



**Das Cyclophilin *EtCyp20.5*
aus *Eimeria tenella*
als Rezeptor für das Antikokzidium
Toltrazuril**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefan Bierbaum
aus Mönchengladbach

Düsseldorf, November 2009

aus der Abteilung für Molekulare Parasitologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung:

„Die Freunde,
die man morgens um vier Uhr
anrufen kann,
die zählen.“

(Marlene Dietrich)

„Gut zu sein,
ist ein größeres Abenteuer
als eine Weltumsegelung.“

(Alessandro Baricco)

„Wenn das Leben dir eine Zitrone gibt,
frag nach Salz und Tequila.“

(Unbekannt)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Kokzidiose und deren Bekämpfung.....	1
1.1.1 <i>Eimeria tenella</i> – Erreger der Geflügel-Kokzidiose.....	1
1.1.2 Pathologie und wirtschaftliche Bedeutung.....	3
1.1.3 <i>Eimeria tenella</i> – Genom und Gene.....	5
1.1.4 Immunantwort gegen <i>Eimeria spp.</i>	6
1.1.5 Bekämpfung.....	8
1.1.6 Toltrazuril (Baycox®) als Chemotherapeutikum.....	9
1.2 Phagen-Display.....	11
1.2.1 M13 Phagen.....	11
1.2.2 Prinzip des Phagen Displays.....	14
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Chemikalien und Reaktionskits	17
2.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	20
2.2.1 Mikrobiologisches Arbeiten.....	20
2.2.2 Molekularbiologisches Arbeiten.....	23
2.3 Versuchstiere, Balterienstämme und Vektoren.....	26
2.3.1 <i>Eimeria tenella</i> Stamm.....	26
2.3.2 Bakterienstämme.....	26
2.3.3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
2.3.4 Vektoren.....	27
2.4 Synthetische Oligonukleotide.....	27
2.4.1 PCR – Primer.....	27
2.4.2 <i>real-time</i> -PCR - Primer	27
2.4.3 Sequenzierungs– Primer.....	27
2.5 Antikörper.....	28
2.5.1 Primärantikörper.....	28
2.5.2 Sekundärantikörper.....	28

2.6	Toxizitätstests mit <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
2.6.1	Haltung der Würmer.....	28
2.6.2	„Semi-Synchronisation“ von Wurmpopulationen.....	28
2.6.3	Toxizitätstests in Flüssigkultur.....	29
2.6.4	Endpunkte der Toxizitätstests.....	29
2.7	Mikrobiologische Methoden.....	30
2.7.1	Lagerung von Bakterienstämmen.....	30
2.7.2	Ansetzen von Vorkulturen.....	30
2.7.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	30
2.7.4	Transformation.....	31
2.7.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α TM -T1R mit pCR [®] 2.1 TOPO [®]	31
2.7.4.2	Transformation von <i>E. coli</i> TOP10 mit pBAD/Thio His TOPO [®]	31
2.7.5	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	32
2.7.5.1	Pilotexpression.....	32
2.7.5.2	Expression in großem Maßstab.....	32
2.8	Phagen-Display.....	32
2.8.1	Phagen-Display mit der Ph.D. TM 12mer Peptide Library.....	32
2.8.2	Titerbestimmung.....	33
2.8.3	ELISA-Studien zur Bindungsaffinität („Phagen-ELISA“)......	33
2.8.3.1	Phagen-ELISA mit „Liganden-coating“.....	33
2.8.3.2	Phagen-ELISA mit „Phagen-coating“.....	34
2.9	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.9.1	Isolation und Analyse von Nukleinsäuren.....	35
2.9.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von Gesamt-RNA.....	35
2.9.1.2	DNA-Präzipitation.....	35
2.9.1.3	Plasmidpräparation im analytischen Maßstab („Minipräp“)......	35
2.9.1.4	Plasmidpräparation im mittleren Maßstab („Midipräp“)......	36
2.9.1.5	Isolation und Aufreinigung von M13ss-DNA.....	36
2.9.1.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
2.9.1.7	Isolation mittels Agaraseverdau.....	36
2.9.1.8	Isolation mittels Silica-Matrix.....	37
2.9.1.9	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von.....	37
2.9.1.10	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	38
2.9.1.11	Denaturierende Gelelektrophorese von RNA („Glyoxal-Gel“)......	38
2.9.1.12	Northern-Blot.....	39

2.9.1.13	Hybridisierung von RNA mittels radioaktiver DNA-Sonden.....	39
2.10	Enzymatische Reaktionen.....	40
2.10.1	Restriktionshydrolyse.....	40
2.10.2	Dephosphorylierung.....	40
2.10.3	Enterokinase-Verdau.....	40
2.10.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, 'polymerase chain reaction').....	41
2.10.4.1	Konventionelle PCR.....	41
2.10.4.2	cDNA-Synthese.....	42
2.10.4.3	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.....	43
2.10.4.4	5'/3'-RACE-PCR.....	44
2.10.4.5	'nested'-PCR.....	44
2.10.5	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	44
2.11	TOPO TA [®] Klonierung.....	45
2.11.1	Klonierung in den pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor.....	46
2.11.2	Klonierung in den pBAD/Thio His TOPO [®] -Vektor.....	46
2.12	Sequenzierung.....	46
2.13	Proteinisolation und Analyse.....	47
2.13.1	Isolation von Gesamtprotein aus <i>E. coli</i>	47
2.13.2	Lösliche Proteinen aus <i>E. coli</i>	47
2.13.3	Proteine aus Inklusionskörpern (IBs, 'inclusion bodys').....	48
2.13.4	Ultrafiltration über Vivaspin [®] 15R-Konzentratoren.....	48
2.13.5	TCA-Präzipitation.....	49
2.13.6	Chloroform/Methanol-Präzipitation.....	49
2.13.7	Aceton-Präzipitation.....	49
2.13.8	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (,IMAC').....	50
2.13.9	'reverse phase high pressure liquid chromatographie' ('RP-HPLC').....	50
2.13.10	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford-Assay	51
2.13.11	Gelelektrophorese von Proteinen.....	52
2.13.11.1	Vorbereitung von Gesamtprotein-Proben.....	52
2.13.11.2	Vorbereitung von aufgereinigten Protein-Proben.....	52
2.13.11.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	52
2.13.12	Nachweis von Proteinen.....	53
2.13.12.1	Coomassie-Färbung.....	53
2.13.12.2	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran.....	53
2.13.12.3	Ponceau S Färbung.....	54

2.13.12.4	Immundetektion mit Antikörpern.....	54
2.14	Enzymkinetik.....	55
2.14.1	Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Assay (,PPlase-Assay‘).....	55
2.14.2	Chaperon-Assay (‘refolding assay‘).....	57
2.15	Fluoreszenz-Titration.....	57
2.16	<i>In vitro</i> Exzystierung von <i>Eimeria tenella</i>	58
2.17	Recherche in Datenbanken.....	58
3.	Ergebnisse.....	61
3.1	Phagen-Display gegen Toltrazuril.....	61
3.2	Datenbank-Recherche mit den angereicherten Peptiden.....	61
3.3	Klonierung und Expression von rekombinantem <i>EtCyp20.5</i> in <i>E. coli</i>	67
3.3.1	Enterokinase-Verdau von <i>EtCyp20.5</i>	70
3.4	Nachweis der PPlase-Enzymaktivität von <i>EtCyp20.5</i>	70
3.4.1	Aktivitätsverlust von <i>EtCyp20.5</i> über die Zeit.....	71
3.4.2	<i>EtCyp20.5</i> : PPlase-Inhibitionsstudien.....	73
3.5	Nachweis der <i>EtCyp20.5</i> Chaperon-Aktivität.....	77
3.5.1	<i>EtCyp20.5</i> : Chaperon-Inhibitionsstudien	78
3.6	Klonierung und Expression von rekombinantem <i>EtCyp18.7</i> in <i>E. coli</i>	79
3.7	<i>EtCyp18.7</i> : PPlase-Inhibitionsstudien.....	81
3.8	<i>EtCyp18.7</i> : Chaperon-Inhibitionsstudien.....	82
3.9	Fluoreszenz-Titration	83
3.10	<i>C. elegans</i> Toxizitätstests.....	85
3.11	<i>In vitro</i> Exzystierung von <i>Eimeria tenella</i>	88
4.	Diskussion.....	91
4.1	Identifikation neuer putativer ‚Drug Targets‘ mittels Phagen Display.....	91
4.2	Cyclophiline.....	93
4.3	Kinetik von PPlase katalysierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierungen.....	96
4.4	Rekombinante Expression von katalytisch aktivem <i>EtCyp20.5</i>	98
4.5	<i>EtCyp20.5</i> Inhibitionsstudien mittels PPlase- und RNase T1-,refolding‘-Assay....	100
4.6	Untersuchungen zur Toltrazuril-Binderegion.....	101
4.7	Übertragung der <i>in vitro</i> Effekte auf <i>in vivo</i> Systeme.....	102

4.8 <i>EtCyp20.5</i> als spezifisches ‚target‘ für Toltrazuril.....	104
4.9 Ausblick.....	105
5. Zusammenfassung.....	107
6. Literaturverzeichnis.....	109
7. Abkürzungsverzeichnis.....	119
8. Anhang.....	123
8.1 Kinetik von chemischen Reaktionen zweiter Ordnung.....	123
8.2 Berechnung von K_D -Werten.....	123
8.3 Berechnung von inhibitorischen Effekten.....	124
9. Danksagungen.....	125
10. Eidesstattliche Erklärung.....	127
11. Lebenslauf.....	129

1 Einleitung

1.1 Kokzidiose und deren Bekämpfung

1.1.1 *Eimeria tenella* – Erreger der Geflügel-Kokzidiose

Eine der bedeutsamsten Parasitosen der heutigen Zeit ist die Kokzidiose, eine Durchfallerkrankung, die durch Protozoen der Gattung *Eimeria* hervorgerufen wird, unbehandelt zum Tod des Wirtes führt und insbesondere in der industriellen Masttierhaltung enorme wirtschaftliche Schäden verursacht. Weltweit bewegen sich die Kosten, welche durch Behandlung und Prophylaxe allein in der Geflügelindustrie anfallen im Bereich von mehr als drei Milliarden US\$ pro Jahr (Dalloul und Lillehoj, 2006). Diese gigantisch anmutende Zahl setzt sich zu etwa 80% aus Verlusten bei der Aufzucht von Broilern und zu 17,5% aus Kosten für Chemotherapie und Prophylaxe zusammen.

Der Parasit wird in der neueren Taxonomie der Protozoen dem Subphylum Apikomplexa (=Sporozoa) zugeordnet, zu dem auch die Vertreter *Plasmodium spp.* (Erreger der Malaria), *Toxoplasma spp.* (Erreger der Toxoplasmose), *Neospora caninum* (Erreger der Neosporiosis) und *Cryptosporidium parvum* gezählt werden, welche sich durch eine ausschließlich endoparasitäre Lebensweise und eine hohe Wirtsspezifität auszeichnen. Namensgebend ist der so genannte Apikalkomplex, ein ultrastruktureller Verband aus sekretorischen und strukturbildenden Organellen am apikalen Pol der infektiösen Stadien. Er besteht aus den Rhoptrien, den Mikronemen und den dichten Granula. Strukturbildend ist das Conoid mit den Polringen und den subpelliculären Mikrotubuli (Jenkins, 1998). Bis heute sind ca. 800 *Eimeria*-Arten beschrieben, wobei sieben eine Kokzidiose im Haushuhn (*Gallus gallus*) auslösen können: *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria maxima*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria mitis*, *Eimeria acervulina* und *Eimeria praecox*. Der für die Geflügenindustrie bedeutsamste und zugleich stärkst pathogene Erreger ist *Eimeria tenella* (Shirley, 2005; McDougald und Fuller, 1997).

System: Protozoa (Einzeller)	
Stamm: Apikomplexa (Sporozoa)	
2. Klasse: Sporozoea	
2. Unterklasse: Coccidia	
2. Ordnung: Eucoccidia	
1. Unterordnung: Eimeriina	2. Unterordnung: Haemosporina
Gattung: <i>Eimeria</i>	Gattung: <i>Plasmodium</i>
Gattung: <i>Toxoplasma</i>	Gattung: <i>Babesia</i>
Gattung: <i>Sarcocystis</i>	Gattung: <i>Theileria</i>
Gattung: <i>Cryptosporidium</i>	
Gattung: <i>Neospora</i>	

Abb.1.1 Systematische Einordnung von *Eimeria spp.*

Auszug aus der Systematik der Protozoen, in der die Gattung *Eimeria* und andere Vertreter eingeordnet sind (nach Mehlhorn, 2001)

Wie bei allen Apikomplexa ist der Lebenszyklus des Parasiten monoxem und in eine asexuelle Vermehrung (Schizogonie) und eine sexuelle Vermehrungsphase (Gamogonie) unterteilt. Außerdem findet man exogen zur Infektion führende „Sporen“. Hühner infizieren sich durch orale Aufnahme von reifen, sporulierten Oozysten mit dem Futter. Im Kaumagen der Tiere erfolgt eine erste mechanische Bearbeitung der Oozystenhülle. Im Dünndarm der Hühner wird die äußerst robuste Oozystenwand enzymatisch durch die Wirkung von Trypsin und Gallsalzen aufgebrochen. Die invasiven Stadien (Sporozoiten) exzystieren aktiv durch den Stiedakörper, eine Öffnung am Pol der Sporozysten. Die freien Sporozoiten invadieren dann Epithelzellen an der Spitze der Blinddarmvilli. Dort werden sie von intraepithelialen Lymphozyten aufgenommen und vermutlich über die Lamina propria (Bindegewebsschicht unter dem Epithel) zu den Blinddarmkrypten transportiert, wo sie ihr vorläufiges Ziel erreichen (Lawn und Rose, 1984; Rose *et al.*, 1984). Es ist ebenfalls möglich, dass der Parasit in den Blutkreislauf eindringt (Rose und Hesketh, 1991); dieses Phänomen ist jedoch noch relativ ungeklärt (Vervelde *et al.*, 1995).

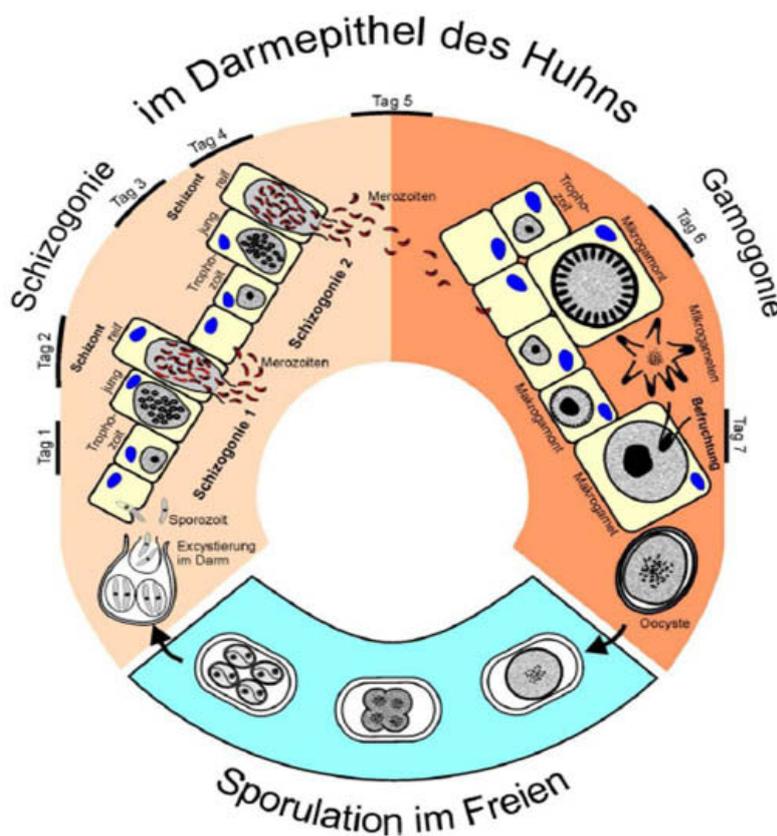


Abb.1.2: Entwicklungszyklus von *Eimeria tenella*

Die Infektion beginnt mit der Aufnahme von Fäzes durch den Wirt, wodurch Oozysten in den Darm gelangen, wo es zur Exzystierung kommt. Die Sporozoiten befallen dann Darmepithelzellen, in denen die Schizogonie stattfindet (hier sind nur zwei Generationen gezeigt). Die daraus resultierenden Merozoiten befallen erneut Darmepithelzellen, in denen dann die Gamogonie vollzogen wird. Nach der Befruchtung werden die Oozysten mit den Fäzes ins Freie abgegeben, wo sie reifen und von einem neuen Wirt aufgenommen werden können wodurch der Zyklus von Vorne beginnt (nach Greif, 2000).

In die Zellen gelangen die Sporozoiten mit Hilfe des Apikalkomplexes, wobei die Mikronemenproteine von außerordentlicher Wichtigkeit zu sein scheinen und als eine Art Zelloberflächen-Rezeptor fungieren (Tomley *et al.*, 1991). Weiterhin scheint die Ausbildung der parasitophoren Vakuole (PV) eng mit den Mikronemen assoziiert zu sein. Durch ein komplexes Zusammenwirken der Strukturen des Apikalkomplexes wird außerdem die Bewegung der

extrazellulären Stadien ermöglicht. In der PV ernähren sich die Parasiten durch Ultracystome (Mikroporen). Hier vollzieht sich auch die Umwandlung zum Trophozoiten am 1. Tag *post infectum* (*p.i.*) und schließlich, nach weiterem Wachstum und einer Abrundung, die Entwicklung zum mehrkernigen Schizonten (2. Tag *p.i.*) aus dem sich rosettenartig bewegliche Merozoiten abschnüren, die bei ihrer Freisetzung die Wirtszelle zerstören. Die nach der ersten Schizogonie freiwerdenden Merozoiten befallen die benachbarten Epithelzellen, die dadurch anschwellen und durch die Basallamina in tieferes Gewebe wandern. Für die Pathologie ist dies der bedeutendste Schritt. Aufeinanderfolgend kann es so zu mehreren Schizontengenerationen kommen, welche die Submucosa stark schädigen, so dass es zu schweren Darmläsionen kommt, die zu den typischen Symptomen der Kokzidiose führen. Ab der dritten Schizogoniegeneration geht der Parasit in die sexuelle Vermehrung über. Dabei wandeln sich die Merozoiten intrazellulär zu haploiden Mikro- und Makrogamonten um. Aus dem Mikrogamonten entstehen zahlreiche begeißelte „männliche“ Mikrogameten, wohingegen sich der Makrogamont zu einem großen Makrogameten differenziert. Im Anschluss verschmelzen die haploiden Keimzellen wieder zu einer diploiden Zygote, die sich zum Sporont weiterentwickelt. Dieser wird von zwei zum Teil sehr widerstandsfähigen Hüllen umgeben, welche durch die so genannten „wall forming bodies“ (WFBs) gebildet werden. Während die 10 nm dicke äußere Oozystenwand durch WFB vom Typ I gebildet wird, besteht die innere 90 nm dicke Wand hauptsächlich aus Glycoproteinen, die aus WFB vom Typ II stammen. Bis heute sind erst einige wenige der Glycoproteine für *Eimeria tenella* beschrieben und charakterisiert (Fetterer und Barfield, 2003). Nach der Fusion der Mikro- und Makrogameten wird die Oozyste unsporuliert mit den Fäzes ausgeschieden. Die Sporulation erfolgt exogen außerhalb des Wirtes in Anwesenheit von ausreichend Feuchtigkeit, Sauerstoff und passender Temperatur innerhalb von zwei Tagen. Die reife Oozyste enthält letztlich zwei Sporozysten mit jeweils zwei Sporozoiten, die erneut durch ein Wirtstier oral aufgenommen werden können. Die sporulierten und nun auch infektiösen Oozysten sind extrem robust und widerstandsfähig (Eschenbacher *et al.*, 1996; Jeurissen *et al.*, 1996) und können als Dauerstadium lange Zeit im Freien überleben (Mehlhorn, 2001). So kann es zu einer milliardenfachen Anreicherung von infektiösen Oozysten kommen, was vor allem bei intensiver Bodenhaltung von Geflügel zu epidemischen Masseninfektionen führen kann (Shirley, 2000).

1.1.2 Pathologie und wirtschaftliche Bedeutung

Von wirtschaftlicher Bedeutung sind hauptsächlich die Geflügel- und Rinderkokzidiosen. Es ist quasi jedes der über 30 Milliarden Hühner, die jährlich weltweit gezüchtet werden, von einer oder mehrerer der sieben *Eimeria*-Arten welche die Geflügelkokzidiose auslösen, betroffen (Klotz *et al.*, 2006). Der Verlauf der Krankheit wird durch eine Reihe von Faktoren, wie dem Alter des Wirtstieres oder dessen Immunstatus bestimmt (Rose, 1978; Yun *et al.*, 2000), jedoch maßgeblich durch die

Anzahl der aufgenommenen Oozysten (Vermeulen, 1998). Hierbei gewinnt der Verlauf der Krankheit durch eine größere Anzahl deutlich an Heftigkeit. Da es sich bei *Eimeria tenella* um einen in der Natur sehr häufig vorkommenden Erreger handelt, verwundert es nicht, dass Infektionen kaum vermieden werden können und nahezu jedes Haushuhn in seinem Leben mit Kokzidiose konfrontiert wird. In natürlichen Populationen, in denen gemischtaltes Tiere miteinander leben, herrscht nach allgemeiner Auffassung ein enzootisches Gleichgewicht in dem sich Jungtiere durch moderate, natürliche Infektionen einen belastbaren Immunschutz gegen Reinfektionen aufbauen können. Wirklich schlimme Ausmaße entwickelt die Krankheit praktisch nur in Gruppen gleichaltriger Tiere, wie man sie beispielsweise in Aufzuchtbetrieben der Geflügelindustrie bei intensiver Bodenhaltung findet (Greif, 2000). Nach der Aufnahme von Oozysten über den Fäzes kommt es nach einer Präpatenzzeit von etwa 5 Tagen zu den ersten Krankheitssymptomen, die im Volksmund als „Rote Ruhr“ oder „Kükenruhr“ bekannt sind. Es kommt zu einer hämorrhagischen Thyphilitis mit starken Entzündungsreaktionen und blutigem Durchfall, bei der eine Mortalität von bis zu 80% beobachtet wird. Je nach Infektionsdosis, bestimmt durch die Anzahl der aufgenommenen Oozysten, kommt es daneben zu einer allgemeinen Abgeschlagenheit, unbefriedigender Gewichtszunahme, verringerter Legeleistung und Nahrungsaufnahme, großem Gewichts- und Blutverlust, schließlich folgt der Tod (Greif, 2000).

Auf der anderen Seite geht die massive Nachfrage der Bevölkerung nach billiger, proteinreicher Nahrung mit einer intensivierten Geflügelindustrie einher, wobei großangelegte Mast- und Aufzuchtbetriebe zur Deckung des weltweiten Nahrungsbedarfs benötigt und eingesetzt werden (Ruff, 1999). Diese widernatürliche Massentierhaltung, vor allem die intensive Bodenhaltung gleichaltriger Tiere auf engstem Raum, bewirkt jedoch erst die dramatischen Auswirkungen der Kokzidiose (Greif, 2000). Bedingt durch den schlechten Allgemeinzustand erkrankter Tiere treten häufig zusätzliche Erkrankungen durch Superinfektionen auf, beispielsweise nekrotische Enteritis, verursacht durch eine Infektion mit dem Bakterium *Clostridium perfringens* (Williams, 2005).

Für alle *Eimeria*-Infektionen lassen sich drei prinzipielle Krankheitsverläufe unterscheiden: Als schwerste Verlaufsform gilt die *klinische Kokzidiose*. Diese ist gekennzeichnet durch eine hohe Mortalitäts- und Morbiditätsrate, verbunden mit zum Teil starken und blutigen Durchfällen. Die Symptomatik der *subklinischen Kokzidiose* fällt dahingegen schwächer aus und äußert sich in allgemeiner Abgeschlagenheit, verringerter Nahrungsaufnahme und damit auch in einer unbefriedigenden Gewichtszunahme. Die Aufnahme einer sehr geringen Anzahl an Oozysten führt zu einer Infektion, die keine erkennbaren negativen Auswirkungen auf den Wirt ausübt. Diese schwache Infektionsform, welche auch als *Kokzidiasis* bezeichnet wird, tritt meist bei teilimmunisierten Tieren auf (Levine, 1963).

Selbst bei neu angelegten Geflügelproduktionsstätten kommt es schon nach wenigen Wochen zur Einschleppung von Kokzidien (McDougald und Reid, 1997). Die extrem hohe Reproduktivität des Parasiten und die endemische Ausbreitung über die robusten Oozysten machen es unmöglich, eine Kokzidien-freie Geflügelfarm vorzufinden. All diese Fakten erklären das stetig wachsende Interesse an der Erforschung wirkungsvoller Mittel zur Prävention und Therapie.

1.1.3 *Eimeria tenella* Genom und Gene

Die meisten genetischen Informationen des Parasiten besitzt man heute dank des *Eimeria*-Genomprojektes (www.sanger.ac.uk; www.genedb.org/eimeria). Diese Institution wurde von Dr. Martin W. Shirley und Dr. Fiona M. Tomley (Institute for Animal Health, Compton, UK), sowie Dr. Bart Barrell und Dr. Al Ivens (Sanger Institute, Cambridge, UK) ins Leben gerufen und beschäftigt sich mit dem „Houghton“-Stamm von *Eimeria tenella*. Dieser *Eimeria*-Stamm ist deshalb auch der am Besten charakterisierte und steht stellvertretend für alle anderen *Eimeria*-Arten. Finanziert wird das Projekt vom Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) in England. Das oberste Ziel ist eine mehrfache Sequenzierung des gesamten Parasiten-Genoms. Dazu nutzt man so genannte „shotgun“-Sequenzierungen, bei denen man kurze, 1500-2000 bp lange, genomische Fragmente von *Eimeria tenella* ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen in eine riesige Datenbank einspeist. Die als Ergebnis dieser „shotgun“-Sequenzierungen vorliegenden 750.000 ca. 400 bp langen Einzelsequenzen ergeben ca. 300 Mbp sequenzierte DNA, also das Fünffache des gesamten haploiden Genoms (60 Mbp). Mit Hilfe von entsprechenden Computerprogrammen werden die Einzelsequenzen überlappend zusammengesetzt, um immer größere Genomabschnitte, so genannte „contigs“, zu bilden. Je weiter die Arbeit des *Eimeria*-Genomprojektes voranschreitet, desto größer, aber auch weniger werden diese „contigs“, bis letzten Endes das ganze Genom des Parasiten in je einer zusammenhängenden Sequenz pro Chromosom vorliegen soll.

Neben dem nukleären Genom, welches sich auf 14 Chromosomen mit einem GC-Gehalt von etwa 53% und einer Größe von etwa 60 Mbp verteilt, enthalten *Eimeria*-Arten noch drei weitere Genome. Die verschiedenen Chromosomen haben eine Größe von 1 bis mehr als 7 Mbp und stellen das am Besten charakterisierte Genom des Parasiten dar (Hoogendoorn *et al.*, 1998; Shirley, 2000). Überraschenderweise ist die Komplexität des Genoms im Vergleich zu anderen Erregern im Geflügel überaus hoch (Shirley, 1997). Zum Vergleich nimmt das *Eimeria*-Genom 1/20 des Genoms vom Haushuhn (*Gallus gallus*) ein, welches aus 1200 Mbp besteht (Olofsson und Bernardi, 1983; Bumstead und Palyga, 1992). Ein Teil des Genoms liegt in Form zweier ribosomaler DNA-cluster vor. Diese nehmen etwa 2,5% des Gesamtgenoms ein und kommen in so genannten „tandem arrays“ in einer Vielzahl von Kopien auf den Chromosomen 10 und 12 vor. Sie weisen meist die Sequenz GCA bzw. TGC, oder auch TTAGGG auf. Man findet solche „repeats“ in allen kodierenden und

nichtkodierenden Regionen mit bis zu 20 konsekutiven Kopien (Jenkins, 1988; Shirley, 1994). Weiterhin besitzen *Eimeria*-Arten zwei extrachromosomale Genome, ein mitochondriales Genom und ein Plastidgenom unbekannter Lokalisation (Dunn *et al.*, 1998; Kohler *et al.*, 1997). Jene mitochondriale DNA kann in bis zu 30 Kopien vorliegen und besteht aus linearen Einzelmolekülen einer Größe von 6213 bp. Das Plastidgenom kommt hingegen in Di- oder Trimeren einer Größe von etwa 25 kbp vor (Chapman und Shirley, 2003). Einige Arten, wie z.B. *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. praecox* und *E. acervulina*, besitzen zudem virusartige, doppelsträngige RNA-Moleküle (Ellis und Revets, 1990; Lee *et al.*, 1996). Auffälliger Weise konnte diese RNA in *E. tenella* noch nicht nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 1996).

Obwohl das *E. tenella* Genomprojekt seit seiner Bestehung schon äußerst viele Informationen über die Organisation des Parasiten-Genoms gesammelt hat, was eine Datenbankrecherche enorm erleichtert, ist der genaue Aufbau der wenigsten Gene bisher beschrieben. Die Eigenschaften und Funktionen der von ihnen kodierten Proteine sind ebenfalls selten bekannt und charakterisiert. Überdurchschnittlich viele Daten liegen jedoch für verschiedene Mikronemproteine des Parasiten vor. Somit existieren auch keine größeren cDNA- Bibliotheken des Parasiten. Einen Überblick über 500 sogenannte ESTs („expressed sequence tags“), teilweise bekannter Funktion, liefert die Publikation von Wan *et al.* (1999). Interessanterweise lassen sich nur sehr wenige Übereinstimmungen mit dem Genom von *Toxoplasma gondii* finden, obwohl man beide Erreger taxonomisch als nahe Verwandte einordnet. Die Publikation von Ng *et al.* (2002) beschreibt eine vergleichende Analyse von jeweils ca. 500 ESTs von *E. tenella* Sporozoiten, bzw. Merozoiten im Hinblick auf unterschiedliche Genexpression in diesen verschiedenen Entwicklungsstadien. Das zur Zeit größte Projekt zur Identifizierung von Genen ist aus einer Kooperation zwischen den Merck Research Laboratories und der Washington University entstanden, die in großem Maßstab ESTs von Sporozoiten und Merozoiten (2. Generation) des Merck-Stammes von *E. tenella* sequenzieren und analysieren. Die Informationen zu den derzeit 13.190 ESTs, darunter 1.679 Konsensus-Sequenzen, sind unter folgenden Webseiten abrufbar: (www.genome.wustl.edu/est/; www.paradb.cis.upenn.edu/eim/).

1.1.4 Immunantwort des Wirts gegen *Eimeria* spp.

Die Mechanismen, die zur Immunantwort gegen Eimerien im Geflügel führen sind noch relativ ungeklärt. Man beobachtet nach einer Erstinfektion eine fast vollständig ausgeprägte Immunität gegenüber Zweitinfektionen; die genauen Effektoren und Mediatoren sind jedoch nicht bekannt (Allen und Fetterer, 2002; Long 1993). Da man Eimerien fast ausschließlich in Zellen des Darmepithels findet, ist davon auszugehen, dass insbesondere die mukosale Immunantwort des "gut associated lymphoid tissue" (GALT) eine Rolle bei der Abwehr des Parasiten spielt. Abgesehen

davon können natürlich auch die physikalischen Barrieren des Wirtes ein Eindringen des Parasiten verhindern. Aus Studien an Mäusen und anderen Nagern weiß man, dass bei der Ausbildung von Immunitäten gegen Reinfektionen T-Zell-Mediatoren eine wichtige Rolle spielen (Rose *et al.*, 1988). Da die *adaptive Immunantwort* erst verzögert eingreifen kann, werden hauptsächlich die intrazellulären Stadien der Gamogonie von dieser Immunantwort betroffen (Rose und Millard, 1985). Die Hauptmediatoren bei Mäusen sind CD4⁺-T-Zellen, welche durch weniger relevante CD8⁺-T-Zellen unterstützt werden (Rose *et al.*, 1985). Bei einer Primärinfektion mit *Eimeria maxima* konnten erhöhte Transkriptmengen diverser proinflammatorischer und T-Zell-spezifischer Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukinen (IL1, IL6, IL10, IL12) gemessen werden. Der Schlüsselfaktor zur Kontrolle von Erstinfektionen ist IFN- γ (Lowenthal *et al.*, 1998). Wie Studien mit Mäusen und Hühnern ergaben, führt dieses zur Verringerung der Pathologie und zur Limitierung der Parasitenreplikation (Lillehoj und Choi, 1998; Rose *et al.*, 1991). Der IFN- γ vermittelte Mechanismus ist zumindest teilweise abhängig von IL-12 (Lillehoj, 1998). Die Sekretion von IFN- γ erfolgt dabei nicht nur von Zellen des adaptiven Immunsystems, sondern auch durch Zellen des angeborenen Immunsystems, so beispielsweise von den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Schito und Barta, 1997). Man vermutet einen starken Zusammenhang zwischen der Eliminierung der Parasiten und den NK-Zellen, jedoch konnte bis heute keine eindeutige Verbindung nachgewiesen werden (Rose *et al.*, 1995). Es ist jedoch bekannt, dass eine IFN- γ vermittelte Induktion des Enzyms Indoleamin-2,3-dioxygenase in Rinder- sowie Humanzellen das Wachstum der nahen Verwandten *T. gondii* und *N. caninum* hemmt. Der vermutete Mechanismus ist eng mit einem Mangel an Tryptophan assoziiert (Spekker *et al.*, 2009). Die Rolle des *angeborenen Immunsystems* bei einer Erstinfektion mit *Eimeria* besteht neben der Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen vor allem in der Immunregulation und der Antigenpräsentation (Rose, 1996). In diesem Zusammenhang spielen antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen (DZ) die wichtigste Rolle. Jedoch scheinen wie die NK-Zellen auch diese Zellen nicht an einer direkten Eliminierung des Parasiten beteiligt zu sein. Es gibt zum Beispiel keinen eindeutigen Hinweis darauf, dass reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffprodukte Einfluss auf infizierte Zellen haben (Ovington *et al.*, 1995). Bei einer Zweitinfektion mit dem gleichen *Eimeria*-Stamm lässt sich, wie Eingangs bereits angemerkt, eine nahezu vollständige Immunität feststellen, auch wenn die Mechanismen hierbei noch weniger bekannt sind als die Immunantwort bei einer Erstinfektion. Die Eliminierung wird über Zellen des erworbenen Immunsystems vermittelt, wobei man davon ausgeht, dass CD8⁺-T-Zellen als Effektor-Gedächtniszellen agieren (Breed *et al.*, 1996). Als gesichert gilt auch, dass IFN- γ zwar die Eliminierung der Parasiten unterstützt, jedoch für die Ausbildung eines Immunschutzes nicht von großer Bedeutung ist (Smith und Hayday, 2000). Die Rolle von intestinalen Antikörpern, hauptsächlich von IgA, ist ebenfalls noch nicht gänzlich verstanden. Man findet jedoch sowohl IgA als auch IgY und IgM zirkulierend, sowie auf den Schleimhäuten von Hühnern, welche mit *Eimeria*

infiziert waren. An einer Eliminierung der Erreger sind sie jedoch nicht beteiligt (Zightermann *et al.*, 1993). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immunantwort gegen eine Zweitinfektion mit *Eimeria* bei Hühnern zwar ein äußerst wirkungsvoller, jedoch kaum verstandener Mechanismus ist.

1.1.5 Bekämpfung von *Eimeria* spp.

Chemische Wirkstoffe gegen Kokzidien (Antikokzidien) werden schon seit über 70 Jahren in Geflügelbetrieben eingesetzt. Die Kosten, die dabei allein für die Prophylaxe dieser Parasitose aufgewendet werden, belaufen sich jährlich auf mindestens 300 Millionen US\$. In den ersten Jahren verwendete man hauptsächlich Polyether-Ionophore wie Monensin, Narasin, Salinomycin oder Lasalocid (Haberkorn, 1996; Greif, 2000; Greif *et al.*, 2001). Der Einsatz dieser Mittel hat sich lange bewährt, jedoch ist die Entwicklung von Resistenzen ein schwerwiegendes Problem.

Innerhalb weniger Jahre haben sich Resistenzen meist so weit verbreitet, dass die betreffende Substanz praktisch keine Marktchance mehr hat (McDougald und Reid, 1997). Man ist deshalb zu so genannten Rotationsprogrammen übergegangen, während der im rotierenden Wechsel verschiedene Antikokzidien in Futtermitteln, vor allen Dingen bei der Jungtieraufzucht, verwendet werden (Coombs, 2002). Zu dem Problem der Resistenzbildung kommt noch die Tatsache, dass Reste der Wirkstoffe in essbarem Gewebe zurückbleiben können und die ökotoxikologische Belastung für die Umwelt nur bedingt vertretbar ist (Klotz, 2004).

Eine Alternative zur Chemoprophylaxe durch Antikokzidien ist eine Immunisierung der Tiere. Bis heute gibt es schon mehrere Ansätze auf diese Art gegen Kokzidien vorzugehen: Beispielsweise kann eine Immunisierung mit vollvirulenten Erregern, in der Regel mit Oozystenstadien, durchgeführt werden. Dieser Ansatz ist in den Präparaten Immunocox® (Vetech Laboratories, Kanada), Supercox® (Qilu Animal Pharmaceutical Company, China) und Coccivac® (Sterwin Laboratories, USA) verwirklicht. Diese Methode ist deshalb besonders aussichtsreich, da ein Kontakt mit dem Erreger meist lebenslange, belastbare Immunität gegen eine Reinfektion mit der gleichen *Eimeria*-Art vermittelt (Rose und Hesketh, 1976; Rose, 1978; Rose und Wakelin, 1990). Da während der Legeperiode einer Henne die Verwendung von Antikokzidien grundsätzlich untersagt ist, muss die Durchseuchung mit einer milden Infektion schon in jungem Alter erfolgen. Masttiere sind von diesem Problem nicht betroffen, da diese Tiere keiner Beschränkung bei der Verwendung von Chemotherapeutika unterliegen (Greif, 2000).

Ein anderer, jedoch ähnlicher Ansatz ist die Immunisierung mit attenuierten, schwach virulenten Erregern. Dieses Konzept ist zum Beispiel in den Präparaten Paracox® (Shering Plough, UK) und Livacox® verwirklicht. Eine Attenuierung des Erregers lässt man mittels radioaktiver Bestrahlung oder durch eine Passage im Wirt oder in Hühnereiern erreichen. Dies führt dazu, dass die

Schizogonie in den Epithelzellen nur noch ein- bis zweimal abläuft und die Ausmaße der Krankheit dadurch meist stark reduziert sind (Shirley und Belatti, 1988). Da die immunologischen Eigenschaften des Erregers durch das Verfahren erhalten bleiben, ist die Ausbildung einer Immunität nicht negativ beeinflusst.

Ein weiterer Ansatz, welcher jedoch auch gleichzeitig der unausgereifteste ist, ist die Immunisierung mit rekombinanten Antigenen. Hierbei spielt wirtschaftlich die größte Rolle, dass man durch entsprechende Expressionssysteme in kurzer Zeit große Mengen an Antigen relativ günstig herstellen kann, während man durch die Passage von virulenten Erregern nur schwer größere Mengen Lebendimpfstoff erhält (Chapman und Shirley, 2003). Neue, innovative Strategien sind in den Präparaten CoxAbic (Immunität durch maternalen Transfer von Immunoglobinen zum Küken) und InovocoxTM (eine *in ovo* Vakzine) verwirklicht, welche jedoch noch kaum ausgereift und daher derzeit noch nicht marktrelevant sind.

Unter dem Gesichtspunkt der Etablierung einer effizienten, rekombinanten Vakzine wurde bereits eine große Anzahl vielversprechender Antigene entdeckt und für experimentelle Studien genutzt. Jedoch führten alle Ansätze nur zu einer Teilimmunität mit viel geringerer Effizienz im Vergleich zu den verwendeten Lebendimpfstoffen (Vermeulen, 1998; Vermeulen *et al.*, 2001; Jenkins, 1998). Ein Problem liegt in der Entdeckung neuer, protektiver Antigene, da eine beträchtliche Anzahl von Molekülen zwar immunogen ist, jedoch keine ausreichende protektive Immunität auslöst (Blake *et al.*, 2006). Ziel ist es daher, mit verbesserten Methoden mögliche Antigene zu finden, wobei eine Eingrenzung potentieller protektiver Antigene die Suche enorm erleichtern würde. Sekretorische und Membran gebundene Parasitenproteine sind aufgrund der Beteiligung bei der komplexen Interaktion zwischen Parasit und Wirt die wohl interessantesten Kandidaten, da sie am wahrscheinlichsten zur Aktivierung des Immunsystems des Wirts führen (Klotz *et al.*, 2007). Da Lebendimpfstoffe jedoch bisher die einzigen zugelassenen Produkte zur Immunprophylaxe gegen *Eimeria* darstellen (Chapman *et al.*, 2002), existiert ein breites Forschungsfeld zur Identifizierung weiterer Antigene aus *Eimeria* spp.

1.1.6. Toltrazuril (Baycox[®]) als Chemotherapeutikum

Bei Toltrazuril handelt es sich um ein symmetrisches Triazinderivat mit ausgezeichneter Wirkung bei der Behandlung von Kokzidiose, Sarcocystose und Toxoplasmose. Es wurde 1977 von BAYER entdeckt und ist seit 1987 unter dem Namen Baycox[®] auf dem Markt (Greif, 2000). Hauptkonkurrenzprodukt ist das chemisch verwandte Diclazuril (Clinacox[®], Janssen). Als erstes Antikokzidiosemittel wirkt Toltrazuril gegen sämtliche intrazellulären Stadien aller *Eimeria*- und *Isospora*-Arten. Außerdem ist es effektiv gegen *Neospora caninum* (Erreger von Fehlgeburten bei

Rindern und neuromuskulären Erkrankungen in Hunden), *Toxoplasma gondii* (Erreger der Toxoplasmose) und *Sarcocystis spp.* (Erreger der Sarcocystose). Nicht nur im Huhn, sondern auch in anderem Geflügel und Säugetieren wie Gänsen, Hunden, Katzen, Schweinen, Schafen und sogar Igel (Driesen *et al.*, 1995; Gjerde und Helle, 1991; Greif, 2001; Institut für Veterinärpharmakologie Zürich, 2009) lässt sich der antiparasitäre Effekt beobachten. Die verschiedenen Entwicklungsstadien der einzelnen Erreger sind gegenüber dem Wirkstoff unterschiedlich empfindlich (Krampitz, 1988). Einzig zur Behandlung der aviären Kryptosporidiose ist Toltrazuril nicht geeignet. Über die erwiesene Wirksamkeit hinaus, ist jedoch bis heute noch kein genauer molekularer Wirkmechanismus dieses Chemotherapeutikums bekannt. Der Hauptmetabolit Toltrazuril-Sulfon, der nach der Verteilung des Wirkstoffs im behandelten Tier über ein Sulfoxid-Zwischenprodukt gebildet wird und zudem das Hauptausscheidungsprodukt darstellt, entfaltet überraschenderweise ebenfalls noch starke, anti-parasitische Wirkung, weshalb es seit einigen Jahren unter dem Namen Ponazuril (Marquis®) von BAYER vertrieben wird. Toltrazuril wird nach der Applikation langsam aus essbarem Gewebe ausgeschieden (Manger, 1991b; Lindsay, 1995). Es kann in der Pektoralmuskulatur noch 24 h nach Absetzen nachgewiesen werden (Lindsay, 1995).

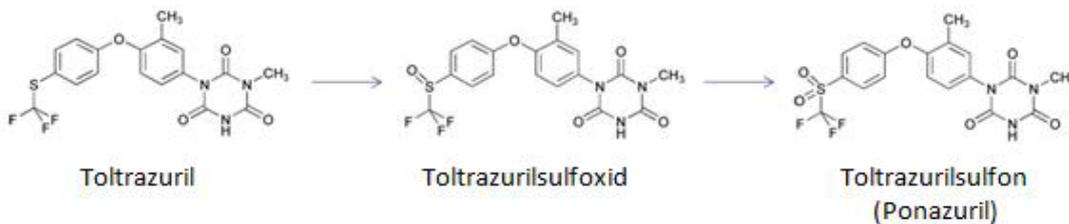


Abb. 1.3: Metabolisierung von Toltrazuril nach oraler Applikation.

Der Wirkstoff wird über das Toltrazurilsulfoxid zum Toltrazurilsulfon umgesetzt. 48 h nach Applikation ist nur noch Ponazuril im Organismus nachweisbar. Toltrazurilsulfon (Ponazuril) wirkt immer noch antiparasitisch und wird als Wirkstoff in der Formulierung Marquis® (Bayer) vertrieben.

Für die beiden Antikozidien Toltrazuril und Ponazuril werden mehrere verschiedene Wirkorte diskutiert, welche man aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen ableiten kann. Jedoch wurde bis heute noch kein eindeutiger Ligand oder Rezeptor identifiziert. Beschrieben sind ultrastrukturelle Veränderungen im Endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien (Mehlhorn *et al.*, 1984). In Mäuseleberzellen zeigte die Substanz eine Hemmung der Atmungskette in den Mitochondrien, da die Aktivität dafür verantwortlicher Schlüsselenzyme wie die Succinat-Cytochrom-C-Reduktase, die NADH-Oxidase, die Succinat-Oxidase und die Fumarat-Reduktase von Toltrazuril inhibiert wurden (Harder, 1989). Man weiß zudem auch, dass Toltrazuril die Kernteilungen bei Schizonten und Mikrogamonten von *E. tenella* negativ beeinflusst (Mehlhorn *et al.*, 1984). Daraufhin wurde ein inhibierender Einfluss von Toltrazuril auf zwei Enzyme der

Pyrimidin-Synthese im Zellkern (Dihydroorotat-Cytochrom-C-Reduktase und Dihydrofolat-Reduktase) postuliert (Lindsay *et al.*, 1994), wobei die zur Hemmung benötigten Toltrazurilkonzentrationen jedoch zu hoch sind, um einen Effekt auf Kokzidien *in vivo* zu erklären. Demnach handelt es sich bei diesen Phänomenen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um spezifische Wirkmechanismen (Harder und Haberkorn, 1989). Hader und Haberkorn (1989) und Hackstein *et al.*, (1995) vermuteten zudem, dass die Wirkung von Toltrazuril auf den Chlorophyll- α -D1 Komplex des Fotosystems II in vergleichbarer Weise auch in den rudimentären Fotosystemen im Apikoplast ablaufen könnte. Dafür spricht, dass in den beiden Toltrazuril-sensitiven Apikomplexen *T. gondii* und *S. muris* ein Fotosystem II, beziehungsweise das vom *psbA*-Gen kodierte D1 Protein als ein entscheidender Bestandteil dieses Systems nachweisbar ist. Weiterhin deuten mikroskopische Beobachtungen darauf hin, dass in den Makrogamonten die Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) vermutlich durch das Chemotherapeutikum zerstört werden (Mehlhorn *et al.*, 1984). Zur selben Zeit wird die Entwicklung einer Immunität des Wirtes während einer Toltrazurilbehandlung nicht gehemmt, sondern stimuliert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die durch Toltrazuril geschädigten intrazellulären Entwicklungsstadien (Schizonten der Generation 1, 2 und 3 und Gamonten) deutlich länger in den Wirtszellen verbleiben und *Eimeria*-Antigene dadurch dem Immunsystem des Wirts effizienter präsentiert werden können. Daraus resultieren signifikant höhere *Eimeria*-spezifische Antikörpertiter im Serum von infizierten Hühnern, welche mit Toltrazuril behandelt wurden (Steinfelder *et al.*, 2005; Greif, 2000). Die protektive Wirkung hält über mehrere Tage nach Dosisverabreichung an. Diese Rückstandsaktivität von Aryltriazinen (Toltrazuril und Diclazuril) ist unter den oral zu verabreichenden Antikokzidien einmalig (McDougald, 1998). Toltrazuril ist mit allen Kokzidiostatika und Antibiotika, die oral verabreicht werden, kompatibel (Manger, 1991b). Der ‚acceptable daily intake‘ (ADI), ein Wert, welcher die akzeptable tägliche Menge, die ein Mensch lebenslanglich täglich verzehren kann ohne gesundheitliche Schäden davonzutragen, beträgt für Toltrazuril 0,002 mg/kg Körpergewicht (EMEA, 1999e).

1.2. Phagen-Display

1.2.1. M13 Phagen

Bei M13 handelt es sich um einen Vertreter aus der Familie der filamentösen Bakteriophagen, zu der auch die Phagen fd und f1 gezählt werden. M13 weist ein relativ kleines, einzelsträngiges DNA-Genom von etwa 6.400 bp Länge auf, welches für 10 Proteine kodiert (pI-pX). Filamentöse Phagen infizieren ausschließlich gram-negative, „männliche Bakterien“ (d.h. F⁺ und Hfr), ohne dabei die Wirtszelle zu lysieren. Während der Infektion wird das ursprüngliche, einzelsträngige Genom des Phagen durch wirtseigene Enzyme in eine doppelsträngige, die so genannte replikative Form (RF),

umgewandelt. Nach einigen Replikationen über theta-förmige Intermediate werden durch *rolling-circle-Replikation* aus der doppelsträngigen, replikativen Form, einzelsträngige (+)-Strang-Moleküle generiert. Die im Zuge dieser *rolling-circle-Replikation* synthetisierte (+)-Strang-DNA wird mit einer Reihe von Hüllproteinen umgeben und als filamentöser Phage von der Wirtszelle ins Medium sezerniert; die „Verpackung“ der DNA in Hüllproteine geschieht dabei nicht vorher in der Zelle, sondern während der Membranpassage. Dies hat zur Folge, dass die beiden Schritte Komplexierung und Sezernierung in einem Wechselspiel gleichzeitig ablaufen müssen (Sambrook und Russel, 2001). Der Phage synthetisiert mehrere Genprodukte, die für die Replikation der viralen DNA unerlässlich sind, so die Produkte pII, pV und pX. Die Produkte pVIII, pIII, pVI und pIX generieren stattdessen das Capsid, also die Hülle des Virus-Partikels, wobei pVIII in 2.700 bis 3.000 Kopien (major coat protein) vorkommt, während die anderen Hüllproteine mit etwa fünf Kopien, in wesentlich geringerer Zahl vorkommen (‘minor coat proteins’).

Die Anordnung des Gen-VIII-Produktes um die Phagen-DNA besteht nach allgemeiner Auffassung aus zwei antiparallelen Ketten von Proteinen, welche die DNA gewindeförmig umgeben und „wie die Schuppen eines Fisches ineinander greifen“ (Rasched und Orberer, 1986). Die Orientierung der Hüllproteine um die DNA ist entscheidend für das Laufverhalten des ganzen Phagen während einer Gelelektrophorese. So sind die sauren Aminosäuren des Proteins am N-terminalen Ende akkumuliert, welches auf der Oberfläche des Virus zu finden ist, während die basischen Aminosäuren im „Innern“ des Phagen überwiegen und das negativ geladene Phosphat-Rückrad der DNA absättigen.

Die Genprodukte sind im Einzelnen:

Gen-I-Produkt: Dieses Produkt läuft bei etwa 35 bis 39,5 kDa in einem Acrylamidgel und wird permanent während der Phagenverpackung in der Wirtszelle gebraucht, wobei man sich über seine Funktion nicht gänzlich im Klaren ist. Man vermutet eine Wechselwirkung mit dem *fip*-Protein des Wirtes während der Phagenverpackung. Es kommt in der Zelle nur in wenigen Kopien vor (Rasched und Orberer, 1986).

Gen-II-Produkt: Man beobachtet bei diesem Genprodukt eine streng spezifische Endonuklease- und Topoisomeraseaktivität, die für die Synthese von neuer, viraler DNA unerlässlich ist. Es scheint unter der regulatorischen Kontrolle des Genprodukt-V zu stehen, hat ein Molekulargewicht von etwa 46 kDa und kommt pro Zelle ungefähr in 1000 Kopien vor (Rasched und Orberer, 1986).

Gen-III-Produkt: Das Produkt von Gen-III gehört zu den „minor coat proteins“ und ist maßgeblich an der Adsorption an die Wirtszelle beteiligt. Es hat ein Molekulargewicht von 42 kDa bis 70 kDa, ist damit ungewöhnlich lang und kommt in 5 Kopien an einem Ende des Phagenpartikels vor (Rasched und Orberer, 1986).

Gen-IV-Produkt: Dieses Genprodukt hat ein Molekulargewicht von 48 bis 50 kDa und ist wahrscheinlich während der Virusverpackung an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert, wo es ähnlich wie das Genprodukt-I die Verpackung des Viruspartikels reguliert (Rasched und Orberer, 1986).

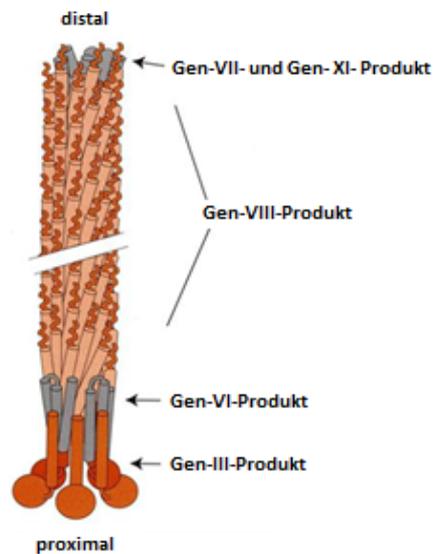


Abb.1.4: Schematische Darstellung eines M13-Bakteriophagen

Die Einzelstrang-DNA wird vom Gen-VIII-Produkt (g8p) umhüllt, welches als „major coat“ Protein mit ca. 3000 Kopien vorliegt. Weitere Genprodukte, die „minor coat“ Proteine III, VI, VII und IX sind am distalen und proximalen Ende lokalisiert (Abbildung verändert nach Sambrook und Russell, 2001).

Gen-V-Produkt: Die wichtigste Funktion dieses Genproduktes ist die Regulation der Anzahl an RF-DNA und der Schutz dieser auf ihrem Weg durch das Cytoplasma des Wirtes zur Zellmembran. Dort wird es durch das Genprodukt-VIII ersetzt. Das Produkt-V hat ein Molekulargewicht von annähernd 10 kDa und ist während der Phageninfektion das am meisten vertretene Produkt mit mehr als 100 Kopien pro Zelle (Rasched und Orberer, 1986).

Gen-VI-Produkt: Ebenfalls zu den „minor coat proteins“ zu zählen ist dieses Genprodukt mit einer Größe von 112 Aminosäuren. Es scheint an der Gestaltgebung des Phagen beteiligt zu sein und kommt, wie das Genprodukt III, in 5 Kopien am selben Ende vor. Über seine genaue Funktion ist jedoch kaum etwas bekannt (Rasched und Orberer, 1986).

Gen-VII- und -IX-Produkte: Diese Proteine haben fast identische Molekulargewichte (3.580 Da und 3.650 Da) und wurden lange für ein einziges Protein gehalten. Auch diese beiden Genprodukte gehören zu den „minor coat proteins“ und kommen in 5 Kopien vor, jedoch am gegenüberliegenden Ende wie das Gen-III- und das Gen-VI-Produkt. (Rasched und Orberer, 1986).

Gen-VIII-Produkt: Da das Gen-VIII-Produkt (5.200 Da) auf dem Virus in über 2.700 bis 3.000 Kopien vorkommt, ist es zu einem beliebten Gegenstand der Forschung geworden und über seine Gestalt und Konformation gibt es die meisten Informationen. Es ist 50 Aminosäuren lang und wird als Vorläuferform mit einer Signalsequenz von 23 Aminosäuren synthetisiert. Nach der Abspaltung des SP lokalisiert es sich in der Wirtsmembran und ist aus diesem Grund auch Gegenstand vieler

Forschungen zu Translokationen von Membranproteinen geworden (Rasched und Orberer, 1986). Stopar *et al.* (2002) haben eine Publikation über die Interaktionen des Gen-VIII-Produktes veröffentlicht, aus der hervorgeht, dass durch die Wirkung von SDS (Natriumdodecylsulfat) nicht nur eine Dissoziation der Proteine aus dem Hüllproteinverband erreicht werden kann, sondern dass das Gen-VIII-Produkt in dieser veränderten Konformation eine hohe Affinität zur Bildung eines Dimers aufweist. Eine Tatsache, welche bei der Auftrennung von M13 Phagen in einem Polyacrylamidgel berücksichtigt werden muss. Das gebildete Dimer läuft dann bei einer Größe von etwa 27 kDa (Henry und Sykes, 1993) und dimerisiert durch eine Helix-Helix-Interaktion. Diese Oligomerisationsbereiche sind es auch, die zum Zusammenhalt am Phagen führen (Williams *et al.*, 1995).

Gen-X-Produkt: Das Produkt dieses Gens ist in seiner Funktion sehr eng verbunden mit dem Gen-II-Produkt. Seine Funktion ist jedoch ebenfalls nicht gänzlich verstanden. Man geht jedoch davon aus, dass es eine zentrale Rolle bei der Replikation der Phagen-DNA spielt (Rasched und Orberer, 1986).

1.2.2 Prinzip des Phagen-Display

Beim Phagen-Display macht man sich zu Nutze, dass es mittels blunt-end-Klonierung möglich ist, fremde chromosomale DNA aus Bakterien, cDNA aus Eukaryonten oder zufällige „random“ Nukleotidsequenzen als Fusionsprotein eines Hüllproteins auf der Oberfläche filamentöser Phagen zu exprimieren (Devlin *et al.*, 1990; Jacobsson *et al.*, 2003). Hierfür sind sowohl das Gen-VIII-Produkt, als auch das Gen-III-Produkt besonders geeignet, wobei die beiden Hüllproteine sich in Anzahl und Position am Phagenpartikel deutlich unterscheiden. Liegt die fremde DNA im selben Leseraster wie die kodierende Sequenz für das Hüllprotein, kann mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit das fremde Polypeptid auf der Oberfläche des Phagen exprimiert werden. Nun ist es möglich, aus einem Phagen-Pool geeigneter Größe spezifisch Polypeptide gegen einen immobilisierten Liganden zu selektionieren, um Bindungssequenzen zu identifizieren. Dieses Verfahren wird als „Panning“ bezeichnet. Dabei können monoklonale Antikörper, Proteine, spezifische DNA-Moleküle sowie Kohlenhydrate als Liganden eingesetzt werden (D’Mello *et al.*, 2001). Nach einer Elution der gebundenen Phagen, dem Abwaschen schwach und unspezifisch gebundener Phagen und einer Amplifikationsphase setzt man den selektionierten Pool erneut ein, um Runde für Runde die Anzahl an verschiedenen Phagen immer weiter einzugrenzen. In der Regel wird der Ligand auf eine geeignete Oberfläche, wie zum Beispiel eine Mikrotiter-Platte, immobilisiert, es sind jedoch auch andere Verfahren umsetzbar, wie beispielsweise die Kopplung an paramagnetische Polystyrol-Beads. Will man für die Wechselwirkung mit einem Liganden das ganze Genom eines Organismus untersuchen, was den Vorteil hat, dass auch alle Proteine, die nur kurz oder stadienspezifisch exprimiert werden „gescreent“ werden können, kann man die Anzahl der

verschiedenen Klone, die man braucht um ein Genom statistisch abzudecken, leicht mit folgender Gleichung berechnen:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - \frac{a}{b})}$$

,wobei gilt:

N = Die Anzahl der benötigten Klone

P = Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Fragmentes

a = Die beabsichtigte Größe der DNA-Fragmente

Das Verfahren wurde erstmals 1985 von G. Smith beschrieben, der mit den Phagen M13, fd und f1 arbeitete. Zwar wurden bis zum heutigen Tag schon sämtliche der fünf Hüllproteine filamentöser Phagen versuchsweise genutzt, um als Fusionsprotein zu fungieren, die Genprodukte-III und -VIII haben sich jedoch als die besten Fusionspartner erwiesen. Der Vorteil dieser Methode ist vor allen Dingen das schnellere „Screening“, mit welchem man in kurzer Zeit sehr große Mengen von Proteinsequenzen nach geeigneten Interaktionspartnern durchsuchen kann. Dennoch ist das Verfahren des Phagen-Displays nicht ganz unproblematisch. Falls beispielsweise alle der fünf Kopien des Gen-III-Produktes mit einer größeren Peptidsequenz fusioniert wären, kann dies zu einer stark verschlechterten Infektivität führen. Außerdem kann, bei einer Fusion vieler Gen-VIII-Produkte, die ganze Struktur des Phagen instabil werden. Um dies zu vermeiden nutzt man heute Phagen, die auf ihrer Oberfläche eine Mischung aus Fusions- und Wildtypproteinen exprimieren (Jacobsson *et al.*, 2003).

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit, sollten auf Basis der Methode des Phagen-Displays neue putative Targets für das Antikozidium Toltrazuril identifiziert und charakterisiert werden, um den bislang unbekanntem Wirkmechanismus dieses Chemotherapeutikums zu klären. Dazu standen Caeca infizierter Hühner (*Gallus gallus*), sowie eine kommerzielle „random“ Dodecapeptid-Phagen-Bibliothek auf Basis von filamentösen M13-Phagen zur Verfügung.

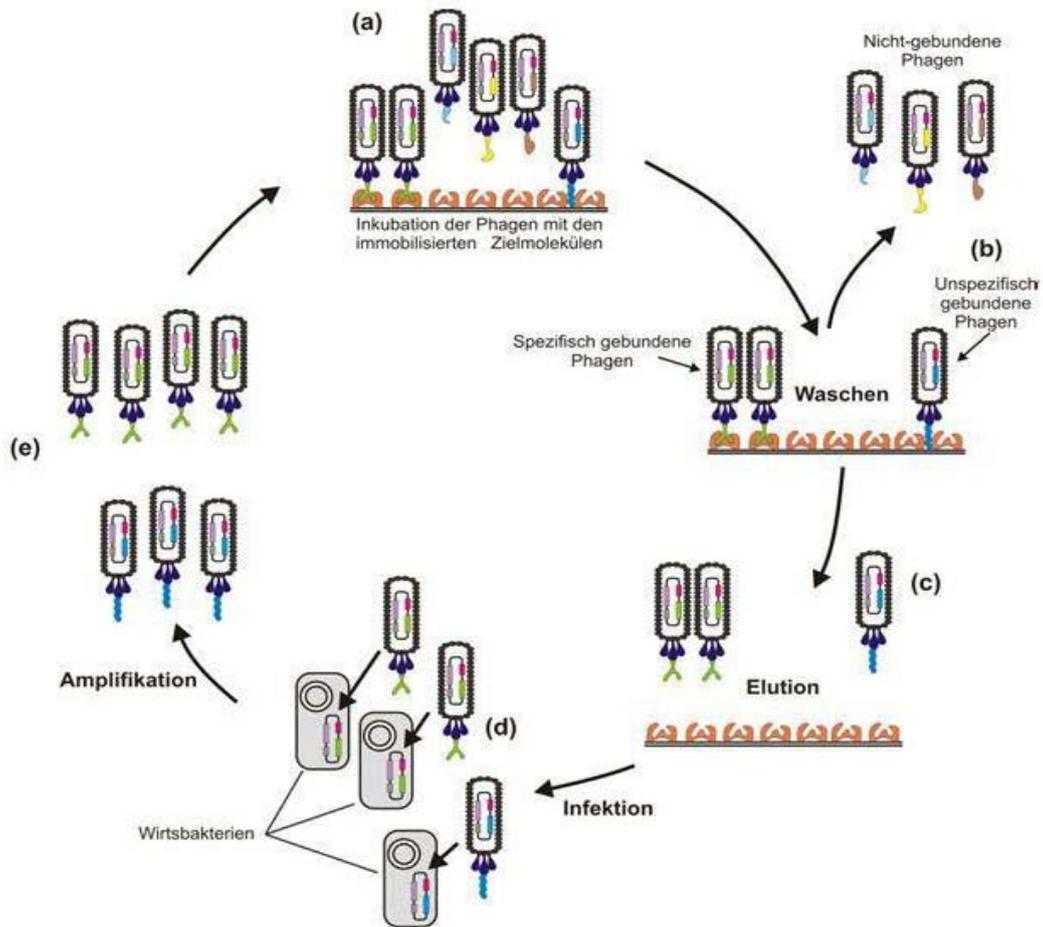


Abb.1.4: Prinzip des Phagen Displays

Ein Phagenpool wird einem „biopanning“ gegen einen immobilisierten Liganden unterzogen (a). Das Eluat mit den spezifisch bindenden Phagen wird nach einem Waschschrift (b,c) für eine Reinfektion von Bakterienzellen eingesetzt, so amplifiziert (d) und für eine weitere, zweite Bindereaktion eingesetzt (e). Nach der dritten „Runde“ erfolgt dann die Charakterisierung der Phagen bzw. der Gen-III-Fusionsproteine, um die hypothetische Bindungssequenz für den immobilisierten Liganden zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reaktionskits

- A** Acrylamid M-Bis 29:1, 30 % Stock Solution (Serva GmbH, Heidelberg)
Agarase [0,5 U/ μ l] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Agarose (Biozym Diagnostik, Hessisch Oldenburg)
Agarose-Gel Ladungspuffer (6 \times Loading Dye Solution) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Albumin Fraktion V (Roth, Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (Merck, Darmstadt)
Arabinose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- B** Bacto™ Trypton (BD, Le Pont de Claix, Frankreich)
Bacto™ Yeast Extrakt (BD, Le Pont de Claix, Frankreich)
Bacto™ Agar (BD, Le Pont de Claix, Frankreich)
BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories GmbH, München)
- C** Carbenicillin (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg)
 α -Chymotrypsin Bovine Pancreas (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
Cyclosporin A (Fluka, Neu Ulm)
CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- D** D-19-Entwickler (Kodak GmbH, Stuttgart)
[α^{32} P] dCTP (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege)
DEPC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
Diclazuril (Bayer AH, Monheim)
 λ DNA *EcoRI/HindIII* Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
DNase I [1 U/ μ l] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
DTT (Gerbu, Gaiberg)
- E** ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia, Freiburg)
ECL Western Blotting Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL USA)
EcoRI [10 U/ μ l] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
EDTA (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Einmal-Küvetten 1,6 ml (VWR International GmbH, Darmstadt)
Emodepsid (Bayer AH, Monheim)

- Ethidiumbromidlösung [1 %] (Roth, Karlsruhe)
- F** Filterpapier (Whatman Ltd., Maidstone, England)
Fixierersalz sauer (Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt)
- G** Go-*Taq*-Polymerase (Promega, Heidelberg)
- H** Hellmanex® II (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim)
Hepes (Roth, Karlsruhe)
HotStar *Taq*-Polymerase (Quiagen, Hilden)
- K** Küvetten OS (Volumen: 700 – 1000 µl) (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim)
Küvetten QS (Volumen: 100 – 200 µl) (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim)
- L** LiCl (VWR International, Leuven, Belgien)
Long Ranger Gel Solution (Cambrex BioScience Rockland, Inc., Rockland, ME USA)
Low-melting-point Agarose (Biozym, Hess, Oldendorf)
Lysozym aus Hühnereiweiß (Applichem GmbH, Darmstadt)
- M** 2-Mercaptoethanol [50 mM] (Roth, Karlsruhe)
Methylcarboxyponazuril (Bayer HC, Monheim)
MgCl₂ × 6 H₂O (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg)
96 well microtiter plates (Nunc, Wiesbaden)
Mssl (PmeI) [5 U/µl] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- N** Nitrocellulose Transfer Membran (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel)
N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid (Sigma, Missouri, USA)
NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren)
NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- O** Oligo-(dT)-Primer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
OPD Tablets for ELISA (Dako Cytomation, Denmark)
- P** PageBlue™ Protein Staining Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
pBAD/TOPO® ThioFusion™ Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

PCR Extender System (Triple Master PCR System) (5 Prime GmbH, Hamburg)
 PCR Nukleotid-Mix (dNTP) [10 mM/nt] (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Pdil (NaeI) [10 U/μl] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 Penicillin-Streptomycin (GIBCO BRL®, Invitrogen, Karlsruhe)
 peqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
 Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
 Platinum® *Pfx* DNA Polymerase [2,5 U/μl] (Invitrogen, Karlsruhe)
 Ponazuril (Bayer HC, Monheim)
 Ponazuril, biotinyliert (Bayer HC, Monheim)
 Ponceau S (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
 Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 Protino® Ni-TED 1000 (Macherey-Nagel, Düren)
 pUC-Mix 8 Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Heidelberg)

Q Q-Solution (Quiagen, Hilden)

R 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 RNase T1 [1000 U/μl] aus *Aspergillus oryzae* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 Roti®-Block-Lösung (10×) (Roth, Karlsruhe)
 Roti®-Load-Ladungspuffer (4×) (Roth, Karlsruhe)

S SDS (Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg)
 Shrimp alkalische Phosphatase [1 U/μl] (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
 SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe)
 Sterilfilter (Nunc, Wiesbaden)
 Streptavidin/HRP (Amersham Life Science, Freiburg)
 Streptavidin F96 clear Immobilizer plates (Nunc, Wiesbaden)

T TEMED (Roth, Karlsruhe)
 2,2,2,-TFE (Fluka, Neu Ulm)
 Toltrazuril (Bayer HC, Monheim)
 Toltrazuril, biotinyliert (Bayer HC, Monheim)
 TOPO TA Cloning® Kit mit pCR®2.1-TOPO® Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)
 Triple Master PCR System (Eppendorf, Hamburg)

Tris (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

Tween®20 (Roth, Karlsruhe)

V Vivaspin 20/50 Konzentratoren 30,000 MWCO (Sartorius AG, Göttingen)

Vivaspin 20/50 Konzentratoren 5,000 MWCO (Sartorius AG, Göttingen)

W Western Transfer-Puffer (20x) (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO USA)

Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie (Biozym, Hess. Oldenburg; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Invitrogen, Leek, NL; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg; USB, Bad Homburg; New England Biolabs, Frankfurt am Main)

2.2 Lösungen, Puffer und Medien

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien aufgeführt. Diese wurden, wenn nicht anders vermerkt, ausschließlich mit hochreinem Wasser einer Aufbereitungsanlage Direct-Q™ (Millipore GmbH, Schwalmbach) hergestellt, welches im weiteren Verlauf als dH₂O bezeichnet wird.

2.2.1 Mikrobiologisches Arbeiten:

Ampicillin (50 mg/ml)	1 g Ampicillin ad 20 ml dH ₂ O Sterilfiltration
Block-Puffer (Phagen-Display)	0,1 M NaHCO ₃ 5 mg/ml BSA 0,1 µg/ml Streptavidin 0,02 % (v/v) NaN ₃ pH 8,6
Carbenicillin (60 mg/ml)	1,2 g Carbenicillin dH ₂ O ad 20 ml Sterilfiltration
Elutions-Puffer (Phagen-Display)	0,2 M Glycin/HCl 1 mg/ml BSA pH 2,2
Bakterien-Einfriermedium	50 % (v/v) Glycerin 50 % (v/v) LB-Medium

LB-Agar	LB-Medium 1,5 % Agar (w/v)
LB-Top-Agar	LB-Medium 2 % (w/v) $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 1,5 % (w/v) Agarose
Luria Bertani- (LB-) Medium	1,0 % (w/v) Trypton 1,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Hefeextrakt dH ₂ O ad 1 l pH 7,5
M9-Medium	6 g Na_2HPO_4 3 g KH_2PO_4 0,5 g NaCl 1 g NH_4Cl ad 990 ml dH ₂ O; autoklavieren 10 ml M9-,Additive' dazu geben
M9-,Additive'	100 mM MgSO_4 20 % (w/v) Glucose 10 mM CaCl_2 100 mM Thiamine-HCl
Medium A	5,0 g NaCl 5,0 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 1,23 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g Glucose ad 500 ml dH ₂ O pH 7,5
Medium B	5,0 g NaCl 5,0 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 1,48 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 12 % (w/v) PEG 8000 36 % (v/v) Glycerin ad 500 ml dH ₂ O pH 7,0
Neutralisierungspuffer	2 M Tris-HCl pH 8,6
NGM-Agar	3 g NaCl 2,5 g Trypton 5 mg Cholesterin (5 mg/ml in Ethanol) 17 g Agar ad 975 ml dH ₂ O, autoklavieren 1 ml 1 M CaCl_2 1 ml 1 M MgSO_4 25 ml 1 M KH_2PO_4 , pH 6,0

NZY-Medium	<p>5 g NaCl 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amin ad 1 l dH_2O pH 7,5</p>
PBS ⁻	<p>8 g NaCl 0,2 g KCl 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g KH_2PO_4 ad 1 l dH_2O pH 7,5</p>
PBST	<p>PBS⁻ 0,05 % (v/v) Tween[®]20</p>
PEG/NaCl	<p>20 % (w/v) PEG 8000 2,5 M NaCl</p>
S-Basal	<p>5,85 g NaCl 1,1 g K_2HPO_4 5,9 g KH_2PO_4 5 mg Cholesterin (5 mg/ml in Ethanol) ad 1 l dH_2O</p>
S-Medium	<p>1 l S-Basal-Medium 10 ml 1 M KCO_3 10 ml ,Trace Metals' Solution 3 ml 1 M CaCl_2 3 ml 1 M MgSO_4</p>
TBS	<p>50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl</p>
TBST	<p>TBS 0,5 % (v/v) Tween[®]20</p>
,Trace Metals' Solution	<p>1,9 g EDTA 0,7 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,025 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ad 1 l dH_2O; im Dunkeln lagern</p>

2.2.2 Molekularbiologisches Arbeiten:

Acrylamid Stock (AA/Bis)	29,2 % (v/v) N,N,-Methylenbisacrylamid in dH ₂ O
Agarose-Gele	1,0 – 2,2 % (w/v) Agarose in 0,5× TAE- bzw. TBE-Puffer aufkochen und anschließend 0,5 mg/ml Ethidiumbromid hinzufügen.
Arabinose Stock	20 % (w/v) Arabinose in dH ₂ O
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
α-Chymotrypsin (60 mg/ml)	60 mg α-Chymotrypsin 1 mM HCl ad 1 ml dH ₂ O
Blocklösung	1× Roti®-Block In 1× PBS ⁻
Kopplungs-Puffer (ELISA)	0,1 M NaHCO ₃ pH 8,6
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 25 % (v/v) Isopropanol
Denaturierungslösung	8,0 M Harnstoff 0,1 M Tris-HCl pH 8,0
Elutions-Puffer (2×)	100 mM NaH ₂ PO ₄ 600 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 8,0
Entwicklerlösung	Kodak D-19-Entwickler 1 Dose in 15 l (37°C) dH ₂ O lösen pH 8,0
Fixierlösung	8 kg Thiosulfat 280 g Natrium-Kalium-Disulfid ad 14 l dH ₂ O
Glyoxal-Ladungspuffer	10mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 50 % Glycerol 0,25 % Bromphenolblau aus RNase-freien Stammlösungen mischen
Hepes-Puffer	35 mM Hepes 0,1 μM BSA pH 7,8
Inhibitor-Lösungsmittel	50 % (v/v) Ethanol 50 % (v/v) Hepes

IB-Solubilisierungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM NaCl 6 M Guanidinhydrochlorid 0,1 % (v/v) TritonX-100 10 mM Imidazol pH 8,0 1 mM DTT vor Gebrauch zufügen
IB-Waschpuffer I	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % (v/v) TritonX-100 pH 8,0 1 mM DTT vor Gebrauch zufügen
IB-Waschpuffer II	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8,0 1 mM DTT vor Gebrauch zufügen
LEW-Puffer (1×)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl pH 8,0
LEW-Waschpuffer I (1×)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 5 mM Imidazol pH 8,0 30 mM β-Mercaptoethanol vor Gebrauch zufügen
LEW-Waschpuffer II (1×)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0 30 mM β-Mercaptoethanol vor Gebrauch zufügen
LEW-Waschpuffer III (1×)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 15 mM Imidazol pH 8,0 30 mM β-Mercaptoethanol vor Gebrauch zufügen
LEW-Waschpuffer IV (1×)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0 30 mM β-Mercaptoethanol vor Gebrauch zufügen
Long Ranger Mastermix	6 M Harnstoff 100 ml 5× TBE 60 ml Long Ranger gel solution dH ₂ O ad 500 ml

Natriumphosphatpuffer	Je nach Molarität X ml 1 M Na ₂ HPO ₄ (Laufpuffer) mit 1 M NaH ₂ PO ₄ auf pH 7 einstellen dH ₂ O ad 2 l 0,1 % (v/v) DEPC autoklavieren
Neutralisierungspuffer (Northern Blot)	92,6 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ mit 1 M NaH ₂ PO ₄ auf pH 6,8 einstellen dH ₂ O ad 1 l 0,1 % (v/v) DEPC autoklavieren
PPIase-Assay-Substrat	4 mM Suc-AAPF- <i>p</i> -NA 470 mM LiCl / TFE
Ponceau S	0,2 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Eisessig
Renaturierungs-Puffer	0,1 M Tris-HCl pH 8,0
SDS-PAGE-Laufpuffer (10×)	25 mM Tris 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
SDS-Sammelgelpuffer (4×)	0,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer (4×)	1,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8
Sequenz-Gel Lösung	40 ml Long Ranger Mastermix 30 µl TEMED 250 µl APS 10 % (w/v)
SSC (20×)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat auf pH 7 einstellen
TAE-Puffer (50×)	242,0 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) dH ₂ O ad 1 l pH 7,5
TBE-Puffer (5×)	0,45 M Tris 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,45 M Borsäure pH 8,3

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 190 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,6
Trichloressigsäure (20 %)	20 % (v/v) Trichloressigsäure

2.3 Versuchstiere, Bakterienstämme, und Vektoren

2.3.1 *Eimeria tenella*

Eimeria tenella VT-2 Stamm (Bayer Health Care, Monheim)

Wirtstiere waren männliche Hühner (*Gallus gallus*) des "leghorn" Stamms LSL (Josef Brinkschulte GmbH, Senden). Die Infektionen wurden von Bayer Health Care, Monheim vorgenommen.

2.3.2 Bakterienstämme

E. coli DH5 α TM-T1R One Shot[®] MAX Efficiency[®] (Invitrogen, Karlsruhe)

F' ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

E. coli TOP10 One Shot[®] (Invitrogen, Karlsruhe)

F' *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

E. coli #ER2738 (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

F' *lac^q* Δ (*lacZ*)M15 *proA⁺B⁺* *zzf::Tn10*(Tet^R)/*fhuA2 supE thi* Δ (*lac-proAB*) Δ (*hsdMS-mcrB*)5 (r_k^- m_k^- McrBC)

2.3.3 *Caenorhabditis elegans*

Mehrere NGM-Agar-Platten mit synchronisierten L4-Larven vom N2-Stamm wurden mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Olaf Bossinger, Aachen übernommen. Außerdem wurde eine statische Kultur des Uracil-auxothrophen *E. coli* Stammes OP50 als Futter zur Verfügung gestellt.

2.3.4 Vektoren

Expressions-Vektor: pBAD/Thio-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Subklonierungs-Vektor: pCR 2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA)

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden kommerziell von MWG (Ebersberg) bezogen und mit dH₂O in einer Stocklösung von 100 pmol/μl resuspendiert.

2.4.1 PCR Primer

Folgende Primer wurden für konventionelle PCR-Reaktionen eingesetzt:

<i>EtCyp18.7up</i>	-	5'-ATGCCGAACCCGCGGTGTTTTTCGACGTGTC-3'
<i>EtCyp18.7lo</i>	-	5'-TGAGAGCTGGCCGCAGTCGACTATGGTGACCTGC-3'
<i>EtCyp20.5up</i>	-	5'-ATGAAGAGAAGTCCCCCATCGCGCTTGTA-3'
<i>EtCyp20.5lo</i>	-	5'-GGCCGGTGGCCAATCCCGAAGACTTGAAGTAGCGTTG-3'
<i>GgCypAup</i>	-	5'-ATGGTCCAGGGTGGAGATTCTCAAATCAAAA-3'
<i>GgCypAlo</i>	-	5'-AGCAAACATTTTAGCGTAAGCTGCCTTCTCT-3'

2.4.2 *real-time* PCR Primer

Folgende Primer wurden für quantitative *real-time* RT-PCR eingesetzt:

<i>EtCyp20 RT up</i>	-	5'-CGTTCCAAAGACAGTGACAGA-3'
<i>EtCyp20 RT lo</i>	-	5'-CTCCTCCCTGAACCATGAAA-3'
<i>Et5.8S RT up</i>	-	5'-CTTGTGGTCTGTGAGGGTT-3'
<i>Et5.8S RT lo</i>	-	5'-AAAATTCGCGACACAAAAC-3'

2.4.3 Sequenzierungs-Primer

Folgende Primer wurden für Sequenzierungsreaktionen eingesetzt:

-96gIIIseq	-	5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'
pBADreverse	-	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'
M13forward	-	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13reverse	-	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Trx-forward	-	5'-TTCCTCGACGCTAACCTG-3'

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Monoklonaler Antikörper Maus-anti-His₆ IgG (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

Polyklonaler Antikörper Kaninchen-Anti-fd-Bakteriophage (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

2.5.2 Sekundärantikörper

Polyklonaler Antikörper Ziege-anti-Maus IgG HRP-gekoppelt (Dianova, Hamburg)

2.6 Toxizitätstests mit *Caenorhabditis elegans*

2.6.1 Haltung der Würmer

Zur Arterhaltung wurden die Würmer auf NGM-Agarplatten mit Bakterienrasen bei 20°C gehalten. Die Platten wurden dazu nach der Herstellung mit 10 Tropfen einer *E. coli* OP50 Übernachtskultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Bakterienrasen diente als Nahrung für die Würmer. Bei den verwendeten *E. coli* OP50-Zellen handelt es sich um einen Uracil auxotrophen Stamm, der in Abwesenheit von Uracil nur sehr langsam wächst, so dass ein übermäßiges Wachstum des Bakterienrasens verhindert wird (Brenner *et al.*, 1974). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Dazu wurden am Vorabend 100 µl einer statischen *E. coli* OP50 Kultur unter Benutzung eines Drygalski-Spatels auf NGM-Agarplatten ausplattiert. In regelmäßigen Abständen wurden dann jeweils 10 Würmer einer Platte mit einem platten, gebogenen Draht auf eine frische Platte umgesetzt. Für Toxizitätstests wurden unter einem Binokular synchronisierte junge Adulte ausgewählt und in die Testplatten überführt.

2.6.2 ‚Semi-Synchronisation‘ von Wurmpopulationen

Um für Toxizitätstests möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden die eingesetzten Wurmpopulationen synchronisiert. Dazu wurde eine Platte reifer, eiertragender Adulte mit 2 ml dH₂O gewaschen, die Flüssigkeit gesammelt und in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen auf 3,5 ml dH₂O aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Würmer durch Zugabe einer frisch bereiteten Lösung aus 500 µl 5 N NaOH-Lösung und 1 ml 5 % (v/v) NaOCl getötet. Diese Mischung wurde fünfmal für einige Sekunden gevortext und danach 2 Minuten unter ständigem Invertieren bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Wurmeier konnten dann durch einen Zentrifugationsschritt (30 s bei 1300×g und RT) pelletiert werden. In einem nachfolgenden Waschschrift mit 5 ml dH₂O und einer erneuten Zentrifugation für 30 s bei 1300×g wurden die Eier in 100 µl dH₂O resuspendiert und mit einer Pasteur-Pipette in die Ecke einer frischen NGM-Agar-Platte mit Bakterienrasen überführt. Nach einer Inkubation üN bei 20 °C befanden sich die geschlüpften Würmer am nächsten Morgen im Bakterienrasen und konnten nach mehreren Tagen als nahezu gleichalte, junge Adulte für Toxizitätstests eingesetzt werden.

2.6.3 Toxizitätstests in Flüssigkultur

Um den Einfluss einer bestimmten Substanz auf *C. elegans* zu testen, wurde folgender Versuchsaufbau genutzt: In sterile 6-Well-Kulturschalen wurden jeweils 5 ml M9-Medium gegeben, welches mit einem Aliquot einer statischen *E.coli* OP50 Kultur angereichert war. Für die Versuche wurde jeweils eine Bakteriendichte von $2,5 \times 10^7$ cfu OP50 / ml eingestellt. Die Zugabe der Bakterien ließ sich mittels Dreisatz leicht unter der Annahme berechnen, dass eine OD₅₉₅ = 1 einer Menge von $6,9 \times 10^8$ cfu OP50 / ml entspricht. In jedes Well wurden dann 10 gleichalte Würmer transferiert. Nach einer Stunde der Eingewöhnung wurde in jedes Well eine entsprechende Menge der jeweils untersuchten Substanz pipettiert. Als Vehikel diente in allen Versuchen DMSO, so dass auch die Lösemittel-Kontrolle mit DMSO erfolgte. Die Kulturschalen wurden daraufhin mit einem Deckel verschlossen und für die Dauer des Experiments bei 20 °C gehalten. In der Regel betrug die Dauer des Experiments 120 h (5 Tage).

2.6.4 Endpunkte der Toxizitätstests

Der Einfluss von Xenobiotika wurde anhand mehrerer Endpunkte überprüft: Zum Einen wurde die Anzahl überlebender Würmer nach festgelegten Zeitintervallen verglichen, zum Anderen die Bewegungsfähigkeit („locomotion“) anhand der gezählten „Schlängelbewegungen“ pro Minute. Weitere Aussagen wurden über die Anzahl der Nachkommen am Ende des Experimentes, sowie deren Entwicklungsstadiums gemacht. Als letztes sollte die Persistenz des Substanz-Effektes und die Regenerationsfähigkeit des Versuchsansatzes getestet werden, wozu die Versuchsschalen eine Woche nach Versuche erneut in Hinblick auf Abundanzen und Reproduktionsrate bewertet wurden.

2.7 Mikrobiologische Methoden

Alle hergestellten, temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation für 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Die Sterilisation temperaturinstabiler Lösungen erfolgte durch Sterilfiltration mittels einer 0,2µm Membran (Nunc, Wiesbaden).

2.7.1 Lagerung von Bakterienstämmen

Zur langfristigen Lagerung und Konservierung von Bakterienstämmen wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dazu wurden in einem sterilen 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss 100 µl einer *üN*-Kultur mit 100 µl autoklaviertem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf eines tiefgefrorenen Bakterienstammes wurde der entsprechende Glycerin-Stock auf eine LB-Agar-Platte, welche mit geeignetem Antibiotikum versehen war ausgestrichen und anschließend bei 37 °C *üN* rekultiviert. Solche Platten wurden je nach verwendetem Antibiotikum 2 - 4 Wochen lang bei 4 °C gelagert und für das Animpfen von Flüssigkulturen genutzt.

2.7.2 Ansetzen von Vorkulturen

Für eine *üN*-Kultur wurden 2 - 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, anschließend unter Benutzung eines sterilen Zahnstochers mit einer Einzelkolonie angeimpft und *üN* bei 37 °C und ca. 280 rpm in einem Rundschtüttler (Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick, Scientific Co. Inc., USA) inkubiert. Solche statische Kulturen dienen als Vorkultur für Proteinexpressionen im großen Maßstab oder der Plasmidisolierung. Alternativ wurde die gewünschte Menge LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, im Verhältnis 1:100 mit einer *üN*-Kultur angeimpft und diese über Tag bis zur gewünschten optischen Dichte ($OD_{595} = 0,6$) in einem Rundschtüttler (Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick, Scientific Co. Inc., USA) bei 37 °C und ca. 280 rpm inkubiert.

2.7.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll von A. Nishimura *et al.* (1990). Dazu wurden 50 ml Medium A im Verhältnis 1:100 mit einer *E. coli* TOP10 *üN*-Kultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd, bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,6 - 0,8$, inkubiert. Darauf folgend wurde die gesamte Kultur umgehend in ein vorgekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 1500×g und 4 °C

zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Medium A resuspendiert, mit 2,5 ml Medium B versetzt und gut gemischt. Für die weitere Verwendung der nun kompetenten Zellen wurden diese zu jeweils 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.7.4 Transformation

Während einer Ligation und zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde diese in entsprechende, chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

2.7.4.1 Transformation von *E. coli* DH5α™-T1® mit pCR®2.1-TOPO®-Plasmidkonstrukten

Für jede Transformation wurde ein Aliquot (50 µl) chemisch kompetenter *E. coli* DH5α™ T1®-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des entsprechenden klonierten Plasmidkonstrukts versetzt und durch leichtes Schnipsen gemischt. Die mit dem Plasmid versetzten Zellen wurden für 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C im Wasserbad. Nach einer Abkühlphase von ca. 2 min auf Eis wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl NZY-Medium (RT) verdünnt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad oder bei 280 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zuletzt wurden je 30 µl und 70 µl der transformierten Zellen auf LB-Agar-Platten, welche auf 37 °C vorgewärmt und mit Carbenicillin (60 µg/ml) oder Ampicillin (50 µg/ml) versetzt waren, ausplattiert und üN bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Gegebenenfalls konnten diese Platten auch zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm umwickelt und für 2 Tage bei RT inkubiert werden. Die Lagerung der inkubierten Platten für weitere Versuche erfolgte bei 4 °C für bis zu 4 Wochen.

2.7.4.2 Transformation von *E. coli* TOP10 mit pBAD/Thio-TOPO®-Plasmidkonstrukten

Die Transformation der hergestellten pBAD/Thio-TOPO®-Plasmidkonstrukte erfolgte in *E. coli* TOP10-Zellen. Dazu wurden 2 µl der Klonierungsreaktion zu einem Aliquot (50 µl) Zellen hinzugefügt und durch leichtes Schnipsen gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 – 60 min auf Eis inkubiert und anschließend, wie zuvor beschrieben, einem Hitzeschock unterzogen und abgekühlt. Zur Regeneration wurde den Zellen 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt und diese dann für 1 h bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Die transformierten *E. coli* TOP10-Zellen wurden anschließend ausplattiert und gelagert.

2.7.5 Rekombinante Expression in *E. coli*

Zur rekombinanten Expression von Proteinen in Bakterienzellen wurden *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.7.5.1 Pilotexpression

Um das optimale Expressionslevel für jedes Protein zu bestimmen, wurde zuerst eine Pilotexpression durchgeführt. Dabei sollte getestet werden, bei welcher Arabinosekonzentration ein Maximum an rekombinant exprimiertem Protein erreicht wurde.

Dazu wurden 10 ml Kulturen der entsprechenden Klone in LB-Medium versetzt mit 60 µg/ml Carbenicillin oder 50 µg/ml Ampicillin, ($OD_{600} = 0,6$), mit unterschiedlichen Arabinosekonzentrationen induziert, wobei die Endkonzentration zwischen 0,2 % - 0,00002 % Arabinose lag. Die genaue Durchführung der Pilotexpression erfolgte gemäß dem Protokoll 'pBAD/TOPO® ThioFusion™ Expression Kit – Pilot Expression' (Invitrogen, Karlsruhe).

2.7.5.2 Expression im großen Maßstab

Nach Ermittlung der optimalen Arabinosekonzentration konnten Expressionskulturen der jeweiligen Klone in großem Maßstab hergestellt werden. Dazu wurden 250 ml bzw. 500 ml Kulturen angesetzt und bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expressionskulturen mit der entsprechenden Arabinosekonzentration. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte ausnahmslos bei 37 °C für 4 ½ h. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C und 5,000×g für 10 min geerntet und bei -20 °C bis zur Proteinisolation gelagert.

2.8 Phagen-Display

2.8.1 Phagen-Display mit der Ph.D.TM 12mer Peptide Library

Bei der Suche nach einer Aminosäuresequenz mit Bindungsaffinität zu Toltrazuril wurde eine Ph.D.TM 12mer Peptide Library (New England Biolabs, Frankfurt am Main) benutzt. Dieses System basiert auf einer M13 Phagen-Bibliothek mit zufällig einklonierten 36mer Nukleotidsequenzen, die dann als Fusionsprotein des Genprodukts III auf der Oberfläche der Phagen präsentiert werden und eine Affinitätsauslese gegen einen bestimmten Liganden ermöglichen. Das Versuchsprotokoll nach Angaben des Herstellers gab vor, das ‚Panning‘ mit Streptavidin-gekoppelten Mikrotiter-Platten als

Positivkontrolle durchzuführen. Eine Versuchsreihe wurde nach diesem Verfahren durchgeführt und ausgewertet. Nachdem der Versuchsaufbau auf diese Weise validiert war, erfolgte das Screening gegen biotinyliertes Toltrazuril welches nach Angaben des Herstellers auf einer Streptavidin-beschichteten Platte immobilisiert wurde. Der Ablauf des Phagen-Displays wurde ausnahmslos, wie im mitgelieferten Protokoll (New England Biolabs, Frankfurt am Main) geschildert, durchgeführt.

2.8.2 Titerbestimmung

Für eine passende Verdünnungsreihe wurden jeweils 10 µl der zu bestimmenden Phagen-Suspension in PBST-Puffer verdünnt. Die passenden Verdünnungen lagen bei dem unamplifizierten Eluat im Bereich von 10^1 - 10^4 und beim amplifizierten Eluat bei 10^8 - 10^{11} . Nach der Verdünnung wurden jeweils 10 µl jeder Verdünnung mit 200 µl einer *E. coli* Kultur ($OD_{600} = 0,5$) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 5 Minuten wurde die Mischung dann mit etwa 3 ml vorher geschmolzenem Top-Agar vermischt und sofort auf vorgewärmte LB-Agar-Platten gegeben, so dass sich ein dünner Film auf der ganzen Platte verteilte. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert und nur die Platten mit etwa 10^1 - 10^3 pfu ausgewertet. Über den Verdünnungsfaktor konnte man dann auf die Menge an Phagen in der Stammlösung schließen.

2.8.3 ELISA-Studien zur Bindungsaffinität („Phagen-ELISA“)

Um die Bindungsaffinität eines bestimmten Phagenklones gegenüber einer Kontrolle zu testen, wurde ein ELISA („enzyme linked immuno sorbent assay“) etabliert. Es wurden dabei zwei Arten von Mikrotiter-Platten eingesetzt, wobei der Boden der Wells einmal mit Streptavidin bedampft war und einmal mit den zu untersuchenden Phagen beschichtet wurde:

2.8.3.1 Phagen-ELISA mit „Liganden-coating“

Für einige ELISA-Studien wurden Mikrotiter-Platten verwendet, die mit Streptavidin beschichtet waren (Nunc ImmobilizerTM Streptavidin, Nunc, Denmark). Zu Beginn wurden diese Platten einem Kopplungs-Schritt unterzogen, wobei 100 µl einer Lösung aus biotinyliertem Toltrazuril der Konzentration 100 µg/ml in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,6 in jedes Well pipettiert wurde und die Platte anschließend über Nacht bei 4 °C in einer luftdichten, feuchten Box inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Platte dann auf einem Stapel trockener Papiertücher ausgeklopft und jedes Well mit 200 µl Blockpuffer gefüllt. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für etwa 2 Stunden. Der Blockpuffer wurde danach ebenfalls ausgeklopft und die Wells 6× mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Nun

wurden Phagenverdünnungen von 10^6 - 10^{12} *pfu* in PBS-Puffer hergestellt und je 100 μ l einer solchen Verdünnung in die Wells pipettiert. Unter leichtem Schwenken wurde die Platte dann für etwa 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Ausklopfen der Platte wurde diese wieder 6x mit TBST-Waschpuffer gespült. Nun wurde nach Herstellerangaben HRP-gekoppeltes Streptavidin (Amersham Life Science, Freiburg) 1:500 in Blockpuffer verdünnt und je 100 μ l dieser Lösung auf die Mikrowells gegeben. Nach diesem Schritt erfolgte erneut ein sechsfach wiederholter Waschschrift mit TBST und im Anschluss daran, ebenfalls nach Angaben des Herstellers, mittels HRP-Substrat (OPD Tablets for ELISA; Dako Cytomation, Denmark), die Detektion in einem ELISA-Lesegerät (anthos reader 2001, anthos labtech instruments, Köln), bei 490 nm.

2.8.3.2 Phagen-ELISA mit „Phagen-coating“

Ein alternatives Versuchsprotokoll sah einen etwas variierten Versuchsaufbau vor: Für die Kopplung von Einzel-Phagenklonen an den Boden der Mikrowell-Platten wurden 100 μ l Phagensuspension der Konzentration 10^{10} *pfu*/ μ l (entspricht 10^{12} *pfu* pro Well) in je ein Well pipettiert. Als Bindungspuffer wurde 0,1 M NaHCO_3 pH 8,6 genutzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C in einem luftdicht abgeschlossenen Behältnis wurde die Platte am nächsten Tag auf einem Stapel Papiertücher ausgeklopft, mit Blockpuffer gefüllt und für 2 h bei 4 °C inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Der Blockpuffer wurde danach ebenfalls wieder ausgeklopft und die Wells 6x mit TBST-Puffer gewaschen. Nun wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Liganden Toltrazuril, ausgehend von einer Konzentration von 100 μ g/ml in 0,1 M NaHCO_3 , hergestellt. Die Verdünnungen wurden in gleichen Schritten, bis zu einer Endverdünnung von 1:128 angefertigt. Nun wurden je 100 μ l der jeweiligen Verdünnung in einer Reihe auf die vorgeblockten Phagen in den Wells pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Nach einem erneuten Waschschrift wurden Kaninchen-Anti-fd-Bakteriophage-Antikörper, nach Angaben des Herstellers, 1:1000 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur in die Wells gefüllt. Die unspezifisch gebundenen Antikörper wurden nach Ablauf der Zeit durch 6x Waschen mit TBST wieder entfernt und es wurde ein Anti-Kaninchen-HRP-gekoppelter Zweitantikörper, nach Herstellerangaben, 1:500 verdünnt und in jedes Well gegeben. Nach diesem Schritt erfolgte erneut ein sechsfacher Waschschrift mit TBST und im Anschluss daran, nach Angaben des Herstellers, mittels HRP-Substrat (OPD Tablets for ELISA; Dako Cytomation, Denmark) die Detektion in einem ELISA-Lesegerät (anthos reader 2001, anthos labtech instruments, Köln) bei 492 nm. Die Referenzwellenlänge betrug 620 nm.

2.9 Molekularbiologische Methoden

Bei den durchgeführten Arbeiten wurde ausschließlich dH₂O verwendet. Für Arbeiten mit RNA wurden entsprechende Lösungen grundsätzlich vor Gebrauch mit 0,1 % (v/v) DEPC behandelt.

2.9.1 Isolation und Analyse von Nukleinsäuren

2.9.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Gesamt-RNA

Für die Extraktion von RNA wurde das peqGOLD TriFast™ Reagenz (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet, das neben Phenol noch Guanidinisothiocyanat enthält. Guanidinisothiocyanat denaturiert als chaotropes Salz Proteine und inaktiviert somit auch RNasen, was folglich die Extraktion intakter RNA ermöglicht. Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Kükenblinddärmen wurden 50 - 100 mg an Blinddarmgewebe von *E. tenella* infizierten bzw. nicht infizierten Küken mit 1 ml TriFast™ Reagenz versetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß der peqGOLD TriFast™ Arbeitsanleitung zur Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebe. Das schließlich gewonnene RNA-Pellet wurde luftgetrocknet, in DEPC-behandeltem dH₂O resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.9.1.2 DNA-Präzipitation

Zur Konzentrierung von DNA wurde diese mittels einer gängigen Alkohol-Präzipitation gefällt und konnte folglich im gewünschten Volumen dH₂O wieder resuspendiert werden. Dazu wurden der DNA-haltigen Lösung 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,5) zugefügt, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Biofuge Primo R, Heraeus). Aus dem Überstand erfolgte die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 1 Volumen eisgekühltem Isopropanol. Der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei -20 °C präzipitiert und die DNA anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert. Durch die Zugabe von 80 %igem Ethanol zum Pellet und erneuter Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde dieses gewaschen und dann nach Abnahme des Überstandes an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das DNA-Pellet in 50 µl dH₂O resuspendiert.

2.9.1.3 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab („Minipräp“)

Zur Isolation von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab aus transformierten *E. coli* - Zellen wurde das NucleoSpin® Plasmid Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Diese Art der

Plasmid-Präparation ('Minipräp') basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Pro Präparationsansatz wurden 2 ml einer üN-Kultur verwendet und diese gemäß den Angaben des Herstellers bearbeitet. Optionale Waschschriffe wurden ausnahmslos durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 50 µl dH₂O. Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde photometrisch bzw. elektrophoretisch bestimmt, wobei sich bei der Präparation aus 2 ml Bakterienkultur in der Regel eine Ausbeute von 5 - 20 µg Plasmid-DNA ergab.

2.9.1.4 Plasmidpräparation im mittleren Maßstab ('Midipräp')

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega GmbH, Mannheim) verwendet.

Aus einer 100 ml üN-Kultur wurde Plasmid-DNA nach Herstellerangaben präpariert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 600 µl auf 70 °C vorgewärmtem, nukleasefreiem dH₂O. Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bzw. elektrophoretisch und ergab pro 100 ml Bakterienkultur etwa 200-400 µg Plasmid-DNA.

2.9.1.5 Isolation und Aufreinigung von M13ss-DNA

Um Einzelklone aus dem Phagen-Panning mit der Ph.D.TM 12mer Peptide Library näher zu charakterisieren, wurden Präparationen von M13-Einzelstrang-DNA mittels dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey Nagel, Düren) durchgeführt. Ein Alternativprotokoll in diesem Kit erlaubt die Isolation und Aufreinigung über Säulen. Die Präparationen wurden ausschließlich nach Angaben des Herstellers durchgeführt, optionale Waschschriffe wurden ausgelassen.

2.9.1.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um ein spezifisches PCR-Fragment aus einem PCR-Reaktionsansatz zu gewinnen, wurden 9/10 des Reaktionsansatzes auf ein 1 %iges TAE-Agarosegel bzw. TAE-'Fenstergel' aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde unter UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgeschnitten, gewogen und die DNA anschließend durch Agaraseverdau bzw. mittels Silica-Matrix aus dem Agarosegel eluiert.

2.9.1.7 Isolation mittels Agaraseverdau

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels Agarase wurde der Reaktionsansatz zunächst in einem 'Fenstergel' aufgetrennt. Dabei wird in das 1 %ige TAE-Agarosegel auf Höhe des

gewünschten DNA-Fragments ein Fenster ausgeschnitten und dieses dann mit 1 %iger 'low-melt'-Agarose (Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf) ausgefüllt. Die 'low-melt'-Agarose des aus dem Fenster ausgeschnittenen DNA-Fragments wurde bei 65 °C für 15 min geschmolzen und anschließend mittels Agarase (1,5 U/100 mg Gel) bei 45 °C üN verdaut. Dabei spaltet das Enzym Agarase den Polysaccharid-Kern der Agarose in Neoagar-Oligosaccharide, die beim Abkühlen nicht mehr auspolymerisieren können und somit eine Fällung der Nukleinsäuren mittels Alkohol möglich wird. Für die Präzipitation der DNA wurde wie zuvor beschrieben verfahren. Die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden 1 µl, 3 µl und 5 µl der jeweiligen Probe und 1 µg λ *EcoRI/HindIII* Marker (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) aufgetragen und die aufgetrennten Banden anschließend mit dem Marker verglichen.

2.9.1.8 Isolation mittels Silica-Matrix

Die Methode des NucleoSpin® Extract II Kits (Macherey-Nagel, Düren) zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen basiert auf dem Prinzip der Adsorption von DNA an spezielle Silikat-Oberflächen in Anwesenheit chaotroper Reagenzien (Vogelstein, Gillespie, 1979). Dabei konnte das DNA-Fragment ohne Verwendung eines 'Fenstergels' direkt aus dem TAE-Agarosegel ausgeschnitten und gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt werden. Die Elution erfolgte mit 50 µl 70 °C warmem dH₂O.

2.9.1.9 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch eine Absorptionsmessung bei den Wellenlängen $\lambda = 260 \text{ nm}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$ und $\lambda = 320 \text{ nm}$ in einem Spektralphotometer (Beckmann DU-640, München). Nukleinsäure-Konzentrationen wurden durch die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ ermittelt, wobei die weiteren Wellenlängen zur Bestimmung der Streuung ($\lambda = 320 \text{ nm}$) und der Verunreinigung der Probe mit Proteinen ($\lambda = 280 \text{ nm}$) dienen (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient A_{260}/A_{280} zeigt eine Verunreinigung der Nukleinsäure-Probe mit Protein an und kann somit als Maß für die Reinheit der Probe gesehen werden. Dabei gilt, dass bei reiner DNA und RNA der Quotient $1,8 \geq 2,0$ sein sollte. Für die Konzentrationsmessung wurde die Nukleinsäure-Probe in einem Endvolumen von 100 µl mit Nuklease-freiem dH₂O soweit verdünnt, dass sich bei der Messung ein Wert von $OD_{260} \leq 1$ ergab. Die Nukleinsäure-Konzentration kann basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt werden. Dabei gelten für die verschiedenen Nukleinsäuren folgende substanzspezifische Extinktionskoeffizienten:

Doppelsträngige DNA	: A_{260} nm = 1 OD entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
Einzelsträngige DNA	: A_{260} nm = 1 OD entspricht 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Einzelsträngige RNA	: A_{260} nm = 1 OD entspricht 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.9.1.10 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die analytische Auftrennung von Plasmid-DNA, DNA-Fragmenten und Gesamt-RNA erfolgte durch eine Gelelektrophorese in horizontalen Flachbettkammern unter Verwendung von 0,8 - 1,5 %igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in 0,5 \times TBE-Puffer bzw. TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und in eine Flachbettkammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde anschließend in eine Laufkammer überführt, die entsprechend dem hergestellten Gel mit 0,5 \times Laufpuffer (TAE- bzw. TBE-Puffer) befüllt wurde. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6 \times Ladungspuffer (6 \times Loading Dye Solution, MBI Fermentas) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und mit einer elektrischen Feldstärke von 0,5-5 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. In Abhängigkeit von der zu detektierenden Fragmentgröße wurde ein Größenstandard mit der entsprechenden Nachweisgrenze eingesetzt, wobei folgende Marker verwendet wurden: *EcoRI/HindIII* restringierte λ -DNA (21.226 – 564 bp), pUC Mix Marker 8 (1.118 – 67 bp) und 100 bp DNA-Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot). Durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, welches mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert, konnten die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren auf einem Transilluminator durch Anregung mit UV-Licht visualisiert und mit einer CCD-Videokamera mit UV-Filter dokumentiert werden.

2.9.1.11 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA („Glyoxal-Gel“)

Da Ribonukleinsäuren zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen, welche das Laufverhalten während einer Elektrophorese stören, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (2003) durchgeführt. Hierbei wird die RNA mit DMSO und Glyoxal behandelt. DMSO eliminiert alle vorhandenen Wasserstoffbindungen, wodurch Glyoxal an die nun zugänglichen Guaninreste binden kann. 20 μg RNA wurden mit 16,1 μl DMSO, 5,4 μl Glyoxal und 3 μl 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) versetzt und für 1 Stunde bei 50 °C inkubiert. 10 μl des Längenstandards λ *EcoRI/HindIII* (Fermentas, St. Leon-Roth) wurden wie die Proben behandelt. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 4 μl Glyoxal-Ladungspuffer und die Auftragung auf ein 1,2 %iges Agarosegel. Die Auftrennung erfolgte bei 4 V/cm. Der Laufpuffer musste während der gesamten Elektrophorese mit Magnetrührern durchmischt werden, damit sich kein pH-Gradient bilden konnte. Erfolgt dies nicht und der pH erhöht sich auf über 8, dissoziiert das Glyoxal von der

RNA und es bilden sich erneut Sekundärstrukturen, die die saubere Größenauftrennung im Gel stören. Der Längenstandard wurde vor dem ‚blotting‘ vom Rest des Gels abgeschnitten und mit 50 mM NaOH für 20 min neutralisiert. Anschließend folgten 3 Waschschriffe mit 0,01 M NaPi (pH 7) à 20 Minuten. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Puffer mit 60 µl Ethidiumbromid versetzt und 30 bis 60 Minuten geschwenkt. Die Banden wurden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert.

2.9.1.12 Northern Blot

Das Northern Blotting ist eine Methode, bei der RNA die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde, dauerhaft auf einer Membran fixiert wird. Die aufgetrennte RNA wird mittels alkalischem Transfer durch Ausnutzung von Kapillarkräften nach der Methode von Chomczynski (1994) auf eine positiv geladene Membran gebloftet. Hierbei wurden auf einen Stapel Papiertücher zwei trockene und zwei in Transferlösung (pH 11,4 -11,45) getauchte Filterpapiere (Whatman, Maidstone) gelegt. Auf diese folgte die ebenfalls mit Transferlösung durchtränkte positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim), das Gel und nochmals vier angefeuchtete Filterpapiere. Um den Transfer vom Gel auf die Membran zu gewährleisten, verband eine Brücke aus Filterpapier den mit einer Petrischale beschwerten Blot-Aufbau mit der Transferlösung. Nach 90 Minuten wurde der Blot abgebaut und die Membran im Neutralisationspuffer (pH 6,8) inkubiert. Um die RNA dauerhaft auf der Membran zu fixieren, wurde sie mittels eines Crosslinkers (UV Stratalinker 1800, Stratagene) für 20 s mit 120 mJ UV-Licht bestrahlt, wobei die Aminogruppen der RNA kovalent an die Membran gebunden wurden.

2.9.1.13 Hybridisierung von RNA mittels radioaktiver DNA-Sonden

Um eine unspezifische Hybridisierung zu verhindern, musste eine Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Nylonmembran erfolgen. Dazu wurde die Nylonmembran für etwa 2 h mit der Hybridisierungslösung ExpressHyb (Clontech, Heidelberg) bei 65 °C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der jeweils spezifischen radioaktiv markierten Sonde erfolgte im Anschluss über Nacht. Am folgenden Tag wurde die hybridisierte Nylonmembran zweimal mit 2× SSC-Lösung für je 20 min und zweimal mit 0,1× SSC-Lösung für je 30 min gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen. Danach wurde für die Autoradiographie ein Biomax MS Röntgen-Film (Kodak) aufgelegt und mit einer Verstärkerfolie (Biomax MS Screen, Kodak) in einer Filmkassette über Nacht bei -80°C exponiert. Sofern notwendig wurde die Expositionszeit entsprechend verlängert oder verkürzt.

2.10 Enzymatische Reaktionen

2.10.1 Restriktionshydrolyse

Die hydrolytische Spaltung von DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen spielt eine wichtige Rolle bei der Analyse von DNA-Fragmenten oder Plasmiden. So findet die Restriktionshydrolyse z.B. breite Anwendung bei Klonierungsreaktionen, um Vektoren aufzuschneiden oder den Erfolg einer Ligation durch das Herausschneiden des Inserts zu überprüfen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen des Typs II, welche spezifische Sequenzen in der DNA erkennen und diese hydrolysieren. Dabei entstehen, abhängig vom jeweiligen Enzym, DNA-Stränge mit glatten ('blunt ends') oder 3'- bzw. 5'-überhängenden ('sticky ends') Enden.

Die Restriktion von DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben (MBI Fermentas GmbH) bezüglich Aktivität, Inkubationstemperatur und Pufferbedingungen des verwendeten Enzyms. Für eine Restriktion wurden in der Regel 10 µl einer Plasmidpräparation eingesetzt und für 4 h bei 37 °C mit der entsprechenden Menge an Enzym in einem adäquaten 1× Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut. Im Anschluss wurde der Erfolg der Restriktion mittels gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft.

2.10.2 Dephosphorylierung

Bei der Verwendung von 5'-Phosphat modifizierten Primern für die PCR-Reaktion erhielt man PCR-Produkte, die so nicht für eine TOPO TA[®] Klonierung geeignet sind. In diesem Fall erfolgte eine Dephosphorylierung des PCR-Produkts mit alkalischer 'Shrimp' Phosphatase (SAP) (Fermentas, St. Leon-Rot) nach folgendem Protokoll: 10 - 40 µl DNA-Lösung wurden mit 1× SAP-Reaktionspuffer versetzt und auf 49 µl mit dH₂O aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1 U SAP wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der SAP für 15 min bei 65 °C.

2.10.3 Enterokinase-Verdau

Um den Einfluss des Thioredoxin-,tag's auf die Enzymaktivität exprimierter Proteine zu untersuchen, wurden die isolierten und aufgereinigten Proteine einem Enterokinase-Verdau unterzogen. Die in dieser Arbeit benutzte leichte Kette der Enterokinase (New England Biolabs) schneidet spezifisch nach einer Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Sequenz oder in Ausnahme-Fällen und

abhängig von der Proteinkonformation auch nach anderen, sehr basischen Motiven. Inhibitorisch wirkt dahingegen ein nachfolgendes Prolin in der Sequenz, was man vor der Durchführung dieses Versuches beachten musste. Für die eigentliche Reaktion wurden 100 μl PBS⁻-Lösung unterschiedlichen Proteingehaltes (10 μg – 300 μg) mit je 2 U Enterokinase versetzt und mit einer 10 mM CaCl₂-Stammlösung auf eine Ca²⁺-Ionenkonzentration von 1 mM eingestellt. Der Verdau erfolgte anschließend für 16 h bei RT. Im Anschluss wurde der Erfolg der Reaktion durch eine SDS-PAGE überprüft.

2.10.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, 'polymerase chain reaction')

Durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) lassen sich *in vitro* große Mengen an beliebigen DNA-Fragmenten synthetisieren. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Gefäßen in einem PTC-200 Gradientencycler der Firma MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Bei den durchgeführten PCR-Reaktionen wurde ein Heizdeckel benutzt, um während der PCR-Reaktion eine Kondensation von Reaktionsflüssigkeit am Gefäßdeckel zu vermeiden. Die sonst übliche Überschichtung des Reaktionsansatzes mit Mineralöl war in diesem Falle nicht nötig.

2.10.4.1 Konventionelle PCR

Der Ablauf einer PCR entsprach immer dem folgenden Schema: Zuerst wurde die DNA-Doppelhelix bei 94 °C in Einzelstränge denaturiert. Anschließend hybridisierten bei reduzierter Temperatur spezifische Oligonukleotide – sogenannte Primer – an das 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, was geläufig als 'annealing' bezeichnet wird. Ausgehend von den hybridisierten Primern erfolgte dann die Synthese neuer DNA in 5'→3' Richtung (Elongation) unter Verwendung einer hitzestabilen Polymerase. Die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isolierte *Taq*-DNA-Polymerase ist das bekannteste Enzym seiner Art, welches selbst bei Temperaturen von über 90 °C stabil ist. Diese Thermostabilität gewährleistet, dass die Polymerase während des Denaturierungsschrittes nicht zerstört wird. Ein Nachteil der *Taq*-Polymerase liegt in der fehlenden 3'→5' Exonukleaseaktivität ('proofreading'), so dass bei der DNA-Synthese eingebaute Fehler rückwirkend nicht korrigiert werden können. Mittlerweile sind jedoch weitere Polymerasen bekannt, die neben der Thermostabilität eine 'proofreading'-Funktion besitzen, wie zum Beispiel die Enzyme *Pfx* und *Pfu* aus *Pyrococcus sp.*. Heute findet der Einsatz von Enzym-Mixen großen Anklang, da man sich bei der Anwendung eines Enzym-Mixes die verschiedenen Eigenschaften unterschiedlicher Enzyme zu Nutze machen kann. Die 'annealing'-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer (T_m) und sollte einige Grad niedriger als der T_m -Wert gewählt werden. Bei Primerpaaren, die eine deutliche Differenz im T_m -Wert aufwiesen, gilt es, die optimale

'annealing'-Temperatur zu ermitteln, bei der beide Primer effizient zum gewünschten Produkt führten. Dafür wurde bei der PCR ein Temperaturgradient angelegt, so dass mehrere Reaktionsansätze parallel unterschiedlichen 'annealing'-Temperaturen ausgesetzt werden konnten. Um das Auftreten unspezifischer Produkte zu minimieren, wurde eine 'hot-start' PCR durchgeführt, d.h. die Zugabe des Enzyms erfolgte erst nach dem ersten 'annealing'-Schritt bei Erreichen der Elongationstemperatur. Zur Kontrolle der amplifizierten Fragmente wurden ca. 1/10 des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

In dieser Arbeit wurde zur Amplifikation von Genen ausschließlich das Triple Master PCR System (5 Prime GmbH, Hamburg) genutzt. Der Reaktionsansatz bestand dabei in aller Regel aus 1× High Fidelity-Puffer mit Mg^{2+} , je 0,3 μM Primer, 0,3 mM dNTP, 1× Q-Solution und 3 μl der nach oben beschriebenen Protokoll hergestellter cDNA in einem Gesamtvolumen von 50 μl nukleasefreiem dH_2O . Die Schritte der Reaktion waren aufeinanderfolgend ein initialer Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C, gefolgt von 35 Zyklen 20 s 94 °C, 30 s 57 – 62 °C und 1 min 72 °C. Als letztes wurde die Reaktion einer finalen Elongation für 7 min bei 72 °C unterzogen. Zum Stoppen wurde die Reaktion etwa 30 min auf Eis inkubiert und die PCR-Produkte nach Belieben gereinigt oder weiterverarbeitet.

2.10.4.2 cDNA Synthese

Eine besondere Variante der PCR ist die RT-PCR, bei der eine Synthese von cDNA ('complementary DNA') mittels Reverser Transkription der eigentlichen PCR vorausgeht. Bei der RT-PCR wird ausgehend von einem Gesamt- oder Poly-A⁺-RNA-Template und der Verwendung eines Oligo(dT)- bzw. Random-Hexamer-Primers mittels Reverser Transkriptase eine zum RNA-Template komplementäre, intronfreie DNA (cDNA) synthetisiert. Diese eignet sich gut als Template für eine konventionelle PCR und liefert unter anderem Auskunft über die Transkriptmenge.

Für die durchgeführten cDNA-Synthesen wurde eine modifizierte *MMLV*-Reverse Transkriptase verwendet, die 'RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase' von Fermentas. Bei der aus dem *Moloney murine leukemia virus* stammenden *MMLV*-Reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-anhängige DNA-Polymerase, welche eine RNase H-Aktivität besitzt und eine maximale Arbeitstemperatur von 42 °C hat. Die modifizierte *MMLV*-Reverse Transkriptase weist einige optimierte Merkmale auf: zum Einen verträgt das Enzym höhere Temperaturen von bis zu 55 °C, zum Anderen wurde die RNaseH-Aktivität durch eine Punktmutation in der RNase H-Domäne eliminiert, wodurch die Prozessivität des Enzyms verbessert wird. Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurde unter Verwendung der 'RevertAid™ H Minus M-MuLV' Reversen Transkriptase folgendes Protokoll verwendet: 10 ng Gesamt-RNA wurden mit 0,5 μg Oligo-dT-Primer in einem Volumen von 11 μl DEPC- behandeltem dH_2O für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Dann wurde dem Reaktionsansatz auf 1× Reaktionspuffer eingestellt, mit 0,3 mM dNTP und 20 U RNase-Inhibitor versetzt und das Volumen mit DEPC-behandeltem dH₂O auf 19 µl erhöht. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 U Enzym gestartet. Die Polymerisation fand bei 42 °C für den Zeitraum von einer Stunde statt. Gestoppt wurde die Reaktion durch einen Denaturierungsschritt für 10 min bei 70 °C. Die synthetisierte cDNA konnte dann auf Eis oder -20 °C für Folgeexperimente gelagert werden.

2.10.4.3 Quantitative *real-time* RT-PCR

Mit der quantitativen *real-time* PCR kann die Menge eines bestimmten DNA-Targets quantifiziert werden. In diesem Fall kam die HotStarTaq DNA Polymerase der Firma Qiagen zum Einsatz, die zu Reaktionsbeginn in einer inaktiven Form vorliegt und erst durch einen 10-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C aktiviert wird. Der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I interkaliert in alle doppelsträngigen DNA-Moleküle und emittiert ein Fluoreszenzsignal bei der Bindung. Die Emissionsmaxima liegen bei 494 nm und 521 nm. Die isolierte RNA wurde in diesem Fall zunächst mit dem DNA-free™ Kit (Ambion, Austin, USA) nach Angaben des Herstellers behandelt, um verbliebene genomische DNA zu eliminieren. Die genomische DNA musste entfernt werden, da sie sonst ebenfalls als Template gedient hätte. Dies hätte das Ergebnis der quantitativen PCR beeinflusst, da eine Verunreinigung mit einer stärkeren Fluoreszenz einhergehen würde. Anschließend wurde mit Hilfe des QuantiTect™ Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers die RNA in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung der quantitativen *real-time* PCR erfolgte nach dem Protokoll des QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden). Die Komponenten des Kits wurden allerdings auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl, anstelle von 50 µl, umgerechnet. Die Amplifizierung erfolgte in einem TaqMan7500 (Applied Biosystems)-PCR-Gerät. Nach einem Initiationsschritt von 2 min bei 50 °C erfolgte ein Aktivierungsschritt der Taq-Polymerase bei 95 °C für 10 min. Anschließend folgten 55 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt für 15 s bei 94 °C, einem Annealing-Schritt für 35 s bei 60 °C und einer Extension für 30 s bei 70 °C, an deren Ende die Fluoreszenz der Proben gemessen wurde. Um die Reinheit der PCR-Produkte zu bestimmen, wurde weiterhin eine Schmelzkurve der Proben aufgenommen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der 7500 System Software v.1.2.3f2 (Applied Biosystems).

Es gibt zwei Arten der Quantifizierung: Die relative Quantifizierung (relative Expression) und die absolute Quantifizierung (absolute Expression). Im Zuge dieser Arbeit wurde die relative Genexpression verwendet, da sie keine Standardkurve benötigt und weniger aufwendig ist, als die absolute. Bei der relativen Genexpression wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet. Diese Methode beruht auf der relativen Expression eines Zielgens im Verhältnis zu einem Referenz-Gen. Bei diesem Referenz-Gen handelt es sich im Allgemeinen um ein „Housekeeping“-Gen wie z.B. GAPDH oder ribosomale RNA. Die mRNA-Synthese dieser Gene wird als stabil angesehen, da sie unabhängig von

äußeren Einflüssen exprimiert wird. Voraussetzung ist, dass alle Effizienzen gleich sind und sehr nahe an 1 liegen. Zur Berechnung der relativen Genexpression verschiedener Proben wird in der exponentiellen Phase der Amplifizierung ein Basiswert der Fluoreszenz (Threshold) definiert. Der sich daraus ableitende fraktionelle *ct*-Wert beschreibt die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz stärker oder schwächer als der Basiswert ist. Die relative Menge an Zielgen ergibt sich dann nach Normalisierung der Probe gegen ein Housekeeping-Gen (hier: 5,8 rRNA), relativ zu einer Referenzprobe (hier: RNA von Hühnern 48 *h.p.i.*), die vorher festgelegt wurde.

2.10.4.4 5'/3'-RACE-PCR

Unbekannte 5'- bzw. 3'-Enden von cDNAs können mit Hilfe einer RACE-PCR ('Rapid Amplification of cDNA Ends') identifiziert werden. Für diese Methode stand ein 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zur Verfügung. Bei der 3'-RACE wurde für die cDNA-Synthese ein modifizierter Oligo-dT-Primer (Ankerprimer) verwendet, der den natürlichen poly-A⁺-Schwanz der mRNA als Primerseite nutzt. Die gemäß den Herstellangaben synthetisierte cDNA verfügte folglich am 5'-Ende über eine spezifische Ankersequenz.

2.10.4.5 'Nested' PCR

Um die Amplifikation des 3'-Endes in einer PCR-Reaktion zu steigern, wurden verschachtelte ('nested')-PCRs durchgeführt. Für die erste 'nested'-PCR wurde die aus der 3'-RACE gewonnene cDNA, welche über eine spezifische Ankersequenz verfügte, als 'template' eingesetzt und mit einem ankerspezifischen Primer und dem ersten transkriptspezifischen Primer in einer PCR ein Produkt amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde in der zweiten 'nested'-PCR als 'template' eingesetzt, wobei nun der zweite, dem 3'-Ende näher gelegene, transkriptspezifische Primer mit dem ankerspezifischen Primer zur Amplifikation diente. Die dritte 'nested'-PCR erfolgte gemäß der Zweiten, nur dass nun der dem 3'-Ende am nächsten gelegene transkriptspezifische Primer verwendet wurde. Nach jeder 'nested'-PCR erfolgte eine Kontrolle der amplifizierten Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese.

2.10.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe von zufälligen Oligonukleotid-Primern ('random priming') beruht auf der Methode von Feinberg & Vogelstein (1984). Die Durchführung erfolgte mit dem DecaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas, St. Leon-Roth). Für die radioaktive Markierung wurden 100 ng DNA-Sonde benötigt, die mit 10 µl 5× Reaktionspuffer (enthält die

Dekanukleotide) und Nuklease-freiem Wasser für 10 min bei 95 °C erhitzt wurden. Dadurch erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA und durch anschließendes Abkühlen der Reaktion auf Eis konnten die Dekanukleotide zufällig mit den DNA-Einzelsträngen hybridisieren. Danach wurden 3 µl Mix C (ohne dCTP), 10 µl [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (100 µCi) sowie 1,8 µl des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I hinzugefügt und alles bei 37 °C für 5 min inkubiert. Durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wird die Anlagerung von Desoxyribonukleosid-5-Triphosphaten an das 3-OH Ende der neu entstehenden DNA-Stränge katalysiert. Zur vollständigen Synthese der neu entstehenden DNA-Stränge kamen im Anschluss noch 4 µl dNTP-Mix hinzu und die Proben wurden bei 37 °C für 30 min inkubiert. Um überschüssige dNTPs zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung mit dem NucleoSpin® Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren). Anschließend wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde nochmal für 10 min bei 95 °C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt, um die benötigte Einzelstrangstruktur für die Hybridisierung zu erhalten.

2.11 TOPO TA®-Klonierung

Mit dem TOPO TA® Cloning®-System von Invitrogen lassen sich PCR-Produkte direkt in einen TOPO-Plasmidvektor klonieren. Dabei wird sich das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus zu Nutze gemacht. Dieses bindet an spezifische Stellen der doppelsträngigen DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrad nach der Sequenz 5'-CCCTT an einem Strang (Shuman, 1994). Durch eine kovalente Bindung zwischen dem freien 3'-Phosphat des gebrochenen DNA-Stranges und dem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I wird die durch die Spaltung freigesetzte Energie konserviert. Der durch die Topoisomerase I an beiden DNA-Einzelsträngen gespaltene Plasmidvektor liegt folglich in linearisierter Form vor und weist zudem an beiden 3'-Enden einen 3'-Überhang von einem Thymidin auf. Die kovalente Phosphotyrosyl-Bindung zwischen DNA und Enzym kann durch die freie 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produkts attackiert werden, wobei die Topoisomerase I verdrängt und die vorangegangene Spaltungsreaktion rückgängig gemacht wird (Shuman, 1994). In dem Fall ligiert der linearisierte Vektor mit hoher Effizienz zusammen mit dem PCR-Insert zu einem zirkulären Plasmid. Zur Ligation mit dem TOPO TA®-Vektor muss das PCR-Produkt über einen 3'-Adenin-Überhang verfügen. Dieser lässt sich durch die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase erzeugen. Aus diesem Grund war darauf zu achten, dass für die PCR-Reaktionen *Taq*-Polymerase oder einen Enzymmix, welcher jene in einem ausreichenden Verhältnis enthielt, verwendet wurde. Für die Klonierungsreaktion wurden 4 µl des PCR-Produkts (Reaktionsansatz 50 µl) eingesetzt. Wegen der Verwendung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen bei der späteren Transformation erfolgte noch die Zugabe von 1 µl 'salt solution'. Abschließend wurde µl1 des linearisierten TOPO® -Plasmidvektors hinzugefügt. Der

Reaktionsansatz von 6 µl wurde vorsichtig gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation des Plasmidkonstrukts in chemisch kompetente *E. coli* Zellen.

2.11.1 Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor

Mit Hilfe des pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektors lassen sich durch direkte Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor Plasmidkonstrukte erstellen, die dann nach anschließender Transformation in Bakterien amplifiziert werden können.

Der Vektor verfügt über eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz, über die eine selektive Anzucht der transformierten Bakterien auf antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platten möglich ist.

2.11.2 Klonierung in den pBAD/Thio His TOPO[®]-Vektor

Der pBAD/Thio His TOPO[®] Expressionsvektor bietet die Möglichkeit, ein PCR-Produkt mittels TOPO TA[®] Klonierung direkt in den Vektor zu inserieren und anschließend das gewünschte Protein in *E. coli* rekombinant zu exprimieren.

Die Expression in *E. coli* unterliegt der Kontrolle eines Arabinose-Operons. Das transkriptionelle Regulatorprotein AraC bildet bei Anwesenheit von L-Arabinose mit dieser einen Komplex, welcher dann den *araBAD* Promotor (pBAD) freisetzt und dann zur Transkription führt (Lee, 1980). Durch Variation der Arabinosekonzentration lässt sich das optimale Expressionslevel des Proteins bestimmen.

Um bei einer Überexpression von Fremdprotein in *E. coli* der Bildung von Inklusionskörpern (IBs) entgegenzuwirken, wird das Fremdprotein in Fusion mit Thioredoxin exprimiert. Thioredoxin akkumuliert mit ca. 40 % des zellulären Gesamtproteins und bewahrt dieses daher in löslicher Form, was die Aufreinigung des Proteins unter nativen Chromatographie-Bedingungen erleichtert. Durch die C-terminal gelegene Polyhistidinregion wird das Fremdprotein mit einem 6× Polyhistidin (His₆-tag) fusioniert. Das His₆-tag ermöglicht eine native Aufreinigung des Proteins mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC).

Der Vektor verfügt über eine Ampicillin-Resistenz, so dass nach der Transformation eine selektive Anzucht der transformierten Bakterien auf antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platten möglich ist.

2.12 Sequenzierung

Die durchgeführte nicht-radioaktive Sequenzierung basierte auf der Kettenabbruch-Methode durch Didesoxynukleosid-Triphosphate (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierreaktion wurde das 'CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit' von Fermentas verwendet. Dabei wurde pro Sequenzierreaktion folgender Mastermix angesetzt: 400-800 ng DNA aus einer Plasmidpräparation,

2 pmol sequenzspezifische IRD-800 modifizierte Primer (MWB Biotech, Ebersberg), 2,5 µl Sequenzierpuffer und 1 µl Reader™*Taq* DNA Polymerase wurden mit nukleasefreiem dH₂O auf ein Volumen von 17 µl aufgefüllt. Pro Sequenzierreaktion wurden vier PCR -Reaktionsgefäße benötigt, in denen jeweils 2 µl einer der Dideoxy-modifizierten Nucleotidmischungen (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) mit 4 µl des Mastermix vermischt wurden. Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem Gradientencycler (PTC-200, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf) nach folgendem Programm: Initiale Denaturierung für 3 min bei 94 °C, gefolgt von 25 wiederkehrenden Zyklen von Denaturierung (94 °C, 30 s), Primer-'annealing' (65 °C, 30 s) und Elongation (72 °C, 60 s). Nach vollendeter Sequenzierreaktion wurde diese durch Zugabe von 3 µl STOP-Solution beendet.

Zur Auftrennung der Sequenzierreaktionen wurden modifizierte Polyacrylamidgele aus einer Long Ranger® Gellösung (Biozym Scientific, Wien, AU) angefertigt und in einem automatischen DNA-Sequenzierer (LI-COR 4000, MWG Biotech, Ebersberg) auf 50 °C vorgeheizt. Das Sequenzgel wurde nach einer Denaturierung der Proben für 3 min bei 72 °C und anschließender Kühlung auf Eis mit 0,5 µl von jedem Reaktionsansatz beladen. Detektiert wurden die mit dem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff IRD800 gekoppelten DNA-Fragmente während der Auftrennung, bei 50 °C und 1.500 V üN, in Echtzeit über eine Laser-Photomultiplier-Einheit. Die spätere Auswertung der Daten erfolgte mittels des Programms BasemagIR 4.0 (LI-COR, MWG Biotech, Ebersbach).

Alternativ wurden Sequenzierungen durch folgende Firmen durchgeführt: SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) und GATC Biotech AG (Konstanz), wobei die verschickten Proben gemäß den Angaben der jeweiligen Firma vorbereitet wurden.

2.13 Proteinisolation und -analyse

2.13.1 Isolation von Gesamtprotein aus *E. coli*

Zur Kontrolle der Expression wurden 1 ml Expressionskultur vor und nach Induktion abgenommen und für 30 s bei 14.000 rpm (Mikrozentrifuge, Eppendorf) pelletiert. Nach einmaligem Waschen des Pellets mit 1 ml dH₂O wurde selbiges in 1× Roti®-Load resuspendiert und bei -20 °C gelagert bzw. direkt für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.13.2 Lösliche Proteine aus *E. coli*

Das aus der Expressionskultur gewonnene Bakterienpellet wurde in 15 ml IB-Puffer I resuspendiert. Nach der Zugabe von 30 - 40 mg Lysozym, 15 µl DNase I (1U/µl) sowie 10 mM MgCl₂ erfolgte der Aufschluss der *E. coli* Zellen für 30 min bei RT. Um das hinzugefügte Magnesium anschließend zu entfernen, wurden dem Lysat 10 mM EDTA zugefügt. Eine Ultraschallbehandlung diente zur

Homogenisierung des Zellysats sowie zur Verringerung der Viskosität. Für die Behandlungen wurde ein Ultraschallprozessor (UP 200S, Dr. Hielscher GmbH) mit einer Nadelsonde verwendet (Cycle 1,0 Amplitude 40 %). Eine Ultraschallbehandlung bestand – wenn nicht anders vermerkt – aus vier Zyklen mit je 1 min Ultraschall sowie anschließender Kühlung für 1 min auf Eis. Daraufhin folgte eine Zentrifugation der Proben in JA-20 Zentrifugenröhrchen für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C (Beckman Coulter® Avanti® J-25). Im erhaltenen Überstand befand sich die lösliche Proteinfraction, die im Anschluss für die native Aufreinigung eingesetzt oder bei -20 °C gelagert wurde. Gegebenenfalls wurde vor der chromatographischen Aufreinigung ein Aliquot der löslichen Fraction an Gesamtprotein entnommen, mit 4× Roti®-Load versetzt (Endkonzentration 1×) und für eine SDS-PAGE eingesetzt.

2.13.3 Proteine aus Inklusionskörpern (IBs, 'inclusion bodies')

Zur Aufreinigung von Proteinen aus Inklusionskörpern (IBs) wurde das aus der Aufreinigung der löslichen Fraction verbliebene Pellet verwendet, da dieses aus Zellüberresten sowie IBs besteht. Das Pellet wurde mit einer Pasteur-Pipette in 5 ml IB-Puffer I resuspendiert, ggf. begleitet von einer Ultraschallbehandlung, um eine vollständige Resuspendierung zu erzielen und anschließend für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C in JA-20 Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (Beckman Coulter® Avanti® J-25). Das Pellet wurde in 5 ml IB-Puffer II erneut – wie zuvor beschrieben – resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml IB-Puffer zum Pellet, welches erneut – wie zuvor beschrieben – resuspendiert wurde, gefolgt von einer Zentrifugation in JA-20 Zentrifugenröhrchen für 30 min bei 15.000 rpm und 4 °C in oben genannter Zentrifuge. Der finale Überstand enthielt das aus den IBs aufgereinigte Protein, welches bei -20 °C gelagert oder direkt einer chromatographischen Aufreinigung unterzogen wurde.

2.13.4 Ultrafiltration über Vivaspin® 15R-Konzentratoren

Für eine schnelle Konzentration und Umpufferung von Proteinlösungen eignet sich die Methode der Ultrafiltration über asymmetrische Membranen. Dabei werden beispielsweise Salze und Detergenzien mit dem Lösemittel per Zentrifugation durch eine Membran gepresst, wobei globuläre Proteine mit einem höheren Molekulargewicht als die gewählte Ausschlussgrenze (z.B. 5 kDa, 10 kDa und 30 kDa) zurückgehalten werden. Zur Einengung wurde im Zuge dieser Arbeit ein Ultrafiltrationsgefäß (Vivaspin® 15R, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) befüllt und bei 2000×g und RT in einer Untertischzentrifuge (Multifuge 3L-R, Kendro, Osterode) bis auf das gewünschte Volumen zentrifugiert. Im Fall einer Umpufferung wurde anschließend, bei Bedarf mehrmals, ein bestimmtes Volumen des gewählten Puffers über die aufkonzentrierte

Proteinlösung gegeben und wiederum bei 2000×g bis auf das gewünschte Volumen zentrifugiert. Anschließend wurde die aufkonzentrierte Proteinlösung mit einer Pasteurpipette unter vorsichtigem Abspülen der Membran in ein Eppendorfgefäß überführt und konnte nach einer Konzentrationsbestimmung nach Bradford auf Eis oder bei -20°C gelagert werden.

2.13.5 TCA-Präzipitation

Im Falle einer zu geringen Proteinkonzentration oder einer zu hohen Salzkonzentration wurden die Proteinproben mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurde die zu fällende Probe mit einer 20 %igen TCA-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 6 % TCA eingestellt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 dH₂O resuspendiert und die Lösung im Folgenden mit dem 4-fachen Volumen Aceton versetzt. Durch eine Inkubation für 10 min bei -80 °C oder vorzugsweise üN bei -20 °C erfolgte die Präzipitation der Proteine, die im Anschluss für 30 min bei 15.000 rpm und 4 °C pelletiert wurden. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet unter dem Abzug oder alternativ in einem Savant SpeedVac® Konzentrator (GMI Inc., Ramsey, MN, USA) getrocknet. Das gefällte Protein wurde in dH₂O bzw. im Falle einer folgenden SDS-PAGE direkt in 1× Roti®-Load aufgenommen.

2.13.6 Chloroform/Methanol-Präzipitation

Zur Entfernung von Salzen und Detergenzien wurden Fraktionen aufgereinigter Proteine optional einer Chloroform/Methanol-Präzipitation unterzogen. Dazu wurde je 100 µl Proteinlösung 400 µl Methanol zugefügt und die Mischung kurz gevortext. Anschließend wurde der Lösung 100 µl Chloroform zugeführt und das Reaktionsgefäß erneut gevortext. Als letzte Komponente kam nun 300 µl dH₂O dazu. Auf einen weiteren Durchmischungsschritt folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 14,000×g und RT. Das Protein befand sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und erneut mit 400 µl Methanol versetzt. Wieder wurde die Mischung gevortext und im Anschluss für 2 min bei 14,000×g zentrifugiert. Nun galt es soviel Methanol wie möglich zu entfernen, ohne dabei das Protein-Pellet zu zerstören. Dieses konnte dann per Vakuum-Zentrifugation getrocknet und in dH₂O oder im Falle einer folgenden SDS-PAGE direkt in 1× Roti®-Load aufgenommen werden.

2.13.7 Aceton-Präzipitation

Um Proteinproben für eine HPLC-Analyse vorzubereiten wurde auf die Methode der Aceton-Präzipitation zurückgegriffen, mit deren Hilfe die Lösung aufkonzentriert und Aceton-lösliche Störfaktoren entfernt werden können. Zu einem Volumen Proteinlösung wurden 4 Volumen kaltes Aceton gegeben, die Lösung gemischt und für 30 min bei -80 °C präzipitiert. Dann wurde das Reaktionsgefäß für 15 min bei 15,000×g 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. In geringem Volumen an Probenpuffer konnten die Proteine dann nach Belieben resuspendiert werden.

2.13.8 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie ('IMAC')

Die Aufreinigung von Fusionsproteinen erfolgte mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie ('IMAC') über Protino® Ni-TED Säulen (Macherey-Nagel). Die Bindung des Fusionsproteins an die Säule basiert auf der Interaktion zwischen den Histidin-Resten des Polyhistidin-'tags' und den immobilisierten Nickel-Ionen (Ni^{2+}), welche mittels des starken Chelators Triscarboxymethyl-Ethylendiamin (TED) in der Säulenmatrix verankert sind. Das gebundene Fusionsprotein wurde anschließend durch eine hohe Imidazol-Konzentration eluiert, wobei das His₆-'tag' durch das strukturell ähnliche Imidazol aus der Nickel-Bindung kompetitiv verdrängt wird. Die Protino® Ni-TED Säulen wurden vor Zugabe der Proteinfraction mit 2 ml 1× LEW-Puffer I äquilibriert. Anschließend wurde die klare Proteinlösung über die Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und ein weiteres Mal auf die Säule geladen. Im Falle einer Trübung der Proteinlösung wurde diese zuvor für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C (Beckman Coulter® Avanti® J-25) zentrifugiert, um Schwebpartikel zu entfernen, die im Folgenden zu einer Verstopfung der Säule führen könnten. Um unspezifischen Bindungen entgegen zu wirken, erfolgten mehrere Waschschrirte mit den 1× LEW-Waschpuffern I-IV in chronologischer Reihenfolge (jeweils 15 ml). Zur Elution der spezifisch gebundenen Proteine wurden 6× 0,5 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben, wobei jede Fraktion in einem neuen Eppendorfgefäß aufgefangen wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Eluate erfolgte mittels Bradford-Assay. Um die Enzymaktivität von Proteinen zu bewahren, wurden diese mit einem Volumen autoklaviertem Glycerin versetzt und gemischt, bevor sie bei -20 °C gelagert wurden.

2.13.9 'reverse phase high pressure liquid chromatography' ('RP-HPLC')

Im Zuge dieser Arbeit sollte mittels RP-HPLC, parallel zur Analyse über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel, die Reinheit von Proteinfractionen bestimmt werden. Mit Hilfe der

Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (‘reversed-phase high pressure liquid chromatography’ oder RP-HPLC) ist es möglich, Proteingemische analytisch wie auch quantitativ in einem Fraktionssammler aufzutrennen. Dies findet durch hydrophobe Wechselwirkung des Analyten mit einer unpolaren, stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel statt. Die stationäre Phase besitzt als Trägermaterial alkyliertes Kieselgel, wobei ihr hydrophober Charakter mit der Länge der Kohlenwasserstoffkette steigt. Die mobile Phase setzt sich aus zwei voneinander getrennten Komponenten zusammen, wobei Solvens A aus 0,1 % (v/v) Ionenpaarreagens Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser und Solvens B aus 0,08 % (v/v) TFA in Acetonitril besteht. Die Elution erfolgt mit Hilfe des organischen Lösungsmittels Acetonitril (Solvens B), welches im Gradientenverlauf der wässrigen Phase (Solvens A) zugemischt wird und dadurch zunehmend mit den adsorbierten Molekülen um die hydrophoben Bindungsstellen konkurriert. Die Detektion der eluierten Proteine verläuft über UV-Absorption bei 220 bzw. 280 nm, wobei die Proteine mit der schwächsten hydrophoben Wechselwirkung zur Kohlenstoffkette den Detektor als Erstes passieren. Das verwendete HPLC-System (System Gold, Beckmann Coulter, Fullerton, USA) wurde mit einer Umkehrphasen-C5-Säule (Discovery® Bio Wide Pore C5, Supelco) betrieben. Der Lösungsmittelgradient verlief von 2 % (v/v) (Solvens A) - 80 % (v/v) (Solvens B) und wurde mit Hilfe eines Pumpenmoduls bei einer Durchflussrate von 1 ml / min über die stationäre Phase gepumpt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm, wobei pro Anwendung 10 µg Protein eingesetzt wurden. Die gemessenen Werte wurden graphisch in einem Chromatogramm dargestellt.

2.13.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford-Assay

Die Konzentrationsbestimmung proteinhaltiger Lösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) unter Benutzung des BioRad-Protein-Assays (BioRad, München). Dieser Assay beruht auf der Komplexbildung des Trimethylmethanfarbstoffs Coomassie® Blue G-250 mit basischen und aromatischen Aminosäureresten von Proteinen, was durch Stabilisierung der anionischen Sulfonat-Form eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von $\lambda = 465$ nm zu $\lambda = 595$ nm zur Folge hat (Comptom *et al.*, 1985). Die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 595$ nm ist somit ein Maß für die Konzentration an Protein in der Lösung. Für die Konzentrationsmessung wurden 50 µl Proteinprobe mit dH₂O auf ein Volumen von 800 µl eingestellt, mit 200 µl BioRad-Farbreagenz versetzt und gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Absorptionsmessung bei $\lambda = 595$ nm in einem Spektralphotometer (Beckmann DU 640, München). Als Referenz wurde die entsprechende Menge an Protein-Elutionspuffer – wie zuvor beschrieben – mit dH₂O und BioRad-Farbreagenz vermischt und gemessen. Anhand einer BSA-Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration durch Interpolation ermittelt werden. Da vorhandene Detergenzien mit dem

Assay interferieren, war darauf zu achten, dass die Proteine in einem mit dem Assay kompatiblen Puffer gelöst waren.

2.13.11 Gelelektrophorese von Proteinen

Die mit 1× Roti®-Load versetzten Proteinproben wurden für 5 min in kochendem Wasser denaturiert und im Anschluss auf Eis gekühlt.

2.13.11.1 Vorbereitung von Gesamtprotein-Proben

Zur mechanischen Homogenisierung des Zelllysats, bei der genomische DNA fragmentiert (geschert) und somit die Viskosität des Lysats reduziert wird, wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Jede Probe wurde 4 Zyklen à 15 s Ultraschall und 15 s Kühlen auf Eis unterzogen. Alternativ konnte die DNA durch mehrfaches Auf- und Abziehen der Probe durch eine enge Kanüle geschert werden.

2.13.11.2 Vorbereitung von aufgereinigten Protein-Proben

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung aufgereinigter Proteine wurden Aliquots der Eluate mit ¼ Volumen 4× Roti®-Load versetzt und die Proteine –wie zuvor beschrieben – denaturiert.

2.13.11.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ('SDS-PAGE')

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1970). Durch die Zugabe des anionischen Detergenzes Natriumdodecylsulfat (SDS), welches im Proteinladungspuffer enthalten war, erfolgt eine Denaturierung der Proteine, wobei diese durch vorherige Inkubation der Proteine mit Disulfidbrücken-reduzierenden Mitteln wie β-Mercaptoethanol oder DTT unterstützt werden kann. Dabei bindet das SDS an hydrophobe Regionen der Proteine und bildet einen SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis, wobei durch die starke negative Ladung des SDS alle Eigenladungen der Proteine nivelliert werden. Die so komplexierten Proteine unterscheiden sich nur noch in ihrer molekularen Größe. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zu einer Migration der negativ geladenen Komplexe durch eine Gelmatrix, bei der, bedingt durch einen Molekularsiebeffekt, eine Anordnung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt.

Die Polyacrylamidgele wurden aus einer 30 %igen Polyacrylamid-Stammlösung hergestellt, indem die radikalische Polymerisation der Polyacrylamidlösung durch die Zugabe von APS und TEMED initiiert wurde. Die verwendeten vertikalen Gele bestanden aus einem, je nach Größe des aufzutrennenden Proteins, 10 - 12,5 %igen Trenngel, sowie einem darüber befindlichen, 5 %igen Sammelgel zur Konzentrierung der Proteinprobe. Pro Geltasche wurden 20 - 40 µg Protein (Volumen max. 20 µl) aufgetragen und in 1× SDS-PAGE-Laufpuffer mit einer Spannung von ca. 10 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 5 - 10 µl des Markers 'PageRuler™ Prestained Protein Ladder' bzw. 'Prestained Protein Molecular Weight' (Fermentas) aufgetragen.

Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurde das Gel zur Detektion der Proteine mit Coomassie gefärbt oder für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt.

2.13.12 Nachweis von Proteinen

2.13.12.1 Coomassie-Färbung

Ein Nachweis von Proteinen erfolgte durch Anfärben selbiger mit einem kolloidalen Coomassie Brilliant Blue Farbstoff. Dafür wurde das Gel zuerst für 15 min in dH₂O geschwenkt, um das enthaltene SDS auszuwaschen. Anschließend wurde das Gel zur Färbung mit 'PageBlue™ Protein Staining Solution' (Fermentas) versetzt und üN inkubiert. Die folgende mit Coomassie-Entfärber durchgeführte Entfärbung diente zur Entfernung der unspezifischen Hintergrundfärbung. Nach abgeschlossener Entfärbung (2-4 h) wurde das Gel kurz mit dH₂O gewaschen und zur Dokumentation gescannt.

2.13.12.2 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Für den Transfer mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA, Schleicher und Schuell, Dassel) wurde nach der 'semi-dry'-Blot Methode (Kyhse-Andersen, 1984) verfahren, wobei ein kontinuierliches Puffersystem verwendet wurde. Der Zusatz von Methanol zum Puffer diente der Aktivierung der Proteinbindestellen der Membran, so dass die Proteine folglich durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden werden konnten. Alle Komponenten des Systems wurden vor dem Aufbau in Transferpuffer getränkt, um ein durchgehendes Puffersystem zu bilden, wobei die getränkten Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone, England) als Puffersystem dienten. Auf die untere Graphitplatte (Anode) wurden zwei Lagen Filterpapier gelegt, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, auf der dann direkt das SDS-Gel aufgelegt wurde. Anschließend erfolgte wiederum das Auflegen von 2 Lagen Filterpapier, sowie das

Verschließen der Apparatur (Biometra Fast Blot Apparatur, Göttingen) mit der zweiten Graphitplatte (Kathode). Der Proteintransfer erfolgte für 45-60 min bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Membran. Nach dem Transfer konnte die Membran entweder direkt weiter verwendet oder zwischen zwei Filterpapieren bei 4 °C gelagert werden.

2.13.12.3 Ponceau S Färbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde eine Färbung mit Ponceau S durchgeführt. Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine, wobei ein sichtbarer, rötlicher Komplex entsteht. Für die Detektion wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung überschichtet, für ca. 2 min schwenkend inkubiert und die Färbelösung anschließend abgegossen. Durch Waschen der Membran mit dH₂O bzw. der Inkubation in Blocklösung konnte die Membran wieder leicht entfärbt werden. Die Lagerung der Membran erfolgte in Filterpapier eingeschlagen bei 4 °C.

2.13.12.4 Immundetektion mit Antikörpern

Nach einem Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran konnte eine Immundetektion mit Antikörpern erfolgen. Eine solche Membran wurde zu Beginn der Detektion für 1 - 2 h in Blocklösung (1× Roti®-Block / 1× PBS⁻) bei RT schwenkend inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach erfolgte die Zugabe des entsprechenden Primärantikörpers, der in Blocklösung verdünnt wurde (in der Regel 1:500). Dieser wurde für 1 - 2 h schwenkend bei RT mit der Membran inkubiert. Anschließend folgten drei 10minütige Waschschrte mit 0,05 % PBST-Puffer, um unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Als weiteres erfolgte die Zugabe des mit Meerrettich-Peroxidase ('horseradish peroxidase', HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher ebenfalls in Blocklösung verdünnt (i. d. R. 1:1000) und für 1 h schwenkend bei RT mit der Membran inkubiert wurde. Um unspezifisch gebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut – wie zuvor beschrieben – dreimal gewaschen. Die an den Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase kann unter Zugabe des 'ECL Western Blotting' Substrats (Pierce Biotechnology, Inc., IL, USA) Chemilumineszenz erzeugen, sodass die mittels Antikörper spezifisch detektierten Proteinbanden visualisiert werden. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Detektionsreagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt, davon 0,125 ml / cm² Membran auf selbige gegeben und für 1 - 2 min bei RT schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die ECL-Lösung entfernt, die Membran kurz mit 1× PBS⁻ gewaschen und luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien gelegt. Die Exposition erfolgte in einer Filmkassette auf einem ECL Hyperfilm (Amersham, Braunschweig) für 30 s bis 1 min, je nach Stärke des Signals. Die

exponierten Filme wurden unter Rotlicht in einer Dunkelkammer entwickelt, indem sie zuerst für 1-5 min in Entwicklerlösung inkubiert, danach mit VE-H₂O gespült und anschließend für 2 - 5 min in Fixierlösung fixiert wurden. Die fixierten Filme wurden gründlich in VE-H₂O gewässert und zum Trocknen in einen Wärmeschrank gehangen.

2.14 Enzymkinetik

2.14.1 Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Assay ('PPlase-Assay')

Da Cyclophiline über eine Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomeraseaktivität verfügen (Fischer *et al.*, 1989), erfolgte die Messung der Enzymaktivität, verändert nach Berriman (1998) und Kofron *et al.* (1991), indirekt über einen kolorimetrischen, Protease-gekoppelten Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPlase)-Assay. Bei dem synthetischen Peptidsubstrat N-Succinyl-Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-*para*-Nitroanilid (Suc-AAPF-*p*NA) (Sigma-Aldrich) handelt es sich um ein Razemat aus Substratpeptid mit *trans*-Ala-Pro-Bindung und *cis*-Ala-Pro-Bindung, welches ein Substrat für α -Chymotrypsin darstellt (DeMar *et al.*, 1979). Dabei wird jedoch spezifisch nur das *trans*-X-Pro Konformer durch die Protease α -Chymotrypsin proteolytisch gespalten (Neil *et al.*, 1966; Fischer *et al.*, 1984b), wobei das gelbfarbene Produkt *para*-Nitroanilin entsteht. Das durch den Entzug des *trans*-Isomers aus dem *cis-trans*-Verhältnis entstandene Ungleichgewicht wird durch spontane Isomerisierung von *cis*-Isomer zu *trans*-Isomer ausgeglichen. Da das in sehr großem Überschuss vorliegende α -Chymotrypsin das nachgelieferte *trans*-Isomer sofort wieder spaltet, läuft dieser Prozess kontinuierlich ab, bis das gesamte Substrat aufgebraucht ist. Mit Hilfe von Isomerasen lässt sich die *cis-trans*-Isomerisierung beschleunigen. Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPlase) (Fischer *et al.*, 1984) katalysieren die Isomerisierung von X-Prolin-Peptidbindungen, z.B. auch von Ala-Pro-Peptidbindungen wie im Falle des verwendeten Substrats.

Die durch Isomerisierung nachgelieferte Menge an *trans*-Isomer verhält sich proportional zur Produktmenge, dem gelben *para*-Nitroanilin. Daraus schlussfolgernd ist die Geschwindigkeit der Produktzunahme ein Maß für die PPlase-Aktivität; abzüglich der Produktzunahme durch spontane Isomerisierung. Vorbereitend für den PPlase-Assay wurden die benötigten Komponenten in den entsprechenden Vehikelsubstanzen gelöst bzw. verdünnt und bei 4 °C bzw. auf Eis gelagert. Um ein Gefrieren der PPlase zu vermeiden wurde das auf -20 °C in Glycerin gelagerte Enzym am jeweiligen Versuchstag stets frisch mit HEPES-Puffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Protease α -Chymotrypsin konnte mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Die verwendeten Micro-Küvetten aus optischem Spezialglas (OS) (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) wurden vor Beginn einer Messreihe mit 2 % (v/v) Hellmanex®-Küvettenreiniger für mindestens 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit dH₂O gespült, um diese zu reinigen. Zur Messung der

Enzymaktivität wurden in einem Versuchsansatz von 1 ml zuerst 20 µl Enzym (PPlase) aus einer 10 µg/ml Stammlösung und 20 µl α-Chymotrypsin aus einer 60 mg/ml Stammlösung ad 990 µl 35 mM Hepes-Puffer aufgefüllt, in eine Küvette überführt und für 10 min bei 10 °C äquilibriert. Nach Kalibrierung mit der vorgekühlten Mixtur erfolgte anschließend die Zugabe von 10 µl Substrat mit Hilfe einer auf Eis vorgekühlten Pipettenspitze, wodurch die Reaktion initiiert wurde. Unter Verwendung einer auf 10 °C temperierten Kühlzelle erfolgte die Messung bei einer Absorptionswellenlänge von $\lambda = 390$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 630$ nm in 1 s Intervallen für eine Zeit von 100 s, wobei die Absorptionszunahme mit einem Spektralphotometer (Beckman DU-640, München) aufgezeichnet wurde. Nach Übertragung der einzelnen Messwerte in eine Excel-Datei konnten die Daten mit Hilfe des Programms SigmaPlot10 (Systat software Inc., 2006) ausgewertet werden. Dafür wurden – unter Einbezug der Mischzeit von 5 s nach Substratzugabe – die gemessenen Absorptionen $[OD_{390}]$ gegen die Zeit [s] aufgetragen.

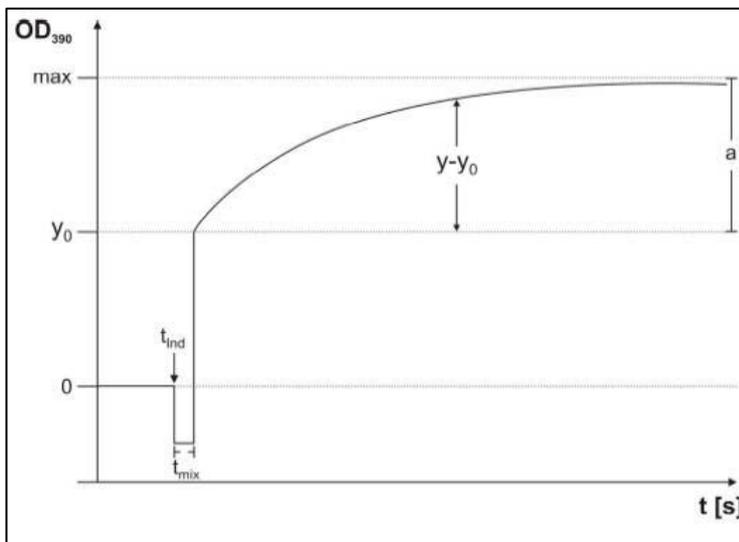


Abb. 2.1 Schematische Darstellung einer Auswertung des PPlase Assays

Dargestellt ist ein modellhafter Kurvenverlauf mit den für eine Auswertung nötigen Parametern y , y_0 , a und t . Die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} errechnet sich nach Normierung der Daten aus der Initialsteigung der Rohdatenkurve, abzüglich der spontanen Isomerisierung. Es handelt sich in diesem Fall um eine Reaktion 1. Ordnung.

Diese Rohdaten wurden anschließend zur Ermittlung einer Geschwindigkeitskonstanten (k_{cat}) 1.Ordnung mittels nicht-linearer Regression durch eine Exponentialfunktion der folgenden Form mit Anstieg bis zu einem Maximum angepasst:

$$f(x) = y_0 + a(1 - e^{-bx}) \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die durch Anpassung der Rohdaten an Gleichung 1 ermittelten Werte wurden unter Einbezug der Parameter y_0 und a verrechnet und die daraus resultierende Kurve logarithmiert:

$$f(x) = \ln\left(\frac{a}{a - (y - y_0)}\right) \quad (\text{Gleichung 2})$$

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k wurden die y -Werte aus Gleichung 2 gegen die Zeit (s) aufgetragen und die initialen Steigung in den ersten 5 s durch lineare Regression ermittelt:

$$f(x) = a x + b \quad (\text{Gleichung 3})$$

Dabei gilt:

$$a = k_{cat} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Durch Subtraktion der spontanen, nicht-enzymatischen Geschwindigkeitskonstanten (k_{spont}) konnte die Netto-Geschwindigkeitskonstante der Enzym-katalysierten Reaktion (k_{cat}) errechnet werden. Gemessen wurde die Aktivität von PPIasen und der Effekt von diversen Substanzen auf die Peptidyl-Prolyl-Aktivität der Enzyme.

2.14.2 Chaperon-Assay ('Refolding'-Assay)

Zum Nachweis der Chaperon-Aktivität von Cyclophilinen wurde ein 'Refolding'-Assay nach Schönbrunner *et al.* (1991) etabliert. In diesem Assay wird in einem Fluoreszenzspektrometer die bei einer Rückfaltung von denaturierten Proteinen messbare Fluoreszenz-Zunahme über die Zeit aufgezeichnet. Chaperone, wie beispielsweise Cyclophiline, beschleunigen im Allgemeinen die Geschwindigkeit des Rückfaltungsprozesses. Das in diesem Assay genutzte, denaturierte Protein war die RNase T1 aus dem Pilz *Aspergillus oryzae* (Sigma). 100 μ M Protein wurden für 2 h bei 10 °C in Denaturierungspuffer inkubiert. In diesem Puffer ist die RNase T1 8 M Harnstoff ausgesetzt. Nach Ablauf der Zeit wurden 25 μ l dieser Lösung mit 975 μ l Renaturierungspuffer gemischt um die Harnstoffkonzentration auf 0,2 M zu reduzieren. Unter diesen Bedingungen wirkt der Harnstoff stabilisierend auf die Konformation des Proteins und das Enzym beginnt zu renaturieren. Durch Zugabe von Cyclophilinen in diesen Reaktionsansatz wurde die Reaktion beschleunigt. Die Fluoreszenzzunahme wurde für einen Zeitraum von 1 h verfolgt und in Zeitintervallen von 30 s bestimmt. Die Anregungswellenlänge war 268 nm (1,5 nm Bandbreite), die Fluoreszenz wurde bei 320 nm gemessen (10 nm Bandbreite). In der eingesetzten 3 ml UV-Meßküvette (Helma) befand sich ein Magnetrührer der den Reaktionsansatz permanent mischte. Vor jedem Meßtag wurde die Küvette mit 2 % (v/v) Hellmanex®-Küvettenreiniger für mindestens 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit dH₂O gespült, um diese zu reinigen. Die Rohdaten der Messung wurden ausgewertet und die Reaktionsgeschwindigkeit als Endpunkt der Fluoreszenzzunahme nach einer bestimmten Zeit definiert. Inhibitionen konnten dann in (%) der Positivkontrolle angegeben werden.

2.15 Fluoreszenz-Titration

Eine Zunahme intrinsischer Tryptophan-Fluoreszenz bei Bindung von kleinen Molekülen an Cyclophiline wurde analog zu der Methode von Husi *et al.* (1994) untersucht. Das Prinzip beruht dabei auf der Änderung der Gesamtfluoreszenz einer Probe, wenn bestimmte Tryptophanreste durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen „verdeckt“ werden. Das Experiment wurde bei Raumtemperatur und in 50 mM Tris, 0,1 M NaCl (pH 7,6) vollzogen. In der eingesetzten UV-Küvette (Helma) befand sich ein Magnetrührer, der die Probe permanent durchmischte. Die Proteinkonzentration variierte in einem Bereich von 0 - 2 μ M und Ligandenkonzentration in einem Bereich von 0 - 50 μ M. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 324 nm aufgenommen, Anregungswellenlänge war 290 nm. Die Fluoreszenzänderung erfolgte unmittelbar nach der Ligandenzugabe. Ausgewertet wurde die Fluoreszenzänderung als Vielfaches der Ausgangsfluoreszenz nach Abzug der Hindergrundfluoreszenz.

2.16 *In vitro* Exzystierung von *Eimeria tenella*

Um den Zustand der Parasiten und den Einfluss des monoklonalen Antikörpers E2E5 zu untersuchen, wurde ein *in-vitro* Exzystierungsassay etabliert. Dazu wurden frische, sporulierte Oozysten in mittels einem Glas-Teflon-Potter aufgebrochen und die freien Sporozysten über Nacht bei 4°C in PBS⁻ / 10 μ g/ml Enrofloxazin (Baytril; Bayer, Leverkusen) inkubiert. Die Sporozysten wurden dann abzentrifugiert und in 20ml PBS⁻ / 2,5 μ g/ml Trypsin. Im Anschluss wurde die Lösung mit 1 ml Hühnergalle versetzt. Aliquots aus dieser Lösung wurden dann entweder mit 12,5 μ l 50-fach konzentriertem E2E5-Antikörper oder entsprechenden Kontrollüberständen, bei 41,5°C und 5% CO₂ für 5 Stunden geschüttelt. Einige Sporozysten vor und Sporozoiten nach Exzystierung wurden dann in einer Neubauerkammer ausgezählt und die Unterschiede in den Anzahlen mittels gepaartem t-Test auf Signifikanz untersucht.

2.17 Recherche in Datenbanken

Die durch Sequenzanalyse ermittelten Daten wurden zunächst mit dem Programm Clone-Manager 7.0 aufgearbeitet, um die Vektoranteile zu entfernen und die deduzierten Proteinsequenzen zu ermitteln. Für den Vergleich mit bereits bekannten Proteinen, cDNA-Banken und genomischen Sequenzen, wurde auf nicht redundante Datenbanken (www.ncbi.nlm.nih.gov.) zurückgegriffen. Weitere Protein- und DNA-Sequenzvergleiche erfolgten mit dem *Eimeria*-Genomprojekt (www.sanger.ac.uk/projects/e_tenella, www.genedb.org/eimer) und dem *Toxoplasma*-Genomprojekt (www.toxodb.org.). Der Abgleich von DNA- und Proteinsequenzen wurde jeweils

mittels der Programme BLAST, xBLAST, tBLASTx und omniBLAST vollzogen. Ebenfalls verwendet wurde das Programm „BLAST2sequences“ (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tatusova und Madden, 1999) und ClustalW2 zum ‚multiple sequence alignment‘ (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/). Offene Leseraster (ORFs), Enzymschnittstellen und hypothetische Klonierungen wurden ebenfalls mittels Clone-Manager 7.0 durchgeführt. Für die bioinformatische Analyse von Proteinen wurde auf die Vorhersagetools auf dem Protein-Server www.expasy.org zurückgegriffen. Im speziellen waren die Programme zur Voraussage von Signalpeptiden (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), der subzellulären Lokalisation (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>), des theoretischen isoelektrischen Punktes und des theoretischen Molekulargewichtes (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

3 Ergebnisse

3.1 Phagen Display gegen Toltrazuril

Der Wirkstoff Toltrazuril (Baycox®, Bayer) ist seit den achtziger Jahren eines der meist verwendeten Chemotherapeutika bei der weltweiten Bekämpfung von Kokzidiose, Toxoplasmose und Sarcocystose. Obwohl man in der Literatur viele Hinweise einer möglichen Wirkung der Substanz auf den Kokzidiose-Erreger *Eimeria tenella* findet, ist ein spezifisches molekulares Target bis heute noch nicht identifiziert worden. Die Problematik der Resistenzentwicklung in den weltweit verbreiteten *Eimeria*-Stämmen und die damit verbundenen enormen wirtschaftlichen Verluste in der Geflügelmastindustrie machen jedoch deutlich, wie wichtig es ist, dieser Frage nachzugehen.

Im Zuge dieser Arbeit sollten neue, potentielle Targets für Toltrazuril identifiziert werden. Dabei wurde auf die Methode des Phagen Displays zurückgegriffen (2.8.1). Unter Benutzung einer 'random'-Dodecapeptid-M13-Phagenbibliothek (New England Biolabs, Frankfurt am Main), welche zu Beginn der Selektion statistisch etwa 55 Kopien $2,7 \times 10^9$ verschiedener Aminosäuresequenzen als Gen-III-Fusionen auf der Oberfläche der Phagenpartikel enthielt, wurden in drei Anreicherungs- und Selektionszyklen Peptide identifiziert, die eine Affinität zu immobilisiertem Toltrazuril zeigten. Aus dem selektionierten Phagenpool wurden 100 Klone zufällig ausgewählt und per DNA-Sequenzanalyse (2.12) auf ihr 'Insert' hin untersucht. Es zeigte sich eine prozentuale Verteilung innerhalb des Pools, bei der sich drei Peptide zu einem Gesamtanteil von 8 – 17 % im Phagenpool angereichert hatten (Abb. 3.1). Es handelte sich dabei um die Klone A (YNVREDIRPVMD), B (QIVDSWSAPTNM) und C (NMDWILGNYTAY). Diese Einzelklone wurden dann erneut für Bindungsstudien ('Kontroll-Pannings') gegen Toltrazuril eingesetzt (2.8.3.1). Dabei zeigte sich, dass alle drei Kandidaten eine höhere Affinität zu Toltrazuril als zur Kontrolle (in diesem Fall immobilisiertes Streptavidin) aufwiesen. Klon A zeigte eine über 400-fach höhere Affinität und rückte daher in den Fokus der weiteren Untersuchungen (Abb. 3.3).

3.2 Datenbank-Recherche mit den angereicherten Peptiden

Die Datenbankrecherche bestand zu Beginn darin, nach Proteinen aus *Eimeria tenella* zu 'screenen', welche die identifizierte Aminosäuresequenz mit Toltrazuril-Affinität ('YNVREDIRPVMD') zu einem hohen Prozentsatz enthielten (2.17). Die hierfür genutzte Datenbank war hauptsächlich das Online-Portal des *Eimeria tenella* Genomprojektes (www.genedb.org/eimer). Zu Beginn der Suche wurde von einem Rezeptor ausgegangen, welcher sich vermutlich in allen Toltrazuril-suszeptiblen Apikomplexa finden ließe, in nicht-suszeptiblen aber fehlen würde oder

deutlich verändert wäre. Deshalb wurden mögliche ‚Kandidaten‘ immer auch mit den orthologen Proteinen aus anderen Apikomplexa verglichen. So zum Beispiel mit *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Theileria annulata*, *Neospora caninum* und *Plasmodium spp.*. Aufgrund der meist sehr geringen Menge an Daten, die in den reinen Proteindatenbanken verfügbar waren, wurden auch die verfügbaren cDNA-Datenbanken inklusive der vorausgesagten Proteine durchsucht. Diese Recherche lieferte einige wenige, putative Rezeptor-Kandidaten, wobei der beste Treffer ein 567 bp (189 AS) großes, theoretisches Protein war. Die Vorhersageprogramme ‚conserved domains‘ Scan (www.ncbi.nlm.nih.gov) und InterProScan (www.ebi.ac.uk) bestimmten mit einer sehr hohen Sicherheit, dass es sich bei diesem unbekanntem Protein um ein Cyclophilin handelte (Abb. 3.2a+b). Für weiterführende Informationen zu Cyclophilinen, siehe Kapitel 4.2.

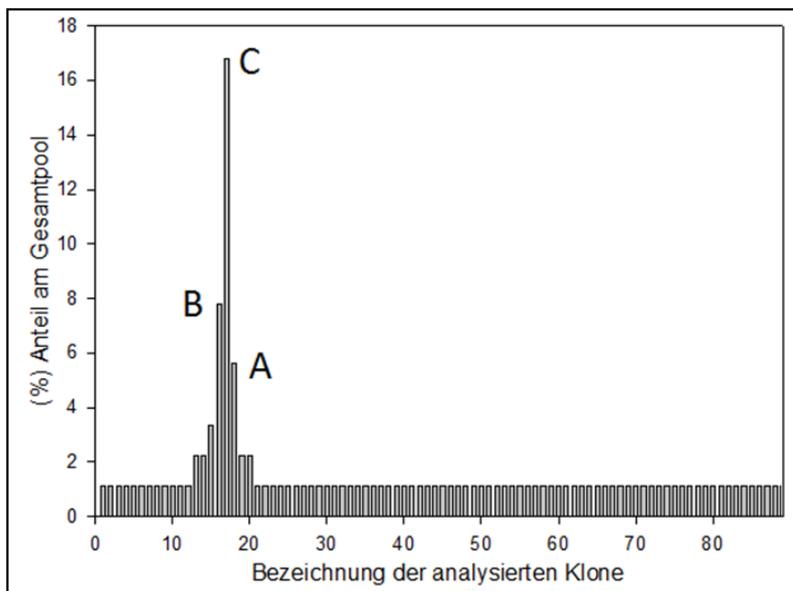


Abb. 3.1 Verteilung der Klone im Phagenpool nach der dritten Selektionsrunde

Nach der dritten Runde Phagen-Display reicherten sich einige wenige Klone zu einem Prozentsatz von bis zu 17 % des Gesamtpools an. Die drei Klone mit der höchsten Anreicherung, A, B und C wurden für nachfolgende Kontrollpanning-Studien eingesetzt.

Das theoretische Molekulargewicht des Cyclophilins lag bei 20,467 kDa, der berechnete isoelektrische Punkt bei pH = 5,53 (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Das Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) zeigte eine fast 100 %ige Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid im N-terminalen Bereich des Proteins (Aminosäuren 1-23). Zwischen den Aminosäuren 23 und 24 ließ sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 81,2 % eine Erkennungssequenz zum Abspalten des Signalpeptids voraussagen (Abb. 3.4) Mit dem Algorithmus PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) konnte weiterhin die subzelluläre Verteilung des Proteins vorhergesagt werden. Auf Basis des Signalpeptids sagte das Programm zu 66,7 % eine extrazelluläre Lokalisation und zu jeweils 11,1 % ein zytoplasmatisches, vakuoläres oder endoplasmatisch retikuläres Vorkommen voraus.

Sequenzvergleiche zeigten, dass das Toltrazuril-Bindepeptid sich zwischen den Aminosäuren 45 und 61 befand. In diesem Bereich ähnelte sich die Sequenz von *EtCyp20.5* in 5 identischen und 4

positiven Aminosäuren, was für diesen Bereich eine Ähnlichkeit von 41,6 % (83,3 % positive) bedeutet (Abb. 3.5a).

A

InterPro IPR002130		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	
Domain	PR00153		CSAPPISMIRASE
InterPro	G3DSA:2.40.100.10		no description
SRS	PF00160		Pro_isomerase
	PS00170		CSA_PPIASE_1
	PS50072		CSA_PPIASE_2

B

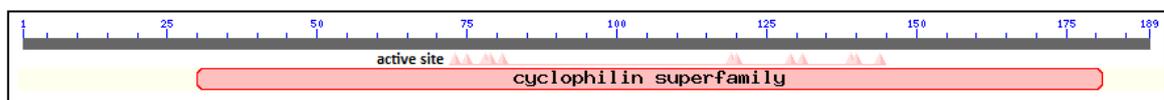


Abb. 3.2a+b Voraussage mittels 'conserved domains' Scan (www.ncbi.nlm.nih.gov) und InterProScan (www.ebi.ac.uk)

Die benutzten Analyse-Programme bestimmten mit einer hohen Sicherheit, dass es sich bei dem unbekanntem Protein um ein Cyclophilin ABH-ähnliches Protein handelte. Zusammen mit dem theoretischen Molekulargewicht von etwa 20,5 kDa ergab sich der Name *EtCyp20.5*. (20,5 kDa großes Cyclophilin aus *Eimeria tenella*).

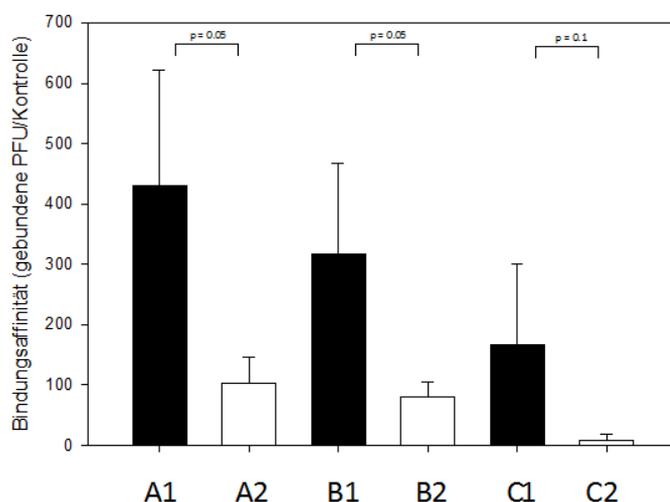


Abb. 3.3 Kontrollpannung (2.8.3.1) der drei am höchsten angereicherten Klone des selektierten Pools nach der dritten Runde 'Biopanning'.

Getestet wurden die Klone A, B und C in ihrer Affinität gegen immobilisiertes Toltrazuril (1) und immobilisiertes Streptavidin (2) als Kontrolle. Die 'Plastikkontrolle' wurde bereits mit allen Werten verrechnet. In allen drei Fällen haben mehr Phagen an Toltrazuril gebunden als an die Kontrolle. Die beste Bindung zeigte der Klon (A). Dieser rückte deshalb in den Fokus weiterer Untersuchungen.

Ein multipler Sequenzvergleich orthologer Proteine aus anderen Toltrazuril-sensitiven und nicht-sensitiven Apikomplexa mit *EtCyp20.5* zeigte, dass es in dem Protein offenbar stark konservierte und hoch variable Bereiche gibt. Das Toltrazuril-Bindepeptid liegt innerhalb eines Bereiches, welcher besonders bei den Toltrazuril-sensitiven Apikomplexa *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* hoch konserviert zu sein scheint (Abb. 3.5b+c). Entsprechende Sequenzdaten zu *Isospora spp.*, *Sarcocystis spp.* oder *Hepatozoon spp.* waren zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit aufgrund zu geringer Sequenzdatenmengen leider nicht verfügbar.

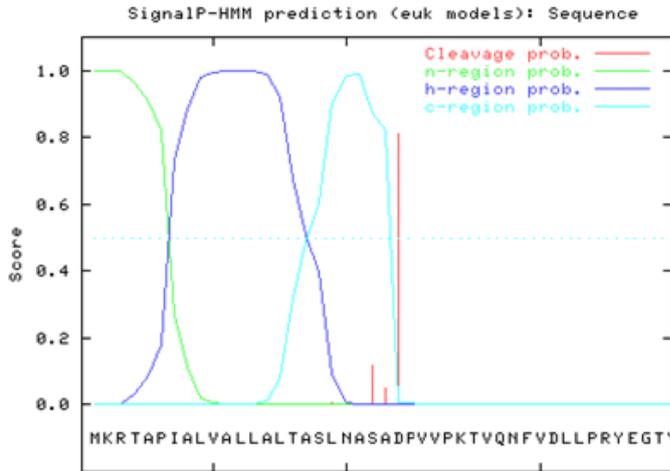


Abb. 3.4 Voraussage eines N-terminalen Signalpeptids bei *EtCyp20.5* mit dem Programm SignalP.

Zu sehen ist die Wahrscheinlichkeit für ein N-terminales Signalpeptid. Diese liegt bei fast 100%. Eine Schnittstelle befindet sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 81,3 % zwischen den Aminosäuren 23 und 24.

Es sei allerdings angemerkt, dass die untersuchten Sequenzen aufgrund der zu geringen verfügbaren Datenmengen nicht eindeutig als orthologe Proteine klassifiziert werden konnten, sondern nur vergleichbare Cyclophiline gleicher Größe und Lokalisation darstellen. Ein Vergleich mit anderen Cyclophilinen aus *Homo sapiens* und *Sacharomyces cerevisiae* ließ den Schluss zu, dass es sich bei dem Kandidaten um ein Protein handelt, welches die höchste Ähnlichkeit zu den Cyclophilinen A (CypA) und B (CypB) aus Mensch und Maus, sowie den Cyclophilinen Cpr1p und Cpr2p aus der Hefe zeigt (Abb. 3.6a-d). Bei dieser Ableitung war vor allen Dingen das Vorhandensein des Signalpeptids entscheidend. Weitere Sequenzvergleiche ließen außerdem den Schluss zu, dass die 13 Aminosäuren, welche bei nahezu allen Cyclophilinen die Cyclosporin A (CsA) Bindungstasche ausmachen, vollständig zu finden waren. Ferner waren 12 der 13 Aminosäuren die in der Bindung der *cis*-Form des künstlichen Peptidsubstrates Suc-AAPF-pNA beim humanen CypA involviert sind bei *EtCyp20.5* identisch (Abb. 3.5b).

```

EtCyp20.5      MKRTAPIALVALLALTASLNASADPVKEAFLEIAINGEPIGFLNFNLRPDVVPKTVQNFVDLL 63
Klon A        -----YNVREDIRP-----VMD-- 12
                                     :*: * *: *      .:*

EtCyp20.5      PRYEGTYFHRIIPDFMVQGGDVQRNSRPDANTEPVDSFEDENFQLKHVGPILSMANAGPNTN 126
Klon A        -----

EtCyp20.5      SSQFFVTVVATPWLDRHVVFGTITEDSMEVLKRIEATGSSSGRPSASVTVKSSGIGHRPNAS 189
Klon A        -----
    
```

Abb. 3.5a ClustalW 2.0.10 Sequenzvergleich zwischen dem Dodecapeptid mit Toltrazurilaffinität (Klon A) und *EtCyp20.5*.

Der Kandidat befindet sich zwischen den Aminosäuren 48 und 61. Innerhalb dieses Bereiches stimmt die Proteinsequenz mit dem Kandidaten in 83 % positiven Aminosäuren überein.

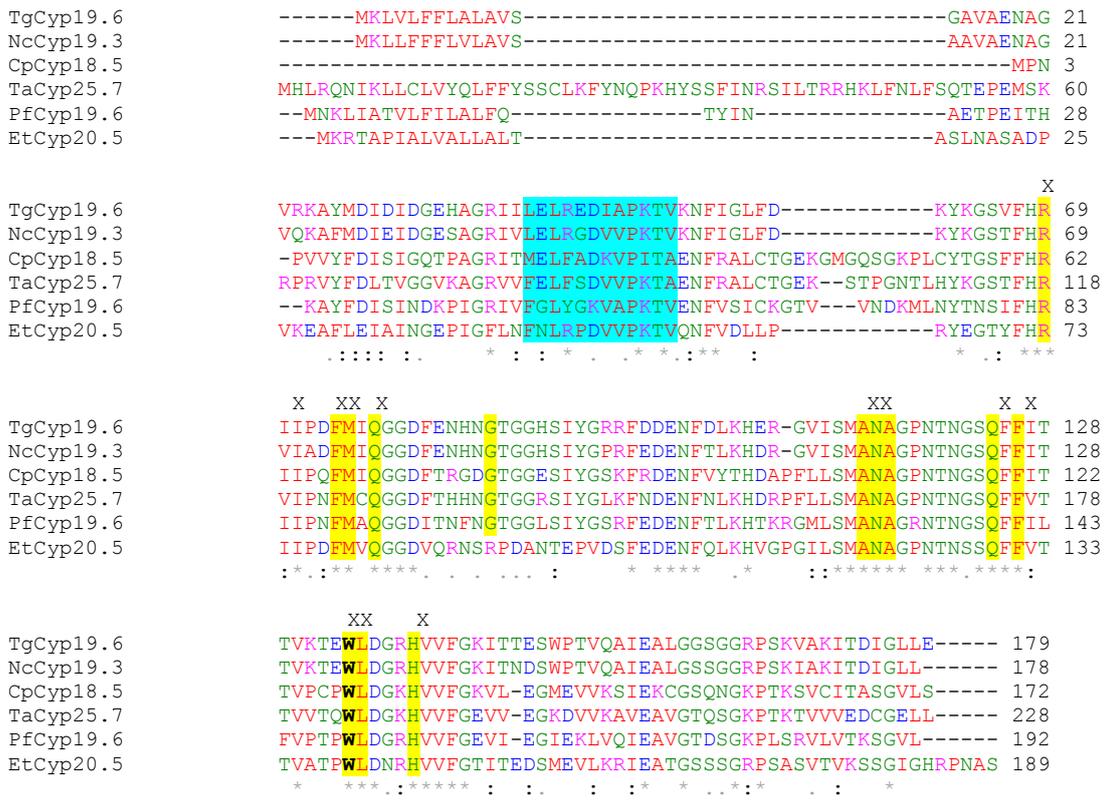


Abb. 3.5b ClustalW 2.0.10 Multipler Sequenzvergleich zwischen EtCyp20.5 und orthologen Proteinen aus anderen Apikomplexa

Die verschiedenen Cyclophiline weisen Bereiche auf, die hoch konserviert und für die PPIase-Funktion unerlässlich sind. Andere Bereiche, wie der C-Terminus und besonders der N-Terminus scheinen sehr variabel zu sein. Der Klon A befindet sich in einem Bereich der besonders bei den Toltrazuril-sensitiven Parasiten hoch konserviert ist. Der Bereich in welchem das Ph.D. Peptid liegt, ist türkis unterlegt. Ein X weist auf eine Aminosäure hin, die in die Bindung des künstlichen Peptidsubstrates Suc-AAPF-pNA involviert ist. Die Aminosäuren die in der CsA Bindung involviert sind, sind gelb unterlegt. Das essentiell notwendige Tryptophan ist zusätzlich schwarz und fett gefärbt. Tg= *Toxoplasma gondii*; Nc= *Neurospora crassa* ; Cp= *Cryptosporidium parvum*; Ta= *Theileria anulata*; Pf=*Plasmodium falciparum*; Et= *Eimeria tenella*

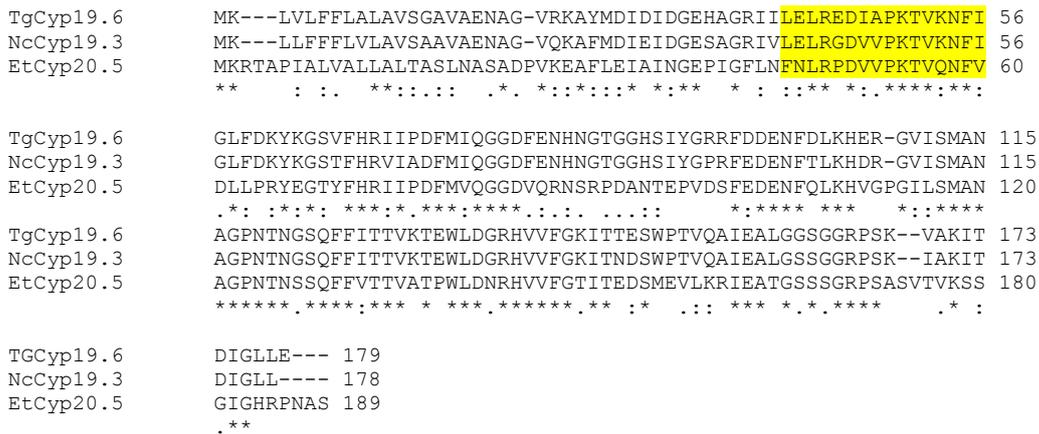


Abb. 3.5c ClustalW 2.0.10 Multipler Sequenzvergleich zwischen EtCyp20.5 und orthologen Proteinen aus anderen Apikomplexa

Ein Vergleich von EtCyp20.5 mit den orthologen Cyclophilinen aus den ebenfalls Toltrazuril-sensitiven Apikomplexen *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* zeigt im Bereich des Klons A eine sehr hohe Konservierung. Alle drei Organismen besitzen die Toltrazuril-Bindesequenz zu mindestens 83,3 %. Tg= *Toxoplasma gondii*; Nc= *Neurospora crassa*; Et= *Eimeria tenella*

Abb. 3.6.a

[ref|NP_000933|](#) Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase B (Cyclophilin)

sekretoriert oder ER-assoziiert

Bezeichnung: CypB (Homo sapiens)

Score = 141 bits (356), Expect = 7e-39, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 72/160 (45%), Positives = 98/160 (61%), Gaps = 7/160 (4%)

Query	28	EAFLEIAINGEPIGFLNFNLRPDVVPKTVQNFVDLLPR-----YEGTYFHRIIPDFMVQG	82
		+ + ++ I E +G + F L VPKT VNFV L Y+ + FHR+I DFM+QG	
Sbjct	45	KVYFDLRIGDEDVGRVIFGLFGKTVPKTVDNFVALATGEKGFYKNSKFHRVIKDFMIQG	104
Query	83	GDVQRNSRPDANTEPVDSFEDENFQLKHVGPILSMANAGPNTNSSQFFVTTVATPWLDN	124
		GD R + + F DENF+LKH GPG +SMANAG +TN SQFF+TTV T WLD	
Sbjct	105	GDFTRGDGTGGKSIYGERFPDENFKLKHYPGWVSMANAGKDTNGSQFFITTVKTAWLDG	164
Query	143	RHVVFGTITEDSMEVLKRIEATGSSS-GRPSASVTVKSSG	181
		+HVVFG + E MEV+++E+T + S +P V + G	
Sbjct	165	KHVVFQKLE-GMEVVRKVESTKTDSDKPLKDVIIADCG	203

Abb. 3.6b

[ref|NP_010439.1|](#) Cytoplasmatische Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (Cyclophilin),

Bezeichnung: Cprlp [Saccharomyces cerevisiae]

Score = 150 bits (380), Expect = 3e-37, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 74/161 (45%), Positives = 101/161 (62%), Gaps = 6/161 (3%)

Query	26	VKEAFLEIAINGEPIGFLNFNLRPDVVPKTVQNFVDLLPR-----YEGTYFHRIIPDFMV	80
		+ + + ++ +G+PIG + F L D+VPKT +NF L Y G+ FHR+IPDFM+	
Sbjct	1	MSQVYFDVEADGQPIGRVVFVKLYNDIVPKTAENFRALCTGEKGFYAGSPFHRVIPDFML	60
Query	81	QGGDVQRNSRPDANTEPVDSFEDENFQLKHVGPILSMANAGPNTNSSQFFVTTVATPWL	140
		QGGD + + F DENF+ H PG+LSMANAGPNTN SQFF+TTV PWL	
Sbjct	61	QGGDFTAGNGTGGKSIYGGKFPDENFKKHDRPGLLSMANAGPNTNGSQFFITTVPCPWL	120
Query	141	DNRHVVFGTITEDSMEVLKRIEATGSSS-GRPSASVTVKSSG	181
		D +HVVFG + D +++K++E+ GS SG A + V SG	
Sbjct	121	DGKHVVFGEVV-DGYDIVKKVESLGSATKARIVVAKSG	160

Abb. 3.6c

[gb|AAH05982.1|](#) Cytoplasmatische Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A (Cyclophilin A)

Bezeichnung: CypA [Homo sapiens]

Score = 164 bits (415), Expect = 1e-40, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 79/157 (50%), Positives = 103/157 (65%), Gaps = 6/157 (3%)

Query	30	FLEIAINGEPIGFLNFNLRPDVVPKTVQNFVDLLPR-----YEGTYFHRIIPDFMVQGGD	84
		F +IA++GEP+G ++F L D VPKT +NF L Y+G+ FHRIIP FM QGGD	
Sbjct	7	FFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGSCHFRIIPGFMCQGGD	66
Query	85	VQRNSRPDANTEPVDSFEDENFQLKHVGPILSMANAGPNTNSSQFFVTTVATPWLDNRH	144
		R++ + + FEDENF LKH GPGILSMANAGPNTN SQFF+ T T WLD +H	
Sbjct	67	FTRHNGTGGKSIYGEKFEDEFNFTLKHGTPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTEWLDGKH	126
Query	145	VVFGTITEDSMEVLKRIEATGSSS-GRPSASVTVKSSG	181
		VVFG + E M +++ +E GS +G+ S +T+ G	
Sbjct	127	VVFGKVKKE-GMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCG	162

Abb. 3.6d

[ref|NP_011924](#) Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase B (Cyclophilin),
beteiligt in Protein-Rückfaltung, ER assoziiert oder sekretiert
Bezeichnung: Cpr2p [*Saccharomyces cerevisiae*]

Score = 113 bits (283), Expect = 2e-30, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 72/194 (37%), Positives = 97/194 (50%), Gaps = 21/194 (10%)

Query	8	ALVALLALTASLNASADPVKE-----AFLEIAINGEPIGFLNFNLRPDVVPKT	55
		L L L S+N A V E F +I E +G + L V PKT	
Sbjct	5	GLWCWLLFLSVNVIASDVGELIDQDDEVITQKVFFDIEHGEEKVGRIVIGLYGKVCPKT	64
Query	56	VQNFVDL-----LPRYEGTYFHRIIPDFMVQGGDVQRNSRPDANTEPVDSFEDENFQLK	109
		+NF L + G+ FHR+IP+FMVQGGD + + D+F DENF LK	
Sbjct	65	AKNFYKLSSTTNSKKGFIGSTFHRVIPNFMVQGGDFTDGTVGGKSIYGDTFDENFTLK	124
Query	110	HVPGILSMANAGPNTSSQFFVTTV-ATPWLDNRHVVFGTITEDSMEVLKRIE-ATGSS	167
		H G LSMAN G +TN SQFF+TT WLD +HVVFG + D M+V+ I+ + +	
Sbjct	125	HDRKGRLSMANRGKDTNGSQFFITTEEASWLDGKHVVFQGVV-DGMDVVNYIQHVS RDA	183
Query	168	SGRPSASVTVKSSG	181
		+ +P +V + G	
Sbjct	184	NDKPLEAVKIAKCG	197

Abb. 3.6a-d BLAST-Vergleiche der *EtCyp20.5* Proteinsequenz mit Proteinen aus Hefe (Abb. 3.4.1+2) und Säugern (Abb. 3.4.3+4).

Die Datenbankrecherche zeigt die höchste Übereinstimmung mit den Hefe-Cyclophilinen Cpr1p und Cpr2p. Bei Cpr3p handelt es sich um ein sekretiertes oder ER-assoziiertes Cyclophilin, bei Cpr1p um ein cytoplasmatisch-nukleäres. Analog dazu zeigt *EtCyp20.5* die höchste Übereinstimmung zu CypA und CypB aus *Homo sapiens*, wobei letzteres ebenfalls sekretiert oder ER-assoziiert vorkommt. Eine eindeutige Lokalisation von *EtCyp20.5* ließ sich auf diese Weise nicht voraussagen oder ableiten.

Während es sich bei CypA und Cpr1p um Cyclophiline handelt, die fast ausschließlich im Zellplasma oder Nukleus vorkommen, sind die Cyclophiline CypB und Crp2p, aufgrund ihres N-terminalen Signalpeptids, mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert, wo sie Rückfaltungen von Proteinen katalysieren, oder sie werden sekretiert.

3.3 Klonierung und Expression von rekombinantem *EtCyp20.5* in *E. coli*

Um *EtCyp20.5* genauer zu charakterisieren, wurde es rekombinant in *E. coli* TOP10-Zellen exprimiert. Dazu wurde unter Benutzung entsprechender aus der cDNA-Sequenz des Kandidaten abgeleiteter Primer eine RT-PCR durchgeführt (2.10.4.1). Als Template diente revers-transkribierte RNA aus Kükenblinddärmen, die 172 Stunden nach Infektion entnommen worden waren (2.10.4.2). Das spezifische PCR-Produkt hatte eine apparente Größe von etwa 600 bp, was mit der theoretisch vorausgesagten Größe von 567 bp korrelierte (Abb. 3.7). Das PCR-Produkt wurde per Gel-Extraktion isoliert (2.9.1.6) und die DNA über eine Silica-Matrix aufgereinigt (2.9.1.8). Im Anschluss erfolgte die Klonierung in den pBAD/Thio His TOPO® Vektor (2.11.2). Dieser Vektor erlaubt die Expression

rekombinanter Proteine in *E. coli* Zellen inklusive einer N-terminalen Thioredoxin-Fusion und eines C-terminalen His₆-tag's (Abb. 3.8).

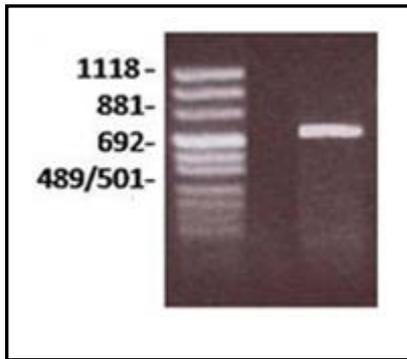


Abb. 3.7 Spezifisches EtCyp20.5 PCR-Produkt

Das PCR Produkt erschien als Einzelbande einer Größe von etwa 600 bp. Die theoretische Größe war 567 bp. Als Größenstandart diente ein Restriktionsmix auf Basis von pUC 18 DNA (Fermentas). Zur Klonierung wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Silica-Matrix aufgereinigt. Nach der Klonierung erfolgte die Verifizierung der Sequenz per DNA-Sequenzanalyse. M = Marker; 1 = EtCyp20.5 PCR-Produkt

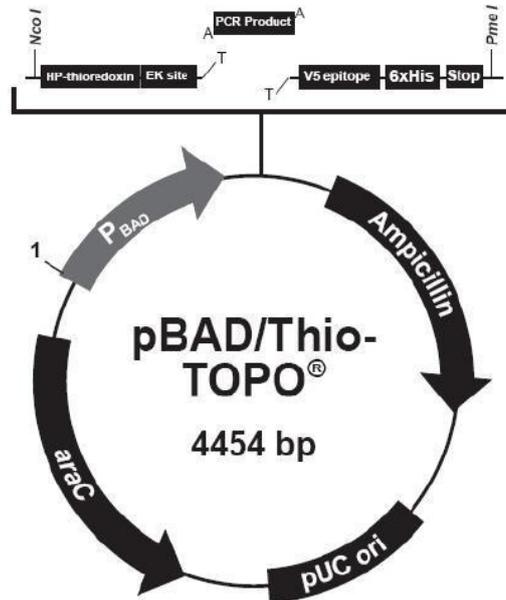


Abb. 3.8 pBAD/Thio-TOPO® Vektorkarte

Quelle: Invitrogen; Produkthanleitung Version H 'pBAD/TOPO® ThioFusion™ Expression Kit'

Thioredoxin verbessert allgemein die Löslichkeit von Proteinen, wohingegen das His₆-tag' eine Aufreinigung per immobilisierter Metallaffinitätschromatographie ermöglicht. Eine Enterokinaseschnittstelle erlaubt eine einfache, nachträgliche Entfernung des Thioredoxins. Die Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von Arabinose. Um die ideale Endkonzentration an Induktor zu bestimmen, wurde zu Beginn der Experimente eine ‚Pilot-Expression‘ mit verschiedenen Arabinose Konzentrationen durchgeführt (2.7.5.1). Als ‚ideal‘ stellte sich eine Endkonzentration von 0,2 % (w/v) Arabinose heraus. In einer SDS-PAGE (2.13.11.3) zeigte sich bei der Auftrennung von Gesamtproteinlysaten induzierter *E. coli*-Zellen im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle eine Induktor-konzentrationsabhängige Expressionsbande auf Höhe von etwa 35 kDa, was in etwa der erwarteten Größe des Fusionsproteins entsprach. Eine Western-Blot-Analyse und eine anschließende Immundetektion mit monoklonalen Anti-His₆-tag'-Antikörpern (2.13.12.4) zeigte ein spezifisches Signal in der entsprechenden Höhe, was auf das Vorhandensein des Fusionsproteins mit His₆-tag' hindeutete (Abb. 3.9). Im Anschluss daran wurden Expressionskulturen in größerem Maßstab angesetzt und Gesamtprotein von jeweils 500 ml induzierter Expressionskulturen geerntet und nach einem Zellaufschluss weiterverarbeitet (2.7.5.2). Aufgrund der Thioredoxin-Fusion war das rekombinante Protein fast vollständig in der löslichen Fraktion zu finden (2.13.2). Diese wurde dann per immobilisierter Metallaffinitätschromatographie über Nickel-Säulen aufgereinigt (2.13.8) und das gebundene Fusionsprotein unter Zugabe von 500

mM Imidazol eluiert (Abb. 3.10). Da für die weitere Proteinanalyse möglichst viele Störfaktoren eliminiert werden sollten, wurden die proteinhaltigen IMAC-Elutionsfraktionen gepoolt, durch Ultrazentrifugation in $1\times$ PBS⁻ umgepuffert und gleichzeitig aufkonzentriert.

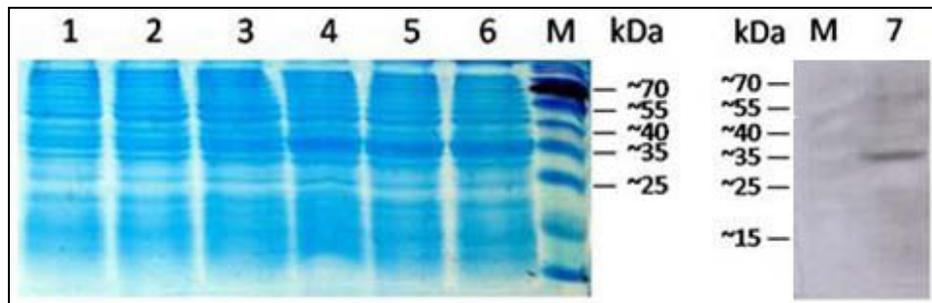


Abb. 3.9 SDS-PAGE und Western Blot Analyse eines *EtCyp20.5* Expressionsnachweises

Zu sehen ist aufgetrenntes *E. coli* Gesamtzellprotein nach Induktion mit 0,2 % (w/v) Endkonzentration Arabinose. Bei einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 35 kDa erkennt man eine konzentrationsabhängig zunehmende Expressionsbande, die sich im Western Blot mit monoklonalen Anti-His₆-Antikörpern nachweisen lässt. M = Prestained Protein Ladder (Fermentas); 1 = nicht induziert; 2 – 6 = Induziert mit 0,00002 % - 0,2 % Arabinose; 7 = Western Blot Analyse einer 0,2 % Arabinose induzierten Probe mit monoklonalen Anti-His₆-Antikörpern.

Es wurde jede frisch hergestellte Proteinfraction mittels SDS-PAGE (2.13.11.3) oder optional mit RP-HPLC (2.13.9) auf ihre Reinheit überprüft. Das in der Regel hochreine *EtCyp20.5*-Fusionsprotein konnte nach dem Umpuffern (2.13.4) sofort für diverse Enzymassays eingesetzt werden (Abb. 3.11).

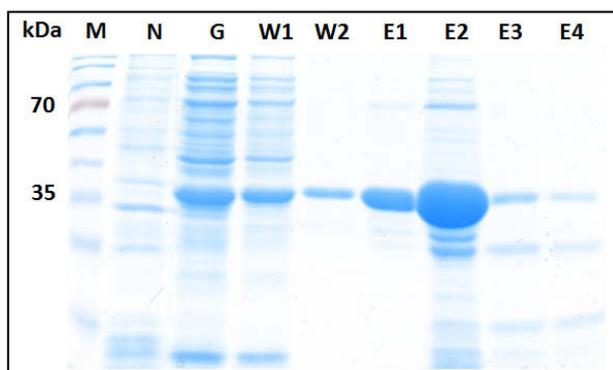


Abb. 3.10 SDS-PAGE einer *EtCyp20.5* Proteinaufreinigung

Zu sehen sind neben dem Proteinmarker (M) eine Gesamtproteinprobe einer nicht induzierten (N) und einer mit 0,2 % Arabinose induzierten Kultur (G). Nach dem Auftragen auf eine IMAC-Säule wurden die beiden ersten Waschfraktionen zur Kontrolle ebenfalls aufgetragen. Die Eluate (E1-E4) zeigen eine spezifische Bande hoher Reinheit auf einer Höhe von 35 kDa. Die größte Ausbeute zeigte sich in der Elutionsfraktion 2.

Parallel wurde auch ein pBAD/Thio His TOPO[®]-Vektorkonstrukt genutzt, welches kein Insert enthielt, folglich also nur zur Expression His₆-tag' fusionierten Thioredoxins genutzt werden konnte. Dieses sollte in den geplanten Enzymassays als Kontrolle genutzt werden um den Einfluss des ,tag's zu untersuchen.

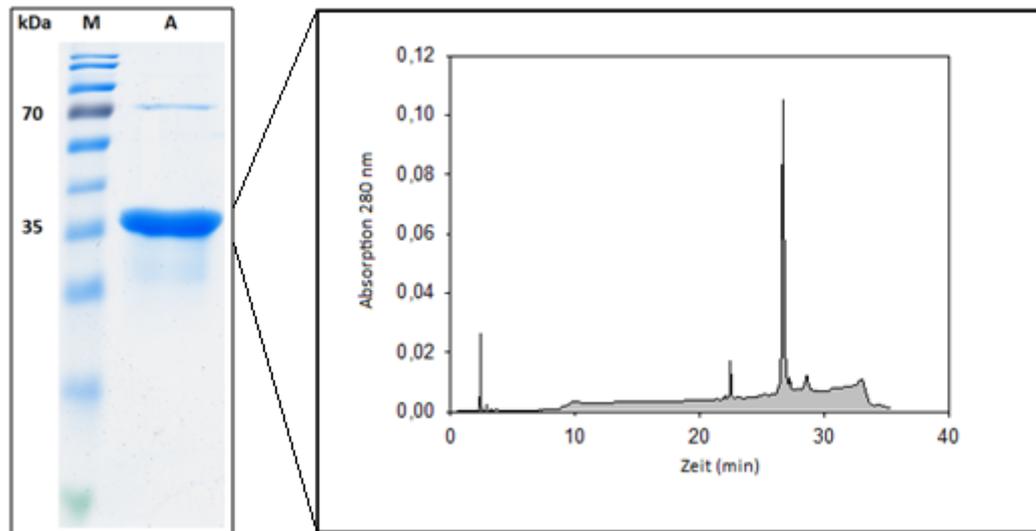


Abb. 3.11 SDS-PAGE und RP-HPLC-Analyse von *EtCyp20.5* Fusionsprotein nach Umpuffern über Ultrazentrifugation

Nach Entfernen von Imidazol und Umpuffern in PBS⁻ zeigt sich in einer SDS-PAGE eine hochreine Proteinbande einer apparenten Größe von etwa 35 kDa, was der erwarteten Größe des Fusionsproteins entspricht. Eine Analyse über reverse-phase-HPLC zeigt neben einem Hintergrundrauschen hervorgerufen durch letzte Verunreinigungen einen Peak bei 27,31 min. Die berechnete Reinheit der Proteinprobe beträgt mehr als 80 %. Die restlichen Verunreinigungen sind Proteine aus *E. coli*, die aufgrund interner Histidin-Reste unspezifisch an die IMAC-Säule gebunden haben.

3.3.1 Enterokinase-Verdau von *EtCyp20.5*

Um den Einfluss des Thioredoxin-tag's auf die Proteinfunktion zu untersuchen, wurde das *EtCyp20.5* Fusionsprotein nach Angaben des Herstellers mit Enterokinase verdaut (2.10.3). Unter Benutzung verschiedener Protein- und Enzymkonzentrationen konnte so eine Enzymfraktion fast vollständig gespalten werden. Da das Thioredoxin ein Molekulargewicht von etwa 12 kDa hat, konnte mittels Ultrazentrifugation unter Benutzung von Konzentratoren eines 30 kDa ‚cut-offs‘ (2.13.4) eine Trennung von *EtCyp20.5* und Thioredoxin erreicht werden. Das 20.5 kDa große Fragment konnte nun ebenfalls für Enzymmessungen eingesetzt werden (Abb. 3.12).

3.4 Nachweis der PPIase-Enzymaktivität von *EtCyp20.5*

Um *EtCyp20.5* als potentiellen Toltrazuril-Rezeptor daraufhin zu testen, ob die Anwesenheit des Chemotherapeutikums in irgendeiner Weise Einfluss auf die Funktion des Proteins ausübt, wurde ein Protease gekoppelter Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Assay nach Fischer *et al.* (1989) etabliert (2.14.1). Grundlage dieses Meßverfahrens ist die Fähigkeit von Cyclophilinen, synthetische Peptide wie Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*para*-Nitroanilid (Succ-AAPF-*p*NA) von *cis*- in *trans*-Konformation zu isomerisieren. Die Protease α -Chymotrypsin wiederum vermag die *trans*-Form des Razemats in die farbige Verbindung *para*-Nitroanilin zu spalten. Auch ohne die katalytische Wirkung einer PPIase

würde es, vorgegeben durch die chemische Gleichgewichtskonstante der Reaktion, zu einer spontanen Umwandlung der *cis*-Form in die *trans*-Form kommen.

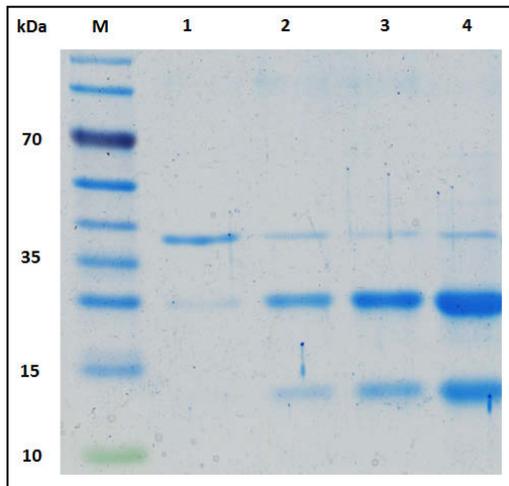


Abb. 3.12 SDS-PAGE von einem Enterokinaseverdau des *EtCyp20.5* Fusionsproteins

Nach einem Verdau mit verschiedenen Mengen an Protein zeigt sich, dass nach 16 h bei RT fast das gesamte eingesetzte 35 kDa Fragment in ein 20 kDa und ein etwa 12 kDa Fragment gespalten wurde. Per Ultrazentrifugation konnten die Fragmente dann getrennt werden und nur das 20.5 kDa Fragment für Enzymassays eingesetzt werden.

M = Marker; 1 – 4: steigende Konzentrationen an eingesetztem Fusionsprotein im Bereich von 1 bis 30 μg . Eine Spaltung des 'großen' Proteins in zwei 'kleinere' Fragmente ist deutlich zu erkennen.

Cyclophiline beschleunigen diesen eigentlich recht langsam ablaufenden Umwandlungsprozess, was man letztlich anhand einer beschleunigten Produktzunahme nachweisen kann. Nach Fischer berechnet sich die initiale Geschwindigkeit der Reaktion durch Normierung der Daten, Abzug der Mischzeit und nicht-lineare Regression der Rohdaten. Ohne einen entsprechenden Katalysator war eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von etwa $k = 0,025 \pm 0,008$ nachweisbar. Eine Zugabe von *EtCyp20.5* erhöhte die Geschwindigkeit signifikant auf etwa $k = 0,087 \pm 0,01$. Außerdem erreichte der Substratumsatz in der Regel nach etwa 50 s Reaktionsdauer eine Sättigung, was auf einen maximalen Umsatz schließen ließ. In diesem Assay war *EtCyp20.5* katalytisch aktiv. Mit steigender Menge an eingesetztem Enzym erhöhte sich proportional die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.13). Die höchste Enzymkonzentration, die eingesetzt werden konnte ohne auf Fällungsprobleme mit den teils sehr hydrophoben Testsubstanzen zu stoßen, war eine 10 nM Endkonzentration. Die bei dieser Konzentration gemessene Reaktionsgeschwindigkeit wurde an jedem Meßtag als 100 % Enzymaktivität definiert. Im Vergleich dazu hatte das Thioredoxin alleine keinen Einfluss auf die Reaktion. Auch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Fusionsprotein und dem rekombinanten 20.5 kDa Protein ohne Thioredoxin-,tag' (Abb. 3.14).

3.4.1 Aktivitätsverlust von *EtCyp20.5* über die Zeit

Um verschiedene Lagerungsbedingungen und Pufferzusammensetzungen zu testen, die eine maximale Enzymaktivität von *EtCyp20.5* über einen möglichst langen Zeitraum gewährleisten würden, wurde in einer langen Versuchsreihe eine Fraktion frisch isoliertem *EtCyp20.5* in mehrere Aliquots geteilt und sowohl in reinem PBS^- Puffer als auch in 50% (v/v) Glycerin/ PBS^- aufgeteilt.

Anschließend wurden diese Aliquots nochmal geteilt und bei Raumtemperatur, 4°C und -20°C gelagert.

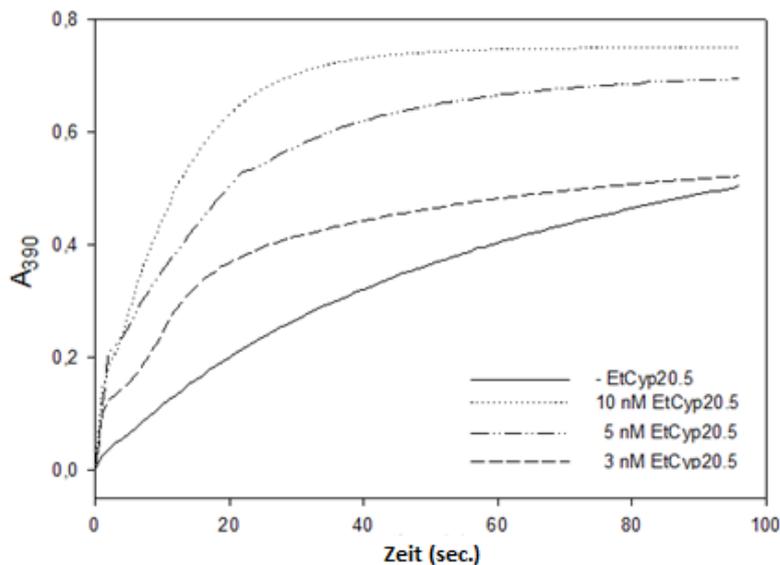


Abb. 3.13 Kinetik der PPIase-Aktivität von *EtCyp20.5*

Die Grafik zeigt den zeitlichen Verlauf der Produktzunahme einer *EtCyp20.5* katalysierten PPIase-Reaktion. Die Zunahme an *p*-Nitroanilin wurde bei 390 nm verfolgt. Abhängig von der Endkonzentration des eingesetzten Enzyms zeigte sich eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit. Da es sich hierbei um eine Reaktion 1. Ordnung handelt, kann direkt über die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k die Geschwindigkeit quantifiziert werden.

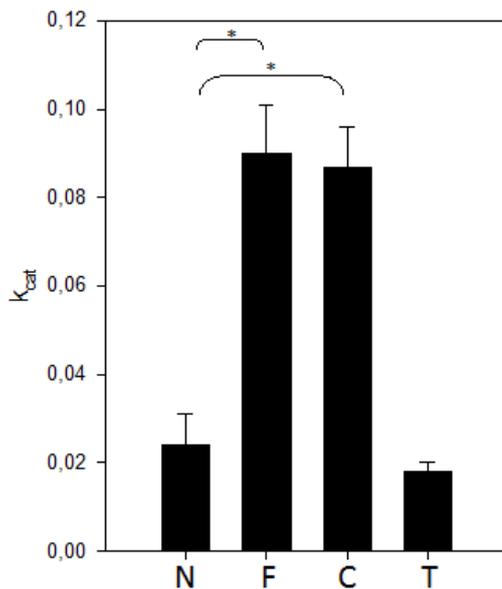


Abb. 3.14 Vergleich der PPIase-Aktivität von *EtCyp20.5* mit verschiedenen Kontrollen

Gezeigt sind die berechneten k_{cat} -Werte für verschiedene Reaktionen. Das Fusionsprotein (F) und das rekombinante *EtCyp20.5* ohne Thioredoxin-,tag' (C) führten zu einer signifikanten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit ($P < 0.05$). Thioredoxin alleine (T) beschleunigte die spontane *cis-trans*-Isomerisierung (N) nicht, was darauf hindeutet, dass offenbar nur *EtCyp20.5* PPIase-Aktivität besitzt.

Von diesen Ansätzen wurde zwei Monate lang regelmäßig die PPIase-Aktivität bestimmt und grafisch aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die besten Lagerungsbedingungen lagen demnach bei 4°C und einem Puffer aus 50% (v/v) Glycerin/PBS⁻. Unter diesen Bedingungen war noch zwei Wochen nach der Präparation kein Aktivitätsverlust zu

verzeichnen. Insgesamt schien das Enzym jedoch recht stabil zu sein, da selbst nach Abbruch der Versuchsreihe nach etwa zwei Monaten immer noch eine gewisse Aktivität zu verzeichnen war.

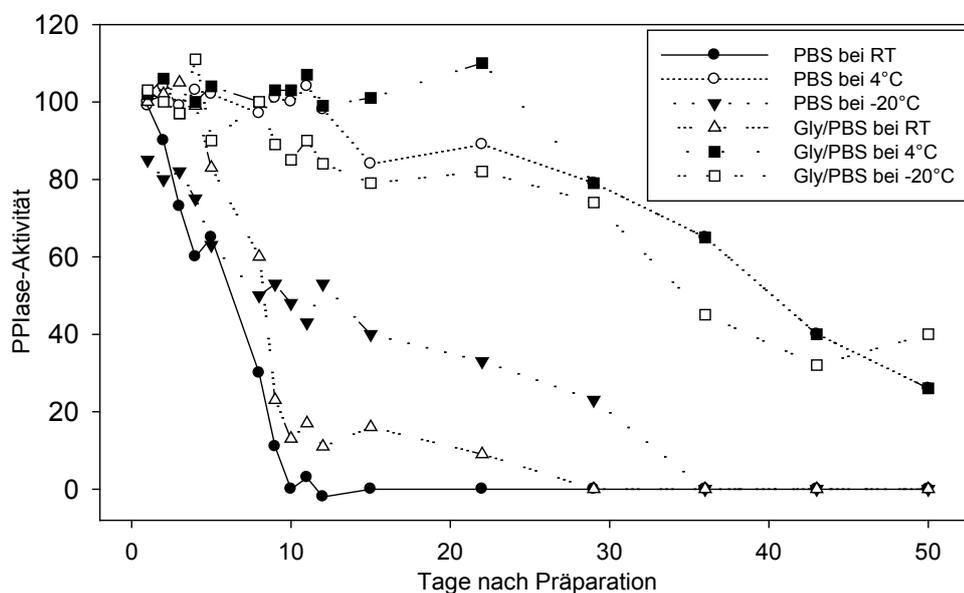


Abb. 3.15 Erhalt der Enzymaktivität von *EtCyp20.5* bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Gezeigt ist die Abnahme der Enzymaktivität von *EtCyp20.5* bei verschiedenen Lagerungs- und Pufferbedingungen. In allen Fällen ist eine deutliche Abnahme der maximalen Aktivität nach unterschiedlicher Zeitdauer zu verzeichnen. Als besonders stabil zeigte sich das Enzym bei einer Lagerung in 50% (v/v) Glycerin / PBS⁻ bei durchgehend 4°C, weshalb diese Lagerung für alle Proteinpräparationen bevorzugt wurde.

3.4.2 *EtCyp20.5*: PPlase-Inhibitionsstudien

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf den putativen Rezeptor *EtCyp20.5* zu untersuchen, wurden Inhibitionsstudien im PPlase-Assay durchgeführt. Dazu wurden potentielle Inhibitoren in 50% (v/v) Ethanol / 35 mM Hepes gelöst und dem Reaktionsansatz zugeführt. Um die Bedingungen für eine mögliche Inhibition konstant zu halten, wurden alle Reaktionsansätze für exakt 1 h bei 10°C präinkubiert. Dabei wurde vorausgesetzt, dass eine spezifische Inhibition innerhalb dieser Zeit erfolgen würde. Getestet wurde eine Reihe verschiedener Wirkstoffe (Abb. 3.16). Während es sich bei CsA um einen bekannten Inhibitor für Cyclophiline handelt und dieses somit als Positivkontrolle dienen konnte, stellten Toltrazuril, Methylcarboxyponazuril, und Ponazuril verschiedene Metabolite des Chemotherapeutikums Baycox[®] dar. Toltrazuril und Ponazuril wirken bekannterweise parasitozid, während Methylcarboxyponazuril laut interner Studien des Herstellers nicht mehr biologisch aktiv ist. Als Konkurrenzprodukt zu Toltrazuril sollte auch der Wirkstoff Diclazuril (Janssen, Neuss) untersucht werden, der angeblich über einen alternativen Mechanismus wirken soll, da es sich dabei um ein asymmetrisches Triazinderivat handelt. Abschließend sollte das

substanzfremde Emodepsid, ein weit verbreitetes Anthelmintikum (vertrieben von BAYER), als zusätzliche Negativkontrolle eingesetzt werden.

Testsubstanz	MW (g/mol)
Cyclosporin A	1202,63
Toltrazuril	425,38
Ponazuril	457,39
Methylcarboxyponazuril	472,38
Emodepsid	1119,42
Diclazuril	407,63

Abb.3.16 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen.

Die Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, in DMSO oder alternativ in 50% (v/v) Ethanol/35 mM Hepes gelöst und entsprechend der einzusetzenden Konzentrationen im Assay-Puffer verdünnt.

Untersucht wurden Konzentrationsbereiche von 100 fM bis hin zu 1 mM. Ab dieser Konzentration beobachtete man ein Ausfallen der allesamt sehr hydrophoben Testsubstanzen. Ausgewertet wurden jeweils die durchschnittlichen initialen Steigungen der 'gefitteten' Rohdatenkurven auf die reguläre Reaktionsgeschwindigkeit der Positivkontrolle des jeweiligen Meßtags bezogen. CsA zeigte einen deutlichen, konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf die PPIase-Aktivität von *EtCyp20.5*. Die IC_{50} lag bei etwa 12 nM (Abb. 3.17). Die Enzymaktivität konnte zu 100 % inhibiert werden. Durch die Zugabe von Toltrazuril konnte die PPIase-Aktivität überraschenderweise ebenfalls konzentrationsabhängig gehemmt werden. Allerdings war selbst bei Konzentrationen von 10 mM Substanz noch etwa 20 % Restaktivität messbar. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Substanz nicht im Reaktionsansatz eingesetzt werden. Die Folge wäre eine Überschreitung des Löslichkeitsproduktes gewesen, was zu einem „Ausfallen“ der Substanz geführt hätte. Eine nicht-lineare Korrektur der Mittelwerte jeder Messung ergab eine ähnliche Kinetik wie bei der Hemmung durch CsA (Abb. 3.18). Die Zugabe von Methylcarboxyponazuril zum Assay zeigte keinen inhibitorischen Effekt, was angesichts der fehlenden biologischen Aktivität der Substanz auch zu erwarten war. Es konnte selbst in Konzentrationsbereichen kurz vor der Überschreitung des Löslichkeitsproduktes keine Inhibition festgestellt werden (Abb. 3.19). Ebenso verhielt es sich mit Ponazuril, Diclazuril und Emodepsid (Abb. 3.20-22). Der inhibitorische Effekt vom Toltrazuril schien also substanzspezifisch zu sein.

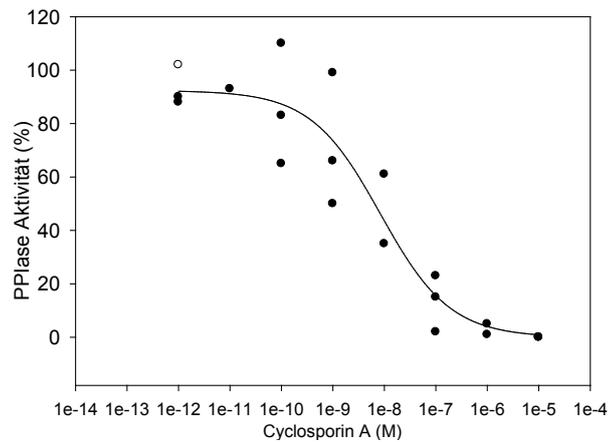


Abb. 3.17 Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp20.5* durch CsA

Im PPlase-Assay zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt mit einer IC_{50} von ungefähr 12 nM. Die Inhibition durch CsA deckt sich mit Literaturwerten und diente als Positivkontrolle um einen inhibitorischen Effekt anderer Substanzen auf die PPlase-Aktivität zu bewerten. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Aus Gründen der Übersicht sind die Balken der Standardabweichungen nicht dargestellt, gehen jedoch in die Berechnung der Ausgleichskurve ein. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

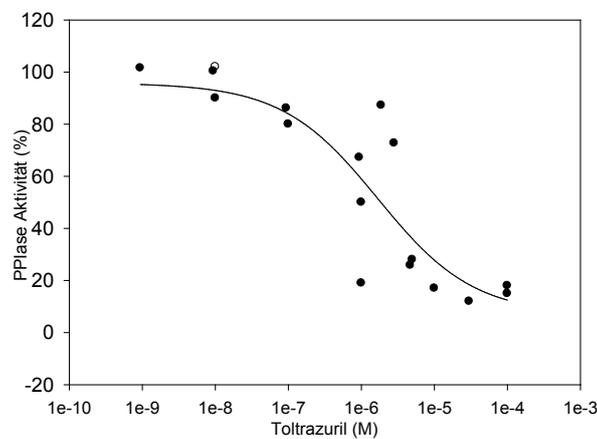


Abb. 3.18 Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp20.5* durch Toltrazuril

Im PPlase-Assay zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt mit einer IC_{50} von 1,84 μ M. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Aus Gründen der Übersicht sind die Balken der Standardabweichungen nicht dargestellt, gehen aber in die Berechnung der Ausgleichsgerade mit ein. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

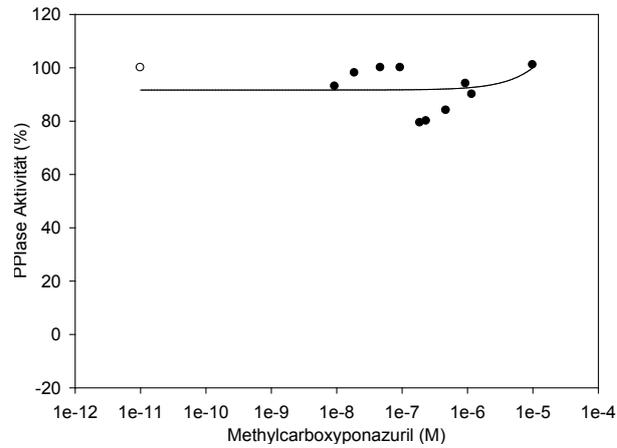


Abb. 3.19 Keine Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp20.5* durch Methylcarboxyponazuril

Im PPlase-Assay zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Aus Gründen der Übersicht sind die Balken der Standardabweichungen nicht dargestellt, gehen aber in die Berechnung der Ausgleichsgerade mit ein. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

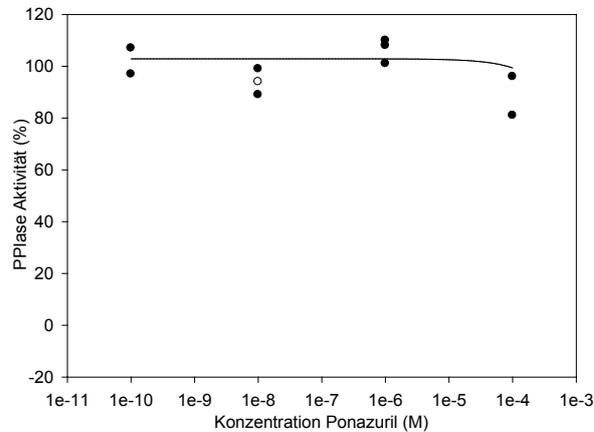


Abb. 3.20 Keine Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp20.5* durch Ponazuril

Im PPlase-Assay zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Aus Gründen der Übersicht sind die Balken der Standardabweichungen nicht dargestellt, gehen aber in die Berechnung der Ausgleichsgerade mit ein. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

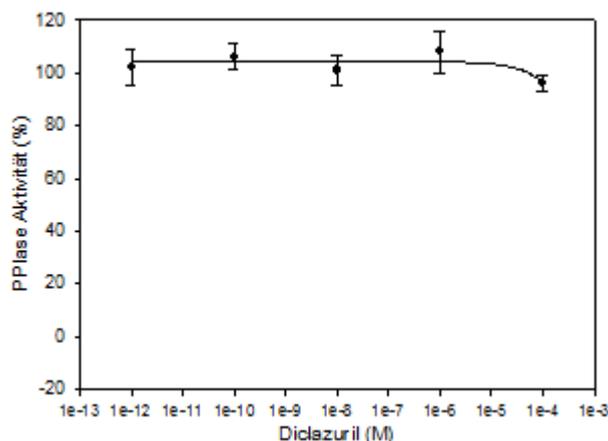


Abb. 3.21 Keine Inhibition der PPIase-Aktivität von *EtCyp20.5* durch Diclazuril

Im PPIase-Assay zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

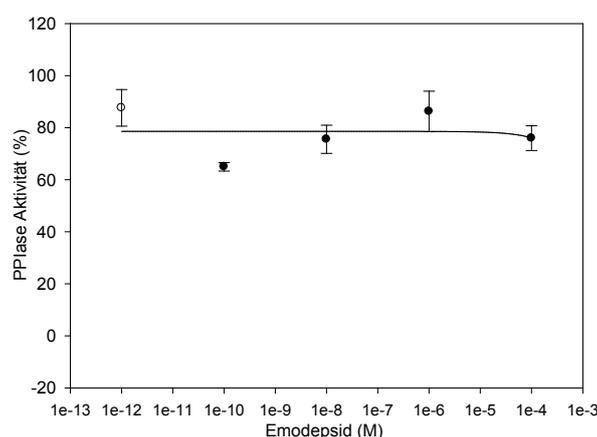


Abb. 3.22 Keine Inhibition der PPIase-Aktivität von *EtCyp20.5* durch Emodepsid

Im PPIase-Assay zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

3.5 Nachweis der *EtCyp20.5* Chaperon-Aktivität

Um die Chaperonfunktion von *EtCyp20.5* zu untersuchen, wurde ein ‚Refolding‘-Assay nach Schönebrunner *et al.* (1990) etabliert (2.14.2). Dabei wird gemessen, in welcher Zeit und unter welchen Bedingungen eine definierte Menge zuvor durch Harnstoff denaturierte RNase T1 wieder rückgefaltet werden kann. Normalerweise läuft dieser ‚Refolding‘-Prozess spontan und sehr langsam ab, allerdings ist es eine charakteristische Eigenschaft von Cyclophilinen, diese Reaktion deutlich zu beschleunigen. Der Rückfaltungsprozess wird mittels eines Spektrofluorometers nach

Anregung bei 268 nm verfolgt und die gemessene Fluoreszenz in relativen Einheiten gegen die Zeit aufgetragen. In diesem Assay konnte durch Endpunktbestimmung die katalytische Wirkung von *EtCyp20.5* nachgewiesen und untersucht werden. Abhängig von der Konzentration an eingesetztem Enzym war die Reaktionsgeschwindigkeit signifikant erhöht (Abb. 3.23).

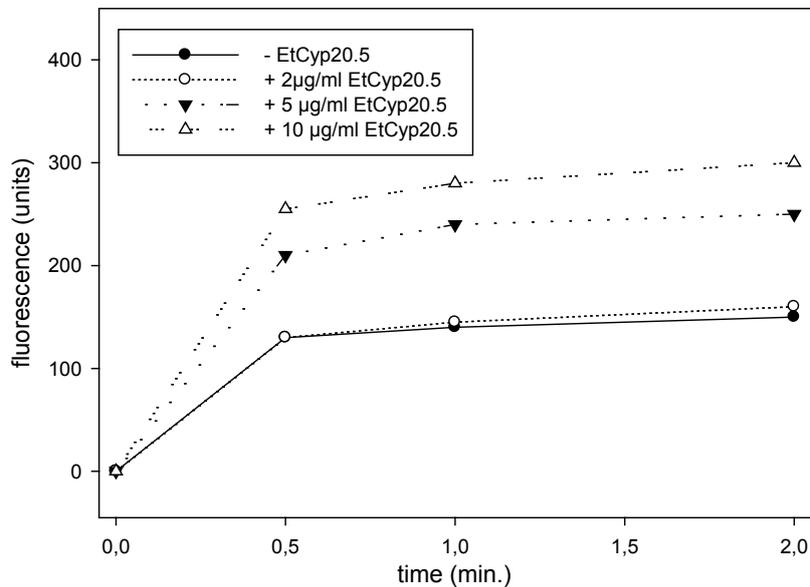


Abb. 3.23 Nachweis der Chaperonaktivität von *EtCyp20.5* im ‚Refolding‘-Assay nach Schönebrunner *et al.* (1990)

Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit bei verschiedenen Zeiten nach Beginn der Rückfaltung. Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang zwischen der Menge an eingesetztem Enzym und der relativen Fluoreszenzzunahme.

3.5.1 *EtCyp20.5*: Chaperon-Inhibitionsstudien

Um das enzymatische Potential von *EtCyp20.5* weiter zu charakterisieren, wurde das Protein in einem Chaperon-Rückfaltungsassay getestet, bei dem man RNase T1 in 8 M Harnstoff denaturiert und in 0,2 M Urea wieder renaturiert. Die Rückfaltung dieses Proteins ist limitiert durch die langsame Isomerisation zweier Prolin-Reste, im Allgemeinen der Proline Pro39 und Pro 55, welche durch die PPIase-Aktivität von Cyclophilinen beschleunigt werden kann. Im nativen Zustand befinden sich die beiden Proline in *cis*-Konformation. In Abhängigkeit von der Menge an eingesetztem Inhibitor konnte die Chaperon-Funktion von *EtCyp20.5* konzentrationsabhängig gehemmt werden. Aufgrund der Länge der Messungen, die bis zur vollständigen Rückfaltung über zwei Stunden andauerte, konnten nicht alle relevanten Konzentrationen untersucht werden. Ausgewählt wurde eine niedrige Konzentration bei welcher im Vergleich zur Positivkontrolle keine Inhibition messbar war. Weiterhin wurde eine Konzentration, bei der eine maximale Inhibition ersichtlich war, untersucht. Komplettiert wurde die Konzentrationsreihe durch eine Inhibitionskonzentration bei welcher eine mittlere Inhibition zu erwarten war. Die benötigten Konzentrationen wurden in einem Vorexperiment durch eine Verdünnungsreihe in 10er-Potenzen bestimmt. *EtCyp20.5* konnte in diesem Assay durch ansteigende Konzentrationen an CsA und

Toltrazuril inhibiert werden, wobei die zur Inhibition nötigen Konzentrationen beim Toltrazuril um ein Vielfaches höher waren als beim CsA. Als Negativkontrolle diente der Toltrazuril-Metabolit Methylcarboxyponazuril, der auch in diesem Assay keinen signifikanten inhibitorischen Effekt zeigte (Abb. 3.24).

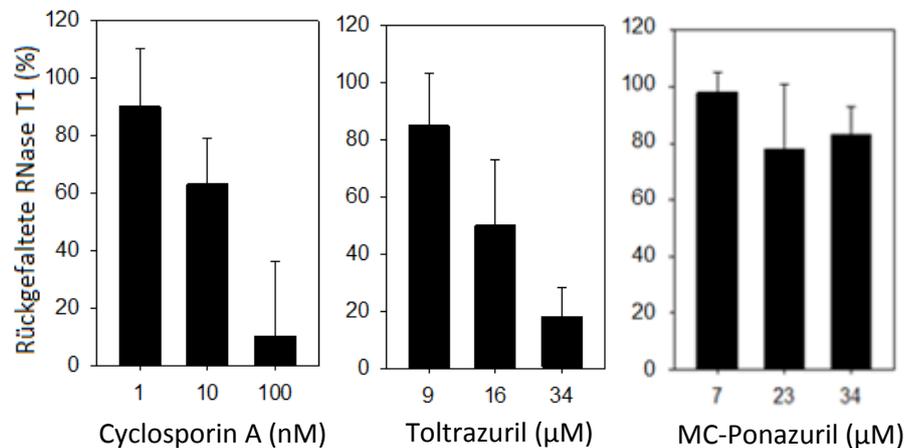


Abb. 3.24 Inhibition der Chaperonaktivität von *EtCyp20.5*

Dargestellt sind die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mittels Chaperon-Assay. Aufgrund der Länge der Messungen wurden in einem Vorversuch geeignete Konzentrationen gefunden um eine eventuelle Inhibition nachzuweisen. Im Falle von CsA befinden sich die Konzentrationen im nM Bereich, im Falle von Toltrazuril und Methylcarboxyponazuril im µM Bereich. CsA hat einen deutlichen inhibitorischen Einfluss auf die Chaperonaktivität von *EtCyp20.5*, abhängig von der Konzentration an Inhibitor. Toltrazuril zeigt einen ähnlichen Effekt, allerdings bei wesentlich höheren Konzentrationen. Methylcarboxyponazuril hat offenbar keinen signifikanten inhibitorischen Einfluss auf die Enzymaktivität.

3.6 Klonierung und Expression von rekombinantem *EtCyp18.7* in *E. coli*

Um die Spezifität der Inhibition von Toltrazuril auf *EtCyp20.5* zu testen, sollte im Zuge der Arbeit auch ein anderes, vergleichbares Cyclophilin aus *Eimeria tenella* kloniert und rekombinant exprimiert werden (vgl. *EtCyp20.5* oben). Ausgewählt wurde ein 18,7 kDa großes Cyclophilin (*EtCyp18.7*) mit der größten Ähnlichkeit zu Cyclophilin A aus Säugern und Cpr1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die höchste Übereinstimmung mit *Toxoplasma gondii* weist auf ein etwa 19 kDa großes, putatives Cyclophilin ohne Signalpeptid hin. Die Lokalisation wurde mit dem Programm PSORT II mit einer Verlässlichkeit von 94,1 % als zytoplasmatisch vorausgesagt. Ein N-terminales Signalpeptid wurde mittels dieses Programms ausgeschlossen. Die Hauptkriterien bei der Auswahl dieses Cyclophilins lagen auf der alternativen Lokalisation und der sehr ähnlichen Größe. Auch sonst weisen die Proteine untereinander eine 43 % Identität (entspricht 57 % Ähnlichkeit) auf (Abb. 3.25). Das Protein wurde analog zum *EtCyp20.5* mittels RT-PCR auf Basis infizierter Caeca 163 *h.p.i.* amplifiziert und in den Expressionsvektor

pBAD/Thio His TOPO® (Invitrogen) kloniert. Genau wie bei der Expression von *EtCyp20.5* wurde auch im Fall von *EtCyp18.7* eine Pilotexpression durchgeführt, um die optimale Induktorkonzentration zu ermitteln, die bei diesem Protein bei 0,2 % Endkonzentration Arabinose lag. Das Protein war nach dem Zellaufschluss in großer Menge in der löslichen Fraktion vorhanden, so dass auch die Aufreinigung über IMAC unter nativen Bedingungen erfolgen konnte. Die Abbildung 3.26a zeigt eine Fraktion aufgereinigtes und in PBS⁻ umgepuffertes Protein. Auch im Fall des *EtCyp18.7* wurde die Reinheit der Proteinfraction sowohl durch SDS-PAGE als auch durch RP-HPLC überprüft. Wie beim *EtCyp20.5* gelang die Aufreinigung gut und die Reinheit entsprach in etwa 80 % bezogen auf die Gesamtproteinmenge in der jeweiligen Fraktion.

<i>EtCyp18.7</i>	MPNPR----VFFDVSIGGGAARRIVMELFADVTPKTAEN-FRCLCTGEKGVGRSGK--- 51
<i>EtCyp20.5</i>	MKRTAPIALVALLALTASLNASADPVKEAFLEIAINGEPIGFLNFNLRPDVVPKTVQNFV 60
	* .. .:: :: . .*: * * * :: : * : . * :: :
<i>EtCyp18.7</i>	--PLHYKGSFFHRI IPEFMLQGGDFTRGNGTGGESIYGEKFADENFNLRHDRPFLLSMAN 109
<i>EtCyp20.5</i>	DLLPRYEGTYFHRI IPDFMVQGGDVQRNSRPDANTEPVDSFEDENFQLKHVGPGLSMAN 120
	:*:*: *****:*:*****. *.. .::: : .* *****:* * :*****
<i>EtCyp18.7</i>	AGPNTNGSQFFITTVVCDWLNKGKHCVFGQVTEG-QDVVKAIEQVGTTSKGPKQQTIVDC 168
<i>EtCyp20.5</i>	AGPNTNSSQFFVTTVATPWLDRHVVFGTITEDSMEVLKRIEATGSSSRGPSASVTVKSS 180
	*****.*****:***. **:.:* *** :**. :*: * * .*:*:*. .**:
<i>EtCyp18.7</i>	GQLS----- 172
<i>EtCyp20.5</i>	GIGHRPNAS 189
	*

Abb. 3.25 Sequenzvergleich von *EtCyp20.5* mit *EtCyp18.7*

Ein Vergleich der beiden Proteine aus *Eimeria tenella* zeigt, dass die Proteine vor allem in den konservierten Regionen eine hohe Übereinstimmung zeigen. Auch ist die Größe der beiden Proteine sehr ähnlich, was ein leichteres Übertragen der Meßergebnisse zulässt. Der Proteinvergleich erfolgte mit dem Programm ClustalW2.

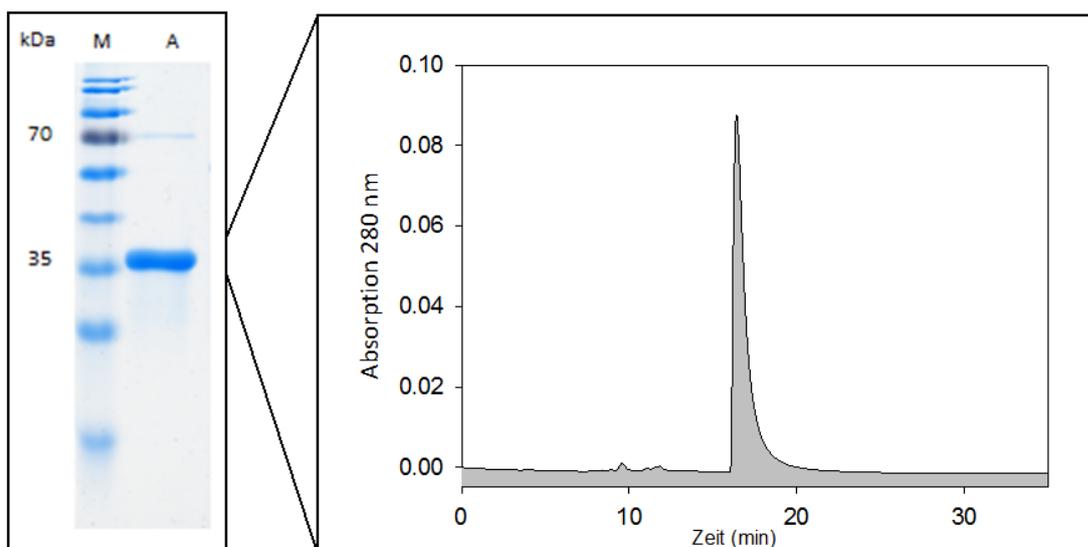


Abb. 3.26a-c SDS-PAGE und RP-HPLC einer aufgereinigten und umgepufferten Fraktion *EtCyp18.7*.

Die eluierten Proteinfractionen waren hochrein und konnten für diverse Enzymassays eingesetzt werden. Die RP-HPLC-Analyse berechnete eine Reinheit von 85 %, in einer SDS-PAGE ist nur eine einzige Bande bei etwa 35 kDa und eine leichte Verunreinigung bei etwa 70 kDa zu sehen.

3.7 *EtCyp18.7*: PPlase-Inhibitionsstudien

Um zu untersuchen, ob sich auch das *EtCyp18.7* für Inhibitionsstudien eignen würde, wurde auch im Falle dieses Proteins der PPlase-Assay durchgeführt. Die Konzentrationen an eingesetztem Enzym waren gleich, auch alle anderen Parameter des Assays blieben konstant. Wie erwartet erwies sich auch das *EtCyp18.7* ebenfalls als aktiv und stand somit für Inhibitionsstudien zur Verfügung. Um einen Vergleich zum *EtCyp20.5* zu ziehen, wurden als Inhibitoren auch in diesem Fall CsA, Toltrazuril und Methylcarboxyponazuril verwendet. Die Ergebnisse sind weiter unten dargestellt: Als bekannter Cyclophilin-Inhibitor war auch CsA in der Lage die PPlase-Aktivität vollständig zu inhibieren. Die dafür benötigte Konzentration lag bei 10 μM . Die IC_{50} wurde in diesem Fall als annähernd 18 nM berechnet und deckt sich mit Literaturwerten zu anderen Cyclophilinen (Abb. 3.27). Toltrazuril war im Gegensatz zu dem Assay mit *EtCyp20.5* nicht in der Lage die PPlase-Aktivität zu hemmen (Abb. 3.28). Entsprechend verhielt es sich beim Methylcarboxyponazuril, welches ebenfalls keinen Effekt zeigte (Abb. 3.29). Die Inhibition von *EtCyp20.5* schien demnach spezifisch zu sein und ließ sich nicht ohne weiteres auf ein anderes Cyclophilin übertragen.

Auf Inhibitionsstudien mit Ponazuril, Diclazuril und Emodepsid wurde im Falle des *EtCyp18.7* verzichtet. Das Methylcarboxyponazuril war in diesem Fall als Negativkontrolle ausreichend.

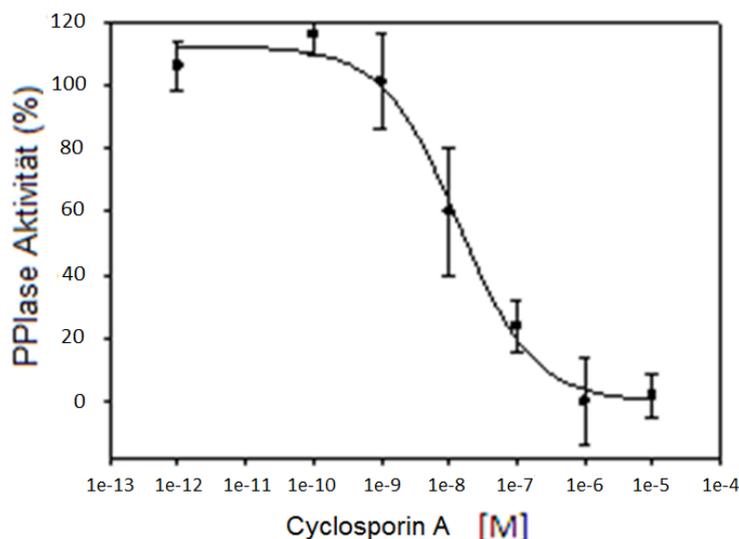


Abb. 3.27 Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp18.7* durch CsA

Im PPlase-Assay zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt mit einer IC_{50} von ungefähr 18 nM. Die Inhibition durch CsA deckt sich mit Literaturwerten und diente als Positivkontrolle um einen inhibitorischen Effekt anderer Substanzen auf die PPlase-Aktivität zu bewerten. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

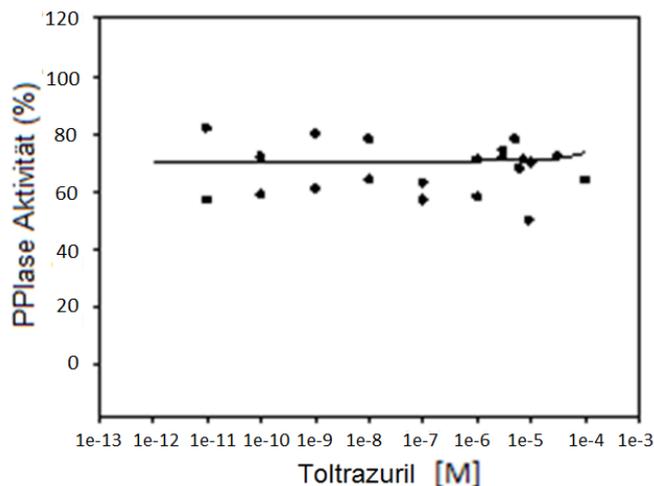


Abb. 3.28 Keine Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp18.7* durch Toltrazuril

Im PPlase-Assay zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Aus Gründen der Übersicht sind die Balken der Standardabweichungen nicht dargestellt, gehen aber in die Berechnung der Ausgleichsgerade mit ein. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

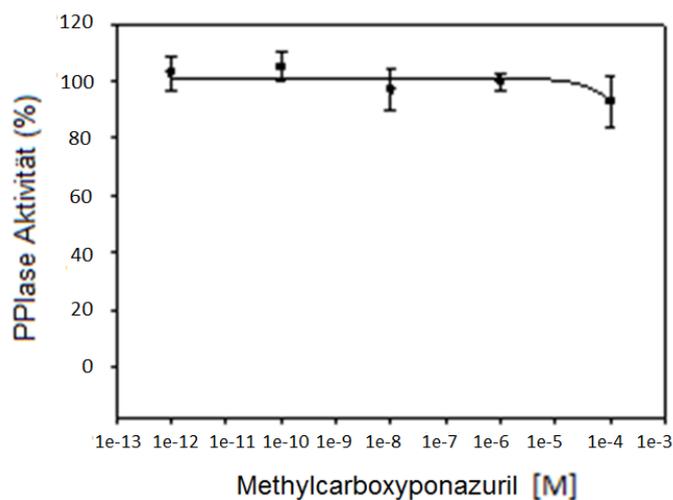


Abb. 3.29 Keine Inhibition der PPlase-Aktivität von *EtCyp18.7* durch Methylcarboxyponazuril

Im PPlase-Assay zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachmessung. Aus Gründen der Übersicht sind die Balken der Standardabweichungen nicht dargestellt, gehen aber in die Berechnung der Ausgleichsgerade mit ein. Mithilfe des Programmes SigmaPlot10 wurde dazu eine nicht-lineare Regression auf Basis eines logistisch abnehmenden Zusammenhangs durchgeführt.

3.8 *EtCyp18.7*: Chaperon-Inhibitionsstudien

Um die Analyse der Toltrazuril-Inhibition auch auf die Chaperon-Aktivität auszuweiten, wurde auch mit diesem Protein der RNase T1 Rückfaltungs-Assay durchgeführt. Die Bedingungen waren auch in dieser Versuchsreihe unverändert von der *EtCyp20.5* Versuchsreihe, um eine Vergleichbarkeit zu

gewährleisten. Als Inhibitoren wurden ebenfalls CsA, Toltrazuril und Methylcarboxyponazuril verwendet.

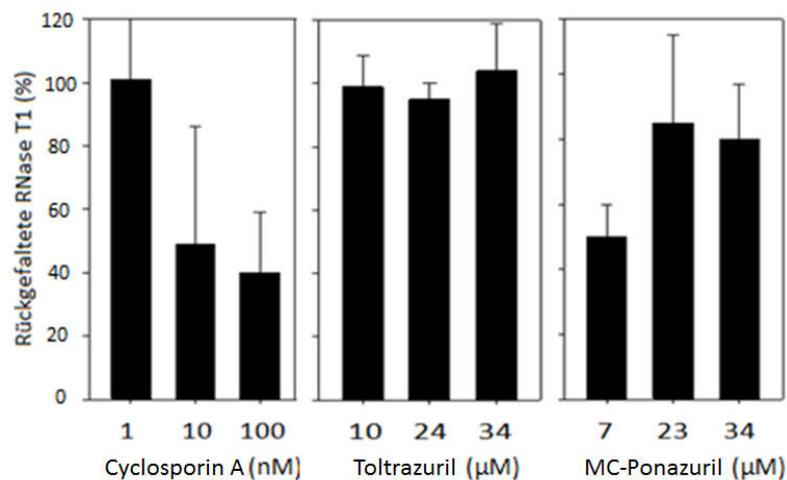


Abb. 3.30 Inhibition der Chaperonaktivität von *EtCyp18.7*

Dargestellt sind die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mittels Chaperon-Assay. Aufgrund der Länge der Messungen wurden in einem Vorversuch geeignete Konzentrationen gefunden um eine eventuelle Inhibition nachzuweisen. Im Falle von CsA befinden sich die Konzentrationen im nM Bereich, im Falle von Toltrazuril und Methylcarboxyponazuril im μM Bereich. CsA hat einen deutlichen inhibitorischen Einfluss auf die Chaperonaktivität von *EtCyp20.5*, abhängig von der Konzentration an Inhibitor. Toltrazuril zeigt einen ähnlichen Effekt, allerdings bei wesentlich höheren Konzentrationen. Methylcarboxyponazuril hat offenbar keinen inhibitorischen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Wie beim *EtCyp20.5* zeigt sich auch beim *EtCyp18.7* ein konzentrationsabhängiger Effekt nach Zugabe von CsA. Die gewählten Konzentrationsbereiche entsprachen in allen Fällen etwa denen des Vorversuches mit *EtCyp20.5*. Die Inhibition durch CsA fiel im Vergleich zum *EtCyp20.5* etwas weniger stark aus, wobei Toltrazuril in den gewählten Konzentrationsbereichen überhaupt keinen Effekt zeigte. Methylcarboxyponazuril bewirkte zwar bei einer Konzentration von 7 μM eine Verringerung der Chaperon-aktivität, allerdings war dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig und ging mit steigender Konzentration an Inhibitor verloren, so dass es sich dabei vermutlich um einen unspezifischen Effekt handelt (Abb. 3.30). Auch in diesem Assay schien der inhibitorische Effekt von Toltrazuril auf *EtCyp20.5* spezifisch zu sein.

3.9 Fluoreszenz-Titration

Es ist eine weithin bekannte und gut untersuchte Tatsache, dass die Bindung von CsA durch Cyclophiline durch eine Bindungstasche realisiert wird, die aus 13 hoch konservierten Aminosäuren besteht. *EtCyp20.5* weist 12 dieser Aminosäuren auf, *EtCyp18.7* sogar 13 Positive (anstatt ein basisches Arginin, ein ebenfalls basisches Lysin). Allen Cyclophilinen gemein ist allerdings ein Tryptophan, welches in aller Regel auch das einzige im Protein vorkommende Tryptophan ist. Beim

EtCyp20.5 bzw. *EtCyp18.7* ist dieses Tryptophan Trp₁₃₉ bzw. das Trp₁₂₈. Bei der Bildung eines CsA – Cyp – Komplexes kommt es zu einer sterischen Änderung des Tryptophans, die durch einen Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz messbar ist. In einem Assay, der in dieser Form erstmals von Husi *et al.* 1984 publiziert wurde (siehe auch 2.15) und der auf der Titration eines Liganden zu einer Cyclophilin-Lösung beruht, sollte im Zuge dieser Arbeit auch die Bindung von Toltrazuril an die *Eimeria tenella* Cyclophiline näher untersucht werden. Als Positivkontrolle diente CsA, von dem man weiß, dass es unmittelbar nach Zugabe eine Fluoreszenzänderung hervorruft. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.31 dargestellt.

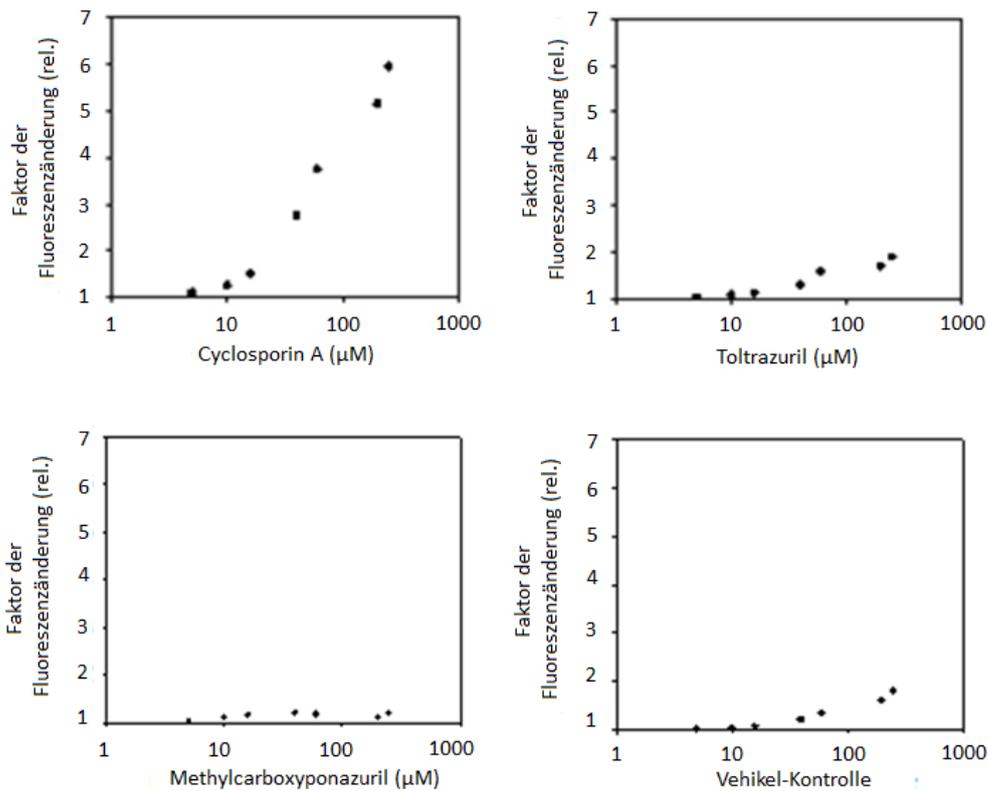


Abb. 3.31 Fluoreszenz-Titration von *EtCyp20.5* mit verschiedenen putativen Liganden

Die Zugabe von CsA führt zu einer gut erkennbaren, konzentrationsabhängigen Erhöhung der Fluoreszenz, wohingegen Toltrazuril im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle keinen Effekt zeigt. Methylcarboxyponazuril führte offenbar auch zu keiner Änderung, welche sich vom Lösemittelleffekt unterschied. Die Meßwerte wurden als Vielfache der Ausgangsfluoreszenz vor Zugabe eines Liganden berechnet und in relativen Einheiten angegeben.

Dieser Versuch wurde zur Kontrolle ebenfalls mit dem zytoplasmatischen *EtCyp18.7* wiederholt. Die Versuchsbedingungen wurden dabei exakt beibehalten. Wie erwartet kam es im Falle von CsA unmittelbar nach der Titration zu einem Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie beim *EtCyp20.5*. Toltrazuril, sowie Methylcarboxyponazuril hatten keinen Effekt im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle, so dass man davon ausgehen musste, dass die Wechselwirkung mit dem Tryptophan nur durch CsA erfolgte und Toltrazuril vermutlich in anderer Art und Weise oder sogar an anderer Stelle das *EtCyp20.5* beeinflusst.

3.10 *In vivo* Toxizitätstests mit *Caenorhabditis elegans*

Um die Effekte von CsA und Toltrazuril auch am lebenden Modell zu untersuchen, wurde entschieden, die Substanzen an dem Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* zu testen. Die Vorteile dieses Organismus sind unter anderem die simple Kultivierung auf Agar-Platten und die schnelle Generationszeit. Dazu sind toxikologische Testverfahren mit *C. elegans* in der Regel billig und einfach in der Durchführung. CsA führt bei dem Wurm in der F1-Generation zu einem in der Literatur moderat beschriebenen Phänotypen, bei dem die Larven ein verkürztes, gedrungenes Aussehen haben und Teile ihrer Kutikula verlieren oder abstreifen. Weiterhin sollte die Reproduktionsrate vermindert und die 'Schlängelbewegung' (Lokomotion) der Würmer gestört, beziehungsweise in ihrer Frequenz vermindert sein (Yang *et al.*, 2007).

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Testsystem etabliert, welches auf der qualitativen Erfassung verschiedener Endpunkte und Parameter basierte. Bis heute gibt es kein standardisiertes Arbeitsprotokoll zu Toxizitätstests mit *C. elegans* nach OECD-Richtlinien, weshalb die Endpunkte und Validitätskriterien für diesen Versuch nach eigenem Ermessen festgelegt worden sind (2.6). Dies waren die Überlebensrate der Adulten, deren Lokomotion, die ungefähre Anzahl, Form und Größe der sich entwickelnden Larven, und strukturelle Merkmale, wie das Vorhandensein von Kutikularesten oder das übermäßige Wachstum von Bakterien als Anzeichen für ein gestörtes Fouragieren ('Fressen'). Außerdem sollte die Persistenz des Effektes, also die Regenerationsfähigkeit des Versuchsansatzes, qualitativ erfasst werden. Die auswertbaren Beobachtungen wurden in einer Tabelle festgehalten und in Form von Graphen umgesetzt. Qualitative Bewertungen hinsichtlich von strukturellen Veränderungen oder Werten, die sich schlecht quantifizieren ließen, wurden durch ein + / - System erfasst. Die Toxizitätstests wurden ausnahmslos in 24-well Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur durchgeführt, als Testmedium diente M9-Medium, welches mit der jeweiligen Testsubstanz und einer entsprechenden Menge an OP50-Futterbakterien supplementiert war (2.6.3). Als Lösungsmittel und Vehikel diente in allen Fällen DMSO. Das Gesamtvolumen der zugesetzten Substanzen war in allen Fällen gleich. Über die Versuchsdauer hinweg zeigten sich für die verschiedenen getesteten Substanzen unterschiedliche Effekte. Leider war es bei der Durchführung dieses Tests nicht möglich, den charakteristischen Cyclosporin A Phänotypen welcher in der Publikation von Yang *et al.* (2007) vorgestellt wurde, zu erkennen. CsA hatte aber offenbar einen starken letalen Einfluss auf die adulten Würmer. Schon nach 24 h waren über 90 % der eingesetzten Adulten tot, nach 48 h alle Würmer des Versuchsansatzes. Außerdem führte die Zugabe zu einer starken Verschiebung des Schlupfzeitpunkts nach hinten. Während in der Negativkontrolle nach spätestens 24 h nahezu alle Larven geschlüpft waren, kam es im Falle von CsA erst nach 96 h zu einer Abundanz junger Larven.

Die absolute Anzahl der jungen Larven nach 8 Tagen war durch die Wirkung von CsA im Gegensatz zur Negativkontrolle ebenfalls deutlich erniedrigt.

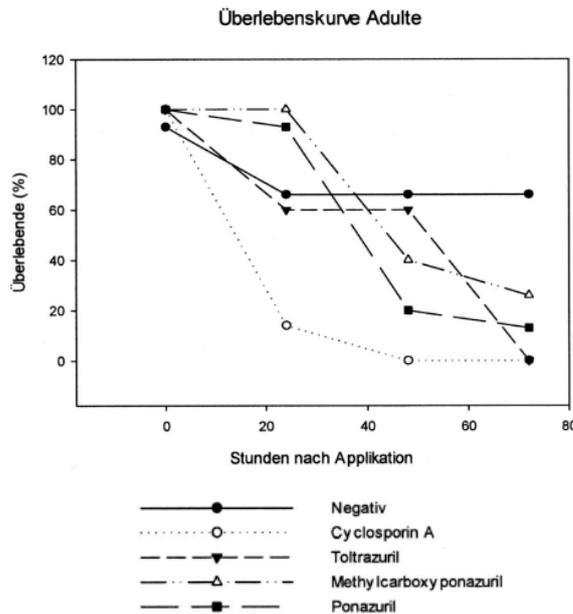


Abb. 3.32 Überlebenskurven adulter Würmer (n = 30)

In Anwesenheit der verschiedenen Testsubstanzen waren unterschiedliche Effekte zu erkennen. Über die Versuchsdauer hinweg nahm die Anzahl der überlebenden Adulten in jedem der Fälle ab. Cyclosporin A hatte den stärksten letalen Effekt, wohingegen Toltrazuril, Ponazuril und Methylcarboxyponazuril untereinander ähnliche Kurven zeigen. Das Versuchsmedium selbst bot offenbar auch keine idealen Überlebensbedingungen.

Ein weiterer Effekt zeigte sich in der Bewegungsfähigkeit der Würmer, die durch Cyclosporin A stark eingeschränkt war. Die Würmer bewegten sich entweder überhaupt nicht mehr oder zuckten nur schwach. Meist war die Letalität so hoch, dass eine sinnvolle Bewertung der Mobilität nicht mehr durchführbar war. Nach Beendigung des Versuches wurde 7 Tage später eine eventuelle Regeneration des Versuchsansatzes bewertet. Der Effekt von Cyclosporin A übertrug sich auch auf die jungen Larven, so dass die Population sich nicht mehr erholen konnte. Zusammengefasst lassen sich die Effekte Cyclosporin A so bewerten, dass es auf die Würmer stark reprotoxisch wirkt und hohe letale Effekte zeigt. Diese Effekte scheinen eine gewisse Persistenz zu besitzen, da eine Regeneration des Versuchsansatzes nicht möglich erscheint.

Toltrazuril zeigte im Vergleich zu CsA einen anderen Effekt. Die Todesrate bei den adulten Würmern war über die Zeit hinweg niedriger, aber dennoch nach 72 h auf dem gleichen Level. Auffällig war, dass der Zeitpunkt des Schlüpfens genau wie nach CsA-Zugabe nach hinten verschoben war, obwohl die Anzahl der jungen Larven in etwa der Menge in der Negativkontrolle entsprach. Die Mobilität der Larven war zwar deutlich besser als bei Anwesenheit von CsA, doch es zeigten sich durchaus starke Abweichungen zur Negativkontrolle. Eine Regeneration des Versuchsansatzes war in gewisser Weise möglich, auch wenn der Allgemeinzustand der Larven von subjektiver Betrachtung her sehr schlecht war. Der Effekt von Toltrazuril schien also auch die Junglarven zu beeinflussen, nur in schwächerer Ausprägung. Das Gesamturteil für diese Substanz in diesem Test war ebenfalls eine gewisse Reprotoxizität und ein letaler Effekt, wobei aber eine leichte Regenerationsfähigkeit zu verzeichnen war.

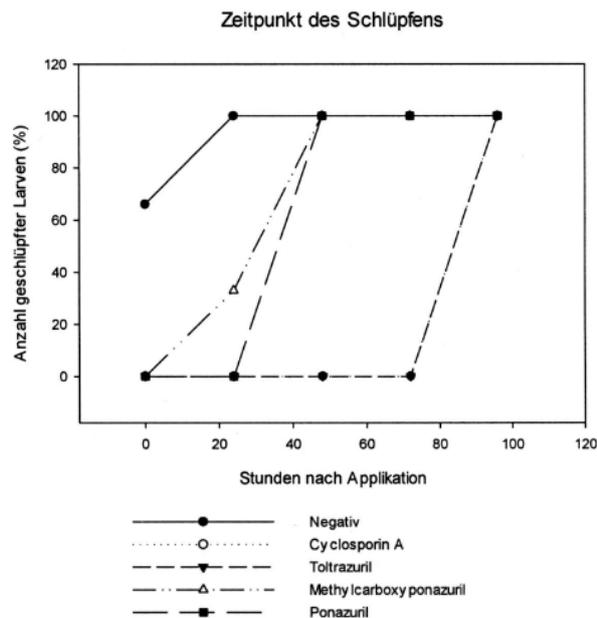


Abb. 3.33 Zeitpunkt des Schlüpfens

In Anwesenheit der verschiedenen Testsubstanzen waren unterschiedliche Effekte zu erkennen. Über die Versuchsdauer hinweg erschienen in jedem Versuchsansatz L1 Larven, wobei der Zeitpunkt ihres Erscheinens durch die Substanzen beeinflusst wurde. CsA und Toltrazuril hatten den stärksten verschiebenden Effekt, wohingegen Ponazuril und Methylcarboxyponazuril die Kurven nur etwa um einen Tag verschoben.

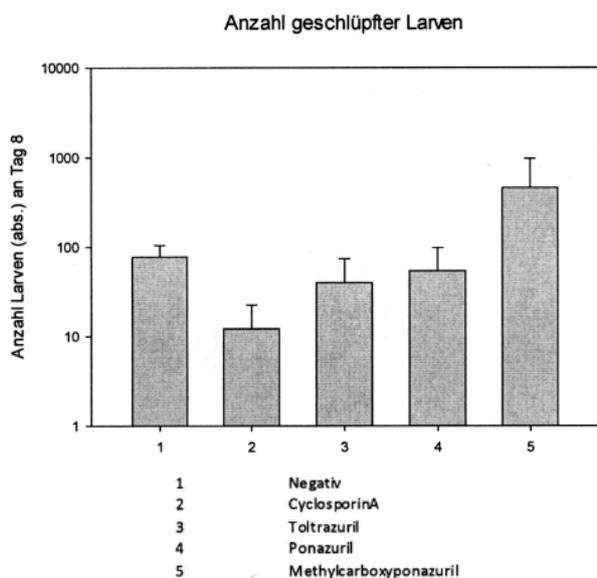


Abb. 3.34 Anzahl geschlüpfter Larven

In Anwesenheit der verschiedenen Testsubstanzen waren unterschiedliche Effekte zu erkennen. CsA hatte als einzige Substanz einen wirklichen hemmenden Einfluss, so dass über die Versuchsdauer hinweg signifikant weniger Larven im Versuchsansatz auftauchten. Methylcarboxyponazuril zeigte überraschenderweise einen starke förderlichen Effekt, durch welchen die Nachkommenzahl stark erhöht wurde.

Relative Mobilität der Larven		Regeneration des Versuchsansatzes	
	Zustand		Zustand
Negativ	++	Negativ	++
Cyclosporin A	-/-	Cyclosporin A	-/-
Toltrazuril	+/-	Toltrazuril	+/-
Ponazuril	++/+	Ponazuril	++/+
Methylcarboxyponazuril	++	Methylcarboxyponazuril	++

Legende:

++ kein Unterschied zur Kontrolle; + hat wenig Einfluss; - Einfluss deutlich erkennbar; -- verheerender Einfluss

Abb. 3.35 Qualitative Bewertung der Mobilität und der Regeationsfähigkeit

Die beiden Parameter korrelierten in diesem Versuch sehr gut miteinander. CsA hatte einen verheerenden Einfluss auf die Mobilität und ließ keine Regeneration des Versuchsansatzes zu. Toltrazuril führte auch zu einer eingeschränkten Mobilität und Regenerationsfähigkeit, wobei der Effekt viel schwächer war als beim CsA. In den Kontrollen war der hemmende Effekt entweder nur schwach ausgeprägt oder gar nicht vorhanden.

Die Auswirkungen von Ponazuril und Methylcarboxyponazuril waren recht ähnlich: Die Letalität führte in beiden Fällen über die Zeit hinweg zu einem Sterben der Adulten. Dieser Effekt war allerdings etwas milder als der Effekt von Toltrazuril. Im Bezug auf das Schlüpfen wirkten beide Substanzen ähnlich, in dem sie den Zeitpunkt um etwa 1 Tag nach hinten verschoben. Ponazuril führte zu keiner signifikanten Abweichung in der Anzahl der Nachkommen, jedoch hatte das Methylcarboxyponazuril offenbar einen beträchtlichen positiven Einfluss. In diesem Versuchsansatz fand man wesentlich mehr Nachkommen als in der Kontrolle. Dies war jedoch der einzige signifikante Unterschied der zwischen den beiden Substanzen auffällig war. Die Mobilität war in beiden Fällen unbeeinflusst und die Versuchsansätze regenerierten sich beide fast vollständig, so dass sich trotz vorheriger Substanzapplikation gesunde Populationen entwickeln konnten. Zusammenfassend kann man also die Wirkungen des Ponazurils und des Methylcarboxyponazurils als nicht reprotoxisch, leicht schlupfverzögernd und nicht persistent beschreiben. Eine Regeneration ist in beiden Fällen gegeben.

3.11 *In vitro* Hemmung der Excystierung bei *Eimeria tenella*

Unabhängig von den Studien zum Toltrazuril-Rezeptor wurde auch ein weiteres Projekt in diese Arbeit aufgenommen. Dabei ging es um die Exzystierung von *Eimeria tenella* Sporozoiten *in-vitro*. Im Fokus der Untersuchungen stand der monoklonale Antikörper E2E5, von dem bekannt ist, dass er die „wall forming bodies“ vom Typ II (WFBII) in Makrogametozyten und die von den WFBII gebildete innere Oozystenwand erkennt. Es sollte untersucht werden, inwiefern die Zugabe von E2E5 den komplexen Vorgang der Exzystierung beeinflussen würde. Dazu wurden die sporulierten Oozysten mittels Wärme und Hühnergalle zur Exzystierung gebracht und die Erfolge unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Nach einer Zeit von 5 Stunden wurde die relative Exzystierung in Form von 'leeren' Sporozysten, beziehungsweise freien Sporozoiten bestimmt und per gepaartem t-Test miteinander verglichen (2.16). In Folgenden sind einige Momentaufnahmen der Exzystierung festgehalten. Nach Zugabe von E2E5-Antikörper zum Versuchsansatz konnte eine signifikante Abnahme der Exzystierung beobachtet werden. Als Kontrolle diente in diesem Versuch eine Exzystierungsrate, die im Normalfall bei 48% – 77% aller verfügbaren Sporozysten lag. Eine Zugabe von E2E5-Überstand reduzierte die Anzahl der Exzystierungen um etwa 50%. Im Gegensatz dazu zeigte weder die Zugabe vom vergleichbaren Antikörper E1D8, noch das Versetzen mit Überständen aus Jurkat-Zellen, die zusätzlich in einem Kontrollexperiment mit V5-IgG2a-Antikörpern supplementiert worden waren, einen ähnlichen Einfluss. Offenbar kam es durch den E2E5-Antikörper zu einer Wechselwirkung mit dem Stieda-Körper, der Struktur, die am komplexen Vorgang der Exzystierung am stärksten beteiligt ist.

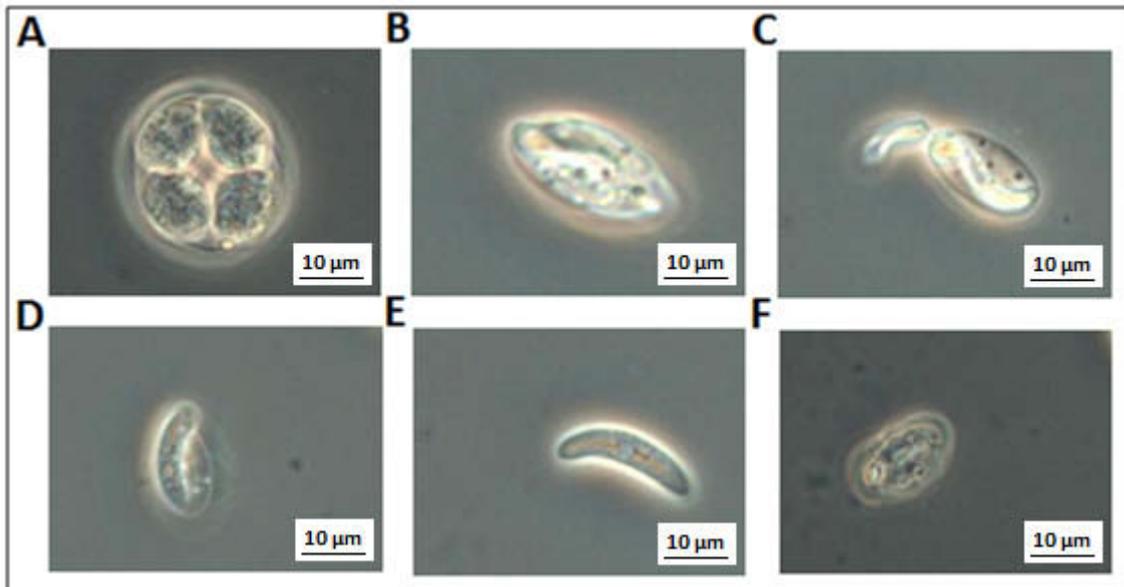


Abb. 3.36 Vorgang einer *in vitro* Exzystierung bei *Eimeria tenella*

Der Vorgang der Exzystierung wurde unter Zuhilfenahme einer Lichtmikroskops im Phasenkontraste verfolgt und dokumentiert. Zu sehen ist eine sporulierte Oozyste (A) mit ihren vier Sporozysten, eine Sporozyste (B) inklusive der beiden Sporozoiten, der Vorgang der Exzystierung des 1. Sporozoiten (C), der Vorgang der Exzystierung des 2. Sporozoiten (D) und einen infektiösen Sporozoiten (E). Abbildung F zeigt die leere Sporozystenhülle, die alsbald von Bakterien und anderen Kleinstlebewesen besiedelt wird.

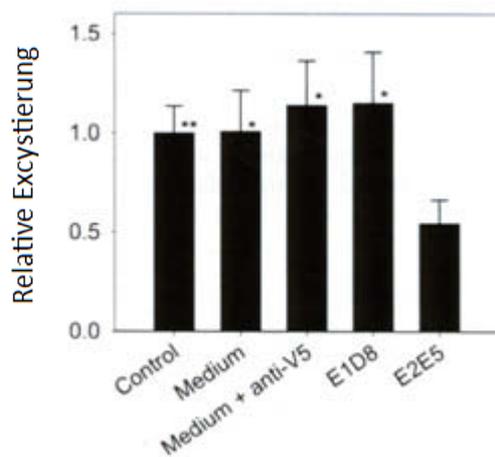


Abb. 3.37 Inhibition durch E2E5 bei *in vitro* Exzystierung

Die Exzystierung wurde in Anwesenheit von 50-fach aufkonzentriertem E2E5- oder Kontrollüberständen von E1D8 und Jurkatzellen mit und ohne V5 IgG2a durchgeführt. Die Effektivität der Exzystierung wurde berechnet als Anzahl der leeren Sporozysten, verglichen mit noch gefüllten Sporozysten. Die Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test. * = $P < 0,05$ (versus E2E5 Überstand); ** = $P < 0.01$.

4 Diskussion

4.1 Identifikation neuer putativer 'Drug-Targets' mittels Phagen-Display

Seit Anfang der achtziger Jahre ist der Wirkstoff Toltrazuril (Baycox®, Bayer) weltweit eines der meist verbreitetsten Chemotherapeutika gegen die Erreger der Kokzidiose, Toxoplasmose und Sarcocystose. Obwohl schon viele pharmakologische und biochemische Daten zum Wirkmechanismus bekannt sind, ist ein eindeutiges molekulares Target bis heute noch nicht identifiziert worden. Ziel dieser Arbeit war die Suche und Charakterisierung eines möglichen Zielmoleküls für Toltrazuril unter Benutzung einer 12mer Peptid Phagen Display-Bibliothek auf der Basis filamentöser M13-Phagen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein 20,5 kDa großes Cyclophilin aus dem Kokzidiose-Erreger *Eimeria tenella* als aussichtsreicher Kandidat identifiziert, erstmals kloniert und biochemisch näher charakterisiert werden. Das Protein bekam die Bezeichnung EtCyp20.5.

Als 'Screening'-Methode ist das Phagen-Displays heute weit verbreitet. Es stellt im Bezug zu vielen Fragestellungen, die auf der Interaktion eines Liganden mit einer unbekanntem Peptidsequenz beruhen, eine adäquate Methode dar, um Hinweise auf mögliche Aminosäuresequenzen mit Bindungsaffinität zu erhalten. Es gibt heute ein sehr breites Feld von Anwendungsmöglichkeiten, die weit über die Suche nach Protein-Protein-Interaktionen hinausgeht. So wurden beispielsweise schon erfolgreich neben hochspezifischen Antikörpern und Proteinbindungspartnern auch DNA- und Kohlenhydrat-bindende Peptide identifiziert. Viele der auf dieser Basis synthetisch hergestellten pharmakologisch wirksamen Stoffe werden derzeit beispielsweise in ihrer Wirksamkeit bei der Krebs- oder Virus-Bekämpfung getestet und stellen dabei sehr aussichtsreiche Kandidaten dar.

Größter Vorteil dieser Methode ist, dass man in sehr kurzer Zeit Peptid-Bibliotheken mit einer Größe von bis zu 1×10^{13} unabhängigen Sequenzen nach geeigneten Interaktionspartnern durchsuchen kann. Allerdings gibt es auch eine Reihe von Nachteilen, welche das Phagen-Display letztlich nicht in allen Fällen zum Mittel der Wahl werden lassen: Um beispielsweise die Infektivität der Phagen gewährleisten zu können, können nicht alle denkbaren Fusionen von Peptiden mit Oberflächenproteinen der filamentösen M13-Phagen auch wirklich umgesetzt werden, da sie unter Umständen bei der Bindung an Rezeptorproteine des bakteriellen Wirts hinderlich sein können. Technisch ausgereift und kommerziell zu erwerben sind derzeit quasi nur Phagen-Bibliotheken die kurze Peptide von 7 beziehungsweise 12 linear oder cyclisch angeordneten Aminosäuren als Fusion des Gen-III-Produktes auf ihrer Oberfläche präsentieren (www.neb.com). Solche kurzkettigen Peptide ermöglichen es aber nicht, komplexe Bindungsepitope wie sie gerade bei Ligand-Rezeptor-

Interaktionen häufig vorkommen, zu detektieren. Die Selektionen führen deshalb oftmals zu einer idealisierten Aminosäuresequenz, die zwar eine Affinität zum eingesetzten Liganden zeigt, aber keinesfalls auch *in vivo* so aufzufinden sein muss. Auch ist das Auftreten sogenannter 'falsch-positiver' Klone, die sich zwar zu großen Prozentanteilen im Phagenpool anreichern, aber letztlich keine signifikante Affinität zum eigentlichen Liganden aufweisen, ein weit verbreitetes Phänomen.

Für den schon seit über 20 Jahren weltweit erfolgreich als Anti-Kokzidiosemittel eingesetzten Wirkstoff Toltrazuril konnte bis heute mit anderen Methoden kein eindeutiger Rezeptor identifiziert werden. Obwohl man verschiedene Hinweise auf mögliche zelluläre Zielmoleküle findet, ist der genaue molekulare Wirkmechanismus bislang ungeklärt.

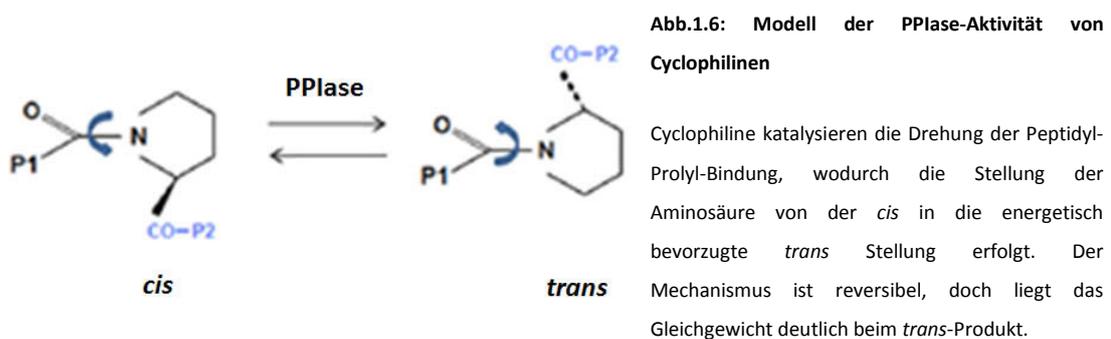
Das in dieser Arbeit durchgeführte 'Screening' gegen Toltrazuril mittels Phagen-Display führte überraschenderweise nicht nur zu einer hohen Anreicherung weniger Peptide während der Selektionsschritte, sondern auch zu Kandidaten die sich in Kontroll-Experimenten als überraschend gute Binder herausstellten. Der Klon A, mit der Aminosäuresequenz YNVREDIRPVMD stellte dabei den aussichtsreichsten Kandidaten dar und rückte in den Fokus der weiteren Untersuchungen. Zwei weitere putative Kandidaten, allerdings mit schlechteren Bindungseigenschaften, wurden parallel in anderen Projekten behandelt. Diese Kandidaten zeigten einerseits eine geringere Affinität zu Toltrazuril als auch eine geringere Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle Streptavidin (Abb. 3.3). Die Aminosäuresequenzen dieser Klone waren QIVDSWSAPTNM und NMDWILGNYTAY.

Die nachfolgende Suche nach bereits beschriebenen Proteinen, welche die angereicherte Proteinsequenz YNVREDIRPVMD zu einem hohen Prozentanteil beinhalten, gestaltete sich relativ schwierig. Zum einen gibt es bisher nur wenige Proteine, die bereits in Struktur und Funktion für *Eimeria tenella* beschrieben sind, zum anderen war das Genom des Parasiten zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht vollständig sequenziert, weshalb die verfügbaren Daten noch unvollständig waren. Dennoch lieferte die Suche unter Benutzung des *Eimeria*-Genomprojektes und des *Toxoplasma*-Genomprojektes ein unbekanntes, vorausgesagtes Protein von 20,5 kDa Molekulargewicht als aussichtsreichsten Treffer. Das Protein war aus verschiedenen Gründen besonders interessant: Zum einen zeigten die Vorhersageprogramme 'conserved domains' Scan und InterproScan, dass es sich offenbar um ein Cyclophilin ABH-ähnliches Protein handelte (Abb. 3.2a+b), zum anderen fand sich eine 83 % Übereinstimmung mit dem angereicherten Peptid aus dem Phagen-Display (YNVREDIRPVMD). Diese Übereinstimmung war überraschenderweise deutlich besser in den orthologen Cyclophilinen der Apikomplexa vorhanden, welche Toltrazuril-suszeptibel sind. In den verfügbaren Proteinsequenzen nicht-suszeptibler Erreger war die Sequenz wesentlich schlechter konserviert (Abb. 3.3b+c). Aufgrund der zu geringen Datenmengen konnte allerdings nicht eindeutig die Orthologie der zum Vergleich herangezogenen Proteine bewiesen werden. Diese stellen nur Cyclophiline gleichen Molekulargewichts dar, die zusätzlich noch ein Signalpeptid

besitzen. Die Namensgebung *EtCyp20.5* ergibt sich aus dem Artnamen des Parasiten, dem theoretischen Molekulargewicht von 20,5 kDa und der Proteinfamilie Cyclophilin.

4.2 Cyclophiline

Cyclophiline sind ubiquitäre Proteine, welche in einem breitgefächerten Spektrum an Zelltypen und Organismen bei Eukaryoten, Prokaryoten und Archaea zu finden sind (Koletsy *et al.*, 1986; Wang, 2005; Maruyama *et al.*, 2000). Man unterscheidet abhängig von Struktur und Lokalisation des Proteins verschiedene Typen von Cyclophilinen, wobei man viele Gruppen ortholog in anderen Taxa wiederfindet. Beispielsweise sind bei der Hefe acht verschiedene Cyclophiline beschrieben, die alle für sich charakteristische Merkmale aufweisen (Pemberton und Kay, 2005). Die meisten Informationen sind heute über die 16 bekannten humanen Cyclophilin-Unterfamilien veröffentlicht. Während beispielsweise das humane CypA nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert ist, findet man CypB assoziiert mit dem Endoplasmatischen Retikulum oder im sekretorischen Pfad, wodurch es dann letztlich extrazellulär sezerniert wird. CypC ist quasi ausschließlich in Vakuolen zu finden und CypD nur in den Mitochondrien (Abb.1.5). CypH ist mit einem Baustein des Spliceosoms, dem tri-snRNP assoziiert. Auch gibt es überdurchschnittlich viele Informationen zum Cyclophilin-Repertoire des Bodennematoden *Caenorhabditis elegans*, welches ganze 18 verschiedene Unterfamilien umfasst. Für die verschiedenen Vertreter der Apikomplexa sind heute 16 Untergruppen von Cyclophilinen bekannt, wobei manche dieser Gruppen in allen Taxa zu finden sind und andere nur sehr spezifisch vorkommen. *Cryptosporidium parvum* hat beispielsweise mit 8 Untergruppen ein relativ kleines Repertoire, wohingegen *Toxoplasma gondii* ganze 14 Untergruppen aufweist. Bemerkenswert ist der Umstand, dass Vertreter der Gattung *Plasmodium* eine eigene, sehr charakteristische Gruppe von Cyclophilinen besitzen. Die Publikation von Krücken *et al.* (2009) bietet eine Übersicht über eine Vielzahl der bisher *in silico* identifizierten Cyclophiline von Apikomplexen. Für *Eimeria tenella* ist bis heute nur ein einziges Cyclophilin beschrieben, das *EtCyp89*, ein 'Multi-Copy-Gen'-kodiertes Protein, das noch nicht näher charakterisiert worden ist (Hosse *et al.*, 2007).



Eine typische Eigenschaft von Cyclophilinen ist ihre Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität (PPIase). Dadurch katalysieren sie *cis/trans*-Isomerisierungen von Peptidyl-Prolyl-Bindungen (Xaa-Pro) in Proteinen und synthetischen Peptidsubstraten (Fischer *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989). Diese Katalyse spielt eine bedeutende Rolle bei der Faltung von Proteinen in ihre native Konformation, sowohl nach der ribosomalen *de novo* Synthese, als auch nach Membran-Passagen in Organellen. Normalerweise werden Peptidbindungen ribosomal in der energetisch bevorzugten *trans*-Konformation synthetisiert. Allerdings wird eine signifikante Minderheit (in etwa 5-7 % aller bisher strukturell bekannten Proteine) nach der Synthese, einem Membran-Transport oder Assemblierung in die energetisch ungünstige *cis*-Konformation überführt (Krücken *et al.*, 2009). Vor allem in diesen Fällen ist die Rotamase-Funktion von Cyclophilinen äußerst wichtig. Beispielsweise ist von der PPIase Pin1 bekannt, dass sie als eine Art molekularer Schalter wirkt und maßgeblich die Phasen des Zellzyklus beeinflussen kann (Lu *et al.*, 2007). Auch sind viele falsch gefalteten Proteine nicht mehr enzymatisch aktiv oder neigen sogar zur Bildung von unlöslichen Präzipitaten in der Zelle. Unabhängig von der PPIase-Aktivität haben viele Cyclophiline zusätzlich noch eine Chaperon-Aktivität, was ihre wichtige Rolle im Zellstoffwechsel noch zusätzlich unterstreicht (Schönebrunner *et al.*, 1990; Santosch und Patrick, 1997; Polinski, *et al.*, 1997). Cyclophiline können zudem als koregulatorische Untereinheiten molekularer Komplexe auftreten und besitzen die Fähigkeit andere Proteine zu binden (für Übersicht, vgl. Galat, 1993). Neuere Studien haben weiterhin gezeigt, dass Cyclophiline in wichtigen Zellprozessen beteiligt (Lu *et al.*, 2007) und mehrfach im komplexen Vorgang der RNA-Prozessierung involviert sind (Gullerova *et al.*, 2007; Reidt *et al.*, 2003). Weiterhin kommt ihnen eine tragende Rolle während der Apoptose, bei der Formation der mitochondrialen 'permeability transition pores' (Baines *et al.*, 2005) und im Replikationszyklus vieler Viren, wie beispielsweise HIV, HCV und SARS zu (Zander *et al.*, 2003; Hanouille *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2004).

Alle Cyclophiline gehören zur Gruppe der 'Immunophilinen'. Diese Familie umfasst eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, die als intrazelluläre Rezeptoren fungieren, in der Lage sind Immunsuppressiva zu binden und so auf das Immunsystem einwirken können. Dabei stellen Cyclophiline spezifische Rezeptoren für Cyclosporin A (CsA) dar (Handschumacher *et al.*, 1984), einem klinisch relevanten Immunsuppressivum. Daher rührt auch die Namensgebung „Cyclophilin“ (Cyclosporin „liebendes“ Protein). Eine weitere Klasse der Immunophilinen sind die FK-506-Bindeproteine (FKBPs), welche spezifisch die immunsuppressiven Makrolaktone FK-506 (Tacrolimus) oder auch Rapamycin komplexieren können. Diese Komplexe bewirken, analog zu CsA, ebenfalls eine Immunsuppression. Die Bindung von CsA führt außerdem zur Inhibition aller enzymatischen Funktionen (Harding *et al.*, 1989). Der sich bildende Cyp-CsA-Komplex ist heute sehr gut untersucht und verschiedene Kristallstrukturen dazu in entsprechenden Datenbanken abrufbar (Pflugl *et al.*, 1993). Ein Beispiel findet sich mit der Publikation von Peterson *et al.* (2000), welche

den Komplex von CsA mit dem 19 kDa Cyclophilin von *Plasmodium falciparum* (PfCyp19) thematisiert, jedoch sind die meisten Daten zum humanen Cyclophilin A verfügbar. Die CsA-Bindungstasche wird bei diesem Protein durch 13 Aminosäuren gebildet, die sich über den gesamten zentralen Teil des Proteins erstrecken (Waldmeier *et al.*, 2003). Kritisch für die Bindung ist dabei ein Tryptophan (Trp₁₂₂ beim humanen CypA), das einzige, welches in dem Protein zu finden ist. Ein Austausch dieser Aminosäure verringert die Affinität zu CsA um den Faktor 1000. Weiterhin scheint ein bestimmtes Arginin (Arg55) für die PPlase-Aktivität essentiell zu sein. Ein Austausch bewirkt hier den fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität (Santosch, Helcher und Patrick, 1997).

In den letzten Jahren sind zudem eine Reihe neuer, synthetischer, niedermolekularer Liganden aus verschiedensten Wirkstoffklassen entdeckt worden, welche ebenfalls spezifisch an Cyclophiline binden (Guo *et al.*, 2007; Demange *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). Zudem wurde beim Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* nach CsA-Zugabe ein typischer Phänotyp beobachtet, der sich auch mit mindestens einer anderen, chemisch nicht verwandten Substanz zeigen ließ, was darauf hindeutet, dass die Effekte die durch CsA bewirkt werden vermutlich auch von anderen Molekülen erzielt werden können (Yang *et al.*, 2007).

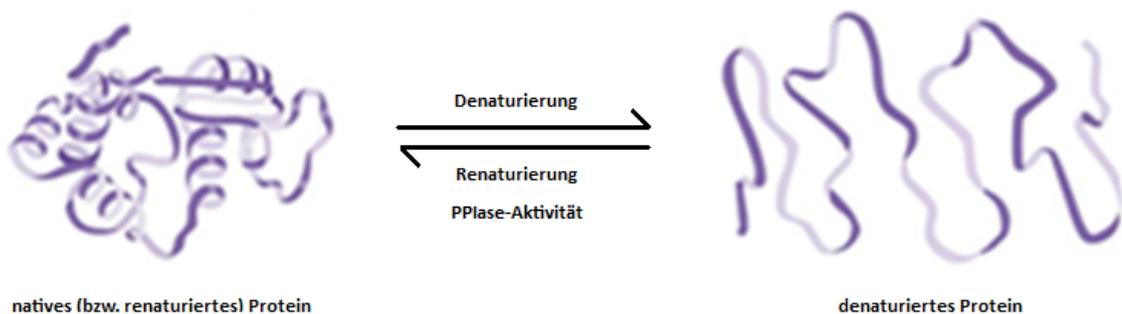


Abb.1.7: Modell zur Chaperon-Funktion von Cyclophilinen

Cyclophiline können eine Faltung von Proteinen in ihre native Konformation bewirken oder die Rückfaltung denaturierter Proteine in eine renaturierte Konformation beschleunigen. Diese Reaktion ist reversibel und schon bei einer Vielzahl von Proteinen untersucht.

Bei einem Sequenzvergleich des in dieser Arbeit identifizierten EtCyp20.5 aus *Eimeria tenella* mit den verschiedenen heute bekannten und zum Teil sehr detailliert erforschten Cyclophilinen aus Säugern bzw. Hefe fand sich die größte Übereinstimmung mit den Cyclophilinen A und B. EtCyp20.5 besitzt ein N-terminales Signalpeptid, wonach sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 66,7% eine extrazelluläre Sekretion ableiten ließ. Die wirkliche Lokalisation des Cyclophilins lässt sich so jedoch nicht abschließend klären, da man beispielsweise vom *Plasmodium falciparum* Cyclophilin PfCyp19B weiß, dass es zwar ein vergleichbares N-terminales Signalpeptid aufweist, aber dennoch hauptsächlich zytoplasmatisch nachzuweisen ist (Bell, 2006).

Protein	Domänen	Molekulargewicht (kDa)	Lokalisation	Säugerortholog
Cpr1		17	Zytoplasma und Nukleus	CypA
Cpr2		20	Sekretiert	CypB
Cpr3		20	Mitochondrien	CypD
Cpr4		33	Vakuole	CypC
Cpr5		23	ER	
Cpr6		45	Zytoplasma	Cyp40
Cpr7		45	Zytoplasma	Cyp40
Cpr8		35	Vakuole	CypC

Abb.1.5: Tabelle zu Gruppen von Cyclophilinen aus der Hefe

Heute bekanntes Cyclophilin-Repertoire von *Sacharomyces cerevisiae*. Zu sehen ist der modellhafte Aufbau, das hypothetische Molekulargewicht, sowie die Lokalisation und das Orthologe Cyclophilin aus *Homo sapiens*. M= mitochondriales Lokalisierungssignal; SP= nicht näher charakterisiertes Signalpeptid; ER= Lokalisierungssignal für Endoplasmatisches Retikulum; TPR= Tetratricopeptid-Region (nach Pemberton und Kay, 2005).

Das Hauptinteresse dieser Arbeit lag vorerst beim Nachweis des hypothetischen Genproduktes und der rekombinanten Expression in einem geeigneten System. Die Anzahl der bisher aus *Eimeria tenella* rekombinant hergestellten Proteine ist relativ gering. Einige wenige Publikationen befassen sich mit der Untersuchung rekombinanter, putativ immunwirksamer Antigene, bei der Entwicklung von neuen Vakzinen (Shirley *et al.*, 2005; Subramanian *et al.*, 2007). Die Charakterisierung eines Cyclophilins aus *E. tenella* (*EtCyp89*) ist bisher nur in einer Publikation von Hosse *et al.*, 2007 zu finden, wobei Teile dieser Arbeit in diese Veröffentlichung eingegangen sind.

4.3 Kinetik von PPIase katalysierten *cis/trans*-Isomerisierungen

Bindungsereignisse zwischen Proteinen und Liganden sind wichtige biochemische Prozesse. Sie sind essentielle Bestandteile vieler Signaltransduktionskaskaden, die die Weiterleitung zellulärer Informationen sicherstellen. Die Aktivität der durch Cyclophiline vermittelten Katalyse von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen ist außerordentlich hoch, so dass die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktionen das *diffusionskontrollierte* Limit für Enzym-Substrat-Reaktionen erreichen. Weiterhin stellen diese Reaktionen auf Grund ihrer relativ hohen Aktivierungsenergie von etwa 80 kJ/mol oft limitierende Schritte bei der Faltung von Proteinen dar

(Schmidt *et al.*, 1993; Scherer *et al.*, 1998). Auf die Kinetik diffusionskontrollierter Reaktionen soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden:

Die Bindung eines Liganden an die Bindungsstelle eines Rezeptorproteins ist aufgrund der anziehenden Bindungskräfte stark exergonisch. Die freie Standardbildungsenthalpie einer typischen biologisch relevanten Affinitätsreaktion liegt zwischen 20 und 80 kJ/mol, damit aber immer noch deutlich unter der einer kovalenten Bindung (ca. 380 kJ/mol für eine C-C-Einfachbindung). Für das humane Cyclophilin hCyp18 konnte bereits am Beispiel der Rückfaltung der RNase T1 kalorimetrisch gezeigt werden, dass die Isomerisierung der *cis/trans*-Isomerisierung stark exotherm abläuft. Die Gleichgewichtskonstanten dieser Reaktionen (Bindungskonstanten) liegen in einem Bereich von 10^3 l/mol bis 10^{15} l/mol. Durch die Bindungskonstante K sind die Konzentrationen von Ligand, Rezeptor und Ligand-Rezeptor-Komplex im Gleichgewicht über das Massenwirkungsgesetz ermittelbar. Bindungskonstanten werden üblicherweise über die entsprechenden Gleichgewichtskonzentrationen bestimmt. Die Bindungskonstante gibt Aufschluss über die thermodynamischen Eigenschaften der Wechselwirkung, die Stärke der Bindung und ihre Temperaturabhängigkeit. Über den dynamischen Verlauf einer Reaktion sagt sie jedoch nichts aus. Die Geschwindigkeit der Wechselwirkung ist jedoch für die Interpretation von Mechanismus und Funktion der Affinitätsreaktion von zentraler Bedeutung. Häufig verläuft die Anlagerung von Liganden nach einem bimolekularen Mechanismus und die Dissoziation nach einem monomolekularen Mechanismus. Sofern keine starken Konformationsänderungen der Reaktionspartner notwendig sind, ist der Bindungsvorgang selbst - aufgrund der Natur der Wechselwirkungskräfte und geringer benötigter Aktivierungsenergien - sehr schnell. Die Geschwindigkeit der Anlagerung ist daher oft nur durch die Wahrscheinlichkeit, mit der Ligand und Rezeptor, aufeinandertreffen, limitiert. Es handelt sich also um *diffusionskontrollierte* Reaktionen. Dies trifft ebenfalls auf Cyclophilin-katalysierte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen zu. In diesem Fall handelt es sich natürlich um die Häufigkeit des Aufeinandertreffens von Enzym und Peptidyl-Prolyl-Bindung. Neuere Studien zum genauen Mechanismus dieser Bindung weisen darauf hin, dass die positive Partialladung des Carbonylkohlenstoffs in der Prolyl-Bindung im Übergangszustand durch ein polarisiertes Wassermolekül im aktiven Zentrum des Enzyms stabilisiert wird. Letztlich ist der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Katalyse abhängig von der sterischen Zugänglichkeit und der Anzahl der zu drehenden Bindungen. Beispielsweise weist das in dieser Arbeit untersuchte Protein RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* zwei solcher Bindungen auf, die jeweils eigene Bindungskonstanten aufweisen und zeitlich aufeinander folgend nacheinander isomerisiert werden.

4.4 Rekombinante Expression von katalytisch aktivem *EtCyp20.5*

Eine Möglichkeit der Proteinexpression stellen, besonders im Hinblick auf die meist sehr hohe Ausbeute an rekombinantem Protein, bakterielle Expressionssysteme dar. Aufgrund der relativ kurzen Generationszeit von *E. coli* ist es möglich, in kürzester Zeit Proteinmengen im mg-Bereich zu isolieren. Ein großer Nachteil dieses Systems ist, dass es sich bei diesem Organismus um einen Prokaryoten handelt. Aufgrund des unterschiedlichen Stoffwechsels zu Eukaryoten und der alternativen Protein-Translation bzw. –prozessierung kann es häufig zu Fehlfaltungen während oder nach der Synthese von Fremdproteinen kommen, welche dann unter Umständen eine völlig unterschiedliche Tertiärstruktur und keine katalytische Funktion mehr aufweisen können. Dennoch wurde entschieden, die Cyclophiline *EtCyp20.5* und *EtCyp18.7* versuchsweise in *E. coli* zu exprimieren.

Dazu wurden Primer designt, welche die vollständige aus der Datenbank abgeleitete Sequenz ohne Stopp-Codon amplifizieren sollten. Das Genprodukt hatte eine theoretische Größe von 564 bp (188 AS). Als Template diente cDNA, die aus der Gesamt-RNA *Eimeria tenella* infizierter Hühnerdärme 172 *h.p.i.* revers transkribiert worden war. Unter PCR-Standardbedingungen konnte das Genprodukt nachgewiesen und für Klonierungsreaktionen eingesetzt werden (Abb. 3.7). Als Vektor wurde auf den pBAD/Thio His TOPO[®] Vektor (Invitrogen) zurückgegriffen, der nicht nur die Expression von rekombinanten Proteinen inklusive eines N-terminalen His₆-‘tags’ erlaubt, sondern auch eine Thioredoxin-Fusion am C-Terminus ermöglicht (Abb. 3.8)

Um die Enzymaktivität der Präparation möglichst lange aufrecht zu erhalten wurde diese in einer Studie zur Stabilität der rekombinanten Proteine unter verschiedenen Bedingungen über einen Zeitraum von zwei Monaten hinweg kontinuierlich gemessen. Als beste Lagerungsbedingungen stellte sich eine Aufbewahrung bei 4°C heraus. Zusätzliche Stabilität erhielt das Enzym dabei durch die Zugabe von Glycerin im Verhältnis 1:1. Die Proteinpräparation war damit abgeschlossen und das Protein konnte für die geplanten Enzym-Assays eingesetzt werden. Die Messung der Enzymaktivität über mehrere Wochen zeigte, dass eine solche Proteinpräparation bis zu zwei Wochen maximale Aktivität entfaltete und danach ein stetiger Rückgang zu verzeichnen war (Abb. 3.15) Deshalb wurden immer frische Proteinpräparationen für Aktivitätsmessungen und die darauf folgenden Inhibitionsstudien genutzt.

Die Enzymaktivität von Cyclophilinen lässt sich mittels spezieller biochemischer Assays nachweisen. Cyclophiline besitzen im Allgemeinen eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität, die essentiell für die Faltung von solch gearteten Peptidbindungen in Proteinen ist. Schon früh wurden Assays entwickelt um die enzymatische Wirkung von Cyclophilinen angemessen darzustellen. Heute ist eine Reihe von Photometrie- oder Fluorometrie-gestützten Assays in vielen Laboren standardmäßig

etabliert und erlaubt leicht eine Quantifizierung der katalytischen Wirkung über eine Messung der beschleunigten *cis/trans*-Isomerisierung. Im Fall der *Eimeria*-Cyclophiline wurde entschieden einen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Assay nach Fischer *et al.* (1989), verändert nach Berriman (1998) und Kofron *et al.* (1991) und einen RNase T1 Rückfaltungs-Assay nach Schönebrunner *et al.* (1990) zu etablieren. Für den PPIase-Assay wurde das synthetische Substrat Succ-AAPF-pNA eingesetzt. Die für die Substratbindung essentiellen Aminosäuren sind heute allgemein bekannt und unter den verschiedenen Cyclophilinen hoch konserviert. Der Chaperonassay verwendete als Substrat denaturierte RNase T1, wobei die Isomerisierung von der *cis*- in die *trans*-Konformation durch einen Anstieg der Fluoreszenz messbar ist.

Für das *EtCyp20.5* und das *EtCyp18.7* konnte die PPIase-Aktivität nachgewiesen werden. Durch die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{cat} konnte die spontane *cis/trans*-Isomerisierung ohne und mit der katalytischen Wirkung eines Cyclophilins bestimmt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit war nach Zugabe verschiedener Mengen an Cyclophilin konzentrationsabhängig signifikant erhöht. Auch im Chaperon-Assay war der Effekt von *EtCyp20.5* und *EtCyp18.7* auf die Rückfaltungsgeschwindigkeit der denaturierten RNase T1 deutlich zu erkennen. Auf Basis dieser Ergebnisse sollten nun Inhibitionsstudien mit verschiedenen pharmakologisch wirksamen Stoffen durchgeführt werden. Diese Stoffe waren die Chemotherapeutica Toltrazuril, Ponazuril, Diclazuril und Emodepsid. Daneben diente als inhibitorische Positivkontrolle Cyclosporin A (CsA). Methylcarboxyponazuril stellte als biologisch inaktive Substanz die Negativkontrolle dar.

Bei Toltrazuril, Ponazuril und Methylcarboxyponazuril (Abb.4.1a-c) handelt es sich um symmetrische Triazinonderivate unterschiedlichen Oxidationsgrades. So wird das Toltrazurilsulfon Ponazuril beispielsweise über das Zwischenprodukt Toltrazurilsulfoxid aus Toltrazuril metabolisiert und weist danach immer noch antiparasitische Aktivität auf. Das Methylcarboxyponazuril hingegen ist biologisch inaktiv und stellt eines der verschiedenen Abbau- und damit Ausscheidungsprodukte von Toltrazuril dar. Auffällige Strukturmerkmale dieser Verbindungen sind neben dem typischen Triazinonring, eingebunden in ein ringübergreifendes aromatisches System, ein Schwefel- bzw. oxidiertes Schwefelatom und ein durch drei Fluor-Substituenten stark polarisierter Molekülpol. Bei Diclazuril (Abb. 4.1d) handelt es sich um ein unsymmetrisches Triazinon (Benzacetonitril) welches ebenfalls über ein weitreichendes aromatisches System verfügt, das jedoch mehrfach chloriert ist. Auffälligste reaktive Gruppe ist bei diesem Molekül allerdings der Nitrilrest.

Die vier oben beschriebenen Moleküle weisen alle ein Molekulargewicht auf, dass sich in ähnlichen Größenordnungen befindet (vgl. Abb 3.16). Beim Cyclosporin A (Abb. 4.1e) hingegen handelt es sich um ein wesentlich größeres Duodecapeptid, das an verschiedenen Stellen methyliert ist. Die genaue Bezeichnung inklusive der Methylierungsstellen lautet L-Alanyl - D-alanyl - *N*-methyl-L-leucyl - *N*-methyl-L-leucyl - *N*-methyl-L-valyl - 3-hydroxy-*N*,4-dimethyl-L-2-amino-6-octenoyl - L-

amino-buteryl - *N*-methylglycyl-*N*-methyl-L-leucyl - L-valyl - *N*-methyl-L-leucyl. Das Anthelmintikum Emodepsid (Abb. 4.1f) gehört zur Klasse der zyklischen Oktadepsipeptide. Besonders auffällig sind zwei Morpholinringe, welche an den D-Phenyl-Laktat-Resten in *para*-Position angeordnet sind.

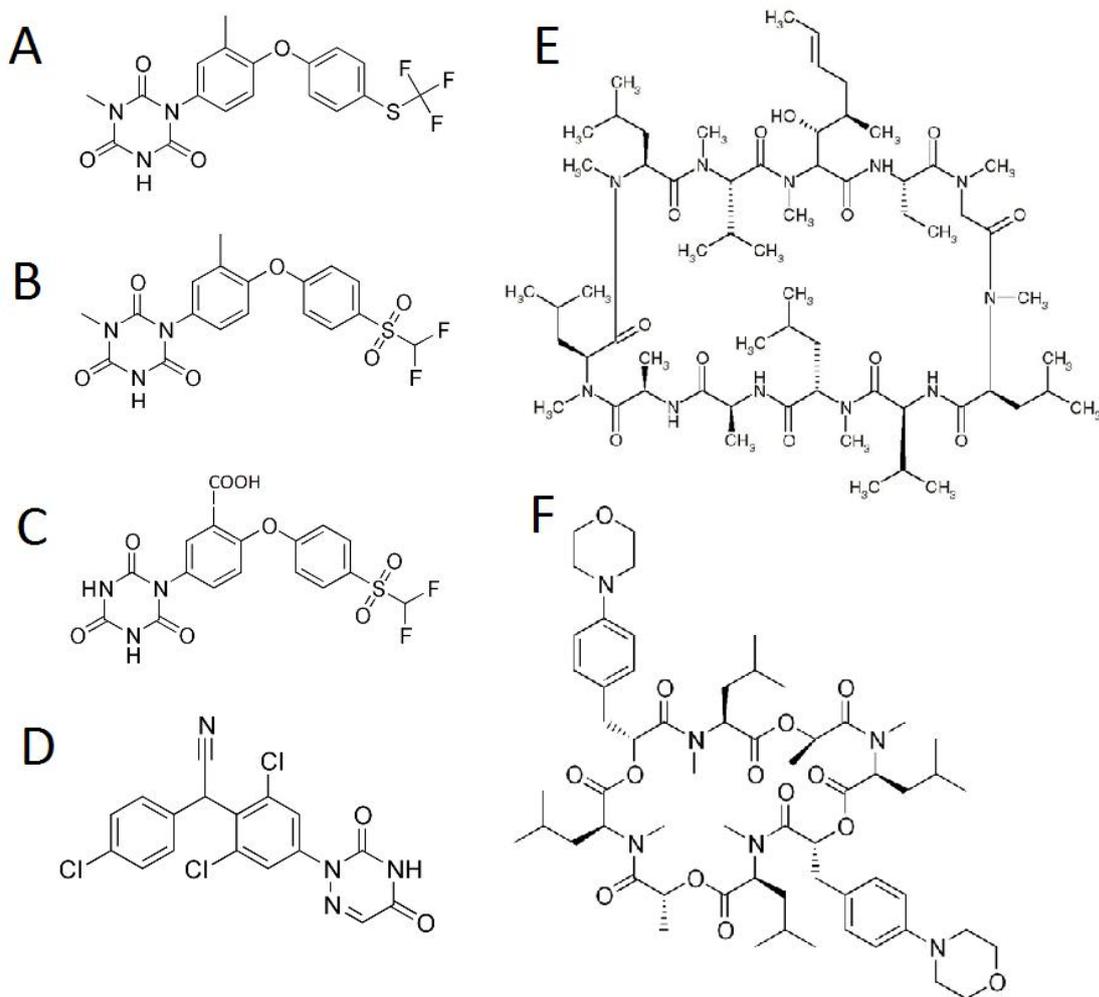


Abb. 4.1 Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe

A = Toltrazuril; B = Ponazuril; C = Methylcarboxyponazuril; D = Diclazuril; E = Cyclosporin A; F = Emodepsid

Bei den Verbindungen A-D handelt es sich um symmetrische und unsymmetrische Triazinonderivate, wohingegen es sich bei E um ein Duodecapeptid handelt. Verbindung F ist ein Oktadepsipeptid. Alle Stoffe werden als Antiparasitika eingesetzt und weisen zum Teil völlig unterschiedliche Wirkmechanismen auf.

4.5 *EtCyp20.5* Inhibitionsstudien mittels PPlase- und RNase T1-,refolding'-Assay

Bei der Charakterisierung von Cyclophilinen hat sich die Inhibition der PPlase-Aktivität durch CsA als Routineuntersuchung etabliert. Heute sind für eine Vielzahl von Cyclophilinen aus Apikomplexa IC_{50} -Werte oder Dissoziationskonstanten (K_D) bekannt. Die Inhibition mit CsA lässt sich anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit sigmoidalem Verlauf und logistischer Abnahme beschreiben. Für

EtCyp20.5 und *EtCyp18.7* ließ sich im Zuge dieser Arbeit ebenfalls eine Inhibition durch CsA zeigen, wobei die IC_{50} -Werte sich in beiden Fällen in ähnlichen Konzentrationsbereichen befinden wie dies auch schon für andere Cyclophiline von Apikomplexa berichtet wurde. Beispielsweise ist eine IC_{50} von $19,4 \pm 1,8$ für das Cyclophilin *PfCyp19* aus *Plasmodium falciparum* publiziert. Vergleichbare andere Werte sind IC_{50} von 5 nM und 32 nM für die Cyclophiline *TgCyp18* und *TgCyp20* aus *Toxoplasma gondii* (Cohen *et al.*, 2002; High *et al.*, 1994). Im Chaperon-Assay konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt zwischen 1 und 100 nM CsA beobachtet werden. Die Wirkung der anderen Inhibitoren unterschied sich maßgeblich von den CSA Effekten: *EtCyp20.5* konnte nur durch Toltrazuril spezifisch gehemmt werden, während Ponazuril, Methylcarboxyponazuril, Diclazuril und Emodepsid keine Wirkung zeigten. Toltrazuril zeigte sich im μ M Bereich effektiv und lieferte eine IC_{50} von 1,84 μ M. *EtCyp20.5* war demnach wesentlich sensitiver gegenüber CsA. Dennoch waren die Effekte von Toltrazuril auf *EtCyp20.5* spezifisch, denn *EtCyp18.7* zeigte keine Inhibition durch Toltrazuril, sehr wohl aber durch CsA (IC_{50} = 18 nM). Um der Frage nachzugehen, warum ein inhibitorischer Effekt nur beim *EtCyp20.5* zu messen war, scheint es angebracht, die Proteine in einem Sequenzvergleich daraufhin zu untersuchen.

Die Hauptunterschiede zwischen den beiden Cyclophilinen finden sich im Vorhandensein, beziehungsweise im Fehlen des Signalpeptids und vor allen Dingen in der Übereinstimmung zum Toltrazuril-Bindepeptid aus dem Phagen-Display. Jenes findet sich nur im *EtCyp20.5*, wohingegen das *EtCyp18.7* in dieser Region überhaupt keine Ähnlichkeit zu dem Peptid aufweist.

4.6 Untersuchungen zur Toltrazuril-Binderegion

Cyclophiline sind charakterisiert durch ihre Eigenschaft, das Immunsuppressivum Cyclosporin A zu binden. Die entsprechende Bindetasche besteht aus 13 Aminosäuren, die bei allen Cyclophilinen hoch konserviert ist. Die für die Bindung kritische Aminosäure ist ein Tryptophan (Trp), welches in aller Regel auch das einzige Trp in diesen Proteinen ist. Wird dieses gegen eine andere Aminosäure substituiert, ist die Bindung zum CsA um den Faktor 1000 vermindert.

Bis heute wurden verschiedene Verfahren entwickelt, den Cyp-CsA-Komplex näher zu untersuchen. So zum Beispiel Röntgen-Untersuchungen (Kallen *et al.* 1991) und NMR- (Pfluegel *et al.*, 1993) oder Fluoreszenz-Messungen (Handsuhmacher *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 2006; Albani *et al.*, 2007; Daum *et al.*, 2009). Als besonders geeignet hat sich die Methode der Fluoreszenz-Titration herausgestellt, bei der die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz proportional zur Zugabe von CsA zur Proteinlösung gemessen wird. Im Fall von *EtCyp20.5* und *EtCyp18.7* konnte nicht nur, wie erwartet, ein Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von CsA gemessen werden, sondern auch die eventuelle Wechselwirkung von Toltrazuril mit der CsA-Bindungstasche näher beleuchtet werden. Im Fall von Toltrazuril konnte kein Fluoreszenzanstieg nachgewiesen werden. Der minimale Effekt, der zu

beobachten war, unterschied sich nicht von dem Effekt der Vehikelkontrolle oder der Negativkontrolle Methylcarboxyponazuril. Offenbar wurde die CsA-Bindungstasche und insbesondere das kritische Tryptophan im *EtCyp20.5* vom Toltrazuril nicht genutzt. Dieses Ergebnis war zu erwarten, wenn man sich vor Augen führt, dass die Toltrazuril-Bindesequenz sich in der Sekundärstruktur des Proteins entfernt von der CsA-Bindetasche befindet.



Abb. 4.2 Modellhafte Darstellung von *EtCyp20.5*

Zweidimensional dargestellt ist das *EtCyp20.5* Protein vom N- bis zum C-Terminus. Die Toltrazuril-Bindedomäne liegt entfernt von den Aminosäuren die für die CsA Bindung notwendig sind (rot). Das Arg55 markiert die für die PPlase-Funktion kritische Aminosäure. Weiterhin sind das Signalpeptid und das für die CsA-Bindung kritische Trp139 markiert.

Diese Ergebnisse lieferten weitere Beweise dafür, dass sich die Wirkungen von CsA und Toltrazuril auf *EtCyp20.5* offenbar grundlegend unterscheiden. Es handelt sich bei Toltrazuril offenbar um einen Inhibitor, der in der Lage ist die PPlase-Funktion zu hemmen ohne dabei an das kritische Trp zu binden. Synthetische Stoffe mit solchen Eigenschaften sind in der Literatur bereits mannigfaltig beschrieben (Abb. 4.3).

4.7 Übertragung der *in vitro* Effekte auf *in vivo* Systeme

All die *in vitro* Effekte ließen sich auch auf die Wirkungen *in vivo* übertragen. CsA ist ein Undekapeptid aus dem Pilz *Tolyocladium inflatum* (Borel, 1979) und wird heute überwiegend in der Transplantationsmedizin zur Unterdrückung von Organabstoßungsreaktionen, sowie zur Behandlung diverser Autoimmunerkrankungen und chronischer Entzündungsreaktionen eingesetzt (Borel, 1991). Ein wachsendes Problem ist jedoch die Nephrotoxizität dieser Substanz (Kengne-Wafo *et al.*, 2009). Überraschenderweise zeigt es zusätzlich eine anti-parasitische Wirkung auf viele Protozoen und Helminthen wie *Eimeria mitis*, *Eimeria vermiformis* (Rose *et al.*, 1989), *Echinococcus granulosus* (Colebrook *et al.* 2002), *Trichinella spiralis* (Bolas-Fernandez *et al.*, 1987), *Plasmodium vivax* (Kocken *et al.*, 1996) und andere Parasiten aus ganz verschiedenen Taxa (Chappell und Wastling, 1992; Thommen-Scott, 1981; Bueding *et al.*, 1981). Beispielsweise wurden IC_{50} -Werte von $19,4 \pm 1,8$ nM CsA für *PfCyp19* aus *Plasmodium falciparum* veröffentlicht. Vergleichbare IC_{50} Werte anderer Cyclophiline aus *Toxoplasma gondii* sind 5 nM für *TgCyp18* und 32 nM für *TgCyp20* (Cohen *et al.*, 2002; High *et al.*, 1994). Um bei *Toxoplasma gondii* in Zellkulturexperimenten Schäden zu verursachen, setzt man Mengen zwischen 0,5 – 5 $\mu\text{g/ml}$ CsA ein (McCabe *et al.*, 1986).

Eine weithin anerkannte Auffassung ist, dass die anti-parasitische Wirkung von CsA durch die Wechselwirkung mit diversen Cyclophilinen in der Zelle und der damit einhergehenden Inaktivierung von Calcineurin erklärt werden kann (Dobson *et al.*, 1999; Ivery, 1998). Der CypA-CsA-Komplex ist in der Lage die zytoplasmatische Proteinphosphatase Calcineurin zu komplexieren, wodurch die immunsuppressive Wirkung von CsA erklärt werden kann. Diese beruht höchst wahrscheinlich auf der Inhibierung eines Ca^{2+} -abhängigen Signalwegs, was eine Suppression der Transkription T-Zell-aktivierender Genprodukte, wie z. B. des Lymphokins Interleukin-2 (IL2), zur Folge hat (Emmel *et al.*, 1989). In ruhenden T-Zellen kommt es normalerweise durch eine Signalvermittlung über den T-Zell-Rezeptor (TCR) zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin wird durch die Bindung von Ca^{2+} und den Kofaktor Calmodulin aktiviert, was schließlich zur Dephosphorylierung von NF-AT ('nuclear factor of activated T-cells') führt. In dephosphorylierter Form wird NF-AT in den Nukleus transloziert, wo durch Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren die Expression spezifischer Gene ausgelöst wird, wie z.B. die von IL2, was zur klonalen Expansion der T-Zelle führt (Janeway, 2005).

Als Modellorganismus, um die Wirkungen von Toltrazuril auch in einem *in vivo* System zu testen, wurde in dieser Arbeit der Bodennematode *Caenorhabditis elegans* herangezogen. In den durchgeführten Toxizitätstests zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Vehikel-Kontrolle ein starker CsA-Effekt auf die Mortalität und die Reproduktion, wobei letztere in diesem Fall eng mit dem frühen Tod der Würmer zusammenhängen muss. CsA wirkte innerhalb von 1 Tag letal auf 80% der Würmer. Die Gesamtzahl der Nachkommen war um eine Zehnerpotenz erniedrigt und der Zeitpunkt des Schlüpfens lag etwa 96h nach der Kontrolle. Toltrazuril im Gegenzug führte zu einem sehr viel langsameren Absterben, so dass nach 48h noch etwa 50% der Würmer lebten. Der Zeitpunkt des Schlüpfens, also dem ersten Auftauchen von Larven, war in beiden Fällen vier Tage nach hinten verschoben. Bei der Anzahl der Nachkommenschaft gab es zwischen den beiden Substanzen einen recht großen Unterschied, da im Fall von Toltrazuril wesentlich mehr Larven überlebten, während CsA fast alle Larven tötete.

In der Literatur wird nach Zugabe von CsA außerdem von einem Phänotyp berichtet, der seine Kutikula 'abstreifen' würde. Dies sei auf die Inhibition des Cyclophilins D Orthologs in der Zellmembran zurückzuführen, welches für die Sekretion der Kutikula nötig sei (Yang *et al.*, 2007). Dieser Phänotyp konnte in dem durchgeführten Versuch nicht gezeigt werden.

Interessanterweise korreliert die Menge an Toltrazuril, die eingesetzt werden muss um *in vivo* Effekte an Parasiten in Zellkultur zu zeigen, in etwa mit den Konzentrationen, die in dieser Arbeit im PPIase-Assay eingesetzt wurden. So ist beispielsweise beschrieben, dass nach Behandlung mit 1 - 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2,3 – 69 μM) Toltrazuril Tachyzoiten von *Neospora caninum* deutliche Schäden zeigen (Darius *et al.*, 2004). Für *Toxoplasma gondii* liegen die Konzentrationen bei etwa 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,92

μM) (Ricketts *et al.*, 1993). Für *Eimeria tenella* sind bis heute zwar keine Zellkulturerperimente mit Toltrazuril veröffentlicht, jedoch werden Erstinfektionen mit 20 mg/kg Körpergewicht behandelt, was interessanterweise auch in etwa der Menge an Ponazuril entspricht, die zur Behandlung von Kokzidiose verabreicht wird (Le Sueur *et al.*, 2008).

4.8 EtCyp20.5 als spezifisches ‚target‘ für Toltrazuril

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen EtCyp20.5 als ein Protein, welches sich sowohl durch CsA als auch durch Toltrazuril inhibieren lässt. Im Vergleich dazu, lässt sich das etwa gleich große EtCyp18.7 nicht durch Toltrazuril inhibieren, weist allerdings auch nicht die Toltrazuril-Binde-Region auf, die im Phagen-Display identifiziert werden konnte. Die inhibitorischen Wirkungen von Toltrazuril liegen im μM Bereich ($\text{IC}_{50} = 1,8 \mu\text{M}$), während CsA in sehr viel geringeren Konzentrationen inhibitorisch wirkt. Die Inhibition der wichtigen PPlase-Funktion und der Chaperon-Funktion von EtCyp20.5 *in vitro* stellen einen Angriffspunkt dar, der durchaus zu einer Störung des Parasitenstoffwechsels oder gar zu dessen Absterben führen könnte.

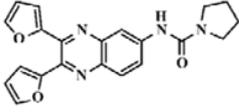
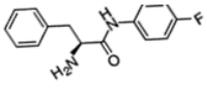
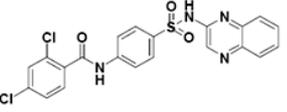
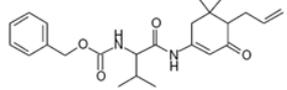
	K_d^{PPlase}	Art der Interaktion	Referenz
	4,4 μM	Inhibiert PPlase-Aktivität, Bindet am Trp122	Guo <i>et al.</i> , 2007
	84 μM	Inhibiert PPlase-Aktivität, Bindet am Trp122	Demange <i>et al.</i> , 2001
	8,9 μM	Inhibiert PPlase-Aktivität, Bindet nicht am Trp122	Li <i>et al.</i> , 2005
	22 μM	Inhibiert PPlase-Aktivität, Bindet nicht am Trp122	Yang <i>et al.</i> , 2007

Abb. 4.3 Strukturformeln einiger neuer synthetischer Inhibitoren für Cyclophilin A

Bei diesen Verbindungen handelt es sich um chemisch nicht verwandte Substanzen, welche jedoch in Struktur und Molekulargewicht viele Ähnlichkeiten zu Toltrazuril aufweisen. Als Beispiel sollen die Halogensubstituenten, die heterozyklischen aromatischen Ringe oder die doppelt gebundenen Sauerstoffe dienen. Auch die Molekulargewichte dieser Stoffe sind vergleichbar. Interessant ist der Umstand, dass zwar alle dieser Substanzen die PPlase-Aktivität inhibieren, jedoch nicht zwangsläufig auch an das Tryptophan 122 binden. Analog ist dies auch bei Toltrazuril.

Auch *in vivo* zeigte Toltrazuril Effekte, die sich in ihrer Stärke und Persistenz deutlich von den CsA-Effekten unterscheiden. Die Fluoreszenzmessungen zur CsA-Bindungstasche legen den Schluss nahe, dass Toltrazuril und CsA auf zwei unterschiedlichen Arten wirken, obwohl sie offenbar dasselbe Zielmolekül haben können. Der Umstand, dass Toltrazuril auf EtCyp20.5 in einem

Konzentrationsbereich wirkt, welcher den Konzentrationen aus *Toxoplasma* Zellkulturexperimenten entspricht, macht es als mögliches Drug-Target nur noch interessanter.

Durch die Methode des Phagen-Display konnte also ein bislang unbekanntes Protein, das *EtCyp20.5*, als sehr aussichtsreicher Rezeptorkandidat für das Chemotherapeutikum Toltrazuril identifiziert werden. Der Wirkmechanismus scheint sich deutlich vom bekannten Inhibitor Cyclosporin A zu unterscheiden und stellt einen völlig neuen Ansatzpunkt dar, der in der Literatur bisher noch nicht diskutiert worden ist. Gestützt werden diese Thesen durch eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* Versuchen, welche alle *EtCyp20.5* als ein spezifisches Toltrazuril-Target präsentieren.

4.9 Ausblick

Im Folgenden sollen einige mögliche Ansätze für Folgearbeiten an diesem Projekt aufgezeigt werden, das immer noch viele Fragen offen lässt. Eine Reihe wichtiger Studien stehen noch aus, um den Wirkmechanismus abschließend zu klären. Ein möglicher Ansatz wäre hier eine Untersuchung zur Lokalisation von *EtCyp20.5* im Parasiten selbst. Zwar ist eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum oder im sekretorischen Weg vorausgesagt, man weiß jedoch vom *Plasmodium falciparum* Cyclophilin *PfCyp19B*, dass es überraschenderweise trotz eines solchen Signalpeptids nahezu ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert ist. Ein Hinweis auf ein solches Verhalten von *EtCyp20.5* wäre die Abspaltungssequenz zwischen den Aminosäuren 23 und 24 im *EtCyp20.5*. Um die Lokalisation also wirklich zu klären, wären Antikörperfärbungen, *in-situ*-Hybridisierungen oder GFP-Fusions-Experimente denkbar.

Insgesamt problematisch scheint die Haltung der Parasiten, beziehungsweise der suszeptiblen intrazellulären Stadien in Zellkultur zu sein. Tatsächlich gibt es bis heute keine Veröffentlichung welche sich mit *Eimeria tenella* in Zellkultur befasst. Überdurchschnittlich viele Publikationen zur Wirkung von Toltrazuril und seinem Metaboliten Ponazuril gibt es allerdings zum nahen Verwandten *Toxoplasma gondii*. Da letzterer Parasit mit *TgCyp19.6* ein orthologes Protein zum *EtCyp20.5* besitzt, wären analoge, gut übertragbare Studien an diesem Parasiten denkbar. Durch RNAi-Experimente könnten einige Cyclophiline gezielt ausgeschaltet werden, um eine vollständige Inhibition dieser Proteine zu simulieren. Transgene Parasiten stellen natürlich das Mittel der Wahl dar wenn man prüfen möchte, welchen Einfluss ein Wegfall einer bestimmten Cyclophilin-Funktion hat. Allerdings gibt es auf dem Gebiet bisher noch keine wirklichen Erfolge.

Ferner wäre die Klonierung der orthologen Cyclophiline aus anderen Toltrazuril-suszeptiblen und nicht-suszeptiblen Apikomplexa interessant, um mit diesen Proteinen ebenfalls Inhibitionsstudien mit Toltrazuril durchzuführen. Dies würde vielleicht einen Zusammenhang zwischen Toltrazuril-Suszeptibilität und Proteinsequenz beziehungsweise –struktur offenbaren.

5. Zusammenfassung

Die Geflügel-Kokzidiose ist eine parasitäre Darmerkrankung bei Hühnern, die insbesondere in der industriellen Masttierhaltung zu enormen wirtschaftlichen Verlusten führt. *Eimeria tenella* ist der am stärksten pathogene Erreger dieser Krankheit im Haushuhn. Ein Meilenstein in der Entwicklung von Kokzidiostatika stellt Toltrazuril (Baycox®) dar, ein symmetrisches Triazinonderivat, das heute weltweit zur Behandlung eines breiten Spektrums von Parasitosen eingesetzt wird. Bislang ist kein molekulares Target für Toltrazuril in *Eimeria tenella* bekannt. Ziel der Arbeit war es, ein Target für Toltrazuril mittels Phagen Displays zu identifizieren und zu charakterisieren.

Es konnten zwei neue Cyclophiline aus *E. tenella* erstmals identifiziert und enzymatisch aktiv in *E. coli* rekombinant exprimiert werden. Diese Arbeit präsentiert ein 20,5 kDa großes Cyclophilin, *EtCyp20.5*, als neuen potentiellen Rezeptor für Toltrazuril in *E. tenella*. Ein Protease gekoppelter PPIase-Assay und ein RNase T1 Rückfaltungs-Assay konnten erfolgreich etabliert werden, um die Enzymaktivität zu bestimmen ($k_{kat (PPIase)} = 0,087 \pm 0,01$) und Hemmstudien mit verschiedenen Inhibitoren durchzuführen. Beide Cyclophiline, *EtCyp20.5* und *EtCyp18.7* ließen sich wie erwartet durch den spezifischen Inhibitor Cyclosporin A (CsA) konzentrationsabhängig inhibieren ($IC_{50} = 12\text{nM}$ bzw. 18nM). Die Enzymaktivität von *EtCyp20.5* konnte überraschenderweise auch durch die Zugabe von Toltrazuril gehemmt werden ($IC_{50} = 1,84 \mu\text{M}$). Diese Hemmung erwies sich als spezifisch, da weder das *EtCyp18.7* durch Toltrazuril inhibiert werden konnte, noch eine der anderen getesteten Substanzen einen Effekt auf *EtCyp20.5* zeigte. Die gemessenen IC_{50} -Werte entsprachen Literaturwerten von in Zellkultur verwendeten Mengen an Toltrazuril und Ponazuril, die eingesetzt werden, um Schäden an suszeptiblen Parasiten auszulösen. Durch Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass sich die Wirkung von Toltrazuril deutlich von den CsA-vermittelten Effekten unterscheidet, da die CsA-Bindungstasche, bzw. das für die Bindung essentielle Tryptophan offenbar nicht von Toltrazuril genutzt wird.

Diese Arbeit identifiziert erstmals das Cyclophilin *EtCyp20.5* aus dem Parasiten *Eimeria tenella* als ein spezifisches Target für Toltrazuril und bietet damit einen neuen Ansatzpunkt zur Klärung des molekularen Wirkmechanismus von Toltrazuril und zum 'design' neuer Kokzidiostatika in der Pharmaindustrie.

5. Abstract

Avian coccidiosis is an important disease causing enormous economic losses, in particular in poultry farms. Typical symptoms are haemorrhagic diarrhea associated with reduced egg production and a dramatic loss of weight. If not medicated, the animals die. *Eimeria tenella* is the most pathogenic causative agent of coccidiosis in the domestic chicken *Gallus gallus*. A milestone in the development of coccidiostats is toltrazuril (Baycox®), a symmetric triazinone derivative which is currently used worldwide against a wide variety of diseases. To date the major target for toltrazuril still remains to be elucidated.

The aim of his Ph. D. thesis was the identification of a molecular target for toltrazuril by using the phage display method.

Two new cyclophilins from *E. tenella* were identified and expressed enzymatically active in *E. coli* cells. This work presents a 20.5 kDa cyclophilin, *EtCyp20.5*, as a new putative receptor for toltrazuril in *Eimeria tenella*. A protease coupled PPIase assay and a RNase T1 refolding assay were successfully established to determine the enzyme activity ($k_{cat (PPIase)} = 0.087 \pm 0.01$) and to perform inhibition assays. As expected, both cyclophilins, *EtCyp18.7* and *EtCyp20.5*, were inhibitable by the specific cyclophilin inhibitor cyclosporine A (CsA) in a concentration dependent manner ($IC_{50} = 12\text{nM}$ and 18nM respectively). Surprisingly, the enzyme activity of *EtCyp20.5* was also inhibitable by toltrazuril ($IC_{50} = 1.84 \mu\text{M}$). This effect seems to be specific, since the *EtCyp18.7* was not inhibited by toltrazuril and none of the other substances that were tested revealed any effect on *EtCyp20.5*. The IC_{50} -values were comparable to concentrations used to induce damages in the close related parasites *T. gondii* and *N. caninum* in cell culture. By fluorescence measurements the interaction of CsA and toltrazuril with the CsA-binding pocket was investigated. However, it seems that the CsA-binding pocket, in particular the critical tryptophane, interacts not with toltrazuril.

This thesis identifies the cyclophilin *EtCyp20.5* as a specific drug target for toltrazuril. Moreover, this protein represents a new starting point for discovering the mode of action of toltrazuril in *Eimeria tenella* or the design of novel coccidiostats by the pharmaceutical industry

6. Literaturverzeichnis

- Albani, J. R. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence. Origin of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: the emission to excitation ratio, *Journal of fluorescence* **17**, 406–417 (2007).
- Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, *Nature* **434**, 658–662 (2005)
- Bell, A. Monaghan, P. & Page, A. P. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action, *Int. J. Parasitol.* **36**, 261–276 (2006).
- Berriman, M. & Fairlamb, A. H. Detailed characterization of a cyclophilin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Biochem. J.* **334 (Pt 2)**, 437–445 (1998).
- Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
- Blake, D. P. Shirley, M. W. & Smith, A. L. Genetic identification of antigens protective against coccidia, *Parasite Immunol.* **28**, 305–314 (2006).
- Borel, J. F. Mechanism of action of cyclosporin A and rationale for use in nephrotic syndrome, *Clin. Nephrol.* **35 Suppl 1**, S23-30 (1991).
- Borel, J. F. & Wiesinger, D. Studies on the mechanism of action of cyclosporin A [proceedings], *Br. J. Pharmacol.* **66**, 66P-67P (1979).
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
- Bueding, E. Hawkins, J. & Cha, Y. N. Antischistosomal effects of cyclosporin A, *Agents Actions* **11**, 380–383 (1981).
- Bumstead, N. & Palyga, J. A preliminary linkage map of the chicken genome, *Genomics* **13**, 690–697 (1992).
- Chapman, H. D. *et al.* Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines, *Int. J. Parasitol.* **32**, 617–629 (2002).
- Chapman, H. D. *et al.* Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines, *Int. J. Parasitol.* **32**, 617–629 (2002).
- Chappell, L. H. & Wastling, J. M. Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant, *Parasitology* **105 Suppl**, S25-40 (1992).
- Chomczynski, P. & Mackey, K. One-hour downward capillary blotting of RNA at neutral pH, *Anal. Biochem.* **221**, 303–305 (1994).
- Cohen, A. M. Rumpel, K. Coombs, G. H. & Wastling, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol.* **32**, 39–51 (2002).

- Cohen, A. M. Rumpel, K. Coombs, G. H. & Wastling, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol.* **32**, 39–51 (2002).
- Colebrook, A. L. Jenkins, D. D. & Lightowlers, M. W. Anti-parasitic effect of cyclosporin A on *Echinococcus granulosus* and characterization of the associated cyclophilin protein, *Parasitology* **125**, 485–493 (2002).
- Coombs, G. H. & Müller, S. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs, *Int. J. Parasitol.* **32**, 497–508 (2002).
- Dalloul, R. A. & Lillehoj, H. S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development, *Expert review of vaccines* **5**, 143–163 (2006).
- Darius, A. K. Mehlhorn, H. & Heydorn, A. O. Effects of toltrazuril and ponazuril on *Hammondia heydorni* (syn. *Neospora caninum*) infections in mice, *Parasitol. Res.* **92**, 520–522 (2004).
- Daum, S. *et al.* Isoform-specific inhibition of cyclophilins, *Biochemistry* **48**, 6268–6277 (2009).
- DelMar, E. G. Largman, C. Brodrick, J. W. & Geokas, M. C. A sensitive new substrate for chymotrypsin, *Anal. Biochem.* **99**, 316–320 (1979).
- Demange, L. Moutiez, M. Vaudry, K. & Dugave, C. Interaction of human cyclophilin hCyp-18 with short peptides suggests the existence of two functionally independent subsites, *FEBS Lett.* **505**, 191–195 (2001).
- Devlin, J. J. Panganiban, L. C. & Devlin, P. E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules, *Science* **249**, 404–406 (1990).
- D'Mello, F. & Howard, C. R. An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries, *J. Immunol. Methods* **247**, 191–203 (2001).
- Dobson, S. *et al.* Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex, *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 167–181 (1999).
- Driesen, S. J. Fahy, V. A. & Carland, P. G. The use of toltrazuril for the prevention of coccidiosis in piglets before weaning, *Aust. Vet. J.* **72**, 139–141 (1995).
- Dunn, P. P. Stephens, P. J. & Shirley, M. W. *Eimeria tenella*: two species of extrachromosomal DNA revealed by pulsed-field gel electrophoresis, *Parasitol. Res.* **84**, 272–275 (1998).
- Emmel, E. A. *et al.* Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation, *Science* **246**, 1617–1620 (1989).
- Eschenbacher, K. H. Egli, P. Wallach, M. & Braun, R. Characterization of a 14 kDa oocyst wall protein of *Eimeria tenella* and *E. acervulina*, *Parasitology* **112** (Pt 2), 169–176 (1996).
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum, *Anal. Biochem.* **137**, 266–267 (1984).
- Fetterer, R. H. & Barfield, R. C. Characterization of a developmentally regulated oocyst protein from *Eimeria tenella*, *J. Parasitol.* **89**, 553–564 (2003).
- Fischer, G. Bang, H. & Mech, C. [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides], *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101–1111 (1984).

- Fischer, G. Wittmann-Liebold, B. Lang, K. Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins, *Nature* **337**, 476–478 (1989).
- Galat, A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins, *Eur. J. Biochem.* **216**, 689–707 (1993).
- Gjerde, B. & Helle, O. Efficacy of toltrazuril in the prevention of coccidiosis in naturally infected lambs on pasture, *Acta Vet. Scand.* **27**, 124–137 (1986).
- Gjerde, B. & Helle, O. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril, *Vet. Parasitol.* **38**, 97–107 (1991).
- Gomez-Barrio, A. Bolas-Fernandez, F. & Martínez-Fernández, A. R. Trichinella pseudospiralis as a model for the "in vitro" screening of anthelmintics, *Wiadomości parazytologiczne* **32**, 303–311 (1986).
- Greif, G. Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril, *Parasitol. Res.* **86**, 787–790 (2000).
- Greif, G. Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril, *Parasitol. Res.* **86**, 787–790 (2000).
- Gullerova, M. Barta, A. & Lorkovic, Z. J. Rct1, a nuclear RNA recognition motif-containing cyclophilin, regulates phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain, *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3601–3611 (2007).
- Haberkorn, A. Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and perspectives, *Parasitol. Res.* **82**, 193–199 (1996).
- Haberkorn, A. Harder, A. & Greif, G. Milestones of protozoan research at Bayer, *Parasitol. Res.* **87**, 1060–1062 (2001).
- Hackstein, J. H. *et al.* Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a-D1 complex, the potential target for therapeutic triazines, *Parasitol. Res.* **81**, 207–216 (1995).
- Hackstein, J. H. *et al.* Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a-D1 complex, the potential target for therapeutic triazines, *Parasitol. Res.* **81**, 207–216 (1995).
- Hanouille, X. *et al.* Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B, *J. Biol. Chem.* **284**, 13589–13601 (2009).
- Harder, A. Greif, G. & Haberkorn, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: Giardia, Trichomonas and Entamoeba—current level of knowledge and outlook, *Parasitol. Res.* **87**, 785–786 (2001).
- Harder, A. Greif, G. & Haberkorn, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: Giardia, Trichomonas and Entamoeba—current level of knowledge and outlook, *Parasitol. Res.* **87**, 785–786 (2001).
- Harder, A. & Haberkorn, A. Possible mode of action of toltrazuril: studies on two Eimeria species and mammalian and Ascaris suum enzymes, *Parasitol. Res.* **76**, 8–12 (1989).
- Harding, M. W. Galat, A. Uehling, D. E. & Schreiber, S. L. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase, *Nature* **341**, 758–760 (1989).
- Henry, G. D. & Sykes, B. D. Detergent-solubilized M13 coat protein exists as an asymmetric dimer. Observation of individual monomers by ¹⁵N, ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Mol. Biol.* **212**, 11–14 (1990).
- Henry, G. D. & Sykes, B. D. Structure and dynamics of detergent-solubilized M13 coat protein (an integral membrane protein) determined by ¹³C and ¹⁵N nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biochem. Cell Biol.* **68**, 318–329 (1990).

- Henry, G. D. & Sykes, B. D. Methods to study membrane protein structure in solution, *Meth. Enzymol.* **239**, 515–535 (1994).
- High, K. P. Joiner, K. A. & Handschumacher, R. E. Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*, *J. Biol. Chem.* **269**, 9105–9112 (1994).
- Hoogendoorn, B. Toye, A. A. Bumstead, N. & Shirley, M. W. Mapping the genome of *Eimeria tenella*: use of a yeast artificial chromosome library as the basis for a physical map, *Parasitol. Res.* **84**, 13–16 (1998).
- Hosse, R. J. Krücken, J. Bierbaum, S. Greif, G. & Wunderlich, F. *Eimeria tenella*: genomic organization and expression of an 89kDa cyclophilin, *Exp. Parasitol.* **118**, 275–279 (2008).
- Hosse, R. J. Krücken, J. Bierbaum, S. Greif, G. & Wunderlich, F. *Eimeria tenella*: genomic organization and expression of an 89kDa cyclophilin, *Exp. Parasitol.* **118**, 275–279 (2008).
- Husi, H. & Zurini, M. G. Comparative binding studies of cyclophilins to cyclosporin A and derivatives by fluorescence measurements, *Anal. Biochem.* **222**, 251–255 (1994).
- Hutchison, C. A. DNA sequencing: bench to bedside and beyond, *Nucleic Acids Res.* **35**, 6227–6237 (2007).
- Jacobsson, K. Rosander, A. Bjerketorp, J. & Frykberg, L. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptors or other Exported Proteins, *Biological procedures online* **5**, 123–135 (2003).
- Janeway, C. Immunology, 5th Edition, Garland Science, New York (2001)
- Jenkins, M. C. A cDNA encoding a merozoite surface protein of the protozoan *Eimeria acervulina* contains tandem-repeated sequences, *Nucleic Acids Res.* **16**, 9863 (1988).
- Jenkins, J. R. Emergency avian surgery, *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice* **1**, 43-58, v-vi (1998).
- Jeurissen, S. H. Janse, E. M. Vermeulen, A. N. & Vervelde, L. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**, 231–238 (1996).
- Kallen, J. *et al.* Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy, *Nature* **353**, 276–279 (1991).
- Kengne-Wafo, S. *et al.* Risk factors for cyclosporin A nephrotoxicity in children with steroid-dependant nephrotic syndrome, *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **4**, 1409–1416 (2009).
- Klotz, C. Gehre, F. Lucius, R. & Pogonka, T. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunisation studies in chickens, *Vaccine* **25**, 6625–6634 (2007).
- Kocken, C. H. van der Wel, A. Rosenwirth, B. & Thomas, A. W. *Plasmodium vivax*: in vitro antiparasitic effect of cyclosporins, *Exp. Parasitol.* **84**, 439–443 (1996).
- Kofron, J. L. Kuzmic, P. Kishore, V. Colón-Bonilla, E. & Rich, D. H. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay, *Biochemistry* **30**, 6127–6134 (1991).
- Köhler, S. *et al.* A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites, *Science* **275**, 1485–1489 (1997).

- Koletsky, A. J. Harding, M. W. & Handschumacher, R. E. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues, *J. Immunol.* **137**, 1054–1059 (1986).
- Krampitz, H. E. & Haberkorn, A. Experimental treatment of Hepatozoon infections with the anticoccidial agent toltrazuril, *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* **35**, 131–137 (1988).
- Krücken, J. Greif, G. & Samson-Himmelstjerna, G. von. In silico analysis of the cyclophilin repertoire of apicomplexan parasites, *Parasit Vectors* **2**, 27 (2009).
- Krücken, J. *et al.* Excystation of *Eimeria tenella* sporozoites impaired by antibody recognizing gametocyte/oocyst antigens GAM22 and GAM56, *Eukaryotic Cell* **7**, 202–211 (2008).
- Kyhse-Andersen, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203–209 (1984).
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- Levine, N. D. Coccidiosis, *Annu. Rev. Microbiol.* **17**, 179–198 (1963).
- Li, J. *et al.* Discovering novel chemical inhibitors of human cyclophilin A: virtual screening, synthesis, and bioassay, *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2209–2224 (2006).
- Li, Y. Johnson, N. Capano, M. Edwards, M. & Crompton, M. Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis, *Biochem. J.* **383**, 101–109 (2004).
- Li, J. *et al.* Strategy for discovering chemical inhibitors of human cyclophilin a: focused library design, virtual screening, chemical synthesis and bioassay, *Journal of combinatorial chemistry* **8**, 326–337.
- Lillehoj, H. S. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis, *Int. J. Parasitol.* **28**, 1071–1081 (1998).
- Lillehoj, H. S. & Choi, K. D. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection, *Avian Dis.* **42**, 307–314.
- Lindsay, D. S. Rippey, N. S. & Blagburn, B. L. Treatment of acute *Toxoplasma gondii* infections in mice with diclazuril or a combination of diclazuril and pyrimethamine, *J. Parasitol.* **81**, 315–318 (1995).
- Lowenthal, J. W. *et al.* Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens, *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 617–622 (1998).
- Löscher, W. Ungemach, F. R. & Kroker, R. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 7th Edition, MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart (2006)
- Lu, K. P. Finn, G. Lee, T. H. & Nicholson, L. K. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer, *Nat. Chem. Biol.* **3**, 619–629 (2007).
- Luo, C. *et al.* Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 557–565 (2004).
- Manger, T. Wolff, H. & Rückert, R. I. [Diagnosis and surgical procedure in intestinal hemorrhage as a sequela of vascular abnormalities (angiodysplasia)], *Zentralblatt für Chirurgie* **116**, 785–794 (1991).

- Maruyama, T. & Furutani, M. Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases), *Front. Biosci.* **5**, D821-36 (2000).
- McCabe, R. E. Luft, B. J. & Remington, J. S. The effects of cyclosporine on *Toxoplasma gondii* in vivo and in vitro, *Transplantation* **41**, 611–615 (1986).
- McDougald, L. R. Fuller, L. & Mattiello, R. A survey of Coccidia on 43 poultry farms in Argentina, *Avian Dis.* **41**, 923–929.
- Mehlhorn, H. *Encyclopedia of Parasitology* 3rd Edition, Springer Verlag (2008)
- Ng, S. T. Sanusi Jangi, M. Shirley, M. W. Tomley, F. M. & Wan, K. L. Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*, *Exp. Parasitol.* **101**, 168–173.
- Nishimura, A. Morita, M. Nishimura, Y. & Sugino, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells, *Nucleic Acids Res.* **18**, 6169 (1990).
- Olofsson, B. & Bernardi, G. Organization of nucleotide sequences in the chicken genome, *Eur. J. Biochem.* **130**, 241–245 (1983).
- Pemberton, T. J. & Kay, J. E. Identification and Comparative Analysis of the Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*, *Comp. Funct. Genomics* **6**, 277–300 (2005).
- Pemberton, T. J. & Kay, J. E. The cyclophilin repertoire of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* **22**, 927–945 (2005).
- Peterson, M. R. *et al.* The three-dimensional structure of a *Plasmodium falciparum* cyclophilin in complex with the potent anti-malarial cyclosporin A, *J. Mol. Biol.* **298**, 123–133 (2000).
- Pfütz, G. *et al.* X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex, *Nature* **361**, 91–94 (1993).
- Polinski, C. The value of the white blood cell count and differential in the prediction of neonatal sepsis, *Neonatal network : NN* **15**, 13–23 (1996).
- Rasched, I. & Oberer, E. Ff coliphages: structural and functional relationships, *Microbiol. Rev.* **50**, 401–427 (1986).
- Reidt, U. *et al.* Crystal structure of a complex between human spliceosomal cyclophilin H and a U4/U6 snRNP-60K peptide, *J. Mol. Biol.* **331**, 45–56 (2003).
- Ricketts, A. P. & Pfefferkorn, E. R. *Toxoplasma gondii*: susceptibility and development of resistance to anticoccidial drugs in vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2358–2363 (1993).
- Rose, M. E. Immunity to *Eimeria* infections, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**, 333–343 (1987).
- Rose, M. E. & Hesketh, P. Infection with *Eimeria tenella*: modulation of lymphocyte blastogenesis by specific antigen, and evidence for immunodepression, *J. Protozool.* **31**, 549–553 (1984).
- Rose, M. E. & Hesketh, P. *Eimeria tenella*: localization of the sporozoites in the caecum of the domestic fowl, *Parasitology* **102 Pt 3**, 317–324 (1991).

- Rose, M. E. Hesketh, P. & Rennie, M. Coccidiosis: rapid depletion of circulating lymphocytes after challenge of immune chickens with parasite antigens, *Infect. Immun.* **45**, 166–171 (1984).
- Rose, M. E. Joysey, H. S. Hesketh, P. Grecis, R. K. & Wakelin, D. Mediation of immunity to *Eimeria vermiformis* in mice by L3T4+ T cells, *Infect. Immun.* **56**, 1760–1765 (1988).
- Rose, M. E. Lawn, A. M. & Millard, B. J. The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken, *Parasitology* **88 (Pt 2)**, 199–210 (1984).
- Rose, M. E. Lawn, A. M. & Millard, B. J. The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken, *Parasitology* **88 (Pt 2)**, 199–210 (1984).
- Rose, M. E. & Lee, D. L. Interactions in vitro between sporozoites of *Eimeria tenella* and host peritoneal exudate cells: electron microscopical observations, *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* **54**, 1–7 (1977).
- Rose, M. E. & Millard, B. J. Host specificity in eimerian coccidia: development of *Eimeria vermiformis* of the mouse, *Mus musculus*, in *Rattus norvegicus*, *Parasitology* **90 (Pt 3)**, 557–563 (1985).
- Rose, M. E. Owen, D. G. & Hesketh, P. Susceptibility to coccidiosis: effect of strain of mouse on reproduction of *Eimeria vermiformis*, *Parasitology* **88 (Pt 1)**, 45–54 (1984).
- Rose, M. E. Wakelin, D. Joysey, H. S. & Hesketh, P. Immunity to coccidiosis: adoptive transfer in NIH mice challenged with *Eimeria vermiformis*, *Parasite Immunol.* **10**, 59–69 (1988).
- Rose, M. E. Wakelin, D. & Hesketh, P. *Eimeria vermiformis*: differences in the course of primary infection can be correlated with lymphocyte responsiveness in the BALB/c and C57BL/6 mouse, *Mus musculus*, *Exp. Parasitol.* **71**, 276–283 (1990).
- Ruff, M. D. Important parasites in poultry production systems, *Vet. Parasitol.* **84**, 337–347 (1999).
- Ryan, R. Shirley, M. & Tomley, F. Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*, *Int. J. Parasitol.* **30**, 1493–1499 (2000).
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning, a laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbour Laboratories, NY (2001)
- Sanger, F. Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463–5467 (1977).
- Scherer, G. Renner, T. & Meger, M. Analysis and evaluation of trans,trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **717**, 179–199 (1998).
- Schito, M. L. & Barta, J. R. Nonspecific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice, *Infect. Immun.* **65**, 3165–3170 (1997).
- Scholz, C. *et al.* Prolyl isomerases do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds, *Biol. Chem.* **379**, 361–365 (1998).
- Schönbrunner, E. R. *et al.* Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species, *J. Biol. Chem.* **266**, 3630–3635 (1991).
- Shirley, M. W. The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation, *Parasitol. Res.* **80**, 366–373 (1994).

- Shirley, M. W. The genome of *Eimeria* spp. with special reference to *Eimeria tenella*--a coccidium from the chicken, *Int. J. Parasitol.* **30**, 485–493 (2000).
- Shirley, M. W. & Bellatti, M. A. Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*, *Res. Vet. Sci.* **44**, 25–28 (1988).
- Shirley, M. W. & Harvey, D. A. A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*, *Genome Res.* **10**, 1587–1593 (2000).
- Shirley, M. W. Smith, A. L. & Tomley, F. M. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination, *Adv. Parasitol.* **60**, 285–330 (2005).
- Smith, M. *et al.* DNA sequence at the C termini of the overlapping genes A and B in bacteriophage phi X174, *Nature* **265**, 702–705 (1977).
- Smith, A. L. & Hayday, A. C. Genetic dissection of primary and secondary responses to a widespread natural pathogen of the gut, *Eimeria vermiformis*, *Infect. Immun.* **68**, 6273–6280 (2000).
- Steinfelder, S. Lucius, R. Greif, G. & Pogonka, T. Treatment of mice with the anticoccidial drug Toltrazuril does not interfere with the development of a specific cellular intestinal immune response to *Eimeria falciformis*, *Parasitol. Res.* **97**, 458–465 (2005).
- Takahashi, N. Hayano, T. & Suzuki, M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin, *Nature* **337**, 473–475 (1989).
- Tatusova, T. A. & Madden, T. L. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences, *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 247–250 (1999).
- Thommen-Scott, K. Antimalarial activity of cyclosporin A, *Agents Actions* **11**, 770–773 (1981).
- Tomley, F. M. Clarke, L. E. Kawazoe, U. Dijkema, R. & Kok, J. J. Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 277–288 (1991).
- Vermeulen, A. N. Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium, *Int. J. Parasitol.* **28**, 1121–1130 (1998).
- Vermeulen, A. N. Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium, *Int. J. Parasitol.* **28**, 1121–1130 (1998).
- Vermeulen, A. N. Schaap, D. C. & Schetters, T. P. Control of coccidiosis in chickens by vaccination, *Vet. Parasitol.* **100**, 13–20 (2001).
- Vervelde, L. & Jeurissen, S. H. The role of intra-epithelial and lamina propria leucocytes during infection with *Eimeria tenella*, *Adv. Exp. Med. Biol.* **371B**, 953–958 (1995).
- Vervelde, L. Vermeulen, A. N. & Jeurissen, S. H. *Eimeria tenella*: sporozoites rarely enter leukocytes in the cecal epithelium of the chicken (*Gallus domesticus*), *Exp. Parasitol.* **81**, 29–38 (1995).
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 615–619 (1979).
- Waldmeier, P. C. Zimmermann, K. Qian, T. Tintelnot-Blomley, M. & Lemasters, J. J. Cyclophilin D as a drug target, *Curr. Med. Chem.* **10**, 1485–1506 (2003).
- Wan, K. L. *et al.* A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing, *Int. J. Parasitol.* **29**, 1885–1892 (1999).

- Wang, P. & Heitman, J. The cyclophilins, *Genome Biol.* **6**, 226 (2005).
- Wastling, J. M. MacKenzie, K. & Chappell, L. H. Effects of cyclosporin A on the morphology and tegumentary ultrastructure of *Hymenolepis microstoma* in vivo, *Parasitology* **104 (Pt 3)**, 531–538 (1992).
- Williams, R. B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity, *Avian Pathol.* **34**, 159–180 (2005).
- Williams, K. A. *et al.* Packing of coat protein amphipathic and transmembrane helices in filamentous bacteriophage M13: role of small residues in protein oligomerization, *J. Mol. Biol.* **252**, 6–14 (1995).
- Yang, Y. *et al.* Structure-based discovery of a family of synthetic cyclophilin inhibitors showing a cyclosporin-A phenotype in *Caenorhabditis elegans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 1013–1019 (2007).
- Yun, C. H. Lillehoj, H. S. & Lillehoj, E. P. Intestinal immune responses to coccidiosis, *Dev. Comp. Immunol.* **24**, 303–324.
- Yun, C. H. Lillehoj, H. S. & Choi, K. D. Chicken IFN-gamma monoclonal antibodies and their application in enzyme-linked immunosorbent assay, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **73**, 297–308 (2000).
- Yun, C. H. Lillehoj, H. S. & Choi, K. D. *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes, *Infect. Immun.* **68**, 1282–1288 (2000).
- Zander, K. *et al.* Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression, *J. Biol. Chem.* **278**, 43202–43213 (2003)

7. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADI	„acceptable daily intake“
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartam
Bis	Bisacrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid
BLAST	„basic local alignment search tool“
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD-Scan	„conserved domains scan“
cDNA	komplementäre DNA
cfu	„colony forming units“
CsA	Cyclosporin A
<i>Cp</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Cyp	Cyclophilin
d	Tage
Da	Dalton
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ECL	,enhanced luminol-based chemiluminescent‘
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Enterokinase
ELISA	,enzyme linked immunosorbent assay‘
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	,expression sequence tags‘
<i>Et</i>	<i>Eimeria tenella</i>
EtBr	Ethidiumbromid
F1-Generation	1. Tochtergeneration
FKBP	Fk506- Bindungsprotein
×g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikogramm
GALT	,gut associated lymphatic tissue‘
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1piperazinyl]-ethansulfonsäure
His ₆ -tag	Hexahistidin-tag
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Reversed Phase ‘High pressure liquid chromatographie‘
<i>h.p.i.</i>	Stunden nach Infektion
HPR	Meerrettich-Peroxidase
IB	,inclusion bodies‘
IC ₅₀	Inhibitor Konzentration um 50% Inhibition zu erreichen
i.d.R.	in der Regel
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN-γ	Interferon gamma
IgA,Y,M	Immunglobuline A, Y und M
IL-2	Interleukin-2
IMAC	‘Immobilized Metall Affinity Chromatography‘
IPTG	Isopropyl-β,D-thiogalactopyranoside
IR	Infrarot
IRD-800	Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff
kb	Kilobasen
<i>k</i>	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
kD	Gleichgewichtsdissoziationskonstante

kDa	Kilodalton
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
Lys	Lysin
m, cm, mm, nm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Nanometer
M, mM, μ M, nM, pM	Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikomolar
mA	Milliampère
MCP	Methylcarboxyponazuril
min	Minuten
mJ	Mega-Joule
mRNA	‘messenger’ Ribonucleinsäure
MW	Molekulargewicht
MWCO	‘molecular weight cut-off’
NCBI	‘National Center of Biotechnology Information’
<i>Nc</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NFAT	‘nuclear factor of activated T-cells’
NGM	‘nematode growth media’
Ni-TED	Ni^{2+} - Triscarboxymethyl-Ethylendiamin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	Kernspinresonanz
OD nm	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
OECD	organisation for economic cooperation and development
ORF	offenes Leseraster
OS	Optisches Spezialglas
p. a.	<i>per analysis</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>p.i.</i>	post infectum
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	‘plaque forming units’
pH	pH-Wert; $-\log[\text{H}^+]$
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
Pro	Prolin
PV	Parasitophore Vakuole
QS	Quarzglas

RACE	'rapid amplification of cDNA ends'
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Inferferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit revers transkribierter DNA als Template
SAP	Alkalische Schrimp-Phosphatase
SARS	'Severe Acute Respiratory Syndrome'
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler
SEM	Standardabweichung
sec oder s	Sekunde
SP	Signalpeptid
Succ-AAPF-pNA	Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>para</i> -Nitroanilid
<i>Ta</i>	<i>Theileria anulata</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluorethanol
<i>Tg</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
T_m	Schmelztemperatur
TPR-Region	Tetratricopeptid-Region
Trp	Tryptophan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
U	Units
UV	ultraviolettes Licht
üN	über Nacht
V	Volt
v/v	'volume per volume'
vgl.	vergleiche
w/v	'weight per volume'
WFB	,wall forming bodies'
z.B.	zum Beispiel
∅	Durchmesser

8. Anhang

8.1 Kinetik von chemischen Reaktionen zweiter Ordnung

Die Bildung eines chemischen Komplexes zwischen zwei Bindungspartnern wird allgemein durch die Reaktionsgleichung



beschrieben. Es handelt sich in diesem Fall um eine Reaktion zweiter Ordnung, bei der die Geschwindigkeit der Komplexbildung von der Konzentration der beiden Reaktionspartner A und B und der Geschwindigkeit der Hin- beziehungsweise Rückreaktion abhängt. Je größer die Konzentrationen der beiden Reaktionspartner, desto höher die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens der Edukte und desto schneller die Bildung eines Komplexes.

Die Geschwindigkeit k_a einer solchen Reaktion kann demnach durch die Formel

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] \quad (7.2)$$

bestimmt werden.

Integriert lautet die Formel:

$$[A]_t = \frac{1}{k_a \cdot t + \frac{1}{[A]_0}} \quad (7.3)$$

mit $[A]_t$ als die Konzentration A zu einem Zeitpunkt t und $[A]_0$ als Anfangskonzentration an A.

k_a beschreibt die Geschwindigkeit der Hinreaktion, also der Bildung eines Komplexes. Analog dazu lässt sich natürlich auch ein k_r -Wert für die Rückreaktion, also den Zerfall eines Komplexes berechnen.

8.2 Berechnung von K_D -Werten

In einem dynamischen chemischen Gleichgewichtszustand lässt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D über das Massenwirkungsgesetz bestimmen. Dabei wird das Verhältnis der Hinreaktion zur Rückreaktion, also das Verhältnis der Edukt- zur Produktkonzentrationen im Gleichgewichtszustand gebildet.

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad [M] \quad (7.4)$$

Solche ermittelte K_D -Werte sind ein Maß für die Stärke einer Bindung zwischen zwei Bindungspartnern. Im Gegenzug kann selbstverständlich auch ein K_A -Wert, also eine

Gleichgewichtsassoziationskonstante berechnet werden, die letztlich aber den selben Informationswert besitzt:

$$K_A = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} \quad [M^{-1}] \quad (7.5)$$

,beziehungsweise

$$K_A = \frac{1}{K_D} \quad [M^{-1}] \quad (7.6)$$

8.3 Berechnung von inhibitorischen Effekten

Um Aussagen über die Stärke eines inhibitorischen Effektes zu machen, ist das Heranziehen eines K_i -Wertes sinnvoll. Der K_i -Wert ist eine Gleichgewichtskonstante die angibt, welcher Anteil eines Inhibitors an einen Rezeptor gebunden ist. Analog zur K_A - und K_D -Berechnung berechnet sich dieser Wert wie folgt:

$$K_i = \frac{[Inhibitor] \cdot [Protein]}{[Inhibitor-Protein-Komplex]} \quad [M] \quad (7.7)$$

Ein weiterer wichtiger Wert zur Bestimmung einer Inhibitionskinetik ist der IC_{50} -Wert. Dieser Wert gibt an, bei annähernd welcher Konzentration gerade 50% der Enzymaktivität durch einen Inhibitor gehemmt wird. Man kann den Wert graphisch durch Hinzufügen einer Geraden, welche die Kurve bei 50% schneidet, ablesen. Bessere Ergebnisse erzielt man bei diesem Verfahren durch Logarithmieren der Werte, so dass sich in einem halblogarithmischen Koordinatensystem eine Gerade ergibt.

Mathematisch kann man den IC_{50} -Wert auch wie folgt berechnen:

$$EXP \left\{ \left[\log(X_1) + \frac{(Y_1 - 0,5)}{(Y_1 - Y_2)} \cdot [\log(X_1) - \log(X_2)] \right] \cdot \ln(10) \right\} \quad (7.8)$$

,wobei gilt:

Y_1 = kleinster Hemmwert größer 50%; X_1 = entsprechende Konzentration an Inhibitor;

Y_2 = größter Hemmwert kleiner 50%; X_2 = entsprechende Konzentration an Inhibitor.

Die IC_{50} -Berechnung ist auch direkt als Umrechnung aus dem K_i -Wert möglich, so fern man Informationen über die Michaelis-Menten-Konstante K_m besitzt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Substrat]}{K_m}} \quad (7.9)$$

9. Danksagungen

Die Räumlichkeiten der Abteilung für Molekulare Parasitologie werden für mich immer ein Ort der Erinnerungen bleiben. Erinnerungen an Zeiten, in denen gelacht und Erfolge gefeiert wurden, doch auch Erinnerungen an Momente des Misserfolgs und des Haderns. In dieser Zeit gab es eine Reihe von Wegbegleitern, die alle auf ihre Weise dazu beigetragen haben, dass ich zurückblicken und schon jetzt anfangen kann, diese Zeit zu vermissen und bereit bin für das nächste Kapitel...

Ich danke aus tiefstem Herzen...

...Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich für das spannende Thema, die vielen interessanten Diskussionen, dafür dass er sich auf so viele meiner Ideen einließ und für seine stete Unterstützung.

...Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die freundliche Übernahme des Koreferates.

...Herrn Dr. Jürgen Krücken, der meine Arbeit im Anfangsstadium mit Ratschlägen begleitet hat.

...Frau Dr. Gisela Greif (Bayer Health Care, Monheim) für die interessante Zusammenarbeit.

...Herrn Hans-Peter Schmitt-Wrede, der nicht nur ein äußerst kompetenter Molekularbiologe ist, sondern auch in vielen anderen Lebenslagen und Zukunftsfragen immer einen hilfreichen Tipp für mich parat hatte.

...Herrn Predrag „Piet“ Marinowski, der mit seiner unnachahmlichen Art, seiner Engelsgeduld und seinem fundierten Computer-Fachwissen wie wohl kein Zweiter dazu beigetragen hat, die Zeit im Institut für seine „Kinder“ zu einer Unvergesslichen zu machen.

...Frau Andrea Grundwald, die ihrer unfreiwilligen Rolle als gute Fee des Instituts nahezu immer mit einem Lächeln begegnete.

...der guten Frau Seefeld, die über drei Jahre lang ohne auch nur einmal zu Murren meine klebten, wasserfest beschrifteten und vollgesauten Reagenzgläser und Flaschen gespült hat.

...den tollsten Kollegen der Welt: Danke an den Jugo, Krille, Kristina, Maddin, Paulinchen, Figen, Klaus, Jules, Cleo, dem Wahnsinnigen, die ´terrible twins´ Nicki und Andi, Charlie, den Gaus, Steffi, de Toni, Karo, Marina, Maga, dem Heuler, Heike, Bam-Lee, die Alex, Lisa und Anna.

...den besten Freunden die man sich nur wünschen kann! Vor allem ein dickes Danke an Silvia, Jenny, Moni, Coriii, Oli, André, Sven, Daniel, Florian und deren Partner.

Euch alle meine Freunde nennen zu können zählt weitaus mehr als alle Dokortitel der Welt!

...meiner Familie, dass sie mir mein Studium ermöglicht hat. Danke an meine Mutter und Paul, meinen Vater und Marleen, meine Geschwister Wolfgang, Angelika, Silke und Frank und deren Partner. Ohne Euch hätte ich das nie geschafft.

...meiner lieben Freundin Angélique, die mir in all der Zeit wohl die wichtigste Stütze war und meine pausenlose Stresserei bis heute tapfer erträgt.

10. Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten- oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 24.11.2009

Stefan Bierbaum

11. Lebenslauf

• PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname: Stefan Bierbaum
 Geburtsdaten: 14.02.1981
 Geburtsort: Mönchengladbach
 Staatsangehörigkeit: deutsch

• SCHULBILDUNG

August 1991 – Juni 2000 Gymnasium Neuwerk, Mönchengladbach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

• WEHRDIENST

Juli 2000 – April 2001 Wehrdienst am Militärflughafen Nörvenich, Kerpen

• STUDIUM

Oktober 2001 – Juni 2006 Studium der Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
 Abteilung für Molekulare Parasitologie
Abschluss: Diplom-Biologe

Oktober 2006 – Heute Promotionsstudium zur Erlangung des Doktorgrades

Juli 2008 – Heute Postgradualstudium zum Fachökotoxikologen
 Abschluss voraussichtlich 1. / 2. Quartal 2010

• BETEILIGUNG AN PUBLIKATIONEN

- „*Eimeria tenella*: Genomic organization and expression of an 89 kDa cyclophilin“ (Experimental Parasitology, 2007)
- „Excystation of *Eimeria tenella* Sporozoites Impaired by Antibody Recognizing Gametocyte/Oocyst Antigens GAM22 and GAM56“ (Eukaryotic Cell, 2008)
- „The Cyclophilin EtCyp20.5 as novel target for toltrazuril in *Eimeria tenella*“ (eingereicht beim Journal of Biological Chemistry, 2009)