

**Identifizierung und Charakterisierung von zwei neuen  
Proteinen aus *Eimeria tenella* als Targets für  
Vakzinierung und Antikokzidia**

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

vorgelegt von  
**Ralf J. Hosse**  
aus Kassel

Düsseldorf  
2004

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Wunderlich

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. A. Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2004

**Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.**



# Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Professor Dr. F. Wunderlich betreut und entstand im Rahmen einer Kooperation mit der Bayer AG Leverkusen (Bayer Health Care, AH-RD-PARA). Die Laborarbeiten wurden in der Abteilung für Molekulare Parasitologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt, die tierexperimentellen Arbeiten im Landwirtschaftszentrum der Bayer AG in Monheim.

Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich danke ich sehr für seine engagierte Betreuung und Großzügigkeit.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. A. Harder (Bayer Health Care, AH-FE-PARA) möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Frau Dr. Gisela Greif (Bayer Health Care, AH-RD-PARA) danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und ihre stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. Jürgen Krücken und Herrn Dr. Hans-Peter Schmitt-Wrede möchte ich mich sehr herzlich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und ihre enorme Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Predrag Marinovski dankt an dieser Stelle jeder für seine Unterstützung am PC – ich auch – aber darüberhinaus vor allem dafür, dass die Zeit der Doktorarbeit durch ihn sehr viel Spaß gemacht hat.

Frau Nadine Tillmanns danke ich für ihre freundschaftliche Unterstützung und dafür, dass sie meiner Zeit in Düsseldorf so viele entscheidend positive Wendungen gegeben hat. Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Herrn Heinz Tillmanns sehr herzlich.

Herrn Markus Epe, Herrn Dr. Olaf Stamm, Herrn Dr. Steffen Tschuschke, Herrn Priv. Doz. Dr. Peter Benten, Frau Andrea Grunwald, Frau Regina Schrötel und Frau Nina Falkenroth sowie allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Parasitologie danke ich herzlich für das freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsklima.

Frau Margitta Meinerzhagen, Frau Kerstin Jankowski, Herrn Carsten Angenendt und Herrn Manfred Schmitz von der Bayer AG danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit in allen logistischen Belangen, von B wie Bestellungen bis T wie Tierhaltung.

Herrn Prof. Dr. R. Entzeroth, TU Dresden, und Herrn Dr. Aimdip Mouafo Noutussi danke ich für die Überlassung der monoklonalen Antikörper.

Meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglicht haben, und meinem Bruder Kai danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und unseren familiären Zusammenhalt.

Für ihre Liebe und ihr Verständnis danke ich meiner Freundin Martina Burkhardt von ganzem Herzen:  
,Nessuna mai ancora mi ha fatto l'effetto che fai!'



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Eimeria tenella</i> – Erreger der Geflügelkokzidiose	1
1.2	Genom und Gene	4
1.3	Pathogenese und wirtschaftliche Bedeutung	5
1.4	Chemotherapeutika und Vakzinierung	6
1.5	DNA-Immunisierung von Geflügel	8
1.6	Toltrazuril wirkt gegen intrazelluläre Stadien von <i>Eimeria</i>	10
1.7	Zielsetzung	10
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits	13
2.2	Lösungen und Puffer	14
2.3	Versuchstiere und <i>E. tenella</i> -Stamm	15
2.4	Bakterienstämme und Vektoren	16
2.4.1	Bakterienstämme	16
2.4.2	Vektoren	16
2.5	Isolation von genomischer DNA aus <i>E. tenella</i>	16
2.6	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>E. tenella</i> und Kükenblinddarm	17
2.7	Präparation von Plasmid-DNA	17
2.8	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	17
2.9	Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA	18
2.10	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	18
2.11	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	18
2.12	Konstruktion einer genomischen Expressionsbank von <i>E. tenella</i>	18
2.12.1	Fragmentierung genomischer DNA und ‚blunt-end‘ Reaktion	18
2.12.2	Dephosphorylierung von pG8SAET	19
2.12.3	Ligation von DNA	20
2.12.4	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	20
2.13	Phagen-Display und Phagen-Panning	20
2.13.1	Präparation und Aufreinigung rekombinanter Phagemide	20
2.13.2	Koppelung von ‚target‘-Molekülen an DYNABEADS™	20
2.13.3	Bindereaktion, Waschschritte und Elution	21
2.13.4	Titerbestimmung und Reinfektion	23
2.13.5	Detektion E-,tag‘-exprimierender Klone	23

<b>2.14</b>	<b>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>24</b>
2.14.1	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	24
2.14.2	RT-PCR	24
2.14.3	5'- und 3'-RACE-PCR	25
<b>2.15</b>	<b>Klonierung von PCR-Produkten</b>	<b>25</b>
<b>2.16</b>	<b>DNA-Sequenzanalyse</b>	<b>26</b>
2.16.1	5'-IRD-800-gekoppelte Primer	26
2.16.2	Sequenzierung mit Thermo Sequenase	27
2.16.3	Computeranalyse von Sequenzdaten	27
<b>2.17</b>	<b>Herstellung von Proteinextrakten aus <i>E. coli</i></b>	<b>28</b>
<b>2.18</b>	<b>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Western Blot</b>	<b>28</b>
2.18.1	SDS-PAGE	28
2.18.2	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	28
2.18.3	Immundetektion	28
<b>2.19</b>	<b>Radioaktive Markierung von DNA</b>	<b>29</b>
<b>2.20</b>	<b>Southern Blot: DNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierung</b>	<b>29</b>
<b>2.21</b>	<b>Elektrophorese von RNA und Northern Blot</b>	<b>30</b>
<b>2.22</b>	<b>Lokalisation von Antigenen des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> in <i>E. tenella</i></b>	<b>31</b>
2.22.1	Immunfluoreszenz	31
2.22.2	Konfokale Laserscanning- und Fluoreszenzmikroskopie	32
<b>2.23</b>	<b>Excystierung von Sporozoiten</b>	<b>32</b>
<b>2.24</b>	<b>DNA-Immunisierung mit <i>Etos22</i></b>	<b>33</b>
2.24.1	Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten	33
2.24.2	ELISA zum Nachweis <i>EtOS22</i> -spezifischem IgG	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Genomische Expressionsbank von <i>E. tenella</i></b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>)</b>	<b>38</b>
3.2.1	Zelluläre Lokalisation der Antigene	39
3.2.2	Der mAk E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> inhibiert die Excystierung	41
<b>3.3</b>	<b>Phagen-Panning gegen den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub></b>	<b>42</b>
3.3.1	Anreicherung von Klonen, die vom mAk E <sub>2</sub> E <sub>5</sub> erkannt werden	43
<b>3.4</b>	<b>Das <i>E. tenella</i> Oocysten Sporocysten Protein (<i>EtOS22</i>)</b>	<b>43</b>
3.4.1	Vollständige Sequenz der <i>Etos22</i> -cDNA	43
3.4.2	Charakterisierung des <i>EtOS22</i> -Proteins	45
<b>3.5</b>	<b>Expressionsmuster von <i>EtOS22</i> in <i>E. tenella</i></b>	<b>46</b>

---

<b>3.6</b>	<b>Genomische Organisation des <i>Etos22</i>-Gens</b>	<b>48</b>
<b>3.7</b>	<b>DNA-Immunisierung mit <i>Etos22</i></b>	<b>51</b>
<b>3.8</b>	<b>Phagen-Panning gegen Toltrazuril (Baycox®)</b>	<b>54</b>
3.8.1	Selektion eines 502 bp Fragments	54
3.8.2	Nachweis des Transkripts des 502 bp Fragments	56
3.8.3	Vollständige cDNA eines Cyclophilins aus <i>Eimeria</i> ( <i>EtCYP89</i> )	57
<b>3.9</b>	<b>Charakterisierung des <i>EtCYP89</i></b>	<b>59</b>
<b>3.10</b>	<b>Genomische Organisation des <i>EtCYP89</i>-Gens</b>	<b>61</b>
<b>3.11</b>	<b>Vergleich des <i>EtCYP89</i> mit Cyclophilinen anderer Organismen</b>	<b>62</b>
<b>3.12</b>	<b>Toltrazuril und <i>EtCYP89</i></b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1	Das Antigen <i>EtOS22</i>	70
4.2	<i>EtCYP89</i> – ein Cyclophilin-artiges Protein aus <i>Eimeria</i>	75
4.3	Vergleich des <i>EtCYP89</i> mit Cyclophilinen aus anderen taxonomischen Gruppen	78
4.4	<i>EtCYP89</i> und <i>EtOS22</i> – neue Ansätze zur Therapie von Kokzidiose	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>103</b>



# 1 Einleitung

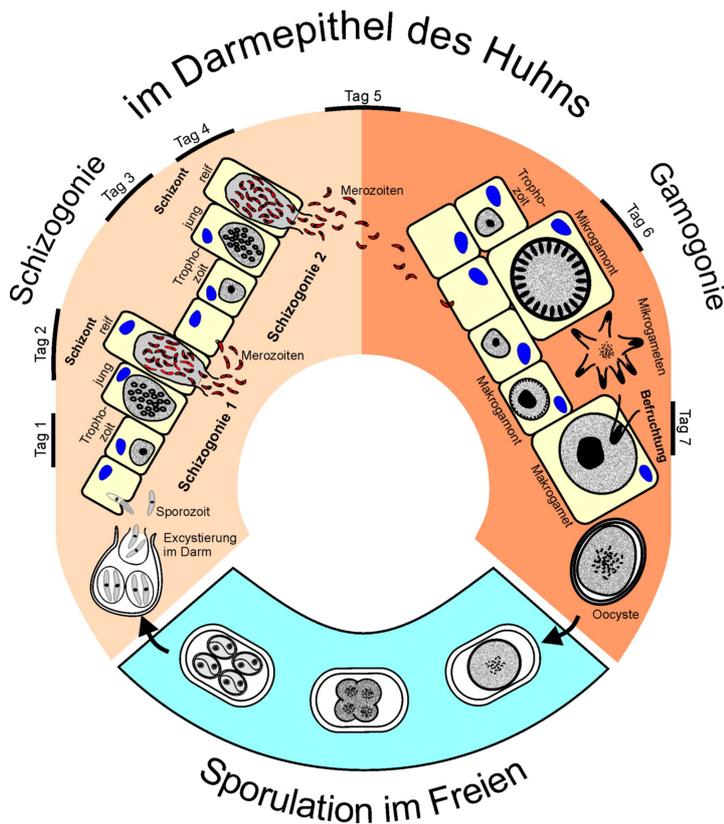
## 1.1 *Eimeria tenella* – Erreger der Geflügelkokzidiose

*Eimeria tenella* ist der Erreger der Geflügelkokzidiose, einer Parasitose, die mit der intensiven Bodenhaltung von Hühnern weltweit zu einem ökonomisch bedeutsamen Problem wurde (Biggs, 1982). Neben den stark pathogenen Arten *Eimeria tenella* und *Eimeria necatrix* parasitieren fünf weitere Vertreter der Gattung *Eimeria* im Haushuhn (*Gallus gallus*): *Eimeria maxima*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria mitis*, *Eimeria acervulina* und *Eimeria praecox* (Shirley, 1986; McDougald and Reid, 1997). Die Reihenfolge entspricht ihrer abnehmenden Pathogenität. Bei allen handelt es sich um obligat intrazelluläre, streng wirtsspezifische Protozoen, deren komplizierter Lebenszyklus in der Abfolge von geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Entwicklungsstadien besteht. Verschiedene Arten parasitieren unterschiedliche Regionen im Darmgewebe des Haushuhns, wobei nur *E. tenella* schwere Läsionen im Epithel und der Submucosa der paarigen Blinddärme (Caeca) verursacht. Zusammen mit humanpathogenen Krankheitserregern wie *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* und *Cryptosporidium parvum* sowie den tierpathogenen Gattungen *Sarcocystis*, *Neospora*, *Babesia* und *Theileria* gehören sie nach der systematischen Einordnung der Protozoen (Levine *et al.*, 1980) zum Stamm der Apicomplexa. Wichtigstes Merkmal sämtlicher Vertreter dieses Stamms ist der Apikalkomplex am vorderen Zellpol der Infektionsformen, der Spor- und Merozoiten. Dieser dient der Invasion der Wirtszellen und besteht aus drei sekretorisch tätigen Organellen, den Rhoptrien, Mikronemen und den dichten Granula, sowie dem strukturbildenden Conoid mit Polringen und subpelliculären Mikrotubuli.

Der Verlauf der Infektion wird maßgeblich durch die Anzahl an sporulierten Oocysten bestimmt, die das Tier bei der Nahrungssuche aufnimmt. An dieser Stelle beginnt der einwirtige (monoxene) Entwicklungszyklus des Parasiten (**Abb. 1.1**). Nach mechanischer Bearbeitung der rigiden Oocystenwand im Kaumagen des Huhns kommt es im Dünndarm unter dem Einfluß von Trypsin und Gallensalzen zur Excystierung der Sporozoiten am sogenannten Stiedakörper der Sporocysten. Im Fall von *E. tenella* handelt es sich dabei pro Oocyste um jeweils zwei Sporozoiten aus insgesamt vier Sporocysten. Für eine kurze Zeit können einige Sporozoiten auch in den Blutkreislauf übergehen (Rose and Hesketh, 1991), die Bedeutung dieses Phänomens ist jedoch unklar (Vervelde *et al.*, 1995). Im allgemeinen dringen die motilen Sporozoiten jedoch in die Enterocyten des Caecumepithels ein und werden von intraepithelialen Lymphocyten aufgenommen, die das Epithel verlassen und sie durch die Lamina Propria zu den Lieberkühn-Krypten transportieren (Lawn and Rose, 1982; Rose *et al.*, 1984). In den Enterocyten der Krypten bilden sie eine parasitophore Vakuole aus, welche sie vor lysosomaler Verdauung schützt. In ihr findet die Schizogonie (Merogonie), die asexuelle Vermehrung des Parasiten, statt. Aus den vielkernigen Schizonten schnüren sich rosettenartig bewegliche Merozoiten ab, die nach ihrer Freisetzung in bis zu drei Schizontengenerationen auch die Submucosa infizieren und so während der akuten Infektion zu großflächigen Darmläsionen führen. Auf diese Schizogoniezyklen folgt die geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie), wobei sich Merozoiten zu Mikro- oder Makrogamonten differenzieren, die ebenfalls in parasitophoren Vakuolen heranreifen. Während sich aus dem Mikrogamonten zahlreiche begeißelte männliche Gameten entwickeln, findet

## Einleitung

man im reifen Makrogamonten sogenannte ‚wall forming bodies‘ (WF), die nach der Befruchtung in der Peripherie der Zelle fusionieren und die Oocystenwand aufbauen. Im Fall von *E. tenella* beträgt die durchschnittliche Präpatenzzeit bis zum Ausscheiden der ersten unsporulierten Oocysten ca. 6 Tage bzw. 142 h (McDonald and Shirley, 1987), die Sporulation der Oocysten im Freien dauert mindestens 18 h und ist abhängig von den äußeren Bedingungen wie z. B. Sauerstoffgehalt, Feuchtigkeit und Temperatur. Die nun infektiösen Oocysten sind enorm widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse (Eschenbacher *et al.*, 1996; Jeurissen, 1996; Yun, 2000) und können sich bei intensiver Bodenhaltung des Geflügels zu Milliarden anreichern (Shirley, 2000).



**Abbildung 1.1 Entwicklungszyklus von *Eimeria tenella*.** Der monoxene Entwicklungszyklus dieses intrazellulären Parasiten gliedert sich im Darmepithel des Haushuhns in mehrere Zyklen ungeschlechtlicher Vermehrung (Schizogonie) und eine geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie). Der befruchtete Makrogamet entwickelt sich zur Oocyste, dem einzigen diploiden Stadium des Parasiten, und wird mit dem Kot abgegeben. Die durch ihre Schale sehr widerstandsfähigen Oocysten sporulieren unter geeigneten Bedingungen im Freien und entlassen bei erneuter Aufnahme durch den Wirt jeweils 8 infektiöse Sporozoiten (nach Greif, 2000).

Es ist sehr schwierig, den kompletten Entwicklungszyklus von *E. tenella* *in vitro* in kultivierten Wirtszellen ablaufen zu lassen. Zwar gibt es Publikationen die vom Erreichen der Gamogonie und der Ausbildung von Oocysten berichten nachdem kultivierte Nierenzellen aus Küken mit Sporozoiten infiziert wurden (Strout and Oullette, 1969; 1970; Doran, 1971; Doran and Augustine, 1973). In der Regel beschränkt sich der Zyklus des Parasiten jedoch auf die Schizogonie und der Übergang zum sexuellen Entwicklungsabschnitt bleibt aus. Long (1965; 1966) konnten jedoch zeigen, dass der ‚Houghton‘ Stamm von *E. tenella* seinen Entwicklungszyklus in den chorioallantoischen Membranen (CAM) des sich entwickelnden Hühnerembryos vollenden kann. Die ständig wiederholte Passage des Parasiten in Hühnerembryos führte zu einer sogenannten ‚embryo-adapted‘ (TA) Linie (Long, 1972), welche sich durch sehr kleine Schizonten der 2. Generation auszeichnet und so vom invasiven Phänotyp der Elterngeneration abweicht. Wird die TA-Linie dann zur Reinfektion von Hühnerküken verwendet, so zeigt sich die Reproduktion und Pathogenität dieser Parasiten signifikant eingeschränkt, was sie zu potentiellen Vakzinierungskandidaten machte. Neben der TA-Linie des

Parasiten ist noch die ‚precocious‘ (HP)-Linie zu nennen: Bei ständig wiederholten Passagen von *E. tenella* in Hühnern wurden jeweils die ersten ausgeschiedenen Oocysten für die erneute Infektion verwendet (McDonald *et al.*, 1986a, b; McDonald and Shirley, 1987) was zu einer deutlich verkürzten Präpatenzzeit von nur noch 109 h führte. Auch die HP-Linie weist kleinere Schizonten der 2. Generation auf, die zudem weniger Merozoiten enthalten, weniger Oocysten produzieren und somit sehr viel schwächer pathogen sind. Diese Eigenschaften macht man sich mittlerweile weltweit mit dem Lebendimpfstoff Paracox<sup>®</sup> (Shering Plough, UK) zunutze.

Die genaue, schnelle und kostengünstige Diagnose von Infektionen mit *Eimeria* spp. ist für die Prophylaxe und Behandlung von größter Bedeutung. Die derzeit routinemäßig angewandte Identifikation der sieben *Eimeria*-Arten im Huhn erfolgt mikroskopisch anhand der Morphologie der Oocysten, der Wirtsspezifität, der Pathologie der Läsionen im Darm und der Präpatenzzeit (Long and Reid, 1982). Daneben gibt es die biochemische Charakterisierung über Isoenzymmuster, die auf spezies-spezifischem Laufverhalten bestimmter Enzyme in der Elektrophorese beruht. Hierbei dienen zumeist Enzyme des Zuckerstoffwechsels (u.a. Glucose-Phosphat-Isomerase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglucomutase) als genetische Marker zur Erstellung eines Zymogramms (Shirley, 1975; Shirley and Lee, 1977; Shirley and Rollinson, 1979; Johnston and Fernando, 1997). Es zeigt sich, dass durch die herkömmliche morphologisch-deskriptive Vorgehensweise als auch die biochemischen Methoden eine genaue Art-Differenzierung nur unzureichend oder nur teilweise erzielt werden kann. Eine Charakterisierung der Art auf genetischer Ebene ist daher wünschenswert. Auf diesem Gebiet liegen bisher nur sehr wenige sich widersprechende Untersuchungsergebnisse vor (Comes *et al.*, 1996). Die biologische Verschiedenheit von *Eimeria*-Arten lässt vermuten, dass genetische Unterschiede in Form von DNA-Polymorphismen in den unterschiedlichen Arten vorliegen. Polymorphismen können durch Basenveränderungen (Deletion, Insertion) oder durch Chromosomenumlagerungen entstehen. In der ursprünglich für die Verwandtschaftsanalyse entwickelten Methode des DNA-Fingerprintings wird die variable DNA mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen zerschnitten, mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden hybridisiert und nach Gelelektrophorese und Southern Blot in der Autoradiographie sichtbar gemacht. Als geeignete Sonden haben sich dabei B18 (Shirley, 1994) und DNA für 5S rRNA (Shirley, 1997) erwiesen. Mit Hilfe des so entstandenen genetischen Fingerabdrucks können Art und Stamm von Organismen eindeutig unterschieden werden. Eine Vereinfachung dieses Ansatzes bietet die RAPD-PCR-Methode (Random Amplification of Polymorphic DNA by PCR) (MacPherson and Gajadhar, 1993; Procunier *et al.*, 1993; Shirley and Bumstead, 1994; Cere *et al.*, 1995). Die Methode basiert auf der Amplifikation genomischer DNA mit Primern einer zufälligen Nukleotidsequenz in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Amplifizierte DNA-Sequenzen (RAPD-PCR Marker) ergeben nach Trennung auf einem Agarosegel und Färbung mit Ethidium-Bromid ein spezifisches Bandenmuster, durch das sich für verschiedene Chemotherapeutika selbst resistente von sensitiven *Eimeria*-Stämmen differenzieren lassen (Greif *et al.*, 1996). Mit dieser Methode können jedoch nur Reinstämme voneinander unterschieden werden. Die differenzierte Identifikation von Arten in einem Feldisolat (Mischung verschiedener *Eimeria*-Arten) ist mit diesen Techniken nicht möglich. Eine technisch einfachere und daher kostengünstigere Methode ist die Identifikation von geeigneten Primersequenzen zur

Amplifikation einer spezifischen Gensequenz. Bisher wurden hierfür nur bekannte Sequenzen ribosomaler DNA (Ellis and Bumstead, 1990) aus dem Bereich der ‚internal transcribed spacer‘ ITS1 (Schnitzler *et al.*, 1998; 1999) und ITS2 (Woods *et al.*, 2000; Gasser *et al.*, 2001) eingesetzt sowie ein Sporozoiten-Antigen von *Eimeria acervulina* (EASZ 240/160) (Molloy *et al.*, 1998).

### 1.2 Genom und Gene

Das Genom des sogenannten ‚Houghton‘ Stammes von *Eimeria tenella* ist von allen *Eimeria*-Arten am besten charakterisiert, da es Gegenstand des 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 gerufenen *E. tenella* Genomprojekts ([www.iah.bbsrc.ac.uk/eimeria/](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/eimeria/) und [www.sanger.ac.uk/Projects/E\\_tenella/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/)) ist. Mit diesem Projekt, finanziert vom Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), England, soll eine mehrfache Sequenzierung des gesamten Genoms des Parasiten erreicht werden. Dafür wurde genomische DNA des ‚Houghton‘ Stammes auf eine Fragmentgröße von 1.500 - 2.000 bp geschert, kloniert und Einzelklone ansequenziert. Die als Ergebnis dieser sogenannten ‚shotgun‘-Sequenzierung vorliegenden 750.000 ca. 400 bp langen Einzelsequenzen ergeben ca. 300 Mbp sequenzierte DNA, also das 5fache des gesamten haploiden Genoms (60 Mbp). Diese werden computergestützt zu immer längeren überlappenden Fragmenten, sogenannten ‚contigs‘ zusammengesetzt. Je weiter das Genomprojekt fortschreitet, desto weniger aber dafür längere ‚contigs‘ werden das Genom von *E. tenella* abdecken und schließlich einzelne, vollständige Chromosomen repräsentieren. Die Vorteile dieser Sequenzierungsstrategie im Vergleich zur gerichteten Sequenzierung einzelner Chromosomen sind Zeit- und Kosteneffektivität (Chapman and Shirley, 2003).

*Eimeria* spp. enthalten vier verschiedene Genome, von denen das Genom des Nucleus mit einer Größe von etwa 60 Mbp, die sich auf 14 Chromosomen zwischen 1 und mehr als 7 Mb verteilen und einen GC Gehalt von ca. 53 % aufweisen, am besten beschrieben ist (Hoogendoorn *et al.*, 1998; Shirley, 2000). Man vermutet, dass es für 10.000 – 12.000 Proteine codiert. Seine Komplexität übertrifft diejenige der Genome sämtlicher anderen bekannten Krankheitserreger in Geflügel um Größenordnungen (Shirley, 1997) und beläuft sich sogar auf 1/20 der geschätzten Genomgröße des Haushuhns von etwa 1.200 Mbp (Olofsson and Bernardi, 1983; Bumstead and Palyga, 1992). Man weiß von zwei ribosomalen DNA-Clustern, die ca. 2,5 % des Gesamtgenoms ausmachen und in sogenannten ‚tandem arrays‘ in einer Vielzahl von Kopien auf den Chromosomen 10 und 12 lokalisiert sind. Für das Genom von *Eimeria* spp. sind verschiedene, über das Genom verteilte Repeats beschrieben, wie z. B. (GCA bzw. TGC) mit bis zu 20 konsekutiven Kopien in codierenden und nicht-codierenden Regionen oder (TTTAGGG) in 4 bis 5 Kopien (Jenkins, 1988; Shirley, 1994). Desweiteren besitzt *Eimeria* zwei extrachromosomale Genome: ein mitochondriales Genom und ein Plastidgenom unbekannter Lokalisation (Dunn *et al.*, 1998; Kohler *et al.*, 1997). Die mitochondriale DNA besteht aus linearen Einzelmolekülen einer Größe von 6.213 bp die in bis zu 30 Kopien vorliegen. Das Plastidgenom hingegen weist eine Größe von ca. 25 kb auf, welche als Di- und Trimere

in der Zelle vorliegen (Chapman and 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 and Revets, 1990; Lee *et al.*, 1996). Interessanterweise konnten diese RNAs in *E. tenella* noch nicht nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 1996).

Während das *E. tenella* Genomprojekt schnell große Fortschritte macht und die Datenbankrecherche mit *Eimeria*-Sequenzen enorm vereinfacht hat, sind bis heute jedoch nur einige wenige cDNAs dieses Parasiten vollständig sequenziert. Die genomische Organisation der wenigsten Gene ist beschrieben. Die Eigenschaften und Funktion der von ihnen codierten Proteine sind selten bekannt und charakterisiert. Überdurchschnittlich viele Daten liegen jedoch für verschiedene Mikronemproteine des Parasiten vor: Als erstes wurde *Etp100*, später umbenannt in *Etmic-1*, identifiziert (Clarke *et al.*, 1987; 1990; Tomley *et al.*, 1991; 1996). Ihm folgten sechs weitere Mikronemproteine, *Etmic-2* bis *Etmic-7* (Tomley *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2000; Tomley *et al.*, 2001). Weitere Sequenzdaten und funktionelle Studien liegen u. a. vor für ein hsp70 homologes Gen in *Eimeria* spp. (Dunn *et al.*, 1995), das  $\beta$ -Tubulin-Gen von *E. tenella* (Zhu and Keithly, 1996), die Antigene *gam56*, *gam82* und *gam230* aus Makrogamonten, die bei der Bildung der Oocystenschale eine Rolle spielen (Wallach *et al.*, 1990; Fried *et al.*, 1992; Belli *et al.*, 2002a, b; Belli *et al.*, 2003a; Ferguson *et al.*, 2003), *EmTFP250*, ein Antigen aus den asexuellen Entwicklungsstadien von *E. maxima* (Witcombe *et al.*, 2003) und Enzyme wie die Mannitol-1-Phosphatase (Liberator *et al.*, 1998) oder eine Aspartyl-Proteinase (Eimepsin) (Jean *et al.*, 2001), beide aus *E. tenella*. Einen Überblick über weitere 500 ESTs („expressed sequence tags“) teilweise bekannter Funktion liefert die Publikation von Wan *et al.* (1999), wobei interessanterweise auffallend wenige homologe Sequenzen zu *T. gondii* identifiziert wurden, was eine deutliche genetische Divergenz zwischen diesen beiden scheinbar nahe verwandten Parasiten vermuten läßt. 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 Consensus-Sequenzen, sind unter folgenden Web-Adressen abrufbar: [www.genome.wustl.edu/est/](http://www.genome.wustl.edu/est/) und [www.paradb.cis.upenn.edu/eim/](http://www.paradb.cis.upenn.edu/eim/).

### 1.3 Pathogenese und wirtschaftliche Bedeutung

Kokzidiose ist eine der wirtschaftlich bedeutsamsten Parasitosen der modernen Geflügelhaltung (Henken *et al.*, 1994; Williams, 1999; Yun *et al.*, 2000), deren Krankheitsbild je nach Art durch die geschlechtlichen und/oder ungeschlechtlichen Vermehrungszyklen von Vertretern der Gattung *Eimeria* im Darmgewebe des Haushuhns hervorgerufen wird. Der Verlauf einer Infektion wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Diese sind u. a. das Alter der Wirtstiere (Rose, 1967; Yun *et al.*,

2000), die Anzahl und das Alter der aufgenommenen Oocysten (Long, 1973) und der Immunstatus des Wirts. Während *Eimeria mitis* und *Eimeria praecox* lediglich Gewichtszunahme und Nährstoffaufnahme reduzieren (Williams, 1998), verursachen *E. tenella* und *E. necatrix* darüberhinaus hohe Mortalitätsraten (Joyner *et al.*, 1974), bedingt durch blutige Durchfälle und Anämie. Man geht zudem davon aus, dass sich sämtliche *Eimeria*-Infektionen negativ auf die Eierproduktion der Hennen auswirken (Vezey, 1978). Das ubiquitäre Vorkommen der Vertreter der Gattung *Eimeria* (Williams, 1998) führt häufig zu Mischinfektionen von bis zu sechs verschiedenen Arten auf einer Geflügelfarm (Williams *et al.*, 1996).

Die Pathogenese von *Eimeria*-Infektionen läßt eine dreifache Klassifizierung zu: die klinische Kokzidiose als schwerste Verlaufsform, gekennzeichnet durch hohe Mortalität, Morbidität, Durchfälle und blutigen Kot, die subklinische Kokzidiose, verantwortlich für reduzierte Gewichtszunahme und Nährstoffaufnahme und schließlich die Infektion mit einer nur sehr geringen Anzahl von Parasiten ohne erkennbare negative Auswirkungen auf den Wirt. Diese, oft bei teilimmunen Tieren auftretende Verlaufsform, wird auch als ‚Kokzidiase‘ bezeichnet (Levine, 1961). Kokzidiosefreie kommerzielle Geflügelbestände sind extrem selten (McDougald and Reid, 1997; Cox, 1998), wobei auch Bestände mit klinischer Kokzidiose zumindest in Europa und Nordamerika kaum zu finden sind. Somit verursacht die subklinische Kokzidiose die größten wirtschaftlichen Verluste, die der Geflügelindustrie durch *Eimeria* spp. entstehen (Williams, 1999). Diese Verluste errechnen sich aus den prophylaktischen Aufwendungen für Antikokzidien, von denen allein in Großbritannien im Jahr 2000 235 Tonnen verkauft wurden (BBSRC business, 2002), sowie den Einbußen an Tieren und in der Fleischproduktion und belaufen sich in Großbritannien auf jährlich durchschnittliche £ 40 Mio. Ein ausführliches Berechnungsmodell schätzte die wirtschaftlichen Gesamtkosten für Kokzidiose in Großbritannien im Jahr 1995 auf mindestens £ 38.588.795, wovon 98,1 % bei der Aufzucht von Broilern entstanden. 80,6 % davon ließen sich auf Verluste durch Mortalität, geringe Gewichtszunahme und Nährstoffaufnahme zurückführen, 17,5 % auf Kosten für Chemoprophylaxe und Therapie. Diese Summe entsprach 4,54 % des britischen Gesamtumsatzes beim Verkauf lebender Broiler (Williams, 1999). In den USA hingegen geht man von ein bis zwei Milliarden U. S. \$ aus, die der Geflügelindustrie jährlich durch Kokzidiose verloren gehen (Danforth and Augustine, 1989; Talebi and Mulcahy, 1995; Yun *et al.*, 2000). Genaue Schätzungen der weltweiten Einbußen in der Geflügelindustrie durch Kokzidiose sind jedoch sehr schwierig (McDougald and Reid, 1997; Danforth, 1998; Williams, 1999).

### 1.4 Chemotherapeutika und Vakzinierung

Seit den Fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts werden Antikokzidien in der Geflügelindustrie eingesetzt (Danforth, 1998). Weltweit werden zur Prophylaxe dieser Parasitose jährlich mindestens 300 Millionen U.S. \$ aufgewendet. Die chemotherapeutische Behandlung wird seit 1970 vor allem mit den Polyether-Ionophoren Monensin, Narasin, Salinomycin und Lasalocid durchgeführt. Daneben sind auch zahlreiche Wirkstoffe auf dem Markt, welche die DNA- oder Proteinsynthese in den

Parasitenstadien hemmen (Haberkorn, 1996; Greif, 2000; Greif *et al.*, 2001). Problematisch sind hier zum einen die schwerwiegende Medikamentenbelastung des Huhns (Rückstandsproblematik in eßbaren Geweben) und die ökotoxikobiologische Belastung der Umwelt, zum anderen die zunehmenden Medikamenten-Resistenzen der Erreger (McDougald and Reid, 1997). Hier versucht man, mit Pendel- oder Rotationsprogrammen und der kostenintensiven Suche nach neuen Wirkstoffen, Wirkmechanismen und sogenannten ‚drug targets‘ zu reagieren (Coombs, 2002).

Eine Alternative zur chemotherapeutischen Behandlung der Kokzidiose ist die Immunprophylaxe (Impfung). Berechtigte Hoffnungen auf diese Art der Prophylaxe basieren auf der Tatsache, dass ein Erregerkontakt zur fast vollständigen Immunität gegen eine Zweitinfektion mit derselben *Eimeria*-Art führt (Rose and Hesketh, 1976; Rose, 1978; Rose and Wakelin, 1990). Die kontinuierliche Gabe von Parasitenstadien über einen Zeitraum von 16-25 Tagen induziert in Eintagsküken eine natürliche Immunität gegen *E. tenella*, *E. acervulina* und *E. maxima* (Stiff and Bafundo, 1993). Als ‚Maternale Immunisierung‘ bezeichnet man die von Wallach 1992 entwickelte Immunisierung von Legehennen mit protektiven Gametocyten-Antigenen, die die Immunitätslage geschlüpfter Küken verbessert (Wallach, 1992). Die natürliche Immunabwehr des Huhns umfaßt neben humoralen Abwehrmechanismen auch die zelluläre Immunität, deren Träger T-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen sowie sekretierte Cytokine, Gamma-Interferon und Interleukine sind (Brake, 2002). Die einzigen Produkte zur Immunprophylaxe, die derzeit auf dem Markt sind, sind Oocysten-Lebendimpfstoffe. Während die Produkte Immucox<sup>®</sup> (Vetech Laboratories, Kanada) und Coccivac<sup>®</sup> (Sterwin Laboratories, USA) auf vollvirulenten *Eimeria*-Stämmen basieren, werden für Paracox<sup>®</sup> (Shering Plough, UK) und Livacox<sup>®</sup> (Williams, 2002) attenuierte, virulente Stämme verwendet. Eine solche Attenuierung erreicht man mittels radioaktiver Bestrahlung oder der Passage der Parasiten in Eiern oder dem Wirt. Dies führt zu einer Verminderung der Virulenz durch einen abgekürzten Lebenszyklus (‚precocious strains‘), die immunogenen Eigenschaften der Parasiten bleiben dabei jedoch erhalten (Shirley and Bellatti, 1988). Von der oben beschriebenen TA-Linie des Parasiten konnten durch die Passage in Eiern jedoch nicht ausreichende Mengen für die Verwendung als Lebendimpfstoff produziert werden (Chapman and Shirley, 2003). Unter den derzeit 13 registrierten Lebendimpfstoffen zur Immunisierung gegen Hühnerkokzidiose (Chapman *et al.*, 2002; Williams, 2002) findet man seit kurzem auch polyetherresistente virulente Lebendvaccine (Vermeulen, 2001). Diese verbinden einen frühen protektiven Effekt durch chemotherapeutische Prophylaxe mit einem späten protektiven Effekt, der durch die Vakzinierung erreicht wird. Der wirtschaftliche Nachteil dieser Lebendimpfstoffe sind die hohen Produktionskosten (u. a. für die notwendige Tierhaltung zur Passage der Oocysten). Es besteht zudem das Risiko einer potentiellen Rückmutation der Lebendimpfstoffe zum pathogenen Wildtyp, welches durch die gentechnologische Entwicklung von rekombinanten Impfstoffen (‚subunit vaccine‘) auf der Grundlage protektiver Antigene ausgeschlossen werden könnte. Bei diesen protektiven Antigenen handelt es sich um Epitope auf Parasitenproteinen, die wichtige Funktionen bei der Zellerkennung, Adhäsion und Invasion erfüllen. Für *E. tenella* wurden bislang Antigene auf der Oberfläche des Parasiten sowie auf Organellen von Oocysten, Sporozoitien und Merozoiten identifiziert (Vermeulen 1998). Zur Identifizierung von Genen mit potentiellen ‚target‘-Eigenschaften bedient man sich u. a. auch der Recherche in EST-generierten Datenbanken (Wan *et al.*, 1999) oder Phagen-Display Banken (da Silva *et al.*, 2002).

Durch rekombinante DNA-Techniken gelang es Danforth and Augustine (1985) erstmals, ein 60-70 kDa Antigen von *E. tenella* *in vitro* herzustellen. Bis heute wurden einige weitere *E. tenella*-Antigene aus Oocysten (Crane *et al.*, 1991; Bhogal *et al.*, 1992; Eschenbacher *et al.*, 1996), aus Sporozoiten (Files *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989) sowie aus Merozoiten (Ko *et al.*, 1990; Binger *et al.*, 1993) rekombinant hergestellt. Trotz der prinzipiell artspezifischen Immunität erreichten Crane *et al.* (1991) mit einem einzigen rekombinanten *E. tenella*-Antigen eine kreuzreagierende Protektion gegen vier *Eimeria*-Arten im Haushuhn. Pogonka *et al.* (2003) verwendeten *E. tenella*-Antigen-exprimierende (SO7 und TA4) *Salmonella typhimurium*-Stämme als Impfstoffträger, während auch die Immunisierung mit ‚nackter‘ DNA, also rekombinanten Expressionsplasmiden, eine alternative Immunisierungsstrategie darstellt (Kopko *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2002). Trotz vieler unterschiedlicher Ansätze für die Immunisierung gegen Kokzidiose wurden bis heute jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt, so dass die Identifizierung und Charakterisierung von neuen, bisher unbekanntem Antigenen und dazugehörigen cDNA-Sequenzen dringend notwendig ist (Jenkins, 1998; Vermeulen *et al.*, 2001).

### 1.5 DNA-Immunisierung von Geflügel

Das Prinzip der Immunisierung auf Grundlage von ‚nackter‘ DNA wurde erstmals 1990 von Wolff *et al.* in der Maus beschrieben und 1993 dann auch von Fynan *et al.* (a, b) und Robinson *et al.* im Huhn. Seitdem folgte ein Vielzahl von Publikationen, in denen DNA-Immunisierungen gegen virale, bakterielle und protozoische Erkrankungen von Geflügel evaluiert wurden (Oshop *et al.*, 2002). Dabei führt *in vivo* applizierte DNA codierend für Proteine pathogener Organismen im geeigneten eukaryotischen Expressionsvektor zur Expression von immunogenem Fremdprotein im geimpften Tier. Diese sogenannte ‚Vakzine der dritten Generation‘ wird seitdem als vielversprechender Fortschritt zum Auslösen eines breiten Spektrums spezifischer Immunantworten gehandelt (Tang *et al.*, 1992; Ulmer *et al.*, 1993, 1996; Corr *et al.*, 1996; Robinson, 1997; Kowalczyk and Ertl, 1999). Auch wenn viele Details der Antigen-Expression, Prozessierung und Präsentation noch unklar sind, so weiß man, dass die exprimierten Erregerproteine von MHC-Molekülen der Klassen I und II präsentiert werden und somit über cytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) und T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) zu einer zellvermittelten und humoralen Immunantwort des geimpften Tiers führen (Gurunathan *et al.*, 2000; Dufour, 2001). Gerade in der Geflügelindustrie, wo Kosteneffizienz und Massen-Immunisierung klare Vorgaben sind, läßt die DNA-Immunisierung möglicherweise die Schwierigkeiten mit herkömmlichen Vakzinierungsmethoden hinter sich. Die potentiellen Vorteile gegenüber letzteren sind zahlreich. Im direkten Vergleich zu den momentan angewandten Lebendimpfstoffen (den einzigen bisher zugelassenen Produkten zur Immunprophylaxe gegen *Eimeria*) können auch sie eine MHC-I vermittelte (CD8<sup>+</sup>)-T-Zell-Antwort induzieren, deren zelluläre Immunität für viele wirtschaftlich-relevanten Geflügelkrankheiten, u. a. auch Kokzidiose (Lillehoj, 1998), eine Schlüsselrolle spielt. Das Risiko der virulenten Rückmutation ist dabei jedoch nicht gegeben. DNA-Vakzine sind weiterhin sehr praktikabel. Sie sind einfach, billig und in großem Maßstab in Bakterienzellen zu replizieren und zu modifizieren. Für Lagerung und Transport vom Labor zur Geflügelfarm benötigt man zudem keine aufwendigen Kühlketten. Besonders bei

Geflügel, das im Rahmen einer kommerziellen Nutzung schon nach ein paar Lebenswochen geschlachtet wird, besteht die Notwendigkeit der Immunisierung neonataler Tiere mit schwach entwickeltem Immunsystem. Die Problematik herkömmlicher Impfstoffe in diesem Zusammenhang könnte durch DNA-basierende Vakzine gelöst werden, die eine Immunisierung von Eintagsküken nicht ausschließen (Oshop *et al.*, 2002). Durch intensive Vakzinierung von Hennen in der kommerziellen Geflügelindustrie lassen sich auch bei Küken hohe Titer an maternalen Antikörpern feststellen. Ein großer Vorteil der DNA-Immunisierung ist dabei die minimale Interferenz mit diesen passiven Antikörpern (Oshop *et al.*, 2002). Neben sämtlichen Vorteilen dieser Immunisierungsmethode werden jedoch auch mögliche Risiken diskutiert, beispielsweise die Integration der DNA-Vakzine ins Wirtsgenom und die Induktion von anti-DNA-Antikörpern, welche bis zum heutigen Tag jedoch noch nicht nachgewiesen wurden.

Die Menge an produziertem Antigen, das sich auf die DNA-Immunisierung zurückführen lässt, liegt im allgemeinen im Pikogramm- bis Nanogrammbereich. Dass trotzdem eine breite und anhaltende Immunantwort erreicht werden kann, liegt möglicherweise an den immunstimulierenden Eigenschaften der DNA selbst (CpG Motive) und/oder dem antigenpräsentierenden transfizierten Zelltyp (APC). Min *et al.* (2002) wiesen nach, dass bei einer suboptimalen Dosis einer *Eimeria*-DNA-Vakzine auf Grundlage des Antigens 3-1E (Song *et al.*, 2000) die gleichzeitige Applikation von verschiedenen Cytokingenen des Huhns in geeigneten Expressionsvektoren die Qualität der lokalen Immunantwort entscheidend verbessert. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten zuvor schon Lillehoj *et al.* (2000), die verschiedene Expressionssysteme und Immunisierungsstrategien als Prophylaxe für *Eimeria*-Infektionen miteinander verglichen. Auch wenn man noch nicht alle Zelltypen kennt, die an der Antigenproduktion nach einer DNA-Immunisierung beteiligt sind, so gehören Muskelzellen und Monocyten mit großer Wahrscheinlichkeit dazu (Babiuk *et al.*, 2000). Auch die Haut spielt eine wichtige Rolle bei einer Immunantwort nach intradermaler Vakzinierung. Sie enthält dendritische antigenpräsentierende Zellen in der Epidermis (Langerhans-Zellen) und in der Dermis, welche auf MHC II-Molekülen Antigenpräsentation und starke T-Helferzell(CD4<sup>+</sup>)-Antworten induzieren (Bos, 1997; Bouloc *et al.*, 1999; Akbari *et al.*, 1999). Auch wenn sich die grundlegenden Immunmechanismen in Vögeln und Säugetieren hinsichtlich der beteiligten Zelltypen nicht unterscheiden (Chan *et al.*, 1988; Sowder *et al.*, 1988; Vandaveer *et al.*, 2001), bestehen doch morphologische Unterschiede. Einerseits gibt es den Vögeln eigene lymphatische Organe wie die Bursa fabricii oder die Harder Drüse, andererseits fehlt ihnen das klar strukturierte lymphatische System der Säugetiere. Während sich bei der DNA-Immunisierung von Säugetieren die Verteilung der rekombinanten Plasmide und die darauf folgende Proteinexpression entlang der Lymphbahnen und in den Lymphknoten verfolgen lässt, so ist deren Verteilung im Vogel weniger klar definiert, findet sich aber auch hier, beispielsweise nach transcutaner Applikation, in verschiedenen Geweben wieder (Oshop *et al.*, 2002). In mehreren Publikationen führten DNA-Immunisierungen von Hühnern gegen Kokzidiose zu einer deutlich verminderten Oocysten-Ausscheidung und einem Schutz gegen starke Gewichtsabnahme nach dem ‚challenge‘ mit Oocysten von *E. acervulina* (Lillehoj *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2002), was der DNA-Immunisierung von Geflügel im Rahmen der Kokzidiose-Bekämpfung eine neue wichtige Rolle bescheinigt.

### 1.6 Toltrazuril wirkt gegen intrazelluläre Stadien von *Eimeria*

Bei Toltrazuril (Baycox<sup>®</sup>, Bay Vi 9142) handelt es sich um ein symmetrisches Triazinonderivat und einen Meilenstein in der Entwicklung von Substanzen gegen parasitische Protozoeninfektionen bei BAYER. Es ist die erste Kokzidiose-wirksame Verbindung, die sich gegen *sämtliche* intrazellulären Entwicklungsstadien von *Eimeria* in Geflügel und Säugetieren richtet (Haberkorn and Stoltefuss, 1987). Toltrazuril, u. a. auch hochwirksam gegen die cystenbildenden Gattungen *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* sowie Fisch-parasitierende Plathelminthen aus der Gruppe der Monogenea, wurde 1977 entdeckt und 1987 als Baycox<sup>®</sup> auf den Markt gebracht (Greif *et al.*, 2001; Haberkorn *et al.*, 2001). Über den molekularen Wirkmechanismus dieser Substanz in den intrazellulären Entwicklungsstadien der Parasiten ist bislang jedoch wenig bekannt. Man vermutet eine inhibierende Wirkung auf die Atmungskette in den Mitochondrien, da dafür verantwortliche Schlüsselenzyme wie die Succinat-Cytochrom-C-Reduktase, die NADH-Oxidase, die Succinat-Oxidase und die Fumarat-Reduktase von Toltrazuril inhibiert werden. Dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach jedoch nicht um den spezifischen Wirkmechanismus (Harder and Haberkorn, 1989). Man weiß zudem, 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) festgestellt, wobei die zur Hemmung benötigten Toltrazuril-Konzentrationen jedoch zu hoch sind, um einen Effekt auf Kokzidien *in vivo* zu erklären (Harder and Haberkorn, 1989). Hackstein *et al.* (1995) vermuteten, dass die Wirkung des modifizierten Herbizids Toltrazuril auf den Chlorophyll- $\alpha$ -D1 Komplex des Photosystems II in vergleichbarer Weise auch in den rudimentären Photosystemen im Apicoplast von Apicomplexen ablaufen könnte. Dafür sprechen Hinweise, dass in den beiden Toltrazuril-sensitiven Apicomplexen *T. gondii* und *S. muris* ein Photosystem II bzw. das vom *psbA*-Gen codierte D1 Protein als ein entscheidender Bestandteil dieses Systems, nachweisbar sind. Desweiteren deuten mikroskopische Beobachtungen darauf hin, dass in den Makrogamonten die Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) durch Toltrazuril zerstört werden (Mehlhorn *et al.*, 1984). Zur selben Zeit wird die Entwicklung einer Immunität seitens des Wirts nicht gehemmt sondern stimuliert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die durch Toltrazuril geschädigten intrazellulären Entwicklungsstadien (Schizonten der Generationen I, II und III 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, die mit Toltrazuril behandelt wurden (Greif, 2000).

### 1.7 Zielsetzung

Das symmetrische Triazinonderivat Toltrazuril (Baycox<sup>®</sup>, Bay Vi 9142) wirkt gegen sämtliche intrazellulären Entwicklungsstadien der Gattung *Eimeria*. Der spezifische, molekulare Wirkmechanismus dieser Substanz ist nicht bekannt und es liegen dazu nur wenige experimentelle Daten vor. Mikroskopische Untersuchungen zeigen jedoch dramatische Auswirkungen auf die

Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) der Makrogamonten von *E. tenella*, *E. maxima* und *E. acervulina*, wenn ihr Wirt 4 oder 5 Tage p. i. einmalig mit 5 mg/kg Toltrazuril behandelt wurde: Die WF II, die normalerweise die innere Oocystenwand ausbilden, schwellen an und werden vollständig zerstört, was die Ausbildung intakter Oocysten stark einschränkt, wenn nicht sogar vollständig verhindert (Mehlhorn *et al.*, 1984). Der Entwicklungszyklus wird unterbrochen. Um die Funktion der WF II während der Entstehung der Oocystenschale besser untersuchen zu können, wurde ein monoklonaler Antikörper (mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>) gegen Antigene der WF II erzeugt (Mouafo *et al.*, 2002). Dieser erkennt stadienabhängige Antigene mit einem apparenten Molekulargewicht von 51 und 46 kDa (138 *hpi*), 30, 25 und 23 kDa (144 *hpi*) und ca. 81 kDa (in sporulierten Oocysten). Die mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierenden Antigene wurden bisher ausschließlich mit proteinanalytischen und mikroskopischen Methoden charakterisiert. Abgesehen von 29 durch Edman Abbau sequenzierten AS (Mouafo, 2001) lagen keinerlei Sequenzinformationen vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine genomische Expressionsbank von *E. tenella* in einem Phagemidvektor konstruiert. Durch ein auf Phagen-Display basierendes Ligandenscreening mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> sollten anschließend Gene identifiziert werden, die für die vom mAk erkannten Proteine codieren. Neben einer vollständigen Klonierung sollten auch das Expressionsmuster und die genomische Organisation sowie die Bedeutung des codierten Proteins für die Immunprophylaxe untersucht werden. Kreuzreaktionen des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> mit weiteren zellulären Strukturen oder Stadien des Parasiten sollten festgestellt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die hier konstruierte Expressionsbank von *E. tenella* dazu verwendet werden, den Rezeptor für Toltrazuril zu isolieren. Dafür wurde Toltrazuril auf der Oberfläche von DYNABEADS™ immobilisiert und im Phagen-Panning eingesetzt. Selektionierte Phagenklone sollten charakterisiert, die vollständige cDNA kloniert und Übereinstimmungen zu bereits beschriebenen Sequenzen untersucht werden.



## 2 Material & Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

Agar, Hefeextrakt, Trypton (GIBCO BRL, Karlsruhe)  
Agarase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
,low melting point'-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)  
6 × Agarose-Gel Ladungspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
Ammoniumperoxodisulfat (MERCK, Darmstadt)  
AMV, Reverse Transkriptase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Biomax MS Screen (Eastman Kodak Company, New York)  
Biomax MS Scientific Imaging Film (Eastman Kodak Company, New York)  
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (Qiagen, Hilden)  
CDP-Star (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan) (Merck, Darmstadt)  
DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid) (Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL)  
DYNABEADS™ Pan Mouse IgG, (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)  
DYNABEADS™ M-270 Amine, (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)  
DYNABEADS™ M-280 Sheep anti-Rabbit IgG, (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)  
DYNABEADS™ M-270 Carboxylic Acid, (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)  
ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia, Freiburg)  
ECL Western Blotting Detektionssystem (Amersham Pharmacia, Freiburg)  
0,1-cm Elektroporationskuvetten (BIO-RAD, München)  
Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Filterpapier (Whatman Ltd., Maidstone, England)  
Größenstandards  $\lambda$ -DNA (*EcoRI*, *HindIII* geschnitten), pUC-Mix Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
Hybond-N Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Hybridisierungslösung Rapidhyb (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Imaging Plate BAS-MS 2025 (Fuji, Kanagawa, Japan)  
Invisorb Genomic DNA Kit II (Invitex, Berlin-Buch)  
Invisorb RNA Kit II (Invitex, Berlin-Buch)  
Megaprime DNA Labelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
NucleoBond PC 500 EF Kit (Macherey Nagel, Düren)  
NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit (Macherey Nagel, Düren)  
NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey Nagel, Düren)  
Protran Nitrocellulose Membran BA 85 (Schleicher und Schuell, Dassel)  
Oligo-(dT)-Primer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Orthophenyldiamin-Tabletten (DAKO, Glostrup, Dk)  
PCR Nukleotid (dNTP) Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen, Groningen, NL)

## Material & Methoden

---

Prestained SDS Molecular Weight Marker Mix (Sigma, Deisenhofen)  
Primer random p[dN]<sub>6</sub> (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Pro-Bind Assay Plates (Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey, USA)  
5'/3'-RACE Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Qiagen Plasmid-Midi Kit (Qiagen, Hilden)  
Radiochemikalien (ICN, Meckenheim)  
Rapid-Hyb Hybridisierungspuffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Restriktions-Enzyme (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
10 × Roti-Block-Lösung (Roth, Karlsruhe)  
4 × Roti-Load-Ladungspuffer (Roth, Karlsruhe)  
Roti-Phenol (Roth, Karlsruhe)  
S-Monovetten (2,7 ml) mit Gerinnungsaktivator (Sarstedt, Nümbrecht)  
*Taq* DNA Polymerase in Storage Buffer A (Promega, Heidelberg)  
Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Titan One Tube RT-PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Triple Master PCR System (Eppendorf, Hamburg)  
Tris-(hydroxyethyl)aminomethan (MERCK, Darmstadt)  
Ultra Pure Sequagel XR (National Diagnostics, Atlanta, USA)  
Vivaspin 20 Konzentratoren (Sartorius AG, Göttingen)

Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie (Biozym, Hess. Oldendorf; GeneCraft, Münster; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Invitrogen, Leek, Niederlande; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg; USB, Bad Homburg; Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL).

## 2.2 Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden ausschließlich mit Milli Q-Wasser angesetzt und für Arbeiten mit DNA, RNA und für Kulturmedien durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Für Arbeiten mit RNA wurden diese zuvor mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Die Zusammensetzung folgender Lösungen und Puffer wird im Text nicht näher erläutert:

Acrylamid Stock (AA/Bis):	29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid in H <sub>2</sub> O
alkalischer Transferpuffer:	3 M NaCl, 8 mM NaOH, pH 11,40 - 11,45
Blotpuffer (Western Blot):	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % Methanol, pH 8,3 in H <sub>2</sub> O
Citrat-Puffer (ELISA):	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 M Citrat; pH 5,0
,Coating'-Puffer (ELISA):	7,5 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 17,5 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,6
Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH in H <sub>2</sub> O
Detektionspuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl

DTT (1 M):	3,09 g in 20 ml 0,01 M Na-Acetat, pH 5,2; sterilfiltrieren
ELISA-Puffer:	0,2 M Tris-HCl; 750 mM NaCl; 0,2 % Tween 20; pH 7,5
Elutionspuffer:	50 mM Natriumcitrat; 150 mM NaCl, pH 4,5 und pH 1,8
Extraktionspuffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 0,5 % SDS; 20 µg/ml RNaseA
Glyoxaligel-Ladungspuffer:	10 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 50 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS in H <sub>2</sub> O
LB-Medium:	1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt in H <sub>2</sub> O, pH 7,5
LB-Agar:	LB-Medium mit 2 % Agar
Lysispuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 7,8; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,5% BSA; 1 µg/ml DNase I; 40 µg/ml Lysozym
Mowiol-Einbettmedium:	5 g Mowiol (Polyscience Inc., Niles, IL, USA) in 20 ml PBS <sup>-</sup> -Puffer, pH 7,4, lösen, 16 h rühren lassen, Zusatz von 10 ml Glycerin und weitere 16 h rühren lassen; abzentrifugieren unlöslicher Partikel, aliquotieren und Lagerung bei – 20°C; Zusatz von 1-2 % DABCO vor Gebrauch
Neutralisationspuffer:	2 M Tris-HCl, pH 8,6
NZY-Medium:	5 g NaCl; 2 g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 5 g Hefeextrakt; 10 g NZ-Amin ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,5
NZY-Agar:	NZY-Medium mit 2 % Agar
PBS <sup>-</sup> -Puffer (1 ×):	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 0,15 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O; 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Ponceau S:	0,5 % Ponceau S; 1 % Eisessig in H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer (4 ×):	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS in H <sub>2</sub> O
Sequenzgel-Lösung:	32 ml SequaGel XR Monomerlsg. (19:1 AA zu Bis); 8 ml SequaGel XR Puffer; 300 µl 10 % APS
SOC-Medium:	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O; 20 mM Glucose in H <sub>2</sub> O
SSC (20 ×):	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 in H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (40 ×):	1,6 M Tris; 1,33 M Natriumacetat; 0,04 M EDTA in H <sub>2</sub> O, pH 8,0
TBE-Puffer (5 ×):	0,445 M Tris; 0,445 M Borsäure; 0,01 M EDTA in H <sub>2</sub> O, pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,0; 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer (4 ×):	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS in H <sub>2</sub> O

### 2.3 Versuchstiere und *E. tenella*-Stamm

Als Versuchstiere für die Passage von *Eimeria* spp. und die DNA-Vakzinierung dienten männliche Legetypküken vom Stamm LSL, Brinkschulte. Diese wurden als Eintagsküken geliefert und mit Kükenaufzuchtsfutter ohne Kokzidiosemittel und Wasser *ad libitum* versorgt. Abhängig von Alter und

Größe der Tiere wurden sie zunächst in Käfig- später in Bodenhaltung gehalten. Zur Infektion wurden pro Tier 15.000 sporulierte Oocysten von *Eimeria tenella* VT-2 verwendet.

## 2.4 Bakterienstämme und Vektoren

### 2.4.1 Bakterienstämme

*E. coli* TOP10 chemisch-kompetent (Invitrogen, Groningen, NL):

F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\Phi80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta(ara-leu)7697$  *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

*E. coli* TG1 elektro-kompetent (Stratagene, Heidelberg):

*supE* *thi-1*  $\Delta(lac-proAB)$   $\Delta(mcrB-hsdSM)5$  (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>*) [F<sup>+</sup> *traD36* *proAB* *lacI<sup>q</sup>* $\Delta M15$ ]

*E. coli* DH5 $\alpha$  chemisch-kompetent (Gibco BRL, Karlsruhe):

F<sup>-</sup>  $\Phi80lacZ\Delta M15$   $\Delta(lacZYA-argF)U169$  *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(*r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>*) *phoA* *supE44*  $\lambda$ *thi-1* *gyrA96* *relA1*

### 2.4.2 Vektoren

pG8SAET (Jacobsson and Frykberg, 1998; Zhang *et al.*, 1999) (AF130864)

pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL)

pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL)

## 2.5 Isolation von genomischer DNA aus *E. tenella*

Die DNA-Isolation erfolgte nach einer modifizierten Methode von Blin und Stafford (1976).  $1 \times 10^8$  sporulierte Oocysten wurden bei 3.000 rpm für 10 min pelletiert (Heraeus MULTIFUGE 3<sub>L-R</sub>) und ein dem Pellet entsprechendes Volumen Glasperlen ( $\varnothing$  0,45-0,5 mm) hinzugegeben. Durch Vortexen bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min wurden Oocysten- und Sporocystenschalen aufgebrochen und mikroskopisch kontrolliert. Es folgte die Hinzugabe von 5 ml Extraktionspuffer, eingestellt auf eine Proteinase K Konzentration von 100  $\mu$ g/ml, und die Inkubation bei 56 °C über Nacht. Die DNA wurde zweimal mit Roti-Phenol (Roth, Karlsruhe)/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert, mit 2 Vol. absolutem Ethanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat gefällt und durch Zentrifugation bei 13.000 rpm im Beckman JS13.1 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 %igen Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in dH<sub>2</sub>O resuspendiert und die DNA-Konzentration in einem 1 %igen TBE-Agarosegel durch den Vergleich mit 1  $\mu$ g *EcoRI/HindIII* verdauten  $\lambda$ -DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

abgeschätzt. Für quantitative Analysen wurde zur Gewinnung hochreiner genomischer DNA aus Sporozoiten das Invisorb® Genomic DNA Kit II (Invitex, Berlin) oder das Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Diese Isolationsmethoden sollten eine Kontamination mit RNA ausschließen, die die exakte photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration beeinflusst hätten.

### 2.6 Isolation von Gesamt-RNA aus *E. tenella* und Kükenblinddarm

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte aus  $3 \times 10^7$  Sporozoiten oder Oocysten bzw. 0,3 g Kükenblinddarm unter Verwendung des ‚Invisorb RNA Kit II‘ (Invitex, Berlin-Buch). Sämtliche Arbeitsschritte wurden mit RNase-freiem Material und DEPC(Diethylpyrocarbonat)-behandelten Lösungen durchgeführt. Die Sporozoiten oder Oocysten wurden in 500 µl Lysis-Lösung aufgenommen und letztere zusätzlich durch Vortexen mit Glasperlen aufgeschlossen, während das Darmgewebe in 2 ml Lysis-Lösung mittels Ultraturrax zerkleinert wurde. Der jeweilige Überstand wurde für die RNA-Isolation verwendet und alle weiteren Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Die in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöste Gesamt-RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung auf –80 °C gelagert.

### 2.7 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus stationären 3 ml bzw. 50 ml Kulturen von *E. coli* TOP10, *E. coli* DH5α oder *E. coli* TG1. Mit einer Einzelkolonie wurde LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Plasmid-Isolation wurden das ‚NucleoSpin Plasmid Kit‘ (Macherey-Nagel, Düren) bzw. das ‚Plasmid Midi Kit‘ (Qiagen, Hilden) verwendet. Die zur DNA-Immunsierung verwendeten Plasmide wurden mittels NucleoBond PC 500 EF Kit endotoxinfrei aufgereinigt. Die Plasmid-DNA-Isolationen wurden gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

### 2.8 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch im Spektrophotometer DU 640 (Beckmann, München). Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook *et al.* (1989) berechnet. Restriktionsfragmente, die als Sonden für Southern und Northern Blot verwendet werden sollten, wurden in einem 1 %igen TBE-Agarosegel durch den Vergleich mit 1 µg *EcoRI/HindIII* verdaute λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) abgeschätzt.

### 2.9 Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde gemäß den Herstellerangaben und im empfohlenen Puffer für das jeweilige Enzym durchgeführt. In der Regel betrug die Inkubationszeit 3 h bei 37 °C.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) in einer horizontalen Flachbettkammer. Dafür wurden 0,6 – 2 %ige Agarosegele verwendet, die mit TBE- oder TAE-Puffer und unter Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gegossen wurden. Die durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Moleküle wurden anschließend auf dem Transilluminator mit parallel aufgetrennten DNA-Längenstandards verglichen. Für Fragmente <1 kb wurde 1 µg pUC-Mix Marker, für größere Fragmente 1 µg *EcoRI/HindIII* verdaute λ-DNA (beide MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

### 2.10 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder mittels Agarase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durch den Verdau von ‚low melting point‘-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf), die als Fenstergel in gleichprozentiges TAE-Agarosegel gegossen wurde, oder mittels des ‚NucleoSpin Extract 2 in 1 Kits‘ (Macherey-Nagel, Düren). In beiden Fällen wurde das gewünschte Fragment unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und gemäß den Angaben der Hersteller isoliert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1/10 des Probenvolumens anschließend in einem Kontrollgel aufgetrennt und im Vergleich zum DNA-Längenstandard abgeschätzt.

### 2.11 Chemische Transformation von *E. coli*

Die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* TOP10 oder *E. coli* DH5α mit rekombinanten Plasmiden wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach dem Ausplattieren der transformierten Zellen auf Selektionsagar und Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten Transformanten isoliert und im Restriktionsverdau analysiert werden.

### 2.12 Konstruktion einer genomischen Expressionsbank von *E. tenella*

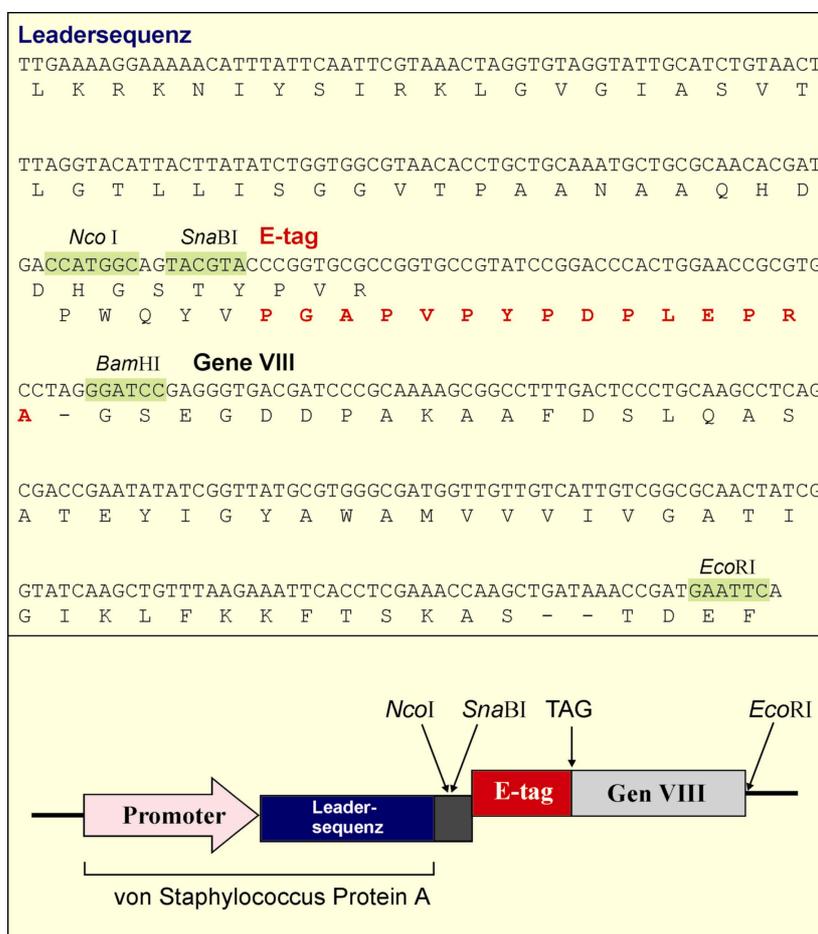
#### 2.12.1 Fragmentierung genomischer DNA und ‚blunt-end‘ Reaktion

25 µg genomische DNA von *E. tenella* wurden in einem Volumen von 4 ml mit der Sonotrode MS73 bei 40 %iger Geräteauslastung 10 × 30 s unter Kühlung im eiskalten Wasserbad fragmentiert. Diese

Fragmente einer Größe zwischen 100 und 800 bp wurden anschließend präzipitiert, in 60 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert und in einem 1,2 %igen Agarosegel mit gleichprozentigem ‚low melting point‘-Agarose-Fenster ohne Ethidiumbromid aufgetrennt. Die durch Agarase-Verdau isolierten Fragmente wurden über ‚S-400 HR Microspin Columns‘ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für die ‚blunt-end‘ Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz erstellt: 75 µl aufgereinigte DNA-Fragmente, 1 mM dNTP-Mix, 10 U AccuTherm DNA Polymerase (GeneCraft, Münster) und 1 × AccuTherm Puffer auf 100 µl dH<sub>2</sub>O. Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 72 °C inkubiert, anschließend Phenol-Chloroform extrahiert und die Fragmente in 100 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. 2 µl davon wurden zur Konzentrationsabschätzung in einem Probegel aufgetrennt.

## 2.12.2 Dephosphorylierung von pG8SAET

20 µg pG8SAET wurden mit 40 U *Sna*BI (Promega, Heidelberg) für 3 h bei 37 °C restringiert. Anschließend wurden dem Restriktionsansatz 4 U Alkalische Shrimp Phosphatase (USB, Bad Homburg) zugesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min Hitzeinaktivierung bei 65 °C wurde der linearisierte und dephosphorylierte Vektor aus einem 0,8 %igen ‚low melting point‘-Agarose-Fenster gel durch Agarase-Verdau isoliert. In **Abb. 2.1** ist die DNA-Sequenz um die ‚cloning site‘ des Vektors sowie ein schematischer Überblick dieser Region aufgeführt.



**Abbildung 2.1 ‚Cloning site‘ des Phagemidvektors pG8SAET.** Der Vektor enthält eine *Sna*BI-Schnittstelle zur ‚blunt end‘-Klonierung von DNA, deren Expression vom Promotor des Proteins A von *Staphylococcus* reguliert wird. Das ‚E-tag‘ ermöglicht die Immundetektion des Fusionsproteins, welches zum Teil in Fusion mit dem Gen VIII-Produkt der Phagenhülle exprimiert wird. Das TAG Stopcodon führt in *amber*-Suppressormutanten, beispielsweise *E. coli* TG1, zur Expression von zwei Genprodukten verschiedener Länge, was für das ‚assembling‘ der Phagenhülle notwendig ist.

### 2.12.3 Ligation von DNA

Die Ligation von 8 µg genomischen DNA-Fragmenten und 5 µg linearisiertem und dephosphoryliertem pG8SAET erfolgte mittels 300 U T4 DNA Ligase HC (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 16 °C für 48 h. Anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und die rekombinanten Vektormoleküle unter Hinzugabe von 20 µg Glykogen präzipitiert. Das Pellet wurde in 100 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert, wovon jeweils 1,5 µl pro Elektrotransformation eingesetzt wurden.

### 2.12.4 Elektrotransformation von *E. coli*

Die Elektrotransformation von jeweils 50 µl *E. coli* TG1 mit 1,5 µl Ligationsansatz wurde in 0,1-cm Elektroporationskuvetten (BIO-RAD, München) bei einer Feldstärke von 17 kV/cm im Gene Pulser (BIO-RAD, München) bei 200 Ω und 25 µF nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Anzahl der Transformanden wurde bestimmt und die rekombinanten Zellen bei –80 °C in Form von Glycerolstocks konserviert.

## 2.13 Phagen-Display und Phagen-Panning

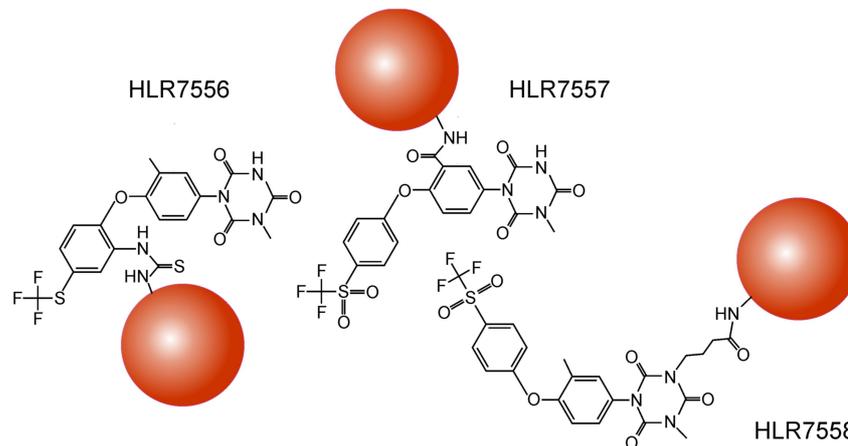
### 2.13.1 Präparation und Aufreinigung rekombinanter Phagemide

20 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (50 µg/ml) wurden mit 200 µl eines jeden Glycerolstocks angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden dann 100 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium angeimpft, bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 inkubiert und mit 500 µl ( $1 \times 10^{11}$  pfu) Helferphagen R408 (Promega, Heidelberg) infiziert. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C und 280 rpm über Nacht wurden die Zellen für 10 min bei 5.000 rpm pelletiert, der Überstand sterilfiltriert und die Phagemide über Vivaspin 20 Konzentratoren (Sartorius AG, Göttingen) gemäß Herstellerangaben aufkonzentriert.

### 2.13.2 Koppelung von ‚target‘-Molekülen an DYNABEADS™

Für das Phagen-Panning gegen Toltrazuril (Baycox®) wurden zur Immobilisierung dieses Triazinonderivats jeweils 30 mg M-270 Amine DYNABEADS™ (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) verwendet. Dabei handelt es sich um paramagnetische Polystyrenbeads mit einem Durchmesser von 2,8 µm, in deren Poren Eisenpartikel gleichmäßig verteilt sind. Diese sind durch eine hydrophile Schicht versiegelt, deren Oberfläche mit Aminogruppen aktiviert ist, welche eine Bindung an Toltrazuril ermöglichen. Diese Arbeiten wurden von Herrn Dr. W. Hallenbach (Bayer AG, Monheim)

durchgeführt (‚Kupplung von Toltrazuril an feste Phasen‘, PF-Bericht 4529). Um zu verhindern, dass wichtige Bindungsstellen des Toltrazurils durch die Beads ‚verdeckt‘ werden, wurden drei verschiedene Konjugate hergestellt (HLR-7556, HLR-7557 und HLR-7558), welche sich hinsichtlich der Position und Koppelgruppe unterscheiden (**Abb. 2.2**). Die Vorteile der M-270 Amine DYNABEADS™ sind die geringen, nicht-spezifischen Bindungseigenschaften, die gute Resuspendierbarkeit und die große spezifische Oberfläche (2-5 m<sup>2</sup>/g DYNABEADS™).



**Abbildung 2.2 Koppelung von Toltrazuril (Baycox®) an M-270 Amine DYNABEADS™.** Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema der Koppelung von Toltrazuril an die aktivierten Aminogruppen auf der Oberfläche der DYNABEADS™. Die drei im Phagen-Panning eingesetzten Präparationen unterscheiden sich im Hinblick auf die Koppelgruppe des Toltrazurils (‚Kupplung von Toltrazuril an feste Phasen‘, PF-Bericht 4529).

Im Phagen-Panning gegen den mAK E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> wurde dieser über ‚anti-Maus‘-Primärantikörper an DYNABEADS™ Pan Mouse IgG gebunden. Für das Beschichten dieser Beads mit dem mAk wurde durch Ultrafiltration (100 kDa MWCO) 50fach aufkonzentrierter Hybridoma-Kulturüberstand des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> verwendet (Mouafo *et al.*, 2002). Pro mg DYNABEADS™ wurden 20 µg aufkonzentriertes Gesamtprotein bei einem Anteil von ca. 5 % mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> eingesetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Durch 3maliges Waschen mit PBS/0,1% BSA wurden nicht-gebundene Proteine und Immunglobuline entfernt und die DYNABEADS™ anschließend in der Bindereaktion eingesetzt.

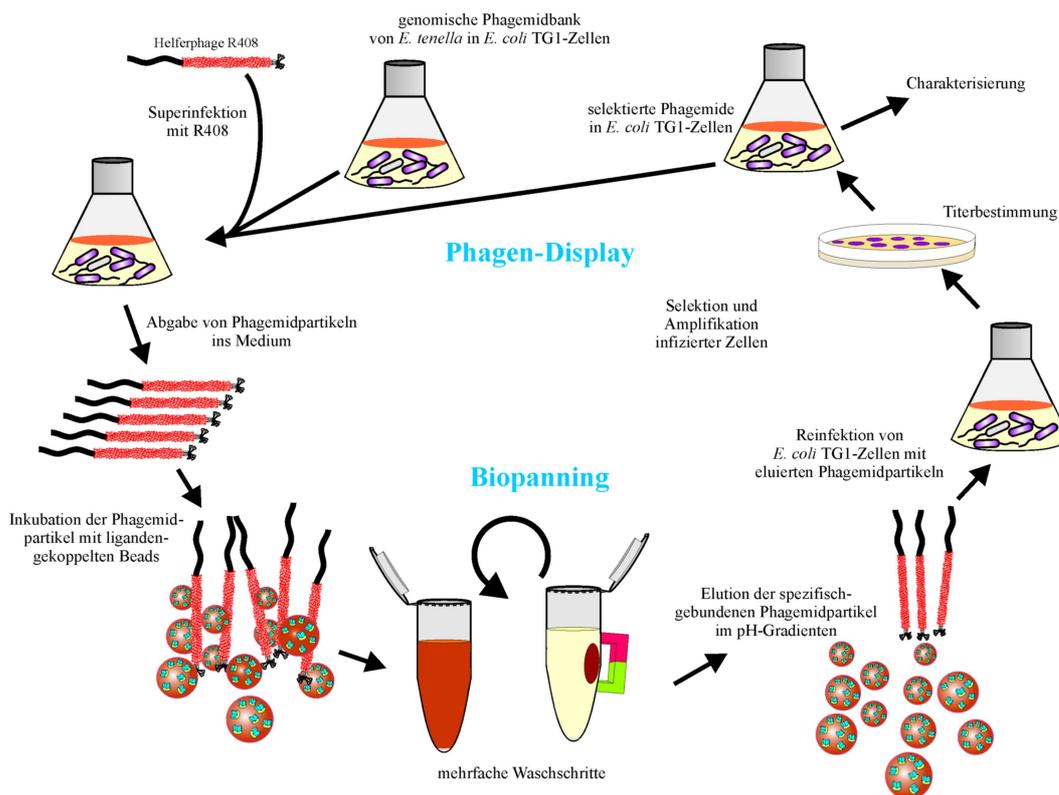
### 2.13.3 Bindereaktion, Waschschritte und Elution

Im Phagen-Panning gegen Toltrazuril wurden pro Bindereaktion jeweils 50 µl (1 × 10<sup>8</sup>) mit Toltrazuril gekoppelte M-270 Amine DYNABEADS™ bzw. 50 µl (1 × 10<sup>8</sup>) M-270 Amine DYNABEADS™ (Negativkontrolle) eingesetzt. Vor der eigentlichen Bindereaktion wurden die mit Toltrazuril gekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ für 2 h rotierend in 2 ml PBS/0,1% BSA vorgeblockt, um unspezifische Bindungsstellen auf den Beads abzusättigen. Zudem wurde zeitgleich eine Negativselektion für die eingesetzten Phagemide durchgeführt: Diese wurden für 2 h rotierend mit 50 µl (1 × 10<sup>8</sup>) ungekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ inkubiert und nur die nicht bindenden Phagemide für die eigentliche Bindereaktion eingesetzt. Dadurch sollte eine unspezifische Anreicherung gegen die Beads als solche ausgeschlossen werden. Die Phagemide im Überstand

## Material & Methoden

wurden anschließend mit 50 µl der vorgeblockten mit Toltrazuril gekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ in einem Volumen von 400 µl in PBS/0,1% BSA über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach 10maligem Waschen in je 2 ml PBS/0,1% BSA wurden schwach bindende Phagemide nach einer 15minütigen rotierenden Inkubation in 400 µl Elutionspuffer pH 4,5 verworfen und die im Elutionspuffer pH 1,8 unter denselben Bedingungen eluierten Phagen mit 40 µl Neutralisationspuffer versetzt und für die Titerbestimmung und Reinfektion verwendet (**Abb. 2.3**).

Für ein ‚Kontroll-Panning‘, also einer Bindungsstudie zum Nachweis der Affinität eines Phagenklons für einen bestimmten auf der Oberfläche von DYNABEADS™ immobilisierten Liganden, wurden Phagemide und DYNABEADS™ in definierter Menge eingesetzt, meist  $5 \times 10^9$  Phagemide und  $2 \times 10^7$  DYNABEADS™ pro Bindereaktion. Die Waschschritte und die Elution wurden wie oben angegeben durchgeführt. Mit den in 400 µl Elutionspuffer pH 1,8 eluierten spezifisch bindenden Phagen wurden 10 ml *E. coli* TG1, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, reinfiziert. Nach Inkubation bei 37 °C und 40 rpm für 0,5 h wurden die Zellen pelletiert, in 400 µl Ampicillin-haltigem LB-Medium resuspendiert und davon zur Titerbestimmung 0,1 µl und 1 µl auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert.



**Abbildung 2.3 Prinzip des Phagen-Display und Biopanning.** Die genomische Expressionsbibliothek von *E. tenella* im Phagemidvektor pG8SAET wird in TG1-Zellen repliziert. Die Infektion mit dem Helferphagen R408 führt zur Abgabe rekombinanter Phagemidpartikel ins Kulturmedium. Diese filamentösen Phagen repräsentieren das Proteinrepertoire des Parasiten in Fusion mit einem ihrer Hüllproteine, dem ‚major coat protein VIII‘, in hoher Kopienzahl. Bei der Inkubation mit auf DYNABEADS™ immobilisierten Liganden wird eine spezifische Bindung einzelner Phagenklone erzielt. Diese werden unter stringenten Elutionsbedingungen isoliert, während nicht- oder schwachbindende Phagemidpartikel durch intensive Waschschrte entfernt werden. Durch die Reinfektion von TG1-Zellen mit den selektierten Phagenklonen werden diese als Phagemide repliziert und führen in weiteren Biopanning-Runden zur enormen Anreicherung weniger spezifisch bindender Phagenklone.

Für das Phagen-Panning gegen den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> wurden in der Bindereaktion jeweils 50 µl ( $2 \times 10^7$ ) DYNABEADS™ mit oder ohne mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Negativkontrolle) auf der Oberfläche mit 200 µl Phagemidkonzentrat in einem Volumen von 400 µl in PBS/0,1% BSA über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Waschschriffe, Elution, Titerbestimmung und Reinfektion erfolgten wie im Phagen-Panning gegen mit Toltrazuril gekoppelte M-270 Amine DYNABEADS™. Bindungsstudien von selektionierten Phagenklonen, wie oben beschrieben, waren in diesem Fall nicht notwendig, da spezifisch angereicherte Phagemide im Western Blot mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> detektiert werden konnten.

### 2.13.4 Titerbestimmung und Reinfektion

Jedes Eluat wurde zur Reinfektion von 10 ml *E. coli* TG1, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, verwendet. Nach Inkubation bei 37 °C und 40 rpm für 0,5 h wurden die Zellen pelletiert, in 400 µl Ampicillin-haltigem LB-Medium resuspendiert und zur Titerbestimmung bzw. Amplifikation auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Für eine weitere Runde Phagen-Panning wurden diese Platten nach 18 h mit Ampicillin-haltigem LB-Medium abgespült und in einer 50 ml Kultur mit 100 µl Helferphagen R408 infiziert. Nach Inkubation bei 37 °C und 280 rpm über Nacht wurden die Phagemide, wie oben beschrieben, aufkonzentriert und für neue Bindereaktionen eingesetzt.

### 2.13.5 Detektion E-,tag'-exprimierender Klone

Zur Isolierung E-,tag'-exprimierender Klone wurden im Anschluß an mehrere Runden Phagen-Panning ca. 100 'colony forming units' (cfu) auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausplattiert und auf Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Die der Membran anhaftenden Zellen wurden über Nacht in 6 ml Lysispuffer lysiert, Zellreste durch 3faches Waschen mit PBS/0,05 % Tween-20 entfernt und unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch 1 h Blocken mit 1 × RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur (RT) mit dem Primärantikörper Maus-anti-E-,tag' (Amersham Pharmacia, Freiburg), 1:500 verdünnt in 1 × RotiBlock, inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch 3maliges Waschen für 0,5 h entfernt. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Alkalischer Phosphatase (AP-) gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG in einer 1:2.000 Verdünnung eingesetzt. Nach 3 erneuten Waschschriffen wurde die Membran für 2 min in Detektionspuffer equilibriert und gebundene Sekundärantikörper durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mittels CDP-Star (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 1:100 verdünnt in Detektionspuffer, nachgewiesen. Die Exposition erfolgte auf ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 2 – 10 min bei RT.

## 2.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Sämtliche PCRs wurden in einem PTC-200 Gradientencycler oder PTC-150 MiniCycler der Firma MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt.

### 2.14.1 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle PCR-Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersbach) synthetisiert (**Tab. 2.1 [A]** und **[B]**).

Tabelle 2.1 Übersicht der verwendeten Primer für RT-PCR [A] und RACE-PCR [B].

#### A

Primer (RT-PCR)	Sequenz (5'-3')
A17-22-up	TCCTCATCCTTATCATCCTCATCCT
A17-112-lo	GTGGGGATGATGGTCGGG
A17-f-length-64-up	CAGGACCCCAAATAAAATCAAAGGCTATCACA
A17-f-length-1176-lo	TGACCGGTGGTGTGTACTTCGTAAC
<i>Et</i> ACTIN-up	CTGTGAGAAGAACCGGGTGCTCTTC
<i>Et</i> ACTIN-lo	CGTGCGAAAATGCCGGACGAAGAG
T7-2N-4-up	GTACATGTAGCGGGGAGCCGGCACAAT
T7-2N-102-up	CAGATGATCAGGAGCTGCATCAGAGAGACAG
T7-2N-474-lo	CTGCCGCTACTTCTATTGCTGCGCTGAC
T7-2N-487-lo	CTCAGCGGTGCTGCTGCCGCTACTTCTATT

#### B

Primer (RACE-PCR)	Sequenz (5'-3')
A17-22-up	TCCTCATCCTTATCATCCTCATCCT
A17-max-90-up	TGAGGACTATCCTAGCCACCCTAGTCGGTTTC
A17-max-150-up	GAGCACCTGAGTATCCTTCTCAGCTTGCAATT
A17-112-lo	GTGGGGATGATGGTCGGG
A17-max-533-lo	TATGTTTCATGATGATGATGGTGAGGATGATGG
A17-max-631-lo	AGGATGCGCAAATGGTAGTCATGGTGATAAT
T7-2N-4-up	GTACATGTAGCGGGGAGCCGGCACAAT
T7-2N-102-up	CAGATGATCAGGAGCTGCATCAGAGAGACAG
T7-2N-229-up	GCTACACGAAGATGTCCAGAAAAGTTCCCATC
T7-2N-246-up	AGAAAAGTTCCCATCATCAGCACCCCAT

### 2.14.2 RT-PCR

Die RT-PCR umfaßt die Reverse Transkription (RT) von Gesamt-RNA und anschließende PCR zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels sequenzspezifischer Primer. Der Reaktionsansatz für die RT setzte sich wie folgt in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammen: 3,5 µg Gesamt-RNA, 80 U

RNasin Ribonuklease Inhibitor (Promega, Heidelberg), 0,4 mM dNTP-Mix, 50 U AMV Reverse Transkriptase, 1 × AMV-Puffer (alles Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 5 mM DTT und 2,5 µM Random Hexamer Primer als Startmoleküle der cDNA-Synthese. Auf eine Inkubation für 10 min bei 22 °C folgte die cDNA-Synthese für jeweils 30 min bei 42 °C und 55 °C. Das Enzym wurde für 5 min bei 95 °C hitzeinaktiviert. Für jede RT wurden zwei weitere Reaktionen ohne Reverse Transkriptase bzw. RNA-Templat als Negativkontrollen durchgeführt. Für die sich anschließende PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1/10 der RT-Reaktionen als Templat eingesetzt. Zur Amplifikation wurden folgende PCR Systeme bei jeweils 0,4 µM der beiden sequenzspezifischen Primer (**Tab. 2.1 [A]**) gemäß den Herstellerangaben verwendet: ‚Triple Master PCR System‘ (Eppendorf, Hamburg), ‚Platinum Pfx DNA Polymerase‘ (Invitrogen, Groningen, NL) und ‚High Fidelity PCR System‘ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Der initialen Denaturierung für 2 min bei 94 °C folgten 35 Zyklen aus 15 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 63 °C und 2 min Kettenverlängerung bei 72 °C. Eine terminale Elongation für 10 min bei 72 °C beendete die Reaktion. 1/5 dieser Reaktion wurde zur Kontrolle in einem entsprechend prozentigen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

### 2.14.3 5'- und 3'-RACE-PCR

Als Ausgangsmaterial für die 5'- und 3'-RACE-PCR wurde Gesamt-RNA aus sporulierten Oocysten (für *Etos22*) oder aus Sporozoiten (für *EtCyP89*) von *E. tenella* unter Verwendung des ‚5'/3'-RACE Kits‘ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) eingesetzt. Die cDNA-Synthese, ‚tailing‘-Reaktion (nur bei 5'-RACE) und Amplifikation der cDNA mit sequenzspezifischen Primern, wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Darauf folgten für *Etos22* bei der 5'-RACE eine, bei der 3'-RACE zwei weitere nested-PCRs um die Amplifikation der 5'- und 3'-Enden zu steigern. Als sequenzspezifische Primer (**Tab. 2.1 [B]**) wurden in der 5'-RACE A17-max-631-lo (cDNA-Synthese), A17-max-533-lo (Amplifikation der dA-tailed cDNA) und A17-112-lo (nested-PCR) verwendet, in der 3'-RACE A17-max-90-up (Amplifikation der cDNA), A17-max-150-up (1. nested-PCR) und A17-22-up (2. nested-PCR). Zur Amplifikation des 3'-Endes von *EtCyP89* wurden für die 3'-RACE-PCR und anschließenden nested-PCRs die Primer T7-2N-4-up, T7-2N-102-up, T7-2N-229-up und T7-2N-246-up verwendet. Die in einem 1,3 %igen oder 2 %igen Agarosegel aufgetrennten RACE-PCR-Produkte wurden nach der Methode von Chomczynski (1992) auf eine neutrale Hybond-N Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert, mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert und zur Belichtung von Kodak Biomax MS Röntgenfilmen verwendet. Die so identifizierten spezifischen RACE-PCR-Produkte wurden kloniert, isoliert und sequenziert.

### 2.15 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden das ‚TOPO TA Cloning Kit‘ und das ‚pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit‘ (Invitrogen, Groningen, NL) benutzt. Die PCR-Produkte wurden mittels

‚NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit‘ (Macherey-Nagel, Düren) aus Agarosegelen isoliert und anschließend mit 5 U *Taq* DNA Polymerase (Promega, Heidelberg), 1 × *Taq* DNA Polymerase Puffer und 0,4 mM dNTP-Mix für 0,5 h bei 72 °C inkubiert. Die durch die Terminale Transferase-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase am 3‘-Ende adenylierten PCR-Produkte wurden ein weiteres Mal mittels ‚NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit‘ aufgereinigt und nach Herstellerangaben in der TOPO TA Klonierung eingesetzt.

## 2.16 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von klonierter DNA erfolgte nicht-radioaktiv nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Hilfe des automatischen DNA-Sequenzierers LI-COR 4000 der Firma MWG Biotech (Ebersbach). Sequenziert wurde mit 5‘-IRD-800-gekoppelten Primern für den Vektor pG8SAET (MWG Biotech, Ebersberg) sowie mit 5‘-IRD-800-gekoppelten Standardprimern (LI-COR Bioscience, Bad Homburg) (**Tab. 2.2**).

### 2.16.1 5‘-IRD-800-gekoppelte Primer

**Tabelle 2.2** Übersicht der verwendeten 5‘-IRD-800-Sequenzierprimer.

5‘-IRD-800-Primer	Sequenz (5‘-3‘)
pG8SAET-up	TAGGTGTAGGTATTGCATCTGTAACCT
pG8SAET-lo	CGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGCA
pG8SAET-seq-up-140	ATGATGACTTTACAAATACATACAGGG
A17-sequit-27-up	CGAGGAAGAGCAGCTTACCGACATCAACTAAG
A17-sequit-44-up	CCGACATCAACTAAGCTATTGGTCGGGAATTA
A17-sequit-385-lo	ATGAGGATAATTTGGCTGAGGATGCGGATAAT
A17-sequit-351-lo	GGATGAGGATGGAGGTGAAAGTGGTAAGTTGT
M13 reverse	CGAGAAACAGCTATGAC
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
T7-Promotor	ATTATGCTGAGTGATATCCC
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
T7-2N-sequit-57-up	TTGCAATAGCAATGAGCCTG
T7-2N-sequit-145-up	AGACGGAGGGCTCGAaATGTGGAGTATACAGT
T7-2N-sequit-242-up	CACCTCTTTGACCTACAGAGAAACGGAACGAC
T7-2N-sequit-250-up	AAGTTCCCATCATCAGCACC
T7-2N-sequit-748-up	AAAAGCATTAGCAACAGCAGCAACAGCAAATC
T7-2N-sequit-934-up	CTTCTTGAGCAGCTCCCAAGTGCAAATAGGTA
T7-2N-sequit-1179-up	TGACATTTGCTTTTCAGCAGAC
T7-2N-sequit-766-lo	AGCTGCTCAAGAAGCAAAGC
T7-2N-sequit-1314-lo	AGGTCAAAGAGGTGCGTTTC
T7-2N-sequit-1858-lo	TCGCGCGTGTCTAATATGTC
T7-2N-sequit-2342-lo	GATCTTCAGAACAACATCTGCG

### 2.16.2 Sequenzierung mit Thermo Sequenase

Für die Sequenzreaktion wurden das ‚Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit‘ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sowie mit dem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff IRD-800-gekoppelte Primer (MWG Biotech, Ebersbach) verwendet. Pro Reaktion wurden dabei 1,5 µg Plasmid-DNA und 2 – 4 µl 5'-IRD-800-gekoppelter Primer (1 pmol/µl) in einem Gesamtvolumen von 13 µl gemischt und je 3 µl dieses Ansatzes zu je 3 µl des jeweiligen A, C-, G- oder T-Nukleotid-Mixes gegeben und anschließend mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Die Sequenzreaktion erfolgte dann in einem PTC 100 Thermocycler (MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf). Dabei folgten auf eine 2-minütige Denaturierung bei 94 °C 30 Zyklen von Denaturierung (94 °C für 30 s), Annealing (55 °C für 30 s) und Strangsynthese (72 °C für 1,5 min). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6 µl Formamid-Ladungspuffer abgestoppt. Unmittelbar vor dem Auftragen der Sequenzreaktion auf das Sequenziergel wurden die Reaktionen für 3 min bei 72 °C denaturiert und sofort danach lichtgeschützt auf Eis gelagert. Die fluoreszenzmarkierten Kettenabbruch-Fragmente wurden in 40 cm langen, 0,25 mm dünnen, 6 %igen Gelen aus modifiziertem Polyacrylamid (Ultra Pure Sequagel XR, National Diagnostics; Atlanta, USA) mit 8 M Harnstoff in 1 × TBE-Puffer bei 1.500 V und 50 °C aufgetrennt und in Echtzeit über eine Laser-Photomultiplier-Einheit detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software Base Imager 4.0 von LI-COR (MWG Biotech, Ebersbach).

### 2.16.3 Computeranalyse von Sequenzdaten

Die durch Sequenzanalyse erhaltenen Daten wurden zunächst mit den Programmen ‚Molecular BioComputing Suite‘ (Muller *et al.*, 2001) und Sequenzen 3.0 aufgearbeitet und die deduzierten Proteinsequenzen ermittelt. Für die Datenbank-Recherche, also den Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen in den Datenbanken EMBL, SwissProt, TrEMBL und TrEMBL\_NEW oder mit den Daten des *E. tenella* Genomprojekts ([www.sanger.ac.uk/Projects/E\\_tenella/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/)), wurden die Programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990) und omniBLAST benutzt. Das ‚Alignment‘ von zwei oder mehreren DNA- oder Proteinsequenzen wurde mit Hilfe der Programme ‚BLAST 2 sequences‘ ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tatusova and Madden, 1999), ClustalW ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) (Thompson *et al.*, 1994) und DIALIGN (Morgenstern *et al.*, 1998; 1999) durchgeführt. Für Recherchen zu Exon-Intron-Strukturen von Genen wurden Einträge der ‚Intron-Exon Knowledge Base‘ unter <http://intron.bic.nus.edu.sg/iekb> (Sakharkar *et al.*, 2000) abgerufen. Zur Identifizierung konservierter Proteindomänen und ihrer graphischen Darstellung wurde ScanProsite (Gattiker *et al.*, 2002; Falquet *et al.*, 2002) verwendet. Weiterhin wurden die Programme SignalIP ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) (Nielsen *et al.*, 1997) zur Identifizierung von Signalpeptiden und Clone Manager 5 zur Planung von Klonierungen und Restriktionen und zur Suche nach offenen Leserastern genutzt.

### 2.17 Herstellung von Proteinextrakten aus *E. coli*

2 ml *E. coli* TG1 aus einer stationären Übernacht-Kultur wurden pelletiert, 1 × mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und in 300 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. 100 µl 4 × RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) wurden hinzugegeben und die Probe für 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Anschließend wurde die genomische DNA im Ansatz durch eine kurze Ultraschall-Behandlung fragmentiert und jeweils 10 µl dieser Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

### 2.18 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Western Blot

#### 2.18.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (1970). Dazu wurde die ‚Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell Apparatur‘ (BIO-RAD, München) benutzt. Die Gelgröße beträgt in diesem System 8 × 10 cm. Es wurden Trenngele mit 15 % Polyacrylamid verwendet. Die Konzentration der Sammelgele betrug einheitlich 4,5 % Polyacrylamid. Die Auftrennung erfolgte bei 40 mA für ca. 2 - 2,5 h. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 µl des ‚Prestained SDS Molecular Weight Marker Mix‘ (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

#### 2.18.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der Semi-Dry-Methode (Kyhse-Anderson, 1984) auf Protran BA 85 Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet. Dabei wurde ein kontinuierliches Puffer-System (Lihme *et al.*, 1986) verwendet, bei dem nur die in Blotpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen zwei Graphitplatten (Biometra Fast Blot, Göttingen) als Pufferreservoir dienen. Zwischen diesen Graphitplatten wurde ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer Stromstärke von 60 mA für 2 h aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten reversibel durch Ponceau S angefärbt und mit dH<sub>2</sub>O wieder entfärbt.

#### 2.18.3 Immundetektion

Die Nitrozellulosemembran wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) eingerollt und rotierend für 1 h mit 10 ml 1 × RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe)

inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde diese Block-Lösung gegen 50 µl 50fach aufkonzentrierten Hybridoma-Kulturüberstand des monoklonalen Antikörpers E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Primärantikörper) in 10 ml 1 × RotiBlock-Lösung ausgetauscht. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurde die Membran 3 × für insgesamt 0,5 h mit PBS/0,05 % Tween-20 gewaschen, um den nicht-gebundenen Überschuss an Primärantikörpern zu entfernen. Dann wurde der Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus IgG ‚Horse Radish‘ Peroxidase- (HRP-) gekoppelt (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA) 1:4.000 verdünnt in 10 ml 1 × RotiBlock-Lösung für 1 h hinzugegeben. Erneut wurde 3 × für insgesamt 0,5 h mit mit PBS/0,05 % Tween-20 gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nun durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des ‚ECL Western Blotting Detektionssystems‘ (Amersham Pharmacia, Freiburg) in Anlehnung an Roswell und White (1978). Gleiche Volumina der Detektionsreagenzien 1 und 2 wurden dafür gemischt und auf die Membran gegeben (0,125 ml/cm<sup>2</sup>). Nach 1 min wurde die Flüssigkeit abgenommen, die Membran 1 × kurz mit PBS/0,05 % Tween-20 gespült und anschließend luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien gelegt. Die Exposition erfolgte auf ECL Hyperfilm (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 2 - 5 min bei RT.

### 2.19 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA war abhängig von der Größe der verwendeten Sonden. DNA-Fragmente >800 bp wurden durch ‚random priming‘ mit [<sup>32</sup>P]dCTP in Anlehnung an die Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) markiert. Für diese Markierungsreaktion wurde das ‚Megaprime DNA Labelling Kit‘ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurden 40 ng DNA und 50 µCi [<sup>32</sup>P]dCTP (10 µCi/µl, spez. Aktivität >3.000 Ci/mmol) eingesetzt.

Sehr kleine DNA-Fragmente, wie zum Beispiel Oligonukleotide, wurden mit [<sup>32</sup>P]-ATP radioaktiv markiert. Bei dieser Reaktion katalysiert die T4 Polynukleotid Kinase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) den Transfer des [<sup>32</sup>P]ATP auf die 5'-OH-Gruppe der DNA. Es wurden 20 ng Oligonukleotide und 100 µCi [<sup>32</sup>P]ATP (10 µCi/µl, spez. Aktivität >4.500 Ci/mmol) verwendet. Nach der Markierungsreaktion wurden nicht-eingebaute Nukleotide mit dem ‚NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit‘ (Macherey-Nagel, Düren) abgetrennt. Die so markierte und gereinigte DNA wurde vor der Verwendung zur Hybridisierung für 5 min denaturiert.

### 2.20 Southern Blot: DNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierung

Mit dieser Technik wurden PCR-Produkte, rekombinante Plasmide und genomische DNA auf eine neutrale Hybond-N Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Die genomische DNA wurde zuvor mit diversen Restriktionsendonukleasen verdaut (10 µg pro Restriktionsansatz) und über Nacht bei 20 mV in einem 0,6 %igen, 14 cm langen Agarosegel

aufgetrennt. Zur genauen Bestimmung der Kopienzahl von *Etos22* wurden außerdem *DraI*-verdaute hochreine genomische DNA von *E. tenella* sowie *XhoI*-linearisiertes pcDNA3.1/V5-His-TOPO mit einkloniertem *Etos22* (Position 1-1.106) in Verdünnungsreihen von definierter Mengen- bzw. Molekülzahl (**Tab. 2.3**) auf dieselbe Art und Weise gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Blot erfolgte nach der Methode von Chomczynski (1992) durch abwärts gerichteten Kapillartransfer in alkalischem Transferpuffer pH 11,40 - 11,45 für 2 h oder über Nacht. Vor dem Transfer wurde die DNA im Gel für 1 h in Denaturierungspuffer denaturiert und anschließend für 10 min in alkalischem Transferpuffer inkubiert. Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran für 15 min mit 0,2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8) neutralisiert und für 20 min bei 80 °C gebacken. Die DNA auf der Membran wurde nun zur Hybridisierung durch radioaktiv-markierte Sonden genutzt. Zunächst wurde die Membran jedoch für 1 h zum Prähybridisieren mit Rapid-Hyb Hybridisierungspuffer bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 60 °C. Für die Waschlösung wurde eine 20 × SSC-Stammlösung verwendet. Die Membran wurde nacheinander für 30 min in 2 × SSC, 0,1 % SDS und für 30 min bis 2 h in 1 × SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Die Exposition der Membran erfolgte auf Kodak Biomax MS Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei -80 °C bzw. auf Fujifilm Imaging Plate BAS-MS 2025 bei RT. Die Intensität der Belichtung wurde anschließend mit dem Programm QuantiScan 1.5 quantifiziert.

**Tabelle 2.3 Pipettierschema für den quantitativen Southern Blot.** Angegeben sind die in den jeweiligen Spuren aufgetragenen Kopienzahlen von pcDNA3.1-*Etos22* und dem haploiden, *DraI*-verdauten Genom von *E. tenella* mit den ihnen entsprechenden Mengenangaben.

Spur	Kopien pcDNA3.1- <i>Etos22</i>	Menge pcDNA3.1- <i>Etos22</i>	Kopien haploides Genom von <i>E. tenella</i>	Menge genomische DNA von <i>E. tenella</i>
1	100.000.000	726 pg	25.856.313	1,7 µg
2	50.000.000	363 pg	12.928.157	0,85 µg
3	25.000.000	181,5 pg	6.464.078	0,425 µg
4	12.500.000	90,8 pg	3.232.039	212,5 ng
5	6.250.000	45,4 pg	1.616.019	106,3 ng
6	3.125.000	22,7 pg	808.010	53,1 ng
7	1.562.500	11,3 pg	404.005	26,6 ng

### 2.21 Elektrophorese von RNA und Northern Blot

Sämtliche Arbeitsschritte zur Elektrophorese von RNA wurden unter RNase-freien Bedingungen mit 0,1% DEPC-behandelten und anschließend autoklavierten Puffern durchgeführt. Die Denaturierung der RNA mit Glyoxal und DMSO sowie die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989). 20 µg RNA in einem Volumen von 5,4 µl wurden mit 5,4 µl deionisiertem 6 M Glyoxal, 16,0 µl DMSO und 3 µl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) versetzt und 1 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 6 µl Glyoxal-Ladungspuffer zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2 %igen Agarosegel in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) bei 3 – 4 V/cm. Mit Hilfe einer abwärts gerichteten Kapillarblot-Technik unter Verwendung eines alkalischen

Transferpuffers (3 M NaCl, 8 mM NaOH, pH 11,40 - 11,45) (Chomczynski, 1992) wurde die RNA auf eine neutrale Hybond-N Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geblotet. Die Membran wurde 15 min in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8) neutralisiert und schließlich 20 min bei 80 °C gebacken. Zur Größenabschätzung wurden 10 µg *EcoRI/HindIII* verdaute λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) glyoxyliert und parallel zur RNA aufgetrennt. Die Spuren mit λ-DNA wurden nach der Elektrophorese vom Rest des Gels abgetrennt, zum Entfernen des Glyoxals für 20 min in 50 mM NaOH gewaschen, 15 min in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) neutralisiert und schließlich im gleichen Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Hybridisierung erfolgte wie für den Southern Blot beschrieben, jedoch unter stringenteren Bedingungen bei 65 °C und mit 0,1 × SSC, 0,1 % SDS als zweitem Waschpuffer.

## **2.22 Lokalisation von Antigenen des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> in *E. tenella***

### **2.22.1 Immunfluoreszenz**

$3 \times 10^7$  sporulierte Oocysten wurden für 2 min bei 14.000 rpm pelletiert, 1 × mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend mit einem dem Pellet entsprechenden Volumen Glasperlen (ø 0,45 - 0,5 mm) für 2 min gevortext, bis ein Teil der im Ansatz enthaltenen Oocysten und Sporocysten ruptiert war (mikroskopische Kontrolle). Diese Zellen und Zelltrümmer wurden pelletiert, in -20 °C kaltem Methanol resuspendiert und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Resuspension in PBS<sup>-</sup>/0,1 % Triton X 100 für 10 min bei RT. Es folgte wiederholtes gründliches Waschen mit PBS<sup>-</sup>, bevor unspezifische Bindungsstellen am Zellmaterial durch rotierende Inkubation in Blockpuffer (PBS<sup>-</sup>/1% BSA) für 1 h bei RT abgesättigt wurden. Danach wurden 25 µl des 50fach aufkonzentrierten Hybridoma-Kulturüberstands des monoklonalen Antikörpers E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Primärantikörper) in 1 ml Blockpuffer hinzugegeben und für 2 h rotierend inkubiert. Durch 3maliges Waschen mit PBS<sup>-</sup> für insgesamt 0,5 h wurde der Überschuss an Primärantikörpern entfernt, bevor das Zellmaterial für 1 h rotierend und lichtgeschützt mit dem 1:100 verdünnten Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, Göppingen) inkubiert wurde. Nach 3fachem Waschen mit PBS<sup>-</sup> wurde das Zellpellet in Mowiol (Polyscience Inc., Niles, IL, USA) resuspendiert, 15µl dieser Suspension auf Objektträger ausgebracht, mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Sporozoitien, die zuvor wie unten beschrieben excystiert wurden, wurden für 10 min bei 1.500 rpm pelletiert und 1 × mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl -20 °C kaltem Methanol resuspendiert und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Jeweils 30 µl dieser Suspension wurden anschließend auf Objektträger aufgetropft. Die angetrockneten Sporozoitien wurden anschließend mit Blockpuffer (PBS<sup>-</sup>/1% BSA) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer bedeckt, um unspezifische Bindungsstellen der Sporozoitien abzublocken. Der Blockpuffer wurde anschließend gegen in Blockpuffer 1:40 verdünnten aufkonzentrierten Hybridoma-Kulturüberstand des monoklonalen Antikörpers E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Primärantikörper) ersetzt und die Objektträger für 2 h in einer feuchten Kammer bei

37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle erfolgte dieser Schritt ohne Zugabe des Hybridoma-Überstands. Anschließend wurde 3 × gründlich mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen, und die Sporozoiten dann für 1 h und lichtgeschützt mit dem 1:100 verdünnten Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG (H+L) (MoBiTec GmbH, Göppingen) bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem 3fachen Waschen wurden die Sporozoiten zum Anfärben der Zellkerne für 3 min mit 300 nM DAPI in PBS<sup>-</sup> bedeckt, erneut gründlich gewaschen und mit 15 µl Mowiol eingedeckelt.

### 2.22.2 Konfokale Laserscanning- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT (Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz des Alexa 488 Farbstoffes wurde mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch Oocysten und Sporocysten wurden mit einer Auflösung von 1.024 × 1.024 Pixeln gescannt. Weitere Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Leica DMLB Mikroskop, das mit einer Leica DC300I Kamera verbunden ist, gemacht. Für das Fluorchrom DAPI wurde der Filter A4, für Alexa Fluor 488 der Filter I3 verwendet und als Software das Programm Leica IM500 Version 1.20 zur Digitalisierung der Bilder benutzt. Die Aufarbeitung der Aufnahmen erfolgte mit den Programmen Adobe Photoshop 6.0 und Corel Draw 10.0 für Windows.

### 2.23 Excystierung von Sporozoiten

Zur Gewinnung frischer Oocysten wurden 2 - 3 Wochen alte Hühnerküken mit ca. 5.000 sporulierten Oocysten von *E. tenella* mittels einer Schlundsonde infiziert. Am 7. Tag nach der Infektion wurden die Tiere getötet und der Inhalt der Blinddärme in 2 %iger Kaliumdichromatlösung gesammelt. Unter Rühren bei ca. 28 °C sporulierten die Oocysten innerhalb von 48 h. Zur Sporocystengewinnung wurden die Oocysten mit einem Potter aufgebrochen. Dafür wurden in das Pottergefäß etwa 1,5 ml konzentrierte Oocystensuspension pipettiert und bei 1.300 rpm ruptiert, bis alle Oocysten aufgebrochen waren (mikroskopische Kontrolle).

Die freigewordenen Sporocysten wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) gesammelt und bei 2.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml PBS resuspendiert und über Nacht unter Zusatz von 10 µg/ml Baytril (BAYER, Leverkusen) auf 4 °C gelagert. Am nächsten Morgen wurde die Suspension pelletiert und die Sporocysten in einem Gemisch aus 1 ml Gallensaft und 20 ml sterilfiltriertem PBS-Trypsin resuspendiert. Davon wurden für parallele Excystierungsversuche jeweils 2 ml Aliquots verwendet, ohne und unter Zugabe von 100 µl des 50fach aufkonzentrierten Hybridoma-Kulturüberstands des monoklonalen Antikörpers E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>. Diese Ansätze wurden in einem 41,5 °C-temperierten Brutschrank für

5 h inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl freier Sporozoiten sowie nicht-geschlüpfter Sporozoiten in den Sporocysten für beide Ansätze mit einer Bürkerkammer bestimmt.

## 2.24 DNA-Immunisierung mit *Etos22*

Diese relativ neue und elegante Methode der Vakzinierung beruht auf dem Prinzip, das für ein immunogenes Protein codierende Gen eines Erregers in einen geeigneten eukaryotischen Expressionsvektor zu klonieren, diesen in *E. coli* zu replizieren, endotoxinfrei aufzureinigen und über eine von vielen möglichen Inokulationsmethoden in den Wirt einzubringen. Oshop *et al.* (2002) geben dazu mit dem Schwerpunkt auf der DNA-Immunisierung von Geflügel einen Überblick. In diesem Versuch sollten erste Erkenntnisse gewonnen werden, ob die Immunisierung mit *Etos22* möglicherweise zu einer partiellen Protektion von Broilern gegen eine *E. tenella*-Infektion führt.

Bei dem Impfstoff handelt es sich um den vollständigen ORF von *Etos22* (enthalten im PCR-Produkt von Position 1-1.106; **Abb. 3.7**), der nach Herstellerangaben in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO (5.523 bp) kloniert wurde (pcDNA3.1-*Etos22*, 6.629 bp). Dieser Vektor hat sich in mehreren Studien als geeignet für die Genexpression in Geflügel erwiesen (Heckert *et al.*, 2002; Kopko *et al.*, 2000). Dabei steht die Expression von *Etos22* unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotors, der sich für die Genexpression in Geflügel gegen andere Promotoren durchgesetzt hat (Kodihalli *et al.*, 1997; Suarez and Schultz-Cherry, 2000; Oshop *et al.*, 2002). Ein BGH- (bovine growth hormone) Polyadenylierungssignal wiederum beendet die Transkription und sorgt für die Polyadenylierung der mRNA (Goodwin and Rottman, 1992). Als Negativkontrolle in diesem Versuch diente pcDNA3.1/V5-His-TOPO ohne einkloniertes Insert (pcDNA3.1-0, 5.523 bp). Die Plasmide wurden nach Herstellerangaben in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und mittels ‚NucleoBond PC 500 EF Kit‘ in großem Maßstab aufgereinigt.

### 2.24.1 Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten

Zur Immunisierung wurden stets 50  $\mu$ g pcDNA3.1-*Etos22* bzw. pcDNA3.1-0 pro Tier verwendet. Die Applikation der Plasmide erfolgte entweder intramuskulär (i.m.) in den Oberschenkel mit einer Dosierung von  $2 \times 25$   $\mu$ g DNA in jeweils 50  $\mu$ l PBS<sup>-</sup> (Gruppen K0 i.m. 1, 2 und CT i.m. 1, 2), oder transcutan (t.c.) auf der Flügelunterseite im Mischungsverhältnis 1:1 mit DMSO. Pro Flügel wurden dabei 50  $\mu$ l dieses Gemischs mit jeweils 25  $\mu$ g DNA (Gruppen K0 t.c. 1, 2 und CT t.c. 1, 2) aufgetragen. Erstmals vakziniert wurden die Tiere im Alter von 11 Tagen. Eine zweite Immunisierung erfolgte 2 Wochen später im Alter von 25 Tagen. Wiederum ca. 2 Wochen später, im Alter von 38 Tagen, wurden die Tiere individuell per Schlundsonde mit 15.000 sporulierten Oocysten von *E. tenella* VT-2 in 0,3 ml dH<sub>2</sub>O infiziert (Haberkorn and Greif, 1999). Der Versuch wurde 8 Tage *p.i.* mit der Sektion der Tiere abgeschlossen. Eine Übersicht über die verschiedenen Testgruppen (2 Replicas) gibt **Tab. 2.4**:

## Material & Methoden

**Tabelle 2.4 Übersicht über die verschiedenen Testgruppen bei der DNA-Immunisierung mit *Etos22*.** K0 sind die nicht-infizierten Kontrollgruppen, die intramuskulär (i.m.) oder transcutan (t.c.) mit pcDNA3.1-0 vakziniert wurden, Ki ist die infizierte Kontrollgruppe und bei CT handelt es sich um die infizierten Gruppen, die i.m. oder t.c. mit pcDNA3.1-*Etos22* vakziniert wurden. Bei Versuchsbeginn (Tag 11) wurde zum ersten Mal immunisiert, zwei Wochen später (Tag 25) zum wiederholten Mal. Die Tiere der Gruppen Ki und CT i.m. und t.c. wurden am Tag 38 mit 15.000 sporulierten Oocysten (VTZK) infiziert und am Tag 8 *p.i.* (Tag 46) wurde die Sektion durchgeführt.

Gruppe	Bezeichnung	Anzahl Tiere	Testgruppe	Immunisierung		Infektion Challenge
				i.m.	t.c.	
1	K0 i.m. 1	4	Kontrolle	pcDNA-3.1-0/PBS	-	-
2	K0 t.c. 1	4	Kontrolle	-	pcDNA-3.1-0/DMSO	-
3	Ki 1	4	inf. Kontrolle	-	-	VTZK
4	CT i.m. 1	4	Behandlungsgruppe	pcDNA-3.1- <i>Etos22</i>	-	VTZK
5	CT t.c. 1	4	Behandlungsgruppe	-	pcDNA-3.1- <i>Etos22</i>	VTZK
6	CT t.c. 2	4	Behandlungsgruppe	-	pcDNA-3.1- <i>Etos22</i>	VTZK
7	CT i.m.2	4	Behandlungsgruppe	pcDNA-3.1- <i>Etos22</i>	-	VTZK
8	Ki 2	4	inf. Kontrolle	-	-	VTZK
9	K0 t.c. 2	4	Kontrolle	-	pcDNA-3.1-0/DMSO	-
10	K0 i.m. 2	4	Kontrolle	pcDNA-3.1-0/PBS	-	-

Folgende Parameter wurden zur Dokumentation des Infektionsverlaufs und zur Auswertung des Versuchs bestimmt: das Gewicht der Tiere im Alter von 11, 19, 25, 32, 38 (Tag der Infektion), 42 (Tag 4 *p.i.*) und 46 (Tag 8 *p.i.*) Tagen, Blutausscheidungen im Kot am Tag 4 und 7 *p.i.*, Oocystenausscheidungen am Tag 8 *p.i.* und schließlich die Beurteilung der Darmläsionen (Tag 8 *p.i.*) (Haberhorn and Greif, 1999). Die Mortalität der Tiere wurde täglich kontrolliert. Zum Nachweis von *EtOS22*-spezifischen Immunglobulinen wurde den Tieren zu folgenden Zeitpunkten aus der Kopfvene Blut abgenommen: im prä-immunen Status im Alter von 11 Tagen, zwei Wochen nach der 2. Immunisierung im Alter von 38 Tagen und unmittelbar vor der Sektion im Alter von 46 Tagen (8 Tage *p.i.*). Das Blut wurde in S-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) aufgezogen, das Serum nach Herstellerangaben aufbereitet und bis zur weiteren Verwendung im ELISA bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.24.2 ELISA zum Nachweis *EtOS22*-spezifischem IgG

Der Nachweis von *EtOS22*-spezifischem IgG im Serum immunisierter Tiere sollte durch einen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) erbracht werden. Als Antigen diente das in den Vektor pG8SAET klonierte und auf der Phagenoberfläche exprimierte ORF von *Etos22* (Pos. 138–670; 532 bp) ohne Signalpeptid. Da das ORF von *Etos22* auf der Phagenoberfläche in Fusion mit dem E-tag

exprimiert wird, konnten anti-E-,tag' Antikörper zur Immobilisierung der Phagen auf der Matrix der ELISA-Mikrotiterplatten verwendet werden.

Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit 1 µg/,well' anti-E-,tag' Antikörper (Amersham Pharmacia, Freiburg) in einem Volumen von jeweils 100 µl ,coating'-Puffer beschichtet. Am nächsten Morgen wurden der nicht-gebundene Überschuß an Antikörpern durch 3faches Waschen mit je 100 µl ELISA-Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween-20, pH 7,2) entfernt und freie unspezifische Bindungsstellen der Mikrotiterplatten für 1 h bei RT mit je 100 µl Blockierungspuffer (PBS/1 % BSA) abgesättigt. Nach 3 weiteren Waschschritten mit Waschpuffer und einem mit ELISA-Puffer wurden pro ,well'  $4,8 \times 10^8$  *Etos22*-exprimierende Phagen verdünnt in je 50 µl ELISA-Puffer hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nicht-gebundene, überschüssige Phagen wurden anschließend, wie zuvor beschrieben, mit Waschpuffer und ELISA-Puffer entfernt. Zur Aufreinigung der Hühnerseren gegen kreuzreagierende *E. coli*-Antigene, die als Kontamination im Phagenkonzentrat enthalten sind, wurden die Antiseren zuvor für 1 h rotierend mit *E. coli*-Zellen inkubiert und die adsorbierten Ak anschließend mit den Zellen abzentrifugiert. Die Seren wurden jeweils 1:10 mit ELISA-Puffer verdünnt, in abnehmenden Verdünnungsreihen in einem Volumen von jeweils 50 µl/,well' aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit Waschpuffer und einem mit ELISA-Puffer wurde der biotinylierte Sekundärantikörper Esel-anti-Huhn IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA) 1:20.000 verdünnt in ELISA-Puffer für 45 min bei 37 °C hinzugegeben und nicht-gebundene Immunglobuline anschließend durch analoge Waschschrritte entfernt. Um einen verbesserten Nachweis des biotinylierten Sekundärantikörpers zu erzielen, wurden pro ,well' 50 µl eines in ELISA-Puffer 1:1.600 verdünnten Streptavidin-Biotin-Peroxidase-(HRP-)Komplexes (Amersham Pharmacia, Freiburg) hinzupipettiert. Nach einer Inkubation für 45 min bei 37 °C wurde der Überschuß dieses Komplexes durch folgende Waschschrritte (je 100 µl) entfernt: 2 × mit Waschpuffer, 1 × mit ELISA-Puffer und abschließend 2 × mit Citratpuffer. Anschließend wurde eine Tablette (2 mg) des Substrats Orthophenyldiamin (DAKO, Glostrup, Dk) in 4 ml Citratpuffer gelöst und 6,4 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Redoxmittel hinzupipettiert. Jeweils 50 µl dieser Substratlösung wurden pro ,well' hinzugegeben und die Farbreaktion nach 3 – 5 min durch den Zusatz von 30 µl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet. Die Messung der relativen Extinktion erfolgte unmittelbar danach bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im ELISA-Reader 2001 (Anthos, Köln).



## 3 Ergebnisse

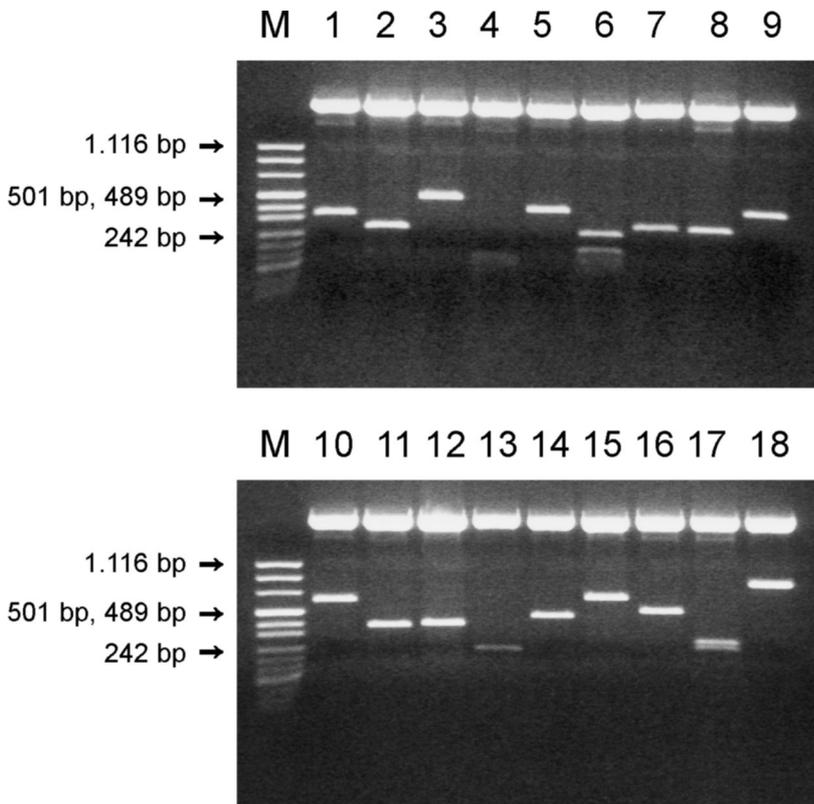
### 3.1 Genomische Expressionsbank von *E. tenella*

Die Gattung *Eimeria* ist gekennzeichnet durch einen komplexen Lebenszyklus, der verschiedene ungeschlechtliche und geschlechtliche Stadien des Parasiten hervorbringt. Entsprechend variabel gestaltet sich die Genexpression: Neben konstitutiven, sogenannten ‚house-keeping‘ Genen wie z. B. den Genen für Actin oder  $\beta$ -Tubulin (Zhu *et al.*, 1995) werden viele der bisher identifizierten Gene nur stadienspezifisch exprimiert, d. h. ihre Expression wird während des Entwicklungszyklus stark reguliert. Zu ihnen zählen beispielsweise die verschiedenen Mikronemproteine (Ryan *et al.*, 2000). Einen guten Einblick in die unterschiedlichen Expressionsmuster liefern auch vergleichende Analysen von EST-Daten verschiedener Entwicklungsstadien des Parasiten. Ng *et al.* (2002) geben eine vergleichende Gegenüberstellung der jeweils 12 häufigsten ESTs aus Sporozysten- bzw. Merozoiten-cDNA-Banken: Während im Sporozystenstadium Transkripte des Zellwachstums, der Zellteilung und der DNA-Synthese überwiegen, finden sich im Merozoitenstadium überdurchschnittlich viele Transkripte für Mikronemproteine und ribosomale Proteine. Diese variable Genexpression bestimmt die Überlegungen, die der Konstruktion einer DNA-Bibliothek zwecks Ligandenscreening vorausgehen: eine cDNA-Bibliothek wird immer nur einen Ausschnitt des gesamten Proteinrepertoires des Parasiten repräsentieren, während sich eine genomische DNA-Bibliothek nur zur Expression relativ kurzer codierender Abschnitte eignet und außerdem nicht-codierende DNA (Introns und Satelliten-DNA) sowie ungerichtet klonierte ‚antisense‘-Fragmente enthält. Die in der vorliegenden Arbeit konstruierte Expressionsbibliothek basiert auf genomischen DNA-Fragmenten einer Größe zwischen 200 und 700 bp: Zum einen ermöglicht sie ein stadienunabhängiges Ligandenscreening, zum anderen erübrigt sich dadurch die schwierige RNA-Isolation aus Gamonten, welche besonders für das Screening mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Mouafo *et al.*, 2002) notwendig gewesen wäre.

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Ligandenscreening basiert auf der Methode des Phagen-Display. Dafür wurde eine repräsentative genomische DNA-Bank des Parasiten im Phagemidvektor pG8SAET (Jacobsson and Frykberg, 1998; Zhang *et al.*, 1999) konstruiert. Idealerweise hat eine solche Bank eine Größe, die das gesamte Genom des Parasiten, im Fall von *E. tenella* 60 Mbp, in beiden Orientierungen und sämtlichen möglichen Leserastern repräsentiert. Auf Grundlage der Formel  $N = \ln(1-P) / \ln(1-X/Y)$  kann die Größe der DNA-Bank (N) berechnet werden, damit eine Einzelkopiesequenz mit der Wahrscheinlichkeit (P) darin enthalten ist. Dabei steht X für die durchschnittliche zu klonierende Fragmentgröße und Y für die Genomgröße des betreffenden Organismus. Daraus errechnet sich für die hier konstruierte Bibliothek mit  $P = 0,95$ ,  $X = 450$  bp und  $Y = 60$  Mbp bei ungerichteter Klonierung und unter Berücksichtigung sämtlicher möglichen Leseraster eine Bibliotheksgröße von  $7,2 \times 10^6$  Klonen. Mit insgesamt  $4,7 \times 10^6$  unabhängigen Transformanden und bei 95 % rekombinantem pG8SAET liegt die hier konstruierte genomische DNA-Bank zwar unter diesem Wert, jedoch in derselben Größenordnung. Während der Konstruktion dieser DNA-Bank wurde ihre Qualität mehrmals durch eine Restriktion der rekombinanten Plasmide mit den

## Ergebnisse

Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Bam*HI kontrolliert. Dabei wurden die in die *Sna*BI-Schnittstelle des Phagemidvektors klonierten *E. tenella*-DNA-Fragmente aus dem Vektor geschnitten, um deren Größe und den Anteil an rekombinanten Klonen zu überprüfen. Von insgesamt 64 isolierten Einzelklonen wiesen 61 (95,3 %) Inserts der gewünschten Größe auf. In **Abb. 3.1** ist eine solche Restriktionsanalyse zu sehen.



**Abbildung 3.1 Genomische DNA-Bank von *E. tenella* in pG8SAET: Restriktionsfragmentanalyse der Transformanten.** Nach Elektrottransformation des rekombinanten pG8SAET in *E. coli* TG1-Zellen wurden aus 18 beliebigen Transformanten Plasmide isoliert (Spur 1-18) und mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut. Die Restriktionsanalyse zeigt in sämtlichen Plasmiden klonierte *E. tenella*-Inserts einer Größe zwischen 200 bp und 700 bp. Zur Größenabschätzung wurde auf beiden Gelen pUC-Mix DNA Marker aufgetragen (M).

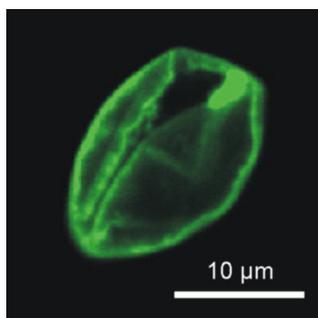
## 3.2 Funktionelle Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>)

Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen IgG2a aus der Maus (Mouafo *et al.*, 2002). Er richtet sich gegen die Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) der Makrogamonten, die am Aufbau der inneren Oocystenschale beteiligt sind. Im Western Blot detektiert dieser Antikörper bei Proteinextrakten aus infiziertem Wirtsgewebe (Caecum) eine Proteinbande bei ca. 51 kDa (136 *hpi*). Bei Immunpräzipitation eines Proteinextrakts aus Makrogamonten mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (138 *hpi*) werden im anschließenden Western Blot zwei starke Proteinbanden bei 51 und 46 kDa von diesem mAk detektiert. Später (144 *hpi*) erscheinen drei zusätzliche Proteinbanden bei ca. 23, 25, 30 kDa. In Proteinextrakten aus unsporulierten Oocysten (168 *hpi*) beschränkt sich das Bandenprofil auf die Signale bei 23, 25 und 30 kDa, wohingegen in sporulierten Oocysten neben der 30 kDa Proteinbande auch eine bei ca. 81 kDa vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> detektiert wird (Mouafo *et al.*, 2002). Das 51 kDa Protein

wurde mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt und 29 AS durch Edman Abbau sequenziert: VPTTVENTVHPYSEMGMHYQGRPYAAYMG (Mouafo, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte u. a. die für die entsprechenden Antigene codierende cDNA isoliert und charakterisiert werden.

### 3.2.1 Zelluläre Lokalisation der Antigene

Die Lokalisation der mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierenden Antigene in Oocysten, Sporocysten und Sporozoiten von *E. tenella* bestätigten zunächst die Arbeiten von Mouafo *et al.* (2002), welche eine immunochemische Charakterisierung des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> beschreiben, ohne vom Antikörper erkannte Proteine genau zu identifizieren. Dabei handelt es sich um ein oder mehrere Proteine, welche Bestandteil der Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) sind, und mit deren Hilfe sich die Bildung der inneren Oocystenwand verfolgen läßt. Während der mAk in jungen Makrogamonten (136 *hpi*) die WF II im Cytoplasma lokalisiert, sind diese in reifen Makrogamonten (140 *hpi*) nur noch in der Peripherie der Zelle nachweisbar. Nach Bildung der äußeren Oocystenwand durch Hüllbildungskörper vom Typ I (WF I) werden die vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannten WF II als kleinere Vesikel exocytiert und bilden die innere Oocystenwand. In mikroskopischen Schnitten durch Blinddarmgewebe experimentell infizierter Hühner (ab 140 *hpi*) zeigen die darin enthaltenen Oocysten Fluoreszenzsignale ausschließlich in der inneren Oocystenwand und nicht mehr im Cytoplasma, was darauf hindeutet, dass die mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierenden Antigene vollständig in die innere Oocystenwand integriert wurden (Mouafo, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden keine mikroskopischen Schnitte durch verschiedene Stadien des Parasiten angefertigt, sondern die Zellen intakt oder mechanisch ruptiert mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> inkubiert, was zusätzliche Hinweise auf die Lokalisation der vom mAk erkannten Antigene liefert. Die gleichmäßigen Fluoreszenzsignale der Oocystenwand bei ruptierten, nicht aber bei intakten Oocysten lassen auf eine Lokalisation der mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierenden Proteine in der inneren Schalenwand schließen (**Abb. 3.2**) und bestätigen somit die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen von mikroskopischen Schnitten durch Oocysten.

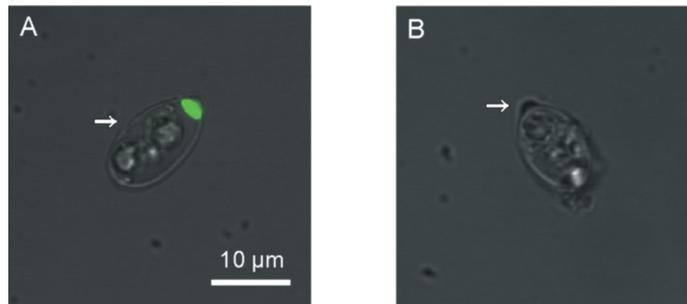


**Abbildung 3.2 Lokalisation der vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannten Antigene in Oocysten von *E. tenella* durch Konfokale Laserscanning Mikroskopie.** Als Primärantikörper wurde der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (IgG2a aus der Maus), als Sekundärantikörper ein Ziege anti-Maus IgG Konjugat Alexa 488 verwendet. Die Immunfluoreszenz zeigt eine gleichmäßige Reaktion des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> mit der inneren Oocystenwand, die durch die Hüllbildungskörper vom Typ II gebildet wird. Die dargestellte Oocyste wurde mechanisch ruptiert, nur so werden die entsprechenden Epitope für den Antikörper zugänglich. Bei intakten Oocysten sind keine Fluoreszenzsignale nachweisbar. Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser angeregt und das Objekt mit einem 100er Öl-Immersionsobjektiv (Leica PL APO 100x 1.40-0,7) betrachtet. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Oocysten wurden mit einer Auflösung von 1.024 × 1.024 Pixeln gescannt. Der Maßstab markiert eine Länge von 10 µm.

Darüber hinaus zeigte sich ein distinktes Fluoreszenzsignal im Bereich des sogenannten ‚Stieda-Körpers‘ der Sporocysten (**Abb. 3.3 [A]**) aus sporulierten Oocysten, einem Stadium des Parasiten, welches bei *E. tenella* frühestens 18 h nach dem Ausscheiden der unsporulierten Oocysten mit dem Kot zu beobachten ist (Long and Reid, 1982). Der Stieda-Körper steht in engem Zusammenhang mit der Excystierung, dem Schlüpfen der beiden Sporozoiten aus der Sporocyste. Die Tatsache, dass nur

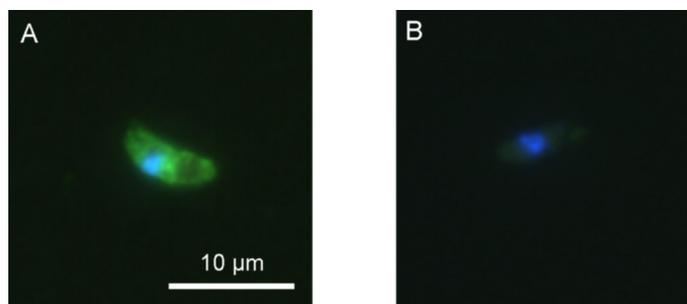
## Ergebnisse

in bereits ruptierten Sporocysten diese Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden können, erlaubt die Schlußfolgerung, dass der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> Strukturen erkennt, die im Inneren der Sporocyste lokalisiert, und kein Bestandteil der äußeren Sporocystenschale sind (**Abb. 3.3 [B]**).



**Abbildung 3.3 Lokalisation der vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannten Antigene in Sporocysten von *E. tenella* durch Konfokale Laserscanning Mikroskopie.** Als Primärantikörper wurde der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (IgG2a aus der Maus), als Sekundärantikörper ein Ziege anti-Maus IgG Konjugat Alexa 488 verwendet. In der ruptierten Sporocyste in **[A]** ist ein distinktes Fluoreszenzsignal unmittelbar unter dem Stieda-Körper zu erkennen, der weiße Pfeil markiert die laterale Ruptur. In **[B]** ist eine intakte und daher nicht-fluoreszierende Sporocyste dargestellt, hier markiert der weiße Pfeil den Stieda-Körper. Zu erkennen sind außerdem die sogenannten ‚refractile bodies‘ der beiden Sporozoiten innerhalb der Sporocysten. Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser angeregt und mit einem 63er Wasser-Immersion-Objektiv betrachtet. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Sporocysten wurden mit einer Auflösung von 1.024 × 1.024 Pixeln gescannt und mit den entsprechenden Durchlichtaufnahmen überlagert. Der Maßstabbalken markiert eine Länge von 10 µm.

Als drittes Parasitenstadium wurden aus den Sporocysten geschlüpfte Sporozoiten mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> als Primärantikörper inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Zum besseren Erkennen der Sporozoiten, insbesondere jener in der Kontrolle (Ansatz ohne den Primärantikörper E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>, nur mit dem Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG Konjugat Alexa 488), wurde eine zusätzliche blaue Färbung der Zellkerne mit DAPI durchgeführt. Die mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> inkubierten Sporozoiten weisen eine diffuse Oberflächenfluoreszenz auf, die in der Kontrolle nicht zu erkennen ist (**Abb. 3.4 [A], [B]**). Auch bei den sich noch in der Sporocyste befindenden Sporozoiten (**Abb. 3.3 [A]**) ist diese Fluoreszenz nicht zu erkennen. Möglicherweise handelt es sich daher um ein kreuzreagierendes Antigen, welches erst nach der Excystierung auf der Oberfläche der freien Sporozoiten exprimiert wird.



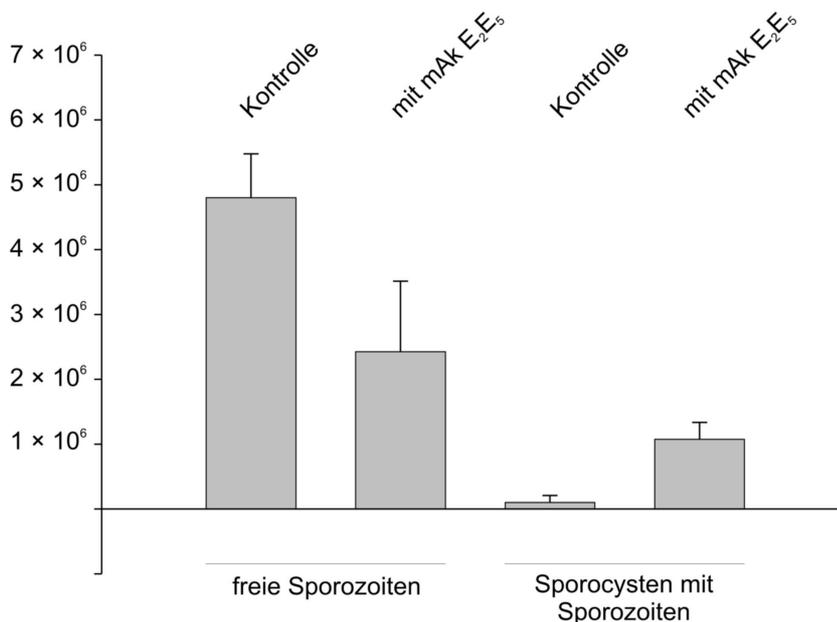
**Abbildung 3.4 Fluoreszenzsignale auf der Oberfläche von Sporozoiten von *E. tenella*.** Als Primärantikörper wurde der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (IgG2a aus der Maus), als Sekundärantikörper ein Ziege anti-Maus IgG Konjugat Alexa 488 verwendet. Die Zellkerne wurden anschließend mit DAPI angefärbt. Der Sporozoit in **[A]** weist eine diffuse Oberflächen-Fluoreszenz auf, die bei der Kontrolle in **[B]**, die ohne den Primärantikörper inkubiert wurde, fehlt. Hier ist lediglich der DAPI-gefärbte Zellkern des Sporozoiten zu erkennen. Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm, der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bei einer Wellenlänge von 358 nm angeregt und die Sporozoiten mit einem 100er Öl-Immersion-Objektiv betrachtet. Die mit den beiden Kanälen gemachten Aufnahmen wurden nachträglich überlagert. Der Maßstabbalken markiert eine Länge von 10 µm.

### 3.2.2 Der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> inhibiert die Excystierung

Oocysten stellen die Dauerstadien des Parasiten dar, die es ihm ermöglichen, außerhalb des Wirts lange Perioden unter ungünstigen Bedingungen zu überdauern. Die widerstandsfähigen Oocystenschalen schützen gegen extreme pH-Werte, Detergenzien, eine Vielzahl von enzymatischen Abbauprozessen und Reagenzien wie Natriumhypochlorid oder Dichromat (Ryley, 1973). In ihnen erfolgt die Sporulation mit nachweisbaren Veränderungen auf DNA- und Proteinebene (Wang and Stotish, 1975). Im Fall von *E. tenella* bilden sich dabei pro Oocyste vier Sporocysten, die jeweils zwei Sporozoiten enthalten (Hammond, 1973). Bei erneuter oraler Aufnahme durch einen geeigneten Wirt wird ein neuer Infektionszyklus begonnen. Der Prozeß, der zur Freisetzung der infektiösen Sporozoiten führt und somit den Übergang zum intrazellulären Entwicklungsabschnitt ermöglicht, wird als Excystierung bezeichnet. Dabei müssen zwei rigide äußere Schalen überwunden werden: Erstens die Oocystenschale, bestehend aus 67 % Peptiden, 19 % Kohlenhydraten und 14 % Lipiden. Die Peptide und Kohlenhydrate sind als Glykoproteine hauptsächlich in der 90 nm dicken inneren Schalenschicht zu finden, während die Lipide die Hauptkomponenten der 10 nm dicken äußeren Schalenschicht stellen (Stotish *et al.*, 1978). Die Oocystenschale wird allein durch die mechanische Bearbeitung im Kaumagen des Huhns aufgebrochen, was zur Freisetzung der Sporocysten führt. Zweitens die Sporocystenschale: Im Dünndarm des Huhns bildet sich unter Einfluß von Gallensalzen und Trypsin eine definierte Öffnung am anterioren Pol der Sporocystenschale, welche bis zu diesem Zeitpunkt vom Stieda-Körper verschlossen wurde. Die Sporozoiten verlassen bei Körpertemperatur des Wirts bzw. 42 °C *in vitro* die Sporocyste durch aktive Bewegungen und werden bei der Passage dieser Öffnung auf bis zu 25 % ihres normalen Durchmessers zusammengedrückt. Dieser Excystierungsprozeß wurde für einige Arten von *Eimeria* sehr genau beschrieben (Roberts *et al.*, 1970; Hammond *et al.*, 1970; Duszynski *et al.*, 1973).

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> lassen darauf schließen, dass dieser Proteine erkennt, die in unmittelbarer Nähe zum Stieda-Körper lokalisiert und möglicherweise an der Excystierung der Sporozoiten aus den Sporocysten beteiligt sind. Das wirft die Frage auf, ob die Erkennung oder Blockierung entsprechender Antigene durch den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> diesen Prozeß beeinflusst oder sogar hemmt. Zur Untersuchung von ‚target‘-Eigenschaften dieser Antigene während der Excystierung wurden parallele *in vitro* Excystierungsansätze mit und ohne Zugabe des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> durchgeführt. Anschließend wurde die Anzahl der geschlüpften Sporozoiten und der Sporocysten mit nicht-geschlüpften Sporozoiten in beiden Ansätzen (pro ml) bestimmt und diese Daten miteinander verglichen. Die Anzahl geschlüpfter Sporozoiten betrug in der Kontrolle  $4,8 \times 10^6$  bzw.  $2,4 \times 10^6$  in Gegenwart des mAk. Die Anzahl von Sporocysten mit nicht-geschlüpften Sporozoiten stieg hingegen von  $1,0 \times 10^5$  auf  $1,1 \times 10^6$  (**Abb. 3.5**). Diese Reduzierung freier Sporozoiten um etwa die Hälfte bei gleichzeitiger Zunahme von Sporocysten mit nicht-geschlüpften Sporozoiten um etwa das 11fache zeigt, dass sich die vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannten Strukturen als Zielmoleküle zur Hemmung der Excystierung von *E. tenella* eignen. Diese Daten lassen auf der Grundlage der mikroskopischen Beobachtungen folgende Hypothese zu: Die entsprechenden Antigene sind für den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> in intakten Sporocysten nicht zugänglich, sondern erst dann, wenn

der Stieda-Körper die Öffnung am anterioren Pol der Sporocysten freigibt. Während einem der beiden Sporozoiten das Schlüpfen zumeist noch gelingt, verbleibt der zweite Sporozoit häufig in der Sporocyste, da die Austrittsöffnung möglicherweise durch den mAk blockiert ist.



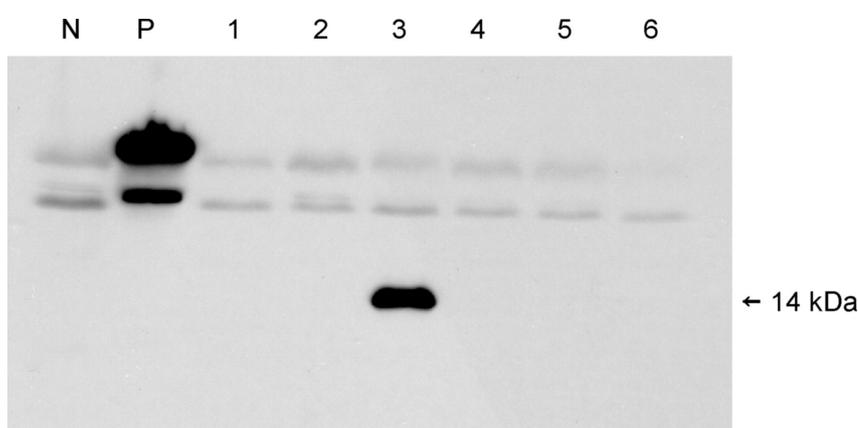
**Abbildung 3.5 Hemmung der Excystierung von *E. tenella* in vitro.** Nach parallelen Excystierungsversuchen wurden im Versuchsansatz ohne Zugabe des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Kontrolle) sowie im Versuchsansatz mit Zugabe des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> die Anzahl freier Sporozoiten und die Anzahl von Sporocysten mit ungeschlüpfen Sporozoiten pro ml bestimmt.

### 3.3 Phagen-Panning gegen den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>

Die Methode des Phagen-Panning oder Phagen-Display ermöglicht die Affinitätsselektion eines auf der Phagenoberfläche exprimierten Peptids oder Proteins durch einen an einer Matrix fixierten Liganden ganz unterschiedlicher stofflicher Natur und stellt somit eine attraktive Alternative zum klassischen ‚two-hybrid‘ System dar (Allen *et al.*, 1995). Die Möglichkeit mehrerer aufeinanderfolgender Selektionsrunden macht diesen methodischen Ansatz sehr effizient. Das Phagen-Display vereinfacht das Ligandenscreening sehr großer Bibliotheken ganz entscheidend, ist hochselektiv und lässt zudem Raum für mannigfaltige Abwandlungen, abhängig von der Fragestellung. In den letzten Jahren hat sich diese Methode zur Identifizierung von Liganden für Rezeptoren, Enzyme und Antikörper bewährt – sogar lebende Sporozoiten von *E. acervulina* wurden schon als ‚target‘ zur Identifizierung anti-mikrobieller Peptide aus sogenannten ‚random peptide libraries‘ eingesetzt (da Silva *et al.*, 2002). Der in dieser Arbeit verwendete Phagemidvektor pG8SAET stammt von einer Reihe immer weiter entwickelter Phagemidvektoren ab (Jacobsson and Frykberg, 1995; Jacobsson and Frykberg, 1996; Jacobsson and Frykberg, 1998; Zhang *et al.*, 1999) und führt zur Expression der inklonierten DNA-Fragmente innerhalb eines durchgängigen offenen Leserasters (ORF) aus Signalpeptid, DNA-Fragment, E-,tag‘ und Phagenhüllprotein VIII (‚major coat protein VIII‘). Als Matrix zur Fixierung der jeweiligen Liganden wurden DYNABEADS™ verwendet, die mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen oder Antikörpern auf ihrer Oberfläche kommerziell erhältlich sind.

### 3.3.1 Anreicherung von Klonen, die vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannt werden

Der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> wurde über das Fc-Fragment an die Oberfläche von DYNABEADS™ Pan Mouse IgG gebunden und im Phagen-Panning eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten DYNABEADS™ Pan Mouse IgG ohne weiteren Antikörper. Nach 3 Runden Phagen-Panning kam es zu einer 362fachen Anreicherung bindender Klone im Vergleich zur Negativkontrolle. Von ihnen wurden E-,tag'-exprimierende Klone für Western Blots mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> als Primärantikörper isoliert. Von 62 analysierten Klonen wurden 6 (A14, A17, A45 – A47 und A62) im Western Blot vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannt. Sämtliche detektierten Fusionsproteine zeigten das gleiche Laufverhalten in der SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kDa (**Abb. 3.6**). Diese Fusionsproteine setzten sich aus 125 AS zusammen, wovon sich 48 AS auf das, zunächst als ‚A17‘ bezeichnete, einklonierte Insert zurückführen lassen.



**Abbildung 3.6 Detektion des Fusionsproteins von Klon A17 durch den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> im Western Blot.** Von den beispielhaft dargestellten E-,tag'-exprimierenden Klonen A15 - A20 (Spur 1-6) nach 3 Runden Phagen-Panning gegen den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>, detektierte der Primärantikörper E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> ein ca. 14 kDa Fusionsprotein in Spur 3 (Klon A17). Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG eingesetzt. Für die Negativkontrolle (N) wurde Proteinextrakt aus pG8SAET-transformierten *E. coli* TG1-Zellen verwendet, für die Positivkontrolle (P) Gewebeextrakt aus infiziertem Hühnerblinddarm (137 *hpi*). Zur Trennung wurde ein SDS-Trenngel mit 15 % Acrylamid verwendet.

## 3.4 Das *E. tenella* Oocysten Sporocysten Protein (EtOS22)

### 3.4.1 Vollständige Sequenz der *Etos22*-cDNA

Die Phagenklone, deren Fusionsproteine im Western Blot mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> interagierten, wurden durch DNA-Sequenzierung analysiert. Sie enthielten ein 145 bp großes DNA-Fragment, welches im Raster +2, in dem eine Expression auf der Phagenoberfläche möglich ist, ein offenes Leseraster (ORF) aufweist. Ausgehend von dieser bekannten Sequenz ‚A17‘ (in **Abb. 3.7** dunkelgrau unterlegt), die exprimiert auf der Phagenoberfläche zur spezifischen Anreicherung dieses Klons geführt hatte, wurden durch 3'-RACE-PCR das vollständige 3'-Ende dieses Gens bis zum Poly-(A)-Schwanz amplifiziert. Am 5'-Ende der cDNA konnten durch 5'-RACE-PCR weitere 224 bp amplifiziert werden. Das Leseraster war weiterhin durchgehend. Es fehlte jedoch ein ATG-Startcodon, mit dem ein ORF

beginnt. Um das vollständige ORF dieses Gens durch RT-PCR zu amplifizieren, wurden auf Basis von Daten aus dem *E. tenella* Genomprojekt zwei neue Primer konstruiert: A17-f-length-64-up und A17-f-length-1176-lo, in der Sequenz durch Unterstriche gekennzeichnet, führten zu einem PCR-Produkt von 1.106 bp. So wurde das vollständige offene Leseraster amplifiziert. Die Primer hybridisieren im 5'- bzw. 3'-UTR der cDNA. Zwischen 5'-Primer und ATG-Startcodon befindet sich ein vorgeschaltetes Stop-Codon, wodurch sichergestellt ist, dass das PCR-Produkt das vollständige offene Leseraster enthält. Die *Etos22*-cDNA weist ein ORF von 594 bp bzw. 198 AS auf, das in Position 677 mit einem TAA-Stopcodon endet und einen GC-Gehalt von 51,1 % aufweist. Der 3'-UTR umfaßt 506 bp und ist im Verhältnis zum ORF relativ lang, ähnlich wie beispielsweise der 3'-UTR des Mikronemgens *Etmic-2* aus *E. tenella* (Tomley *et al.*, 1996). In **Abb. 3.7** ist die vollständige Sequenz der cDNA für das *EtOS22* aufgeführt, wobei die Länge des 5'-UTR noch nicht bestimmt wurde.

```

1  caggacccca aaataaaatc aaaggctatc acactatntt acttcttaac cgtttactga
61 ggctacaaga acaagtttga agatgaggac tatcctagcc accctagtcg gtttcacagc
1  M R T I L A T L V G F T
121 ctgcgagacc gttgctgcag acggagcacc tgagtatcct tctcagcttg cagttgaaat
13 A C A A V A A D G A P E Y P S Q L A V E
181 cgatccagaa gcgattattg cgatccagca agatgcaaac gccgacccac gtctcttttt
33 I D P E A I I A I Q Q D A N A D P R L F
241 cccactgagc gggcttgtct ccgccaaact tgccaaagtc tttcaaccca acatataccc
53 F P L S G L V S A K L A K V F Q P N I Y
301 aaccctcctc agtccccaga caacttacca ctttcacctc catcctcctc cccattatcc
73 P T P P S P Q T T Y H F H L H P H P H Y
361 gcacccctcag ccaagttatc ctcatcctca accccatcat cctcatcctc atccttatca
93 P H P Q P S Y P H P Q P H H P H P H P Y
421 tcctcctcct catccccatc atcctcatcc tcacccccat caacatcctc atcgtcctcc
113 H P H P H P H H P H P H P H P H Q H P H R H
481 cgaccatcat ccccaccatc atcctcacca tcacatcat gaacataatg ttcatgtgcc
133 P D A H H P H H H P H H H H H E H N V H V
541 tcaacatcag cacgctcaac acaagggcca ccagaacaac ggtggcccag ctcattatca
153 P Q H Q H A Q H N G H Q N N G G P A H Y
601 ccatgactac cattttgctc atcctcatca agagaaccag catcaccgag aggaagagca
173 H H D Y H F A H P H Q E N Q H H R E E E
661 gcttaccgac atcaactaag ctattggctc ggaattaagg tgcttagtct cagtagtcag
193 Q L T D I N -
721 tacagtaacta ggctacgtct gagatcttca tggcaaagag gtaccagcca ccaagctgac
781 tcggctatgt tttattagac aaattttaat ttaaagggtc ccagtttcag tctctgcagg
841 tctgcccctg aaagcagcag aggggcttaa aggggtgattg gagctgcaaa tacagctgca
901 aatgcagctg caaagtgccg cttcaaaaaa gggacaggct tcccgccaaa atttttggat
961 catacctatc aatgcttcga gaaaacatag aaaacaaaag cactgaagaa cgttcatagt
1021 cggtagtttt aggggcatgc cgtgtgctaa aatcccatcg aaccttcagg tacacctgat
1081 cgttacgaag tacacaccac cggtcactct caacgcgcac cactagagcg agagctgctt
1141 cagggatgca gcgagatgtc gactcagagg tcctacatta aaggg(a)n

```

**Abbildung 3.7** DNA- und deduzierte Aminosäuresequenz der *Etos22*-cDNA. Die Primer A17-f-length-64-up und A17-f-length-1176-lo sind durch Unterstriche gekennzeichnet. Das Signalpeptid ist hellgrau unterlegt. Die ursprüngliche Sequenz des im Phagen-Panning angereicherten Klons (A17), von der aus die 5'- und 3'-RACE-PCR durchgeführt wurden, ist dunkelgrau unterlegt.

Datenbankanalysen für das vollständige ORF von *Etos22* einschließlich 3'-UTR (Position 83 – 1.185) ergeben weder auf DNA-Ebene (blastn) noch auf Proteinebene (blastx, tblastx) signifikante Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen. Dabei wird jedoch noch nicht auf die Sequenzdaten zugegriffen, die vom *E. tenella* Genomprojekt mit zunehmender Vollständigkeit

bereitgestellt werden. Signifikante Übereinstimmungen ergeben sich hier auf Ebene der genomischen DNA, jedoch nicht auf cDNA-Ebene (ESTs). Das Ergebnis des Abgleichs der 1.103 bp von *Etos22* mit den genomischen ‚shotgun‘-Sequenzen sind 54 unabhängige Einzelsequenzen, die zu 98 % bis 100 % identisch zur Quellsequenz sind (Stand: September 2003). Die Länge der übereinstimmenden Sequenzabschnitte liegt dabei positionsabhängig zwischen 229 bp und 691 bp. Diese enorme Häufigkeit von *Etos22*-identischen unabhängigen Sequenzen ist bemerkenswert und läßt darauf schließen, dass *Etos22* in mehreren Kopien im Genom von *E. tenella* vorliegt. Tatsächlich findet sich unter den zusammengesetzten Einzelsequenzen von genomischer DNA, den sogenannten ‚contigs‘, eine 71.864 bp lange Sequenz ([2257242.c007101021.Contig1](#)), welche *Etos22* in zwei Kopien und 3′ – 5′-Orientierung hintereinanderliegend aufweist (Stand: September 2003). Die beiden ORFs von *Etos22* sind innerhalb dieses ‚contigs‘ durch 1.365 bp voneinander getrennt. Diese beiden Kopien unterrepräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit die wirkliche Kopienzahl von *Etos22* im Genom. Problematisch ist hierbei das computergestützte Zusammenfügen („assembly“) von Einzelsequenzen: Identische Sequenzbereiche werden als Überlappungen bearbeitet, was dazu führt, dass ähnliche, sich repetitiv wiederholende Bereiche, nicht berücksichtigt werden und schließlich in der Sequenz des gesamten Chromosoms fehlen. Deswegen wurde bei der Charakterisierung von *Etos22* die tatsächliche Kopienzahl dieses Gens durch einen quantitativen genomischen Southern Blot abgeschätzt (**Abb. 3.12**).

### 3.4.2 Charakterisierung des *EtOS22*-Proteins

Das Programm SignalP V1.1 (Nielsen *et al.*, 1997) identifiziert am N-terminalen Ende des Proteins ein Signalpeptid von 18 AS (in der Sequenz in **Abb. 3.7** hellgrau unterlegt). Dies belegt die Vollständigkeit des klonierten ORFs und ist zudem ein Hinweis, dass *EtOS22* am Aufbau der inneren Oocystenschale beteiligt sein könnte und dafür vom Makrogamonten sekretiert werden muß. Die Spaltstelle zwischen Signalpeptid und reifem Protein liegt sehr wahrscheinlich zwischen Position Ala18 und Ala19 (AVA – AD). Somit liegt die Größe des reifen Proteins bei 180 AS. Daraus errechnet sich ein theoretisches Molekulargewicht von 21.039,7 Da ohne bzw. 22.830,9 Da mit Signalpeptid. Auffällig ist die Häufigkeit bestimmter AS im Vorläufer-Protein (bzw. im reifen Protein): Histidin (H) 23,2 % (25,6 %), Prolin (P) 17,2 % (18,9 %), Alanin (A) 8,6 % (6,7 %) und Glutamin (Q) 7,6 % (8,3 %). Histidin und Prolin stellen zusammen über 40 % aller Aminosäuren im Protein. Der isoelektrische Punkt (pI) des Vorläuferproteins beträgt 6,6, der des reifen Proteins 6,5 (Muller *et al.*, 2001).

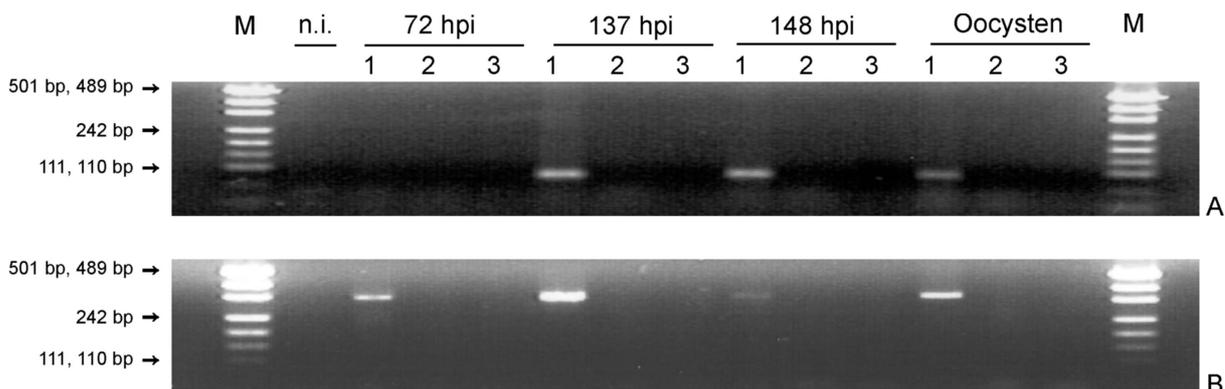
In der deduzierten AS-Sequenz von *Etos22* (**Abb. 3.7**) sind die bekannten 29 AS der im Western Blot detektierten 51 kDa Proteinbande nicht enthalten. Zudem ist das Molekulargewicht von *EtOS22* deutlich geringer. Es handelt sich daher nicht um identische Proteine, der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagiert vielmehr mit mehr als nur einem Antigen. *EtOS22* ist eines von ihnen und ist möglicherweise identisch mit der im Western Blot detektierten ca. 23 kDa Proteinbande. Das N-terminale Signalpeptid und die Häufigkeit der AS Prolin deuten jedoch darauf in, dass auch *EtOS22* am Aufbau der inneren Oocystenschale beteiligt sein könnte. Datenbankanalysen konnten die 29 AS des 51 kDa Proteins

(Mouafo, 2001) Ende des Jahres 2002 eindeutig einem Antigen aus Makrogamonten von *E. maxima*, das am Aufbau der Oocystenwand beteiligt ist, zuordnen: GAM56 (Belli *et al.*, 2002b). Die durch Edman Abbau bestimmten 29 AS entsprechen dem N-terminalen Ende des reifen Proteins GAM56 nach Abspaltung des Signalpeptids zwischen Ala20 und Val21. Für das reife Protein berechnet sich ein theoretisches Molekulargewicht von 51,4 kDa (Muller *et al.*, 2001), was mit der vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> im Western Blot detektierten Proteinbande sehr gut übereinstimmt. Der Vergleich des N-terminalen Endes von GAM56 mit den ersten 21 AS der kurzen Sequenz der 51 kDa Proteinbande ergibt 73 % identische AS. Die geringen Sequenzunterschiede lassen sich wahrscheinlich durch die zwei verschiedenen *Eimeria*-Arten begründen: *E. tenella* (Mouafo, 2001) und *E. maxima* (Belli *et al.*, 2002b).

### 3.5 Expressionsmuster von *EtOS22* in *E. tenella*

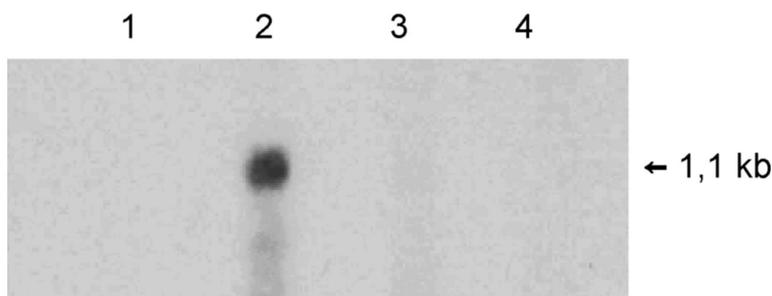
Um das Expressionsmuster des *EtOS22* durch den Nachweis des entsprechenden Transkripts zu untersuchen, wurden RT-PCRs und Northern Blots mit sequenzspezifischen Primern bzw. radioaktiv-markierten Sonden durchgeführt, wobei es sich bei der RT-PCR um die wesentlich sensitivere Methode handelt. Der Northern Blot ermöglicht hingegen eine Größenabschätzung der vollständigen mRNA, was eine Überprüfung der durch RACE-PCR erhaltenen cDNA-Sequenz zulässt. Außerdem ist der Northern Blot zur Quantifizierung der mRNA-Menge geeigneter. Für die RT-PCRs wurde cDNA von 4 verschiedenen Parasitenstadien verwendet: aus sporulierten Oocysten sowie aus intrazellulären Stadien 72 h, 137 h und 148 h nach der Infektion, wobei für diese Stadien Gesamt-RNA aus Blinddarmgewebe von *E. tenella*-infizierten Hühnern isoliert wurde. Als Positivkontrolle wurden Primer verwendet, die einen Bereich des Actin-Gens von *E. tenella* amplifizieren, welches den gesamten Zellzyklus hindurch exprimiert wird (Ryan *et al.*, 2000). Um auszuschließen, dass die PCR-Produkte von kontaminierender genomischer DNA amplifiziert wurden, wurde in der jeweils zweiten Spur eines jeden Dreifach-Ansatzes keine Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt. In der jeweils dritten Spur dagegen enthielten die RT-PCR-Ansätze zwar RT, jedoch kein RNA-Templat. Es kam erwartungsgemäß zu keiner Amplifikation, da cDNA als Templat fehlte bzw. keine kontaminierenden Nukleinsäuren in den PCR-Reagenzien enthalten waren. Die Amplifikation von *Etos22*-spezifischen PCR-Produkten gelang 137 und 148 h nach der Infektion (Gamogonie) und im Oocystenstadium, nicht jedoch 72 h nach der Infektion (Schizogonie). Das Transkript von *Eimeria*-Actin hingegen war in allen vier Stadien nachweisbar, was die Qualität der cDNA sowie die PCR-Bedingungen bestätigt. *Etos22* wird demnach 72 h nach der Infektion noch nicht transkribiert, die Transkription erfolgt dagegen spätestens ab 137 h nach der Infektion und auch noch in den sporulierten Oocysten (**Abb. 3.8**). Das hier beschriebene Expressionsmuster deckt sich mit den Ergebnissen, die mit der Charakterisierung des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erzielt wurden (Mouafo *et al.*, 2002): 136 hpi reagiert der mAk mit einer Proteinbande im Western Blot von Extrakten aus infiziertem Hühnerblinddarm, ein Zeitpunkt, der mit dem Auftreten von Makrogamonten im infizierten Darmepithel sowie der Bildung von Hüllbildungskörpern vom Typ II zusammenfällt. Auch im Western Blot von sporulierten Oocysten erkennt der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> noch Antigene, die sich jedoch hinsichtlich ihres Molekulargewichts von 31 bzw. 81 kDa von denen zu

früheren Zeitpunkten unterscheiden. Man weiß jedoch, dass zwischen dem Nachweis einer mRNA durch RT-PCR und der Detektion des entsprechenden Proteins im Western Blot mehrere Stunden liegen können. Im Fall verschiedener Mikronemproteine aus *E. tenella* (*EtMIC1-5*) war die Detektion sämtlicher Proteine im Western Blot erst 10 – 12 h nach dem Nachweis der spezifischen mRNA möglich, so dass post-transkriptionale Faktoren bei der Regulation der Expression dieser Proteine eine Rolle zu spielen scheinen (Ryan *et al.*, 2000). Das bedeutet, dass die mRNA von *Etos22* möglicherweise deutlich früher als 137 *hpi* nachweisbar ist.



**Abbildung 3.8 Bestimmung des Expressionsmusters von *Etos22* durch RT-PCR.** Als DNA-Längenstandard (M) wurde jeweils 1 µg pUC-Mix Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Als Templat für die PCR-Reaktionen diente cDNA aus nicht-infizierten Hühnerblinddärmen (n.i.), sowie aus infizierten Hühnerblinddärmen 72, 137 und 148 h nach der Infektion (72 *hpi*, 137 *hpi* und 148 *hpi*) und aus sporulierten Oocysten. Die durch die Primer A17-22-up und A17-112-lo amplifizierten *Etos22*-spezifischen PCR-Produkte haben eine Größe von 91 bp (A), die durch die Primer *EtACTIN*-up und *EtACTIN*-lo amplifizierten PCR-Produkte sind 350 bp groß (B). In den mit (1) gekennzeichneten Spuren wurden jeweils Reaktionsansätze mit Reverse Transkriptase (RT) und mit RNA-Templat aufgetragen, in (2) Reaktionsansätze ohne RT und mit RNA-Templat und in (3) Reaktionsansätze mit RT aber ohne RNA-Templat.

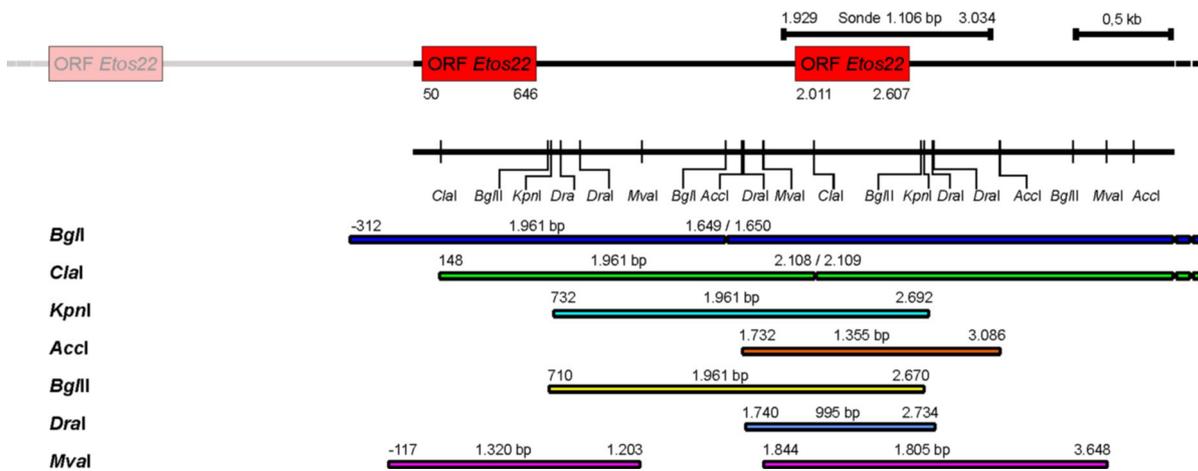
Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA aus sporulierten Oocysten, aus infiziertem Darmgewebe 137 *hpi* bzw. 148 *hpi* sowie aus nicht-infiziertem Darmgewebe (Negativkontrolle) isoliert. Es zeigte sich ein sehr deutlicher Expressionspeak 137 h nach der Infektion (**Abb. 3.9**). Nach 148 h und in den Oocysten war das mRNA-Transkript des *EtOS22* mit dieser Methode kaum bzw. nicht mehr nachweisbar. Kein Hybridisierungssignal wurde außerdem für Gesamt-RNA aus nicht-infiziertem Blinddarm erhalten, was sicherstellte, dass es sich in Spur 2 um das spezifische Transkript aus *E. tenella* und nicht um eine Kreuzreaktion mit Wirts-RNA handelte. Der Northern Blot liefert zudem Hinweise auf die Größe des vollständigen mRNA-Transkripts von ca. 1,1 kb. Dies bestätigt die Vollständigkeit der klonierten cDNA und läßt außerdem vermuten, dass es sich um einen relativ kurzen, noch unbestimmten, 5'-UTR handelt.



**Abbildung 3.9 Northern Blot Analyse für *Etos22*.** Gelelektrophoretisch aufgetrennt und gebロットet wurde Gesamt-RNA aus sporulierten Oocysten (1), Gesamt-RNA aus infiziertem Hühnerblinddarm 137 h (2) bzw. 148 h (3) nach der Infektion sowie Gesamt-RNA aus nicht-infiziertem Hühnerblinddarm als Negativkontrolle (4). Hybridisiert wurde mit dem radioaktiv-markierten, in Position 385 beginnenden, 3'-RACE-PCR-Produkt (816 bp).

### 3.6 Genomische Organisation des *Etos22*-Gens

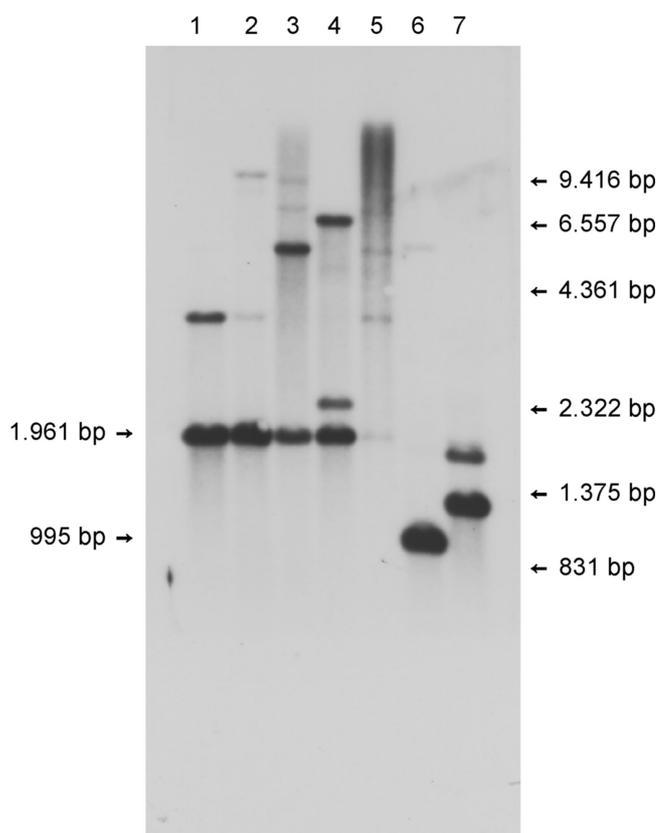
Datenbankanalysen ergaben erste Hinweise zur genomischen Organisation des Gens, das für *EtOS22* codiert. Die cDNA und die genomischen Sequenzen entsprechen sich. Es handelt sich also um ein Gen ohne Introns, das aus einem einzigen codierenden Exon besteht. Das ORF des *Etos22* Gens mit einer Grösse von 597 bp findet sich in zwei Kopien im ‚contig‘ 2257242.c007101021.Contig1 (71.864 bp, Stand: September 2003), welche durch 1.365 bp getrennt sind. Beide liegen im äußersten 5'-Bereich dieser langen genomischen Sequenz, von der in **Abb. 3.10** die ersten 4.000 bp schematisch dargestellt sind.



**Abbildung 3.10 Schematische Darstellung der ersten 4.000 bp des ‚contigs‘ 2257242.c007101021.Contig1 mit den zwei ORFs von *Etos22*.** Angegeben sind die Schnittstellen der im genomischen Southern Blot eingesetzten Restriktionsenzyme *BglI*, *ClaI*, *KpnI*, *Accl*, *BglII*, *DraI* und *MvaI* sowie die zu erwartenden Fragmente, die durch die eingezeichnete radioaktiv markierte Sonde (1.106 bp) detektiert werden. Diese Fragmente sind unter Angabe ihrer Länge als verschiedenfarbige Balken rechts neben den entsprechenden Restriktionsenzymen dargestellt. Liegen die Restriktionsschnittstellen der detektierten Fragmente 3'-seitig außerhalb dieser 4.000 bp, so enden die entsprechenden Balken mit Unterbrechungen. Für die zu erwartenden Schnittstellen, die 5'-seitig außerhalb dieses Bereichs liegen, ist ihre relative Position in bezug auf das erste der als schwarze Linie dargestellten 4.000 bp angegeben. Von den weiteren *Etos22*-Kopien, die ‚upstream‘ der abgebildeten 4.000 bp liegen, ist das erste in weniger intensiven Farben angedeutet. Die Sequenz des ‚contigs‘ mußte für dieses Schema in den ‚sense‘-Strang umgeschrieben werden, zudem wurde als Korrektur dieser ‚shotgun‘-Sequenz in Position 2.347 das Triplet CAT ergänzt.

Um das Vorkommen mehrerer Kopien dieses Gens im Genom von *E. tenella* zu überprüfen, wurde ein genomischer Southern Blot durchgeführt (**Abb. 3.11**). Genomische DNA wurde mit 7 verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut (*BglI*, *ClaI*, *KpnI*, *Accl*, *BglII*, *DraI* und *MvaI*), welche nicht oder nur im Randbereich des ORFs schneiden und somit Restriktionsfragmente ergeben, die das ORF (fast) vollständig enthalten und dadurch zu klaren Hybridisierungssignalen führen sollten. Deutlich sind für fast alle Restriktionen mehrere Banden unterschiedlicher Größe erkennbar, was für mindestens zwei Kopien dieses Gens spricht und die Sequenzdaten bestätigt. Bei genauerer Analyse der Restriktionsmuster (**Abb. 3.11**) scheint es zudem wahrscheinlich, dass *Etos22* in repetitiver Anordnung in deutlich mehr als zwei Kopien im Genom von *E. tenella* vorliegt und zwar ‚upstream‘ der genomischen Sequenz 2257242.c007101021.Contig1. Diese repetitive Anordnung führt zu mehreren identischen Restriktionsfragmenten beim Verdau der genomischen DNA, was sich auch in der

Intensität der daraus resultierenden Bande widerspiegelt. Solche Banden ergeben sich beispielsweise für *Bgl*I, *Cl*I, *Kpn*I (alle 1.961 bp) und *Dra*I (995 bp), wie aus **Abb. 3.11** ersichtlich. Die Tatsache, dass unterschiedliche Restriktionsendonukleasen gleichgroße Fragmente produzieren, bestätigt die regelmäßige repetitive Anordnung von *Etos22* im Genom von *E. tenella*. Die parallel dazu erkennbaren Banden von Fragmenten mit deutlich höherem Molekulargewicht entstehen, wenn im Anschluß an die hintereinanderliegenden *Etos22*-ORFs die entsprechende Schnittstelle entweder ‚downstream‘ (*Bgl*I und *Cl*I) oder ‚upstream‘ (*Kpn*I) fehlt. Das Bandenmuster in Spur 4 für *Ac*I ist auf Grundlage der Genomsequenz nicht erklärbar, während in Spur 5 der Verdau durch *Bgl*II nur partiell stattgefunden hat, die zu erwartende Bande (ebenfalls bei 1.961 bp) jedoch schwach erkennbar ist. Auch das Bandenmuster für *Dra*I und *Mva*I entspricht den Erwartungen, wobei die Restriktion mit *Dra*I für einen quantitativen Southern Blot geeignet scheint, durch den die Kopienzahl von *Etos22* abgeschätzt werden kann.

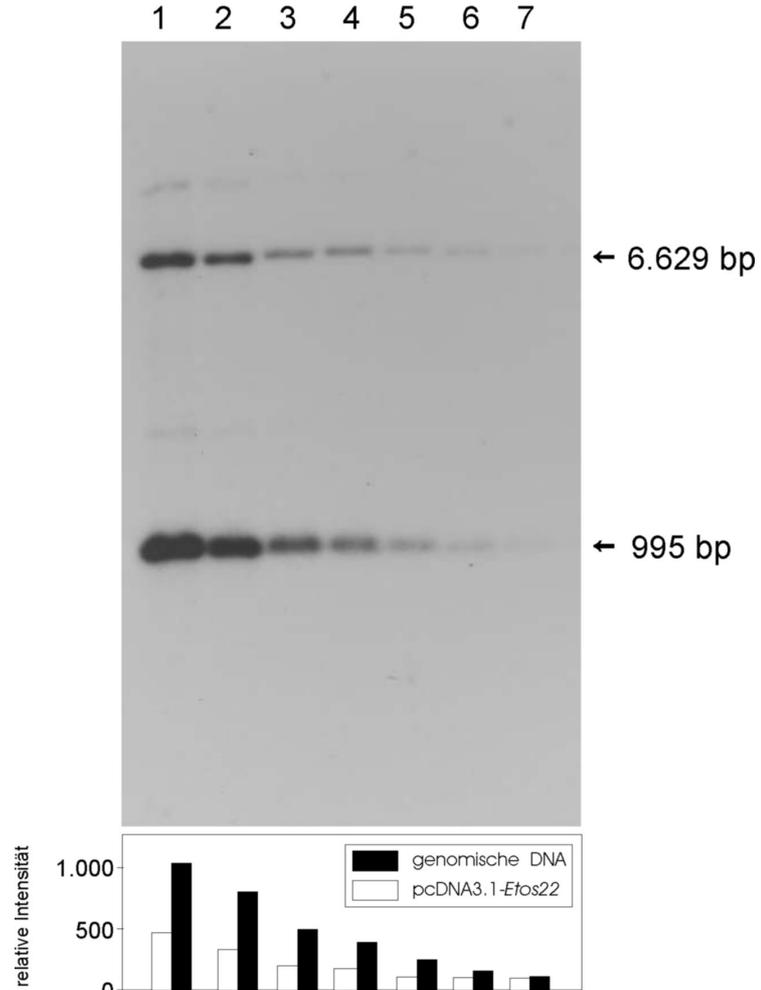


**Abbildung 3.11 Genomischer Southern Blot für *Etos22*.** Gelelektrophoretisch aufgetrennt und gebloftet wurden in jeder Spur 10 µg genomische DNA von *E. tenella*. Diese wurden zuvor mit folgenden Restriktionsendonukleasen verdaut: *Bgl*I (1), *Cl*I (2), *Kpn*I (3), *Ac*I (4), *Bgl*II (5), *Dra*I (6) und *Mva*I (7). Hybridisiert wurde mit dem radioaktiv-markierten PCR-Produkt von Position 1 bis Position 1.106. Zu erkennen und auf der linken Seite des Blots gekennzeichnet sind die einheitlich 1.961 bp großen Restriktionsfragmente als Produkte unterschiedlicher Restriktions-endonukleasen sowie die für den quantitativen Southern Blot verwendeten 995 bp großen *Dra*I-Fragmente.

Um eine bessere Abschätzung der Kopienzahl von *Etos22* im Genom von *E. tenella* vornehmen zu können, wurde ein quantitativer Southern Blot durchgeführt. Dafür wurden 726 pg (100.000.000 Kopien) des durch *Xho*I linearisierten Plasmids pcDNA3.1 mit einkloniertem *Etos22* (6.629 bp) sowie 1,7 µg (25.856.313 Kopien) *Dra*I-verdaute genomische DNA von *E. tenella* gemischt und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebloftet. Die genomischen *Dra*I-Restriktionsfragmente mit *Etos22* haben eine Größe von 995 bp. Hybridisiert wurde mit der radioaktiv markierten Sonde ‚*Etos22* ORF‘ (542 bp, Position 84-625). Die densitometrische Auswertung der Banden (**Abb. 3.12**) aus dem Phosphor Imager erfolgte mit dem Programm QuantiScan 1.5.

## Ergebnisse

**Abbildung 3.12 Quantitativer Southern Blot zur Abschätzung der Kopienzahl von *Etos22*.** Gelelektrophoretisch auf demselben Agarosegel aufgetrennt und geblottet wurden 7 definierte Konzentrationen des *Xho*I-linearisierten Plasmids pcDNA3.1/V5-His TOPO (5.523 bp) mit einkloniertem PCR-Produkt von *Etos22* (1.106 bp) sowie *Dra*I-geschnittene genomische DNA von *E. tenella*. Im unteren Teil des Southern Blots sind die *Dra*I-Restriktionsfragmente von *Etos22* mit einer Größe von 995 bp zu erkennen. Die als Referenz dienenden Kopienzahlen des rekombinanten Plasmids nehmen mit jeder Spur um den Faktor 0,5 ab: Spur 1 (100.000.000 Kopien), Spur 2 (50.000.000 Kopien), Spur 3 (25.000.000 Kopien), Spur 4 (12.500.000 Kopien), Spur 5 (6.250.000 Kopien), Spur 6 (3.125.000 Kopien), Spur 7 (1.562.500 Kopien). Demgegenüber befinden sich in den Spuren rechnerisch 25.856.313 Kopien (Spur 1), 12.928.157 Kopien (Spur 2), 6.464.078 Kopien (Spur 3), 3.232.039 Kopien (Spur 4), 1.616.019 Kopien (Spur 5), 808.010 Kopien (Spur 6), 404.005 Kopien (Spur 7) des haploiden *E. tenella* Genoms. Das Balkendiagramm unter dem Foto gibt die durch densitometrische Auswertung mit dem Programm QuantiScan 1.5 bestimmte relative Intensität für die entsprechenden Banden wieder.



**Tabelle 3.1** Densitometrische Auswertung der 6,6 kb Banden (pcDNA3.1-*Etos22*) und 995 bp Banden (genomisches *Dra*I-Restriktionsfragment mit *Etos22*) des quantitativen Southern Blots zur Bestimmung der Kopienzahl von *Etos22*. Die Kopienzahl für *Etos22* wurde nur für den linearen Bereich (Spuren 3 – 6) bestimmt.

Spur	Kopien pcDNA3.1- <i>Etos22</i>	relative Intensität für 6,6 kb Banden	Kopien haploides Genom von <i>E. tenella</i>	relative Intensität für 995 bp Banden	Kopienzahl <i>Etos22</i>
1	100.000.000	462,86	25.856.313	1.026,08	-
2	50.000.000	328,40	12.928.157	794,53	-
3	25.000.000	195,26	6.464.078	491,69	15,09
4	12.500.000	173,29	3.232.039	386,61	22,06
5	6.250.000	104,74	1.616.019	247,23	22,56
6	3.125.000	102,83	808.010	157,32	17,30
7	1.562.500	97,94	404.005	112,88	-
$\bar{\emptyset} \pm SD$					19,25 $\pm$ 3,2

In **Tab. 3.1** finden sich Kopienzahlen und relative Intensitäten für Plasmid- und genomische DNA unter Annahme einer haploiden Genomgröße von 60 Mb. Aus den Daten für das rekombinante Plasmid (ein Plasmidmolekül entspricht einer Kopie von *Etos22*) ergibt sich die Standardgerade  $y = 4 \times 10^{-6x} + 101,4$  bei  $R^2 = 0,9745$ , auf deren Grundlage sich die Anzahl der Kopien für *Etos22* im haploiden Genom von *E. tenella* berechnen lässt: Für  $y$  werden die relativen Intensitäten für die genomische DNA eingesetzt und dann nach  $x$ , der Kopienzahl von *Etos22*, aufgelöst. Bei einer Standardabweichung von 3,2 ergeben diese Berechnungen für *Etos22* eine durchschnittliche Kopienzahl von  $19,25 \pm 3,2$  im Genom von *E. tenella*. Damit ist *Etos22* das erste für diesen Organismus beschriebene ‚multi-copy‘ Gen.

### 3.7 DNA-Immunisierung mit *Etos22*

Die DNA-Immunisierung mit *Etos22* erfolgte für fünf Testgruppen à vier Tiere bei zwei Replicas. Die Gruppen K0 waren nicht-infizierte Kontrollgruppen, die entweder i.m. oder t.c. mit pcDNA3.1-0 vakziniert wurden, Ki war die infizierte Kontrollgruppe und die Gruppen CT wurden entweder i.m. oder t.c. mit pcDNA3.1-*Etos22* vakziniert. Das Gewicht der Tiere wurde zu sieben Zeitpunkten ab Versuchsbeginn (Alter der Tiere: 11 Tage) bestimmt. Es gibt den gesundheitlichen Zustand der Tiere sowie den wirtschaftlichen Aspekt der Fleischproduktion wieder. Für die in **Tab. 3.2** aufgelisteten Durchschnittsgewichte der Tiere wurden die jeweiligen Replicas zusammengefasst.

**Tabelle 3.2 Durchschnittliche Gewichte [g] mit Standardabweichung pro Tier.** K0 sind die nicht-infizierten Kontrollgruppen, die intramuskulär (i.m.) oder transcutan (t.c.) mit pcDNA3.1-0 vakziniert wurden, Ki ist die infizierte Kontrollgruppe und bei CT handelt es sich um die infizierten Gruppen, die i.m. oder t.c. mit pcDNA3.1-*Etos22* vakziniert wurden. Bei Versuchsbeginn (Tag 11) wurde zum ersten Mal immunisiert, zwei Wochen später (Tag 25) zum wiederholten Mal. Die Tiere der Gruppen Ki und CT i.m. und t.c. wurden am Tag 38 mit 15.000 sporulierten Oocysten infiziert und am Tag 8 *p.i.* (Tag 46) wurde die Sektion durchgeführt (Haberkorn and Greif, 1999). Die sich entsprechenden Gruppen der beiden Replicas wurden zusammengefasst, so dass die Durchschnittswerte auf jeweils 8 Tieren basieren.

Gruppen	Tag 11	Tag 19	Tag 25	Tag 32	Tag 38 (i.)	Tag 42 (4 <i>p.i.</i> )	Tag 46 (8 <i>p.i.</i> )
<b>K0 i.m.</b>	102,3 ± 9,9	182,9 ± 19,7	288,5 ± 31,3	424,9 ± 49,3	565,3 ± 65,5	643,8 ± 61,6	720,9 ± 73,7
<b>K0 t.c.</b>	97,4 ± 12,0	173,8 ± 25,5	276,1 ± 39,6	411,6 ± 56,4	558,5 ± 78,5	631,3 ± 92,6	710,8 ± 102,7
<b>Ki</b>	95,5 ± 9,5	175,0 ± 10,9	281,0 ± 11,7	421,6 ± 21,2	575,1 ± 37,9	620,0 ± 51,5	584,6 ± 105,2
<b>CT i.m.</b>	100,0 ± 7,7	181,9 ± 18,3	288,5 ± 33,4	422,5 ± 43,6	576,1 ± 61,2	622,5 ± 57,3	603,6 ± 53,6
<b>CT t.c.</b>	95,4 ± 10,6	170,5 ± 18,5	268,9 ± 29,5	394,0 ± 40,7	532,8 ± 57,1	582,5 ± 54,4	590,6 ± 72,5

Nach einem vollendeten Entwicklungszyklus von *E. tenella* lassen sich am Tag 8 *p.i.* deutliche Gewichtsunterschiede zwischen den nicht-infizierten Kontrollen K0 ( $720,9 \pm 73,7$ ;  $710,8 \pm 102,7$ ) und den mit 15.000 sporulierten Oocysten pro Tier infizierten Gruppen Ki ( $584,6 \pm 105,2$ ) und CT ( $603,6 \pm 53,6$ ;  $590,6 \pm 72,5$ ) erkennen. Während man bei den Kontrollgruppen K0 eine kontinuierliche Gewichtszunahme erkennt, ist diese bei den infizierten Gruppen zwischen Tag 4 *p.i.* und Tag 8 *p.i.* rückläufig oder stagniert. Ein Unterschied hinsichtlich der Gewichtszunahme zwischen Tag 4 *p.i.* und Tag 8 *p.i.* ist beim Vergleich der Gruppen Ki und CT t.c. erkennbar: Das durchschnittliche Gewicht ist

## Ergebnisse

bei der infizierten Kontrollgruppe deutlich rückläufig ( $620,0 \pm 51,5$ ;  $584,6 \pm 105,2$ ), während es bei der transcutan mit pcDNA3.1-*Etos22* vakzinierten Gruppe CT t.c. ( $582,5 \pm 54,4$ ;  $590,6 \pm 72,5$ ) stagniert. Zur Überprüfung, ob die unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen in den Gruppen Ki, CT i.m. und CT t.c. signifikant sind, wurden die absoluten Gewichtsveränderungen sämtlicher Tiere dieser Gruppen zwischen Tag 4 *p.i.* und Tag 8 *p.i.* bestimmt und die Werte der Gruppe Ki durch einen zweiseitigen t-Test mit den beiden vakzinierten Gruppen verglichen: bei einem Signifikanzniveau von 0,05 sind jedoch weder die Unterschiede der infizierten Kontrollgruppe Ki zur Gruppe CT i.m. ( $t = -0,53391$ ;  $p = 0,60178$ ) noch zur Gruppe CT t.c. ( $t = -1,57031$ ;  $p = 0,13866$ ) signifikant.

Weiterhin wurden sowohl die Blutausscheidungen der Tiere am Tag 4 *p.i.* und Tag 7 *p.i.* kontrolliert und bewertet sowie am Tag 8 *p.i.* die Ausscheidungen an Oocysten pro Gramm Faeces (OpG) bestimmt. Dabei wurden die Blutausscheidungen auf Basis einer Skala von 0 (keine Blutausscheidungen) bis 6 (hoher Anteil an Blut im Kot oder freies Blut) bewertet (Haberkorn and Greif, 1999). Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.3** zusammengefaßt.

**Tabelle 3.3 Durchschnittliche Blutausscheidungen und Oocystenausscheidungen pro Testgruppe.** K0 sind die nicht-infizierten Kontrollgruppen, die intramuskulär (i.m.) oder transcutan (t.c.) mit pcDNA3.1-0 vakziniert wurden, Ki sind die infizierten Kontrollgruppen und bei CT handelt es sich um die infizierten Gruppen, die i.m. oder t.c. mit pcDNA3.1-*Etos22* vakziniert wurden. Bei Versuchsbeginn (Tag 11) wurde zum ersten Mal immunisiert, zwei Wochen später (Tag 25) zum wiederholten Mal. Die Tiere der Gruppen Ki und CT i.m. und t.c. wurden am Tag 38 mit 15.000 sporulierten Oocysten infiziert und am Tag 8 *p.i.* (Tag 46) wurde die Sektion durchgeführt (Haberkorn and Greif, 1999). Die Blutausscheidungen wurden während der Schizogonie (Tag 4 *p.i.*) und Gamogonie (Tag 7 *p.i.*) kontrolliert und auf Basis einer Skala von 0 (keine Blutausscheidungen) bis 6 (hoher Anteil an Blut im Kot oder freies Blut) bewertet. Nach Ablauf eines vollständigen Entwicklungszyklus von *E. tenella* wurde am Tag 8 *p.i.* die Anzahl ausgeschiedener Oocysten/g Faeces bestimmt.

Gruppen	Blutausscheidungen Tag 42 (4 <i>p.i.</i> )	Blutausscheidungen Tag 45 (7 <i>p.i.</i> )	Oocysten/g Faeces Tag 46 (8 <i>p.i.</i> )
K0 i.m. 1	0	0	0
K0 t.c. 1	0	0	0
Ki 1	0	3	76.000
CT i.m. 1	2	3	220.000
CT t.c. 1	0	1	65.000
CT t.c. 2	3	1	304.000
CT i.m. 2	2	1	103.000
Ki 2	0	4	21.000
K0 t.c. 2	0	0	0
K0 i.m. 2	0	0	200

Auffällig ist zunächst, dass die Blutausscheidungen bei den vakzinierten Gruppen früher einzusetzen scheinen als bei den infizierten Kontrollgruppen. Bei ihnen sind am Tag 4 *p.i.* noch keine Blutausscheidungen feststellbar, am Tag 7 *p.i.* dafür umso stärker. Zumindest in den Gruppen CT t.c. 2 und CT i.m. 2 scheinen sie zu diesem Zeitpunkt schon wieder abzuklingen. Die Oocystenausscheidungen am Tag 8 *p.i.* sind bei den infizierten Kontrollgruppen durchschnittlich deutlich niedriger als bei den vakzinierten Gruppen. Bei ihnen ist die maximale

Oocystenausscheidung möglicherweise schon erreicht, während das Maximum für die infizierten Kontrollgruppen noch zu erwarten gewesen wäre. Bei den für die Gruppe K0 i.m. 2 nachgewiesenen 200 OpG handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine Kontamination. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Infektionsverlauf bei den vakzinierten Tieren möglicherweise beschleunigt wurde und es dadurch zu einem früheren Auftreten aber auch Abklingen der durch die Kokzidiose verursachten Symptome kam.

Bei der Sektion am Tag 8 *p.i.* wurden die Darmläsionen der einzelnen Tiere (**Tab. 3.4**) auf einer Skala von 0 bis 6 bewertet (Haberkorn and Greif, 1999). An den festgestellten Darmläsionen kann man erkennen, dass es sich mit 15.000 sporulierten Oocysten pro Tier um eine hohe Infektionsdosis gehandelt hat: Bei den Tieren sämtlicher infizierten Gruppen war das Höchstmaß an Darmläsionen (Läsionsgrad 6) feststellbar, lediglich bei zwei Tieren aus den mit pcDNA3.1-*Etos22* immunisierten Gruppen CT t.c. 1 und CT i.m. 2 wurden etwas weniger starke Läsionen (Läsionsgrad 5) diagnostiziert. Die Mortalität der Tiere wurde täglich überprüft, alle Tiere überlebten bis zum Versuchsende. Weiterhin wurde versucht, im Blutserum der mit pcDNA3.1-*Etos22* vakzinierten Tiere *Etos22*-spezifische IgG nachzuweisen. Dafür wurden im ELISA Seren getestet, die vor der Immunisierung im prä-immunen Zustand (Tag 11) und 2 bzw. 3 Wochen nach der zweiten Immunisierung (Tag 38 bzw. Tag 46) abgenommen wurden. Da *EtOS22* noch nicht als rekombinantes Protein zur Verfügung stand, diente als Antigen der auf der Phagenoberfläche exprimierte ORF von *Etos22* ohne Signalpeptid (Pos.138-670; 532 bp). Der Nachweis von *Etos22*-spezifischen IgG war jedoch nicht möglich.

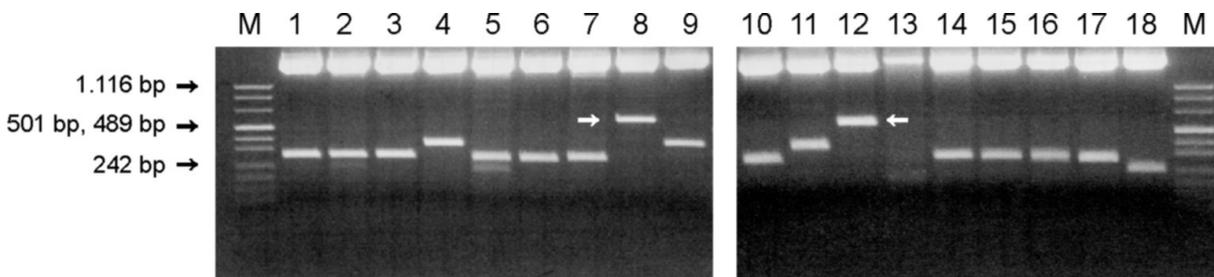
**Tabelle 3.4 Bewertung der Darmläsionen.** Die Darmläsionen wurden am Tag 8 *p.i.* bei der Sektion der Tiere bewertet. Die Bewertung basiert auf einer Skala von 0 bis 6: der Läsionsgrad 0 bedeutet keinerlei symptomatische Veränderungen, der Läsionsgrad 6 hingegen steht für sehr schwerwiegende Darmläsionen. K0 sind die nicht-infizierten Kontrollgruppen, die intramuskulär (i.m.) oder transcutan (t.c.) mit pcDNA3.1-0 vakziniert wurden, Ki sind die infizierten Kontrollgruppen und bei CT handelt es sich um die infizierten Gruppen, die i.m. oder t.c. mit pcDNA3.1-*Etos22* vakziniert wurden. Bei Versuchsbeginn (Tag 11) wurde zum ersten Mal immunisiert, zwei Wochen später (Tag 25) zum wiederholten Mal. Die Tiere der Gruppen Ki und CT i.m. und t.c. wurden am Tag 38 mit 15.000 sporulierten Oocysten infiziert und am Tag 8 *p.i.* (Tag 46) wurde die Sektion durchgeführt (Haberkorn and Greif, 1999). Diese hohe Infektionsdosis spiegelt sich in den schweren Darmläsionen wieder.

Tier	K0 i.m. 1	K0 t.c. 1	Ki 1	CT i.m. 1	CT t.c. 1	CT t.c. 2	CT i.m. 2	Ki 2	K0 t.c. 2	K0 i.m. 2
1	0	0	6	6	6	6	5	6	0	0
2	0	0	6	6	5	6	6	6	0	0
3	0	0	6	6	6	6	6	6	0	0
4	0	0	6	6	6	6	6	6	0	0

### 3.8 Phagen-Panning gegen Toltrazuril (Baycox®)

#### 3.8.1 Selektion eines 502 bp Fragments

Das ‚target‘-Protein für Toltrazuril, der „Toltrazuril-Rezeptor“, über den die selektive und spezifische Wirkung dieser Substanz vermittelt wird, ist noch nicht identifiziert worden. In dieser Arbeit sollte durch die Methode des Phagen-Panning eine direkte Selektion von Toltrazuril-bindenden Peptiden aus der genomischen Expressionsbank von *E. tenella* erreicht werden. Dafür wurde Toltrazuril, wie unter ‚Material & Methoden‘ beschrieben, über drei verschiedene Koppelgruppen an die Oberfläche von M-270 Amine DYNABEADS™ gebunden. Um eine spezifische Bindung von exprimierten *Eimeria*-Peptiden an diese Substanz zu erzielen und um unspezifische Bindungen an die Oberfläche der magnetischen Beads auszuschließen, wurde vor jeder Bindereaktion eine Negativselektion durchgeführt. Nur diejenigen Phagemide wurden in der Bindereaktion eingesetzt, die zuvor nicht an ungekoppelte DYNABEADS™ gebunden hatten. Für die drei verschiedenen Toltrazurilbeads-Präparationen (HLR7556, HLR7557 und HLR7558) wurden drei separate Phagen-Pannings über jeweils vier Runden durchgeführt. Danach wurden diejenigen selektionierten Phagemidklone, welche das E-,tag‘ exprimierten, durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Bam*HI sowie DNA-Sequenzierung analysiert. In **Abb. 3.13** sind die Restriktionsanalysen für jeweils sechs Klone aus den drei separaten Phagen-Pannings zu sehen.



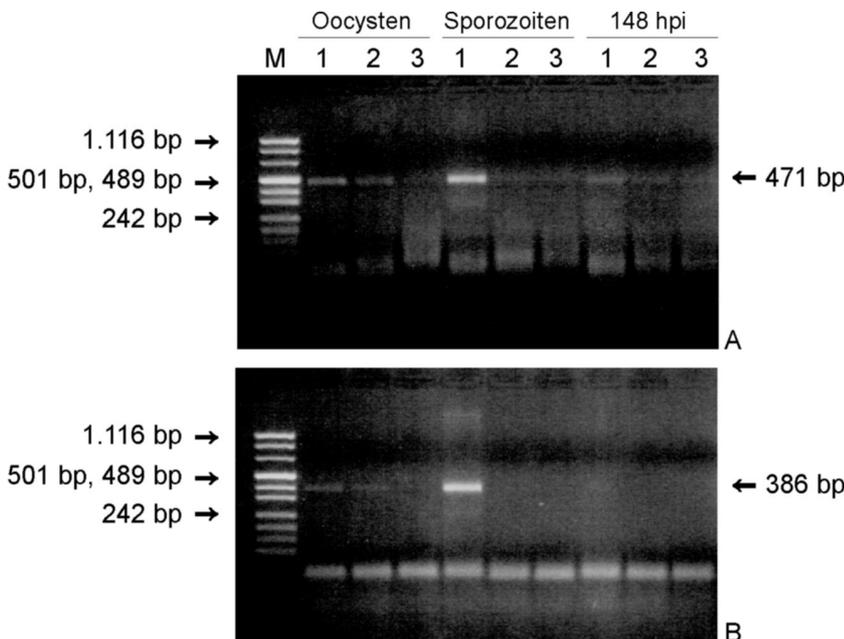
**Abbildung 3.13 Restriktionsfragmentanalyse von 18 E-,tag‘-exprimierenden Phagemidklonen nach 4 Runden Phagen-Panning gegen drei verschiedene Toltrazurilbeads-Präparationen.** Nach vier Runden Phagen-Panning wurden für HLR7556 (Spur 1-6), HLR7557 (Spur 7-12) und HLR7558 (Spur 13-18) von jeweils sechs E-,tag‘-exprimierenden Phagemidklonen Plasmide isoliert und mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut. Die weißen Pfeile markieren das Restriktionsfragment mit einem 502 bp Insert, welches im folgenden charakterisiert wurde. Zur Größenabschätzung wurde auf beiden Seiten pUC Mix DNA Marker (M) aufgetragen.

Der Restriktionsverdau mit *Nco*I und *Bam*HI zeigt Restriktionsfragmente in vier verschiedenen Größen, wobei jedes Fragment zusätzlich zum einklonierten Insert 63 bp Vektorsequenz enthält: 288 bp (in den Spuren 1-3, 5-7, 10 und 14-17), 369 bp (in den Spuren 4, 9 und 11), 565 bp (in den Spuren 8 und 12) und 238 bp (in Spur 18). Die DNA-Sequenzanalyse dieser vier verschiedenen Klone hatte folgendes Ergebnis: Das 288 bp Fragment enthält ein 225 bp großes Insert, welches jedoch in allen drei Leserastern *amber*-Stopcodons (TAG) aufweist und somit nur von den *E. coli* TG1 Zellen (*amber*-Supressormutanten), nicht aber in *Eimeria* exprimiert wird. Das 369 bp Fragment enthält ein 306 bp großes Insert ohne Stopcodons. Die Datenbankanalyse für diese Sequenz durch Abgleich mit bereits bekannten Sequenzen aus dem *E. tenella* Genomprojekt ([www.sanger.ac.uk/Projects/E\\_tenella/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/))



### 3.8.2 Nachweis des Transkripts des 502 bp Fragments

Die in **Abb. 3.14** aufgeführte Sequenz ist zu 100 % identisch mit einem Ausschnitt aus dem genomischen *E. tenella* contig202 mit einer Größe von 52.651 bp unter [www.sanger.ac.uk/Projects/E\\_tenella](http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella) (Stand: September 2003). In diesem ‚contig‘ findet sich die Sequenz des angereicherten 502 bp Inserts in ‚antisense‘-Orientierung von Position 46.748 bis 47.249. Um die Transkription dieser Sequenz nachzuweisen, wurden zwei Primerpaare für RT-PCRs konstruiert und cDNA aus Gesamt-RNA sporulierter Oocysten, Sporozoiten und infiziertem Blinddarmgewebe (148 hpi) synthetisiert. Die beiden Primerpaare T7-2N-4-up / T7-2N-474-lo und T7-2N-102-up / T7-2N-487-lo amplifizierten von der Sporozoiten-cDNA die erwarteten 471 bzw. 386 bp großen PCR-Produkte, welche von den anderen beiden cDNAs nur schwach bzw. nicht amplifiziert wurden (**Abb. 3.15**). Das im Phagen-Display gegen Toltrazuril (HLR7557) selektionierte 502 bp Insert ist folglich ein Fragment aus einem Gen, welches als mRNA-Transkript in *Eimeria* vorliegt und dessen Genprodukt möglicherweise stadienspezifisch exprimiert wird. Der Sequenzvergleich mit dem entsprechenden Abschnitt genomischer DNA zeigt, dass dieses Fragment aus einem einzigen codierenden Exon stammt, da es nicht von Introns unterbrochen wird. Das erste ORF dieser Sequenz beginnt in Position 29 mit einem ATG-Startcodon. Da in 5'-Richtung vor diesem Startcodon im gleichen Leseraster ein *amber*-Stopcodon liegt (Position 11) und sich die cDNA mit dem Primer T7-2N-4-up, der 5'-seitig des Startcodons liegt, amplifizieren lässt, enthält das 502 bp Insert wahrscheinlich das 5'-Ende des ORFs dieses Gens sowie 28 bp 5'-UTR. Durch 3'-RACE-PCR sollte nun das komplette ORF sowie dessen 3'-UTR bis zum Poly-(A)-Schwanz amplifiziert werden.



**Abbildung 3.15 RT-PCRs zum Nachweis des Transkripts des 502 bp Inserts aus dem Phagen-Panning gegen Toltrazuril (HLR7557).** Als Templat für die PCR-Reaktionen diente cDNA aus sporulierten Oocysten, Sporozoiten und infiziertem Blinddarmgewebe (148 hpi). In den mit (1) gekennzeichneten Spuren wurden jeweils Reaktionsansätze mit Reverser Transkriptase (RT) und mit RNA-Templat aufgetragen, in (2) wurden Reaktionsansätze ohne RT und mit RNA-Templat und in (3) Reaktionsansätze mit RT aber ohne RNA-Templat aufgetragen. Als DNA-Längenstandard (M) wurde jeweils 1 µg pUC-Mix Marker verwendet. In Gel A erfolgte die Amplifikation des 471 bp Produkts mit den Primern T7-2N-4-up / T7-2N-478-lo, in Gel B wurde das 386 bp große PCR-Produkt durch die Primer T7-2N-102-up / T7-2N-487-lo amplifiziert.

3.8.3 Vollständige cDNA eines Cyclophilins aus *Eimeria* (*EtCyP89*)

Auf Grundlage der in **Abb. 3.14** dargestellten 502 bp langen Sequenz aus dem Phagen-Panning wurden die zusätzlichen Primer T7-2N-229-up und T7-2N-246-up konstruiert und eine 3'-RACE-PCR mit anschließenden ‚nested‘-PCRs durchgeführt. So wurde eine cDNA von 2.763 bp amplifiziert, die 5'-seitig mit der Sequenz des Primers T7-2N-102-up beginnt, mit einem Poly-(A)-Schwanz endet und von der mit mehreren internen Sequenzierprimern die Sequenz von ‚sense‘-Strang und Gegenstrang bestimmt wurde. Der Vergleich dieser cDNA mit der genomischen Sequenz contig202 bestätigt, dass tatsächlich der Bereich ‚downstream‘ des im Phagen-Panning selektionierten 502 bp Fragments amplifiziert und kloniert wurde, die entsprechende genomische Sequenz jedoch von einer Vielzahl von Introns unterbrochen wird. Das ORF aus **Abb. 3.14** hätte auf Grundlage dieser Sequenz eine Größe von lediglich 275 AS. Aus diesem Grund wurden weitere PCR-Produkte aus voneinander unabhängigen Reaktionen sequenziert. Diese führten zur Identifizierung eines alternativen Spleiß-Produkts, welches durch eine 5'-seitige Verlängerung des dritten Exons um 71 bp gekennzeichnet ist und damit das ORF auf 2.460 bp bzw. 819 AS verlängert. Auch dieses ORF beginnt mit dem ATG-Startcodon in Position 29, welches in ein ‚Kozak‘-Motiv (Kozak, 1984) eingebettet ist und so auf den tatsächlichen Translationsstart hinweist. Übereinstimmungen mit der ‚Kozak‘-Consensus-Sequenz sind A in Position –3 sowie C in den Positionen –2 und –4 ‚upstream‘ des Startcodons. Die von Yamauchi (1991) für Sporozoen (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Theileria* und *Babesia*) beschriebene Consensus-Sequenz in der Umgebung des ATG-Startcodons ist in diesem Fall nicht zu erkennen. Das Leseraster der deduzierten AS-Sequenz ist identisch zu dem des im Phagemidvektor exprimierten Peptids. Ein TAA-Stopcodon (Pos. 2.486) führt zum Abbruch der Proteinsynthese und wird gefolgt von einem 436 bp langen 3'-UTR, der nach dem Polyadenylierungssignal (Pos. 2.905-2.909) in einem Poly-(A)-Schwanz endet. Die Gesamtlänge dieser cDNA einschließlich der 101 bp vor dem Primer T7-2N-102-up beträgt 2.924 bp (ohne Poly-A-Schwanz). **Abb. 3.16** zeigt die ‚full-length‘-cDNA dieses, später als Cyclophilin aus *Eimeria* (*EtCyP89*) identifizierten, Gens.

```

1  ggtgtacatg tagcggggag cgggcacaat gccgcaccac cacaccaaca gcagcggcag
1  M P H H H T N S S G
61  caacagcagc agcagcaaaa ctccggcaccg cagccgctca ccagatgatc aggagctgca
11  S N S S S S K T R H R S R S P D D Q E L
121  tcagagagac agcagcagca gtagcagcag caaacccaac ggtgcagccg gtagtagccg
31  H Q R D S S S S S S S K P N G A A G S S
181  gcacaccagc agcagcagca gcagcaagga cggaagcgga gccacaggc tacacgaaga
51  R H T S S S S S S K D G S G A H R L H E
241  tgtccagaaa agttcccatc atcagcacc ccatcaccac catcacaaca gcagcagttc
71  D V Q K S S H H Q H P H H H H H N S S S
301  cggcaagggc ggcagcagca gtaataaaca tgccggcggc gacagggaaa gcagggctgg
91  S G K G G S S S N K H A G G D R E S R A
361  taccgtcagc aacaagcagc accacaaaag cagcggcaac aaacacagcc acgacagcag
111  G T V S N K H D H K S S G N K H S H D S
421  cagcagccgc aaagagagcg gcggcggtca gcgcagcaat agaagtagcg gcagcagcac
131  S S S R K E S G G G Q R S N R S S G S S
481  cgctgagcag ccccgagtg tggagaagtc ttcccacgat gcgcccagca gcagcaagag
151  T A E Q P R S V E K S S H D A P S S S K
541  caacgaagcc aacaacacca gcggcaaaag cattagcaac agcagcaaca gcaaatcggg
171  S N E A N N T S G K S I S N S S N S K S

```

Ergebnisse

601 aaaaaattgc aatagcaatg agcctggacc ggccacggct gcaacacaaa aaagcgacag  
**191** G K N C N S N E P G P A T A A T Q K S D  
661 cagcagcagc gatgatgagt tcggtccgaa accaattgag gccgcgggag caccgccagcg  
**211** S S S S D D E F G P K P I E A A G A P Q  
721 aaagcggcgt cgcctgagac atgaggcttt gcttcttgag cagctcccaa gtgcaaatag  
**231** R K R R R L R H E A L L L E Q L P S A N  
781 gtacagcaag agcttcatgc acagagagca aattatattc gttgtggcga gttctgtctca  
**251** R Y S K S F M H R E Q I I F V V A S S A  
841 ccacttcatt ctgagcgggt ctgtcgtatg gcatgtaaaa ttttggatcc agaaggaggg  
**271** H H F I L S G S V D G H V K F W I Q K E  
901 aggcataagag tttgtcaagc acttttagggc ccacatagga gaattgcact gcctgtgcat  
**291** G G I E F V K H F R A H I G E L H C L C  
961 ctccagagaa gacggaggag accacgcggc atctgttggg gctgacaaaa ctttgaggat  
**311** I S R E D G G D H A A S V G A D K T L R  
1021 gttcgtatgtg tgtaatttcg acatggcttg cctcgtttcg ctcgactttg tcccctgggc  
**331** M F D V C N F D M A C L V S L D F V P W  
1081 ctgagagttc gtctctagaa aaggagagcc aactcccctc gttgcgggat cggacaaaga  
**351** A C E F V S R K G E P T P L V A V S D K  
1141 tagcccaagt gtggtggtgc tgaagccgtt gctgcattgc gcgaagccgg tggtcacctt  
**371** D S P S V V V L K P L L H C A K P V V T  
1201 ctctctccac gcgtctcccg tgcgcttggt ggcccatgtc ggtggtagctg acatttgctt  
**391** F S L H A S P V R L L A H V G G T D I C  
1261 ttcagcagac aaagacggag ggctcgaat gtggagtata cagtcaggcc gtagagtctc  
**411** F S A D K D G G L E M W S I Q S G R R V  
1321 taaagagagc catcctgcac agatagttt tgaattcaag gcggaaacgc acctcttga  
**431** S K E S H P A Q I G F E F K A E T H L F  
1381 cctacagaga aacggaacga ccccgctggc gatcgccgca agtcctaacg ggcagtggtc  
**451** D L Q R N G T T P L A I A A S P N G Q W  
1441 ggctgtcttt ggcgccgact accacttgag gattttcagt gtccggaagg cgaagcttag  
**471** L A V F G A D Y H L R I F S V R K A K L  
1501 tcgagtctac ctgagacgc tccagttcta cgaaatggcc cagaaagacc cgcagtcggt  
**491** S R V Y L E T L Q F Y E M A Q K D P Q S  
1561 tatgctgcac caaggcgcac tggatttcga gcaacgagcg gcccttgaga aggaactatc  
**511** V M L H Q G A L D F E Q R A A L E K E L  
1621 gcgttcccct cttcgtttcc accagacct tctgtttgac gcttcttcat ctttcttct  
**531** S R S P L R F H Q T L L F D A S S S F L  
1681 ctatccggtt cttctcgggg ttaaagtcct aatatattt gacaataaag tctgccgctt  
**551** L Y P V L L G V K V L N I L D N K V C R  
1741 catcggctgc cagagcaag gcttgcggtta cctggcgatt gctcttcac agtcctgtgc  
**571** F I G R H E Q G L R Y L A I A L H Q S C  
1801 aagccgtcga cttgccaaag ccacaggggg ttccaacgat gcaattttga tcgcatcggc  
**591** A S A R R L A K A T G G S N D A I L I A S  
1861 gttcaagaag aaacgggtct actttttcac cccagaagtt ccgtccagg acatattaga  
**611** A F K K K R V Y F F T P E V P S E D I L  
1921 cacgcgcat atctttaatg agaagccttc taaggaggag caggagtcac taggcgctgc  
**631** D T R D I F N E K P S K E E Q E S L G A  
1981 atctggacac tctgccatga ctcccgccca gcgtgtgggt tcgacggcca cactgcacac  
**651** A S G H S A M T P A Q R V G S T A T L H  
2041 gacttttggg gacattcgcg tcaactatt tggaaaccgag tgtccaaga ccgtggaaaa  
**671** T T F G D I R V K L F G T E C P K T V E  
2101 cttcacagtc cacgcgcgga atggctatta tgacaacatg ctcttccaca gagttattaa  
**691** N F T V H A R N G Y Y D N M L F H R V I  
2161 gggctttatg atccaaacgg gagatcccaa tggagatgga acgggcgggg agtcgatttg  
**711** K G F M I Q T G D P N G D G T G G E S I  
2221 gggcggcgac tttgaggatg agttacacag gtctctgaag cagcagaggc ctttcacttt  
**731** W G G D F E D E L H R S L K H D R P F T  
2281 atccatggcg aatgcgggtc ccaataccaa cggatctcag tttttcatca ccactgtgcc  
**751** L S M A N A G P N T N G S Q F F I T T V  
2341 ttgtccatgg ctggacatga agcactgt ctctggcaga gtcacgcatg gcgcagatgt  
**771** P C P W L D M K H T V F G R V T H G A D  
2401 tgttctgaag atcgaaggag tgaaaactaa catgaacgac aagcctctgc aagacgtgaa  
**791** V V L K I E G V K T N M N D K P L Q D V

```

2461 gttgctgacc atcaaaatta cttcttaata ttccttcact tcttcaagct ggaagccttc
811 K L L T I K I T S -
2521 agaaggattc cagagggctc taccacctag tcagcgcttt gctgctaggt attttgccgt
2581 atttcaagga ccagatgatg tttaaatgct ttgttatfff gtccagatga aagcgcgtgaa
2641 cgtctttgtc agattggcgc gtgcatgcat gtccgtacac atcattcgcc acaccgcttt
2701 acacgtaacc acctccctcg tttaccggtc tgtgtacgca gccacgcaa gcttgtaacg
2761 gctctgtggc cttgtgcatt tgcgtagata ttttgcccgc tgctgtgtac caactgtcca
2821 acttaggcgt gagcccaagc agatgagagg aagcaaaacg cgcccaccta tatgggtgca
2881 ctaacaaatt tgcaagcata ctacataaag ttgcttgctc tgta(a)n

```

**Abbildung 3.16 DNA- und deduzierte Aminosäuresequenz von *EtCyP89*.** In Position 29 befindet sich das ATG-Startcodon (fettgedruckt), in Position 2.486 das Stopcodon (TAA), mit dem das ORF endet. Die Consensus-Sequenz für den Translationsstart (Kozak, 1984) und das Polyadenylierungssignal (Pos. 2.905-2.909) sind schwarz unterstrichen dargestellt. Die deduzierte Aminosäuresequenz des ORFs ist fettgedruckt im Ein-Buchstaben-Code unter der dritten Base eines jeden Codons angegeben und beläuft sich auf 819 AS. Die Serin-reiche Region am N-terminalen Ende der Proteinsequenz (Pos. 8-214) ist blau und unterstrichen dargestellt. Die vier WD40 G- $\beta$  Repeats (Pos. 252-287; Pos. 295-333; Pos. 387-423; Pos. 448-484) sind unterstrichen und in orange abgedruckt. Die Cyclophilin-artige Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domäne umfaßt das C-terminale Ende des Proteins und ist rot und unterstrichen markiert, wobei die für die Bindung von Cyclosporin A essentiellen AS gelb unterlegt sind (Liu *et al.*, 1991a; Pflugl *et al.*, 1993; Berriman and Fairlamb, 1998). Die exakte Größe des 5'-UTR wurde nicht bestimmt, der 3'-UTR umfaßt 436 bp.

### 3.9 Charakterisierung des *EtCYP89*

Das 2.460 bp lange ORF von *EtCyP89* codiert für 819 AS. Aus dieser Aminosäuresequenz errechnet sich ein theoretisches Molekulargewicht von 89,4 kDa (Muller *et al.*, 2001). Das Programm SignalP V1.1 (Nielsen *et al.*, 1997) identifiziert im Gegensatz zu *Etos22* kein Signalpeptid am N-terminalen Ende der Sequenz, so dass es sich wahrscheinlich nicht um ein sekretorisches Protein handelt. Auffällig ist die Häufigkeit der Aminosäure Serin (S), die 13,9 % aller AS in *EtCYP89* ausmacht und besonders nahe dem Amino-Terminus des Proteins in bis zu sieben hintereinanderliegenden Resten auftritt. Das Programm ScanProsite (Gattiker *et al.*, 2002) schränkt diese Serin-reiche Region auf die Reste 8 bis 214 ein, in der durchschnittlich jede dritte AS ein Serin ist (in **Abb. 3.16** blau markiert und unterstrichen). Serin wird in dieser Region hauptsächlich von dem sich tandemartig wiederholenden Trinukleotid AGC codiert (zu 81,2 %), obwohl insgesamt 6 Codons dafür zur Verfügung stehen. Dieser auffällige, repetitive ‚codon usage‘ wurde schon für den *E. tenella*-cDNA-Klon SO7 (Liberator *et al.*, 1989) beschrieben. Auch bei *EtCyP89* befindet sich dieses repetitive Trinukleotid nicht immer in demselben Leseraster, so dass es als CAG auch für Glutamin (Q) (zu 85,7 %) codiert. Weitere AS mit relativer Häufigkeit sind Glycin (G) mit 7,8 %, Leucin (L) mit 7,3 % und Alanin (A) mit 7,2 %, alle mit unpolaren Seitenketten. Von den 819 AS haben insgesamt 86 (Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E)) negativ geladene Seitenketten, wohingegen 99 (Arginin (R) und Lysin (K)) positive Seitenketten aufweisen und für den isoelektrischen Punkt dieses Proteins von 9,02 verantwortlich sind.

*EtCYP89* weist zwei verschiedene, konservierte Proteindomänen auf: Am Carboxy-Terminus von *EtCYP89* (Pos. 668-819) befindet sich eine Cyclophilin-artige Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domäne (PPIase oder Rotamase), die in **Abb. 3.16** rot gedruckt und unterstrichen ist. Domänen dieser Art zeigen enzymatische Aktivität bei der Faltung von Proteinen, da sie die *cis-trans* Isomerisierung der Iminosäure Prolin in Peptidbindungen katalysieren (Lang *et al.*, 1987; Lodish and Kong, 1991; Steinmann *et al.*, 1991; Fransson *et al.*, 1992; Gething and Sambrook, 1992). Außerdem

## Ergebnisse

wurden Cyclophiline 1984 als Rezeptoren des immunsuppressiven Undekapeptids Cyclosporin A (CsA) (Handschumacher *et al.*, 1984) identifiziert, welches zudem anti-parasitische Eigenschaften besitzt (Bueding *et al.*, 1981; Thommen-Scott, 1981; Chappell and Wastling, 1992). Die am besten untersuchte biologische Funktion dieses Cyclophilin-Cyclosporin-Komplexes (CyP-CsA) ist die Inhibierung der Serin-Phosphatase Calcineurin, die dramatische Auswirkungen auf die Signaltransduktion zwischen der Stimulation von T-Zell-Rezeptoren und der Transkription verschiedener Cytokine hat: Der dafür notwendige Import wichtiger Transkriptionsfaktoren in den Nukleus, wie der des ‚nuclear activation factor of T-cells‘ (NF-AT) wird unterbunden (Schreiber and Crabtree, 1992). Das für die Bindung durch CsA essentielle Tryptophan (Pos. 774) sowie 12 weitere hochkonservierte AS, die dafür von entscheidender Bedeutung sind, finden sich alle in *EtCYP89* und wurden in **Abb. 3.16** gelb unterlegt (Liu *et al.*, 1991a; Pflugl *et al.*, 1993). Darüber hinaus enthält *EtCYP89* vier sogenannte ‚WD40 G- $\beta$  Repeats‘ (in **Abb. 3.16** orange markiert und unterstrichen). Diese Repeats kennt man aus der  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta$ -Transducin oder G- $\beta$ ) von heterotrimeren G-Proteinen. Bei ihnen handelt es sich um eine kleine Multigen-Familie von hochkonservierten Proteinen mit einer Größe von ca. 340 AS, welche aus acht ca. 40 AS großen Tandem-Repeats aufgebaut sind. Diese weisen typischerweise ein Glycin-Histidin-Dipeptid (GH) nahe ihrem N-terminalen Ende sowie das namensgebende Tryptophan-Asparaginsäure-Dipeptid (WD) am Carboxy-Terminus auf (Neer *et al.*, 1994; Garcia-Higuera *et al.*, 1996). Die Anzahl beschriebener Proteine, die WD-Repeats aufweisen, wächst ständig, und man versucht sie auf Basis ihrer Funktion in Sub-Familien zu gruppieren. Man findet sie in allen Eukaryoten und obwohl sie strukturell miteinander verwandt sind, erfüllen sie unterschiedlichste Funktionen: von Signaltransduktion und RNA-Prozessierung über Transkriptionsregulation bis hin zum Aufbau des Cytoskeletts, der Kontrolle während der Zellteilung und der Regulation des Schwefelmetabolismus in Pilzen (Smith *et al.*, 1999). Die Funktion der meisten WD-Repeats enthaltenden Proteine ist jedoch nicht oder nur annähernd bekannt und in vielen Fällen ist man unsicher, ob eine bekannte Funktion den Repeats selbst zugeschrieben werden kann oder vielmehr durch die N- oder C-terminalen Extensionen der repetitiven Region vermittelt wird. In **Abb. 3.17** sieht man einen Vergleich der Cyclophilin-artigen Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domäne **[A]** und den vier WD40 G- $\beta$  Repeats **[B]** aus *EtCYP89* mit den entsprechenden Consensus-Sequenzen, den sogenannten ‚Pfam‘-Motiven (Protein families databases of alignments and hidden Markov models).

### A

**PPIase Motiv**  
*EtCYP89* PPIase

```
KVYFDITIGGKPLGRIVFELFGDVVPKTAENFRALCTGEKGFGKKLFYKG
668 ----TLHTT---FGDIRVKLFGTECPKTVENFTVHARNG-----YYDN 703

STFHRVIPNFMIOGGDFTAGNQGTGGKSIYGEKFKDENFN-LKHDRHEPG
704 MLFHRVIKGFMIQTGD-PNGD-GTGGESIWGGDFEDELHRSLLKHDR--PF 749

TLSMANAGDPNTNGSQFFITTVKTPWLDGKHVVDFGYAVFGKVVEGMDVV
750 TLSMANAG-PNTNGSQFFITTVPCPWLDMKHT-----VFGRVTHGADV 792

KKIENVGTDEYGKSGDKPSKEVKIADCGQLE
793 LKIEGVKTN----MNDKPLQDVKLLTIKITS 819
```

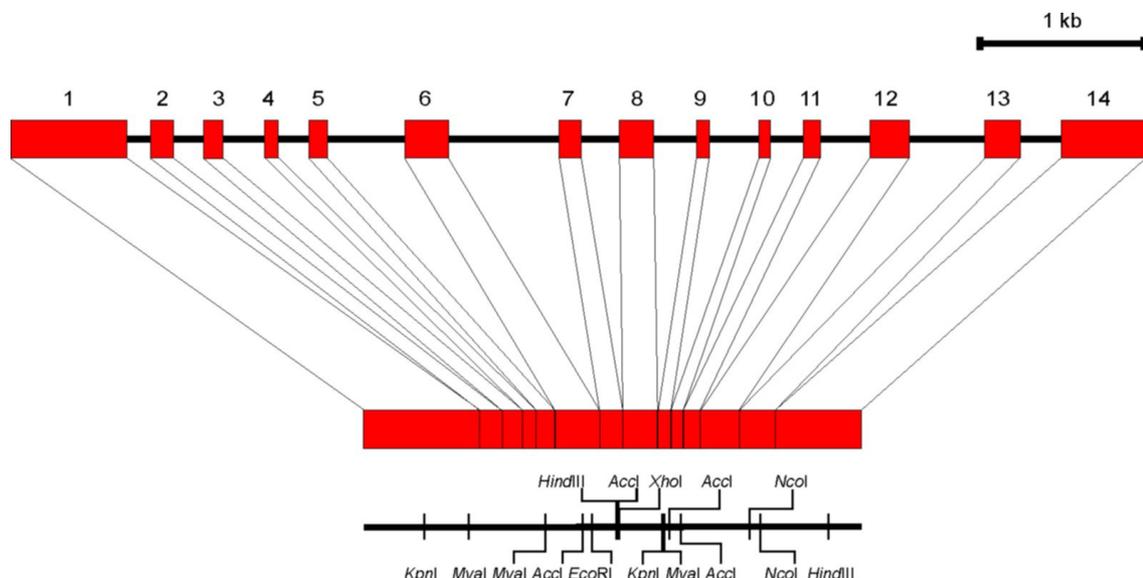
## B

<b>WD40 Motiv</b>		<b>LLRTL-GHTGPVTSVAFSPDGNLLASGSDDGTVKLWD</b>	
<i>EtCYP89</i> WD-Repeat 1	252	YSKSFMHREQIIFV <b>VASSAH-HFILSGSV</b> DGHVKFWI	287
<b>WD40 Motiv</b>		<b>LLRTL-GHTGPVTSVAFSPD--GNLLASGSDDGTVKLWD</b>	
<i>EtCYP89</i> WD-Repeat 2	295	FVKHFRAHIGELHCLCISREDGGDHAASVGADKTLRMFD	333
<b>WD40 Motiv</b>		<b>LLRTL-GHTGPVTSVAFSPDGNLLASGSDDGTVKLWD</b>	
<i>EtCYP89</i> WD-Repeat 3	387	PVVTFSLHASPVRLLAHVGGTDICFSADKDGGLEMWS	423
<b>WD40 Motiv</b>		<b>LLRTL-GHTGPVTSVAFSPDGNLLASGSDDGTVKLWD</b>	
<i>EtCYP89</i> WD-Repeat 4	448	HLFDLQRNGTTPLAIAASPNGQWLAVFGADYHLRIFS	484

**Abbildung 3.17 Konservierte Proteindomänen in *EtCYP89*.** [A] Vergleich der Cyclophilin-artigen Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domäne (PPIase) aus *EtCYP89* (Pos. 668-819) mit dem PRO-ISOMERASE Motiv (PF00160) durch das Programm ‚MotifScan‘ (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), das auf die Datenbank ‚protein families databases of alignments and hidden Markov models‘ (Pfam) (Falquet *et al.*, 2002) zugreift. [B] Vergleich der vier in *EtCYP89* vorkommenden WD-artigen Repeats (Pos. 252-287; Pos. 295-333; Pos. 387-423; Pos. 448-484) mit dem WD40 Consensus-Motiv dieses Repeats aus ‚Pfam‘ (PF00400). Identische AS sind hellblau, ähnliche AS sind grau unterlegt und die Consensus-Sequenzen der ‚Pfam‘-Motive sind fettgedruckt. Zwei AS wurden als ähnlich bewertet, wenn beide unpolare, ungeladene polare, saure oder basische Seitenketten haben oder zu den aromatischen AS gehören. Die Numerierung der AS entspricht jener der vollständigen *EtCYP89* Sequenz in **Abb. 3.16**.

### 3.10 Genomische Organisation des *EtCyP89*-Gens

Die oben abgebildete 2.924 bp große cDNA von *EtCyP89* erstreckt sich im contig202 auf 6.710 bp genomische DNA, der Intronanteil im Gen liegt bei 56,4 %. In **Abb. 3.18** ist ein Schema der Exon-Intron-Struktur dieses Gens zu sehen, welches sich aus 14 Exons und 13 Introns zusammensetzt.



**Abbildung 3.18 Schematische Darstellung des *EtCyP89*-Gens.** Das Gen besteht aus 14 Exons und 13 Introns. Die Exons sind als rote Rechtecke dargestellt und durchnummeriert, die Introns als schwarze Linien, die die Exons 3'-seitig flankieren. Die Größe der einzelnen Exons liegt zwischen >683 bp (Exon 1) und 69 bp (Exon 10), die der im Durchschnitt deutlich längeren Introns zwischen 648 bp (Intron 6) und 138 bp (Intron 1). Die Gesamtheit der dargestellten Exons ergibt eine cDNA von 2.924 bp (ohne Poly-(A)-Schwanz), für die die Position der Schnittstellen ausgewählter Restriktionsendonukleasen angegeben sind.

## Ergebnisse

Die Größe der einzelnen Exons liegt zwischen >683 bp (Exon 1) und 69 bp (Exon 10), die der Introns zwischen 648 bp (Intron 6) und 138 bp (Intron 1). Die exakte Länge des Exons 1, das sehr wahrscheinlich den 5'-UTR enthält, wurde noch nicht bestimmt und wurde daher bei der durchschnittlichen Exongröße des *EtCyP89* noch nicht berücksichtigt. Die durchschnittliche Größe der Exons liegt somit bei 172, die der Introns bei 291 bp. Der codierende Bereich dieses Gens erstreckt sich über alle 14 Exons, wobei der gesamte 3'-UTR (436 bp) den größten Teil des letzten Exons ausmacht. Die Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge des *EtCyP89*-Gens entsprechen den Consensus-Sequenzen, die für das Spleißen genutzt werden können (Breathnach *et al.*, 1978; Breathnach and Chambon, 1981; Stephens and Schneider, 1992). Für die 5'-Spleißstelle ist dies AG/gtragt und für die 3'-Spleißstelle yag/GT (r = A oder G; y = T oder C). Die unveränderlichen Basen g und t der 5'-Spleißstelle sowie a und g der 3'-Spleißstelle sind unterstrichen und flankieren sämtliche Introns des *EtCyP89*-Gens. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Exon-Intron-Übergängen, die für Eimepsin (Jean *et al.*, 2001) beschrieben sind. In **Tab. 3.5** sind die Exon- und Introngrößen sowie sämtliche Exon-Intron-Übergänge des *EtCyP89*-Gens unter Angabe der jeweils 10 flankierenden Basen eines jeden Exons und Introns aufgeführt.

**Tabelle 3.5 Exon-Intron-Übergänge in *EtCyP89*.** Die Exon-Intron-Übergänge zeigen die Consensus-Sequenzen, die für das Spleißen genutzt werden können (Breathnach *et al.*, 1978; Breathnach and Chambon, 1981; Stephens and Schneider, 1992): die unveränderlichen Basen g und t der 5'-Spleißstelle sowie die Basen a und g der 3'-Spleißstelle flankieren sämtliche Introns des *EtCyP89*-Gens und sind in der Tabelle durch Unterstriche gekennzeichnet. Exonsequenzen sind in Großbuchstaben, Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. (\*) Die Größe des ersten Exons ist aufgrund des unbestimmten 5'-UTRs noch nicht bekannt und wurde daher bei der Bestimmung der durchschnittlichen Exongröße noch nicht berücksichtigt. Die Größe des Exons 14 versteht sich ohne Poly-(A)-Schwanz.

Exon	Exongröße	5'-Spleißdonor	Intron	Introngröße	3'-Spleißakzeptor
1	> 683 bp	GATGAGTTCGgta <sup>u</sup> cgtcatt	1	138 bp	atgcgtatagGTCCGAAACC
2	138 bp	ATTATATTCGgtaagc <sup>u</sup> ttt <sup>g</sup>	2	177 bp	tgctatgcagTTGTGGCGAG
3	117 bp	GCCCACATAGgtaggtgcca	3	247 bp	gtgtgcacagGAGAATTGCA
4	79 bp	AACTTTGAGGg <sup>u</sup> ttt <sup>g</sup> tt <sup>g</sup> ct	4	181 bp	tcgccttcagATGTTTCGATG
5	111 bp	TCGTTGCGGt <sup>u</sup> gtacgtacac	5	455 bp	ctcgccgcagATCGGACAAA
6	262 bp	CCTACAGAGag <sup>u</sup> taagtagtt	6	648 bp	tgcgccgcagAACGGAACGA
7	135 bp	GACGCTCCAGg <sup>u</sup> tatttctta	7	223 bp	gcttttttagTTCTACGAAA
8	204 bp	TGACAATAAAg <sup>u</sup> tgagaaact	8	251 bp	ttgtttgcagGTCTGCCGCT
9	78 bp	TGCAAGCCGTg <sup>u</sup> gtgtcttc	9	291 bp	ttttatgcagCGACTTGCCA
10	69 bp	AGAAGAAACGg <sup>u</sup> ttagacacc	10	195 bp	ttacttttagGGTCTACTTT
11	100 bp	TCACTAGGCGg <sup>u</sup> tcgctcatt	11	294 bp	gctgctgcagCTGCATCTGG
12	231 bp	GGAACGGGCg <sup>u</sup> tgagagc <sup>u</sup> tt	12	446 bp	atgtctgcagGGGAGTCGAT
13	212 bp	GATCGAAGGAg <sup>u</sup> tatgcattc	13	240 bp	gtattcgcagGTGAAAAC <sup>u</sup> TA
14	505 bp	-	-	-	-
Ø	172 bp*		Ø	291 bp	

### 3.11 Vergleich des *EtCYP89* mit Cyclophilinen anderer Organismen

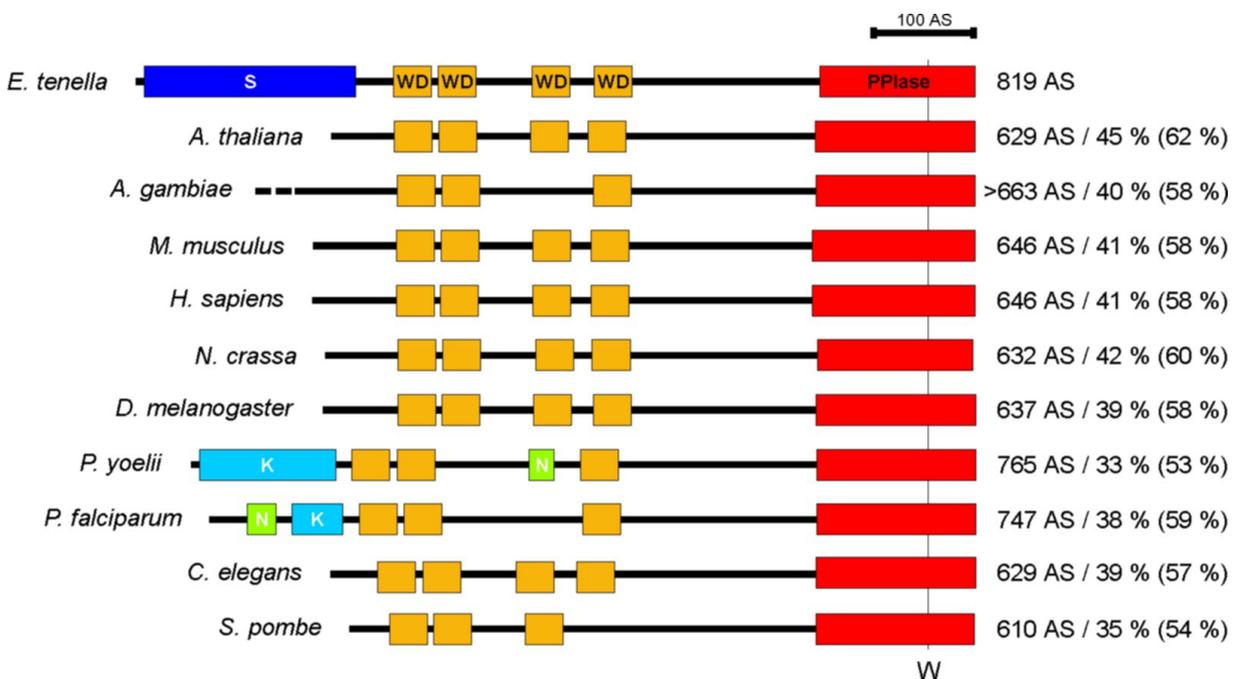
Cyclophiline sind ubiquitäre, hochkonservierte Proteine und gehören zu einer großen Familie von homologen Proteinen, die mit vielen Isoformen in den unterschiedlichsten Geweben und Organismengruppen zu finden sind: in Bakterien, Pilzen, parasitischen Protozoen und Helminthen bis

hin zu Pflanzen und Säugetieren (Göthel and Marahiel, 1999). Einen Überblick, der sowohl phylogenetische Zusammenhänge herstellt, als auch die subzelluläre Lokalisation beschriebener Cyclophiline (falls bekannt) auflistet, geben Chou und Gasser (1997). Bei vielen Cyclophilinen handelt es sich entweder um relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 20 kDa, wie es beispielsweise bei den für *P. falciparum* beschriebenen Cyclophilinen PfCyP19 (Berriman and Fairlamb, 1998), PfCyP22 (Hirtzlin *et al.*, 1995) und PfCyP24 (Reddy, 1995) der Fall ist. Außerdem gibt es Cyclophilin-artige Domänen als katalytische Regionen in viel größeren Proteinen. Letztere, zu denen auch EtCYP89 zählt, können auch als Cyclophilin-artige Proteine bezeichnet werden (Chou and Gasser, 1997). Alle weisen eine hochkonservierte ca. 18 kDa Domäne auf, die von ganz unterschiedlichen weiteren Proteinmotiven flankiert werden kann, welche beispielsweise als Signalpeptide oder Retentionssignale über die subzelluläre Lokalisation entscheiden. Das humane Cyclophilin B (CyPB) beispielsweise weist ein Signalpeptid für die Translokation ins endoplasmatische Reticulum (ER) auf (Price *et al.*, 1991) und ist eines von mindestens 16 humanen Cyclophilinen oder Cyclophilin-artigen Proteinen mit ganz unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und einem Molekulargewicht zwischen 17 und 324 kDa (Galat, 2003). Neben CyPB (ER) gibt es u. a. das cytosolische CyPA, das mitochondriale hCyP3 sowie das CyP-40 und CyP-60 mit Cyclophilin-artigen Domänen (Chou and Gasser, 1997). Die stetig wachsende Zahl von klonierten und charakterisierten Cyclophilinen unterstreicht die Vielfältigkeit dieser Proteinfamilie: von den beispielsweise 17,7 kDa eines Cyclophilins aus *S. mansoni* (Kiang *et al.*, 1996) über die 150 kDa des Cyclophilin-artigen Proteins aus Mensch bzw. Maus (Anderson *et al.*, 1993) auf der Oberfläche von NK-Zellen (natural killer cells) bis hin zu einem humanen, 324 kDa großen Cyclophilin-artigen Protein (Galat, 2003).

Zum Sequenzvergleich von EtCYP89 mit beschriebenen Cyclophilinen anderer Organismen auf Proteinebene wurde das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des ExpASy (Expert Protein Analysis System) Servers ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) benutzt. Blastp greift dabei auf die Proteindatenbanken Swiss-Prot, TrEMBL und TrEMBL\_NEW zu. Die Filteroption für Bereiche niedriger Komplexität wurde deaktiviert und zur Verbesserung der Vergleiche wurden Lücken im ‚alignment‘ zugelassen. Da es sich bei EtCYP89 um eine Cyclophilin-artige *cis-trans* Isomerase Domäne von 152 AS handelt, die den Carboxy-Terminus dieses Proteins bildet, wurden separate Datenbankanalysen für das gesamte EtCYP89 (819 AS) und für die enzymatische Domäne alleine durchgeführt. Die Ergebnisse sind jedoch sehr ähnlich, wobei die prozentualen Angaben zur Übereinstimmung beim ausschließlichen Vergleich der Cyclophilin-artigen Domäne wegen ihres hochkonservierten Charakters natürlich deutlich höher liegen. Auffällig ist zunächst, dass die Cyclophiline mit der größten Ähnlichkeit nicht etwa bei anderen Apicomplexen wie *Plasmodium*, *Toxoplasma* und *Theileria* zu finden sind, sondern im Pflanzenreich: bei der Brunnenkresse *Arabidopsis thaliana* und beim Reis *Oryza sativa*. Die ähnlichsten Cyclophilin-artigen Proteine zur Gesamtsequenz von EtCYP89 sind somit eine 70,7 kDa Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase (PPIase, Rotamase) aus *A. thaliana* (Q9LXM7) mit 45 % identischen (bzw. 62 % ähnlichen) AS über einen Abschnitt von 611 AS. Es folgen ein Cyclophilin aus der Maus *M. musculus* (Q8CEC6) mit 41 % (58 %) über 638 AS sowie eines aus der Stechmücke *A. gambiae* (EAA10133) mit 40 % (58%) über 664 AS. Vergleicht man nur die enzymatische Domäne von EtCYP89, so besteht die größte Ähnlichkeit zu

## Ergebnisse

einem Cyclophilin aus dem Reis *O. sativa* (BAC78591) mit 75 % identischen (85 % ähnlichen) über 149 AS, gefolgt von der gleichen *A. thaliana* Sequenz (Q9LXM7) wie für das Gesamtprotein schon angegeben, diesmal jedoch mit 75 % (84 %) über 149 AS. Als drittbesten Treffer erscheint hier erstmals ein Sporozoen-Cyclophilin von *P. falciparum* (Q8I402): Von 151 verglichenen AS sind 67 % identisch und 82 % ähnlich (Stand: Oktober 2003). Aufgrund des ubiquitären und konservierten Charakters der Cyclophiline ist die Anzahl an Sequenzen mit signifikanten Übereinstimmungen sehr groß, so dass selbst der Datenbanktreffer Nr. 100, eine Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase aus *Drosophila melanogaster* (Q8MKJ6), noch 46 % identische AS im Vergleich zu 151 AS aus *EtCYP89* aufweist. Bei der großen Mehrheit dieser Proteine repräsentiert die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domäne den äußersten Carboxy-Terminus oder ist zumindest nahe diesem lokalisiert, so dass sie sich hauptsächlich in ihrem N-terminalen Ende voneinander unterscheiden. In **Abb. 3.19** werden die 10 zur Gesamtsequenz von *EtCYP89* ähnlichsten Cyclophilin-artigen Proteine hinsichtlich ihrer Struktur und ihren konservierten Proteindomänen miteinander verglichen.



**Abbildung 3.19 Proteindomänen Cyclophilin-artiger Proteine aus verschiedenen Organismen.** Der Vergleich zeigt 10 zu *EtCYP89* (*E. tenella*) homologe Cyclophilin-artige Proteine aus unterschiedlichen Organismen: *A. thaliana* (Q9LXM7, 629 AS), *A. gambiae* (EAA10133, 663 AS), *M. musculus* (Q8CEC6, 646 AS), *H. sapiens* (Q96BP3, 646 AS), *N. crassa* (EAA34523, 632 AS), *D. melanogaster* (Q960Q8, 637 AS), *P. yoelii* (EAA15686, 765 AS), *P. falciparum* (Q8I402, 747 AS), *C. elegans* (Q9U1Q3, 629 AS), *S. pombe* (O74942, 610 AS). Die angegebenen ‚accession numbers‘ stammen aus den Datenbanken TrEMBL und TrEMBL\_NEW. Mit Ausnahme des Cyclophilin-artigen Proteins von *A. gambiae* (663 AS-Fragment, als unterbrochene schwarze Linie am N-Terminus markiert) sind nur vollständige Proteinsequenzen im Schema abgebildet. Die Größe dieser Cyclophilin-artigen Proteine sowie deren prozentuale Identität (Ähnlichkeit) mit *EtCYP89* sind auf der rechten Seite des Schemas aufgeführt. Auffällig ist der konservierte Charakter der als rote Rechtecke dargestellten Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domänen (PPlase) am C-terminalen Ende der Proteine sowie die Position der jeweils drei bis vier WD-40-artigen Repeats (WD, orange-farbene Rechtecke). Die Isomerase Domänen sind anhand der Position des konservierten Tryptophans (W) in Pos. 121 des humanen CyPA (Liu *et al.*, 1991a; Page *et al.*, 1995a) aneinander ausgerichtet (vertikale, schwarze Linie). Sämtliche abgebildeten Proteine weisen dieses, zur Cyclosporin A-Bindung essentielle Tryptophan auf. Als zusätzliche Domänen finden sich bei *EtCYP89* eine Serin-reiche Region (S, dunkelblaues Rechteck), bei den beiden *Plasmodium*-Arten jeweils eine Lysin-reiche Region (K, hellblaue Rechtecke) sowie eine kürzere Asparagin-reiche Region (N, grüne Rechtecke). Die in diesem Schema abgebildeten Proteindomänen wurden mit dem Programm MotifScan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), das dabei auf die Datenbank ‚The Pfam collection of hidden Markov models‘ zugreift, detektiert (Falquet *et al.*, 2002). Der Maßstabalken markiert 100 AS.

Die Genome der in **Abb. 3.19** aufgeführten Organismen sind annähernd vollständig sequenziert. Das ermöglicht einen Vergleich von *EtCyP89* mit den Cyclophilin-artigen Proteinen dieser Organismen hinsichtlich ihrer genomischen Organisation. Die Exon-Intron-Struktur dieser Gene wird durch das ‚alignment‘ der für ein Cyclophilin-artiges Protein codierenden cDNA mit dem entsprechenden genomischen DNA-Abschnitt deutlich. In der ‚Intron-Exon Knowledge‘ Datenbank (Sakharkar *et al.*, 2000; <http://intron.bic.nus.edu.sg/iekb>) hingegen finden sich nur wenige Einträge zur genomischen Organisation von Cyclophilinen. Aufgrund der großen Ähnlichkeit eines Cyclophilin-artigen Proteins aus *A. thaliana* zu *EtCYP89* bietet sich zunächst dieser Organismus zum Vergleich an: Von der hypothetischen 70,7 kDa Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase von *A. thaliana*, deren Gesamtsequenz zu 45 % bzw. deren PPIase-Domäne zu 75 % identisch ist mit *EtCYP89*, weiß man beispielsweise, dass die cDNA aus 13 Exons aufgebaut ist und die entsprechende genomische DNA-Sequenz durch 12 Introns unterbrochen wird. Zwei weitere Cyclophiline aus diesem Organismus, ROC4 (L14845), welches im Chloroplast lokalisiert ist, weist 7 Exons und 6 Introns auf, bei CYP5 (AF020433), das ein N-terminales Signal zur Translokation ins ER besitzt (Saito *et al.*, 1999), sind es 6 Exons und 5 Introns. Die Introns von ROC4 weisen eine Größe zwischen 77 und 194 bp auf (Chou and Gasser, 1997) und sind somit im Durchschnitt deutlich kleiner als die 138 bis 648 bp großen Introns von *EtCyP89*. Im Gegensatz dazu sind fünf cytosolische Cyclophiline aus *Arabidopsis* (ROC1, 2, 3, 5 und 6) intronlos (Chou and Gasser, 1997). Bei *Arabidopsis* scheinen also die cytosolischen Cyclophiline mit relativ geringem Molekulargewicht meist intronlos zu sein, wohingegen die größeren Cyclophilin-artigen Proteine, deren AS-Sequenz durch Signalpeptide oder andere Proteindomänen verlängert wird, häufig eine Exon-Intron-Struktur aufweisen. Die codierenden DNA-Sequenzen für die in **Abb. 3.19** aufgeführten Cyclophilin-artigen Proteine setzen sich bei *M. musculus* (Q8CEC6) aus 10 Exons, bei *H. sapiens* (Q96BP3) aus 11 Exons, bei *N. crassa* (EAA34523) aus 3 Exons und bei *D. melanogaster* (Q960Q8) aus 10 Exons zusammen. Für das 663 AS-Fragment des Cyclophilins von *A. gambiae* codieren 7 Exons. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Gene für die beiden relativ großen Cyclophilin-artigen Proteine aus *P. yoelii* (EAA15686) und *P. falciparum* (Q8I402) nicht durch Introns unterbrochen werden; die für sie codierenden cDNAs lassen sich lückenlos auf den entsprechenden genomischen Sequenzen abbilden.

Weitere Cyclophilin-artige Proteine, von denen man die genomische Organisation kennt, sind beispielsweise das oben erwähnte humane Cyclophilin-artige Protein (Anderson *et al.*, 1993) auf der Oberfläche von NK-Zellen, bei dem die codierende Region aus 16 Exons und 15 Introns besteht (AF184110) und das humane, von Kieffer *et al.* (1993), beschriebene CyP-40 (L11667) mit 10 Exons und 9 Introns. Das *ninaA*-Gen aus dem Auge von *Drosophila* weist ein einziges Intron nahe dem 3'-Ende der codierenden Region auf (Schneuwly *et al.*, 1989). Die bei den Pilzen *Neurospora crassa* (J039063) und *Tolyopocladium niveum* (Z48002) im Cytosol und den Mitochondrien vorkommenden Cyclophiline weisen jeweils 5 Exons und 4 Introns auf. Auch hier scheinen die Translokation in unterschiedliche Zellkompartimente, die komplexeren Funktionen Cyclophilin-artiger Proteine durch zusätzliche Proteindomänen und das zunehmende Molekulargewicht mit einer Intron-Exon-Genstruktur der betreffenden Gene einherzugehen.

## Ergebnisse

Die anti-parasitische Wirkung von Cyclosporin A wurde zufällig 1981 entdeckt (Bueding *et al.*, 1981; Thommen-Scott, 1981) und seitdem für viele parasitische Protozoen und Helminthen untersucht und bestätigt (Chappell and Wastling, 1992; Page *et al.*, 1995a): u. a. für *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma* und *Eimeria* sowie für *Trichinella*, *Fasciola*, *Schistosoma* und *Hymenolepis*. Der genaue Mechanismus dieser anti-parasitischen Effekte ist noch unklar, eine Cyclophilin-vermittelte Wirkung beispielsweise über die Hemmung der Peptidyl-Prolyl Isomerase-Aktivität oder die Hemmung eines essentiellen Signaltransduktionswegs, wie man es für die Calcineurin-vermittelte Inhibierung von Interleukin-Transkriptionsfaktoren bei T-Zellen kennt (Göthel and Marahiel, 1999), liegt jedoch nahe. Bestätigt wird diese Annahme durch Untersuchungen, wonach die Aktivität von Calcineurin in *P. falciparum*-Extrakten durch Cyclosporin A ausschließlich in Gegenwart von Cyclophilin inhibiert wird (Bell *et al.*, 1994). Cyclosporin A-bindende Cyclophiline sind u. a. bereits für *S. mansoni* (Koletsky *et al.*, 1986), *P. falciparum* (Bell *et al.*, 1994) und *T. gondii* (High *et al.*, 1994) beschrieben worden. Die spezies-spezifische Wirkung von Cyclosporin A hängt wahrscheinlich mit unterschiedlichen Isoformen der Cyclophiline zusammen. Durch Röntgen-Kristallographie und gezielte Mutagenese fand man heraus, dass für eine hochaffine Bindung von Cyclosporin A 13 hochkonservierte AS verantwortlich sind (Pflugl *et al.*, 1993; Berriman and Fairlamb, 1998), allen voran ein Tryptophan (Trp121) (Liu *et al.*, 1991a). Tritt an die Stelle dieses Tryptophans beispielsweise ein Phenylalanin (im Cyclophilin von *E. coli*) oder ein Histidin (im Cyclophilin von *Brugia malayi*) (Page *et al.*, 1995b), so nimmt die Bindungsaffinität dramatisch ab: Während das humane Cyclophilin A mit Trp121 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 19 nM Cyclosporin A aufweist, steigt dieser für das entsprechende Cyclophilin A aus *B. malayi* mit einem Histidin an dieser Position auf 860 nM an. Da man also auf Basis dieser Aminosäure(n) eine gewisse Vorhersage für Cyclosporin A-Sensitivität treffen kann, ist es eine wichtige Feststellung, dass *EtCYP89* als erstes beschriebenes Cyclophilin-artiges Protein aus *Eimeria* genau diese 13 entscheidenden Reste aufweist (**Abb. 3.20**).

<i>E. tenella</i>	TLHTTFGDIRVKLFGTECPKTVENFTVHARNGYYDNMLFHRVIKGFMIQTGDPNGDGTGG	727
<i>N. crassa</i>	VIHTTYGDIHIRLFPDAAPKAVENFVTHAKRGYYNNTIFHRVIRKFMIOGGDPLGDGTGG	543
<i>S. pombe</i>	IIHTTQGDISIKLYPEEAPKAVQNFTHAENGYDNTIFHRIKKNFMIOGGDPLGDGTGG	517
<i>O. sativa</i>	VMHTSMGDIHLRLYPEECPKTVENFTTHCRNGYYDNLIHFHRVIKGFMIQTGDPNGDGTGG	88
<i>A. thaliana</i>	IMHTTLGDIHMKLYPEECPKTVENFTTHCRNGYYDNHLFHRVIRGFMIQTGDPNGDGTGG	536
<i>H. sapiens</i>	IIHTSMGDIHTKLFVPECPKTVENFCVHSRNGYYNGHTFHRIKGFMIQTGDPNGDGTGG	554
<i>M. musculus</i>	IVHTSMGDIHIKLFVPECPKTVENFCVHSRNGYYNGHTFHRIKGFMIQTGDPNGDGTGG	554
<i>A. gambiae</i>	VLHTTMGDVHLRFLFGKECPKTVENFCVHSKNGYYNGHLFHRVIKGFMIQTGDPNGDGTGG	571
<i>D. melanogaster</i>	VLHTTKGDIHMRLLFFKEVPKTVENFCVHAKNGYYNGHIFHRVIKGFMIQTGDPNGDGTGG	544
<i>C. elegans</i>	IIHTSFGDITIRLFGDECPKTVENFCVHSRNGYYNGHTFHRIKGFMIQTGDPNGDGTGG	536
<i>P. falciparum</i>	IIYTTMGDIHISLFYKECKKTVQNFVHSINGYYNNCIFHRVIKGFMIQTGDPNGDGTGG	655
<i>P. yoelii</i>	IIYTTMGEIHISFFYKECKKTVLNFATHSTNGYYNNCIFHRVIKGFMIQTGDPNGDGTGG	673
	::*: **: : : *:* * .*. .***:. ****: **:* *** * * *	

<i>E. tenella</i>	ESIWGGDFEDELHRSCLKHDRPFTLSMANAG-PNTNGSQFFITTVPCPWLDMKHTVFGRVT	786
<i>N. crassa</i>	ESIWGKEFEDEFSS-LKHDKPYTVSMANAG-PNTNGSQFFITTEKTPWLDNKHTVFGRV	601
<i>S. pombe</i>	ESIWKKDFEDEISPNLKHDRPFTVSMANAG-PNTNGSQFFITTDLTPWLDGKHTVFARAY	576
<i>O. sativa</i>	QSIWGREFEDEFHKSRLRHDRPFTLSMANAG-PNTNGSQFFITTVATPWLDMKHTVFGRVV	147
<i>A. thaliana</i>	QSIWGREFEDEFHKSRLRHDRPFTLSMANAG-PNTNGSQFFITTVATPWLDMKHTVFGRVV	595
<i>H. sapiens</i>	ESIWGGFEDEFHSTLRHDRPYTLSMANAG-SNTNGSQFFITVVPWPWLDMKHTVFGRVT	613
<i>M. musculus</i>	ESIWGGFEDEFHSTLRHDRPYTLSMANAG-SNTNGSQFFITVVPWPWLDMKHTVFGRVS	613
<i>A. gambiae</i>	QSIWGGFEKDFCSTLKHDRPYTVSMANAG-PNTNGSQFFITVLPWPWLDMKHTVFGRVH	630
<i>D. melanogaster</i>	KSIWGSDFKDEFVPSLKHDRPYTVSMANAG-PNTNGSQFFITVLPWPWLDMKHTVFGRVY	603
<i>C. elegans</i>	ESIWGEDFEDEFHRLRHKDPFKVSMANAGGNTNGSQFFITVCPADWLDGKNTLFGVEVT	596
<i>P. falciparum</i>	ESIWGNFEDEFDHLNHSKPFVSMANAG-PNTNGSQFFITTVPCPWLDFKHTVFGRVT	714
<i>P. yoelii</i>	ESIWGSEFEDEFDHLNHSKPFVSMANAG-PNTNGSQFFITTVPCPWLDFKHTVFGRVT	732
	:*** :***: *..*: :****.* *****. ****:*:*..	

<b><i>E. tenella</i></b>	<b>HGADVVLKIEGVKTN-MNDKPLQDVKLLTIKITS-</b>	<b>819</b>
<i>N. crassa</i>	QGLDVIHRIEN-VKTHK-DKPVEDIKILNIDIM--	632
<i>S. pombe</i>	AGLDVVHRIEQ-GETDKYDRPLEPTKIINISIVYT	610
<i>O. sativa</i>	KGMDVVQQIEKVKTD-KNDKPYQDVKILNVTVPKT	181
<i>A. thaliana</i>	KGMDVVQGIEKVKTD-KNDRPYQDVKILNVTVPKS	629
<i>H. sapiens</i>	KGMEVVQRISNVKVNPKTDKPYEDVSIINITVK--	646
<i>M. musculus</i>	KGMEVVQRIFNVKVNPKTDKPYEDVSIINITVK--	646
<i>A. gambiae</i>	KGMEIVQNICNAKTNPKTDKPYDEIRIISINLS--	663
<i>D. melanogaster</i>	RGMEVVLNINCSKANPKTDKPYDDIKIISIHLNS-	637
<i>C. elegans</i>	AGMSVVQRINQVSTFERSGRPRESIQIMSISLK--	629
<i>P. falciparum</i>	QGSKIVLDIEKVRTD-KRDKPLEDIKILNIKINN-	747
<i>P. yoelii</i>	QGTKVVLVDIEKVRTD-KRDKPLDEIKILNIKINH-	765
	* .:: *                    .:* :        :::: :	

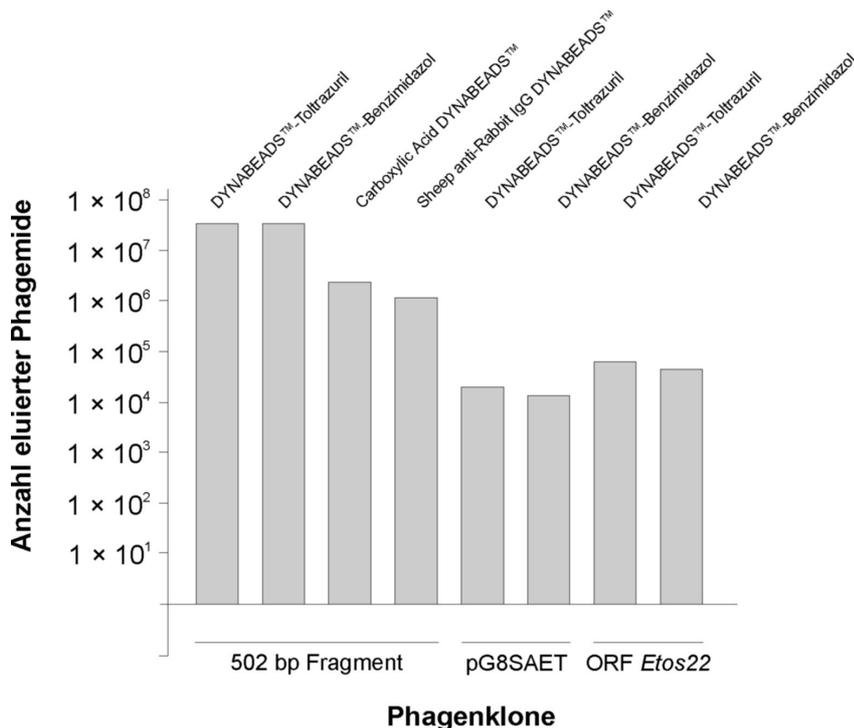
**Abbildung 3.20 Sequenzvergleich von Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domänen aus verschiedenen Cyclophilin-artigen Proteinen.** Für das Alignment der enzymatischen Domänen am C-terminalen Ende von 12 Proteinen mit Isomerase-Aktivität aus verschiedenen Organismen wurde das Programm ClustalW benutzt. Die Cyclophiline stammen aus *E. tenella* (*EtCYP89*, fettgedruckt), *N. crassa* (EAA34523), *S. pombe* (O74942), *O. sativa* (BAC78591), *A. thaliana* (Q9LXM7), *H. sapiens* (Q96BP3), *M. musculus* (Q8CEC6), *A. gambiae* (EAA10133), *D. melanogaster* (Q960Q8), *C. elegans* (Q9U1Q3), *P. falciparum* (Q8I402) und *P. yoelii* (EAA15686). Die für die Cyclosporin A-Bindung entscheidenden AS sind gelb, das essentielle ‚W121‘ grün unterlegt (Liu *et al.*, 1991a; Pfugl *et al.*, 1993; Berriman and Fairlamb, 1998).

### 3.12 Toltrazuril und *EtCYP89*

Ein 502 bp Fragment aus einer genomischen Expressionsbibliothek von *E. tenella* wurde auf der Oberfläche von filamentösen Phagen im Phagen-Panning gegen mit Toltrazuril gekoppelte M-270 Amine DYNABEADS™ über vier Runden selektiert. Die darauffolgende Charakterisierung dieses Fragments zeigte, dass eine Region aus dem N-Terminus eines Cyclophilin-artigen Proteins aus *E. tenella* (*EtCYP89*) als Fusionsprotein mit dem Gen VIII-Produkt der Phagenhülle exprimiert wurde. Ein direkter oder funktioneller Zusammenhang zwischen der als Antikozidium eingesetzten Substanz Toltrazuril und *EtCYP89*, so wie er beispielsweise zwischen Cyclosporin A und Cyclophilinen belegt ist, ist jedoch fraglich. Bei dem im Phagen-Panning gegen Toltrazuril selektierten 502 bp Fragment handelt es sich um eine Region aus *EtCyP89*, die sich ca. 1,5 kb ‚upstream‘ der enzymatischen Domäne befindet. Somit hat keine Bindung von Toltrazuril an die Isomerase Domäne stattgefunden. Dennoch könnte durch allosterische Wechselwirkungen zwischen der selektierten Region und der enzymatischen Domäne die Isomerase-Aktivität gehemmt werden. Bindungsstudien, sogenannte Kontroll-Pannings, zeigten jedoch, dass das auf der Phagenoberfläche exprimierte 502 bp Fragment eine hohe Affinität zu M-270 Amine DYNABEADS™ an sich aufweist, so dass der Grund für die Selektion dieses Klon nicht zwangsläufig bei den auf der Oberfläche der Beads immobilisierten Toltrazurilmolekülen zu suchen ist. Dies sollte durch eine Negativselektion vor jeder Phagen-Panning-Runde verhindert werden, während der M-270 Amine DYNABEADS™ bindende Phagenklone abgetrennt und verworfen wurden. Diese in Vorversuchen zu diesen Bindungsstudien festgestellte starke Affinität des auf der Phagenoberfläche exprimierten 502 bp Fragments zu nicht-gekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ könnte möglicherweise mit den aktivierten Aminogruppen auf der Oberfläche dieser Beads zusammenhängen. Aus diesem Grund wurden als Negativkontrolle für darauffolgende Kontroll-Pannings M-270 Amine DYNABEADS™ verwendet, an deren NH<sub>2</sub>-Gruppen ein Benzimidazol-Derivat gekoppelt worden war. Vergleichende Bindungsstudien zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bindung des in dieser Arbeit selektierten und charakterisierten Phagenklons an mit Toltrazuril gekoppelte M-270 Amine DYNABEADS™ (HLR7557)

## Ergebnisse

und mit Benzimidazol gekoppelte M-270 Amine DYNABEADS™ (Negativkontrolle): bei jeweils  $5 \times 10^9$  Phagemiden und  $2 \times 10^7$  Beads pro Bindereaktion wurden für beide Ansätze  $\sim 3,2 \times 10^7$  bindende Phagemide eluiert. Für verschiedene andere DYNABEADS™ wie beispielsweise M-270 Carboxylic Acid DYNABEADS™ oder M-280 Sheep anti-Rabbit IgG DYNABEADS™ wurden hingegen nur 1/15 bzw. 1/30 der Phagen eluiert, die an die M-270 Amine DYNABEADS™ gebunden hatten. Für zusätzliche Bindungsstudien wurden 2 weitere Phagenklone als Negativkontrollen eingesetzt: Klon 16 exprimiert das ORF (Pos. 138 – 670; 532 bp) von *Etos22* ohne Signalpeptid auf der Oberfläche, wohingegen Klon pG8SAET kein Fremdprotein in Fusion mit E-,tag' und Phagenhüllprotein VIII exprimiert. Beide Phagenklone binden nur gering an die mit Toltrazuril (HLR7557) gekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ ( $6,0 \times 10^4$  bzw.  $2,0 \times 10^4$  eluierte Phagemide) und die Benzimidazol-gekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ ( $4,4 \times 10^4$  bzw.  $1,2 \times 10^4$  eluierte Phagemide) (**Abb. 3.21**). Das bedeutet, dass keine hohen unspezifischen Bindungseigenschaften der M-270 Amine DYNABEADS™, die nach Herstellerangaben auch nicht gegeben sind, zur Selektion des 502 bp Fragments im Phagen-Panning geführt haben. Möglicherweise führt jedoch die außergewöhnliche AS-Zusammensetzung dieses Fragments (30 % Serin) zu dieser Affinität. Denkbar sind Wasserstoffbrücken zwischen der –OH-Gruppe von Serin und den NH<sub>2</sub>-Gruppen auf der Oberfläche der M-270 Amine DYNABEADS™.



**Abbildung 3.21 Vergleichende Bindungsstudie von Phagenklonen an DYNABEADS™.** Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl eluierter Phagemide aus 8 Bindereaktionen, für die jeweils  $2 \times 10^7$  DYNABEADS™ und  $5 \times 10^9$  Phagemide eingesetzt wurden. Die Anzahl der eluierten Phagen ist auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Die drei verschiedenen Phagenklone exprimieren auf ihrer Oberfläche entweder das 502 bp Fragment aus dem N-Terminus von *EtCYP89*, kein Fremdprotein (pG8SAET) oder das ORF von *Etos22* ohne Signalpeptid (Pos.138-670; 532 bp). Die in der jeweiligen Bindereaktion eingesetzten DYNABEADS™, die auf ihrer Oberfläche mit Toltrazuril, einem Benzimidazol-derivat, mit Carboxylgruppen oder anti-Rabbit Ak gekoppelt waren, sind über dem entsprechenden Balken vermerkt. Auffällig ist, dass die Affinität des auf der Phagenoberfläche exprimierten 502 bp Fragments sowohl für Toltrazuril- wie für Benzimidazol-gekoppelte DYNABEADS™ gleich ist. Die Affinität dieses Phagenklons zu den beiden anderen Sorten DYNABEADS™ ist deutlich geringer: nur 1/15 davon wurde von den Carboxylic Acid DYNABEADS™ eluiert, nur 1/30 davon von den anti-Rabbit Ak DYNABEADS™. Die Affinität der weiteren getesteten Phagemide (pG8SAET und ORF *Etos22*) zu den mit Toltrazuril bzw. Benzimidazol gekoppelten Beads liegt um Größenordnungen unter der des 502 bp Fragments.

## 4 Diskussion

Eine im Rahmen dieser Arbeit konstruierte genomische Expressionsbank von *E. tenella* im Phagemidvektor pG8SAET wurde zum Ligandenscreening für den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Mouafo, 2001; Mouafo *et al.*, 2002) und das symmetrische Triazinonderivat Toltrazuril (Baycox<sup>®</sup>, Bay Vi 9142) benutzt. Mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierende Antigene waren als Bestandteil der Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) bereits mit proteinanalytischen und mikroskopischen Methoden charakterisiert worden. Es handelt sich um stadienabhängige Antigene mit einem apparenten Molekulargewicht von 51 und 46 kDa (138 *hpi*), 30, 25 und 23 kDa (144 *hpi*) und ca. 81 kDa (in sporulierten Oocysten). Sequenzinformationen lagen bis auf 29 durch Edman Abbau sequenzierte AS der 51 kDa Proteinbande jedoch nicht vor. Durch Phagen-Panning wurde ein Fragment eines spezifisch mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierenden Antigens aus der Expressionsbank isoliert. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde amplifiziert und charakterisiert. Diese codiert für ein 22,8 kDa großes Prolin- und Histidin-reiches Protein, das als *EtOS22* (*E. tenella* Oocysten Sporocysten Protein) bezeichnet wurde. Das *Etos22*-Gen ist intronlos und liegt mit ca. 19 Kopien im Genom von *E. tenella* vor. Somit ist *Etos22* das erste für diesen Organismus beschriebene ‚multi-copy‘ Gen. Es liegen zudem erste Hinweise vor, dass sich *EtOS22* möglicherweise als Bestandteil einer Immunprophylaxe eignen könnte.

Auch das Phagen-Panning für Toltrazuril, das für das Screening derselben Phagemidbank auf der Oberfläche von M-270 Amine DYNABEADS<sup>™</sup> immobilisiert wurde, führte zur Isolierung eines DNA-Fragments, welches als RNA-Transkript in *E. tenella* exprimiert wird. Die Amplifikation der vollständigen cDNA von ca. 3,0 kb zeigte, dass es sich um ein Cyclophilin-artiges Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 89,4 kDa handelt, welches daraufhin als *EtCYP89* bezeichnet wurde. Bindungsstudien konnten jedoch nicht eindeutig bestätigen, dass das ursprüngliche Fragment aus *EtCYP89* aufgrund einer Affinität zu Toltrazuril aus der Expressionsbank isoliert worden war. Cyclophiline sind als ubiquitäre Proteine in sämtlichen taxonomischen Gruppen zu finden und *EtCYP89* ist das erste für die Gattung *Eimeria* beschriebene Cyclophilin-artige Protein. *EtCYP89* stellt möglicherweise ein neues ‚target‘ zur Chemotherapie von Infektionen mit Erregern der Gattung *Eimeria* dar, da Cyclophiline u. a. Rezeptoren des immunsuppressiven Undekapeptids Cyclosporin A sind, für das eine anti-parasitische Wirkung auf viele Protozoen und Helminthen nachgewiesen ist.

Das *E. tenella* Genomprojekt ([www.sanger.ac.uk/Projects/E\\_tenella/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/)), im Rahmen dessen seit 2002 an einer mehr als 5fachen Sequenzierung des Genoms des ‚Houghton‘ Stammes gearbeitet wird, macht mit zunehmender Vollständigkeit genomische Sequenzdaten des Parasiten zugänglich (Chapman and Shirley, 2003). Ergänzt wird dieses Projekt durch EST-Analysen verschiedener Entwicklungsstadien (Wan *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003), durch das Immunscreening von cDNA-Bibliotheken (Réfega *et al.*, 2003) und Genomkartierungen (Shirley and Harvey, 2000). Die Anzahl der Gene, die sowohl auf cDNA- als auch auf genomischer DNA-Ebene vollständig charakterisiert worden sind, ist bis heute jedoch sehr gering. Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei neue Gene von *E. tenella*, *Etos22* und *EtCyP89*, die hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion sehr unterschiedlich sind und trägt so zu einem besseren Verständnis der Gene und Proteine dieses Parasiten, auch im Vergleich zu anderen taxonomischen Gruppen, bei.

### 4.1 Das Antigen *EtOS22*

Im Ligandenscreening einer genomischen Expressionsbank von *E. tenella* mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (Mouafo, 2001; Mouafo *et al.*, 2002) sollten entsprechende Antigene, für die auf Proteinebene bereits immunochemische Daten vorlagen, isoliert werden, um nach der cDNA-Sequenzierung eine eindeutige Identifizierung vornehmen zu können. Bereits nach 3 Selektionsrunden im Phagen-Panning kam es zu einer deutlichen Anreicherung eines Phagenklons (A17). Im Western Blot reagierte der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> sehr stark mit dem entsprechenden Fusionsprotein. Ausgehend von diesen für ein Prolin- und Histidin-reiches Polypeptid codierenden 145 bp wurde die vollständige cDNA dieses Gens kloniert und charakterisiert. Dabei stellte sich zunächst die Frage, mit welchem der von Mouafo *et al.* (2002) beschriebenen Antigene aus den WF II das von dieser cDNA codierte Antigen, *EtOS22*, identisch ist, oder ob es sich um ein bislang nicht detektiertes, zusätzliches Antigen handelt.

Mouafo *et al.* (2002) lokalisierten mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> reagierende Antigene in den WF II, die eine entscheidende Rolle beim Aufbau der inneren Oocystenschale spielen. Die Detektion dieses Antigens im Western Blot von infiziertem Blinddarmgewebe (136 *hpi*) fällt zeitlich mit dem Auftreten von Makrogamonten im infizierten Blinddarm und der Bildung der WF II innerhalb dieser Makrogamonten zusammen. Die durch den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> detektierten Proteinbanden unterliegen jedoch einer zeitlichen Veränderung in Abhängigkeit vom Entwicklungszyklus des Parasiten. Während in infiziertem Blinddarmgewebe 136 *hpi* und 138 *hpi* ein einzelnes 51 kDa Protein identifiziert werden konnte, wurden 144 *hpi* vier verschiedene Proteinbanden mit Größen von 23, 25, 30 und 51 kDa beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl Gamonten, als auch schon Oocysten im Darmepithel zu finden. 24 Stunden später (168 *hpi*), wenn nur noch unsporulierte Oocysten im Darmlumen des Wirts nachzuweisen sind, reduziert sich das Bandenmuster im Western Blot auf die 23, 25 und 30 kDa Proteinbanden, wofür die Autoren proteolytische Prozessierung des 51 kDa Proteins verantwortlich machen. In Proteinextrakten von sporulierten Oocysten lassen sich im Western Blot schließlich die ca. 30 kDa Proteinbande sowie eine zusätzliche bei 81 kDa durch den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> detektieren. Dabei stammt das ca. 30 kDa Protein möglicherweise aus kontaminierenden unsporulierten Oocysten, wohingegen das 81 kDa Protein nach Mouafo *et al.* (2002) entweder spezifisch für die Schale von sporulierten Oocysten oder ein Polymerisationsprodukt sein könnte.

Bei *EtOS22* handelt es sich nicht um die im Western Blot detektierte Proteinbande von 51 kDa. Mit einem theoretischen Molekulargewicht von 21,0 kDa ohne bzw. 22,8 kDa mit Signalpeptid ist es deutlich kleiner. Zudem weist die durch Edman Abbau bestimmte AS-Sequenz für die 51 kDa Proteinbande (VPTTVENTVHPYSEMGHYQGRPYAAYMG) (Mouafo, 2001) keine Ähnlichkeit mit der deduzierten AS-Sequenz der *Etos22*-cDNA auf. Vielmehr weist diese kurze Proteinsequenz eine 73 % Identität zu einem kürzlich beschriebenen 56 kDa Protein aus Makrogamonten von *E. maxima*, GAM56, auf (Belli *et al.*, 2002b). Es handelt sich dabei um das N-terminale Ende des reifen Proteins GAM56 nach Abspaltung des Signalpeptids zwischen Ala20 und Val21. Die Sequenzunterschiede lassen sich wahrscheinlich durch die beiden verschiedenen *Eimeria*-Arten begründen: *E. tenella* (Mouafo, 2001) und *E. maxima* (Belli *et al.*, 2002b). Für das reife Protein GAM56 aus *E. maxima* berechnet sich ein theoretisches Molekulargewicht von 51,4 kDa (Muller *et al.*, 2001), was mit der vom

mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> im Western Blot detektierten Proteinbande aus *E. tenella* sehr gut übereinstimmt. Ein zu GAM56 homologes Protein scheint also in *E. tenella* und möglicherweise auch in weiteren *Eimeria*-Arten zu existieren, was die Ähnlichkeit der N-terminalen Sequenz des reifen Proteins sowie übereinstimmende mikroskopische Daten belegen. Zudem beschreibt Mouafo (2001) Kreuzreaktionen des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> mit Proteinextrakten aus mit *E. maxima* infiziertem Darmgewebe: während 137 hpi die 51 kDa Proteinbande detektiert wird, kommt 140 hpi noch eine zweite starke Bande bei 33 kDa hinzu. Aufgrund der Tatsache, dass GAM56 aus *E. maxima* eine sehr Prolin-reiche Region aufweist, läßt sich erklären, warum der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> in *E. tenella* sowohl mit dem GAM56 homologen Protein, als auch mit EtOS22 reagiert: Sowohl GAM56 (Pos. 334-478), als auch EtOS22 (Pos. 69-141) weisen eine Prolin-reiche Region auf, und bei dem im Phagen-Panning gegen den mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> angereicherten Fragment von EtOS22 handelt es sich um den größten Teil genau dieser Prolin-reichen Region (**Abb. 3.7**).

EtOS22 und GAM56 (AY129951) sind offenbar zwei verschiedene, voneinander unabhängige Proteine, die jedoch interessante Übereinstimmungen aufweisen, welche auf eine ähnliche Funktion schließen lassen. GAM56 gehört zu einer Familie von Antigenen aus Makrogamonten, die in den Hüllbildungskörpern von *E. maxima* lokalisiert und am Aufbau der inneren Oocystenwand beteiligt sind: GAM82 (AY179510) (Wallach *et al.*, 1990; Belli *et al.*, 2002a; Belli *et al.*, 2003a) und GAM230, vormals pEM230 (M80656) (Fried *et al.*, 1992; Ferguson *et al.*, 2003) sind die anderen beiden Mitglieder dieser Familie. Alle drei Antigene sind in dem Impfstoff CoxAbic<sup>®</sup> enthalten. Für alle drei Proteine codieren stadienspezifisch regulierte Gene deren Expressionsmuster sehr ähnlich zu dem von *Etos22* sind: *gam56* (detektierbar ab 120 hpi), *gam82* (ab 130 hpi) und *gam230* (118-164 hpi). GAM56 und GAM82 weisen wie *EtOS22* ein N-terminales Signalpeptid auf. Ob das auch für GAM230 gilt, ist unklar, da die 5'-Region der ca. 7 kb großen cDNA noch nicht kloniert wurde. Alle drei Proteine weisen wie *EtOS22* eine Region mit sehr hohem Anteil der AS Prolin auf, dessen Anteil sich im Gesamtprotein auf 12,8 % (GAM56), 10,7 % (GAM82), 16,8 % (C-Terminus von GAM230) und 18,9 % (*EtOS22*) beläuft. Der Anteil an Tyrosin, das durch Peroxidase-katalysiertes, sogenanntes ‚cross-linking‘ zwischen Dityrosin und anderen Proteinen für die Aushärtung der Oocystenschale verantwortlich gemacht wird (Ferguson *et al.*, 2003), liegt bei *EtOS22* mit 4 % jedoch niedriger als bei GAM56 (8,6 %) und GAM82 (9,7 %). Von den für diese Proteine codierenden Genen, *gam56* und *gam82*, weiß man, dass sie wie *Etos22* intronlos sind. Beide liegen jedoch als Einzelkopien im Genom von *E. maxima* vor und unterscheiden sich in dieser Hinsicht deutlich von der Vielzahl von *Etos22*-Kopien im Genom von *E. tenella*. Obwohl Sequenzvergleiche von *EtOS22*, GAM56, GAM82 und GAM230 keine signifikanten Übereinstimmungen ergeben, scheint es Verbindungen zwischen ihnen zu geben. Der gegen GAM56 produzierte mAk 1E11-11 führt bei der Affinitätsaufreinigung von GAM56 aus Gamontenextrakt zur Co-Aufreinigung von GAM82 (Wallach *et al.*, 1990) und auch der in dieser Arbeit verwendete mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkennt zumindest zwei verschiedene Antigene: ein GAM56-homologes Protein aus *E. tenella* und *EtOS22*. Da der mAk 1E11-11 im Immunblot nur die GAM56-Proteinbande detektiert, vermutet man, dass GAM56 und GAM82 miteinander interagieren (Belli *et al.*, 2002a). Beim GAM56-homologen Protein aus *E. tenella* und *EtOS22* hingegen kann man von einem gemeinsamen Epitop ausgehen, da beide unabhängig voneinander vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannt werden. Die Ähnlichkeiten zu den Antigenen GAM56 und GAM82 könnten darauf hindeuten, dass es sich bei

*EtOS22* tatsächlich um ein Protein der WF II handelt, das in die innere Oocystenschale inkorporiert wird. Man weiß, dass die WF II als kleinere Vesikel exocytiert werden und vollständig in die innere Oocystenschale eingebaut werden. *EtOS22* besitzt ein N-terminales Signalpeptid, was wahrscheinlich zwischen Position Ala18 und Ala19 (AVA–AD) vom reifen Protein abgespalten wird. Möglicherweise dient dieses Signalpeptid zur Sekretion dieses Proteins, also zum Transport an die Plasmamembran, wo es schließlich exocytiert und als Strukturprotein Bestandteil der inneren Oocystenschale wird. Die Lokalisation von *EtOS22* im Bereich des Stieda-Körpers der Sporocysten ist wohl eher unwahrscheinlich, da eine Proteinbande entsprechender Größe in Western Blots mit Extrakt aus sporulierten Oocysten nicht detektiert wird (Mouafo *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang interessant ist jedoch die Tatsache, dass der mAk 1E11-11, der den Stieda-Körper auch erkennt, mit zusätzlichen Antigenen in der äußeren Sporocystenschale reagiert (Belli *et al.*, 2002b) und sich in dieser Hinsicht vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> unterscheidet.

Die Zuordnung von *EtOS22* zu den stadienabhängigen, vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> im Western Blot detektierten, Proteinbanden bleibt zunächst jedoch unsicher. Möglicherweise ist *EtOS22* identisch mit der im Western Blot (144 *hpi*, 168 *hpi*) detektierten ca. 23 oder 25 kDa Proteinbande aus *E. tenella* bzw. homolog zu einer 22 kDa Proteinbande, die vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> als Kreuzreaktion in Proteinextrakten aus Makrogamonten von *E. maxima* (144 *hpi*) detektiert wird (Mouafo, 2001). Da man mittlerweile jedoch weiß, dass die beiden Glykoproteine GAM56 und GAM82 Vorläuferproteine von kleineren proteolytisch prozessierten Proteinen sind, die in die sich entwickelnde Oocystenschale inkorporiert werden (Belli *et al.*, 2003b), kann die Zuordnung zu diesen Proteinbanden jedoch nicht mit endgültiger Sicherheit und ohne parallele Detektion mit einem für rekombinantes *EtOS22*-spezifischen Ak getroffen werden. Während GAM82 das Vorläuferprotein für mindestens drei Proteine mit Molekulargewichten von 30, 10 und 8 kDa ist, wird GAM56 zu zwei Schalenproteinen einer Größe von 33 und 12 kDa prozessiert (Belli *et al.*, 2003b). Dieses 33 kDa Protein ist sehr wahrscheinlich identisch zu der vom mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> als Kreuzreaktion detektierten 33 kDa Bande bei Proteinextrakten aus Makrogamonten von *E. maxima* (144 *hpi*) und möglicherweise homolog zu der von Mouafo *et al.* (2002) detektierten ca. 30 kDa großen Proteinbande im Western Blot von Makrogamonten aus *E. tenella* (140 und 144 *hpi*). Zudem kann das Laufverhalten von *EtOS22* in der SDS-PAGE schwer vorausgesagt werden. Glykosylierungen oder auch der hohe Prolin-Gehalt können dazu führen, dass ein stark verändertes Laufverhalten zu beobachten ist, d.h. das aus dem Gel abgeschätzte MW könnte deutlich über dem des aus der cDNA deduzierten liegen (Dunn, 1993). GAM82 hat beispielsweise ein durch Massenspektroskopie bestimmtes MW von nur 62.450 Da.

Die Daten, die durch RT-PCRs und Northern Blot zum Expressionsmuster von *EtOS22* gewonnen wurden, lassen sich zeitlich mit dem Nachweis spezifischer Proteine mit geringerem MW im Western Blot (144 *hpi*, 168 *hpi*) zur Deckung bringen. Man weiß, dass RNA-Transkripte durch RT-PCR oft deutlich früher nachgewiesen werden können, als die entsprechenden Proteine im Western Blot. Ryan *et al.* (2000) konnten beispielsweise für verschiedene Mikronemproteine aus *E. tenella* (*EtMIC1-5*) zeigen, dass die Detektion dieser Proteine im Western Blot erst 10 – 12 h nach dem Nachweis der spezifischen mRNAs möglich war. Ähnliches wird für das, für eine Aspartyl Proteinase in *E. tenella*

codierende Eimepsin-Gen berichtet: Während auf Ebene der Transkripte ein Maximum zwischen 6 und 11 h nach einsetzender Sporulation der Oocysten zu erkennen ist, steigt die im Western Blot detektierte Proteinmenge noch bis zu 24 h nach einsetzender Sporulation an (Jean *et al.*, 2001). Posttranskriptionale Faktoren wie Stabilität der mRNA-Transkripte, die Regulation auf Ebene der Translation und die Degradation des Genprodukts können also die Expression eines Proteins regulieren und verzögern. Durch RT-PCR läßt sich ein *Etos22*-spezifisches Transkript noch nicht 72 *hpi*, spätestens jedoch ab 137 *hpi* nachweisen und findet, möglicherweise in geringerem Maße, auch noch in sporulierten Oocysten statt. Im Northern Blot zeigt sich ein sehr deutlicher Expressionspeak bei 137 *hpi*, wobei die *Etos22*-mRNA mit dieser weniger sensitiven Methode in Gesamt-RNA-Isolationen aus infiziertem Blinddarmgewebe 148 *hpi* und aus sporulierten Oocysten nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Eine genauere Identifizierung des *EtOS22*-Proteins könnte durch die Expression der *Etos22*-cDNA in einem eukaryotischen Expressionssystem ermöglicht werden, wobei Proteinextrakte der transfizierten Zellen durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> inkubiert werden könnten. Die Expression dieses Gens im Vektor pcDNA3.1 und der Zelllinie CHO-K1 (aus *Cricetulus griseus*) war bisher jedoch erfolglos. Die Expression des rekombinanten Proteins wäre jedoch auch für die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen *EtOS22* notwendig, mit deren Hilfe eine eindeutige Identifizierung dieses Proteins durch Western Blot und durch Immunfluoreszenzen denkbar wäre. Weiterhin könnte eine Kolo-kalisation mittels eines *EtOS22*-spezifischen Antikörpers und des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> klären, ob diese beiden Proteine miteinander assoziiert oder in voneinander unabhängigen Strukturen lokalisiert sind.

Die genomische Organisation von *Etos22* zeigt eine Auffälligkeit, wie sie bisher für kein Gen von *Eimeria* beschrieben ist: *Etos22* liegt in einer Vielzahl von Kopien, in tandemartiger Anordnung, im Genom von *E. tenella* vor. Der Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen sowie die Sequenzinformation des ‚contigs‘ 2257242.c007101021.Contig1 (71.864 bp) zeigen, dass die ORFs von *Etos22* (597 bp) durch jeweils 1.365 bp lange ‚Spacer‘-Regionen voneinander getrennt sind. Ein Teil der eingesetzten Restriktionsendonukleasen (*Bgl*I, *Cl*aI, *Kpn*I und *Bgl*II) wurden so gewählt, dass für sie nur eine einzige Schnittstelle innerhalb der repetitiven Einheit, also entweder im ORF oder der ‚Spacer‘-Region vorhergesagt wurde. Da sowohl die einzelnen Kopien von *Etos22* als auch die ‚Spacer‘-Regionen sehr hoch konserviert sind, sind die Erkennungsstellen der Enzyme in jeder repetitiven Einheit identisch. Beim Restriktionsverdau von genomischer DNA führt das zu mehreren gleichen Restriktionsfragmenten, deren Länge zu der der repetitiven Einheit identisch ist, unabhängig von der Position der Schnittstelle oder der Hybridisierungsposition der Sonde innerhalb dieser Einheit. So wurden im Southern Blot Restriktionsfragmente einer Größe von 1.961 bp detektiert, die der Länge einer repetitiven Einheit entsprechen. Diejenigen *Etos22*-Kopien, welche diese Region 5'- oder 3'-seitig flankieren, führten zur Hybridisierung von Restriktionsfragmenten mit abweichender Größe, die im Southern Blot als höhermolekulare Banden geringerer Intensität zu erkennen sind. Zur genaueren Abschätzung der Kopienzahl wurde ein densitometrischer Vergleich von mit *Etos22*-spezifischer Sonde hybridisierten *Dra*I-Restriktionsfragmenten genomischer DNA und

einem Referenzplasmid durchgeführt. Der in **Abb. 3.11** dargestellte Southern Blot läßt zudem vermuten, dass die repetitive Anordnung dieses Gens auf einen einzigen Genlokus im Genom von *E. tenella* beschränkt ist. Bemerkenswert ist der hohe Konservierungsgrad der ORFs von *Etos22*. Die beiden im ‚contig‘ 2257242.c007101021.Contig1 enthaltenen Kopien unterscheiden sich lediglich durch eine Deletion des Triplets CAT in Position 2.347 (**Abb. 3.10**), wobei es sich auch um einen Sequenzierfehler handeln könnte. Zudem zeigt der Abgleich der 1.103 klonierten bp von *Etos22* eine 98-100 % Übereinstimmung zu 54 unabhängigen ‚shotgun‘-Sequenzen über 229 bis 691 bp (Stand: September 2003). Tandemartige ‚Cluster‘ von identischen Genen, wie man sie beispielsweise in extrem hohen Kopienzahlen für Histone oder ribosomale RNA kennt, entstehen durch Genduplikation und führen zu sogenannten Genfamilien. Genduplikation läßt sich u. a. auf fehlerhafte Rekombination von homologen Chromosomen oder fehlerhafte Replikation zurückführen. Genfamilien sind auch bei Protozoen beschrieben: bei der Gattung *Babesia* (Apicomplexa) codieren vier sich tandemartig wiederholende Gene für das Rhoprien-Protein Bv60 (Dalrymple *et al.*, 1993), bei der Gattung *Leishmania* (Flagellata) sind es fünf für das Oberflächen-Glykoprotein gp63 (Button *et al.*, 1989) und bei der Gattung *Trypanosoma* (Flagellata) ebenfalls fünf für hsp70 (Glass *et al.*, 1986), drei für Calmodulin (Tschudi *et al.*, 1985) und zwei bis vier für Actin (Ben Amar *et al.*, 1988). Durch Duplikation entstandene Gene können im Laufe der Evolution dadurch divergieren, dass sie unabhängig voneinander Mutationen akkumulieren. Das kann zu unterschiedlicher Funktion oder zu einem unterschiedlichen Expressionsmuster und Expressionsort ursprünglich identischer Kopien führen. Gut untersuchte Beispiele für Multigenfamilien mit unterschiedlichen aber miteinander verwandten Genen ist das Actin, von dem verschiedene Formen in Muskel- und Nicht-Muskelzellen exprimiert werden, oder das  $\beta$ -Globin: Fünf verschiedene  $\beta$ -Globingene codieren für  $\beta$ -Untereinheiten unterschiedlicher Hämoglobine, die sich geringfügig in ihrer Sauerstoffbindungs- und Freisetzungseigenschaft unterscheiden und daher nur in bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert werden. Zu diesem Zweck wird ihre Expression unabhängig voneinander reguliert. Die Kopien von *Etos22* hingegen scheinen sehr identisch zu sein. Das könnte einerseits darauf hindeuten, dass die Genduplikationen, die zur hohen Kopienzahl dieses Gens führten, in evolutionärer Hinsicht noch nicht lange zurückliegen. Andererseits könnten die Kopien von *Etos22* einer starken Gen-Konversion ausgesetzt sein. Bei diesem Mechanismus nimmt man an, dass voneinander abweichende nicht-allelische Gene sich paaren (Heteroduplex-DNA) und enzymatisch homogenisiert werden. Dies kann entweder durch Strangaustausch oder durch das Ersetzen von fehlgepaarten Basen in der Heteroduplex-DNA erfolgen.

Man geht davon aus, dass ‚multi-copy‘ Gene für stark exprimierte Proteine codieren, eine hohe Konzentration an spezifischen RNA-Transkripten herstellen und somit eine große Menge des entsprechenden Proteins gewährleisten. Möglicherweise ist die Expression dieser Gene aber auch nur innerhalb einer sehr kurzen Phase des Entwicklungszyklus notwendig. Der im Northern Blot nachgewiesene Expressionspeak von *EtOS22* könnte ein Hinweis dafür sein, dass es sich hier um ein Protein handelt, das in einem engen Zeitfenster im Lebenszyklus des Parasiten in großer Menge zur Verfügung stehen muß. Wie wird die Transkription solcher ‚multi-copy‘ Gene reguliert? Von verschiedenen tandemartig angeordneten Genen aus Trypanosomen weiß man, dass ihre

Transkription von einem einzigen Promotor ‚upstream‘ der repetitiven Region gesteuert wird und zu einer polycistronischen Vorläufer-mRNA führt (Van der Ploeg, 1986; Sutton and Boothroyd, 1986; Murphy *et al.*, 1986). Diese wird *trans*-gespleißt und führt zu reifen mRNA-Molekülen für jedes einzelne Gen dieser Region. Polycistronische Vorläufer-mRNA konnte für einige Gene, beispielsweise die Calmodulingene von *T. gambiense*, nachgewiesen werden (Tschudi and Ullu, 1988). Einen weiteren Hinweis für die Existenz von polycistronischen Vorläufer-mRNAs liefern Analysen von ‚Spacer‘- oder intergenen DNA-Regionen zwischen tandemartig angeordneten Genen. Manche von ihnen weisen nicht die essentiellen Signale auf, die für den Transkriptionsbeginn durch die RNA-Polymerase II notwendig sind. Der Nachweis von polycistronischen Vorläufer-mRNAs im Northern Blot ist prinzipiell möglich, durch die schnelle oder co-transkriptionale Prozessierung dieser RNA-Spezies jedoch schwierig. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Kopien von *Etos22* ebenfalls unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen. Regulationsmechanismen dieser Art wurden bisher nur für Trypanosomen beschrieben, bei denen polycistronische RNAs und *trans*-Spleißen die Regel sind. Bei Apicomplexen hingegen wurde dieses Phänomen noch nicht beobachtet, und die hohe Konservierung der intergenen DNA-Regionen zwischen den einzelnen Kopien von *Etos22* deutet darauf hin, dass dort die Kontrollelemente für jeweils nur eine Kopie dieses Gens zu erwarten sind. Durch die genauere Analyse dieser intergenen DNA-Regionen sind somit weitere Erkenntnisse zur Regulation dieses ersten beschriebenen ‚multi-copy‘ Gens aus *Eimeria* zu erwarten.

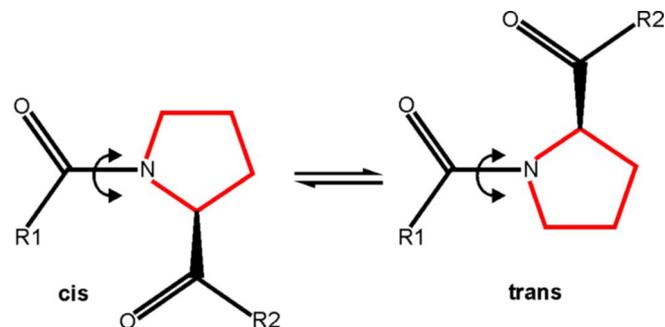
## 4.2 *EtCYP89* – ein Cyclophilin-artiges Protein aus *Eimeria*

Das erste Cyclophilin (CyPA) wurde 1984 aus bovinen Milzzellen aufgereinigt (Handschumacher *et al.*, 1984): ein 18 kDa cytoplasmatisches Protein mit einem basischen isoelektrischen Punkt (pI) >9. Mittlerweile weiß man, dass Cyclophiline ubiquitäre, hochkonservierte Proteine sind, die zu einer großen Familie von homologen Proteinen gehören und mit vielen Isoformen in den unterschiedlichsten Geweben und Organismengruppen zu finden sind: in Bakterien, Pilzen, parasitischen Protozoen und Helminthen bis hin zu Pflanzen und Säugetieren (Göthel and Marahiel, 1999). Die Anzahl verschiedener Cyclophiline in einem Organismus, die oft in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind, ist in höheren Organismen drastisch gestiegen (Galat, 2003). Allen gemein ist die enzymatische Funktion als Peptidyl-Prolyl Isomerasen (PPIasen). Sie katalysieren die *cis-trans* Isomerisierung der Iminosäure Prolin (**Abb. 4.1**) in Peptidbindungen. Aufgrund sterischer Konflikte zwischen den Seitenketten von Aminosäuren in *cis*-Konformation liegen 99,95 % von ihnen als *trans*-Isomere in Peptidbindungen vor. Prolin ist dabei eine Ausnahme. Da keines der beiden Isomere aus sterischen Gründen bevorzugt wird, liegen ca. 10 % der Peptidyl-Prolyl-Bindungen in der ungewöhnlichen *cis*-Konformation vor (Göthel and Marahiel, 1999). Für die korrekte Faltung mancher Proteine ist eine *cis-trans* Isomerisierung jedoch einerseits notwendig, andererseits auch ein zeitlich limitierender Prozeß (Page *et al.*, 1995a). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die PPIase Aktivität von Cyclophilinen die *cis-trans* Isomerisierung von Peptidbindungen, an denen das Iminostickstoffatom von Prolin beteiligt ist, katalysiert und so die Faltung verschiedener Proteine *in vitro* (Lang *et al.*, 1987; Fransson *et al.*, 1992; Gething and Sambrook, 1992) und *in vivo* (Lodish and

Kong, 1991; Steinmann *et al.*, 1991) beschleunigt. Verschiedene spektro-photometrische Tests zum Nachweis dieser *cis-trans* Peptidyl-Prolyl Isomerisierung wurden entwickelt (Fischer *et al.*, 1984; Kofron *et al.*, 1991; Janowski *et al.*, 1997). Neben Cyclophilinen sind zwei weitere Klassen von Prolyl-Isomerasen bekannt, die der Vollständigkeit halber genannt werden sollten: FK506-bindende Proteine (FKBPs) und Parvuline (Göthel and Marahiel, 1999; Galat, 2003).

*EtCYP89* unterscheidet sich einerseits deutlich vom ersten beschriebenen Cyclophilin (Handschumacher *et al.*, 1984), andererseits scheint es wahrscheinlich, dass die Funktion seiner C-terminalen Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Domäne (PPIase) mit der von CyPA identisch ist. *EtCYP89* weist ein theoretisches Molekulargewicht von 89,4 kDa auf und liegt damit deutlich über dem MW von vielen anderen beschriebenen Cyclophilinen. Der isoelektrische Punkt dieses Proteins von 9,02 stimmt jedoch gut mit dem des CyPA überein. Da *EtCYP89* neben der PPIase Domäne eine N-terminale Serin-reiche Region sowie vier zentrale WD-40-artige Repeats aufweist, liegt es nahe, von einem Cyclophilin-artigen Protein zu sprechen (Chou and Gasser, 1997). Die ca. 18 kDa PPIase Domäne ist bei diesen Proteinen hochkonserviert. Zusätzliche N- oder C-terminale Extensionen können darüberhinaus die subzelluläre Lokalisation bestimmen oder weitere Funktionen vermitteln. Die Rolle der Serin-reichen Region und der WD-40-artigen Repeats bei *EtCYP89* ist jedoch noch unklar, ebenso wie die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins. N-terminale Signalpeptide oder C-terminale Retentionssignale konnten nicht detektiert werden, so dass *EtCYP89* möglicherweise im Cytoplasma vorliegt.

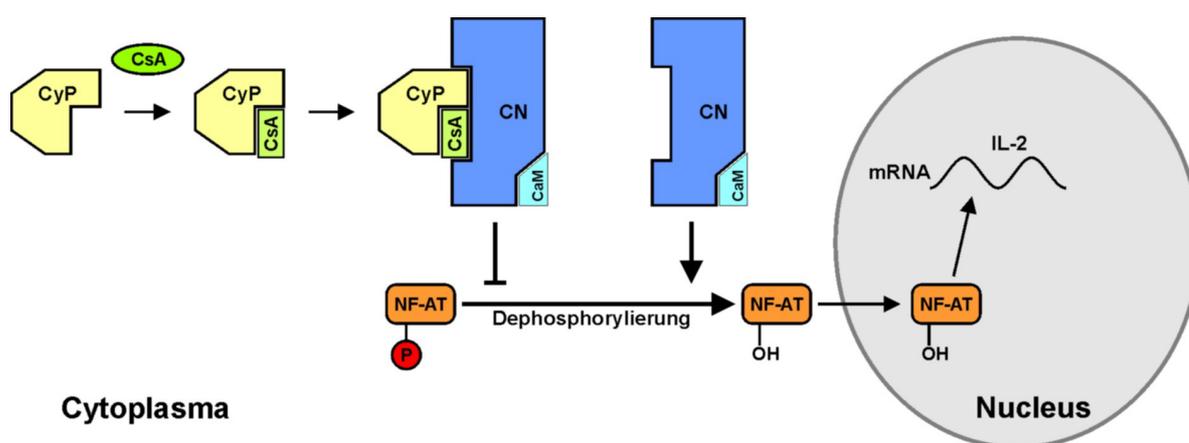
**Abbildung 4.1 *cis-trans* Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl Bindung.** Die *cis-trans* Isomeraseaktivität von Cyclophilinen katalysiert die Umwandlung der *cis*- in die *trans*-Konformation von Peptidyl-Prolyl Bindungen (nach Göthel and Marahiel, 1999).



*EtCYP89* wird von einem Gen mit 14 Exons codiert. Von den wenigen bislang vollständig sequenzierten Genen von *Eimeria* ist nur für die Aspartyl-Proteinase (Eimepsin) von *E. tenella* eine ähnlich extensive Exon-Intron-Verteilung mit 18 Exons und 17 Introns bekannt (Jean *et al.*, 2001). Für dieses Gen liegt die durchschnittliche Größe der Exons bei 83 bp, die der Introns bei 50 bp und somit deutlich unter den Durchschnittswerten für Exons (172 bp; Exons 2 - 14) und Introns (291 bp) bei *EtCyP89*. Auffällige Unterschiede sind weiterhin das Auftreten von sehr kleinen Exons im Eimepsin-Gen (Exons mit 7, 14, 16 und 18 bp) und die regelmäßige Größe der 17 Eimepsin-Introns, die alle eine Größe zwischen 43 und 62 bp aufweisen. Der Intronanteil im Eimepsin-Gen liegt bei 36,1 % und zeigt damit ein umgekehrtes Intron-Exon-Verhältnis zu *EtCyP89* mit einem Intronanteil von 56,4 %. Sowohl in *EtCyP89* als auch im Eimepsin-Gen sind die begrenzenden Exons 1 und 14 (>683 bp, 505 bp) bzw. 1 und 18 (352 bp, 192 bp) deutlich größer als die internen Exons. Dieses Muster aus

größeren 5'- und 3'-terminalen Exons gegenüber kleineren internen Exons ist bei den meisten eukaryotischen Genen zu beobachten (Robbersson *et al.*, 1990; Sterner *et al.*, 1996). Bei beiden Genen entsprechen die Exon-Intron-Übergänge den Consensus-Sequenzen, die für das Spleißen genutzt werden können (Breathnach *et al.*, 1978; Breathnach and Chambon, 1981; Stephens and Schneider, 1992). Sämtliche Introns beginnen mit dem Dinukleotid GT und enden auf das Dinukleotid AG. Die Struktur von *EtCyP89* unterscheidet sich grundlegend von den intronlosen Antigenen aus Makrogamonten und Oocysten: *Etos22* (diese Arbeit), *gam56* (Belli *et al.*, 2002b) und *gam82* (Belli *et al.*, 2003a).

Eine weitere wichtige Rolle spielen Cyclophiline als Rezeptoren für das immunsuppressive Undekapeptid Cyclosporin A (CsA) aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* (Borel, 1989), welches in der Transplantationsmedizin und bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird. Die immunsuppressive Wirkung von CsA beruht auf der Inhibierung der T-Zell-Aktivierung, ein Effekt der durch den Komplex aus Cyclophilin und Cyclosporin A (CyP-CsA) vermittelt wird. Die Antigenerkennung durch T-Zell Rezeptoren startet eine Signaltransduktionskette, die zu einer schnellen Aktivierung von Tyrosinkinase führt. Diese phosphorylieren die Phospholipase C, was u. a. zur Freisetzung des intrazellulären Botenmoleküls Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) führt, das aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup> freisetzt. Durch den Anstieg des freien, intrazellulären Ca<sup>2+</sup> bindet Calmodulin (CaM) die Calcium-Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin (CN) (Liu *et al.*, 1991b). An genau dieser Stelle hemmt CyP-CsA durch die Bindung an Calcineurin die weitere Signaltransduktion, indem es die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors für aktivierte T-Zellen (NF-AT) durch CN blockiert. NF-AT kann nur im dephosphorylierten Zustand die Kernporen passieren und so die Transkription von Interleukin-Genen, am besten untersucht ist dabei das Interleukin 2, vermitteln (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2 Hypothetische Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch den CyP-CsA Komplex.** Während der T-Zell-Aktivierung führt der Anstieg an freiem intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> zur Bindung von Calmodulin (CaM) an Calcineurin (CN). Dieser Komplex dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor für aktivierte T-Zellen (NF-AT), der nur im dephosphorylierten Zustand die Kernmembran passieren kann. Im Zellkern dient er als Transkriptionsfaktor für Interleukin 2 (IL-2). Der Komplex CyP-CsA bindet an CN-CaM, blockiert die Phosphataseaktivität und unterbricht so die Signaltransduktion (nach Göthel and Marahiel, 1999).

Die Rolle von Cyclophilinen bzw. Peptidyl-Prolyl Isomerasen in Wechselwirkung mit anderen Proteinen in der Zelle scheint sehr vielfältig zu sein. Neben Interaktionen mit Chaperonen wie HSP90 (,heat shock protein 90') (Pahl *et al.*, 1997), bindet das CyPA des Menschen beispielsweise an das humane HIV-1 Gag Protein und wird zur Replikation infektiöser HIV-1 Virionen benötigt (Luban *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1997). Diese Bindung wird durch Cyclosporin A kompetitiv inhibiert.

### 4.3 Vergleich des *EtCYP89* mit Cyclophilinen aus anderen taxonomischen Gruppen

Ein Vergleich des *EtCYP89* aus *E. tenella* mit Cyclophilin-artigen Proteinen aus Organismen anderer taxonomischer Gruppen zeigt auffällige Übereinstimmungen. Die 10 Cyclophilin-artigen Proteine aus den Datenbanken Swiss-Prot, TrEMBL und TrEMBL\_NEW mit der größten Ähnlichkeit zu *EtCYP89* entstammen neun unterschiedlichen Gattungen, von Protozoen über Pflanzen und Tiere bis zum Menschen, was den ubiquitären Charakter und hohen Konservierungsgrad dieser Proteinfamilie unterstreicht. Alle weisen eine PPIase Domäne nahezu gleicher Länge an ihrem äußersten C-terminalen Ende auf. Auch die N-terminalen Extensionen sind strukturell miteinander verwandt, was das Auftreten von jeweils drei oder vier WD-40-artigen Repeats belegt, die größtenteils in vergleichbaren Positionen zu finden sind (**Abb. 3.19**). Die Cyclophilin-artigen Proteine der Apicomplexa, also aus *Eimeria* sowie den zwei Arten von *Plasmodium*, weisen zusätzlich Regionen mit geringer Komplexität und unbekannter Funktion auf: bei *EtCYP89* ist das die Serin-reiche Region am N-Terminus (Pos. 8-214), bei *P. falciparum* und *P. yoelii* sind es jeweils eine kürzere Asparagin-reiche Region (Pos. 37-64 bzw. Pos. 330-353) sowie eine etwas längere Lysin-reiche Region (Pos. 80-129 bzw. Pos. 8-140). Mit zunehmendem Organisationsniveau der Organismen steigt die Anzahl unterschiedlicher Cyclophiline pro Organismus. Während prokaryotische Genome null bis drei unterschiedliche Cyclophiline aufweisen, kennt man beim Menschen bislang mindestens 16 Cyclophilin-artige Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 17 und 324 kDa (Galat, 2003). Für alle in **Abb. 3.19** aufgeführten Gattungen sind neben den Cyclophilin-artigen Proteinen mit hoher Ähnlichkeit zu *EtCYP89* weitere, oft deutlich kleinere, Cyclophiline mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation bekannt. Für *P. falciparum* beispielsweise kennt man neben dem 747 AS Cyclophilin-artigen Protein drei weitere Cyclophiline mit viel geringerem Molekulargewicht: *PfCyP19* (Berriman and Fairlamb, 1998), *PfCyP22* (Hirtzlin *et al.*, 1995) und *PfCyP24* (Reddy, 1995). Man kann daher davon ausgehen, dass auch für die Gattung *Eimeria* mehrere Proteine mit PPIase Domäne und möglicherweise unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation existieren. Beim Großteil der für Protozoen identifizierten Cyclophiline handelt es sich zwar um cytosolische Formen, man findet sie beispielsweise aber auch im endoplasmatischen Reticulum bei *Theileria annulata* (U55771). Das Auftreten der hochkonservierten PPIase Domäne in ansonsten sehr verschiedenen Proteinen könnte durch das sogenannte ‚exon shuffling‘ erklärbar sein, eine Hypothese, die Exons als abgeschlossene Untereinheiten genetischer Information ansieht. Der Austausch von Exons würde somit mit größerer Wahrscheinlichkeit neue funktionsfähige Gene hervorbringen, als eine völlig zufällige Rekombination

vorhandener Gene. Die PPIase Domäne von *EtCYP89* läßt sich jedoch nicht auf vollständige Exons übertragen. Sie wird von den 178 3'-seitigen Basen von Exon 12, von Exon 13 (212 bp) und den 69 5'-seitigen Basen von Exon 14 codiert. Die Identifizierung von weiteren Cyclophilinen aus *Eimeria* und ein Vergleich der genomischen Organisation ihrer PPIase Domänen könnten dazu möglicherweise weitere Erkenntnisse liefern.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass *EtCYP89* der 70,7 kDa Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase (Q9LXM7) aus *A. thaliana* oder der PPIase Domäne eines Cyclophilins aus *O. sativa* (BAC78591) ähnlicher ist, als den Cyclophilinen der Apicomplexa. Unter den 100 besten Treffern zur Gesamtsequenz von *EtCYP89* finden sich, abgesehen von *Plasmodium*, keine weiteren Sequenzen von Cyclophilinen aus Sporozoen. Auch hinsichtlich ihrer genomischen Organisation unterscheiden sich *EtCYP89* und die beiden ähnlichen und relativ großen Cyclophilin-artigen Proteine aus *P. yoelii* (EAA15686) und *P. falciparum* (Q8I402) deutlich. Während die genomische Sequenz von *EtCYP89* durch 13 Introns unterbrochen wird, werden die beiden Proteine aus *Plasmodium* von einer durchgehenden Region codiert, was das relativ seltene Vorkommen von Introns in diesen Organismen demonstriert. Vergleicht man die Gesamtsequenz von *EtCYP89* ausschließlich mit vollständigen Proteinsequenzen aus Apicomplexen, so fällt zunächst auf, dass nur die beiden bereits genannten Cyclophilin-artigen Proteine aus *P. yoelii* (EAA15686) mit 765 AS und *P. falciparum* (Q8I402) mit 747 AS ein ähnliches Molekulargewicht wie *EtCYP89* aufweisen. Der größte Teil der anderen ähnlichen Sequenzen liegt hingegen zwischen 160 und 230 AS. Zwei Nicht-*Plasmodium* Cyclophiline, die aus der Gruppe der Apicomplexen zur PPIase Domäne von *EtCYP89* die größte Ähnlichkeit aufweisen, sind das 169 AS große Cyclophilin-artige Protein aus *Cryptosporidium parvum* mit 43 % identischen (bzw. 66 % ähnlichen) AS über einen Abschnitt von 153 AS sowie das 227 AS große Cyclophilin 1 aus *Theileria parva* mit 52 % (60 %) über einen Abschnitt von 146 AS.

#### 4.4 *EtCYP89* und *EtOS22* – neue Ansätze zur Therapie von Kokzidiose

Für die vorliegende Arbeit ist vor allem die anti-parasitische Wirkung von Cyclosporin A von Bedeutung. Diese wurde 1981 bei Untersuchungen zur Rolle von T-Zellen bei *Schistosoma*- und *Plasmodium*-Infektionen zufällig entdeckt (Bueding *et al.*, 1981; Thommen-Scott, 1981) und seitdem für viele parasitische Protozoen und Helminthen untersucht und bestätigt (Chappell and Wastling, 1992; Page *et al.*, 1995a): u. a. für *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma* und *Eimeria* sowie für *Trichinella*, *Fasciola*, *Schistosoma* und *Hymenolepis*. Der genaue Mechanismus dieser anti-parasitischen Effekte ist noch unklar; eine Cyclophilin-vermittelte Wirkung beispielsweise über die Hemmung der Peptidyl-Prolyl Isomerase Aktivität oder die Hemmung eines essentiellen Signaltransduktionswegs, wie bei der Calcineurin-vermittelten Inhibierung von Interleukin-Transkriptionsfaktoren bei T-Zellen (Göthel and Marahiel, 1999), liegt jedoch nahe. Bestätigt wird diese Annahme durch Untersuchungen, wobei die Aktivität von Calcineurin in *P. falciparum*-Extrakten durch Cyclosporin A ausschließlich in Gegenwart von Cyclophilin inhibiert wird (Bell *et al.*, 1994). Cyclosporin A-bindende Cyclophiline sind u. a. bereits für *S. mansoni* (Koletsy *et al.*, 1986), *P.*

*falciparum* (Bell *et al.*, 1994) und *T. gondii* (High *et al.*, 1994) beschrieben worden. Die spezies-spezifische Wirkung von Cyclosporin A hängt wahrscheinlich mit unterschiedlichen Isoformen der Cyclophiline zusammen. Durch Röntgen-Kristallographie und gezielte Mutagenese fand man heraus, dass für die Bindung von Cyclosporin A mit hoher Affinität 13 hochkonservierte AS verantwortlich sind (Pflugl *et al.*, 1993; Berriman and Fairlamb, 1998), allen voran ein Tryptophan (Trp121) (Liu *et al.*, 1991a). Tritt an die Stelle dieses Tryptophans beispielsweise ein Phenylalanin (im Cyclophilin von *E. coli*) oder ein Histidin (im Cyclophilin von *Brugia malayi*) (Page *et al.*, 1995b), so nimmt die Bindungsaffinität dramatisch ab: Während das humane Cyclophilin A mit Trp121 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 19 nM Cyclosporin A aufweist, steigt dieser für das entsprechende Cyclophilin A aus *B. malayi* mit einem Histidin an dieser Position auf 860 nM an. Die deduzierte AS-Sequenz von *EtCYP89* weist sowohl das für die Bindung von Cyclosporin A essentielle Tryptophan (Trp121) als auch alle weiteren 12 dafür notwendigen AS auf (**Abb. 3.20**). Man kann daher von einer Interaktion zwischen Cyclosporin A und *EtCYP89* ausgehen. Die PPlase Aktivität von *EtCYP89* sowie der Nachweis, dass Cyclosporin A die enzymatische Aktivität dieses Cyclophilin-artigen Proteins aus *E. tenella* hemmt, muß jedoch noch erbracht werden. Zunächst muß *EtCYP89* dafür beispielsweise in *E. coli* rekombinant hergestellt werden, wie das für Cyclophiline anderer Parasiten bereits gelungen ist: für *P. falciparum* (Berriman and Fairlamb, 1998; Hirtzlin *et al.*, 1995; Reddy, 1995), *B. malayi* (Page *et al.*, 1995b; Ma *et al.*, 1996) oder *S. mansoni* (Kiang *et al.*, 1995). Zur Messung der PPlase Aktivität, also der *cis-trans* Peptidyl-Prolyl Isomerisierung, stehen dann verschiedene spektro-photometrische Tests zur Verfügung (Fischer *et al.*, 1984; Kofron *et al.*, 1991; Janowski *et al.*, 1997). Nach diesen Vorversuchen *in vitro* könnten dann *in vivo* die Effekte von Cyclosporin A auf Parasiten der Gattung *Eimeria* in Zellkultur oder im infizierten Wirt genauer untersucht werden. Denkbar wäre auch die Entwicklung modifizierter Moleküle, die Cyclophilin ebenfalls binden, jedoch keine immunsuppressive Wirkung besitzen. Im Rahmen der oben beschriebenen Vorversuche könnte zudem eine direkte Interaktion zwischen *EtCYP89* und Toltrazuril überprüft werden. Die bisherigen Bindungsstudien mit dem im Phagen-Panning selektionierten 502 bp Fragment aus diesem Gen und mit Toltrazuril gekoppelten DYNABEADS™ sind nicht eindeutig. Exprimiert auf der Oberfläche von filamentösen Phagen, konnte für dieses Fragment, was ca. 1,5 kb ‚upstream‘ der PPlase Domäne von *EtCYP89* liegt, auch eine Affinität zu nicht-gekoppelten bzw. Benzimidazol-gekoppelten M-270 Amine DYNABEADS™ nachgewiesen werden. Zudem bleibt die Frage, zu welchem Prozentsatz die aktivierten Amino-Gruppen auf der Oberfläche der M-270 Amine DYNABEADS™ mit Toltrazurilmolekülen besetzt sind (‚Kupplung von Toltrazuril an feste Phasen‘, PF-Bericht 4529, Bayer AG). Die Kontrolle der Kopplungseffizienz hat nicht stattgefunden und wäre durch die DYNABEADS™ technisch problematisch und zu aufwendig gewesen. Trotzdem wäre es bei einer nachgewiesenen Bindung von Toltrazuril an diese N-terminale Region von *EtCYP89* denkbar, dass es durch allosterische Wechselwirkungen zu einer Inhibierung der PPlase Domäne kommt.

Zur Wirkung von Cyclosporin A auf *Eimeria* gibt es bis heute lediglich drei Publikationen: Lillehoj (1987), Rose und Hesketh (1989) sowie Kogut und Eirmann (1991). Lillehoj (1987) unterstrich die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A auf den Wirt, zeigte aber auch, dass eine 7-tägige Behandlung mit dieser Substanz, beginnend einen Tag vor einer experimentellen Infektion von

Hühnern mit *E. tenella*, ‚die Resistenz des Wirts erhöht‘. Dabei wurde jedoch kein direkter Wirkmechanismus von Cyclosporin A auf die Parasiten vermutet. Anders Rose und Hesketh (1989): Diese zeigten eine deutliche Reduktion ausgeschiedener Oocysten von *E. vermiformis* (in *M. musculus*) und *E. mitis* (in *G. domesticus*). Im Gegensatz zu Lillehoj (1987) wiesen sie darauf hin, dass der in vielen Protozoen nachgewiesene anti-parasitische Effekt von Cyclosporin A auch für *Eimeria* gilt. Kogut und Eirmann (1991) hingegen benutzten die immunsuppressiven Eigenschaften von Cyclosporin A, um mit *Eimeria*-Arten aus dem Truthahn (*E. adenoeides*, *E. meleagrimitis* und *E. gallopavonis*) das Haushuhn als einen nicht-spezifischen Wirt zu infizieren. Auch sie stellten fest, dass Hühner, die nach der Infektion mit Cyclosporin A behandelt wurden, keine bzw. in Ausnahmefällen nur wenige Oocysten ausschieden. Bei Infektionen mit *Eimeria* scheint also ein Antagonismus zwischen den beiden Effekten von Cyclosporin A offensichtlich: zwischen der immunsuppressiven Wirkung auf den Wirt, da beispielsweise auch das Cyclophilin B aus *Gallus gallus* (P24367) alle 13 für die Bindung von Cyclosporin A wichtigen AS aufweist, sowie der anti-parasitischen Wirkung auf *Eimeria* (Chappell and Wastling, 1992). Dabei wird der Erfolg von Cyclosporin A als potentielles Antikozidium maßgeblich von der Art und dem Zeitpunkt der Applikation bestimmt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Sequenzinformationen für das erste beschriebene Cyclophilin-artige Protein aus *E. tenella* (*EtCYP89*) liefern Ansätze zur Erklärung und zur Bestätigung eines direkten Wirkmechanismus von Cyclosporin A auf diesen Parasiten. Weitere Versuche *in vitro* und *in vivo* müssen zeigen, ob sich diese Substanz über eine Cyclophilin-vermittelte Wirkung als Chemotherapeutikum gegen Geflügelkokzidiose eignet.

*EtOS22* wurde als Antigen aus *E. tenella* identifiziert und charakterisiert. Die immunogenen Eigenschaften dieses Proteins beruhen wahrscheinlich auf einer Prolin-reichen Region, die von dem mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> erkannt wird. Regionen mit hohem Anteil an Prolin sind auch von einer Familie von Antigenen aus *E. maxima* bekannt, die am Aufbau der Oocystenschale beteiligt sind: GAM56 (Belli *et al.*, 2002a; Belli *et al.*, 2002b), GAM82 (Wallach *et al.*, 1990; Belli *et al.*, 2002a; Belli *et al.*, 2003a) und GAM230, vormals pEM230 (Fried *et al.*, 1992; Ferguson *et al.*, 2003). Sie sind in aufgereinigter Form im Impfstoff CoxAbic<sup>®</sup> enthalten. Aufgrund der oben diskutierten Ähnlichkeiten dieser drei Proteine zu *EtOS22* und der Tatsache, dass der mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> mit GAM56 aus *E. maxima* sowie einem dazu homologen Protein aus *E. tenella* kreuzreagiert, sollte überprüft werden, ob sich möglicherweise auch *EtOS22* als Bestandteil einer sogenannten ‚subunit‘-Vakzine eignen könnte. Dafür wurde eine DNA-Immunisierung von Hühnern mit *Etos22* durchgeführt und anschließend mit *E. tenella* infiziert. Ein Vakzinierungserfolg sollte an Gewichtszunahme, Blut- und Oocystenausscheidungen und Grad der Darmläsionen gemessen werden. Zudem wurde das Serum der Versuchstiere auf *EtOS22*-spezifisches IgG untersucht. Unterschiede zwischen immunisierten Tieren und denen der infizierten Kontrollgruppen (Ki) können wie folgt zusammengefaßt werden: 1. zwischen Tag 4 *p.i.* und Tag 8 *p.i.* zeigt der Vergleich der Gruppen Ki und CT t.c., dass das durchschnittliche Gewicht bei der infizierten Kontrollgruppe deutlich rückläufig (620,0 ± 51,5; 584,6 ± 105,2) ist, während es bei der transcutan mit pcDNA3.1-*Etos22* vakzinierten Gruppe CT t.c. (582,5 ± 54,4; 590,6 ± 72,5) stagniert (**Tab. 3.2**). 2. Blutausscheidungen sind bei den immunisierten Gruppen CT i.m. 1, CT t.c. 2 und CT i.m. 2 früher feststellbar (Tag 4 *p.i.*) als für die infizierten Kontrollgruppen, am Tag 8 *p.i.* hingegen sind die Blutausscheidungen der vakzinierten Gruppen durchschnittlich deutlich geringer als die der infizierten

Kontrollgruppen (**Tab. 3.3**) Diese Ergebnisse deuten auf einen beschleunigten Infektionsverlauf und ein früheres Abklingen der Symptome hin. 3. Die Oocystenausscheidungen am Tag 8 *p.i.* sind bei den vakzinieren Tieren stärker als bei denen der nicht-vakzinieren Gruppen, die das Maximum der Oocystenabgabe möglicherweise noch nicht erreicht haben (**Tab. 3.3**). 4. Die Darmläsionen der Tiere sind aufgrund der hohen Infektionsdosis von 15.000 sporulierten Oocysten durchweg schwerwiegend, wobei in den immunisierten Gruppen CT t.c. 1 und CT i.m. 2 jeweils ein Tier mit etwas weniger schweren Läsionen (Läsionsgrad 5) beobachtet wurde (**Tab. 3.4**). Ob diese Unterschiede durch die DNA-Immunisierung mit *Etos22* zu begründen sind, müssen weitere Versuche zeigen, da zudem kein *EtOS22*-spezifisches IgG im Serum vakzinierter Hühner nachgewiesen werden konnte. Das schließt jedoch nicht aus, dass spezifische Immunglobuline anderer Isotypen oder Immunglobuline in anderen Geweben, wie beispielsweise der Darmschleimhaut, gebildet wurden. Außerdem könnte auf die Immunisierung eine zelluläre Immunantwort erfolgt sein. Zunächst muß jedoch in Folgeversuchen ermittelt werden, ob *Etos22* im Expressionsvektor pcDNA3.1 im Huhn bzw. in Hühnerzellen tatsächlich exprimiert wird. Dies könnte beispielsweise durch die Transfektion von embryonalen Nierenzellen des Huhns in Zellkultur und anschließender immunochemischer Analyse oder den Nachweis des entsprechenden Transkripts in vakzinierem Wirtsgewebe durch RT-PCR erfolgen.

Sowohl *EtCYP89* als auch *EtOS22* können neue Ansätze für chemotherapeutische bzw. immunoprophylaktische Maßnahmen zur Bekämpfung von Erregern der Gattung *Eimeria* darstellen. Eine heterologe Überexpression würde für beide Proteine neue experimentelle Möglichkeiten erschließen. *EtOS22* könnte durch polyklonale Antikörper gegen das rekombinante Protein einerseits genauer lokalisiert werden, andererseits würde man mit dem aufgereinigten Protein alternative Vakzinierungs-Strategien verfolgen können. Für *EtCYP89* könnte durch spektro-photometrische Messung der Peptidyl-Prolyl Isomerase Aktivität *in vitro* die Inhibierung durch Cyclosporin A und andere Wirkstoffe untersucht werden. Desweiteren würde die Identifizierung und der Vergleich weiterer Cyclophiline sowohl aus *Eimeria*, als auch aus dem Wirt, *Gallus gallus*, ein spezie-spezifisches ‚drug design‘ ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

*Eimeria tenella* verursacht die Kokzidiose des Haushuhns, die mit der intensiven Bodenhaltung von Geflügel zu einem weltweiten Problem wurde. Durch enorme Aufwendungen für Chemotherapeutika und Immunprophylaxe versucht die Geflügelindustrie, den wirtschaftlichen Schaden zu kontrollieren. Das verstärkte Auftreten von resistenten *Eimeria*-Stämmen sowie mäßige Erfolge bei der Entwicklung von Impfstoffen bereiten jedoch Schwierigkeiten. Zur Immunprophylaxe sind bis heute ausschließlich kostenintensive Lebendimpfstoffe auf dem Markt. Daher ist die Identifizierung von Proteinen, die als Zielmoleküle für neue Wirk- oder Impfstoffe dienen können, von großer Bedeutung. Zielsetzung dieser Arbeit waren die Identifizierung und Charakterisierung solcher Zielmoleküle durch Ligandenscreening einer hier konstruierten genomischen Expressionsbibliothek von *E. tenella* mittels Phagen-Display.

Das symmetrische Triazinonderivat Toltrazuril (Baycox®) wirkt gegen sämtliche intrazellulären Entwicklungsstadien der Gattung *Eimeria*. Es schädigt insbesondere die Hüllbildungskörper vom Typ II (WF II) der Makrogamonten, so dass die Ausbildung einer intakten Oocystenschale nicht möglich ist und der Entwicklungszyklus des Parasiten unterbrochen wird. Der monoklonale Antikörper E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> (mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub>) erkennt Epitope auf diesen WF II und ermöglicht so ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zur Ausbildung dieser für den Parasiten lebenswichtigen Oocystenschale führen. In dieser Arbeit konnte eine inhibitorische Wirkung des mAk E<sub>2</sub>E<sub>5</sub> auf die Excystierung von Sporozoiten *in vitro* nachgewiesen werden. Als spezifisches Antigen wurde ein ca. 22 kDa großes Prolin- und Histidin-reiches Protein identifiziert: das *E. tenella* Oocysten Sporocysten Protein (*EtOS22*). Das dafür codierende, intronlose Gen *Etos22* wurde vollständig kloniert. Es handelt sich um ein stadienspezifisch reguliertes Gen, welches in tandemartiger Anordnung in ca. 19 Kopien im Genom von *E. tenella* vorliegt und somit das erste aus diesem Organismus beschriebene ‚multi-copy‘ Gen darstellt. Die Vielzahl von Kopien sowie der Expressionspeak dieses Gens 137 h nach der Infektion lassen darauf schließen, dass *EtOS22* in einem engen Zeitfenster in großer Menge von der Zelle benötigt wird. Das N-terminale Signalpeptid und die Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen Antigenen aus Makrogamonten und Oocystenschale lassen auf eine Beteiligung von *EtOS22* am Aufbau der Oocystenschale schließen. Nach DNA-Immunisierung mit *Etos22* wurden die immunogenen Eigenschaften dieses Proteins im Hinblick auf eine protektive Immunantwort des Wirts bei *E. tenella*-Infektionen untersucht. Erste Ergebnisse deuten auf einen beschleunigten Infektionsverlauf und ein früheres Abklingen der Symptome hin.

Im Rahmen der Rezeptorsuche für Toltrazuril (Baycox®) wurde ein weiteres bislang nicht beschriebenes Gen von *E. tenella* identifiziert und kloniert. Es weist mit 14 Exons und 13 Introns eine extensive genomische Organisation auf und codiert für ein ca. 89 kDa großes Cyclophilin-artiges Protein, *EtCYP89*. Cyclophiline sind als ubiquitäre Proteine aus vielen taxonomischen Gruppen bekannt. Sie katalysieren die *cis-trans* Isomerisierung der Iminosäure Prolin in Peptidbindungen. *EtCYP89* weist am Carboxy-Terminus eine solche stark konservierte Peptidyl-Prolyl Isomerase Domäne (PPIase) auf. Cyclophiline von *Arabidopsis thaliana* (Q9LXM7) und *Oryza sativa* (BAC78591) zeigen eine größere Übereinstimmung zu *EtCYP89*, als die für die Gattung *Plasmodium* beschriebenen. Cyclophiline sind als Rezeptoren des immunsuppressiven Undekapeptids Cyclosporin A (CsA) bekannt, dessen anti-parasitische Wirkung u. a. für *Eimeria* beschrieben wurde. Alle 13 für die Bindung von CsA essentiellen Aminosäuren innerhalb der PPIase Domäne sind bei *EtCYP89* konserviert. So trägt dieses erste Cyclophilin-artige Protein aus Parasiten der Gattung *Eimeria* zum besseren Verständnis der beschriebenen Effekte von CsA auf diese Parasiten bei. Möglicherweise stellt es zudem ein Zielmolekül für neue Antikokzidien dar.



## 6 Literaturverzeichnis

- Akbari,O., Panjwani,N., Garcia,S., Tascon,R., Lowrie,D., and Stockinger,B.** (1999) DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J.Exp.Med.* **189**:169-178.
- Allen,J.B., Walberg,M.W., Edwards,M.C., and Elledge,S.J.** (1995) Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem.Sci.* **20**:511-516.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**:403-410.
- Anderson,S.K., Gallinger,S., Roder,J., Frey,J., Young,H.A., and Ortaldo,J.R.** (1993) A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:542-546.
- Babiuk,L.A., Babiuk,S.L., Loehr,B.I., and van Drunen Littel-van den Hur** (2000) Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **76**:1-23.
- BBSRC business** (2002) Sequencing the genome of a poultry killer. Magazine features July 2002 ([www.bbsrc.ac.uk/news/features/features02.html#july](http://www.bbsrc.ac.uk/news/features/features02.html#july)). 8-10.
- Bell,A., Wernli,B., and Franklin,R.M.** (1994) Roles of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and calcineurin in the mechanisms of antimalarial action of cyclosporin A, FK506, and rapamycin. *Biochem.Pharmacol.* **48**:495-503.
- Belli,S.I., Lee,M., Thebo,P., Wallach,M.G., Schwartsburd,B., and Smith,N.C.** (2002a) Biochemical characterisation of the 56 and 82 kDa immunodominant gametocyte antigens from *Eimeria maxima*. *Int.J.Parasitol.* **32**:805-816.
- Belli,S.I., Witcombe,D., Wallach,M.G., and Smith,N.C.** (2002b) Functional genomics of gam56: characterisation of the role of a 56 kilodalton sexual stage antigen in oocyst wall formation in *Eimeria maxima*. *Int.J.Parasitol.* **32**:1727-1737.
- Belli,S.I., Wallach,M.G., and Smith,N.C.** (2003a) Cloning and characterization of the 82 kDa tyrosine-rich sexual stage glycoprotein, GAM82, and its role in oocyst wall formation in the apicomplexan parasite, *Eimeria maxima*. *Gene* **307**:201-212.
- Belli,S.I., Wallach,M.G., Luxford,C., Davies,M.J., and Smith,N.C.** (2003b) Roles of tyrosine-rich precursor glycoproteins and dityrosine- and 3,4-dihydroxyphenylalanine-mediated protein cross-linking in development of the oocyst wall in the coccidian parasite *Eimeria maxima*. *Eukaryot.Cell* **2**:456-464.
- Ben Amar,M.F., Pays,A., Tebabi,P., Dero,B., Seebeck,T., Steinert,M., and Pays,E.** (1988) Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei*. *Mol.Cell Biol.* **8**:2166-2176.

- Berriman,M. and Fairlamb,A.H.** (1998) Detailed characterization of a cyclophilin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem.J.* **334** (Pt 2):437-445.
- Bhogal,B.S., Miller,G.A., Anderson,A.C., Jessee,E.J., Strausberg,S., McCandliss,R., Nagle,J., and Strausberg,R.L.** (1992) Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **31**:323-335.
- Biggs,P.M.** (1982) The world of poultry disease. *Avian Pathol.* **11**:281-300.
- Binger,M.H., Hug,D., Weber,G., Schildknecht,E., Humbelin,M., and Pasamontes,L.** (1993) Cloning and characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus. *Mol.Biochem.Parasitol.* **61**:179-187.
- Blin,N. and Stafford,D.W.** (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**:2303-2308.
- Borel,J.F.** (1989) Pharmacology of cyclosporin (Sandimmune). Pharmacological properties *in vivo*. *Pharmacol.Rev.* **41**:259-371.
- Bos,J.D.** (1997) The skin as an organ of immunity. *Clin.Exp.Immunol.* **107** (Suppl.1):3-5.
- Bouloc,A., Walker,P., Grivel,J.C., Vogel,J.C., and Katz,S.I.** (1999) Immunization through dermal delivery of protein-encoding DNA: a role for migratory dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **29**:446-454.
- Brake,D.A.** (2002) Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *Int.J.Parasitol.* **32**:509-515.
- Breathnach,R., Benoist,C., O'Hare,K., Gannon,F., and Chambon,P.** (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**:4853-4857.
- Breathnach,R. and Chambon,P.** (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **50**:349-383.
- Brown,P.J., Billington,K.J., Bumstead,J.M., Clark,J.D., and Tomley,F.M.** (2000) A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein. *Mol.Biochem.Parasitol.* **107**:91-102.
- Bueding,E., Hawkins,J., and Cha,Y.N.** (1981) Antischistosomal effects of cyclosporin A. *Agents Actions* **11**:380-383.
- Bumstead,N. and Palyga,J.** (1992) A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics* **13**:690-697.

- Button,L.L., Russell,D.G., Klein,H.L., Medina-Acosta,E., Karess,R.E., and McMaster,W.R.** (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. *Mol.Biochem.Parasitol.* **32**:271-283.
- Cere,N., Licois,D., and Humbert,J.F.** (1995) Study of the inter- and intraspecific variation of *Eimeria* spp. from the rabbit using random amplified polymorphic DNA. *Parasitol.Res.* **81**:324-328.
- Chan,M.M., Chen,C.L., Ager,L.L., and Cooper,M.D.** (1988) Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J.Immunol.* **140**:2133-2138.
- Chapman,H.D., Cherry,T.E., Danforth,H.D., Richards,G., Shirley,M.W., and Williams,R.B.** (2002) Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int.J.Parasitol.* **32**:617-629.
- Chapman,H.D. and Shirley,M.W.** (2003) The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. *Avian Pathol.* **32**:115-127.
- Chappell,L.H. and Wastling,J.M.** (1992) Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitology* **105** (Suppl.):S25-S40.
- Chomczynski,P.** (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal.Biochem.* **201**:134-139.
- Chou,I.T. and Gasser,C.S.** (1997) Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol.Biol.* **35**:873-892.
- Clarke,L.E., Messer,L.I., and Wisner,M.H.** (1986) Antigens of *Eimeria* cloned and expressed in *E. coli*. *J.Cell Biochem.* **10**:A 145.
- Clarke,L.E., Messer,L.I., Greenwood,N.M., and Wisner,M.H.** (1987) Isolation of lambda amp3 genomic recombinants coding for antigens of *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **22**:79-87.
- Clarke,L.E., Tomley,F.M., Wisner,M.H., Foulds,I.J., and Bournnell,M.E.** (1990) Regions of an *Eimeria tenella* antigen contain sequences which are conserved in circumsporozoite proteins from *Plasmodium* spp. and which are related to the thrombospondin gene family. *Mol.Biochem.Parasitol.* **41**:269-279.
- Comes,A.M., Humbert,J.F., Cabaret,J., and Elard,L.** (1996) Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Vet.Res.* **27**:333-342.
- Coombs,G.H. and Muller,S.** (2002) Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *Int.J.Parasitol.* **32**:497-508.
- Corr,M., Lee,D.J., Carson,D.A., and Tighe,H.** (1996) Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J.Exp.Med.* **184**:1555-1560.

- Cox,F.E.** (1998) Control of coccidiosis: lessons from other sporozoa. *Int.J.Parasitol.* **28**:165-179.
- Crane,M.S., Goggin,B., Pellegrino,R.M., Ravino,O.J., Lange,C., Karkhanis,Y.D., Kirk,K.E., and Chakraborty,P.R.** (1991) Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen. *Infect.Immun.* **59**:1271-1277.
- Da Silva,A.Jr., Kawazoe,U., Freitas,F.F., Gatti,M.S., Dolder,H., Schumacher,R.I., Juliano,M.A., da Silva,M.J., and Leite,A.** (2002) Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries. *Mol.Biochem.Parasitol.* **120**:53-60.
- Dalrymple,B.P., Casu,R.E., Peters,J.M., Dimmock,C.M., Gale,K.R., Boese,R., and Wright,I.G.** (1993) Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **57**:181-192.
- Danforth,H.D. and Augustine,P.C.** (1985) Use of hybridoma antibodies and recombinant DNA technology in protozoan vaccine development. *Avian Dis.* **30**:37-42.
- Danforth,H.D.** (1998) Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *Int.J.Parasitol.* **28**:1099-1109.
- Danforth,H. and Augustine,P.** (1989) Coccidia vaccines. Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines. Chapter 8:165-175.
- Doran,D.J.** (1971) Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *J.Parasitol.* **57**:891-900.
- Doran,D.J. and Augustine,P.C.** (1973) Comparative development of *Eimeria tenella* from sporozoites to oocysts in primary kidney cell cultures from gallinaceous birds. *J.Protozool.* **20**:658-661.
- Dufour,V.** (2001) DNA vaccines: new applications for veterinary medicine. *Vet.Sci.Tomorrow* **1**:1-19.
- Dunn,M.J.** (1993) Gel electrophoresis: proteins. Graham,J.M. and Billington,D. (eds.). Bios Scientific Publishers Ltd.,UK.57-58.
- Dunn,P.P., Billington,K., Bumstead,J.M., and Tomley,F.M.** (1995) Isolation and sequences of cDNA clones for cytosolic and organellar hsp70 species in *Eimeria* spp. *Mol.Biochem.Parasitol.* **70**:211-215.
- Dunn,P.P., Stephens,P.J., and Shirley,M.W.** (1998) *Eimeria tenella*: two species of extrachromosomal DNA revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Parasitol.Res.* **84**:272-275.
- Duszynski,D.W. and Brunson,J.T.** (1973) Structure of the oocysts and excystation processes of four *Eimeria* spp. (Protozoa: Eimeriidae) from the Colorado pika, *Ochotona princeps*. *J.Parasitol.* **59**:28-34.
- Ellis,J. and Bumstead,J.** (1990) *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitology* **101** (Pt 1):1-6.

- Ellis, J. and Revets, H.** (1990) *Eimeria* species which infect the chicken contain virus-like RNA molecules. *Parasitology* **101** (Pt 2):163-169.
- Eschenbacher, K.H., Egli, P., Wallach, M., and Braun, R.** (1996) Characterization of a 14 kDa oocyst wall protein of *Eimeria tenella* and *E. acervulina*. *Parasitology* **112** (Pt 2):169-176.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K., and Bairoch, A.** (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* **30**:235-238.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum. Anal. Biochem.* **137**:266-267.
- Ferguson, D.J., Belli, S.I., Smith, N.C., and Wallach, M.G.** (2003) The development of the macrogamete and oocyst wall in *Eimeria maxima*: immuno-light and electron microscopy. *Int. J. Parasitol.* **33**:1329-1340.
- Files, J.G., Paul, L.S., and Gabe, J.D.** (1987) Identification and characterization of the gene for a major surface antigen of *Eimeria tenella*. In: *Molecular strategies of parasite invasion*. Agabian, N., Goodman, H., and Noguiera, N. (eds.). *UCLA Symp. Mol. Cell Biol., New Series*, Vol. **32**:713-723.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C.** (1984) Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* **43**:1101-1111.
- Franke, E.K., Yuan, H.E., and Luban, J.** (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-362.
- Fransson, C., Freskgard, P.O., Herbertsson, H., Johansson, A., Jonasson, P., Martensson, L.G., Svensson, M., Jonsson, B.H., and Carlsson, U.** (1992) Cis-trans isomerization is rate-determining in the reactivation of denatured human carbonic anhydrase II as evidenced by proline isomerase. *FEBS Lett.* **296**:90-94.
- Fried, M., Mencher, D., Sar-Shalom, O., and Wallach, M.** (1992) Developmental gene expression of a 230-kilodalton macrogamete-specific protein of the avian coccidial parasite, *Eimeria maxima*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**:251-262.
- Fynan, E.F., Robinson, H.L., and Webster, R.G.** (1993a) Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol.* **12**:785-789.
- Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., and Robinson, H.L.** (1993b) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**:11478-11482.
- Galat, A.** (2003) Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity – targets - functions. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**:1315-1347.

- Garcia-Higuera,I., Fenoglio,J., Li,Y., Lewis,C., Panchenko,M.P., Reiner,O., Smith,T.F., and Neer,E.J.** (1996) Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **35**:13985-13994.
- Gasser,R.B., Woods,W.G., Wood,J.M., Ashdown,L., Richards,G., and Whithear,K.G.** (2001) Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. *Electrophoresis* **22**:3546-3550.
- Gattiker,A., Gasteiger,E., and Bairock,A.** (2002) ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl.Bioinform.* **1**:107-108.
- Gething,M.J. and Sambrook,J.** (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**:33-45.
- Glass,D.J., Polvere,R.I., and Van der Ploeg,L.H.** (1986) Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. *Mol.Cell Biol.* **6**:4657-4666.
- Goodwin,E.C. and Rottman,F.M.** (1992) The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J.Biol.Chem.* **267**:16330-16334.
- Göthel,S.F. and Marahiel,M.A.** (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol.Life Sci.* **55**:423-436.
- Greif,G., Stephan,B., and Haberkorn,A.** (1996) Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. *Parasitol.Res.* **82**:706-714.
- Greif,G.** (2000) Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitol.Res.* **86**:787-790.
- Greif,G., Harder,A., and Haberkorn,A.** (2001) Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidia - current level of knowledge and outlook. *Parasitol.Res.* **87**:973-975.
- Gurunathan,S., Klinman,D.M., and Seder,R.A.** (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu.Rev.Immunol.* **18**:927-974.
- Haberkorn,A. and Stoltefuss,J.** (1987) Untersuchungen zum Wirkungsspektrum von Toltrazuril, einem neuen Kokzidiose-Mittel. *Vet.Med.Nachr.* **1**:22-32.
- Haberkorn,A. and Greif,G.** (1999) Animal Models of Coccidia Infection. Chapter 99. In: *Handbook of Animal Models of Infection*, Academic Press.
- Haberkorn,A.** (1996) Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and perspectives. *Parasitol.Res.* **82**:193-199.
- Haberkorn,A., Harder,A., and Greif,G.** (2001) Milestones of protozoan research at Bayer. *Parasitol.Res.* **87**:1060-1062.

- Hackstein,J.H., Mackenstedt,U., Mehlhorn,H., Meijerink,J.P., Schubert,H., and Leunissen,J.A.** (1995) Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll  $\alpha$ -D1 complex, the potential target for therapeutic triazines. *Parasitol.Res.* **81**:207-216.
- Hammond,D.M., Ernst,J.V., and Chobotar,B.** (1970) Composition and function of the substiedal body in the sporocysts of *Eimeria utahensis*. *J.Parasitol.* **56**:618-619.
- Hammond,D.** (1973) Life cycles and development of coccidia. In: Hammond,D.M. and Long,P.L. (eds.) *The coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera*. University Park Press, Baltimore. 45-79.
- Handschumacher,R.E., Harding,M.W., Rice,J., Drugge,R.J., and Speicher,D.W.** (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**:544-547.
- Harder,A. and Haberkorn,A.** (1989) Possible mode of action of toltrazuril: studies on two *Eimeria* species and mammalian and *Ascaris suum* enzymes. *Parasitol.Res.* **76**:8-12.
- Heckert,R.A., Elankumaran,S., Oshop,G.L., and Vakharia,V.N.** (2002) A novel transcutaneous plasmid-dimethylsulfoxide delivery technique for avian nucleic acid immunization. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **89**:67-81.
- Henken,A.M., Ploeger,H.W., Graat,E.A., and Carpenter,T.E.** (1994a) Description of a simulation model for the population dynamics of *Eimeria acervulina* infection in broilers. *Parasitology* **108** (Pt 5):503-512.
- Henken,A.M., Graat,E.A., Ploeger,H.W., and Carpenter,T.E.** (1994b) Description of a model to simulate effects of *Eimeria acervulina* infection on broiler production. *Parasitology* **108** (Pt 5):513-518.
- High,K.P., Joiner,K.A., and Handschumacher,R.E.** (1994) Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. *J.Biol.Chem.* **269**:9105-9112.
- Hirtzlin,J., Farber,P.M., Franklin,R.M., and Bell,A.** (1995) Molecular and biochemical characterization of a *Plasmodium falciparum* cyclophilin containing a cleavable signal sequence. *Eur.J.Biochem.* **232**:765-772.
- Hoogendoorn,B., Toye,A.A., Bumstead,N., and Shirley,M.W.** (1998) 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.
- Jacobsson,K. and Frykberg,L.** (1995) Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. *Biotechniques* **18**:878-885.
- Jacobsson,K. and Frykberg,L.** (1996) Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100 % correct clones. *Biotechniques* **20**:1070-1071.

**Jacobsson,K. and Frykberg,L.** (1998) Gene VIII-based, phage-display vectors for selection against complex mixtures of ligands. *Biotechniques* **24**:294-301.

**Janowski,B., Wollner,S., Schutkowski,M., and Fischer,G.** (1997) A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates. *Anal.Biochem.* **252**:299-307.

**Jean,L., Pery,P., Dunn,P., Bumstead,J., Billington,K., Ryan,R., and Tomley,F.** (2001) Genomic organisation and developmentally regulated expression of an apicomplexan aspartyl proteinase. *Gene* **262**:129-136.

**Jenkins,M.C.** (1988) A cDNA encoding a merozoite surface protein of the protozoan *Eimeria acervulina* contains tandem-repeated sequences. *Nucleic Acids Res.* **16**:9863.

**Jenkins,M.C.** (1998) Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine. *Int.J.Parasitol.* **28**:1111-1119.

**Jeurissen,S.H., Janse,E.M., Vermeulen,A.N., and Vervelde,L.** (1996) *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **54**:231-238.

**Johnston,D.A. and Fernando,M.A.** (1997) Isoenzymes of *Eimeria* from the domestic fowl: electrophoretic variants among species, strains and clones. *Parasitol.Res.* **83**:464-470.

**Joyner,L.P. and Long,P.L.** (1974) The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. *Avian Pathol.* **3**:145-157.

**Kiang,D., El Ghazalie,N.E., Medhat,A.M., Abdel-Fattah,M., Karim,A.M., and LoVerde,P.T.** (1996) Identification and characterization of *Schistosoma mansoni* p17.7, a cyclophilin. *Mol.Biochem.Parasitol.* **76**:73-82.

**Kieffer,L.J., Seng,T.W., Li,W., Osterman,D.G., Handschumacher,R.E., and Bayney,R.M.** (1993) Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA and further characterization. *J.Biol.Chem.* **268**:12303-12310.

**Ko,C., Smith,C.K., and McDonell,M.** (1990) Identification and characterization of a target antigen of a monoclonal antibody directed against *Eimeria tenella* merozoites. *Mol.Biochem.Parasitol.* **41**:53-63.

**Kodihalli,S., Haynes,J.R., Robinson,H.L., and Webster,R.G.** (1997) Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J.Virol.* **71**:3391-3396.

**Kofron,J.L., Kuzmic,P., Kishore,V., Colon-Bonilla,E., and Rich,D.H.** (1991) Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* **30**:6127-6134.

**Kogut,M.H. and Eirmann,L.** (1991) The effect of cyclosporin A on the development of *Eimeria* in non-specific hosts. *Int.J.Parasitol.* **21**:979-983.

- Kohler,S., Delwiche,C.F., Denny,P.W., Tilney,L.G., Webster,P., Wilson,R.J., Palmer,J.D., and Roos,D.S.** (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275**:1485-1489.
- Koletsky,A.J., Harding,M.W., and Handschumacher,R.E.** (1986) Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J.Immunol.* **137**:1054-1059.
- Kopko,S.H., Martin,D.S., and Barta,J.R.** (2000) Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies. *Poult.Sci.* **79**:336-342.
- Kowalczyk,D.W. and Ertl,H.C.** (1999) Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol.Life Sci.* **55**:751-770.
- Kozak,M.** (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**:857-872.
- Kyhse-Andersen,J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* **10**:203-209.
- Laemmli,U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lang,K., Schmid,F.X., and Fischer,G.** (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**:268-270.
- Lawn,A.M. and Rose,M.E.** (1982) Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J.Parasitol.* **68**:1117-1123.
- Lee,S., Fernando,M.A., and Nagy,E.** (1996) dsRNA associated with virus-like particles in *Eimeria* spp. of the domestic fowl. *Parasitol.Res.* **82**:518-523.
- Levine,N.D.** (1961) Protozoan parasites of domestic animals and man. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Levine,N.D., Corliss,J.O., Cox,F.E., Deroux,G., Grain,J., Honigberg,B.M., Leedale,G.F., Loeblich,A.R. 3rd, Lom,J., Lynn,D., Merinfeld,E.G., Page,F.C., Poljansky,G., Sprague,V., Vavra,J., and Wallace,F.G.** (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J.Protozool.* **27**:37-58.
- Li,L., Brunk,B.P., Kissinger,J.C., Pape,D., Tang,K., Cole,R.H., Martin,J., Wylie,T., Dante,M., Fogarty,S.J., Howe,D.K., Liberator,P., Diaz,C., Anderson,J., White,M., Jerome,M.E., Johnson,E.A., Radke,J.A., Stoeckert,C.J., Jr., Waterston,R.H., Clifton,S.W., Roos,D.S., and**

**Sibley,L.D.** (2003) Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res.* **13**:443-454.

**Liberator,P., Anderson,J., Feiglin,M., Sardana,M., Griffin,P., Schmatz,D., and Myers,R.W.** (1998) Molecular cloning and functional expression of mannitol-1-phosphatase from the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *J.Biol.Chem.* **273**:4237-4244.

**Liberator,P.A., Hsu,J., and Turner,M.J.** (1989) Tandem trinucleotide repeats throughout the nucleotide sequence of a cDNA encoding an *Eimeria tenella* sporozoite antigen. *Nucleic Acids Res.* **17**:7104.

**Lihme,A., Schafer-Nielsen,C., Larsen,K.P., Muller,K.G., and Bog-Hansen,T.C.** (1986) Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins. *J.Chromatogr.* **376**:299-305.

**Lillehoj,H.S.** (1987) Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infect.Immun.* **55**:1616-1621.

**Lillehoj,H.S.** (1998) Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int.J.Parasitol.* **28**:1071-1081.

**Lillehoj,H.S., Choi,K.D., Jenkins,M.C., Vakharia,V.N., Song,K.D., Han,J.Y., and Lillehoj,E.P.** (2000) A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis. *Avian Dis.* **44**:379-389.

**Liu,J., Chen,C.M., and Walsh,C.T.** (1991a) Human and *Escherichia coli* cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry* **30**:2306-2310.

**Liu,J., Farmer,J.D. Jr., Lane,W.S., Friedman,J., Weissman,I., and Schreiber,S.L.** (1991b) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**:807-815.

**Lodish,H.F. and Kong,N.** (1991) Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* **266**:14835-14838.

**Long,P.L.** (1965) Development of *Eimeria tenella* in avian embryos. *Nature* **208**:509-510.

**Long,P.L.** (1966) The growth of some species of *Eimeria* in avian embryos. *Parasitology* **56**:575-581.

**Long,P.L.** (1972) *Eimeria tenella*: reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial passage. *J.Comp.Pathol.* **82**:429-437.

- Long,P.L.** (1973) Pathology and pathogenicity of coccidial infection. In: The Coccidia *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related genera. Long,P.L. and Hammond,D.M. (eds.). University Park Press, London. 253-294.
- Long,P. and Reid,W.** (1982) A guide to the diagnosis of coccidiosis in chickens. Research Report 404, University of Georgia, Athens.
- Luban,J., Bossolt,K.L., Franke,E.K., Kalpana,G.V., and Goff,S.P.** (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**:1067-1078.
- Ma,D., Hong,X., Raghavan,N., Scott,A.L., McCarthy,J.S., Nutman,T.B., Williams,S.A., and Carlow,C.K.** (1996) A Cyclosporin A-sensitive small molecular weight cyclophilin of filarial parasites. *Mol.Biochem.Parasitol.* **79**:235-241.
- MacPherson,J.M. and Gajadhar,A.A.** (1993) Differentiation of seven *Eimeria* species by random amplified polymorphic DNA. *Vet.Parasitol.* **45**:257-266.
- McDonald,V., Shirley,M., and Millard,B.** (1986a) A comparative study of two lines of *Eimeria tenella* attenuated either by selection for precocious development in the chicken or by growth in chicken embryos. *Avian Pathol.* **15**:323-335.
- McDonald,V., Shirley,M.W., and Bellatti,M.A.** (1986b) *Eimeria maxima*: characteristics of attenuated lines obtained by selection for precocious development in the chicken. *Exp.Parasitol.* **61**:192-200.
- McDonald,V. and Shirley,M.W.** (1987) The endogenous development of virulent strains and attenuated precocious lines of *Eimeria tenella* and *E. necatrix*. *J.Parasitol.* **73**:993-997.
- McDougald,L.R. and Reid,W.M.** (1997) Coccidiosis. In: Diseases of Poultry, 10th Edition. 865-883.
- Mehlhorn,H., Ortmann-Falkenstein,G., and Haberkorn,A.** (1984) The effects of sym. Triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*: a light and electron microscopical study. *Z.Parasitenkd.* **70**:173-182.
- Miller,G.A., Bhogal,B.S., McCandliss,R., Strausberg,R.L., Jessee,E.J., Anderson,A.C., Fuchs,C.K., Nagle,J., Likel,M.H., and Strasser,J.M.** (1989) Characterization and vaccine potential of a novel recombinant coccidial antigen. *Infect.Immun.* **57**:2014-2020.
- Min,W., Lillehoy,H.S., Burnside,J., Weining,K.C., Staeheli,P., and Zhu,J.J.** (2002) Adjuvant effects *IL-1 $\beta$* , *IL-2*, *IL-8*, *IL-15*, *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 4* and *lymphotactin* on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine* **20**:267-274.
- Molloy,J.B., Eaves,F.W., Jeston,P.J., Minchin,C.M., Stewart,N.P., Lew,A.E., and Jorgensen,W.K.** (1998) Detection of *Eimeria acervulina* using the polymerase chain reaction. *Avian Dis.* **42**:119-123.

**Morgenstern,B., Frech,K., Dress,A., and Werner,T.** (1998) DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **14**:290-294.

**Morgenstern,B.** (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15**:211-218.

**Mouafo,A.N.** (2001) Characterization of wall forming bodies in macrogamonts and oocyst wall formation in *Eimeria tenella* (Coccidia, Apicomplexa): Study on the ultrastructure, immunolocalization of proteins and drug effects. Dissertation, Technische Universität Dresden.

**Mouafo,A.N., Weck-Heimann,A., Dubremetz,J.F., and Entzeroth,R.** (2002) Monoclonal antibodies specific for the two types of wall-forming bodies of *Eimeria tenella* macrogametes (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol.Res.* **88**:217-224.

**Muller,P.Y., Studer,E., and Miserez,A.R.** (2001) Molecular Biocomputing Suite: a word processor add-in for the analysis and manipulation of nucleic acid and protein sequence data. *Biotechniques* **31**:1306-1313.

**Murphy,W.J., Watkins,K.P., and Agabian,N.** (1986) Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for *trans*-splicing. *Cell* **47**:517-525.

**Neer,E.J., Schmidt,C.J., Nambudripad,R., and Smith,T.F.** (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**:297-300.

**Ng,S.T., Sanusi,J.M., Shirley,M.W., Tomley,F.M., and Wan,K.L.** (2002) Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Exp.Parasitol.* **101**:168-173.

**Nielsen,H., Engelbrecht,J., Brunak,S., and von Heijne,G.** (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int.J.Neural Syst.* **8**:581-599.

**Olofsson,B. and Bernardi,G.** (1983) Organization of nucleotide sequences in the chicken genome. *Eur.J.Biochem.* **130**:241-245.

**Oshop,G.L., Elankumaran,S., and Heckert,R.A.** (2002) DNA vaccination in the avian. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **89**:1-12.

**Page,A.P., Kumar,S., and Carlow,C.K.S.** (1995a) Parasite cyclophilins and antiparasite activity of cyclosporin A. *Parasitol.Tod.* **11**:385-388.

**Page,A.P., Landry,D., Wilson,G.G., and Carlow,C.K.** (1995b) Molecular characterization of a cyclosporin A-insensitive cyclophilin from the parasitic nematode *Brugia malayi*. *Biochemistry* **34**:11545-11550.

- Pahl,A., Brune,K., and Bang,H.** (1997) Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms. *Cell Stress Chaperones* **2**:78-86.
- Pflugl,G., Kallen,J., Schirmer,T., Jansonius,J.N., Zurini,M.G., and Walkinshaw,M.D.** (1993) X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex. *Nature* **361**:91-94.
- Pogonka,T., Klotz,C., Kovacs,F., and Lucius,R.** (2003) A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken. *Int.J.Parasitol.* **33**:81-88.
- Price,E.R., Zydowsky,L.D., Jin,M.J., Baker,C.H., McKeon,F.D., and Walsh,C.T.** (1991) Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:1903-1907.
- Procunier,J.D., Fernando,M.A., and Barta,J.R.** (1993) Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. *Parasitol.Res.* **79**:98-102.
- Reddy,G.R.** (1995) Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* cyclophilin gene that is stage-specifically expressed. *Mol.Biochem.Parasitol.* **73**:111-121.
- Réfega,S., Girard-Misguich,F., Bourdieu,C., Pery,P., and Labbe,M.** (2003) Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. *Vet.Parasitol.* **113**:19-33.
- Robberson,B.L., Cote,G.J., and Berget,S.M.** (1990) Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol.Cell Biol.* **10**:84-94.
- Roberts,W.L., Speer,C.A., and Hammond,D.M.** (1970) Electron and light microscope studies of the oocyst walls, sporocysts, and excysting sporozoites of *Eimeria callospermophili* and *E. larimerensis*. *J.Parasitol.* **56**:918-926.
- Robinson,H.L., Hunt,L.A., and Webster,R.G.** (1993) Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* **11**:957-960.
- Robinson,H.L.** (1997) Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine* **15**:785-787.
- Rose,M.E.** (1967) The influence of age of host on infection with *Eimeria tenella*. *J.Parasitol.* **53**:924-929.
- Rose,M.E. and Hesketh,P.** (1976) Immunity to coccidiosis: stages of the life-cycle of *Eimeria maxima* which induce, and are affected by, the response of the host. *Parasitology* **73**:25-57.
- Rose,M.E.** (1978) Immune response of chickens to coccidia and coccidiosis. In: *Avian Coccidiosis*. 297-336.

- Rose,M.E., Lawn,A.M., and Millard,B.J.** (1984) 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.
- Rose,M.E. and Hesketh,P.** (1989) *Eimeria vermiformis* and *E. mitis*: inhibition of development *in vivo* by cyclosporin A. *Exp.Parasitol.* **68**:289-296.
- Rose,M.E. and Wakelin,D.** (1990) Immunity to coccidiosis. In: *Coccidiosis of man and domestic animals.* 281-306.
- Rose,M.E. and Hesketh,P.** (1991) *Eimeria tenella*: localization of the sporozoites in the caecum of the domestic fowl. *Parasitology* **102** (Pt 3):317-324.
- Roswell,D.F. and White,E.H.** (1978) The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* **57**:409-423.
- Ryan,R., Shirley,M., and Tomley,F.** (2000) Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. *Int.J.Parasitol.* **30**:1493-1499.
- Ryley,J.** (1973) Cytochemistry, physiology and biochemistry. In: Hammond,D.M. and Long,P.L. (eds.). *The Coccidia.* University Park Press, London. 145-181.
- Saito,T., Niwa,Y., Ashida,H., Tanaka,K., Kawamukai,M., Matsuda,H., and Nakagawa,T.** (1999) Expression of a gene for cyclophilin which contains an amino-terminal endoplasmic reticulum-targeting signal. *Plant Cell Physiol.* **40**:77-87.
- Sakharkar,M.K., Kanguene,P., Woon,T.W., Tan,T.W., Kolatkar,P.R., Long,M., and de Souza,S.J.** (2000) IE-Kb: intron exon knowledge base. *Bioinformatics* **16**:1151-1152.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**:5463-5467.
- Schneuwly,S., Shortridge,R.D., Larrivee,D.C., Ono,T., Ozaki,M., and Pak,W.L.** (1989) *Drosophila ninaA* gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporine A binding protein). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:5390-5394.
- Schnitzler,B., Thebo,P., Mattson,J., Tomley,F., and Shirley,M.** (1998) Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol.* **27**:490-497.
- Schnitzler,B., Thebo,P., Tomley,F., Uggla,A., and Shirley,M.** (1999) PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathol.* **28**:89-93.

- Schreiber,S.L. and Crabtree,G.R.** (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol.Today* **13**:136-142.
- Shirley,M.W.** (1975) Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitology* **71**:369-376.
- Shirley,M.W. and Lee,D.L.** (1977) Isoelectric focusing of coccidial enzymes. *J.Parasitol.* **63**:390-392.
- Shirley,M.W.** (1986) New methods for the identification of species and strains of *Eimeria*. In: *Research in avian coccidiosis*. Athens, Georgia: University of Georgia. 13-35.
- Shirley,M.W. and Bellatti,M.A.** (1988) Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. *Res.Vet.Sci.* **44**:25-28.
- Shirley,M.W.** (1994) The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. *Parasitol.Res.* **80**:366-373.
- Shirley,M.W. and Bumstead,N.** (1994) Intra-specific variation within *Eimeria tenella* detected by the random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol.Res.* **80**:346-351.
- Shirley,M.W.** (1997) *Eimeria* spp. from the chicken: occurrence, identification and genetics. *Acta Vet.Hung.* **45**:331-347.
- Shirley,M.W.** (2000) The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella* - a coccidium from the chicken. *Int.J.Parasitol.* **30**:485-493.
- Shirley,M.W. and Harvey,D.A.** (2000) A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*. *Genome Res.* **10**:1587-1593.
- Shirley,M. and Rollinson,D.** (1979) Coccidia: the recognition and characterization of populations of *Eimeria*. In Taylor, A.E.R.& Muller, R. (eds.), *Proceedings of the 17th Symposium of the British Society for Parasitology*. Blackwell Science Publications, Oxford. 7-30.
- Smith,T.F., Gaitatzes,C., Saxena,K., and Neer,E.J.** (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem.Sci.* **24**:181-185.
- Song,K.D., Lillehoj,H.S., Choi,K.D., Yun,C.H., Parcels,M.S., Huynh,J.T., and Han,J.Y.** (2000) A DNA vaccine encoding a conserved *Eimeria* protein induces protective immunity against live *Eimeria acervulina* challenge. *Vaccine* **19**:243-252.
- Sowder,J.T., Chen,C.L., Ager,L.L., Chan,M.M., and Cooper,M.D.** (1988) A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J.Exp.Med.* **167**:315-322.
- Steinmann,B., Bruckner,P., and Superti-Furga,A.** (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J.Biol.Chem.* **266**:1299-1303.

- Stephens,R.M. and Schneider,T.D.** (1992) Features of spliceosome evolution and function inferred from an analysis of the information at human splice sites. *J.Mol.Biol.* **228**:1124-1136.
- Sterner,D.A., Carlo,T., and Berget,S.M.** (1996) Architectural limits on split genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:15081-15085.
- Stiff,M.I. and Bafundo,K.W.** (1993) Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria* sp. *Avian Dis.* **37**:295-301.
- Stotish,R.L., Wang,C.C., and Meyenhofer,M.** (1978) Structure and composition of the oocyst wall of *Eimeria tenella*. *J.Parasitol.* **64**:1074-1081.
- Strout,R.G. and Ouellette,C.A.** (1970) Schizogony and gametogony of *Eimeria tenella* in cell cultures. *Am.J.Vet.Res.* **31**:911-918.
- Strout,R. and Ouellette,C.** (1969) Gametogony of *Eimeria tenella* (Coccidia) in cell cultures. *Science* **163**:695-696.
- Suarez,D.L. and Schultz-Cherry,S.** (2000) The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model. *Avian Dis.* **44**:861-868.
- Sutton,R.E. and Boothroyd,J.C.** (1986) Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* **47**:527-535.
- Talebi,A. and Mulcahy,G.** (1995) Correlation between immune responses and oocyst production in chickens monospecifically infected with *E. maxima*. *Avian Pathol.* **24**:485-495.
- Tang,D.C., DeVit,M., and Johnston,S.A.** (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**:152-154.
- Tatusova,T.A. and Madden,T.L.** (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol.Lett.* **174**:247-250.
- Thommen-Scott,K.** (1981) Antimalarial activity of cyclosporin A. *Agents Actions* **11**:770-773.
- Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tomley,F.M., Clarke,L.E., Kawazoe,U., Dijkema,R., and Kok,J.J.** (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **49**:277-288.
- Tomley,F.M., Bumstead,J.M., Billington,K.J., and Dunn,P.P.** (1996) Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **79**:195-206.

- Tomley,F.M., Billington,K.J., Bumstead,J.M., Clark,J.D., and Monaghan,P.** (2001) *EtMIC4*: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. *Int.J.Parasitol.* **31**:1303-1310.
- Tschudi,C., Young,A.S., Ruben,L., Patton,C.L., and Richards,F.F.** (1985) Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**:3998-4002.
- Tschudi,C. and Ullu,E.** (1988) Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J.* **7**:455-463.
- Ulmer,J.B., Donnelly,J.J., Parker,S.E., Rhodes,G.H., Felgner,P.L., Dwarki,V.J., Gromkowski,S.H., Deck,R.R., DeWitt,C.M., Friedman,A., et al.** (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**:1745-1749.
- Ulmer,J.B., Donnelly,J.J., and Liu,M.A.** (1996) Toward the development of DNA vaccines. *Curr.Opin.Biotechnol.* **7**:653-658.
- Van der Ploeg,L.H.** (1986) Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. *Cell* **47**:479-480.
- Vandaveer,S.S., Erf,G.F., and Durdik,J.M.** (2001) Avian T helper one/two immune response balance can be shifted toward inflammation by antigen delivery to scavenger receptors. *Poult.Sci.* **80**:172-181.
- Vermeulen,A.N.** (1998) Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium. *Int.J.Parasitol.* **28**:1121-1130.
- Vermeulen,A.N., Schaap,D.C., and Schetters,T.P.** (2001) Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet.Parasitol.* **100**:13-20.
- Vervelde,L., Vermeulen,A.N., and Jeurissen,S.H.** (1995) *Eimeria tenella*: sporozoites rarely enter leukocytes in the cecal epithelium of the chicken (*Gallus domesticus*). *Exp.Parasitol.* **81**:29-38.
- Vezey,S.A.** (1978) Coccidiosis in laying birds. In: *Avian coccidiosis*. Long,P.L., Boorman,K.N., Freeman,B.M. (eds.). British Poultry Science Limited, Edinburgh. 495-500.
- Wallach,M., Pillemer,G., Yarus,S., Halabi,A., Pugatsch,T., and Mencher,D.** (1990) Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen. *Infect.Immun.* **58**:557-562.
- Wallach,M., Halabi,A., Pillemer,G., Sar-Shalom,O., Mencher,D., Gilad,M., Bendheim,U., Danforth,H.D., and Augustine,P.C.** (1992) Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. *Infect.Immun.* **60**:2036-2039.

- Wan,K.L., Chong,S.P., Ng,S.T., Shirley,M.W., Tomley,F.M., and Jangi,M.S.** (1999) A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing. *Int.J.Parasitol.* **29**:1885-1892.
- Wang,C.C. and Stotish,R.L.** (1975) Changes of nucleic acids and proteins in the oocyst of *Eimeria tenella* during sporulation. *J.Protozool.* **22**:438-443.
- Williams,R.B., Bushell,A.C., and Répérant,J.M.** (1996) A survey of *Eimeria* species in commercially-reared chickens in France during 1994. *Avian Pathol.* **25**:113-130.
- Williams,R.B.** (1998) Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int.J.Parasitol.* **28**:1089-1098.
- Williams,R.B.** (1999) A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int.J.Parasitol.* **29**:1209-1229.
- Williams,R.B.** (2002) Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol.* **31**:317-353.
- Witcombe,D.M., Belli,S.I., Wallach,M.G., and Smith,N.C.** (2003) Molecular characterisation of *EmTFP250*: a novel member of the TRAP protein family in *Eimeria maxima*. *Int.J.Parasitol.* **33**:691-702.
- Wolff,J.A., Malone,R.W., Williams,P., Chong,W., Acsadi,G., Jani,A., and Felgner,P.L.** (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**:1465-1468.
- Woods,W.G., Whithear,K.G., Richards,D.G., Anderson,G.R., Jorgensen,W.K., and Gasser,R.B.** (2000) Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. *Int.J.Parasitol.* **30**:1019-1023.
- Yamauchi,K.** (1991) The sequence flanking translational initiation site in protozoa. *Nucleic Acids Res.* **19**:2715-2720.
- Yun,C.H., Lillehoj,H.S., and Lillehoj,E.P.** (2000) Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev.Comp.Immunol.* **24**:303-324.
- Zhang,L., Jacobsson,K., Strom,K., Lindberg,M., and Frykberg,L.** (1999) *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. *Microbiology* **145** (Pt 1):177-183.
- Zhao,Y., Chen,Y., Schutkowski,M., Fischer,G., and Ke,H.** (1997) Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity. *Structure* **5**:139-146.
- Zhu,G. and Keithly,J.S.** (1996) The beta tubulin gene of *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **76**:315-319.

## 7 Abkürzungen

AC	'accession number'
A, C, G, T, U	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil
(A, C, G, T, U)TP	Adenosin-, Cytidin-, Guanosin-, Thymidin-, Uracil-5'-Triphosphat
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b(p)	Basen(paare)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cfu	'colony forming unit'
d(A, C, G, T)TP	2'-Desoxy(adenosin-, cytidin-, guanosin-, thymidin-)5'-Triphosphat
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	'enzyme-linked immunosorbent assay'
Glyoxal	Glyoxalethandial
<i>hpi</i>	Stunden nach Infektion ( <i>,horae post infectionem'</i> )
HRP	'Horse Radish' Peroxidase
IR	Infrarot
IgG	Immunglobulin G
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Molarität
mA	Milliampere
Mb(p)	Megabasen(paare)
MCS	'multi cloning site'
MW	Molekulargewicht ('molecular weight')
MWCO	'molecular weight cut-off'
mRNA	'messenger' RNA
μCi	Mikrocurie (3,7 x 10 <sup>7</sup> Zerfälle pro Sekunde)
OD <sub>nm</sub>	Optische Dichte einer bestimmten Wellenlänge
ORF	offenes Leseraster ( <i>,open reading frame'</i> )

## Abkürzungen

---

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pfu	„plaque forming unit“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>p.i.</i>	nach Infektion („ <i>post infectionem</i> “)
Pos.	Position
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
UTR	„untranslated region“
UV	Ultraviolettes Licht
VTZK	<i>E. tenella</i> Stamm VT aus der Zellkultur

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Ralf Jörg Hosse  
Geburtsdatum: 29.06.1973  
Geburtsort: Kassel  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

1979 – 1983 Grundschule Kirchbrombach i. Odw.  
1983 – 1985 Förderstufe der Mittelpunktschule Bad König i. Odw.  
1985 – 1992 Gymnasium Michelstadt i. Odw.  
05/1992 Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

07/1992 – 09/1993 Kreiskrankenhaus Erbach i. Odw.

## Studium

10/1993 – 05/2000 Studium der Biologie und Anglistik an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
10/1996 – 02/1997 Auslandssemester: CSIRO Australia, Armidale, N.S.W., Australien  
05/2000 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Hauptfächern Biologie und Englisch; Staatsexamensarbeit in Biologie  
seit 07/2000 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung für Molekulare Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

