

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
- Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften –  
Abteilung Immunologie und Zellbiologie

Direktorin:

Prof. Dr. Dr. S. Bulfone-Paus

Assoziation mit dem Wirtszell-Mikrotubulinetzwerk  
und zytoplasmatische Arretierung von p53:  
Untersuchungen zur Überlebensstrategie von  
*Theileria annulata* in transformierten  
Rinderleukozyten

Inauguraldissertation  
zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von  
Silke Gerber  
aus Merseburg

Lübeck, 2008

Die Dissertation wurde in der Zeit von Juni 2005 bis Dezember 2008 unter der Betreuung von Prof. Dr. J. S. Ahmed und Prof. Dr. U. Seitzer am Leibniz-Forschungszentrum Borstel in der Abteilung Immunologie und Zellbiologie, Laborgruppe Veterinärinfektiologie und -immunologie angefertigt.

Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren: 22.10.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 9.01.2009

Prüfungsausschuss:

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. N. Tautz

Erstberichterstatter: Prof. Dr. U. Seitzer

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. O. Holst

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung</b>		<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	<i>Theileria annulata</i> und Theileriose	10
1.1.1	Lebenszyklus von <i>T. annulata</i>	11
1.1.2	Eindringen in die Wirtszelle und Etablierung des Parasiten	12
1.2	Transformation von <i>T. annulata</i> -infizierten Leukozyten	14
1.2.1	Transformationsrelevante Parasitenproteine	15
1.3	Überlebensstrategien des Parasiten	17
1.3.1	Assoziation des Parasiten mit dem Mikrotubulinnetzwerk der Wirtszelle	17
1.3.2	Zellteilung des Parasiten	20
1.3.3	Apoptose in Theilerien-infizierten Leukozyten	21
1.3.3.1	Das Tumorsuppressor-Protein p53	26
1.3.3.2	p53 in <i>Theileria annulata</i> -infizierten Leukozyten	28
1.3.3.3	Humanes Papillomvirus-E6-Protein	30
1.3.3.4	Ta6TMP – ein Parasitenprotein, das möglicherweise mit p53 interagiert	32
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1	Materialien und Hersteller	34
2.1.1	Antisera und Antikörper	34
2.1.2	Enzyme	35
2.1.2.1	Restriktionsendonukleasen	35
2.1.2.2	Polymerasen, modifizierende Enzyme	35
2.1.3	Molekulargewichtsstandards	35
2.1.4	Verwendete Kits	35
2.1.5	Oligonukleotide	36
2.1.6	Plasmide	37
2.1.7	Klone	37
2.1.8	Bakterienstämme	38
2.1.9	Zelllinien	38
2.1.9.1	Kulturmedien für die eukaryotische Zellkultur	39
2.1.9.2	Kulturmedien für die prokaryotische Zellkultur	39
2.1.9.3	Kulturführung von <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	Zellbiologische Methoden	40
2.2.1.1	Kultivierung von bovinen und ovinen <i>Theileria</i> -infizierten Leukozyten	40
2.2.1.2	Kultivierung von HeLa-, COS-7-, HEK-293- und CHO-K1-Zellen	40
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	40
2.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen	41
2.2.1.5	Herstellung von Zelllysaten von infizierten Zellen	41
2.2.1.6	Behandlung von <i>T. annulata</i> -infizierten Zellen mit Buparvaquone (BW720c)	41
2.2.1.7	Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten	41
2.2.1.8	Herstellung von mit Zellen bewachsenen Objektträgern	41

2.2.1.9	Behandlung der Zellen mit Mikrotubuli-interagierenden Reagenzien	42
2.2.1.10	Isolierung von Schizonten aus <i>T. annulata</i> -infizierten Zellen	42
2.2.1.11	Giemsa-Färbung	42
2.2.1.12	Transiente Transfektion von Säugerzellen	43
2.2.1.13	Immunfluoreszenzfärbung	44
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.2.1	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese	45
2.2.2.2	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen	45
2.2.2.3	Isolierung genomischer DNA	45
2.2.2.4	Präzipitation von DNA	45
2.2.2.5	Isolierung von RNA	45
2.2.2.6	Synthese von cDNA	46
2.2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Reinheitsanalyse	46
2.2.2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion	47
2.2.2.9	Restriktionsreaktion	47
2.2.2.10	Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Enzymreaktionen	48
2.2.2.11	Ligationsreaktion	48
2.2.2.12	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	49
2.2.2.13	Transformation durch die CaCl <sub>2</sub> -Methode	49
2.2.2.14	Identifizierung positiver Klone mittels ‚colony‘-PCR	50
2.2.2.15	Plasmidpräparation	50
2.2.2.16	Sequenzierung	51
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	51
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.2.3.2	Proteinfärbung nach Fairbanks	52
2.2.3.3	Silberfärbung	53
2.2.3.4	Gelauswertung und Gelkonservierung	53
2.2.3.5	Immunblotting von Elektrophoresegelen (Western blot)	54
2.2.3.6	Ponceau S-Färbung	54
2.2.3.7	Immundetektion	54
2.2.3.8	Proteinbestimmung nach Bradford	55
2.2.3.9	Proteinbestimmung nach Lowry	56
2.2.3.10	Expression rekombinanter Proteine im Schüttelkolbenmaßstab	56
2.2.3.11	Zellaufschluss	56
2.2.3.12	Affinitätschromatographie	57
2.2.3.13	Dialyse und Aufkonzentration von Proteinproben	59
2.2.3.14	Koimmunpräzipitation	59
2.2.3.15	TCA-Proteinfällung	60
2.2.3.16	„Pull down“	60
2.2.3.17	Assemblierung von Mikrotubuli	61
2.3	Computer-Hardware und Software	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>62</b>
3.1	Untersuchungen zu einer möglichen Assoziation des Schizontenmembranproteins TaSP und Mikrotubuli der Wirtszelle	62
3.1.1	TaSP kolokalisiert mit dem Mikrotubulinnetzwerk der Wirtszelle	62
3.1.2	TaSP interagiert mit Tubulin <i>in vivo</i>	65
3.1.3	Nachweis von $\alpha$ -Tubulin auf isolierten Schizonten	66
3.1.4	Assoziation von TaSP mit $\alpha$ -Tubulin im heterologen System	67
3.1.5	Die TaSP-Tubulin-Assoziation ist parasitenabhängig	71
3.1.6	Einfluss von Nocodazol auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubulinnetzwerk	72
3.1.7	Einfluss von Taxol auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubulinnetzwerk	74
3.1.8	Einfluss von Taxol und Nocodazol auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubulinnetzwerk in transfizierten Zellen	76
3.1.9	TaSP interagiert mit Tubulin in den verschiedenen Zellzyklusphasen	78

3.1.10	<i>In vitro</i> -Interaktion von TaSP mit den Mikrotubuli	81
3.1.11	TaSP lokalisiert partiell am Zentrosom	83
3.2	p53 – Lokalisationsstudien in Theilerien-infizierten Leukozyten und isolierten Schizonten	85
3.2.1	p53 bindet an die Schizontenoberfläche in <i>T. annulata</i>	85
3.3	Charakterisierung und Untersuchungen des <i>T. annulata</i> - Proteins Ta6TMP, einem potentiellen Interaktionspartner von p53	88
3.3.1	Sequenzanalyse von Ta6TMP	89
3.3.2	Lokalisationsstudien von Ta6TMP in transfizierten eukaryotischen Zellen	90
3.3.3	Die Ta6TMP-Proteinsequenz ist konserviert in leukoproliferativen Theilerien-Spezies	93
3.3.4	Phylogenetische Analyse von Ta6TMP	95
3.3.5	NH <sub>2</sub> -Ta6TMP besitzt Immunreaktivität mit Seren von infizierten Tieren	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>97</b>
4.1	TaSP assoziiert mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle	97
4.1.1	Biochemische und funktionelle Interaktion zwischen TaSP und Tubulin	97
4.1.2	Mögliche Rolle von TaSP in der Verteilung des Parasiten auf die Wirtszellen	100
4.2	p53 ist möglicherweise durch Ta6TMP am Schizonten arretiert	106
4.2.1	Funktion von p53 in <i>T. annulata</i> -infizierten Lymphozyten und anderen leukoproliferativen Theilerien	106
4.2.2	Charakterisierung und Untersuchungen zur Funktion eines potentiellen Interaktionspartners von p53 – Ta6TMP	108
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>111</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>129</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>130</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1 Phylogenetische Beziehung der Apikomplexa	10
Abb. 1.2 Lebenszyklus von <i>T. annulata</i>	12
Abb. 1.3 Eindringen in die Wirtszelle und Etablierung von <i>Theileria</i> -Sporozoit	13
Abb. 1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Wirtszellinvasion von <i>T. parva</i>	17
Abb. 1.5 Primär- und Sekundärstruktur von TaSP	19
Abb. 1.7 Schematische Darstellung der Zellteilung von <i>Theileria</i>	20
Abb. 1.8 Die drei Apoptose-Signalwege	21
Abb. 1.9 Permanent aktivierte Signalwege in <i>Theileria</i> -infizierten Zellen	22
Abb. 1.10 Wirtszellsignaltransduktionswege, die in <i>Theileria</i> -transformierten Zellen konstitutiv aktiviert sind	25
Abb. 1.11 Domänen des Transkriptionsfaktors p53	26
Abb. 1.12 Aktivierung und Deaktivierung des p53-Proteins	27
Abb. 1.13 Rolle von p53 und p53-transaktivierten Proteinen in der Apoptose von <i>T. annulata</i> -infizierten Zellen	29
Abb. 1.14 Sekundär-struktur des E6-Proteins	30
Abb. 1.15 HPV E6 inaktiviert p53	31
Abb. 1.16 Physikalische und biochemische Eigenschaften von Ta6TMP	33
Abb. 3.1 TaSP kolokalisiert mit dem Zytoskelett der Wirtszelle	64
Abb. 3.2 <i>in vivo</i> -Interaktion von TaSP mit Tubulin	65
Abb. 3.3 Isolierte Schizonten binden Tubulin	66
Abb. 3.4 TaSP kolokalisiert <i>in vivo</i> mit den Mikrotubuli in verschiedenen Zellphasen des Zellzyklus	68
Abb. 3.4 TaSP kolokalisiert <i>in vivo</i> mit den Mikrotubuli in verschiedenen Zellphasen des Zellzyklus	69
Abb. 3.5 TaSP interagiert mit Tubulin in transfizierten COS-7-Zellen	70
Abb. 3.6 Die TaSP-Tubulin-Interaktion ist abhängig vom Parasiten	72
Abb. 3.7 TaSP kolokalisiert nicht mit Tubulin nach Nocodazolbehandlung	73
Abb. 3.8 TaSP bindet weniger Tubulin nach Nocodazolbehandlung	74
Abb. 3.9 TaSP zeigt eine stärkere Kolokalisation mit dem Mikrotubulinnetzwerk nach Taxolbehandlung	75
Abb. 3.10 Assemblierte Mikrotubuli assoziieren mit TaSP	76
Abb. 3.11 Einfluss von Nocodazol und Taxol auf die TaSP-Tubulin-Assoziation in transfizierten Zellen	77
Abb. 3.12 TaSP kolokalisiert mit dem Zytoskelett der Wirtszelle in den verschiedenen Zellzyklusphasen	79
Abb. 3.13 In synchronisierten Zellen interagiert TaSP ebenfalls mit $\alpha$ -Tubulin	80
Abb. 3.14 TaSP interagiert <i>in vitro</i> mit Mikrotubuli, aber nicht mit Tubulin	81
Abb. 3.15 Rekombinantes TaSP interagiert mit $\alpha$ -Tubulin	82
Abb. 3.16 TaSP lokalisiert teilweise am MTOC	84
Abb. 3.17 p53 assoziiert mit Schizonten von <i>T. lestoquardi</i>	85
Abb. 3.18 p53 bindet an Schizonten von <i>T. parva</i>	86
Abb. 3.19 p53 bindet an die Schizontenmembran	88
Abb. 3.20 Ta6TMP kolokalisiert mit p53 in COS-7-Zellen	92
Abb. 3.21 Ta6TMP ist in den leukoproliferativen Theilerien Spezies konserviert	94
Abb. 3.22 Phylogenetischer Baum von Ta6TMP-Homologen in Apikomplexa	95
Abb. 3.23 Ta6TMP ist ein immunreaktives Protein	96

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1 Primärantikörper	34
Tab. 2.2 Sekundärantikörper	35
Tab. 2.3 Restriktionsenzyme	35
Tab. 2.4 Andere Enzyme	35
Tab. 2.5 Kommerzielle Kits	36
Tab. 2.6 Primer zur Klonierung und Sequenzierung	37
Tab. 2.7 Plasmide	37
Tab. 2.8 Verwendete Klone	38
Tab. 2.9 Genotypen der verwendete Bakterienstämme	38
Tab. 2.10 Bovine und ovine Zelllinien	38
Tab. 2.11 Säugetierzelllinien	39
Tab. 2.12 Kulturmedien für verwendete Zelllinien	39
Tab. 2.13 Verwendete Antibiotikakonzentrationen	40
Tab. 2.14 Pipettierschema für die Transfektion mittels TransPEI	43
Tab. 2.15 Pipettierschema für die Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000	43
Tab. 2.16 Verwendte Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	44
Tab. 2.17 Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	44
Tab. 2.18 Pipettierschema für den PCR-Ansatz	47
Tab. 2.19 Pipettierschema für die Restriktionsreaktion	47
Tab. 2.20 Pipettierschema für die Ligation	48
Tab. 2.21 Pipettierschema für die Ligation mit	48
Tab. 2.22 Sequenzierungsprimer	51
Tab. 2.23 SDS-PAA-Gel-Zusammensetzung	52
Tab. 2.24 Bedingungen für Western blot	54
Tab. 2.25 verwendete Primärantikörper für Western blot	55
Tab. 2.26 verwendete Sekundärantikörper für Western blot	55
Tab. 2.27 verwendete Antikörper für Immunpräzipitation	59
Tab. 3.1 Vorhergesagte physikalische und biochemische Parameter von TaSP	63
Tab. 3.2 Vorhergesagte physikalische und biochemische Parameter von Ta6TMP	89

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat, Toluidin-Salz
bidest.	zweifach entionisiertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	,complementary DNA'
cv	Säulenvolumen
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dest.	einfach entionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
dNTP	Desoxynukleotid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
FKS	Fötale Kälberserum
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
IB	Immunblot
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MCS	'multiple cloning site'
MG/MW	Molekulargewicht
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
tRNA	„transfer“ Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
p. a.	pro analysi
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
<i>T.</i>	<i>Theileria</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	„tris buffered saline“, Tris-gepufferte Saline
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units/Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
% v/v	Volumenprozent
verg.	vergällt
% w/w	Massenprozent

#### Einbuchstabencode der 20 proteinogenen Aminosäuren:

A Alanin	G Glycin	M Methionin	S Serin
C Cystein	H Histidin	N Asparagin	T Threonin
D Asparaginsäure	I Isoleucin	P Prolin	V Valin
E Glutaminsäure	K Lysin	Q Glutamin	W Tryptophan
F Phenylalanin	L Leucin	R Arginin	Y Tyrosin

## Zusammenfassung

Der obligat intrazelluläre Parasit *Theileria annulata* induziert in infizierten Wirtszellen, den Rinderleukozyten, eine unkontrollierte Proliferation. *Theileria*-Parasiten nutzen diese Transformation für die eigene Vermehrung und Verteilung auf die Wirtstochterzellen, indem sie an die mitotische Spindel der Wirtszelle binden. *Theileria* interagiert dabei mit dem Mikrotubulinnetzwerk der Wirtszelle. Welche Proteine an dieser Interaktion beteiligt sind, war bis jetzt unbekannt. In dieser Arbeit konnte die Assoziation eines *T. annulata*-Oberflächenproteins („TaSP“) mit den Mikrotubuli der Wirtszelle nachgewiesen werden. TaSP und Tubulin kopräzipitierten *in vivo* und kolokalisierten *in situ* in infizierten Zellen. In mitotischen Zellen war eine auffällige Assoziation mit dem Spindelapparat der Zelle zu beobachten. Diese Interaktion war durch Abtötung des Parasiten mit dem anti-*Theileria* Medikament Buparvaquone und durch Zerstörung des Tubulingerüsts mit Nocodazol modulierbar: (1) Die Menge kopräzipitierten Tubulins war nach Buparvaquonebehandlung stark reduziert. (2) Die Behandlung des Parasiten mit Nocodazol resultierte in reduzierten Mengen von mit TaSP kopräzipitiertem Tubulin und umgekehrt.

Gleichermaßen zeigte die Überexpression dem Wirtszellzytoplasma zugewandte Domäne von TaSP als Fusionsprotein mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) in COS-7-Zellen, dass die Fluoreszenz ebenfalls partiell mit dem Mikrotubulinnetzwerk verknüpft ist, vor allem während der Zellteilung. Die Interaktion zwischen dem TaSP-GFP-Fusionsprotein und Tubulin wurde durch reziproke Koimmunpräzipitations-Experimente *in vivo* bestätigt.

Des Weiteren konnte eine direkte *in vitro*-Assoziation mit aufgereinigten und assemblierten Mikrotubuli und dem Histidin-Fusionsprotein von TaSP in ‘pull down’-Experimenten nachgewiesen werden.

Diese Assoziation eines vom Parasiten-stammenden Membranproteins mit dem Wirtszellzytoskelett deutet darauf hin, dass diese Interaktion eine Rolle in der gleichmäßigen Verteilung des Parasiten auf die Tochterzellen der Wirtszelle während der Zellteilung spielt, um die Vermehrung des Parasiten im Schizontenstadium sicher zu stellen.

Ein weiteres Merkmal der Transformation der Wirtszelle durch *Theileria annulata*-infizierten Zellen ist die Inhibierung der Apoptose durch Modulation verschiedener Signaltransduktionswege. Parasitenproteine, die an dieser Transformation beteiligt sind, sind aber noch weitestgehend unbekannt. Vor Kurzem wurde das Tumorsuppressor-Protein p53 in *T. annulata* untersucht und eine parasitenabhängige Sequestrierung dieses Wirtszellproteins im Zytoplasma am Schizonten festgestellt, mit der Folge der Inhibierung der p53-abhängigen Apoptose. Dass p53 eng assoziiert mit der Schizontenmembran vorliegt, konnte in dieser Arbeit durch Kolokalisationsstudien an isolierten Schizonten bestätigt werden. In anderen leukoproliferativen Theilerien-Spezies, *T. parva* und *T. lestoquardi*, zeigte sich in Konfokalen Mikroskopie-Experimenten die gleiche enge lokale Nachbarschaft

von endogenem p53 zum Parasiten, sodass anzunehmen ist, dass es sich hierbei wahrscheinlich um einen allgemeinen Mechanismus der p53-Sequestrierung des Parasiten zur Inhibierung der Apoptose handeln muss.

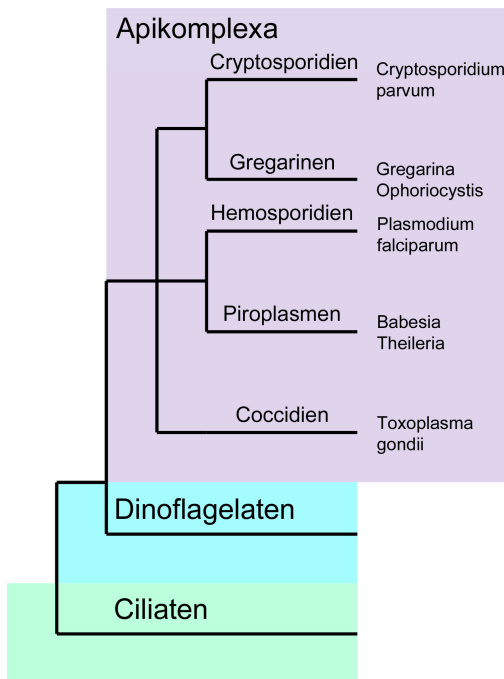
Ein Parasitenprotein, das *T. annulata*-6-Transmembranprotein (Ta6TMP), welches eine Homologie zum Humanen Papillomvirus-E6-Protein (HPV-E6) aufweist, wurde identifiziert. HPV-E6 inhibiert die p53-Funktion innerhalb der Zelle durch proteosomalen Abbau. Die zweite Fragestellung dieser Arbeit war deshalb die Charakterisierung und Untersuchung der möglichen Funktion von Ta6TMP in den infizierten Leukozyten und transfizierten Zellen. Es konnten vermehrt Hinweise gefunden werden, dass das Parasitenprotein Ta6TMP mit p53 interagiert. Exogen überexprimierte Teilsequenzen von Ta6TMP-GFP-Fusionsproteinen kolokalisierten partiell mit p53 in COS-7-Zellen. Dies war sowohl im Fall der N-terminalen als auch im Fall der C-terminalen Domäne zu beobachten. Interessanterweise wurde der C-terminale Teil von Ta6TMP in den Nukleoli der COS-7-Zellen detektiert, wohingegen der N-terminale Teil und das komplette Ta6TMP-GFP im Zytoplasma der Zelle nachweisbar waren. Dies sind Hinweise darauf, dass Ta6TMP eine Rolle in der Transformation der infizierten Zelle spielen könnte. Es wird noch dadurch bekräftigt, dass Ta6TMP in der phylogenetischen Analyse hochkonserviert innerhalb der Gruppe der leukoproliferativen *Theileria* spp. vorliegt.

# 1 Einleitung

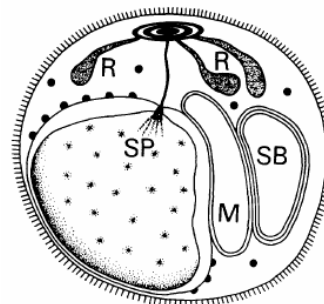
## 1.1 *Theileria annulata* und Theileriose

*Theileria annulata*, entdeckt und zum ersten Mal von Dschunkowsky und Luhs (1904) beschrieben, gehört zum Genus der Protozoa, welches zum Phylum der Apikomplexa zählt. Zum Stamm der Apikomplexa gehören ebenfalls viele Spezies von medizinischer (z. B. *Plasmodium* und *Toxoplasma*) und tiermedizinischer (z. B. *Eimeria*, *Babesia* und *Theileria*) Bedeutung. Die größten phänotypischen Ähnlichkeiten in der Pathogenese und teilweise auch im Lebenszyklus weisen die Theilerien mit *Plasmodium*, dem Erreger der Malaria auf (Abb. 1.1 A). *Theileria* besteht aus einem Apikalkomplex, welches dem Phylum seinen Namen gibt, und verschiedenen Organellen wie Mikronemen und Rhoptrien (Marechal & Cesbron-Delauw, 2001). Dies sind sekretorische Organellen, die Produkte für die Bewegung, die Wirtszelladhäsion und das Eindringen in die Wirtszelle enthalten (Scholtyseck & Mehlhorn, 1970). Dabei fehlt allerdings das für Apikomplexa charakteristische Conoid. Die Mikronemen, deren Sekretion mit der Zelladhäsion assoziiert ist, sind verändert oder abwesend (Blackman & Bannister, 2001). Der Apikoplast, ein sekundäres endosymbiontisches Organell, zeigt eine reduzierte Funktion (Abb. 1.1 B).

A



B



**Abb. 1.1 Phylogenetische Beziehung der Apikomplexa**

**A** Auf den Lebenszyklus und der 18S rRNA basierender phylogenetischen Baum der verschiedenen Apikomplexa-Spezies. Bearbeitet nach Sibley *et. al* (2004). **B** Schematische Darstellung eines Sporozoiten bzw. Merozoiten von *Theileria*. Innerhalb der Plasmamembran, auf dessen extrazellulärer Seite Moleküle zu finden sind, die an Oberflächenkomponenten der Wirtszelle binden, in die der Parasit eindringt, befindet sich der Zellkern mit seinem Spindelpolkörper (SP), Mitochondrium (M), Sphärikalkörper (SB) und die Rhoptrien (R). Alle diese Komponenten binden direkt oder indirekt an den Zellkern: die Ribosomen und Mitochondrien binden direkt an die Kernmembran, der Sphärikalkörper an das Mitochondrium und die Rhoptrien an den Spindelpolkörper und den polaren Ring. Nach (Tilney & Tilney, 1996).

Theileriose wird durch verschiedene Theilerien-Spezies verursacht. *Theileria annulata* ist der Erreger der Tropischen Theileriose im Rind, die im tropischen und subtropischen Afrika, Asien und in Teilen Südeuropas vorkommt. Er verursacht weltweit eine hohe Sterblichkeit und einen hohen ökonomischen Verlust (Mehlhorn *et al.*, 1994; Norval, 1992). *Theileria annulata* wird über Zecken der Gattung *Hyalomma* übertragen (Robinson, 1982) und

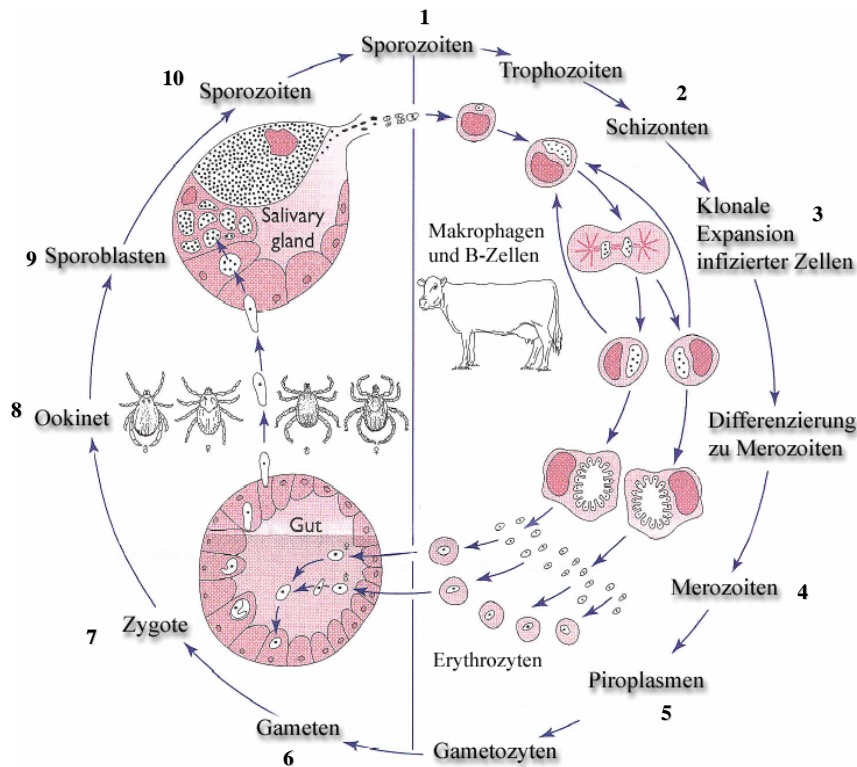
entwickelt sich in den Leukozyten des Wirtes. Typische klinische Zeichen von tropischer Theileriose sind ein Anschwellen der regionalen Lymphknoten, Fieber, Anorexie und Anämie. Dabei variiert die Sterblichkeitsrate zwischen 3 % und 90 %, abhängig vom Parasitenstamm und der Anfälligkeit des Rindes.

Die Kontrolle der tropischen Theileriose erfolgt zum einen durch Immunprophylaxe unter Verwendung einer attenuierten Vakzine, und zum anderen durch Bekämpfung der Vektorzecken. Zusätzlich können akute Fälle durch die Applikation des Medikamentes Buparvaquone (Butalex®, BW720c) (McHardy & Morgan, 1985) therapiert werden. Tiere, die sich von einer Infektion erholen, stellen jedoch zeitlebens ein Erregerreservoir dar. Da bis heute kein Impfstoff bekannt ist, der nicht zu einer Infektion führt, ist die Entwicklung neuer Vakzine zentraler Bestandteil der wissenschaftlichen Anstrengungen. Als potentielle molekular-basierte Vakzine werden Sporozoitenproteine verwendet, die das Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle verhindern sollen (Musoke *et al.*, 1993).

### 1.1.1 Lebenszyklus von *T. annulata*

Der Lebenszyklus besteht wie bei allen Apikomplexa aus drei Phasen: Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie. Dabei durchlaufen die Parasiten eine sexuelle und eine asexuelle Vermehrung, die mit einem Wirtswechsel verbunden ist. In dem Überträger des Parasiten, der Zecke, findet die sexuelle Vermehrung und Sporogonie und im Wirt, dem Rind, die asexuelle Vermehrung durch Schizogonie und Merogonie statt.

Der Zyklus im Wirt beginnt, wenn die Sporozoiten über die Speicheldrüse der Zecke im Saugakt übertragen werden. Die Sporozoiten dringen in die Leukozyten ein (Jura *et al.*, 1983; Shaw, 1997; Shaw, 2003) und entwickeln sich zum mehrkernigen Schizonten (Schizogonie), der die Wirtszelltransformation und Proliferation auslöst. Ab diesem Zeitpunkt verläuft die Teilung von Schizont und Wirtszelle synchron (Hulliger, 1965; Shiels *et al.*, 1992), wobei die DNA-Synthese des Wirtszellkerns und des Schizonten asynchron ohne G<sub>2</sub>-Phase des Parasiten verlaufen (Irvin *et al.*, 1982). Ferner differenziert sich der Schizont, durch die Fieberreaktion des Tieres (Glascodine *et al.*, 1990), über Mikroschizonten zu Merozoiten, die dann die Erythrozyten infizieren (Shaw & Tilney, 1992; Mehlhorn & Schein E., 1984) und sich als Piroplasmen in diesen Zellen vermehren. Die Piroplasmen werden von Zecken beim Saugen aufgenommen und durchlaufen im Zeckendarm über die Bildung einer Zygote eine sexuelle Entwicklung (Gamogonie). In den Epithelzellen des Darmes entwickelt sich die Zygote zu einer beweglichen Ookinete, die dann in die Speicheldrüsen wandert und sich wiederum asexuell vermehrt (Sporogonie). Ausgelöst durch den Saugakt der Zecke bildet sie Tausende von Sporozoiten (Fawcett *et al.*, 1982). Diese werden beim nächsten Zeckenbiss in den Wirt inokuliert, und der Kreislauf beginnt von vorne. Die Übertragung in die Zecke verläuft transstadial. In Abbildung 1.2 ist der komplette Zyklus von *T. annulata* dargestellt.



**Abb. 1.2 Lebenszyklus von *T. annulata***

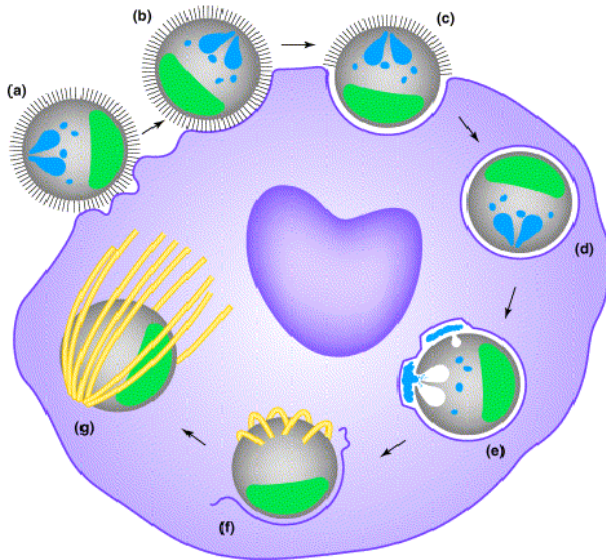
Sporozoiten (1) befallen bovine Makrophagen und B-Zellen und induzieren über die Bildung von Schizonten (2) deren unbegrenzte klonale Expansion (3). In manchen Zellen differenzieren die Schizonten (3) zu Merozoiten (4) und Piroplasmen, die in die Blutbahn abgegeben werden und dort die roten Blutzellen befallen (5). Wenn eine Zecke Blut infizierter Rinder saugt, kommt es im Zeckendarm zur Ausbildung von Mikro- und Makrogameten (6), die zu einer Zygote fusionieren (7). Daraus entsteht ein beweglicher Ookinet, der das Darmepithel durchbricht und mit der Lympflüssigkeit zu den Speicheldrüsen gelangt (8). Nach Inokulation differenzieren die Ookineten

zu Sporoblasten (9), die sich ungeschlechtlich vermehren. Beim Saugakt der Zecke werden die reifen Sporozoiten in den nächsten Wirt übertragen (10). Modifiziert nach Mehlhorn und Schein (1984).

### 1.1.2 Eindringen in die Wirtszelle und Etablierung des Parasiten

Die *Theileria*-Sporozoiten sind im Gegensatz zu anderen Apikomplexa nicht frei beweglich und dringen ohne bestimmte Orientierung in die Wirtszelle ein (Soldati *et al.*, 2004; Sibley, 2004). Das Eindringen des Parasiten wurde erstmals von Fawcett *et al.* für *T. parva*, einem nahem Verwandten von *T. annulata*, beschrieben (Fawcett *et al.*, 1982; Webster *et al.*, 1985; Fawcett *et al.*, 1984). Dies gelang ebenfalls Jura *et al.* für *T. annulata* (Jura *et al.*, 1983). In Abbildung 1.3 sind die Aufnahme des Parasiten und die damit verbundenen Veränderungen in der Wirtszelle dargestellt. Nach Anheftung des Sporozoiten an die Zielzelle dringt der Parasit, umschlossen von der parasitären Vakuolenmembran (PVM) und der Wirtszellmembran, in die Wirtszelle ein. Anschließend sezerniert der Parasit den Inhalt der Rhoptrien in die Wirtszelle. Daraus resultieren ein Anschwellen und das anschließende Auflösen der PVM. Die Mikrosphäre, ein granuläres Organell, gibt amorphes Material an die Oberfläche des Parasiten ab, welches mit den Mikrotubuli der Wirtszelle assoziiert. Welcher Natur dieses Parasitenmaterial ist und wie es mit den Mikrotubuli assoziiert - ob durch Mikrotubulinukleation oder durch einfaches Anheften an die Mikrotubuli oder sogar durch beides - ist nicht bekannt. Dies steht im Gegensatz zu anderen Apikomplexa, bei denen das Eindringen des Parasiten von Aktin und Myosin des Parasiten abhängig ist und nicht von der Wirtszelle beeinflusst wird (Dobrowolski & Sibley, 1996; Meissner *et al.*, 2002).

Etwa 24 - 48 Stunden nach dem Eindringen des Sporozoiten teilt sich der Zellkern des Parasiten wiederholt bis sich ein mehrkerniges Syncytium, der Schizont, gebildet hat.



**Abb. 1.3 Eindringen in die Wirtszelle und Etablierung von *Theileria*-Sporozoiten**

Der Sporozoit bindet irreversibel an die Oberfläche der Wirtszelle (a + b). Dabei löst sich die Oberfläche des Sporozoiten auf und er wird von der Wirtszelle durch umlaufendes 'Zippering' aufgenommen (c). Dabei wird der Parasit von einer Wirtszellmembran umgeben (d). Die Wirtszell- und Parasitenmembranen werden gleichzeitig mit dem Sezernieren der Rhoptrien und Mikrosphären durch Proteasen aufgelöst und es bildet sich eine Schicht (10-15 nm) auf der Oberfläche des Parasiten (e). Darauf folgt die Ausbildung von Wirtszellmikrotubuli um den Parasiten, die mit Proteinen auf der Parasitenoberfläche, die von den Mikrosphären stammen, assoziieren (f und g). Die Rezeptoren für das Binden und

Eindringen des Parasiten sind nicht identifiziert. Der vollständige Prozess vom ersten Anheften bis zur Freigabe ins Zytoplasma dauert etwa 30 Minuten. Modifiziert nach Shaw (2003).

Er zeichnet sich durch eine unregelmäßige Oberfläche mit mehreren Einbuchtungen aus, die die Mikrotubuli binden und somit wahrscheinlich dem Parasiten seine komplexe Form geben (Tilney & Tilney, 1996). Der Parasit induziert darüber hinaus die Transformation der Wirtszelle, denn die Sporozoiteninvasion führt zu einer klonalen Expansion der infizierten Zelle. Wie die Transformation jedoch initiiert wird, ist nicht geklärt.

Welche Proteine beim Eindringen in die Wirtszelle beteiligt sind, ist bisher nicht genau bekannt. Es wurden allerdings einige Parasitenproteine identifiziert und molekularbiologisch charakterisiert, die möglicherweise beim Eindringen in die Wirtszelle eine Rolle spielen.

So wurde gezeigt, dass Antikörper gegen das Oberflächenprotein p67 von *T. parva* ein Eindringen der Sporozoiten teilweise sowohl *in vitro* (Dobbelaere *et al.*, 1984; Nene *et al.*, 1992) als auch *in vivo* (Nene *et al.*, 1996; Nene *et al.*, 1995) hemmen. Antikörper gegen ein weiteres *T. parva* Oberflächenprotein Antigen PIM ('Polymorphic Immunodominant Protein') inhibierten ebenfalls die Sporozoiteninvasion *in vitro* (Toye *et al.*, 1995b).

Für *T. annulata* konnte ebenfalls ein Sporozoitenprotein SPAG-1 identifiziert und charakterisiert werden (Hall *et al.*, 1992). Ein Antikörper gegen SPAG-1 hatte eine neutralisierende Wirkung auf die Infektiosität der Sporozoiten für die Wirtszelle (Hall *et al.*, 2000). Immunisierungsversuche mit rekombinantem p67 oder SPAG-1 führten allerdings zu keiner vollständigen und belastbaren Immunität. Deshalb ist es notwendig, weitere Proteine aus verschiedenen Entwicklungsstadien des Erregers zu identifizieren, zu charakterisieren und deren Potential als Impfstoff zu untersuchen.

An der Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle müssen auch Liganden auf der Oberfläche der Wirtszelle beteiligt sein. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass gegen MHC Klasse I Moleküle gerichtete Antikörper das Eindringen von *T. parva* in die Zelle verhinderten (Shaw *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1995). Dies konnte auch für andere Oberflächenmoleküle der Lymphozyten wie z. B. CD2, CD4, CD6 und CD8 gezeigt werden.

## 1.2 Transformation von *T. annulata*-infizierten Leukozyten

Wie bereits erwähnt, induziert das Schizontenstadium die Transformation der infizierten Wirtszelle. Die zelluläre Transformation ist ein bekanntes Phänomen für Virus-infizierte Zellen (O'Shea, 2005). Theilerien sind jedoch die einzigen bekannten eukaryotischen pathogenen Organismen, die ihre Wirtszelle transformieren können (Dobbelaere & McKeever, 2002). *T. annulata* zählt wie *T. parva*, *T. lestoquardi* und *T. taurotragi* zu den lymphoproliferativen Theilerienarten. Diese Parasiten infizieren die Leukozyten des Wirts und verursachen ihre Transformation und unkontrollierte Proliferation. Dabei ist zu bemerken, dass *T. parva* T- und B-Zellen transformiert, wohingegen *T. annulata* die unkontrollierte Proliferation von Monozyten, Makrophagen und B-Zellen induziert. Die Transformation der Wirtszelle ist durch zelluläre Differenzierung (Sager *et al.*, 1997), Proliferation in Abwesenheit von antigenen Stimulantien oder exogenen Wachstumsfaktoren (Dobbelaere & Heussler, 1999; Dobbelaere *et al.*, 1988; Ahmed *et al.*, 1999) und Inhibierung der Apoptose (Luder *et al.*, 2001) gekennzeichnet. Deshalb können diese Zellen auch *in vitro* unbegrenzt kultiviert werden. Diese Eigenschaften der infizierten Zellen erinnern an Tumorzellen; sie zeigen zudem genauso wie viele Tumore einen metastatischen Phänotyp (Dobbelaere & Heussler, 1999). *In vivo* zeigen infizierte Zellen eine erhöhte Migration, Infiltration und Proliferation in nicht-lymphatisches wie auch in lymphatisches Gewebe, wo sie Läsionen verursachen, die Lymphosarkomen ähneln. Darüber hinaus verhalten sich *Theileria*-infizierte Leukozyten wie invasive Tumore in *scid* Mäusen (Fell *et al.*, 1990) und athymischen Mäusen (Irvin *et al.*, 1975). Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich der Parasit als Tumormodell, um die Lymphoproliferation zu studieren (Chaussepied & Langsley, 1996).

Die Fähigkeit der Bildung von Tumoren ist möglicherweise auf die Parasiten-induzierte Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-9 zurückzuführen (Baylis *et al.*, 1995). Ein entscheidender Unterschied zwischen Theilerien-infizierten Zellen und Tumorzellen ist, dass die Transformation vollkommen reversibel ist. Die *Theileria*-induzierte Transformation kann durch Behandlung mit dem Medikament Buparvaquone (BW720c) (McHardy *et al.*, 1985), welches die Elektronentransportkette des Parasiten beeinträchtigt, den Tod des Parasiten induziert und ihn aus der Wirtszelle eliminiert (Hudson *et al.*, 1985), rückgängig gemacht werden. Die Leukozyten zeigen dann einen ruhenden Phänotyp oder gehen in Apoptose.

Diese Reversibilität deutet darauf hin, dass die Transformation nicht auf eine permanente Veränderung des Genoms der Leukozyten wie z. B. Mutationen oder Deletionen, wie es für Krebs und krebsverursachende Viren beschrieben ist, zurückzuführen ist. Um also den transformierten Phänotyp der Wirtszelle aufrechtzuerhalten, sich vor Apoptose zu schützen und so sein eigenes Überleben zu sichern, muss der Parasit zentrale Signalwege der Wirtszelle kontrollieren. Hierauf soll im Folgenden eingegangen werden. Dadurch dass sich der Schizont frei und ohne umgebende Vakuole im Zytoplasma der Wirtszelle aufhält, ist er perfekt ausgestattet, um mit den Signaltransduktionswegen der Wirtszelle zu interagieren. Es

sind viele Signalwege in *Theileria*-transformierten Zellen aktiviert, die direkt oder indirekt zum transformierten Phänotyp beitragen (Dessaugue *et al.*, 2005b; Eichhorn & Dobbelaere, 1994; Chaussepied & Langsley, 1996; Dobbelaere & Heussler, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2000; Dobbelaere & Kuenzi, 2004). Als erster Signalweg in *Theileria*, welcher bei der Transformation eine Rolle spielt, wurde der CK-II-Signalweg beschrieben (Dessaugue *et al.*, 2005c). Die  $\alpha$ -Untereinheit der Casein Kinase II („CK II“) wurde in *T. parva* gefunden (ole-MoiYoi *et al.*, 1992) und ist konstitutiv aktiviert (ole-MoiYoi *et al.*, 1993; ole-MoiYoi, 1995). Interessanterweise zeigen transgene Mäuse, die dysreguliertes CK II  $\alpha$  exprimieren, typische Eigenschaften von Lymphomen, wie sie auch für das lymphoproliferative Syndrom von infizierten Rindern beschrieben sind (Seldin & Leder, 1995). Die Koexpression von CK II mit c-myc in transgenen Mäusen führte zur Ausbildung von Leukämie. CK II scheint als Onkogen zu fungieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Export der Parasiten-CK-II $\alpha$ -Untereinheit nicht über den klassischen Weg die Zelltransformation auslöst (Biermann *et al.*, 2003). Der Parasit muss also seine eigenen Mechanismen zum Überleben entwickelt haben. Da sowohl das Genom von *T. parva* (Gardner *et al.*, 2005) als auch von *T. annulata* (Pain *et al.*, 2005) sequenziert ist, bietet dies einen Ansatzpunkt, um nach potentiellen transformationsrelevanten Proteinen zu suchen.

### 1.2.1 Transformationsrelevante Parasitenproteine

Möglicherweise sind Oberflächenmoleküle auf dem Leukozyten, die mit dem eindringenden Parasiten interagieren, für die initiale Aktivierung und die folgende Transformation verantwortlich. Wenn der Parasit sich dann in der Wirtszelle befindet, setzt er wahrscheinlich Proteine frei, die zur Klasse der Kinasen und Phosphatasen gehören und die Wirtszellsignalwege beeinflussen könnten. Alternativ sezerniert der Schizont Proteine ins Wirtszellzytoplasma oder exprimiert Proteine auf seiner Oberfläche, die ins Zytoplasma der Wirtszelle gerichtet sind und somit eine Interaktion mit den Regulatoren der Wirtszellsignalwege erlauben.

*Theilerien*-Moleküle, die den Phänotyp der Wirtszelle verändern und eine Rolle bei der Transformation spielen, sind noch nicht identifiziert. Dass die Transformation aber von einem lebensfähigen Parasiten abhängig ist, zeigt sich in der Behandlung von infizierten Zellen mit dem anti-*Theileria*-Wirkstoff Buparvaquone, die zu einer Einstellung der Proliferation oder sogar zum Tod der Wirtszelle führt. Auch die Mechanismen, die zur Herunterregulierung der Leukozytenteilung während der Differenzierung zum Merozoiten führen, sind nicht bekannt. Bis jetzt sind sechs *Theileria* Makroschizontenproteine beschrieben worden, die in die Wirtszelle sekretiert werden. Eins von ihnen, ein *T. annulata*-sekretorisches Protein (TaSE) spielt wahrscheinlich im Besonderen bei der Interaktion des Wirts mit dem Parasiten eine Rolle. Auf die mögliche Funktion dieses Proteins soll später näher eingegangen werden.

Es wurden weiterhin sogenannte TashAT-Proteine beschrieben, die eine Homologie zu ‚AT-hook‘-DNA-Bindungsproteinen beim Säugetier besitzen und im Wirtszellkern lokalisiert sind (Swan *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2001; Shiels *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die TashAT-Proteine die Expression von Wirtszellproteinen modulieren und möglicherweise an der Kontrolle der Wirtszellproliferation beteiligt sind. Die drei charakterisierten TashAT-Proteine TashAT1, TashAT2 und TashAT3 besitzen eine Signalsequenz und ein Kernlokalisierungssignal (NLS), was möglicherweise erklärt, wie sie translozieren, nachdem sie ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert wurden. Zumindest TashAT2 (Swan *et al.*, 1999) und TashAT3 (Swan *et al.*, 2001) lokalisieren im Zellkern der Wirtszelle. Die Tatsache, dass Parasitenhomologe solcher ‚AT-hook‘-Proteine im Wirtszellkern enden, wo sie an Wirtzell-DNA binden und Transkriptionsfaktoren binden können, deutet auf die Möglichkeit hin, dass sie eine Rolle in der durch *Theileria* hervorgerufenen Transformation der Leukozytenzelle spielen. Für TashAT2 konnte gezeigt werden, dass es an AT-reiche Sequenzen bindet. Die Transfektion eines TashAT2-Konstrukts in bovine Makrophagen (BoMac) resultierte in einer Veränderung der Zellmorphologie und offenbarte Änderungen des Expressionsprofils der Ubiquitin-ähnlichen Protease bUBP43 und ihrem Substrat bISG15. Es wird angenommen, dass diese Interferon-stimulierten Gene an der Umgehung der Wirtszellimmunabwehr, an der Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt sind. Deshalb könnte die Modulation dieser Gene durch TashAT2 eine Rolle sowohl in der Transformation der Leukozytenzelle durch *Theileria* als auch in seiner Fähigkeit, die Immunantwort der Wirtszelle zu unterbinden, spielen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression der TashAT-Proteine während der Differenzierung zum Merozoitenstadium herunterreguliert ist und mit der beginnenden Reduzierung der Proliferation einhergeht.

TashHN gehört ebenfalls zur Familie der TashAT-Proteine und zeigt die gleiche subzelluläre Lokalisation im Zellkern der Wirtszelle. Seine Expression ist während der Differenzierung zum Merozoiten ebenfalls verringert (Swan *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte eine erhöhte Expression von TashHN in attenuierten Zelllinien nachgewiesen werden. Ob dies die Ursache oder nur ein Effekt des veränderten Phänotyps der infizierten Zellen ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Ein weiteres Protein, welches ebenfalls ein AT-hook-Bindemotiv, ein Signalpeptid und ein NLS-Signal besitzt und ebenfalls im Wirtszellkern lokalisiert, ist das SuAT-Protein (Shiels *et al.*, 2004). Da SuAT nicht wie die TashAT-Proteine im Merozoitenstadium herunterreguliert wird, ist es wahrscheinlich nicht an der Stimulation der Wirtszellproliferation beteiligt. Vielmehr moduliert es den Phänotyp der Säugetierzelle, indem es die Expression von Zytoskelettproteinen wie Cytokeratin reprimiert. Dies wurde auch schon für einige andere transformierte Zellen beschrieben.

Das Merozoiten-Oberflächen-Antigen Tams1 ist ebenfalls ein Protein, welches möglicherweise in die Differenzierung des Makroschizonten zum Merozoitenstadium

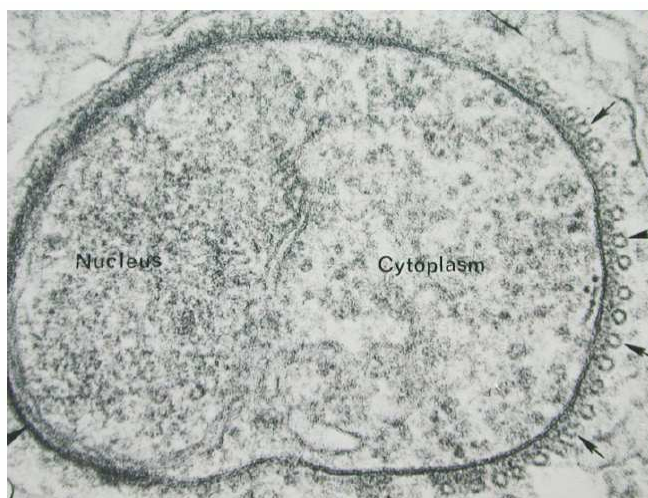
involviert ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass es eine Korrelation zwischen der Hochregulation der Tams1-Genexpression und der Bildung des Merozoiten gibt (Shiels *et al.*, 1997). Weiterhin konnte durch die EMSA-Technik (‘electrophoretic mobility shift assay’) gezeigt werden, dass ein vorgelagertes Nukleotidmotiv von Tams1 (CAT1) von verschiedenen nukleären Polypeptiden erkannt und gebunden wird (Shiels *et al.*, 2000). Es konnten drei Komplexe identifiziert werden, die spezifisch an die CAT1-Region binden. Dies könnte einen allgemeinen Mechanismus darstellen, wie *Theilerien* und auch andere Apikomplexa-Parasiten ihre Genexpression während der Differenzierung regulieren.

### 1.3 Überlebensstrategien des Parasiten

*T. annulata* hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um sein eigenes Überleben innerhalb der Wirtszelle und seine Vermehrung zu sichern. Auf diese Aspekte soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

#### 1.3.1 Assoziation des Parasiten mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle

Mikrotubuli kommen im Zytoplasma der eukaryotischen Zelle vor und sind an der Zellbewegung und der Zellteilung beteiligt (Alberts *et al.*, 2003). Eine weitere Funktion der Mikrotubuli besteht in der Aufrechterhaltung der Zellstruktur und ihres mechanischen Gerüsts. Die Mikrotubuli bilden zusammen mit den Intermediärfilamenten und den Mikrofilamenten das Zytoskelett der Zelle und sind mit den Intermediärfilamenten assoziiert. Das Eindringen der Sporozoiten ist nicht abhängig vom Zytoskelett des Parasiten, aber absolut abhängig von einem funktionsfähigen Zytoskelett der Wirtszelle (Shaw, 1999). Dabei interagiert der Parasit nicht mit dem Aktinzytoskelett der Wirtszelle, sondern bewirkt, dass die von der Wirtszelle stammenden Mikrotubuli um die Parasitenoberfläche polymerisiert werden (Abb. 1.4). Der vom Sporozoit zum Schizonten differenzierte Parasit bleibt mit den Mikrotubuli der Wirtszelle verbunden (Shaw, 2003; Fawcett *et al.*, 1982). Diese Assoziation



des Parasiten mit dem Zytoskelett der Wirtszelle erleichtert wahrscheinlich die Bewegung des Parasiten zum perinukleären Bereich der Wirtszelle (Fawcett *et al.*, 1984).

#### Abb. 1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Wirtszellinvasion von *T. parva*

30 Minuten nach der Invasion werden Mikrotubuli im Wirtszellzytoplasma geformt (Pfeile), die zu den Sporozoiten wandern. 140000fache Vergrößerung. Aus Fawcett, D. *et al.* (1984).

*Theileria* nutzt die Wirtszellmikrotubuli, um seine Zellteilung mit der Zytokinese der Wirtszelle zu koppeln. Diese geordnete Orientierung der Mikrotubuli zum Parasiten hin ist sehr stabil und bleibt erhalten, solange

sich der Parasit in der Wirtszelle befindet. Möglicherweise sekretiert der Parasit Proteine, die an der Mikrotubuli-Nukleation beteiligt sind. Erst im Verlauf der Differenzierung zum Merozoitenstadium ist die Assoziation des Parasiten mit den Mikrotubuli nicht mehr sichtbar. Die molekularen Mechanismen dieser Assoziation sind weitgehend unbekannt. Vor kurzem wurde ein sekretorisches Parasitenprotein TaSE (*Theileria annulata* secreted) identifiziert (Schneider *et al.*, 2007) und sowohl molekularbiologisch als auch biochemisch charakterisiert. Es konnte dabei durch Koimmunpräzipitations-Experimente und Lokalisationsstudien gezeigt werden, dass TaSE mit dem Tubulin der Wirtszelle interagiert und möglicherweise eine Rolle bei der Verteilung des Parasiten auf die Tochterzellen spielt.

Proteine, die auf der Oberfläche der Schizonten bzw. in das Zytoplasma der Wirtszelle abgegeben werden, könnten ebenfalls eine Rolle bei der Replikation des Parasiten spielen. Ein potentieller Kandidat ist z. B. das *Theileria annulata* surface protein' (TaSP), ein Membranprotein mit drei vorhergesagten Transmembrandomänen, einer Größe von 35 kDa und einem N-terminalen Signalpeptid (Schnittger *et al.*, 2002). Es zeigt eine Homologie mit PIM (Polymorphic Immunodominant') aus *T. parva* (Toye *et al.*, 1995a; Toye *et al.*, 1995b; Toye *et al.*, 1991). Die beiden Proteine sind zu 56 % identisch; sie unterscheiden sich jedoch in einigen molekularen und biochemischen Eigenschaften. PIM und TaSP werden sowohl im Sporozoitenstadium als auch im Schizontenstadium exprimiert (Toye *et al.*, 1991; Schnittger *et al.*, 2002). PIM ist ein hochpolymorphes Protein, welches zudem sehr immunogen ist. Die molekulare Masse von PIM variiert sehr stark, eine Eigenschaft, die bei Membranproteinen oft mit antigener Variation verbunden ist. Für PIM konnte gezeigt werden, dass ein Antiserum gegen das Protein die Invasion der Sporozoiten in die Lymphozyten (Toye *et al.*, 1995b) inhibiert. Diese Eigenschaft macht PIM zu einem Kandidaten für die Immunisierung gegen Ostküstenfieber.

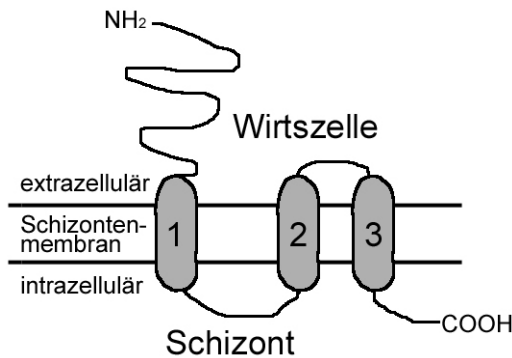
TaSP wird auf der Oberfläche des Schizonten exprimiert und besitzt eine extrazelluläre Glutamin-Prolin-reiche Domäne (QP-Domäne) mit repetitiven Elementen, die eine Interaktion mit dem Wirtszellzytoskelett möglich macht (Abb. 1.5 A). Es sind zwei Repeats der Sequenz QPXQ in TaSP enthalten. Weiterhin besitzt es eine Transmembrandomäne, die eine Ähnlichkeit zu Kupfer-Transporter-Proteinen zeigt (Abb. 1.5 C). Auch wenn TaSP keine vorhergesagte enzymatische Aktivität besitzt, ist vorstellbar, dass es als Gerüst-Protein fungiert, indem es Wirtszellproteine rekrutiert, die Signaltransduktionswege aktivieren. TaSP wird genauso wie PIM von einem 'single copy gene' kodiert und besitzt eine zentrale polymorphe Region, flankiert von hochkonservierten N- und C-terminalen Bereichen (Abb. 1.5). TaSP besitzt eine hohe Anzahl an negativ geladenen Aminosäureresten wie Glutaminsäure (17 %) und Asparaginsäure (11 %). Aufgrund seiner immunogenen Eigenschaften eignet sich das Protein zur Entwicklung serologischer Diagnostik (Seitzer *et al.*, 2007; Salih *et al.*, 2005; Bakheit *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit sollte das TaSP-Protein hinsichtlich seiner möglichen Assoziation mit dem Zytoskelett der Wirtszelle und seiner Rolle bei der Verteilung des Parasiten auf die Tochterzellen untersucht werden.

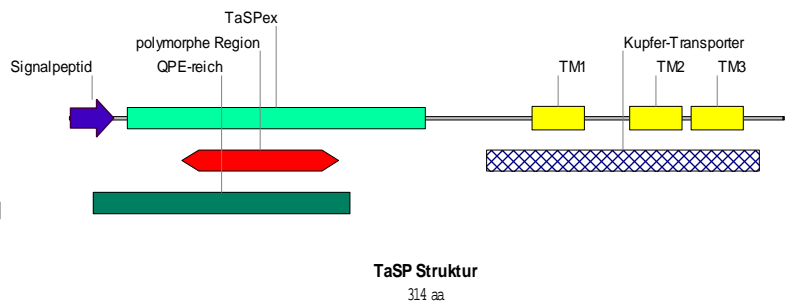
**A**

MKFFYLFVLF PILLKFCECG PFLPLDRQLN PIDFDPNDDQ HPLDPDQLID QIEPSEQPAQ  
 QEPIEPQOPT QPSTEPEELQ PETVTVEVPE PVTSEEPKES DQTEEQKHEE PEASPAPPEPV  
 DEPAVHATES TPTKASSSGD GAAVCHGKHH DYDSGKESK SDHDKRPKDK KPFVPKTSQC  
 CGSYFTNSYK ITVAFDWWLC DKPWQYALT LALFGFSLLS PCLKAYREVL RAKAIRSFIF  
 DCFLTHLFLF LIAFCAYALD FLLMLVMTF NVGVFFAVIT GYTVGYLVSS LAYSTLRSHF  
 ARSSSF SRIN EDCC

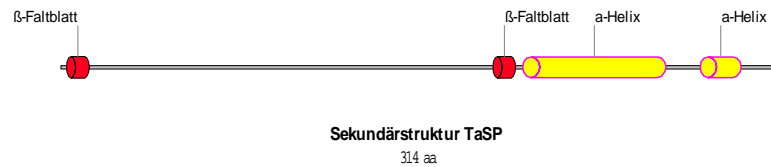
**B**



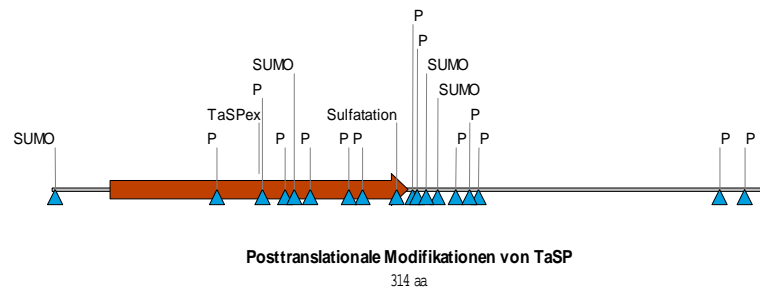
**C**



**D**



**E**



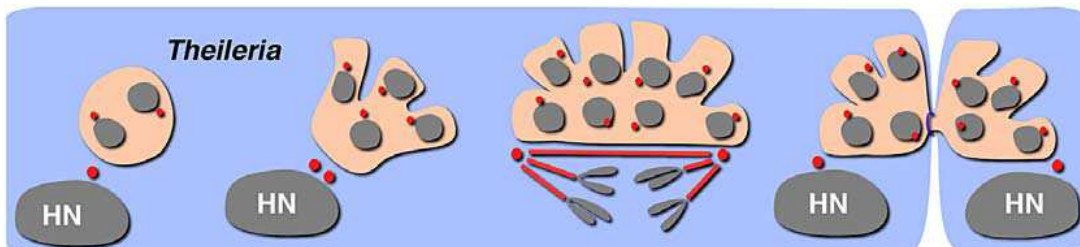
**Abb. 1.5 Primär- und Sekundärstruktur von TaSP**

**A** Aminosäuresequenz von TaSP. Signalpeptid, grün; Transmembranhelices, blau. Zusätzlich ist die Glutamin-Prolin-reiche (QP) Sequenz rot markiert. Die repetitive Sequenz QPXP ist blau unterlegt. Grau unterlegt ist die polymorphe Region von TaSP **B** Transmembrantopologie, vorhergesagt mit TMHMM 2.0. TaSP besitzt drei Transmembranhelices AS 204-226, AS 247-269 und AS 274-296. Der N-terminale Bereich des Proteins ragt ins Zytoplasma der Wirtszelle. Der C-terminale Bereich zeigt ins Zytoplasma des Schizonten. **C** Proteinkarte von TaSP, modifiziert nach *T. annulata* GeneDB TA17315. TaSP besitzt ein absplittbares N-terminales Signalpeptid (blau), vorhergesagt mit SignalP 2.0 HMM. Die Transmembranbereiche sind gelb dargestellt. Außerdem ist eine Domäne für einen Kupferionentransporter in der Sequenz von TaSP (AS 184-303) vorhanden (schraffiert). Die polymorphe Region ist rot unterlegt. Die Glutamin-Prolin-reiche Domäne (QPE) ist in dunkelgrün dargestellt. **D** Sekundärstruktur von TaSP. Vorhergesagt mit PSIPRED v2.6 (Jones, 1999). In rot sind die  $\beta$ -Faltblätter und in gelb die  $\alpha$ -Helices dargestellt. **E** vorhergesagte posttranslationale Modifikationen von TaSP. P = Phosphorylierungsstellen. SUMO = Sumoylierungsstellen. Sulfatation = Tyrosinsulfatationsstellen. In braun ist die extrazelluläre Domäne von TaSP (TaSPex) dargestellt.

### 1.3.2 Zellteilung des Parasiten

In der Mitose spielen die Mikrotubuli in der Aufteilung der Chromosomen eine Rolle. Zwei verschiedene Chromosomenbewegungen können unterschieden werden: die Bewegung zur Metaphaseplatte und die Bewegung zu den Spindelpolen in der Anaphase. Während der Zellteilung werden die Mikrotubuli an den Spindelpolen gebildet (Cuschieri *et al.*, 2007), binden an die Kinetochoren auf den Chromatidpaaren und ziehen in der Metaphase die Chromosomen zur Mittelebene. Die eigentliche Zellteilung findet in der Zytokinese statt, in der die beiden Tochterzellen noch durch den Midbody, der aus überlappenden antiparallelen Mikrotubuli besteht, miteinander verbunden sind und die Abschnürung der Tochterzelle stattfindet (McCollum, 2005).

Theilerien bilden eine interessante Ausnahme unter den Apikomplexa, da sie die Teilung und die Transformation der Wirtszelle steuern (Striepen *et al.*, 2007). Die Verteilung des Parasiten auf die beiden Tochterzellen geschieht während der Zellteilung der Wirtszelle (Hulliger *et al.*, 1964). *Theileria* interagiert dabei mit den Mikrotubuli der Wirtszelle, sodass der Parasit zu den Zentrosomen wandert, um sich anschließend zu teilen (Stagg *et al.*, 1980). Dabei benutzt der mehrkernige Schizont die mitotische Spindel der Wirtszelle, um sich auf die gebildeten Tochterzellen zu verteilen (Shaw *et al.*, 1991). In der Anaphase wird der Schizont in zwei Teile gezogen, sodass in der Zytokinese jede Tochterzelle einen Teil des Parasiten erhält (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7 Schematische Darstellung der Zellteilung von *Theileria***

Der *Theileria* Schizont (beige) teilt sich in direkter Assoziation mit der Zellteilung der Wirtszelle (HN, Wirtszellkern). *Theileria* entwickelt sich direkt im Zytoplasma der Wirtszelle (blau). DNA, grau; Zentrosom, rot; IMC, violett. Modifiziert nach Striepen, B. (2007).

Die DNA-Synthese der Wirtszelle und des Makroschizonten verlaufen asynchron (Irvin *et al.*, 1982). Genauer gesagt erfolgt die S-Phase der Makroschizonten, wenn die Wirtszelle in die Mitose eintritt. Die Zellteilung (M-Phase) erfolgt kurz darauf, während die Wirtszelle sich noch in der Metaphase befindet. Es konnte weiterhin in der Gruppe um Irvin durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Markierungsexperimente gezeigt werden, dass die G<sub>2</sub>-Phase im Parasiten verkürzt bzw. nicht mehr vorhanden ist.

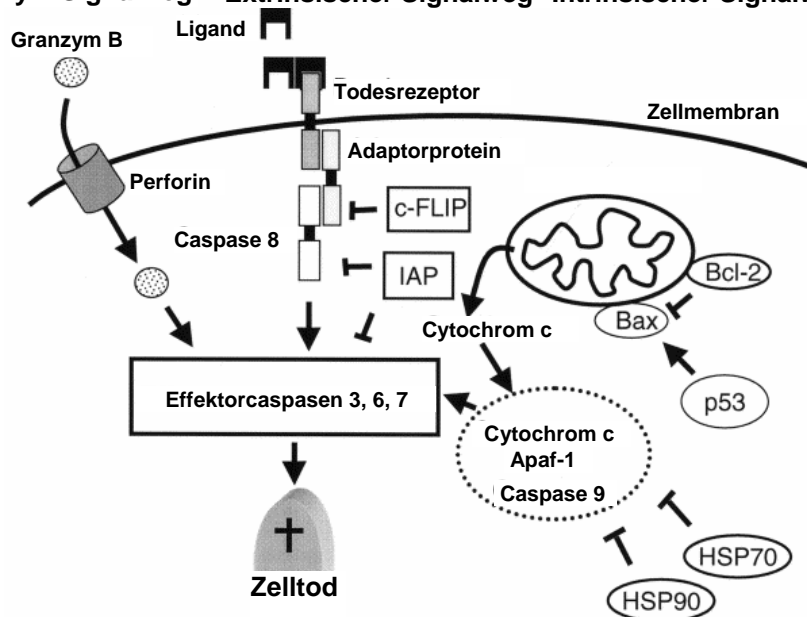
Die fehlende Synchronität von Wirtszell- und Parasiten-S-Phase sind Hinweise darauf, dass der Makroschizont seine DNA-Synthese unabhängig vom Wirtszellkern vollzieht. Dies wurde durch Inhibitionsexperimente mit Agenzien, die den Wirtszellmetabolismus an bestimmten Punkten des Zellzyklus stören, bestätigt. Diese hatten keinen Effekt auf die Replikation des

Parasiten; Er teilte sich auch in Abwesenheit der DNA-Synthese und Zellteilung der Wirtszelle. Obwohl die S-Phase des Schizonten und der Wirtszelle nicht synchron verlaufen, ist die Zellteilung des Parasiten doch mit der Metaphase der Wirtszelle synchronisiert.

### 1.3.3 Apoptose in Theilerien-infizierten Leukozyten

Phänotypisch zeigt sich die Apoptose im Schrumpfen der Zelle und in der Kondensation des Zellkerns zusammen mit der Fragmentierung der DNA (Wyllie & Golstein, 2001). Die Apoptose spielt eine Rolle beim Entfernen von beschädigten Zellen, in der Homöostase und im Alterungsprozess von mehrzelligen Organismen (Vaux & Strasser, 1996). Darüber hinaus ist die Apoptose ein wichtiger Verteidigungsmechanismus gegen virale, bakterielle und parasitäre pathogene Organismen (Williams, 1994; Gao & Kwai, 2000; Barry & McFadden, 1998; Vaux *et al.*, 1994). Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein wichtiger Regulator der Wirtszellantwort während der Infektion mit verschiedenen intrazellulären einzelligen Parasiten. Dabei wird die Apoptose von den Parasiten herunterreguliert bzw. inhibiert (Heussler *et al.*, 2001b), um das intrazelluläre Überleben des Parasiten zu erleichtern.

#### Granzym Signalweg    Extrinsischer Signalweg    Intrinsischer Signalweg

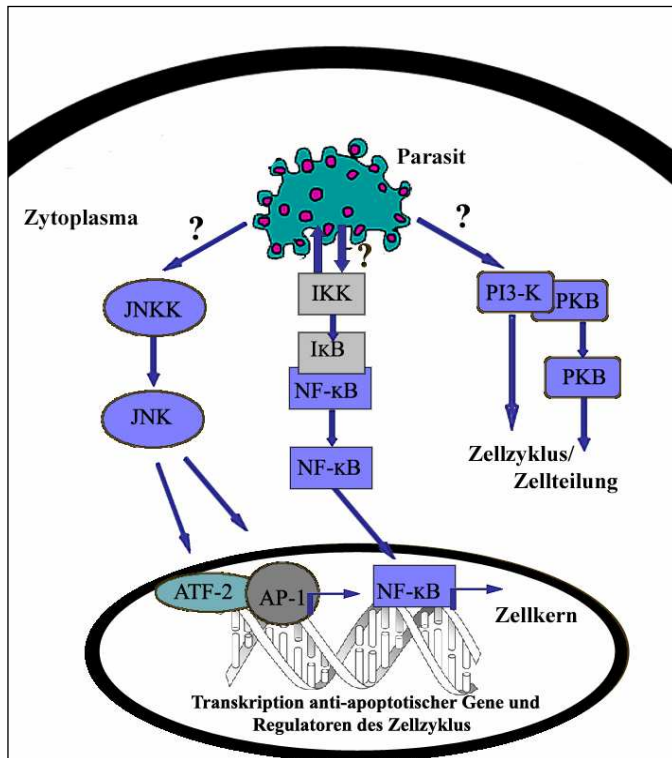


#### Abb. 1.8 Die drei Apoptose-Signalwege

**Granzym-Signalweg:** Granzym B wird von zytotoxischen Zellen sekretiert, dringt in die Zielzelle mit Hilfe von Perforin ein und aktiviert direkt die Effektorcaspasen. **Extrinsischer Signalweg:** Nachdem ein Ligand (TNF/Fas-Ligand) gebunden hat, assoziiert der Todesrezeptor (TNF/Fas Ligand) mit Adapterproteinen (FADD, TNF-R1 assoziierte death domain (TRADD)), welche den Rezeptor mit der Caspase 8 verbinden. Dieser Komplex wird 'death inducing signalling complex' (DISC) genannt. Die DISC-Bildung führt zur Spaltung und Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase 8 und schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7), welche den Zelltod induzieren. **Intrinsischer Signalweg:** Der mitochondriale Signalweg wird durch interne Signale ausgelöst. DNA-Schädigungen oder Stress führen zur Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53. p53 rekrutiert die pro-apoptischen Mitglieder (Bax, Bad und Bid) der Bcl-Proteinfamilie zur mitochondrialen Membran. Es folgt die Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytoplasma, wo das Cytochrom c mit Apaf-1 und Caspase 9 komplexiert, um das aktive Apoptosom zu formen. Die Aktivierung des Apoptosoms leitet dann die Aktivierung von Effektorcaspasen ein. c-Flip kann das Überleben begünstigen, indem es mit der Caspase 8 Aktivierung interferiert. Die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) interagieren mit dem Todessignalweg durch Assoziation mit sowohl Initiatorcaspasen als auch Effektorcaspasen. Bcl-2 blockiert die Abgabe von Cytochrom c durch die Interaktion mit Bax. HSP70 und HSP90 zerstören die Bildung des Apoptosoms durch Bindung an Apaf-1. Bearbeitet nach Heussler *et al.* (2001).

Apoptose (Abb. 1.8) wird durch die Bindung von Liganden an spezifische Oberflächenrezeptoren, wie z. B. Fas/APO-1 (CD95) oder ‚tumor necrosis factor receptor I‘ (TNFRI), oder andere Stimuli wie chemotherapeutische Agenzien, Bestrahlung oder Zellstress ausgelöst (Yuan, 1997).

*Theileria* inhibiert die Apoptose der Wirtszelle durch die Modulation der Expressionsmuster von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Proteinasen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Abbildung 1.9 gibt einen Überblick über die verschiedenen Signaltransduktionswege, die *Theileria* moduliert.



**Abb. 1.9 Permanent aktivierte Signalwege in *Theileria*-infizierten Zellen**

Der JNK-Signalweg wird durch einen unbekanntem Mechanismus vom Parasiten ausgehend aktiviert. Diese Aktivierung resultiert in der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und AP-1 und deren Translokation in den Zellkern. Die Aktivierung von NF-κB scheint durch die direkte Interaktion des Parasiten mit dem regulatorischen IKK-Komplex und durch dessen resultierende Aktivierung ausgelöst zu werden. Die Aktivierung des IKK-Komplexes führt zur permanenten Phosphorylierung und Ubiquitinierung des NF-κB-Inhibitors IκB. NF-κB wird dadurch freigesetzt und in den Zellkern transloziert. Hier steigert NF-κB die Expression einer Vielzahl von Genen, inklusive solcher Gene, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind oder für anti-apoptische Proteine kodieren. Die parasiten-abhängige Aktivierung von PI3-K induziert zum einen die Aktivierung von PKB, welche die Zellteilung stimuliert, zum anderen einen über die plasmamembran-abhängige Kinase (PDK1)/p70-S6-Kinase (p70<sup>S6K</sup>) führenden Signalweg (nicht gezeigt), der den Zellzyklus reguliert. (verändert nach Heussler, 2002)

NFκB-Signalweg

Der Signalweg von NF-κB (‚Nuclear Factor κB‘) reguliert die Expression von Proteinen in der Zellzykluskontrolle und trägt zur Zellproliferation bei. Des Weiteren aktiviert er die Transkription von Genen, die für anti-apoptische Proteine kodieren. In seiner inaktiven Form wird NF-κB durch die Bindung an seinen Inhibitor IκB im Zytoplasma der Zelle arretiert. Durch zellulären Stress, wie z. B. Infektion mit intrazellulären Erregern oder extrazelluläre Stimuli (TNF, IL-1) wird der Inhibitor durch einen Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert und dann ubiquitinyliert und folglich degradiert. NF-κB ist nun frei und transloziert in den Zellkern, wo es an die DNA bindet und die Transkription von anti-apoptischen und Zellzyklus-regulierenden Genen aktiviert.

Die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB sichert das Überleben von *Theileria*-transformierten Leukozyten (Heussler *et al.*, 1999b; Ivanov *et al.*, 1989). Für die kontinuierliche Aktivierung und die nukleäre Translokation von NF-κB wird IκB, welcher

normalerweise den Transport in den Zellkern inhibiert, durch Phosphorylierung und folgender Ubiquitinylierung degradiert (Palmer *et al.*, 1997). Die Degradierung der Inhibitoren I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  durch Polyubiquitinylierung ist ein reversibler Prozess. Durch Abtötung des Parasiten wird das normale I $\kappa$ B Niveau wiederhergestellt und NF- $\kappa$ B sammelt sich wieder im Zytoplasma der Zelle an. Medikamentenvermittelte Inhibierung der konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivierung in *Theileria*-infizierten Zellen blockiert den NF- $\kappa$ B Signalweg und löst die Apoptose aus (Heussler *et al.*, 1999a; Fernandez *et al.*, 1999). Wie der Parasit allerdings NF- $\kappa$ B aktiviert, blieb lange Zeit ungeklärt (Machado, Jr. *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung durch die Rekrutierung der I $\kappa$ B Kinase (IKK-Signalosom) auf der Parasitenoberfläche vermittelt wird (Heussler *et al.*, 2002). IKK phosphoryliert und induziert die Degradierung von I $\kappa$ B. Dass diese IKK-Rekrutierung spezifisch für das Schizontenstadium ist und im nicht transformierenden Merozoitenstadium herunterreguliert wird, wurde ebenfalls nachgewiesen. Es wurde auch eine zellzyklusabhängige Aktivierung des IKK-Signalosoms gefunden, was darauf hinweist, dass andere Wirtszellmoleküle neben IKK an der Interaktion beteiligt sind. Eine direkte Interaktion zwischen Parasitenproteinen und IKK konnte allerdings nicht demonstriert werden.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass ein TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) involvierender autokriner Zyklus möglicherweise an der NF- $\kappa$ B Aktivierung in *T. parva*-transformierten B-Zellen beteiligt ist (Guernon *et al.*, 2003a). Die direkte Inhibition von TNF $\alpha$  führte zur Arretierung der Proliferation, verursachte allerdings keine Apoptose in den infizierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die TNF-Signale an NF- $\kappa$ B ausschließlich über den TNF-Rezeptor TNFR2, der im Gegensatz zu TNFR1 keine Todesdomäne besitzt, vermittelt werden.

Weiterhin konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die IKK-Aktivierung unabhängig von HSP90 funktioniert (Hermann & Dobbelaere, 2006). Durch Inhibition der IKK-HSP90-Interaktion mit Geldamycin konnte zum ersten Mal eine HSP90-unabhängige IKK-Aktivierung nachgewiesen werden.

### PI-3K/PBK Weg

Des Weiteren ist der Phosphoinositol-3-phosphat/Proteinkinase B (PI-3K/PBK)-Signalweg an der Inhibition der Apoptose beteiligt (Downward, 1998; Hemmings, 1997). Aktiviertes PI3-K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) auf der Zelloberfläche, welches u. a. von der Proteinkinase B (PKB oder Akt) als Anker genutzt wird. Dieses Andocken der PKB an die Membran setzt eine Transduktionskaskade in Gang, die letztendlich die Hemmung verschiedener Apoptose-auslösender Effektorproteine bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass PI3-K und PKB in *T. parva*-infizierten T- und B-Zellen und in *T. annulata*-infizierten Makrophagen abhängig vom Parasiten konstitutiv aktiviert sind (Heussler *et al.*, 2001a; Dobbelaere *et al.*, 1999). Die

Blockierung der PKB-Aktivierung durch die Inhibierung der vorgelagerten PI-3-Kinase, beeinflusste den NF- $\kappa$ B-Signalweg allerdings nicht und induzierte auch keine Apoptose in den behandelten Zellen. Auch die Expression einer doppelt-negativen Mutante von PKB führte nicht zum Zelltod der Leukozyten, sodass anzunehmen ist, dass beide Signalwege unabhängig voneinander aktiviert werden. Dies konnte auch in der Gruppe um Baumgartner an *T. parva*-infizierten B-Lymphozyten bestätigt werden (Baumgartner *et al.*, 2000). PKB ist in transformierten B-Zellen minimal aktiviert. Der PI-3K/PBK-Signalweg spielt also eher eine Rolle für die Proliferation als für das Überleben der Zelle (Inhibierung der Apoptose).

#### Oberflächenrezeptoren und Moleküle der Apoptose-Signalkaskade

Zwei weitere Apoptosefaktoren, die in *T. parva*-transformierten T-Zellen konstitutiv exprimiert werden, sind der Fas-Ligand (FasL) und sein Rezeptor Fas (CD95) (Kuenzi *et al.*, 2003). Weiterhin konnte durch diese Gruppe gezeigt werden, dass die anti-apoptotischen Proteine c-FLIP und XIAP in T-Zellen parasitenabhängig induziert werden. In der Gruppe um Dobbelaere konnte des Weiteren bewiesen werden, dass der PI-3K-Akt-Signalweg nicht essentiell für die konstitutive Expression des anti-apoptotischen c-FLIP-Proteins ist. Obwohl *T. parva*-infizierte B- und T-Zellen TNF-Rezeptoren exprimieren, induziert TNF $\alpha$  keine Apoptose (Guernon *et al.*, 2003a; DeMartini & Baldwin, 1991).

Caspase-9 und Caspase-3 sind in *Theileria* transformierten T- und B-Zelllinien aktiviert, wenn der Parasit eliminiert wird (Guernon *et al.*, 2003b; Kuenzi *et al.*, 2003). Caspase-8 hingegen zeigte in *T. parva*-infizierten T-Zellen nur eine geringe Aktivierung. Dies spricht, genau wie für die beobachteten Ergebnisse zu TNF $\alpha$ , für eine Beeinflussung des intrinsischen Signalweges des programmierten Zelltods durch den Parasiten. In infizierten B-Zellen zeigte sich eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins und eine verminderte Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins, die zu einer Unterdrückung der Apoptose führen. In welchem Umfang die Mitglieder der Bcl-2 Familie zum Schutz vor Apoptose beitragen, ist bisher jedoch ungeklärt.

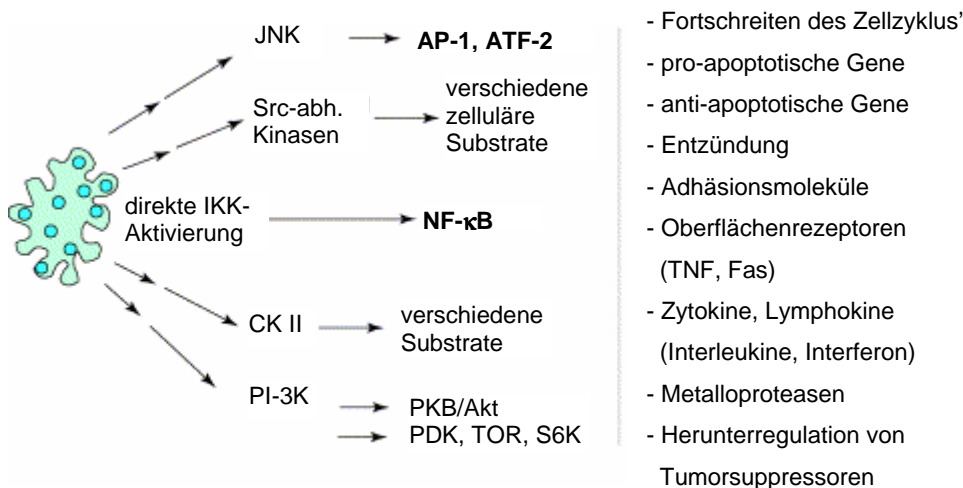
#### MAP-Kinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) spielen in der Immunantwort eine große Rolle (Dong *et al.*, 2002). Sie sind außerdem an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt. Die Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK), aber nicht ERK (Extrazellulär regulierte Proteinkinase) (Galley *et al.*, 1997) bzw. die p38-MAP-Kinasen (Botteron & Dobbelaere, 1998; Galley *et al.*, 1997; Chaussepied *et al.*, 1998; Seitzer *et al.*, 2006) sind in *Theileria*-infizierten Zellen konstitutiv aktiviert. Dies ist überraschend, da die Aktivierung von ERK mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht wird, wohingegen JNK und auch p38 mit der Induktion von Apoptose verknüpft ist. Die JNK-Aktivierung resultiert in einer Hochregulierung von Proteinen der Jun- und Fos-Familie (Chaussepied *et al.*, 1998) und die Transkriptionsfaktoren AP-1 und ATF-2 werden über den JNK-Signalweg konstitutiv induziert

(Botteron & Dobbelaere, 1998; Baylis *et al.*, 1995). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Induktion von c-Jun, dem Substrat von JNK, und die Aktivierung von JNK keine anti-apoptotische Rolle für das Überleben der infizierten B-Zellen haben (Lizundia *et al.*, 2006). Die Inhibierung von c-Jun resultierte in einem reduzierten metastatischen Potential *in vitro* und in einer verminderten Ausbildung von Tumoren *in vivo*. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Induktion von c-Jun für den metastatischen Phänotyp der *Theileria*-transformierten B-Zellen verantwortlich ist, und sprechen eher für eine anti-apoptotische Aktivierung von JNK in *Theileria* (Lizundia *et al.*, 2005; Lizundia *et al.*, 2007).

c-Myc

c-Myc konnte ebenfalls in mit *Theileria*-infizierten Zellen detektiert werden und löst eine anti-apoptotische Antwort der mit *T. parva*-infizierten B-Zellen aus. Die Induktion von c-Myc wird durch den Parasiten verursacht, denn wenn die infizierten B-Zellen mit dem Medikament Buparvaquone behandelt wurden, kam es zu einer Verringerung der c-Myc-Konzentration (Dessauge *et al.*, 2005b; Dessauge *et al.*, 2005a). Wahrscheinlich werden die hohen Konzentrationen von c-Myc über den GM-CSF-autokrinen Zyklus induziert. Weiter konnte gezeigt werden, dass die *Theileria*-abhängige transkriptionelle Induktion von c-Myc in infizierten B-Zellen JAK2 und STAT3 benötigt. Des Weiteren hängt die Transaktivierung von c-Myc von AP-1, E2F und NF-κB ab. Alle bisher beschriebenen Signalwege in T-Zellen (NFκB) und in B-Zellen (JNK) scheinen also an der Induktion von c-Myc beteiligt zu sein (Dessauge *et al.*, 2005a).



**Abb. 1.10 Wirtszellsignaltransduktionswege, die in *Theileria*-transformierten Zellen konstitutiv aktiviert sind**

JNK ist die einzige MAP-Kinase, die in infizierten Zellen permanent aktiviert ist und die für die AP-1- und ATF-2-Aktivierung verantwortlich ist. Darüber hinaus sind - abhängig vom transformierten Zelltyp - verschiedene Mitglieder der Src-verwandten Kinasefamilie aktiv, die an Signaltransduktionswegen teilnehmen, die von verschiedenen Oberflächenrezeptoren ausgehen. Die Caseinkinase II (CK II), welche eine Vielzahl von verschiedenen Substraten besitzt, ist stark hochreguliert. Der NF-κB-Signalweg wird direkt vom Parasiten durch die Rekrutierung und Aktivierung des IKK-Komplexes an die Schizontenoberfläche aktiviert. Die Einspeisung von anderen Signalwegen kann auch, abhängig vom Zelltyp, an der Aktivierung des IKK-Komplexes beteiligt sein. Obwohl der NF-κB-Signalweg wichtig für den Übergang in die S-Phase sein kann, reguliert er auch die Expression von anti-apoptotischen Genen, die am Überleben der Zelle beteiligt sind. Der PI-3K-PKB Weg ist ebenfalls konstitutiv aktiv und essentiell für die Proliferation der *Theileria*-transformierten Zellen. Eine direkte

Rolle im Schutz vor Apoptose ist nicht offensichtlich. Zusammengenommen kann die Aktivierung dieser Signalwege helfen, die vielen phänotypischen Änderungen, die in *Theileria*-transformierten Zellen entdeckt wurden (siehe rechts) und die an der Pathogenese der Theileriose beteiligt sind, zu erklären. Modifiziert nach Dobbelaere *et al.* (2004).

### 1.3.3.1 Das Tumorsuppressor-Protein p53

Ein weiteres Protein, welches in der Apoptose eine Rolle spielt und welches in dieser Arbeit näher untersucht werden sollte, ist das Tumorsuppressor-Protein p53.

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus und das Überleben der Zelle kontrolliert, und wird deshalb als ‚Wächter des Genoms‘ bezeichnet (Vogelstein *et al.*, 2000). Eine Mutation im p53 Gen tragen 50 % der menschlichen Tumore (Levine *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991). Die Hauptfunktionen von p53 sind das Anhalten des Zellzyklus‘ in der G<sub>1</sub>-Phase und die folgende Reparatur der DNA sowie die Auslösung der Apoptose (Levine, 1997).

Das p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren und wird strukturell und funktionell in vier Domänen unterteilt (Abb. 1.11): die Transaktivierungsdomäne, die DNA-Bindedomäne, die Tetramerisierungsdomäne und eine regulatorische Domäne (Wang *et al.*, 1993). Die N-terminale Transaktivierungsdomäne interagiert mit einer Reihe von Proteinen, darunter auch dem humanem MDM2-Proteine, welches die Aktivität von p53 negativ reguliert. In der zentralen Kernregion konnten die meisten Mutationen nachgewiesen werden (Hollstein *et al.*, 1994). *In vivo* bildet das p53-Protein ein Homo-Tetramer aus jeweils zwei Dimeren, das an eine aus vier repetitiven Sequenzen bestehende Konsensus-DNA-Sequenz bindet, wobei sich diese Sequenz in invertierten repetitiven Sequenzen wiederholt (El-Deiry *et al.*, 1992). Die C-terminale Domäne reguliert die Fähigkeit von p53, spezifische DNA-Sequenzen an seine Kernregion zu binden. Die C-terminale Domäne enthält ein Kernlokalisierungssignal (NLS), ein Kernexportsignal und eine Tetramerisierungsdomäne. Diese Domäne bindet auch an DNA-Strangbrüche oder Mutationen (Lee *et al.*, 1995).

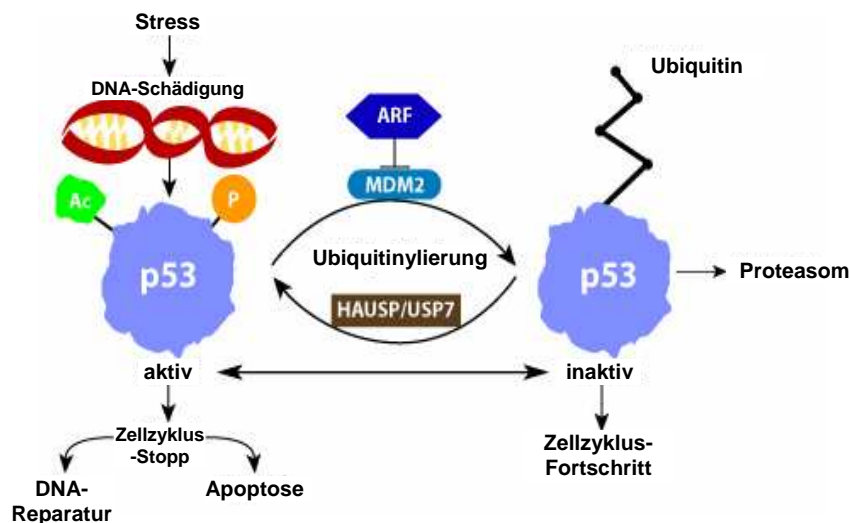


**Abb. 1.11 Domänen des Transkriptionsfaktors p53**

Zentral im p53 Protein befindet sich eine Kernregion mit spezifischen Sequenzen zur DNA-Bindung. Am N-Terminus ist der transaktivierende Bereich lokalisiert. Die Domänen zur Oligomerisierung und Proteinregulation sind am C-Terminus lokalisiert (P = Phosphorylierungsstellen). Verändert nach Vogelstein und Kinzler (1994).

p53 besitzt eine geringe Halbwertszeit und wird unter physiologischen Bedingungen in geringen Mengen im Zytoplasma der Zelle gehalten. Die Funktion von p53 ist also unter normalen Umständen ausgeschaltet und wird erst aktiviert, wenn die Zellen durch ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, Aktivierung von onkogenen Signalen, Hypoxia oder Nukleotiddeletion geschädigt sind. Das p53-Protein unterdrückt dann die Zellteilung der gestressten Zellen, indem es das Fortschreiten durch den Zellzyklus inhibiert oder die Apoptose auslöst. Somit verhindert p53 die Bildung von Tumoren und fungiert als ‚Handbremse‘. Was aber aktiviert das p53-Netzwerk? Es sind bis jetzt drei unabhängige Signalwege bekannt, die p53 aktivieren: die Proteinkinasen ATM und Chk2 bzw. p14/ARF

und Caseinkinase II sowie ATR. Auf diese Signalwege soll hier aber nicht näher eingegangen werden. Allen drei Wegen ist gemeinsam, dass sie die Degradierung von p53 inhibieren und das p53-Protein in hohen Konzentrationen stabilisieren. Dadurch kann das Protein seine Hauptfunktion ausführen: Es bindet im Kern an bestimmte DNA Sequenzen und aktiviert die Expression/Transkription stromabwärts gelegener Gene. Die von diesen Genen kodierten Proteine führen dann direkt oder indirekt zum Zelltod oder zur Inhibierung der Zellteilung. Wie wird nun p53 stabilisiert? Eine wichtige Rolle spielt dabei das MDM2- (murine double minute 2') Protein. Das p53-Protein bindet an die regulatorische Region des MDM2-Gens und aktiviert die Expression des MDM2-Proteins, welches wiederum an die Transaktivierungsdomäne von p53 bindet (Oliner *et al.*, 1993). Dadurch wird die Anheftung von Ubiquitinygruppen an den Carboxyterminus von p53 stimuliert und resultiert in der Degradierung von p53 (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Dies verringert die Konzentration von p53 und folglich auch die Transkription des MDM2-Gens (Abb. 1.12). Der autoregulatorische Rückkopplungsmechanismus ist damit geschlossen (Wu *et al.*, 1993). Ein weiterer Faktor, der p53 zum transkriptionellen Aktivator werden lässt, sind Änderungen der Konformation des Proteins, die durch Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung und Sumoylierung hervorgerufen werden.



**Abb. 1.12 Aktivierung und Deaktivierung des p53-Proteins**

p53 ist ein Tumorsuppressor-Phosphoprotein, welches in normalen Zellen in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Die geringe Konzentration wird von MDM2-vermittelter Ubiquitinylierung und daraus resultierender Proteolyse aufrechterhalten. Wenn die Zellen Stress wie Hypoxia und UV-Strahlung ausgesetzt sind, dann wird p53 durch Acetylierung und Phosphorylierung aktiviert, das Proteinniveau steigt an und die

Ubiquitin-abhängige Degradierung ist blockiert. Der resultierende Anstieg in der p53 Konzentration führt entweder zum Anhalten des Zellzyklus oder zur Apoptose. Die Zellzyklusarretierung erlaubt der Zelle eine Reparatur der DNA bevor die Zelle in die Mitose geht. Wenn der Schaden jedoch größer ist, dann endet die p53 Aktivierung in der Apoptose. Deshalb bietet funktionelles p53 einen protektiven Effekt gegen Tumorstadium. Mutationen im p53 Gen sind sehr häufig in verschiedenen Typen menschlicher Tumoren. Modifiziert nach [www.emdbiosciences.com/html/cbc/p53\\_apoptosis](http://www.emdbiosciences.com/html/cbc/p53_apoptosis).

Aktiviertes p53 ist ein sequenzspezifischer DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der verschiedene stromaufwärts gelegene Zielsequenzen von Genen wie z. B. p21, MDM2, GADD45 oder Bax bindet, deren Produkte als Regulatoren im Zellwachstum fungieren (El-Deiry, 1998; Ko & Prives, 1996). Das p21/WAF/Cip-Gen ist das am besten untersuchte p53-abhängige Gen (El-Deiry *et al.*, 1993). Die Expression von p53 führt in den Zellen zum Wachstumsstopp durch das Anhalten des Zellzyklus am G<sub>1</sub>- oder am G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt, um

beschädigte DNA zu reparieren. Das Stoppen am G<sub>1</sub>-Kontrollpunkt wird durch das p21/WAF1/Cip1-Gen, welches für einen Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor (CDK) kodiert und Cyclin und verschiedene Cyclin-abhängige Kinase Komplexe inhibiert, vermittelt (Bunz *et al.*, 1998). Dabei wird die Expression von p21 durch p53 kontrolliert.

Wenn ein Schaden an der DNA schwerwiegender und nicht reparabel ist, führt p53 seine alternative Funktion der Apoptoseinduktion über den Bax/Bcl-2 Signalweg aus (Symonds *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur Funktion von p53 in der Zellzyklusunterbrechung, die transkriptionsabhängig ist, wird die Apoptose von p53 sowohl transkriptionsabhängig als auch transkriptionsunabhängig induziert. Es gibt zwei Hauptwege der Apoptose: Erstens den extrinsischen, so genannten Todesrezeptor-Signalweg, der die Aktivierung der Caspase-Kaskade auslöst. Zweitens den intrinsischen, der sogenannte mitochondriale Weg, der pro-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie aktiviert und ebenfalls die Caspase-vermittelte Apoptose vermittelt (Haupt *et al.*, 2003). Die Bcl-2-Familie beinhaltet anti-apoptotische Proteine wie z. B. Bcl-Xl und Bcl-2 und pro-apoptotische Mitglieder wie z. B. Bax, Bak, Bad und Bid (Cory & Adams, 2002). Diese Proteine regulieren den Ionentransport und schützen vor Brüchen in der Membran. Die Bax Proteine sind im Zytosol sequestriert. Nach dem Eingang des apoptotischen Signals binden die Bax-Proteine an die mitochondriale Membran und bilden die ‚permeability transition pore‘, wobei eine selektive Ionenpermeabilität induziert wird. Resultierend aus den Membranänderungen werden u. a. Cytochrom c und Apoptose-induzierende Faktoren (AIF) aus dem Zwischenmembranbereich in das Zytosol abgegeben. Die AIF wandern direkt in den Zellkern und lösen eine Chromatinkondensation sowie eine nukleare Fragmentation aus. Bax wird durch p53 induziert und bildet ein Homodimer, welches in der Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Skulachev, 1998) und folgend in der Aktivierung von Caspase 9 resultiert (Adams & Cory, 1998). Cytochrom c, Caspase-9 und Apaf-1 bilden das sogenannte Apoptosom (Adams & Cory, 2002). Die Apaf-1-Expression wird ebenfalls von p53 induziert.

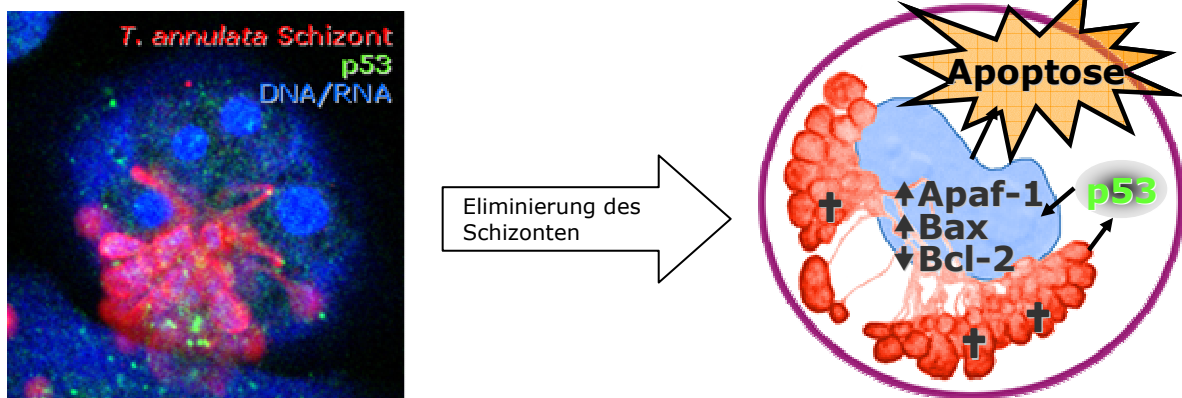
### 1.3.3.2 p53 in *Theileria annulata*-infizierten Leukozyten

Bei der Transformation von Makrophagen und B-Zellen durch *T. annulata* wird eine unkontrollierte Proliferation in den infizierten Zellen ausgelöst. Eine Besonderheit von Parasiten-infizierten Zellen, ist die Tatsache, dass sie ähnlich wie viele Tumorzellen resistent gegenüber der Aktivität von Tumorsuppressorproteinen sind. Das p53-Protein ist – wie schon beschrieben - ein solcher Tumorsuppressor. Ein Homolog des p53-Gens ist im Genom von *Theileria annulata* nicht vorhanden. Das bovine p53-Gen in *T. annulata*-transformierten Zellen liegt nicht, wie es für viele humane Tumoren beschrieben ist, mutiert vor (Haller, 2004). Haller konnte außerdem zeigen, dass p53 in enger Assoziation mit dem Parasiten in *Theileria annulata*-infizierten Zellen vorliegt (Abb. 1.13). Dies ist erstaunlich, da p53 in transformierten Zellen vor allem im Zellkern vorliegt. Dass diese Lokalisation

parasitenabhängig ist, zeigte sich in Experimenten mit dem anti-Theilerien-Medikament Buparvaquone. Nachdem der Parasit getötet wurde, konnte p53 im Zellkern der Wirtszelle nachgewiesen werden. *Theileria annulata*-Schizonten scheinen also einen Mechanismus zur Kontrolle der Lokalisation und folglich der Funktion von p53 entwickelt zu haben.

Daraufhin wurden Proteine, die den Fortschritt des Zellzyklus, die Stabilität von p53 und die Regulation der Apoptose kontrollieren, in *T. annulata*-infizierten Leukozyten untersucht. Die von p53 aktivierten und an der Zellzyklusregulation beteiligten Gene für die CdK-Inhibitoren GADD45 und Waf-1 und das Onkogen Mdm-2 zeigten eine verstärkte transkriptionelle Aktivität nach der Elimination des Schizonten.

In infizierten Zellen liegt p53 also im Zytoplasma der infizierten Zelle vor. Der p53-Apoptose-Signalweg ist demzufolge durch die Sequestrierung von p53 durch den Schizonten inhibiert. Wenn der Parasit durch Buparvaquone getötet wird, transloziert p53 in den Kern und kann dort den apoptotischen Signaltransduktionsweg auslösen. Pro-apoptotische Gene werden angeschaltet und anti-apoptotische Gene abgeschaltet. Es konnte gezeigt werden, dass die pro-apoptotischen Proteine Bax und Apaf-1 in der Zelle nach der Behandlung mit Buparvaquone vermehrt exprimiert werden. Im Gegensatz dazu ist das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in geringeren Mengen als vor der Behandlung nachweisbar. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression von Waf-1, GADD-45, Mdm-2, Apaf-1 und Bax während einer Infektion mit *T. annulata* inhibiert ist. Bcl-2 hingegen ist aktiviert und wird erst nach der Elimination des Schizonten inhibiert.



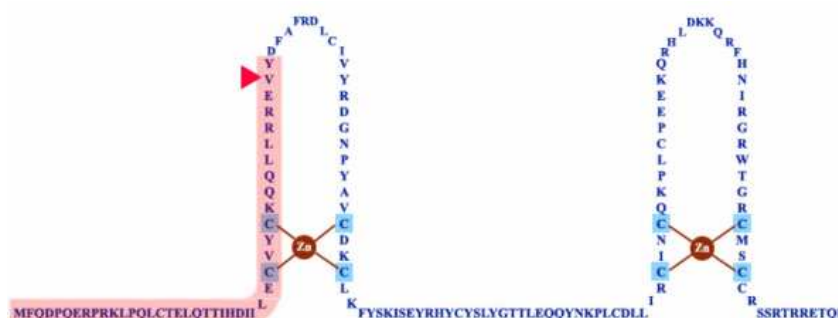
**Abb. 1.13 Rolle von p53 und p53-transaktivierten Proteinen in der Apoptose von *T. annulata*-infizierten Zellen**

p53 (grün) liegt in *T. annulata*-infizierten Leukozyten im Zytoplasma der Wirtszellen in unmittelbarer Nähe zum Schizonten (rot) vor. Proteine, die die Apoptose auslösen, werden in geringeren Konzentrationen exprimiert und Proteine, die die Apoptose inhibieren, werden verstärkt exprimiert. Die p53-abhängige Apoptose ist inhibiert. Nach der Eliminierung des Parasiten wird p53 in den Wirtszellkern transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor Gene aktiviert, die die p53-medierte Apoptose in Gang setzt. Die pro-apoptotischen Gene Bax und Apaf-1 werden hochreguliert und das anti-apoptotische Gen Bcl-2 wird herunterreguliert. Dies führt zur Auslösung der Apoptose der infizierten Zellen und zum Zelltod.

Die Ergebnisse von Haller zeigten auch, dass die Aktivität der Caspasen 3 und 7 während der Behandlung von *T. annulata*-infizierten Leukozyten mit Buparvaquone deutlich ansteigt. Bei Zellen, die zusätzlich mit Inhibitoren des p53-Signalweges inkubiert wurden, trat die Caspasen-Aktivierung erst signifikant verzögert ein.

### 1.3.3.3 Humanes Papillomvirus-E6-Protein

Ein Interaktionspartner von p53 ist das Humane Papillomvirus-E6-Protein in HPV-infizierten Zellen. Humane Papillomviren (HPV) gehören zu den unbehüllten doppelsträngigen DNA-Viren, die in über 100 verschiedenen Typen aufgeteilt werden. HPV infiziert genitale und orale Epithelzellen und verursacht in diesen Zellen ein tumorartiges Wachstum. Die genitalen HPV-Typen lassen sich in zwei verschiedene Gruppen unterteilen: die Niedrig-Risiko-(low risk)-Typen und die Hoch-Risiko-(high risk)-Typen. Zu den low-risk-Typen zählen das HPV 6 und 11, die für die Bildung von Genitalwarzen verantwortlich sind und sehr selten zu bösartigen Tumoren führen. Die high-risk-Typen wie z. B. HPV 16 und 18 verursachen Gebärmutterhalskrebs. Die high-risk-HPV 16 und 18 sind in über 90 % von Zervixkrebsfällen vorhanden. Das virale Genom wird entweder als Episom in der Wirtszelle behalten oder in das Wirtsgenom integriert. Das HPV-Genom wird in drei verschiedene Regionen eingeteilt: eine frühe Region („early region“, E), eine späte Region („late region“, L) und eine nichtkodierende lange Kontrollregion (LCR). Die E-Region kodiert für sieben nichtstrukturelle Proteine: E1 - E7, die L-Region kodiert für zwei strukturelle Proteine. Die transformierenden Eigenschaften von high-risk-HPVs sind hauptsächlich auf zwei Gene zurückzuführen, E6 und E7, die in HPV-positiven Zervixkarzinomen exprimiert werden (Schwarz *et al.*, 1985). E7 interagiert mit verschiedenen Mitgliedern der Retinoblastoma-Proteinfamilie wie z. B. pRB. Dadurch wird die Apoptose inhibiert und die Replikation der transformierten Zellen erhöht. Die einzigen Proteine, die konstitutiv exprimiert werden, sind die E6 und E7 Proteine. Das HPV-16-E6-Protein ist ein relativ kleines Protein von 151 Aminosäuren. Die E6-Proteine von verschiedenen HPV-Typen zeigen eine Aminosäurehomologie auf, wobei die auffallendste Gemeinsamkeit das Vorhandensein von vier Cys-X-X-Cys Motiven ist, die in der Lage sind, Zinkionen zu binden (Barbosa *et al.*, 1989). Das Cys-X-X-Cys Motiv (Zinkfingermotiv) spielt eine Rolle in der transkriptionellen Aktivierung, der Transformation, der Immortalisation und der Assoziation mit anderen Proteinen (Abb. 1.14).



**Abb. 1.14 Sekundärstruktur des E6-Proteins**

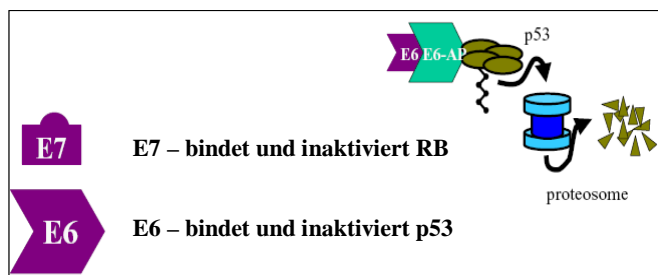
Das E6 Gen kodiert für das komplette E6 Protein und für eine verkürzte Variante von E6 (unterlegt in rosa). Zu sehen sind die beiden Zinkfinger-motive des E6-Proteins, die durch die Bindung von  $Zn^{2+}$ -Ionen an die Cysteine-reiche Region von HPV-E6 binden. (Vaeteewoottacharn *et al.*, 2005).

In den high risk HPVs existiert darüber hinaus ein C-terminales PDZ-Bindemotiv XT/SXV, welches wichtig für die Assoziation mit PDZ enthaltenden Proteinen ist (Watson *et al.*, 2003). In low-risk-HPVs fehlt diese Domäne. E6 bindet an eine Konsensussequenz der Onkoproteine, die das LXXLL-Motiv besitzen (Cooper *et al.*, 2003), was durch eine

Substitution dieser Leucine, welche die E6/E6-AP Interaktion unterbindet, gezeigt werden konnte. Für viele Interaktionspartner von E6 konnte weder das LXXLL-Motiv noch die PDZ-Domäne nachgewiesen werden, sodass anzunehmen ist, dass mindestens ein weiteres Bindungsmotiv existiert.

Die Lokalisation von E6 ist aufgrund seiner geringen Menge in der Zelle nicht eindeutig zu bestimmen (Matlashewski *et al.*, 1986). Das Protein wurde sowohl im Zellkern (Le Roux & Moroianu, 2003), im Zytoplasma als auch an Membranen des Golgi-Apparats gefunden. Auch gibt es einen Unterschied in der zellulären Lokalisation in high-risk- und low-risk-HPVs (Guccione *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass das high-risk-HPV 18 E6-Protein über die ganze Zelle verteilt ist, wohingegen low-risk-HPV 11 E6-Protein punktuell im Zellkern detektiert wurde.

Das HPV-E6-Protein ist ein Onkogen und verhindert den programmierten Zelltod (Apoptose). Das HPV-E6-Protein bindet zusammen mit dem E6-assoziierten Protein (E6-AP), welches eine E3-Ubiquitinligase-Aktivität besitzt, an das Tumorsuppressor-Protein p53. Dabei bindet weder das E6-Protein noch das E6-AP-Protein alleine an p53 (Huibregtse & Beaudenon, 1996). Das p53-Protein wird ubiquitinyliert und über das 26 S-Proteasom ATP-abhängig abgebaut (Huibregtse *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1993). Die folgende Ubiquitinylierung von p53 wird durch die N-terminale HECT-Domäne von E6-AP katalysiert (Schwarz *et al.*, 1998). Die beschriebene Bindung von E6 an E6-AP und die nachfolgende Degradierung von p53 wurde nur für high-risk-HPVs nachgewiesen (Abb. 1.15), low-risk-HPVs zeigen eine sehr geringe Degradierung von p53 (Scheffner *et al.*, 1990).



**Abb. 1.15 HPV E6 inaktiviert p53**

HPV-E6 bindet über das E6-assoziierte Protein (E6-AP) an p53 und inhibiert seine Funktion, indem es das E6-Protein ubiquitinyliert und folglich p53 über das Proteasom abgebaut wird. Das virale Onkogen HPV-E6 modifiziert den Zellzyklus so, dass die sich differenzierenden Wirtszellkeratinozyten in einem Status gehalten werden, der eine einfache Amplifikation des viralen Genoms erlaubt und folgend zu einer

späten Genexpression führt. E6 assoziiert mit dem Wirtszell-E6-AP, welches eine Ubiquitinligase-Aktivität besitzt und ubiquitinyliert p53, welches zu seiner proteosomalen Degradierung führt.

Interessanterweise ist das bovine Papillomvirus-E6-Protein (BPV-E6) nicht in der Lage, p53 zu binden und zu degradieren, obwohl die betroffenen bovinen Zellen transformiert sind. Trotzdem interagiert BPV-E6 mit E6AP, sodass anzunehmen ist, dass das Zielprotein von BPV-E6/E6-AP ein anderes als p53 sein muss.

Obwohl die Degradierung von p53 der Hauptweg ist, über den E6 die Apoptose inhibiert, sind noch zusätzliche Signalwege gefunden worden. In HPV-E6-Zelllinien (z. B. HeLa) konnte gezeigt werden, dass, wenn die E6-induzierte Degradierung von p53 blockiert ist, eine erhöhte Konzentration von p53 in den Zellen vorhanden ist. HPV-E6-Proteine sind in der Lage, die p53-vermittelte transkriptionelle Repression *in vivo* zu unterbinden, indem sie an den C-Terminus von p53 binden (Lechner *et al.*, 1992). Dabei spielt die zytoplasmatische

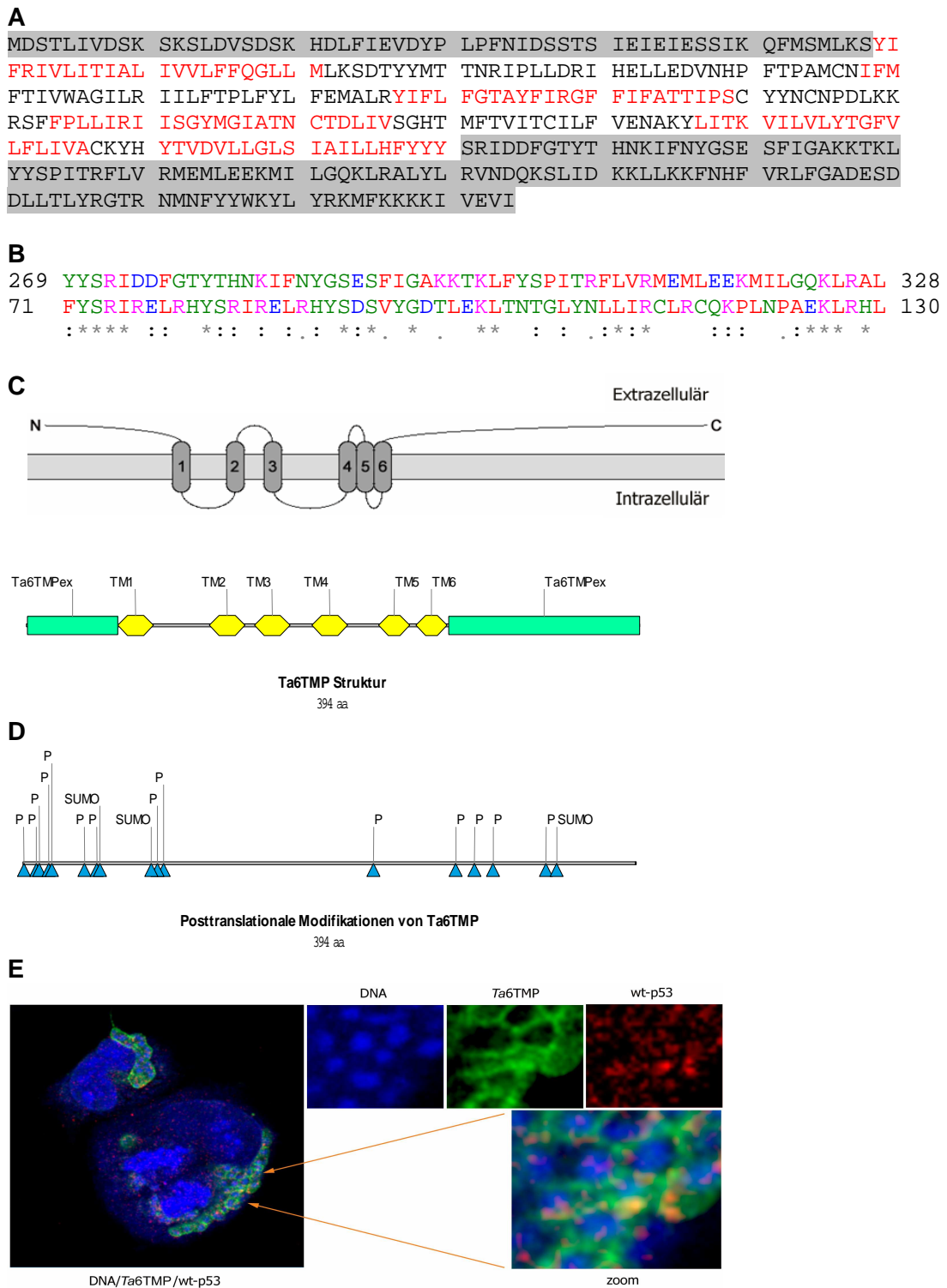
Verankerung von p53 eine Rolle, denn es konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von p53 im Zellkern blockiert ist, auch wenn die proteasomale Degradierung inhibiert ist (Mantovani & Banks, 1999). Es wird angenommen, dass die E6-vermittelte Degradierung von p53 zumindest teilweise vom nukleären Transport abhängig ist.

Die transformierenden Eigenschaften von E6 sind darüber hinaus auf andere zelluläre Zielproteine als p53 zurückzuführen. Zum Beispiel bindet HPV-16-E6 an den p53-Koaktivator p300/CBP, der in der Regulation des Zellzyklus' und der Differenzierung eine Rolle spielt, und inhibiert seine transkriptionelle Aktivität (Zimmermann *et al.*, 1999).

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass E6 auch p53-unabhängige apoptotische Signalwege inhibiert. Zum Beispiel ist Bak, ein pro-apoptotischer Faktor, durch HPV-E6 inhibiert (Thomas *et al.*, 2002). Dies gilt auch für das pro-apoptotische c-Myc-Protein, dessen Degradierung vorangetrieben wird (Kinoshita *et al.*, 1997).

#### **1.3.3.4 Ta6TMP – ein Parasitenprotein, das möglicherweise mit p53 interagiert**

Da p53 im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle in der Nähe des Schizonten lokalisiert und nach der Elimination des Parasiten in den Wirtszellkern transportiert wird, ist davon auszugehen, dass ein oder mehrere Parasitenproteine entweder direkt oder indirekt an der zytoplasmatischen Verankerung von p53 beteiligt sein müssen. Dafür kommen nur Membranproteine oder Proteine, die ins Zytoplasma der Wirtszelle sezerniert werden, in Frage. Kürzlich konnte ein Theilerienprotein identifiziert werden, welches eine Homologie zum HPV 18 E6-Protein besitzt (Abb. 1.16 B) und somit einen potentiellen p53 Bindungspartner darstellt (Haller, 2004). Die Identität zwischen HPV 18 E6 und Ta6TMP (*Theileria annulata* 6 Transmembranprotein) beträgt 68 % auf Proteinebene. Vorhersagen zu Ta6TMP zeigen ein Membranprotein aus 394 Aminosäuren und mit sechs Transmembrandomänen auf, wobei der N- und C-Terminus auf der extrazellulären Seite der Parasitenmembran liegen und somit ins Zytoplasma der Wirtszelle gerichtet sind (Abb. 1.16 C). Da Ta6TMP kein bekanntes N-terminales Signalpeptid besitzt, übernimmt gewöhnlich die erste Transmembrandomäne die Funktion der Signalsequenz (Signalankersequenz). Ta6TMP konnte mit einem polyklonalen Antikörper in der Membran des Parasiten detektiert werden. Durch konfokale Mikroskopie wurde eine partielle Kolokalisation mit p53 in der Wirtszelle gefunden (Abb. 1.16 E).



**Abb. 1.16 Physikalische und biochemische Eigenschaften von Ta6TMP**

**A** Proteinsequenz von Ta6TMP. Rote Buchstaben zeigen Transmembranhelices. Grau unterlegt sind die extrazellulären Bereiche von Ta6TMP dargestellt. **B** Homologiebereich zwischen Ta6TMP (AS 269-328) und HPV-E6 Protein. Oben ist die Aminosäuresequenz von Ta6TMP und unten die Aminosäuresequenz von HPV-E6 dargestellt. Ein Stern steht für identische Aminosäuren. Zwei Punkte stehen für Aminosäurereste mit gleichen Eigenschaften und ein Punkt für Aminosäurereste mit ähnlichen Eigenschaften. **C** Membrantopologie von Ta6TMP nach Vorhersage mit TopPred2. Proteinkarte von Ta6TMP, modifiziert nach *T. annulata* GeneDB TA10800. Die sechs Transmembranbereiche (TM1-TM6) sind gelb dargestellt. Die ins Zytosol gerichteten Domänen von Ta6TMP sind in hellgrün gezeigt. **D** vorhergesagte Posttranslationale Modifikationen von Ta6TMP. P = Phosphorylierungsstellen. SUMO = Sumoylierungsstellen. In Braun sind die N-terminale und die C-terminale Domäne von Ta6TMP dargestellt. **E** Kolokalisation von p53 und Ta6TMP in TaA288-Zellen (aus Haller, 2004). Nukleinsäure-Färbung mit Toto-3-jodid (blaues Signal), Immunfärbung gegen wt-p53 (rotes Signal) gegen Ta6TMP (grünes Signal).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Hersteller

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Biolab (Garlstorf, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco/BRL (Eggenstein, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland), Pierce (Bonn, Deutschland), Promega (Madison, USA), Riedel de Haen AG (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande; La Jolla, USA) verwendet.

Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland), Pharmacia (München, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland), bezogen. In allen der unten beschriebenen molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden wurden sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

Sterile Materialien für die Zellkultur und andere Verbrauchsmaterialien wurden bezogen von folgenden Firmen: Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Greiner (Frickhausen, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Biozym (Hessisch-Oldendorf, Deutschland).

#### 2.1.1 Antiseren und Antikörper

Spezifität	Antigen	Klon	Spezies	Hersteller, Land
RGS-His	RGSHHHHHH (AS-Sequenz)		Maus	Qiagen, Hilden, Deutschland
anti- $\alpha$ -Tubulin	Kükengehirn-Tubulin	DM1A	Maus	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
p53		PAb1620	Maus	Calbiochem, San Diego, USA
p53	AS1 - AS 393	FL-393	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
p53		DO-7	Maus	BD Pharmingen, San Diego, USA
TaSP	zytoplasmatische Domäne AS 26 - AS 156	rekombinantes Protein	Kaninchen	TaSP teilsequenziert (Schnittger <i>et al.</i> 2002)
Oberflächen- protein	<i>T. annulata</i> Schizont	1C7	Maus	Andy Tait, Universität Glasgow, England (Shiels <i>et al.</i> , 1986)
PIM	„polymorphic immunodominant antigen“ aus <i>T. parva</i>		Maus	Dirk Geysen, Institut für Tropische Medizin, Antwerpen, Belgien
clone-5	AS 408 - AS 421	clone-5	Kaninchen	(Bakheit <i>et al.</i> , 2006)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein	JL-8	Maus	Clontech, Mountain View, USA
GST	Glutathione-S- Transferase [ <i>Schistosoma japonicum</i> ]		Ziege	Rockland Inc., Gilbertsville, USA

Tab. 2.1 Primärantikörper

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller, Land
Anti-Maus-IgG, Alexa 488/546/568- konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Anti-Kaninchen-IgG, Alexa 488/546/568- konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus-IgG, AP-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller, Land
Anti-Ziege-IgG, AP-konjugiert	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti-Rind-IgG, HRP-konjugiert	Kaninchen	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Tab. 2.2 Sekundärantikörper

## 2.1.2 Enzyme

### 2.1.2.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
<i>Pst I</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Hind III</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Sal I</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Xho I</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Sph I</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Sac I</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Kpn I</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2.3 Restriktionsenzyme

### 2.1.2.2 Polymerasen, modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, Karlsruhe, Deutschland
Platinum Pfx-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
RNase A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2.4 Andere Enzyme

### 2.1.3 Molekulargewichtsstandards

Als DNA-Standard wurden der ‚MassRuler™ DNA Ladder mix‘ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und der ‚peqGOLD DNA-Leiter Mix‘ von Peqlab (Erlangen, Deutschland) verwendet. Als Protein-Standards dienten der ‚SeaBlue Plus 2‘ von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), die ‚PageRuler™ Unstained Protein Ladder‘ und die ‚PageRuler™ Prestained Protein Ladder‘ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

### 2.1.4 Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
QIAprep Spin Kit	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Kulturen	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR- und Restriktionsreaktionen	Qiagen, Hilden, Deutschland
MinElute Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Puregene DNA Isolation Kit	Isolierung von genomischer DNA	Genra Systems, Minneapolis, USA
Puregene Total RNA Isolation Kit	Isolierung von Gesamt-RNA	Genra Systems, Minneapolis, USA
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription von RNA	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR Cloning Kit	Klonierung von PCR-Produkten	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi Plus	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Kulturen	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoTrap mRNA Mini Kit	Isolierung von mRNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Kit	Verwendung	Hersteller
DNase I Amplification Grade Kit	Restriktion von DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ProFound Pull Down GST-Protein:Protein Interaction Kit	Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen	Pierce, Bonn, Deutschland

Tab. 2.5 Kommerzielle Kits

### 2.1.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> [°C]	Verwendungszweck
pEGFPC1for	GAT CAC TCT CGG CAT GGA C	59	Sequenzierung
pEGFPC1rev	CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GG	57	Sequenzierung
G-TaE6-F	CAC CAT GGA CTC CAC TTT GAT TGT TGA	63	Klonierung
G-TaE6-R	TTA TAT GAC TTC AAC TAT TTT CTT CTT CTT GA	59	Klonierung
G-TaE6-R ohne Stoppcodon	TAT GAC TCC AAC TAT TTT CTT CTT CTT GAA	60	Klonierung
G3-Ta6TMP-F	CAC CAT GGA CTC CAC TTT GA	57	Klonierung
G3-Ta6TMP-R	TTA TAT GAC TTC AAC TAT TTT CTT CTT CTT G	59	Klonierung
Ta6TMPcons_s1	TGT ACG GAC TTA ATT GTG TCA	54	Klonierung
Ta6TMPcons_s2	TGT ACG GAC TTA ATT GTG	49	Klonierung
Ta6TMPcons_as1	AAC ATC CAC TGT GTA ATG	49	Klonierung
Ta6TMPcons_as2	TAA AAC ATC CAC TGT GTA ATG	52	Klonierung
Ta6TMP-BamHI-for	GAA CTG GAT CAT GGA CTC CAC TTT	61	Klonierung
Ta6TMP-PstI-stopp-rev	CGA ACC TGC AGT TAT ATG ACT TCA ACT ATT TTC T	65	Klonierung
T.parva 299-317F	TTC ATG AAC TTT TGG AAG	47	Sequenzierung
T.parva 745-765R	ACA TCC ACT GTG TAA TGA TAT	52	Sequenzierung
T.parva 745-765F	ATA TCA TTA CAC AGT GGA TGT	52	Sequenzierung
T.p. 1065-1084 R	ATC ATC AGA TTC ATC TGC GC	55	Sequenzierung
TaSPex_Sall_F	GTC GAC GAT CGA CAA CTT AAT CCT AT	62	Klonierung
TaSPex_stBamHI_R	GGA TCC TTA ACC GTC AGA GTC ATA ATC AT	64	Klonierung
T.p. 299-317 R	CTT CCA AAA GTT CAT GAA	47	
M13 uni (-21)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	54	Sequenzierung
M13 rev (-29)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	54	Sequenzierung
M13 uni (-43)	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	62	Sequenzierung
M13 rev (-49)	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	61	Sequenzierung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53	Sequenzierung
pQE for	GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T	55	Sequenzierung
pQE rev	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG	59	Sequenzierung
pEGFPN1for	GTC GTA ACA ACT CCG CCC	58	Sequenzierung
pEGFPN1rev	GTC CAG CTC GAC CAG GAT G	61	Sequenzierung
D24_p53_r	CCTCAAGACCCGTTTAGAGG	59	Sequenzierung
Ta6TMP1-62 for	ATG GAC TCC ACT TTG ATT GT	53	Klonierung
Ta6TMP1-62 rev	CCT AAA TAT ATA GCT TTT AA	45	Klonierung
Ta6TMP272-394 for	AGA ATT GAC GAT TTC GGG AC	55	Klonierung
Ta6TMP272-394 rev	TAT GAC TTC AAC TAT TTT CT	47	Klonierung
Ta6TMP 188-333 F	ATT AGG ATA ATC TCA GGT TA	49	Klonierung
Ta6TMP 188-333 R	TTA AGG TAC AAT GCC CTC AA	53	Klonierung
T.p_hom_atg_f	ATG AAC TCC TCT TTG ATA CTT	52	Sequenzierung
T.p_hom_taa_r	TTA TAT AAC CTC TAC TAT CTT	48	Sequenzierung
Brady-Primer	CAT GTC GTC CAG GCC GCT CTG GGA CAA AAT ATG AAT TCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T	42	Sequenzierung
TaSPex_F	GAT CGA CAA CTT AAT CCT AT	51	Klonierung

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> [°C]	Verwendungszweck
TaSPex_R	TTA CCG TCA GAG TCA TAA TC	53	Klonierung
TaSPunsp_R	CAA TGT TAG AGC GTA TTG CC	55	PCR
TaSPex_mST_R	TTA ACC GTC AGA GTC ATA ATC	54	Klonierung
TaSPex_mST2_R	TTA ACC GTC AGA GTC ATA ATC AT	55	Klonierung
TaSPex_XhoI_F	CTC GAG GAT CGA CAA CTT AAT CCT	61	Klonierung
TaSPex_PstI_R	CTG CAG TTA ACC GTC AGA GTC ATA	61	Klonierung
Tp_538-558_F	AAG AGA TCC TTC TTC CCA CT	55	Sequenzierung
Tp_538-558_R	AGT GGG AAG AAG GAT CTC TT	55	Sequenzierung
TaSPex_Sall_F	GTC GAC GAT CGA CAA CTT AAT CCT AT	62	Klonierung
TaSPex_stBamHI_R	GGA TCC TTA ACC GTC AGA GTC ATA ATC AT	64	Klonierung
EGPPC1_for	CTC CAC CCC ATT GAC GTC AA	59	Sequenzierung
EGFPC1_rev	CTG TAA ACA TTG TGT GG CCT	55	Sequenzierung
T.p. 299-317 R	CTT CCA AAA GTT CAT GAA	47	Sequenzierung

Tab. 2.6 Primer zur Klonierung und Sequenzierung

### 2.1.6 Plasmide

Bezeichnung	Wichtige genetische Marker, Konstruktion	Verwendung	Hersteller
pDrive	T7, SP6 und Phage f1 Promotoren; Marker Amp <sup>r</sup> / Kana <sup>r</sup> ; Lac Operon; M13 reverse / M13 forward (-20;-40) Primer-Bindungsstelle	Klonierung und Sequenzierung	Qiagen, Hilden, Deutschland
pQE30 pQE31 pQE32	Phage T5 Promotor; Marker Amp <sup>r</sup> ; Lac Operon, kodierend für N-terminales 6x Histidin	Prokaryotische Expression	Qiagen, Hilden, Deutschland
pENTR/SD/D-TOPO	Marker Kana <sup>r</sup> ; attL1 und attL2 Rekombinationsstelle; TOPO Eintrittssequenz; Shine-Dalgarno-Sequenz; pUC origin; M13 reverse Primer-Bindungsstelle	Klonierung und Sequenzierung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pEGFP-C1	pUC ori; SV40 Promotor; Marker Kana <sup>r</sup> ; Neo <sup>r</sup>	Eukaryotische Expression	Clontech, Mountain View, USA
pEGFP-N3	pUC ori; SV40 Promotor; Marker Kana <sup>r</sup> ; Neo <sup>r</sup>	Eukaryotische Expression	Clontech, Mountain View, USA
pDEST24	CMV, T7, SV40, bla Promotor; pUC ori; Marker Neo <sup>r</sup> / Chl <sup>r</sup> ; attR1 und attR2 Rekombinationsstelle; ccdB Todesgen; Glutathion-S-Transferase-(GST) Tag;	Prokaryotische Expression	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pDEST40	T7, CMV, SV40 Promotor; pUC ori; Marker Amp <sup>r</sup> / Neo <sup>r</sup> / Chl <sup>r</sup> ; attR1 und attR2 Rekombinationsstelle; ccdB Todesgen; kodierend für C-terminales V5-Epitop und 6x-Histidin	Eukaryotische Expression	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2.7 Plasmide

### 2.1.7 Klone

Klone, die nicht selbst hergestellt wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Bezeichnung	Wichtige genetische Marker	Verwendung	Quelle
pDrive_TaSP Klon 4	Amp <sup>r</sup> / Kana <sup>r</sup> ; M13 reverse / M13 forward (-20;-40) Primer-Bindungsstelle	Subklonierung	Schnittger <i>et al.</i> , 2002
pQE30_TaSP Klon 7	Amp <sup>r</sup> ; kodierend für N-terminales 6x Histidin	Expression	Schnittger <i>et al.</i> , 2002
pDrive_Ta6TMP	Amp <sup>r</sup> / Kana <sup>r</sup> ; M13 reverse / M13 forward (-20;-40) Primer-Bindungsstelle	Subklonierung	Haller, 2004

Bezeichnung	Wichtige genetische Marker	Verwendung	Quelle
pDEST24_bovp53 Klon 2/3	Neo <sup>r</sup> / Chl <sup>r</sup> ; Glutathion-S-Transferase- (GST) Tag	Expression	Haller, 2004

Tab. 2.8 Verwendete Klone

### 2.1.8 Bakterienstämme

Für die Klonierung von DNA-Konstrukten und zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden folgende *E. coli* Stämme eingesetzt.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Hersteller
EZ	[F <sup>+</sup> ::Tn10(Tcr) <i>proA+B+ lacIqZΔM15</i> ], <i>recA1 end A1 hsdR17</i> ( <i>rK12- mK12+</i> ) <i>lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
M15	<i>Nals Strs rifSs, lac- ara- gal- mtl- F- recA+ uvr+</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
DH5α	<i>supE44 ΔlacU 169(φ80lacZ ΔM15) hsd R17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOP10	<i>F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR</i> <i>recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λc I ts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Novagen, Gibbstown, NJ, USA
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-</i> <i>F [proAB+ lacIq lacZDM15 Tn 10(tetr)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
BL21-AI™	<i>F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA--</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2.9 Genotypen der verwendete Bakterienstämme

### 2.1.9 Zelllinien

Folgende Säugetierzelllinien wurden verwendet. Dabei handelte es sich vorwiegend um Theilerien-infizierte bovine und ovine Zelllinien.

Erreger	Stamm	Nr. des Tieres	Bezeichnung der Zelllinie	Referenz
<i>T. annulata</i>	Ankara	288	<i>TaA288</i>	Ahmed, FU Berlin
<i>T. annulata</i>	Ankara	346	<i>TaA346</i>	Ahmed, FU Berlin
<i>T. parva</i>	Mugguga	803	<i>TpM803</i>	Emery <i>et al.</i> , 1981
<i>T. lestoquardi</i>	Atbara	-	<i>T. lestoquardi</i>	Bakheit, Central Veterinary Research Laboratory, Soba, Sudan

Tab. 2.10 Bovine und ovine Zelllinien

Andere verwendete Säugetierzelllinien:

Name	Eigenschaften	Referenz
COS-7	Die Zelllinie COS-7 wurde 1981 aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) gewonnen. Die Zellen (Fibroblasten) wurden stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert.	Gluzman <i>et al.</i> , 1981
CHO-K1	Die Zelllinie CHO-K1 wurde aus einer adulten Ovarien-Primärkultur (Epithelzellen) eines chinesischen Hamsters gewonnen und subkloniert.	Puck <i>et al.</i> , 1958
HEK-293	Die Zelllinie HEK293 wurde aus einer humanen, embryonalen Nieren-Primärkultur (Epithelzellen) gewonnen und durch Adenoviren des Typ 5 transformiert.	Graham <i>et al.</i> , 1977
HeLa	Diese Zelllinie (Epithelzellen) wurde 1951 aus einem Gebärmutterhalskarzinom einer 31 Jahre alten Frau Henrietta Lacks etabliert.	Scherer <i>et al.</i> , 1957
A-549	Diese Zelllinie (Epithelzellen) wurde 1972 aus einem Lungentumor eines 58 Jahre alten Mannes etabliert.	Giard <i>et al.</i> , 1973
HL60	Diese Zelllinie wurde 1976 aus den Blutzellen einer 35 Jahre alten Frau mit einer myeloischen Leukemie (AML FAB M2) etabliert.	Collins <i>et al.</i> , 1977

Name	Eigenschaften	Referenz
MDBK	Zellen stammen von der Niere eines Stiers (1957).	Madin <i>et al.</i> , 1958
CCRF-CEM	Die Zelllinie wurde aus dem Blut eines 3-Jahre alten Mädchens mit akuter Leukämie im Jahre 1964 etabliert (T-Zelllinie).	Foley <i>et al.</i> , 1965

Tab. 2.11 Säugetierzelllinien

### 2.1.9.1 Kulturmedien für die eukaryotische Zellkultur

Die Zellkulturmedien RPMI-1640, Ham's F-12 und DMEM wurden von der Firma PAA (Pasching, Österreich) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die Zusätze wurden separat und steril hinzugefügt. Dazu zählten fötales Kälberserum, 10000 U/10000 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 200 mM L-Glutamin (alle von Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Für die Trypsinierung von einzelnen Zelllinien wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Die adhärenz *Theileria*-infizierten Zelllinien wurden mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) geerntet.

Zelllinie	Medium	Subkultivierung	DMSZ-Nummer
TaA288 (adhärent)	88 % RPMI 1640, 10 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	mit Zellschaber abschaben	-
TaA346 (adhärent)	88 % RPMI 1640, 10 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	mit Zellschaber abschaben	-
TpM803 (in Suspension)	78 % RPMI 1640, 20 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	Zentrifugation	-
<i>T. lestoquardi</i> [Atbara] (in Suspension)	78 % RPMI 1640, 20 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	Zentrifugation	-
COS-7 (adhärent)	88 % DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	Trypsinierung	ACC 60
CHO-K1 (adhärent)	88 % Ham's F-12, 10 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	Trypsinierung	ACC 110
HEK-293 (adhärent)	88 % DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	Trypsinierung	ACC 305
HeLa (adhärent)	88 % DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen /Strep, 1 % L-Glutamin	Trypsinierung	ACC 57

Tab. 2.12 Kulturmedien für verwendete Zelllinien

### 2.1.9.2 Kulturmedien für die prokaryotische Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank HLB2472 (Heraeus Instrumente, Osterode, Deutschland) durchgeführt.

Wenn nicht anders beschrieben, wurde zur Herstellung der Puffer und Medien deionisiertes Wasser verwendet.

#### Luria-Bertani-(LB) Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

1 % (w/v) Pepton/Trypton (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1 % (w/v) NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

pH 7,5 mit NaOH

Zur Herstellung von Festmedienplatten wurden 1,2 % (w/v) Agar hinzugesetzt und bei 121 °C 20 min autoklaviert. Zur Selektion auf Kanamycin- bzw. Ampicillinresistenz (bzw. Carbenicillinresistenz) wurden nach dem Abkühlen optional das entsprechende Antibiotikum steril hinzugefügt.

### 2.1.9.3 Kulturführung von *E. coli* - Zellen

Die Stämme wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Festmedium bei 37 °C kultiviert. Zur Selektion auf die Antibiotikaresistenz der Plasmide wurde den nach dem Autoklavieren auf 50 °C abgekühlten Medien entsprechend Antibiotika zugesetzt:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Kanamycin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	20 µg/ml

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml

**Tab. 2.13** Verwendete Antibiotikakonzentrationen

Die Stammlösungen wurden nach dem Ansetzen durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Zum Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen wurde der Bakterienstamm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 (exponentielle Phase) angezogen. 500 µl Kultur wurden mit 500 µl sterilem 87 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von bovinen und ovinen *Theileria*-infizierten Leukozyten

*Theileria annulata*-infizierte Zellen (Tab. 2.10, S. 38) wurden in 25 cm<sup>2</sup>-, 75 cm<sup>2</sup>- oder 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI-1640-Medium (PAA, Pasching, Österreich) mit den Zusätzen 10 % hitzeinaktiviertes FKS (fötales Kälberserum, Biochrom, Berlin, Deutschland), 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland) in einem Inkubator (LaminAIR® Heraeus Instrumente, Osterode, Deutschland) kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurden die adhärennten Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vom Boden der Flaschen gelöst, in ein 50 ml Röhrchen (Cellstar, Greiner, Essen, Deutschland) überführt und bei 1200 g für 5 min zentrifugiert (Heraeus Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt (2.2.1.3, S. 40) und in einer Dichte von 6 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml in neue Kulturflaschen (10 ml Medium für 25 cm<sup>2</sup>-, 20 ml für 75 cm<sup>2</sup>- oder 40 ml für 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen) überführt. Die Kultivierung von *T. parva*- und *T. lestoquardi*-infizierten Zellen wurde wie oben beschrieben in Kompletmedium mit 20 % FKS durchgeführt, wobei diese Zellen in Suspension wachsen. Die Kompletmedien sind in Tab. 2.12 (S. 39) aufgeführt.

#### PBS für Zellkultur:

145 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
 6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 18 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

#### 2.2.1.2 Kultivierung von HeLa-, COS-7-, HEK-293- und CHO-K1-Zellen

Adhärennt wachsende Zellen (Tab. 2.11, S. 39) wurden bei Erreichen von 70 % bis 90 % Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium (2.1.9.1, S. 39) abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und je nach Flaschengröße mit 1-3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland; 0,5 % [w/v] Trypsin; 0,2 % [w/v] EDTA in PBS) bedeckt. Nach 3-5 min Inkubation im Brutschrank wurde das Ablösen der Zellen mikroskopisch überprüft. Waren die Zellen vollständig abgelöst, wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von DMEM-Kulturmedium gestoppt. HEK-293-Zellen wurden durch einfaches Abspülen mit PBS von der Kulturflasche abgelöst. Sie wurden wie unter 2.2.1.1 (S. 40) weiterbehandelt.

Je nach Zelldichte und Teilungsrate wurden die Zellen in einem Teilungsverhältnis von 1:5-1:12 ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden mit einem der Flaschengröße adäquaten Volumen (5-30 ml) DMEM-Kulturmedium versehen und resuspendiert. Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### 2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Quantifizierung wurden die Zellen nach dem Waschen in 10 ml PBS (145 mM NaCl, 6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 18 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 6 H<sub>2</sub>O) aufgenommen und resuspendiert. Dann wurden 10 µl der Suspension abgenommen und in 190 µl Trypanblau-Arbeitslösung (0,5% [w/v] Trypanblau [Biochrom AG, Berlin, Deutschland] 1:3 mit PBS verdünnt) verdünnt. Aus dieser Lösung wurden wiederum 10 µl abgenommen, in eine Neubauer-Kammer (Brand, Wertheim, Deutschland) pipettiert, und unter einem Durchlicht-Mikroskop (Hund, Wetzlar, Deutschland) vier Großquadrate ausgezählt.

Die Anzahl der Zellen/ml ergab sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\sum \text{der Zellen von 4 Großquadraten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

#### 2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden Zellen bei  $-196\text{ °C}$  über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und das erhaltene Pellet mit Einfriermedium (9 Teile FKS und 1 Teil DMSO [Serva, Heidelberg, Deutschland]) auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt und 1 h auf Eis vorgekühlt, bevor es mit Zellstoff umwickelt zunächst ÜN bei  $-70\text{ °C}$  und dann über flüssigem Stickstoff gelagert wurde.

#### 2.2.1.5 Herstellung von Zelllysaten von infizierten Zellen

Um Proteinextrakte aus *Theileria annulata*-infizierten Leukozyten zu gewinnen, wurden tiefgefrorene oder frische Zellen in 500 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und 10 x 15 s mit jeweils 15 s Pause auf Eis mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 250 mit Microtip, Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland; Ausgangsleistung 150 W bei 50 W, 30 % Ausgangsleistungskontrolle). Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 14000 g und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert (Biofuge 28 RS; Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (2.2.3.9, S.56).

#### 2.2.1.6 Behandlung von *T. annulata*-infizierten Zellen mit Buparvaquone (BW720c)

*T. annulata*-infizierte Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.1.1 (S.40) beschrieben kultiviert und nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640-Medium auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Um die Parasiten abzutöten, wurde das Medikament Buparvaquone (Wellcome Research Laboratories, Kent, U.K.) eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in RPMI-Komplettmedium mit 0,05 µg/ml Buparvaquone (Stammlösung: 1 mg Buparvaquone in 1 ml Ethanol) für maximal fünf Tage im Brutschrank kultiviert ( $37\text{ °C}$ , 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>). Um zu überprüfen, ob die Behandlung erfolgreich war, wurde mit einem Teil der Zellen eine Giemsa-Färbung (2.2.1.11, S.42) durchgeführt.

#### 2.2.1.7 Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Es wurden Objektträger mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$ , abhängig von der verwendeten Zelllinie und Zellgröße, vorbereitet.

Die benötigte Anzahl von Zellen wurde zweimal mit PBS gewaschen, auf  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und in 10 % (w/v) BSA/PBS (bovines Serumalbumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) aufgenommen. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden dann in einer Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon, Pittsburgh, USA) mit 50 g für 10 min auf einen Objektträger (Superfrost® Plus, Omnilab, Bremen, Deutschland) zentrifugiert. Die Objektträger wurden dann ÜN bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei  $-70\text{ °C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.1.8 Herstellung von mit Zellen bewachsenen Objektträgern

Da *Theileria annulata*-infizierte Leukozyten sich für Wachstumsprozesse an eine Matrix anheften müssen (adhärieren), können sie direkt auf Objektträgern kultiviert werden. Dadurch bleiben dreidimensionale Zellstrukturen für Protein-Protein-Interaktionsanalysen erhalten. Zur Herstellung der Präparate wurden je fünf sterile Superfrost-Objektträger in 225 cm<sup>2</sup>-Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gelegt, und mit 30 ml RPMI 1640 Komplettmedium überschichtet. Es wurden  $2 \times 10^7$  Zellen ins Medium pipettiert, und diese bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte (2-3 Tage) im Brutschrank kultiviert. Die Objektträger wurden dann vorsichtig in PBS gewaschen und anschließend 10 min in 2 % Formaldehyd (PFA, Merck, Darmstadt) in PBS bei Raumtemperatur bzw. für 3 min in Methanol bei  $-25\text{ °C}$  fixiert. Nach zwei weiteren einminütigen Waschschrritten mit PBS in einer 50 ml-Küvette wurden die Präparate mit 80 % (v/v) Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS eingedeckelt und zur späteren Verwendung bei  $-70\text{ °C}$  gelagert. Nach der Methanol-Fixierung wurden die Objektträger 3 x 5 min bei Raumtemperatur zur Rehydrierung der Zellen in PBS inkubiert. Für die Tubulin-Färbung wurden die Zellen vorher mit Mikrotubuli-stabilisierenden bzw. -destabilisierenden Reagenzien behandelt (2.2.1.9, S. 42).

### 2.2.1.9 Behandlung der Zellen mit Mikrotubuli-interagierenden Reagenzien

Um die Mikrotubuli der Zellen zu depolymerisieren, wurden die auf Objektträgern kultivierten Zellen mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Nocodazol behandelt. Nocodazol gehört zu der Gruppe der „Colchicine-seitbinder“, die mit Tubulin-Dimeren interagieren und so eine Polymerisation verhindern (Hoebeker *et al.* 1976). Nocodazol bindet an  $\beta$ -Tubulin und verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Heterodimeren von Tubulin. Die Zellen wurden für 1 - 16 h mit 10  $\mu$ M - 40  $\mu$ M Nocodazol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), gelöst in DMSO, kultiviert, direkt in der Schale vorsichtig mit PBS gewaschen und fixiert.

Paclitaxel (Taxol) hingegen ist ein Pflanzengift, welches die Assemblierung der Mikrotubuli begünstigt. Taxol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde in Konzentrationen von 10  $\mu$ M - 50  $\mu$ M, gelöst in DMSO, eingesetzt und für 1 h - 16 h mit den Zellen zusammen inkubiert.

### 2.2.1.10 Isolierung von Schizonten aus *T. annulata*-infizierten Zellen

Für die Aufreinigung von Schizonten aus *T. annulata*-infizierten Leukozyten wurde ein modifiziertes Protokoll nach Baumgartner *et al.* (1999) verwendet. Das Prinzip der Isolierung beruht auf der Zellyse der infizierten Zellen durch das bakterielle Toxin Aerolysin unter Ausnutzung der Zerstörung der Mikrotubuli der Wirtszelle durch den Mikrotubuli-Inhibitor Nocodazol.

Während der Isolierung wurde auf Eis und unter sterilen Bedingungen mit steriltfiltrierten Lösungen gearbeitet.

Die *T. annulata*-infizierte Zelllinie A288 wurde in RPMI 1640-Komplettmedium mit 40  $\mu$ M Nocodazol (Methyl-[5-(2-thienyl-carbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]-carbamate; Sigma, Deisenhofen; gelöst in DMSO) für 16 h kultiviert.

Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.1 (S. 40) beschrieben 2 x mit PBS gewaschen und 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen ( $5 \times 10^7$ ) wurden in 1 ml eiskaltem 1 x HEPES-CaCl<sub>2</sub> (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) aufgenommen. Proaerolysin (Protox Biotech, Victoria, BC, Kanada), gelöst in PBS, wurde in einer Arbeitskonzentration von 15  $\mu$ g/ml hinzugefügt, und die Zellen wurden 30 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, damit Proaerolysin an die Zelloberfläche binden konnte.

Die Zellen wurden dann 2 x mit eiskaltem 1 x HEPES-CaCl<sub>2</sub> gewaschen (300 g, 4 °C, 5 min), um nichtgebundenes Proaerolysin zu entfernen. Um die Zellen zu lysieren, wurde das nach dem Waschen erhaltene Pellet in 2 ml 1 x HEPES-EDTA (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM KCl, 5 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert und 15 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Für eine vollständige Lyse wurden die Zellen zusätzlich mit einer Kanüle (0,6 mm) 3 x auf- und abgezogen.

Die endgültige Trennung der Schizonten von den Wirtszellbestandteilen erfolgte mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Dazu wurden 1 ml der lysierten Zellen in 3,8 ml 85 % Percoll in 1 x HEPES-EDTA (Dichte  $1,13 \pm 0,005$  g/ml; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aufgenommen, auf 5 ml mit 1 x HEPES-EDTA aufgefüllt und in ein Zentrifugenröhrchen (14 x 95 mm, Beckman Coulter, USA) gefüllt. Dies ergab eine Endkonzentration an Percoll von 64,5 %. Die 5 ml Percoll/Lysat-Mischung wurde mit 7 ml 45 % Percoll in 1 x HEPES-EDTA vorsichtig überschichtet und 30 min bei 12 °C und 85000 g in einer Ultrazentrifuge (Beckmann L7-65 mit SW40T-Rotor; Beckmann, München, Deutschland) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten die Schizonten vorsichtig aus der gebildeten Interphase zwischen den beiden Percollgradienten mit einer Pipette entfernt werden und 2 x mit PBS bei 2500 g und 4 °C für 5 min gewaschen werden. Von den aufgereinigten Schizonten wurden Zytozentrifugenpräparate (2.2.1.7, S. 41) hergestellt, die bei -70 °C gelagert wurden oder sofort für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt wurden.

Zur Überprüfung von Reinheit und Qualität der Schizontenisolierung wurde direkt nach der Isolierung eine Giemsa-Färbung (2.2.1.11, S. 42) angeschlossen.

### 2.2.1.11 Giemsa-Färbung

Der Giemsa-Farbstoff (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) färbt Nukleinsäuren spezifisch rot an, wohingegen das Zytoplasma blau erscheint. Somit können die Schizontenzellkerne sehr gut sichtbar gemacht werden. Fixiert und gewaschen wurde in Färbetrögen von Hellendahl (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland).

Zytozentrifugenpräparate (2.2.1.7, S. 41) wurden von den Zellen (infizierte *Theileria*-Zellen oder isolierte Schizonten) angefertigt (2.2.1.7, S. 41), getrocknet und 5 min in eiskaltem Aceton (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Die luftgetrockneten Präparate wurden für 30 - 60 min in 0,4 % (w/v) Giemsalösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1:20 verdünnt in Weise-Puffer (0,63 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,31 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2; Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Danach wurden die Objektträger mehrmals mit Leitungswasser gewaschen und unter einem Lichtmikroskop (Leitz GmbH, Oberkochen, Deutschland) mit Immersionsöl und 100 x Vergrößerung/Objektiv ausgewertet.

### 2.2.1.12 Transiente Transfektion von Säugerzellen

#### Transiente Transfektion mittels TransPEI

Die Transfektion wurde nach einem Protokoll des Herstellers von TransPEI (Eurogentec, Seraing, Belgien) durchgeführt.

Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.2 (S. 40) beschrieben, kultiviert. Die adhärenen Zellen wurden laut Tab. 2.14 (S. 43) in der entsprechenden Dichte und in das entsprechende Kulturgefäß ausgesät. Für eine anschließende Immunfluoreszenzfärbung wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Komplettmedium in Petrischalen mit Glasboden (MatTek Corporation, Ashland, USA) ausgesät und 16 h bis 24 h kultiviert bis sie 50 % - 60 % konfluent waren. Für die Transfektion wurden 2 µg cDNA und 8 µl TransPEI in einem N/P-Verhältnis von 5 (N/P ist das Verhältnis der Stickstoffgruppen von TransPEI zu den Phosphatgruppen der DNA) separat in je 100 µl 150 mM NaCl verdünnt und gut gemischt. Das verdünnte TransPEI-Reagenz wurde zur DNA-Lösung gegeben, gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der gebildete TransPEI/DNA-Komplex wurde dann tropfenweise zu den Zellen in die Petrischale gegeben, kurz geschüttelt und bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h bis 48 h inkubiert. Die Expression des EGFP-Fusionsproteins wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan) verfolgt. Danach wurde die Reaktion gestoppt und die transfizierten Zellen unterschiedlich weiterbehandelt. Entweder wurden sie fixiert und gefärbt (2.2.1.13, S. 44), eine Expressionsanalyse mittels Western blot (2.2.3.5, S. 54 und 2.2.3.7, S. 54) durchgeführt oder einer Koimmunpräzipitation (2.2.3.14, S. 59) unterzogen.

Kulturgefäß	Auszusäende Zellzahl	Medien-Volumen [ml]	DNA-Menge [µg]	DNA-Verd. (NaCl) [µl]	Trans-PEI [µl]	Gesamt-volumen [µl]
6-well-(d = 3 cm)-Platten oder MatTek-Schälchen	$2 - 4 \times 10^5$	2 - 4	2 - 4	100	8	200
25 cm <sup>2</sup>	$4 - 8 \times 10^5$	5 - 10	5	250	10	500
75 cm <sup>2</sup>	$1 - 2 \times 10^6$	10 - 20	7 - 8	500	14 - 16	1000
175 cm <sup>2</sup>	$2 - 5 \times 10^6$	20 - 40	10 - 12	1000	20 - 24	2000

Tab. 2.14 Pipettierschema für die Transfektion mittels TransPEI

#### Transiente Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000

Hierzu wurden adhärenen Säugerzellen in Kulturgefäßen in DMEM-Komplettmedium bzw. HAM's F-12-Komplettmedium unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % kultiviert.

Vor der Transfektion wurde das Medium durch serum- und antibiotikafreies Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden pro 3 cm-Petrischale mit Glasboden (MatTek Corporation, Ashland, USA) 1 - 2 µg gereinigte Plasmid-DNA und 2,5 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) jeweils in 250 µl serumfreiem Medium verdünnt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lipofectamine™ 2000™-Lösung und die DNA-Lösung vereint und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese für 16 h bis 48 h bei 37 °C inkubiert.

Kulturgefäß	Auszusäende Zellzahl	Medien-Volumen [ml]	DNA-Menge [µg]	DNA-Verd. (NaCl) [µl]	Lipofect-amine 2000 [µl]	Gesamt-volumen [ml]
6-well-(d = 3 cm)-Platten o. MatTek-Schälchen	$2 - 4 \times 10^5$	2 - 4	4	250	10	0,5
25 cm <sup>2</sup>	$4 - 8 \times 10^5$	5 - 10	8	500	20	1
75 cm <sup>2</sup>	$1 - 2 \times 10^6$	10 - 20	24	1500	60	3
175 cm <sup>2</sup>	$2 - 5 \times 10^6$	20 - 40	56	3500	140	7

Tab. 2.15 Pipettierschema für die Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000

### 2.2.1.13 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Zytozentrifugenpräparate (2.2.1.7, S. 41), bewachsene Objektträger (2.2.1.8, S. 41) und bewachsene Petrischalen mit Glasboden verwendet. Die Zellen wurden nach Bedarf vor der Färbung transfiziert (2.2.1.12, S. 43).

Die Zellen wurden 3 x 1 min mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur mit 2 % Formaldehyd in PBS fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen fand für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,25 % Triton-X 100 (UBS, Cleveland, USA) in PBS statt. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen für 30 min in 10 % (w/v) BSA/PBS (PAA Laboratories, Hanau, Deutschland) inkubiert. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (Tab. 2.16, S. 44) mit 10 % BSA-Blockierungslösung in einem Volumen von 50 µl - 300 µl auf die Zellen gegeben und für 30 - 90 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS konnte der Sekundärantikörper (Tab. 2.17, S. 44) zusammen mit dem Nukleinsäurefarbstoff Toto-3-jodid (1 mM in DMSO; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) oder 1 µg/ml Propidiumjodid (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), 1:500 verdünnt in 10 % Blockierungslösung, auf die Zellen appliziert und 30 min in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert werden. Danach wurden die Objektträger bzw. Petrischalen in PBS gewaschen, wiederum in 4 % Formaldehyd fixiert, ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und schließlich mit DABCO (1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octan; Sigma, Deisenhofen, Deutschland [Johnson *et al.*, 1982]) eingedeckelt. Die gefärbten Präparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (TCS SP, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) oder einem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan) ausgewertet.

Spezifität	Antigen bzw. Klon und Hersteller	Wirtsspezies	Konzentration [µg/ml] oder Verdünnung
p53	pAb1620 (Calbiochem, Merck, Bad Soden, Deutschland)	Maus-Monoklonal	20 µg/ml
p53	FL-393 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	Kaninchen-Polyklonal	40 µg/ml
p53	DO-7 (BD Pharmingen, San Diego, USA)	Maus-Monoklonal	20 µg/ml
TaSP	TaSP teilexprimiert (Schnittger <i>et al.</i> 2002) Charles River GmbH, Kisslegg, Deutschland	Kaninchen-Polyklonal	0,2 µg/ml
Ta6TMP	Ta6TMP Peptid, Charles River GmbH, Kisslegg, Deutschland	Kaninchen-Polyklonal	1:100
Tubulin	DM 1A (Sigma, St. Louis, USA)	Maus-Monoklonal	10 µg/ml
<i>T. annulata</i> Zellmembran	1C7 (Andy Tait, University Glasgow, Schottland)	Maus-Monoklonal	1:80
PIM	'polymorphic immunodominant antigen' aus <i>T. parva</i>	Maus-Monoklonal	1:1000
clone-5	clone-5 Peptid (AS 408-421), Charles River GmbH, Kisslegg, Deutschland	Kaninchen-Polyklonal	1:1000

**Tab. 2.16** Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit Alexa-Fluoreszenz-Farbstoffen unterschiedlicher Anregungswellenlängen (Alexa 488, 546 oder 568) konjugiert.

Spezifität	Wirtsspezie	Hersteller, Land	Eingesetzte Konzentration in µg/µl
Anti-Maus IgG, Alexa 488/546/568-konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	8
Anti-Kaninchen IgG, Alexa 488/546/568-konjugiert	Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	8

**Tab. 2.17** Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders beschrieben wurden Standardmethoden von Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

### 2.2.2.1 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Gemischen zur Analyse und Reinigung erfolgte je nach Größe der zu erwartenden Fragmente in 0,8 - 1,5 %-Agarosegelen. Der 10 x TBE-Puffer wurde auf 1 x TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer, 89 mM Tris-HCl pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) verdünnt. Es wurden 30 - 50 ml 1 x TBE-Puffer, je nach gewünschter Gelgröße, mit 0,3 - 0,5 g Agarose (Crystal Agarose, Biolab, Garlstorf, Deutschland) versetzt und in der Mikrowelle ohne Siedeverzug gelöst. Nach dem Abkühlen der Agarose auf 50 °C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, Deutschland) dazugegeben, kurz gemischt und in die Gelkammer (Mini Gelkammer horizontal, G & P, Kassel, Deutschland) gegossen. Der Kamm wurde hineingesteckt. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Geles (ca. 30 min) wurde das Gel in die Elektrophoresekammer (G & P, Kassel, Deutschland) platziert und die Proben 1:6 mit 6 x Ladebuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,03 % (v/v) Bromphenolblau; 0,03 % (v/v) Xylen Cyanol FF; 60 % (v/v) Glycerin; 60 mM EDTA) versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm Gel mit einer Spannungsquelle (80 V, 400 mA, Model 200/2,0 power supply, Biorad, München, Deutschland) im 1 x TBE-Puffer für 1 h (1 %-Agarosegel) und 90 min (1,5 %-Agarosegel) bis die Farbstoffbande (Bromphenolblau) etwa 2/3 des Gels durchwandert hatte. Anschließend konnte die Auftrennung auf einem Transilluminator (intas, UV-Systeme, Göttingen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 300 nm (UV-Licht) mit einem Videosystem (Biometra, Göttingen, Deutschland) ausgewertet werden. Als Größenstandard diente eine 10 kb-Leiter der Firma Fermentas (MassRuler™ DNA Ladder mix) oder der Firma peqlab (peqGOLD DNA-Leiter Mix). Als 1 kb-Standard wurde die peqGold 100 bp Leiter (Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet.

### 2.2.2.2 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente, die nach der Auftrennung (2.2.2.1, S. 45) für Klonierungsschritte weiterverwendet werden sollten, wurden mit einem Skalpell vorsichtig unter UV-Lichteinstrahlung (300 nm) herausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem Gel-Extraktionskit „QiaexII“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Vorschrift aus dem Gel isoliert und gereinigt. Dabei wurde zuerst die Agarose aufgelöst, danach die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Kieselgelmatrix gebunden und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen eluiert. Es wurde jeweils für 1 min bei 16000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5418; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Ermittlung der DNA-Konzentration (2.2.2.7, S. 46) erfolgte mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

### 2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem „Puregene DNA Isolation Kit“ (Gentra Systems, Minneapolis, USA) nach Anweisung des Herstellers. Frische oder bei -20 °C gelagerte Zellpellets von 1 - 2 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden für die Isolierung verwendet. Die Zentrifugationsschritte (Eppendorf Centrifuge 5418; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden bei 13000 g für 1 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gewonnene und rehydrierte DNA wurde bei -25 °C gelagert.

### 2.2.2.4 Präzipitation von DNA

Die Präzipitation von DNA wurde nach der Ethanolmethode nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt, um die DNA aufzukonzentrieren und unerwünschte Salze zu entfernen. Dazu wurde zu der DNA-Lösung 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetatpuffer (Fluka, Buchs, Schweiz), pH 5,2 und zwei Volumen an eiskaltem 100 % Ethanol hinzugegeben und mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die ausfallene DNA bei 16000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert (Biofuge 28RS, Hereaus, Hanau, Deutschland) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Pellet bei 37 °C im Heizblock getrocknet und im gewünschten Volumen an ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend die DNA-Konzentration (2.2.2.7, S. 46) bestimmt.

### 2.2.2.5 Isolierung von RNA

Es wurde unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet. Dies beinhaltet, dass nur RNase-freie Materialien und Geräte (4 h, 200 °C sterilisiert) und DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandelte Lösungen verwendet wurden.

**Isolierung von Gesamt-RNA mit dem „Puregene Total RNA Isolation Kit“**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde mit dem „Puregene Total RNA Isolation Kit“ (Gentra Systems, Minneapolis, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zentrifugation wurde bei 13000  $g$  in der Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Lagerung der hydrierten RNA erfolgte bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Isolierung von Gesamt-RNA mit der Trizol-Methode**

Die RNA-Isolierung wurde nach einem Protokoll des Herstellers von Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt, das auf der Methode nach Chomczynski and Sacchi (1987) basiert. Dazu wurden  $5 - 10 \times 10^6$  eukaryotischen Zellen geerntet, 2 x mit PBS gewaschen und pelletiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 12000  $g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Heraeus Biofuge 28RS; Heraeus, Hanau, Deutschland). Die gewonnene RNA wurde rehydriert, die RNA-Konzentration bestimmt (2.2.2.7, S. 46) und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Isolierung von mRNA mit dem „NucleoTrap mRNA Mini Kit“**

Der Isolierung von mRNA aus eukaryotischen Zellen ging eine Gesamt-RNA-Isolierung nach den vorher beschriebenen Methoden (2.2.2.5, S. 45) voraus. Die so gewonnene RNA wurde dann weiter nach Herstellerangaben für die Isolierung von mRNA mit dem „NucleoTrap mRNA Mini Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) weiterbehandelt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 11000  $g$  (Eppendorf Centrifuge 5418; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die mRNA wurde bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**2.2.2.6 Synthese von cDNA**

Für die Herstellung von cDNA aus mRNA oder Gesamt-RNA (2.2.2.5, S. 45) bediente man sich dem „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Dabei wurde für das Umschreiben von RNA in DNA eine reverse Transkriptase verwendet, die eine RNA- und DNA-abhängige Polymeraseaktivität, aber keine für RNA in RNA-DNA-Hybriden spezifische RNase H-Aktivität besitzt.

Um sicherzustellen, dass die RNA nicht mit genomischer DNA verunreinigt war, wurde sie vorher einem DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurde die DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach den Herstellerangaben verwendet.  $1\text{ }\mu\text{l}$  RNA ( $10\text{ ng} - 5\text{ }\mu\text{g}$  RNA oder  $1\text{ ng} - 0,5\text{ }\mu\text{g}$  Poly(A)<sup>+</sup> RNA),  $1\text{ }\mu\text{l}$  (1U) RNase-freier DNase I und  $9\text{ }\mu\text{l}$  DNase Puffer ( $40\text{ mM}$  Tris-HCl pH 8,0,  $6\text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub>,  $2\text{ mM}$  CaCl<sub>2</sub>) wurden für  $10\text{ min}$  bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $1\text{ }\mu\text{l}$   $25\text{ mM}$  EDTA-Lösung und Inkubation für  $5\text{ min}$  bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestoppt.

Zu dieser DNA-freien RNA wurde  $1\text{ }\mu\text{l}$  oligo(dT)<sub>18</sub> Primer ( $0,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gegeben, auf  $12\text{ }\mu\text{l}$  mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt, kurz gemischt und  $5\text{ min}$  bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Heizblock (Eppendorf Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Dabei lagern sich die Primer an die RNA an. Nach kurzem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Eis wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

5x Reaktionspuffer	4 $\mu\text{l}$
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor ( $20\text{ U}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
10 mM dNTP Mix	2 $\mu\text{l}$

Dann wurde kurz gemischt und  $5\text{ min}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach konnte die RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase ( $200\text{ U}/\mu\text{l}$ ) hinzugefügt und  $60\text{ min}$  bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden. Das Stoppen der Reaktion erfolgte bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  für  $10\text{ min}$  im Heizblock.

Die so in cDNA umgeschriebene mRNA wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und konnte für weitere Versuche wie z. B. PCR (2.2.2.8, S. 47) verwendet werden.

**2.2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Reinheitsanalyse**

Bei  $260\text{ nm}$  hat eine  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  konzentrierte DNA-Lösung bzw. eine RNA-Lösung mit  $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  eine Absorption von 1. Die DNA bzw. RNA wurde mit  $10\text{ mM}$  Tris-HCl-Puffer pH 8,5 oder H<sub>2</sub>O verdünnt und spektroskopisch bei  $260$  und  $280\text{ nm}$  an einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermessen. Die DNA-Menge berechnete sich nach folgender Formel:

$$[\mu\text{g}/\text{ml}] = A_{260} \times 50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Entsprechend berechnete sich die RNA-Konzentration nach folgender Formel:

$$[\mu\text{g}/\text{ml}] = A_{260} \times 40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  ist ein Grad für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen. Idealerweise sollte dieser Wert bei reiner DNA bei etwa 1,8 liegen.

### 2.2.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR zur selektiven, exponentiellen Vermehrung von geringen Mengen von DNA wurde mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, die Taq-Polymerase (Saiki *et al.*, 1987) durchgeführt. Sie besitzt keine 3'→5'-proofreading Exonuklease-Aktivität, aber eine geringe 5'→3'-Exonukleaseaktivität.

Die lyophilisierten Primer (HPSF- „High Purity Salt Free“ oder HPLC- „High Performance Liquid Chromatography“ gereinigt, MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 pmol/μl eingestellt. Der dNTP-Mix und die Sawady Taq DNA Polymerase wurden von der Firma Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland) bezogen.

Der 1 x PCR-Ansatz in einem Gesamtvolumen von 35 μl hatte folgende Zusammensetzung:

Lösungen	Arbeitskonzentration/ Enzymaktivität	Volumen (μl)
20 ng - 400 ng cDNA, genomische DNA		2 μl
je 10 mM dNTP-Mix	220 μM	0,8 μl
10 pmol/μl 3'-Primer	0,5 μM	1,75 μl
10 pmol/μl 5'-Primer	0,5 μM	1,75 μl
10 x PCR-Puffer	1 x	3,5 μl
5 U/μl Taq-Polymerase	25 mU/μl	0,175 μl
H <sub>2</sub> O steril		

Tab. 2.18 Pipettierschema für den PCR-Ansatz

Folgendes PCR-Programm am Thermocycler (T3; Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde verwendet:

Denaturierung	94 °C	3 min	} 25 - 35 x
Denaturierung	94 °C	1 min	
Annealing	50 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	5 min	
Kühlen	4 °C	unendlich	

Die Hybridisierungstemperatur (Annealing  $T_A$ ) wurde in einer ersten Annäherung über den CG-Gehalt der verwendeten Primer ermittelt ( $T_A = [(Anzahl\ von\ A+T) \times 2\ ^\circ C + (Anzahl\ von\ G+C \times 4\ ^\circ C) - 5\ ^\circ C]$ ) und in mehreren PCR-Reaktionen optimiert. Nach Beendigung des Programms wurden 10 μl des PCR- Produktes auf ein 1 %-Agarosegel (2.2.2.1, S. 45) aufgetragen und analysiert.

### 2.2.2.9 Restriktionsreaktion

In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen (Tab. 2.3, S. 35) zur Linearisierung der Vektor-DNA und anschließender Klonierung verwendet. Des Weiteren wurde damit eine erfolgreiche Klonierung des Zielgens nachgewiesen (Restriktionsanalyse).

Ein Standard-Restriktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Lösungen	für Klonierungsreaktion:	für Restriktionsanalyse
DNA	0,4-5 μg	5-10 μl
Restriktionsenzym(e)	10 U	10 U
BSA (100 μg/ml)	1 μg/ml	1 μg/ml
10 x Reaktionspuffer	5 μl	5 μl
H <sub>2</sub> O	ad 50 μl Gesamtvolumen	ad 50 μl Gesamtvolumen

Tab. 2.19 Pipettierschema für die Restriktionsreaktion

1 Unit (U) Enzym entspricht der Enzymmenge, die 1 μg dsDNA innerhalb von 1 h spaltet. Konnten unterschiedliche Enzyme nicht im selben Puffer inkubiert werden, erfolgte der Verdau in dem Puffer mit der geringeren Salzkonzentration, anschließend wurde die Restriktionsendonukleasen mit dem Puffer der höheren Salzkonzentration zugesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 2 h im Inkubator (Thermomixer compact, eppendorf, Hamburg, Deutschland) oder 14 h im Thermocycler (T3; Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert.

Zur Inaktivierung der Enzyme wurde eine 20-minütige Inkubation bei 80 °C angeschlossen (im Thermocycler).

Zur Reinigung der Enzymreaktion von Salzen und Enzymen erfolgte eine Aufreinigung mit dem „Qiaquick PCR-Purification-Kit“ von der Firma Qiagen (2.2.2.10, S. 48) oder eine Isolierung und Aufreinigung aus dem Agarosegel (2.2.2.2, S. 45).

### 2.2.2.10 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Enzymreaktionen

Nach einer Restriktionsreaktion oder einer PCR mussten die DNA-Produkte für eine weitere Verarbeitung vorher von unerwünschten Salzen und Enzymen befreit werden. Die Reinigung erfolgte mit dem „QIA quick Purification Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) und nach dem Herstellerprotokoll. Die Ermittlung der DNA-Konzentration (2.2.2.7, S. 46) erfolgte mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

### 2.2.2.11 Ligationsreaktion

#### Ligation von PCR-Produkten mit „A“-Überhängen

Die Ligation wurde mit dem „PCR Cloning Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Der verwendete pDrive-Vektor (Tab. 2.7, S. 37) besitzt in Nachbarschaft zur „multiple cloning site“ (MCS) überhängende U-Enden (Uracil) und ist somit komplementär zu PCR-Produkten, die mit einer Taq-Polymerase hergestellt wurden und einen Adenin-Überhang besitzen. Der Ligationsansatz wurde folgendermaßen zusammenpipettiert:

Lösung	Volumen
pDrive-Vektor (50 ng/µl)	1 µl
Ligations Master Mix (5x)	2 µl
PCR-Produkt (aufgereinigt)	1 - 4 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

**Tab. 2.20 Pipettierschema für die Ligation mit « A »-Überhängen**

Das zuvor aufgereinigte PCR-Produkt wurde in fünffachen molaren Überschuß (s.u. Formel) zum linearisierten Vektor eingesetzt, um multiple Klonierung des Inserts zu vermeiden.

Der Ansatz wurde für 14 h bei 16 °C und zur Inaktivierung der Ligase für 10 min bei 20 °C im Thermocycler inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Probe ohne PCR-Produkt inkubiert.

#### Ligation von „sticky ends“

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente, zu klonierendes Fragment und Vektor (2.2.2.9, S. 47) wurden zunächst nach Vorschrift mit dem „PCR-Purification Kit“ oder aus dem Agarosegel mit dem „Qiaex II“ (beides Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt (2.2.2.2, S. 45) und für die Ligation eingesetzt.

Mit DNA-Ligasen können DNA-Fragmente kovalent miteinander verknüpft werden, wenn die Enden komplementär zueinander sind. Hier wurde eine T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet, die in dsDNA die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen benachbarten 3'- und 5'-Hydroxygruppen katalysiert. Somit können DNA-Fragmente (Inserts) in die zuvor mit Restriktasen linearisierte Vektor-DNA eingefügt werden. Die Ligationsreaktion wurde nach Anleitungen von Fermentas „Tipps und Tricks für ihre Ligation“ durchgeführt. Ein Standard-Ligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Lösung	Volumen
Vektor-DNA	10-100 ng
Insert-DNA	30-300 ng
10 x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1-2 U
bideion. H <sub>2</sub> O	ad 20 µl Gesamtvolumen

**Tab. 2.21 Pipettierschema für die Ligation mit « sticky ends »**

1 Weiss-Unit (1 U) entspricht dem katalytischen Austausch von 1 nmol <sup>32</sup>Ppi zu [γ/β<sup>32</sup>P] ATP in 20 min bei 37 °C. Das ideale molare Verhältnis bezogen auf pmol ligierbare Enden betrug 3:1, wobei das Verhältnis für einige Ansätze angepasst werden musste.

Die Menge an einzusetzendem Insert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$ng_{\text{Insert}} = \frac{ng_{\text{Vektor}} \cdot bp_{\text{Insert}}}{bp_{\text{Vektor}}} \cdot \text{molares Verhältnis Insert : Vektor}$$

Der Reaktionsansatz wurde für 14 h bei 14 °C und anschließenden 10 min bei 65 °C (Denaturierung der T4-DNA-Ligase) im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert und die klonierten Plasmide wurden in chemisch kompetente Zellen transformiert (2.2.2.13, S. 49). Die transformierten Zellen konnten ÜN bei 37 °C auf Selektionsmedium angezogen werden.

### 2.2.2.12 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Vor der Transformation von DNA in Bakterien müssen die Zellen für die Aufnahme von Fremd-DNA durch mehrere Waschstschritte mit 15 % Glycerin vorbehandelt werden, d. h. kompetent gemacht werden.

Das Protokoll zur Präparation von chemisch kompetenten Zellen wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Der gewünschte *E. coli*-Stamm (Tab. 2.9, S. 38) wurde auf eine LB-Agarplatte mit oder ohne Selektionsmarker (2.1.9.3, S. 39 und Tab. 2.13, S. 40) ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Eine *E. coli*-Einzelkolonie (nicht rekombinant) wurde zum Animpfen von 7 ml LB-Medium verwendet und ÜN bei 37 °C und 200 upm (Julabo SW-2 0C, Mickley-Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland) angezogen. 100 ml LB-Medium wurden mit 10 ml der ÜNKultur inokuliert und bei 37 °C und 80 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 angezogen. Nachdem die Zellen 15 min auf Eis abgekühlt waren, wurden sie in Falcon-Röhrchen (vorgekühlt) für 5 min bei 4000 g und 4 °C (Heraeus Biofuge 26RS, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml sterilem, eiskaltem, TFB1-Puffer resuspendiert, für 90 min auf Eis inkubiert und wiederum 5 min bei 4000 g, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem, sterilem TFB2-Puffer (Endkonzentration ~ 2 x 10<sup>11</sup> Zellen/ml) aufgenommen und in 100 µl-Portionen aliquotiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

#### TFB1:

30 mM KOOCH<sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
50 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
15 % (v/v) Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Es wurden 30 mM KOOCH<sub>3</sub>-Puffer hergestellt und mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt. Dann wurden die restlichen Chemikalien dazugeben, der pH erneut überprüft und die Lösung sterilfiltriert.

#### TFB2:

10 mM MOPS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
75 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
10 mM KCl  
15 % Glycerin

Es wurden 30 mM 10 mM MOPS-Puffer hergestellt und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Dann wurden die restlichen Chemikalien dazugeben, der pH erneut überprüft und die Lösung sterilfiltriert.

### 2.2.2.13 Transformation durch die CaCl<sub>2</sub>-Methode

Transformation ist die Einschleusung von Fremd-DNA in die Bakterienzelle. Die Transformations-effizienz der auch als Hitzeschockmethode (Dagert *et al.* 1998) bekannten Transformation beträgt 10<sup>4</sup> Transformanten pro ng Superspiralierter DNA.

#### **Transformation von EZ-Zellen und Blau-Weiß-Selektion**

Die chemisch kompetenten Zellen wurden kurz auf Eis aufgetaut. 1-2 µl DNA aus der Plasmidpräparation oder 5 µl des Ligationsproduktes wurden zu 100 µl chemisch kompetenten Zellen gegeben, kurz vorsichtig vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde für 45 s bei 42 °C im Heizblock (Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 min auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben, kurz auf- und abpipettiert und die Zellen wurden anschließend entweder für 1h bei 37 °C unter leichtem Schütteln (300 upm im Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) inkubiert oder direkt ausgestrichen. Verschiedene Aliquote der Zellen konnten dann auf Selektionsmedium, abhängig vom verwendeten Vektor, mit Antibiotikum LB<sub>Kan</sub> (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) oder LB<sub>Carb</sub> (Roth,

Karlsruhe, Deutschland) mit 80 µg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid in Dimethylformamid; Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 50 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in ddH<sub>2</sub>O; Roth, Karlsruhe, Deutschland) ausplattiert und bei 37 °C ÜN im Brutschrank (Heraeus B5025; Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert werden. Dieses Selektionsmedium erlaubt eine einfache Identifizierung von positiven Klonen mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion.

#### SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

2 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

0,05 % (w/v) NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2,5 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

10 mM MgCl<sub>2</sub> (sterilfiltriert; Merck, Darmstadt, Deutschland)

20 mM Glucose (sterilfiltriert; Roth, Karlsruhe, Deutschland)

pH 7,5 mit NaOH

Die sterilfiltrierten Lösungen wurden nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Pro Agarplatte wurden am nächsten Tag zehn positive weiße Kolonien mit einer Pipettenspitze abgenommen und steril in 5 - 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin oder 20 µg/ml Kanamycin überführt. Nach Inkubation der Kulturen ÜN in einem Wasserbad (Julabo SW-20C, Mickley-Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland) bei 37 °C konnten die transformierten Bakterien durch PCR auf die in den Vektor eingebauten Produkte hin untersucht werden. Dazu wurden 2 µl der Kultur als DNA-Template in einer PCR (2.2.2.8, S. 47) eingesetzt. Der Versuch wurde mit Primern (Tab. 2.6, S. 37) durchgeführt, die für das zu klonierende Produkt oder für den Vektor (M13-forward/reverse-Primer) spezifisch waren. Nach einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.1, S. 45) konnten die positiven Klone auf Grund der Bandengröße der PCR-Produkte identifiziert werden.

#### **Transformation von M15[pREP4] und DH5α**

Kompetente M15[pREP4]- (Qiagen, Hilden, Deutschland) und DH5α-(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) Zellen wurden nach Herstellerangaben transformiert. Die Durchführung war ähnlich wie die zuvor beschriebene Methode mit folgenden Änderungen. Es wurden 50 µl - 100 µl kompetente Zellen mit der Ligationsreaktion gemischt, 20 - 30 min auf Eis inkubiert und danach 30 s - 90 s bei 42 °C inkubiert. Die Zellen wurden sofort mit „Psi broth“-Medium für M15[pREP4] oder SOC-Medium für DH5α gemischt und bei 37 °C im Heizblock für 60 min - 90 min bei 200 upm (Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geschüttelt. Die Zellen konnten dann entsprechend ihres Selektionsmarkers (Tab. 2.7, S. 37) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inku biert.

#### „Psi broth“:

LB-Medium (2.1.9.2, S. 39)

4 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)

10 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

#### **2.2.2.14 Identifizierung positiver Klone mittels ‚colony‘-PCR**

Nach erfolgreicher Transformation (2.2.2.13, S. 49) wurden die auf Selektionsmedium gewachsenen Bakterien auf das Vorhandensein des gewünschten DNA-Inserts untersucht. Dazu bediente man sich dem PCR-Screening mit Hilfe der ‚colony‘-PCR, wenn der verwendete Plasmid-Vektor keine einfache Erkennung von Klonen (z. B.: Blau-Weiß-Selektion) erlaubte.

Zum Screenen nach positiven Klonen wurde die Vorschrift Novagen pET Manual 10<sup>th</sup> edition (2003) verwendet. Je Klonierung wurden mehrere Klone getestet.

#### **2.2.2.15 Plasmidpräparation**

##### **Miniprep-Plasmid-Isolierung**

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab erfolgte nach dem Prinzip der alkalische Zellyse und alkoholische Präzipitation.

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration der so isolierten Plasmid-DNA wurde bestimmt (2.2.2.7, S. 46) und für Sequenzierung (2.2.2.16, S. 51) oder Klonierung eingesetzt.

### Midiprep-Plasmid-Isolierung

Für die Plasmidpreparation (Tab. 2.7, S. 37) im größeren Maßstab wurde das „NucleoBond® Xtra Midi Plus Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und das Protokoll des Herstellers für „high-copy-Plasmide“ verwendet. Das Prinzip funktioniert nach der Anionen-Austausch-Chromatographie. Die DNA wurde in 500 - 1000 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt (2.2.2.7, S. 46) und die so gewonnene DNA für die Transfektion (2.2.1.12, S. 43) verwendet.

#### 2.2.2.16 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG (Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 2 x 1 µg der vorher mit dem „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) isolierten Plasmid-DNA in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und 30 min unter Vakuum getrocknet (Savant SpeedVac Plus SC 110; Global Medical Instrumentation, Inc, Ramsey, USA mit Membran-Vakuumpumpe). Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Es wurden folgende Sequenzierungsprimer, die von der Firma MWG synthetisiert wurden, verwendet. Die Sequenzierungen wurden jeweils mit den ‚forward‘- und den ‚reverse‘-Primern durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> [°C]
pEGFPC1for	GAT CAC TCT CGG CAT GGA C	59
pEGFPC1rev	CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GG	57
M13 uni (-21)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	54
M13 rev (-29)	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	54
M13 uni (-43)	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	62
M13 rev (-49)	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	61
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53
pQE for	GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T	55
pQE rev	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG	59
pEGFPN1for	GTC GTA ACA ACT CCG CCC	58
pEGFPN1rev	GTC CAG CTC GAC CAG GAT G	61

Tab. 2.22 Sequenzierungsprimer

Die resultierenden Sequenzen wurden mit Hilfe des „standard nucleotide-nucleotide Blast“-Programmes (NCBI-Blastn) analysiert. Außerdem wurden mehrere Analysewerkzeuge des ExPasy-Servers verwendet (2.3, S. 61).

### 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische diskontinuierliche Elektrophorese von Proteinen wurde nach (Laemmli, 1970) in einer Gel-Elektrophorese-Kammer (Mini/Maxi Gelkammer vertikal, Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurde die Konzentration des Trenngels entsprechend der erwarteten Größe der zu trennenden Proteine gewählt (zwischen 10 % und 15 %). Für die Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden die Lösungen nach folgendem Schema in der Tab. 2.23 (S. 52) zusammengestellt. Das Trenngel wurde zuerst zwischen 2 Glasplatten (10 cm x 11 cm oder 10 cm x 20 cm) auf einem Gießstand (Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland) gegossen, mit 70 % Ethanol überschichtet und für 30 min polymerisiert.

Für je 2 kleine Sammel- und Trenngele:

Lösungen	3 % Sammelgel	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	15 % Trenngel
ddH <sub>2</sub> O	3 ml	5 ml	4 ml	6ml
Acrylamide/Bisacrylamide Lösung (30 %; Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0.5 ml	4 ml	5 ml	3ml
Sammelgelpuffer	1.25 ml	-	-	3ml
Trenngelpuffer	-	3 ml	3 ml	100µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin; Merck; Darmstadt, Deutschland)	10 µl	10 µl	10 µl	10µl
Pyronin Y-Puffer	10 µl	-	-	6ml

Lösungen	3 % Sammelgel	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	15 % Trenngel
Ammoniumpersulphat	20 µl	100 µl	100 µl	3ml

**Tab. 2.23 SDS-PAA-Gel-Zusammensetzung**

Dann wurde das 10-15%ige Trenngel nach der Polymerisation und dem Entfernen von Ethanol mit einem 3%igem Sammelgel überschichtet, der Silikonkamm (Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland) mit den Taschen zwischen die beiden Glasplatten gesteckt und wiederum für 30 min auspolymerisiert. Die kleinen Gele (Minigel: 7,5 cm x 8,5 cm) und die großen Gele (Maxigele: 7,5 cm x 16 cm) hatten eine Dicke von 0,75 mm.

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C im Thermoblock (Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Es wurden jeweils 15 -25 µl Probe bei einem 15-/20-/25-Taschen-Kamm aufgetragen. Vom Marker wurden nur 5 µl aufs Gel aufgetragen.

Als Marker wurden die ‚Page Ruler™ Prestained Protein Ladder‘ (Fermentas, St- Leon-Rot, Deutschland) oder SeaBlue Plus 2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für die Western blot Analyse (da vorgefärbt, erfolgreicher Transfer nachweisbar) und die ‚Page Ruler™ Protein Ladder‘ (Fermentas, St- Leon-Rot, Deutschland) für die Coomassie- und Silberfärbung verwendet (2.2.3.2, S. 52 und 2.2.3.3, S. 53).

Die Auftrennung der Proteine erfolgte vertikal in einer Elektrophoresekammer mit einer Spannungsquelle (EC 3000P Series 90; E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Rußland) in SDS-Laufpuffer nach folgendem Programm: 5 min bei 50 V, 10 min bei 100 V und 60 min bei 200 V bei konstanter Stromstärke (300 mA).

Die Proteinbanden konnten entweder sofort mit Lösung A (2.2.3.2, S. 52) nach Fairbanks, *et al.* (1971) angefärbt werden oder die Gele wurden ÜN im Fixierbad für die Silberfärbung (2.2.3.3, S. 53) nach Blum, H. *et al.* (1987) inkubiert.

Für die spezifische Identifikation der Proteine wurde ein Western blot (2.2.3.5, S. 54) an die Elektrophorese angeschlossen. Mit Western blot Analysen können Proteinmengen von bis zu 30 ng spezifisch nachgewiesen werden, wohingegen der Coomassie-Farbstoff 0,1 - 0,3 µg Protein pro Bande unspezifisch anfärbt. Ähnlich sensitiv wie der Western blot aber unspezifisch ist die Silberfärbung mit einer Nachweisgrenze im ng-Bereich.

**4x Protein-Probenpuffer:** 180 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 6,8  
40% (v/v) Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0.04% (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
100 mM DTT (Dithiothreitol; Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris(Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 8,8  
0,4% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**Sammelgelpuffer:** 500 mM Tris(Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl pH 6,8  
0,4 % (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**gesättigte APS (Ammoniumperoxodisulfat)-Lösung:** 10 % (w/v) APS (Merck, Darmstadt, Deutschland)

**Pyronin Y-Puffer** 0,5 M Tris(Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl  
10 % Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0,4 % SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0,01% pyronin Y (Serva, Heidelberg, Deutschland)

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris(Roth, Karlsruhe, Deutschland)/HCl, pH 8,3  
192 mM Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0.1% (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

### 2.2.3.2 Proteinfärbung nach Fairbanks

Das Protokoll wurde nach Fairbanks *et al.* (1971) durchgeführt. Der Unterschied zur herkömmlichen Coomassie-Färbung besteht in der stufenweisen Entfärbung der Polyacrylamidgele. Isopropylalkohol wurde zur Fixierung der Proteine eingesetzt. Die Konzentrationen von Isopropanol und Coomassie-Blau (Phast Gel™ Blue R, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) wurden mit jedem Wechsel der Lösungen verringert. Damit wurden auch sonst kaum sichtbare Proteinbanden besser angefärbt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde das Gel bei Raumtemperatur ÜN oder für mindestens 2 h in Lösung A auf einem Schüttler (GFL 3016, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Nach dem Entfernen (Abgießen) von Lösung A wurde Lösung B für 6 bis 9 h bei Raumtemperatur hinzugefügt. Danach wurde Lösung B gegen Lösung C ausgetauscht und ebenfalls ÜN inkubiert. Mit Lösung D wurde durch mehrmaliges Wechseln der Lösung bis zum gewünschten Färbegrad entfärbt; optimalerweise bis der Hintergrund fast klar war. Alternativ wurde die Entfärbung mit Lösung B, C und D für je 30 s in der Mikrowelle durchgeführt. Danach wurden die Gele getrocknet und ausgewertet (2.2.3.4, S. 53).

#### SDS-PAGE-Färbelösung (Fairbanks *et al.*, 1971)

**Lösung A:** 0,05 % (w/v) Phast Gel™ Blue R (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in 25 % (v/v) 2-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10 % (v/v) Essigsäure (96%; Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**Lösung B:** 0,005% (w/v) Phast Gel™ Blue R in 10 % (v/v) 2-Propanol und 10 % (v/v) Essigsäure (96%)

**Lösung C:** 0,002% (w/v) Phast Gel™ Blue R in 10 % (v/v) Essigsäure (96%)

**Lösung D (Entfärbelösung):** 10 % (v/v) Essigsäure (96%)

### 2.2.3.3 Silberfärbung

Bei dieser Färbemethode wurde eine abgeänderte Fassung von Blum *et al.* (1987) verwendet.

Der Unterschied zur herkömmlichen Silberfärbung besteht darin, dass hier die Natriumthiosulfatlösung lösliche Komplexe mit unspezifisch, d. h. nicht an Protein gebundenem Silber bildet und somit zur Reduzierung der Hintergrundfärbung beiträgt. Die Verwendung von Formaldehyd verstärkt diesen Effekt noch. Statt Ethanol wurde Methanol in der Fixierlösung verwendet.

Die Färbeprozedur verlief nach folgendem Schema:

Das Polyacrylamid-Gel wurde mindestens 1 h oder besser ÜN in der Fixierlösung inkubiert. Danach konnte durch 3 x 20minütiges Waschen mit 50 %iger Ethanollösung das Methanol herausgewaschen werden. Es folgte die Inkubation für genau eine Minute in der Thiosulfatlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und anschließendes 3 x 20sekündiges Waschen mit deion. H<sub>2</sub>O. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch die Inkubation für 30 min in der Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Es wurden zwei Waschschrte für jeweils 20 s mit deion. H<sub>2</sub>O angeschlossen. Darauf folgten die Entwicklung des Gels bis zum gewünschten Färbegrad, das Abstoppen der Reaktion für mindestens 10 min und ein erneuter Waschschrte mit 50 % Methanol, das gegebenenfalls auch zum Aufbewahren des angefärbten Geles (2.2.3.4, S. 53) verwendet wurde.

#### Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987)

Alle Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

Thiosulfat-, Silbernitrat- und Entwicklerlösung wurden jeweils frisch angesetzt.

**Fixierlösung:** 50 % (v/v) Methanol  
12 % (v/v) Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %; Merck, Darmstadt, Deutschland)

**Waschlösung:** 50 % (v/v) Ethanol  
**Thiosulfatlösung (Sensitivierlösung):** 0,02 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**Silbernitratlösung:** 0,04 % (w/v) AgNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
0,075 % (v/v) Formaldehyd (37 %)

**Entwicklerlösung:** 6 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %)  
0,0004 (w/v) % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Stopplösung:** 50 % (v/v) Methanol  
12 % (v/v) Essigsäure

### 2.2.3.4 Gelauswertung und Gelkonservierung

Nach erfolgter Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele entweder direkt mit dem hp officeJet G55 Scanner eingescannt und mit Adobe Photoshop 5.5 bearbeitet; oder die Gele wurden konserviert und später ausgewertet. Zur Konservierung wurden die Gele nach dem Waschen mit deion. H<sub>2</sub>O in Trocknerlösung inkubiert und anschließend luftdicht zwischen 2 Cellophanfolien (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingespannt und für 2 h bei 80 °C im G eltrockner (Biorad Gel dryer Modell 583; Biorad, München, Deutschland) unter Vakuum getrocknet.

**Geltrocknerlösung:** 20 % (v/v) verg. Ethanol  
10 % (v/v) Glycerin (Roth Karlsruhe, Deutschland)

### 2.2.3.5 Immunblotting von Elektrophoresegelen (Western blot)

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus einem PAA-Gel auf eine NC-(Nitrocellulose)-Membran erfolgte direkt im Anschluss an die SDS-PAGE nach dem „semi-dry-Verfahren“ (Kyhse-Andersen *et al.*, 1994) nach der Vorschrift von Millipore „Immobilon-P Transfer membran User Guide“. Dazu wurde eine „Semi-Dry“-Blotkammer mit Graphitelektroden (Perfect Blue™ semi dry Elektroblogger, Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet.

Die auf Gelgröße zugeschnittene NC-Membran (7,5 cm x 9 cm, Protran®BA, 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) wurde genauso wie das PAA-Gel 15 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Der luftblasenfreie Aufbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema („Sandwich-System“):

Die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen mit einer Spannungsquelle (EC 3000P Series 90; E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Russland) durchgeführt (2,5 mA/cm<sup>2</sup> PAA-Gel):

Anzahl der Gele	U [V]	I [mA]	t/min
1 kleines Gel; 0,75 mm	25 V=const.	60 mA	90 min
2 kleine Gele oder 1 großes Gel; 0,75 mm	25 V=const.	120 mA	90 min
2 große Gel; 0,75 mm	25 V=const.	200 mA	90 min

**Tab. 2.24 Bedingungen für Western blot**

Ein erfolgreicher Transfer wurde sofort nach dem Lauf an dem vorgefärbten Proteinmarker auf der Membran oder durch eine Ponceau S-Färbung der NC-Membran kenntlich gemacht. Jetzt konnten die Proteine durch immunologische Methoden spezifisch identifiziert werden.

#### Western blot:

**Anodenpuffer I:** 300 mM Tris-HCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 10  
20 % (v/v) Methanol

**Anodepuffer II:** 25 mM Tris-HCl, pH 10,4  
20 % (v/v) Methanol

**Kathodenpuffer:** 300 mM Tris-HCl, pH 9,4  
20 mM 6-Aminohexansäure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
10 % (v/v) Methanol

### 2.2.3.6 Ponceau S-Färbung

Das Anfärben mit Ponceau S (Eltest GmbH, Bonn, Deutschland) wurde durchgeführt, um die durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinextrakte nach Transfer auf die Nitrocellulose-Membran sichtbar zu machen. Dazu wurde die Blotmembran 5 min in 2 % (w/v) Ponceau S-Färbelösung (1 % (v/v) Essigsäure mit 0,02 % (w/v) Ponceau-S) auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde dann so lange in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bis sich die Proteinbanden vom Hintergrund abhoben. Die Ponceau S-Färbung wurde durch Waschen mit PBS wieder ausgewaschen.

### 2.2.3.7 Immundetektion

Die Detektion von Proteinen, die auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert wurden, erfolgte durch einen antigen-spezifischen Primärantikörper und einem sekundären Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert war. Das Enzym setzt das Substrat NBT/BCIP um, das als dunkler Niederschlag ausfällt.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Inkubations- und Waschschrte bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln auf dem Schütteltisch (GFL 3016, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland). Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran wurden durch Inkubation in 5 % (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz) in PBS 1 h bei Raumtemperatur oder alternativ ÜN bei 4 °C abgesättigt. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dreimaligem zehninütigen Waschen mit PBS mit dem entsprechenden primären Antikörper (Tab. 2.25, S. 55) in PBS-T im Allgemeinen ÜN bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Membran 3 x 10 min mit PBS-T-Puffer gewaschen worden war, wurde sie mit dem sekundären AP-konjugierten Antikörper in PBS-T (Tab. 2.26, S.55) für 1 - 2 h inkubiert. Die vorherige Waschprozedur (3 x 10 min) wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Membran konnte dann für 10 min in AP-Puffer äquilibriert werden. Die Detektion der immunreaktiven Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran mit

NBT/BCIP (0,1 % (w/v) NBT in 70 % DMF, pH 9,5 und 0,5 % (w/v) BCIP 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, Toluidin-Salz in 100 % DMF, gelöst in 10 ml AP-Puffer; beides Roth, Karlsruhe, Deutschland) im Dunkeln. Die Farbreaktion wurde durch Absaugen der Substratlösung und Inkubation mit der Stopplösung beendet.

<b>Phosphat-buffered-Saline-(PBS)-Puffer:</b>	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland) 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 100 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) pH 7,5 mit NaOH
<b>PBS-Tween (PBS-T):</b>	0,1 % (v/v) Tween 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ad 1000 ml PBS pH 7,5
<b>Blockier-Lösung:</b>	5 % (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz) in PBS-T-Puffer
<b>AP-Puffer:</b>	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)
<b>Stopplösung:</b>	20 mM EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in ddH <sub>2</sub> O

Spezifität	Antigen bzw. Klon und Hersteller	Wirtspezies	[µg/ml] oder Verd.
RGS-His	RGSHHHHHH (Qiagen, Hilden, D)	Maus-monoklonal	0,2 µg/ml
GFP	JL-8 (Clontech, Mountain View, USA)	Maus-monoklonal	1 µg/ml
GST	Glutathione-S-Transferase [ <i>Schistosoma japonicum</i> ] (Rockland Inc., Gilbertsville, USA)	Maus-monoklonal	0,6 µg/ml
p53	FL-393 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	Kaninchen-Polyklonal	1 µg/ml
p53	DO-7 (BD Pharmingen, San Diego, USA)	Maus-Monoklonal	2 µg/ml
TaSP	TaSP teilexprimiert (Schnittger <i>et al.</i> 2002) Charles River GmbH, Kisslegg, Deutschland	Kaninchen-Polyklonal	17 µg/ml
Ta6TMP	Ta6TMP-Peptid, Charles River GmbH, Kisslegg	Kaninchen-Polyklonal	1:100
Tubulin	DM 1A (Sigma, St. Louis, USA)	Maus-Monoklonal	1 µg/ml

**Tab. 2.25** verwendete Primärantikörper für Western blot

Spezifität	Wirtsspezies	Hersteller, Land	Eingesetzte Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert	Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:2000
Anti-Maus IgG, AP-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:2000
Anti-Ziege IgG, AP-konjugiert	Kaninchen	Jackson Immunoresearch, West Grove, USA	1:2000

**Tab. 2.26** verwendete Sekundärantikörper für Western blot

### 2.2.3.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach (Bradford, 1976) durchgeführt.

50 µl Protein- bzw. Kalibrierlösung (5 - 500 µg/ml enthaltend) wurden mit 2 ml Farbreagenz versetzt und gut gemischt. Spätestens nach 5 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert (statt Proteinlösung 50 µl Puffer) an einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen.

<b>Farbreagenz:</b>	100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 (Merck, Darmstadt, Deutschland) 50 ml 95%iger Ethanol (v/v) 100 ml 85%ige (w/v) Phosphorsäure 100 ml Glycerin ad 1000 ml mit dest. H <sub>2</sub> O
---------------------	---

### 2.2.3.9 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry wurde mit einem BioRad Micro-DC-Assay 500-0116 (BioRad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in einer Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden 0,2-2 µg BSA (0,2 µg-2,0 µg; PAA, Hanau, Deutschland) im Assay eingesetzt. Die Platten wurden dann 15 - 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte mit einem Mikroplatten-Reader (ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 550 nm. Für die Erstellung einer Eichkurve wurden die BSA-Werte dreifach bestimmt, die Proteinwerte wurden durch eine Zweifachbestimmung ermittelt. Als Nullwert wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Die Ergebnisse wurden mit Microwin Ver. 4.2 ausgewertet.

### 2.2.3.10 Expression rekombinanter Proteine im Schüttelkolbenmaßstab

#### Expression eines 6x-Histidin-Fusionsproteins

Die Expression wurde mit einigen Änderungen nach einem Protokoll von Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Eine M15-Bakterienkolonie, die das gewünschte rekombinante pQE30-Plasmid trägt, wurde für eine Vorkultur in 7 ml LB<sub>Kan/Carb</sub> (2.1.9.2, S. 39 und 2.1.9.3, S. 39) ÜN bei 37 °C und 200 upm im Wasserbad (Julabo SW-20C, Mickley-Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland) angezogen. 2 x 500 ml LB<sub>Kan/Carb</sub> wurden mit 5 ml (1 % [v/v]) der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C und unter leichtem Schütteln (100 upm) angezogen. Dann wurden die Expression der 500 ml der Bakterienkultur mit 500 µl 1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in ddH<sub>2</sub>O; Roth, Karlsruhe, Deutschland; sterilfiltriert; Endkonzentration 1 mM) bei 15 °C (bzw. 25 °C oder 37 °C) induziert; die anderen 500 ml Bakteriensuspension wurden ohne Zusätze weiter inkubiert. Die OD<sub>600</sub> wurde stündlich verfolgt (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und es wurden 1/OD-Proben angelegt. Die 1/OD-Proben wurden 3 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Biofuge 28RS; Heraeus, Hanau, Deutschland), und das Pellet wurde bei -25 °C gelagert. Die Zellen wurden nach Beendigung des Versuches durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C (Heraeus Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau) geerntet und bei -25 °C eingefroren. Es wurde abhängig vom Protein für mindestens 4 h oder auch ÜN exprimiert. Die Proben der induzierten und der nicht induzierten Bakterienkultur wurden mittels SDS-PAGE (2.2.3.1, S. 51) und Western blot (2.2.3.5, S. 54) analysiert.

#### Expression eines GST-Fusionsproteins

Bevor das Protein exprimiert werden konnte, musste das Plasmid (pcDNA DEST24) frisch aus dem allgemeinen Klonierungsstamm DH5α in den Expressionsstamm BL21-AI™ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transformiert werden. Dieser Bakterienstamm ist besonders für die Expression von für die Bakterien toxischen Proteinen geeignet. Transformiert wurde nach der Hitzeschockmethode wie unter 2.2.2.13 (S. 49) für die M15-Zellen beschrieben. Die kompetenten Zellen wurden 30 min zusammen mit dem Ligationsansatz inkubiert und vor dem Ausplattieren für 30 min unter leichtem Schütteln bei 200 upm inkubiert. Es wurde auf Ampicillinresistenz (Tab. 2.13, S. 40) selektiert.

Das Anlegen der Vorkultur und das Inokulieren der Hauptkultur erfolgten wie oben beschrieben. Nachdem eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde, wurde die Expression der Bakterienkultur mit 5 ml 20 % (w/v) L-Arabinose (in ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Arbeitskonzentration: 0,2 %, [Serva, Heidelberg, Deutschland]) induziert. Es wurden ebenfalls 1/OD-Proben der induzierten und der nicht induzierten Kultur angelegt und analysiert.

### 2.2.3.11 Zellaufschluss

#### Zellaufschluss von GST-Fusionsproteinen

Die nach der Expression geernteten *E. coli*-Zellen (s.o.) wurden 1 x mit TBS-Puffer gewaschen (fünfminütige Zentrifugation bei 5000 g, 4 °C) und in 20 ml Auftragspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 60 x 30 s mit jeweils 30 s Pause auf Eis mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 250: Ausgangsleistung 150 W bei 50 W, 30 % Ausgangsleistungskontrolle, mit Microtip). Das Lysat wurde dann 30 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) und der erhaltene Überstand für die FPLC („Fast Protein Liquid Chromatography“) an der Äkta prime™ (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) eingesetzt.

#### Zellaufschluss von His-Fusionsproteinen

Die geernteten Zellpellets wurden genauso behandelt wie oben beschrieben. Allerdings wurden die Zellen im Lysepuffer resuspendiert und 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln lysiert. Zusätzlich schloss sich noch eine Ultraschallbehandlung (s. oben) an.

**Lysepuffer:** PBS  
 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen, Deutschland, in 100 % Ethanol)  
 1 mM EDTA pH 7,4 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
 je 1 µg/ml Aprotinin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Leupeptinhydrogensulfat (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), Pepstatin A (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 1 mg/ml Lysozym (aus dem Hühnereiweiß; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

### 2.2.3.12 Affinitätschromatographie

#### Analytische Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie

Hierfür wurde ein Protokoll vom Hersteller der Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Diese Aufreinigung wurde abhängig von der Löslichkeit des Proteins entweder unter nativen oder unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Zuerst musste die Ni-NTA-Agarose äquilibriert werden, um ein Binden des His-Fusionsproteins zu ermöglichen. Es wurden 5 ml der Ni-NTA-Agarose (50 % in Ethanol) in eine 5 ml Polypropylen-Säule gegeben (Qiagen, Hilden, Deutschland), 3 x mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O und 3 x mit 10 ml Lysepuffer gewaschen. Die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose wurde in einem separaten Gefäß für 60 min mit dem Lysat (20 ml) bei 4 °C unter leichtem Schütteln (RM 5 Assistent 348, Karl Hecht GmbH, Sondheim) inkubiert. Die Ni-NTA-His-Protein-Agarose wurde wieder auf die Säule gegeben und der Durchfluß gesammelt. Nach 5maligem Waschen mit je 10 ml Waschpuffer, konnte das His-Fusionsprotein mit 10 ml Elutionspuffer in 1 ml-Schritten eluiert werden. Es wurde eine Proteinbestimmung und eine SDS-PAGE der Eluate zur Überprüfung der Expression angeschlossen.

#### Puffer für Aufreinigung unter nativen Bedingungen:

**Lysepuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 300 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
 10 mM Imidazol (Fluka, Buchs, Schweiz), pH 8.0

**Waschpuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 300 mM NaCl  
 20 mM Imidazol, pH 8.0

**Elutionspuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 300 mM NaCl  
 250 mM Imidazol, pH 8.0

#### Puffer für Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

**Lysepuffer:** 10 mM Tris(Roth, Karlsruhe, Deutschland)-HCl, pH 8,0  
 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 8 M Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland)

**Waschpuffer:** 10 mM Tris-HCl, pH 6,3  
 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 8 M Harnstoff

**Elutionspuffer:** 10 mM Tris-HCl, pH 5,9  
 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 8 M Harnstoff

#### Präparative Ni-Affinitätschromatographie mit der Äkta prime

Diese Methode der Aufreinigung von Proteinen wurde mit der Äkta prime (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als Säule wurde eine schon gepackte und mit Ni-Ionen beladene HisTrap FF (5 ml Ni Sepharose 6 Fast Flow; Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Ni-Chromatographie wurde nach den Anleitungen des Pharmacia-Handbuchs „The Recombinant Protein Handbook“ (2001) von Amersham Bioscience durchgeführt. Es wurde unter denaturierenden oder nativen Bedingungen chromatographiert und folgendes Chromatographieprogramm erstellt:

5 - 10 cv Waschen der Säule mit H<sub>2</sub>O, Flussrate: 5 ml/min

10 cv Äquilibrieren der Säule mit Auftragspuffer, Flussrate: 5 ml/min

20 ml Probenaufnahme über A1 (Pufferzugang) mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule

20 cv Waschen mit Waschpuffer bis die Leitfähigkeit oder A<sub>280</sub> konstant war; Flussrate: 3 ml/min; 5 ml Fraktionen sammeln

1 cv Elutionspuffer mit linearem Gradienten bis 500 mM bzw. 1 M Imidazol bis Proteinpeak zu sehen; Flussrate: 1 ml/min; 2 ml Elutionsfraktionen gesammelt  
 5 - 10 cv Waschen der Säule mit H<sub>2</sub>O  
 5 - 10 cv Waschen und Lagern der Säule mit 20 % (v/v) EtOH

Ein cv („column volume“, Säulenvolumen) entsprach 5 ml.

Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumina äquilibriert, dann erfolgte die Probenauftragung (20 ml) über eine Injektionsschleife. Anschließend wurde mit 20 Säulenvolumina gewaschen. Mit einer ansteigenden Konzentration von Imidazol wurde eluiert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und analysiert.

#### Ni-Affinitätschromatographie

Puffer nach Handbuch „The Recombinant Protein Handbook“ von Pharmacia (2001).

Die Puffer und Lösungen wurden durch einen Millipore-Filter (Schwalbach, Deutschland) mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm filtriert und 10 min im Ultraschallbad entgast.

a) Puffer für Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen:

**Auftragspuffer:** 20 mM Tris-HCl pH 8,0  
 8 M Harnstoff  
 0,5 M NaCl  
 5 mM Imidazol  
**Elutionspuffer:** 20 mM Tris-HCl pH 8,0  
 8 M Harnstoff  
 0,5 M NaCl  
 1 M Imidazol

b) Puffer für Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen:

Puffer nach Handbuch „Affinity Chromatography“ von Pharmacia (2002).

**Auftragspuffer:** 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4  
 0,5 M NaCl  
**Elutionspuffer:** 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4  
 0,5 M NaCl  
 500 mM Imidazol  
 20 % (v/v) Ethanol zur Lagerung der Säule

#### **Präparative Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins**

Die Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins wurde wie oben beschrieben am gleichem System durchgeführt (Äkta prime).

Eine C10/10-Säule (d = 10 mm, l = 10 cm; Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) wurde mit Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Suspension in 20 % EtOH) luftblasenfrei befüllt.

Folgendes Chromatographieprogramm wurde verwendet, wobei 1 Säulenvolumen (cv) 7 ml entsprach.

5 - 10 cv Waschen der Säule mit H<sub>2</sub>O, Flussrate: 5 ml/min

10 cv Äquilibrieren der Säule mit Auftragspuffer, Flussrate: 5 ml/min

20 ml Probenaufgabe über A1 (Pufferzugang) mit einer Flussrate von 1 ml/min auf Säule

10 - 20 cv Waschen mit Waschpuffer bis die Leitfähigkeit oder A<sub>280</sub> konstant ist; Flussrate: 3 ml/min

10 ml Fraktionen gesammelt

5 - 10 cv Eluieren mit Elutionspuffer bis peak zu sehen; Flussrate: 1 ml/min; 2 ml Elutionsfraktionen gesammelt

5 - 10 cv Waschen der Säule mit H<sub>2</sub>O

5 - 10 cv Waschen und Lagern der Säule mit 20 % (v/v) EtOH

#### Puffer für GST-Aufreinigung

nach Handbuch „GST Gene Fusion System“ von Amersham Bioscience (2002)

**Auftragspuffer:** 140 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3

**Elutionspuffer:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0  
10 mM Glutathion

Puffer durch 0,45 µm Filter filtriert und entgast.

### 2.2.3.13 Dialyse und Aufkonzentration von Proteinproben

Um reines Protein zu gewinnen, mussten die durch Ni-NTA-Aufreinigung gewonnenen Fraktionen gegen reines Wasser oder PBS dialysiert werden.

Es wurde entweder ein Dialyseschlauch von Roth (Karlsruhe, Deutschland) mit einem ‚cut off‘ von 4 - 6 kDa oder von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) mit einem ‚cut off‘ von 12,4 kDa (23 mm breit) für die Umpufferung entsprechend der zu dialysierenden Proteingrößen verwendet. Der Dialyseschlauch wurde jeweils entsprechend der Herstellerangaben vorbehandelt. Die vereinigten Fraktionen aus der Ni-Chromatographie wurden 4 x gegen 2 l deion. H<sub>2</sub>O bei 4 °C dialysiert und eine Proteinbestimmung angeschlossen (2.2.3.9, S. 56).

Zur Aufkonzentration oder Umpufferung von Proteinlösungen wurde das Prinzip der Ultrafiltration angewendet. Hierfür wurden die Centricon Ultracel-YM-30-Säule mit einem ‚cut off‘ von 30 kDa oder die Amicon Ultra-4-Säule mit einem ‚cut off‘ von 10 kDa (beide von Millipore, Schwalbach, Deutschland) nach einem Protokoll der Hersteller verwendet.

### 2.2.3.14 Koimmunpräzipitation

Der Nachweis einer Protein-Interaktion erfolgt bei einer Immunpräzipitation *in vitro*, indem mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch präzipitiert wurde. Hierfür wurde ein Protokoll nach (Gordon, 1991) verwendet.

Die Koimmunpräzipitation wurde sowohl mit transfizierten Zellen (COS-7-Zellen, 2.1.9.1, S. 39) als auch mit infizierten Zelllinien (TaA288, TaA346, 2.1.9.1, S. 10) durchgeführt.

Die Zellen wurden entsprechend mit dem Zellschaber geerntet oder trypsinisiert (2.2.1.1 S. 40 und 2.2.1.2, S. 40), 2 x mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt (2.2.1.3, S. 40). 1 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden in 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer + Proteaseinhibitoren (s. unten) resuspendiert und für 30 - 90 min bei 4 °C auf dem Invertierer (Rotator Drive STR 4, Stuart Scientific, Staffordshire, Großbritannien) lysiert. Das Lysat wurde bei 14000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert (Biofuge 28RS, Hereaus, Hanau, Deutschland) und der Überstand auf vorher äquilibrierte (3 x mit 500 µl eiskaltem PBS gewaschen und 1 min bei 10000 g zentrifugiert) 100 µl Protein-A-Agarose (Fast Flow, 100 µl pro 1 ml Zelllysate; Upstate, Schwalbach, Deutschland) gegeben. Das Zelllysate wurde 60 - 90 min bei 4 °C auf dem Invertierer inkubiert. Dies war nötig, um das Lysat von unspezifisch an die Agarose bindenden Proteine zu befreien. Die Protein-A-Agarose konnte dann bei 14000 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert werden und vom Überstand eine Proteinbestimmung (2.2.3.9, S. 56) durchgeführt werden. Das Zelllysate wurde dann mit PBS auf 1 mg/ml in 500 µl verdünnt, und der zu immunpräzipitierende Antikörper wurde anhand Tab. 2.27 (S. 59) zum Lysat dazugegeben. Das Lysat-/Antikörper-Gemisch wurde ÜN bei 4 °C unter leichtem Schütteln (Rotator Drive STR 4, Stuart Scientific, Staffordshire, Großbritannien) inkubiert. Der Immunkomplex konnte durch die Zugabe von 100 µl gewaschener Protein-A-Agarose und anschließender Inkubation für 60 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln präzipitiert werden. Der Immunkomplex wurde bei 16000 g für 15 s pelletiert und 3 x mit 800 µl eiskaltem RIPA-Puffer (ohne Proteaseinhibitoren) gewaschen, kurz anzentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die Protein-A-Agarose wurde in 50 µl 2 x Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit den Waschschrritten auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Zelllysate mit Protein-A-Agarose, aber ohne Antikörper inkubiert. Um die zu erwartenden Proteinbanden von den Proteinbanden der Antikörper, die der leichten und schweren Kette entsprechen, zu unterscheiden, wurde zusätzlich der Immunblot nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Spezifität	Antigen bzw. Klon und Hersteller	Spezies	[Konz]
RGS-His	RGSHHHHHH (Qiagen, Hilden, D)	Maus-monoklonal	5 µg/ml
GFP	JL-8 (Clontech, Mountain View, USA)	Maus-monoklonal	20 µg/ml
p53	pAb1620 (Calbiochem, Merck, Bad Soden, Deutschland)	Kaninchen-Monoklonal	1 µg/ml
p53	DO-7 (BD Pharmingen, San Diego, USA)	Maus-Monoklonal	2 µg/ml
TaSP	TaSP teilexprimiert (Schnittger <i>et al.</i> 2002) Charles River GmbH, Kisslegg, Deutschland	Kaninchen-Polyklonal	1,7 - 17 µg/ml
Tubulin	DM 1A (Sigma, St. Louis, USA)	Maus-Monoklonal	2 µg/ml

**Tab. 2.27** verwendete Antikörper für Immunpräzipitation

<b>RIPA-Puffer:</b>	50 mM Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland)-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1 % (v/v) Nonidet P-40 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 0,25 % (w/v) Desoxycholat (Fluka, Buchs, Schweiz)
<b>modifizierter RIPA-Puffer:</b>	RIPA-Puffer 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen, Deutschland, in 100 % Ethanol) 1 mM EDTA pH 7,4 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) je 1 µg/ml Aprotinin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Leupeptinhydrogensulfat (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), Pepstatin A (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 1 mM aktiviertes Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 1 mM NaF

### 2.2.3.15 TCA-Proteinfällung

Zur Aufkonzentrierung und zur Umpufferung von Proteinlösungen wurde die Methode der Proteinpräzipitation mittels Trichloressigsäure (TCA) nach Sambrook *et al.* (1989) angewandt. Hierfür wurde ein Volumen an 100 % TCA (Merck, Darmstadt, Deutschland) zu vier Volumeneinheiten der zu präzipitierenden Proteinlösung hinzugegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Die folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und 14000 g für 5 min (Biofuge 28RS, Hereaus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet 3 x mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde für 5 - 10 min bei 95 °C im Heizblock getrocknet und anschließend entweder in Probenpuffer für die SDS-PAGE (2.2.3.1, S. 51) oder in einem anderem gewünschten Puffer aufgenommen.

### 2.2.3.16 „Pull down“

Beim „pull down“ handelt es sich um eine *in vitro*-Methode zur Untersuchung einer physikalischen Interaktion zwischen zwei oder mehreren Proteinen.

In dieser Arbeit wurde eine spezielle magnetische Agarose-Matrix (Qiagen, Hilden, Deutschland), die mit einem Ni-NTA Komplex gebunden ist, verwendet. Somit konnte die immobilisierte Agarose-Matrix leicht durch Anlegen eines magnetischen Feldes abgetrennt werden.

Für den „pull down“ wurde ein Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die äquilibrierte (1 x 1 ml Waschpuffer nach Qiagen) magnetische Agarose-Matrix wurde mit 15 µg aufgereinigtem und dialysiertem Protein (= maximaler Bindungskapazität) mit 500 µl Waschpuffer versetzt und 30 - 60 min auf einem Invertierer (Rotator Drive STR 4, Stuart Scientific, Staffordshire, Großbritannien) inkubiert. Das Eppendorfgefäß wurde für 1 min in einen Magnetseparator gespannt und der Überstand abgenommen. Nachdem die Agarose mit 500 µl Interaktionspuffer gewaschen wurde, konnte entweder ein bestimmtes Protein oder das Zelllysate mit dem vermeintlich interagierenden Protein(en) zu dem Agarose-His-gebundenen-Protein-Komplex im Interaktionspuffer gegeben werden und ÜN bei 4 °C invertiert werden. Die immobilisierte Magnetagarose wurde 1 - 3 x mit je 500 µl Interaktionspuffer gewaschen, 1 min separiert und der Überstand abgenommen. Der Proteinkomplex wurde dann mit 50 µl Elutionspuffer für 10 min bei Raumtemperatur eluiert und sowohl das Eluat als auch die Agarose, gelöst in 50 µl 1 x Probenpuffer, wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.1, S. 51) und geblottet (2.2.3.5, S. 54).

Als Kontrolle dienen sowohl die immobilisierte Magnetagarose (mit ‚bait‘-Protein - ‚Köder‘-Protein, ohne ‚prey‘-Protein – ‚Beute‘-Protein) als auch die nicht immobilisierte Agarose, nur mit Interaktionspartner inkubiert (mit ‚prey‘-Protein, ohne ‚bait‘-Protein).

Des Weiteren wurde ein „ProFound Pull Down GST-Protein : Protein Interaction Kit“ von Pierce (Bonn, Deutschland) nach der Vorschrift des Herstellers für GST-markierte Proteine verwendet. Es wurden die gleichen Kontrollen wie oben schon erwähnt, benutzt und die Proben wurden ebenfalls in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet.

Puffer für pull down: Waschpuffer s. präparative Ni-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen (2.2.3.12 b), S. 57)

### 2.2.3.17 Assemblierung von Mikrotubuli

Für den ‚pull down assay‘ musste das  $\alpha$ -Tubulin zuvor polymerisiert werden. Dazu wurden 25  $\mu$ g des aufgereinigten  $\alpha$ -Tubulins aus Rinderhirn (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA), gelöst in 1 x PEM-Puffer mit 1 mM GTP (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA) mit 90  $\mu$ l Polymerisationspuffer versetzt und 30 min bei 37 °C im Heizblock (Eppendorf Thermo mixer compact; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

**1 x PEM-Puffer:**                    80 mM PIPES, pH 6,9  
    2 mM MgCl<sub>2</sub>  
    0,5 mM EGTA

**Polymerisationspuffer:**        1 x PEM-Puffer  
    10 % (v/v) Glycerin  
    10  $\mu$ M Taxol

## 2.3 Computer-Hardware und Software

Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe folgender Internetdienste durchgeführt. BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), SMART (<http://www.smart.embl-heidelberg.de>), SwissProt (<http://www.expasy.ch>) und PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>). Für Sequenzanalysen wurden die Programme DNA-Star (DNA-Star Inc.) und VectorNTI (Invitrogen) verwendet. Für das Designen von Primern wurde folgendes onlinebasiertes Programm verwendet: Primer 3 V. 0.4.0. (<http://frodo.wi.mit.edu>). Chemilumineszenzfilme (Amersham Biosciences) und getrocknete Polyacrylamidgele wurden mit einem Office Jet G55 Scanner (HP, Böblingen, Deutschland) und mit dem Programm Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert. Graphiken und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc.) oder Microsoft Powerpoint 2000 erstellt. Literatur wurde mit Reference Manager 10 archiviert. Die Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft WordXP.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zu einer möglichen Assoziation des Schizontenmembranproteins TaSP und Mikrotubuli der Wirtszelle

#### 3.1.1 TaSP kolokalisiert mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle

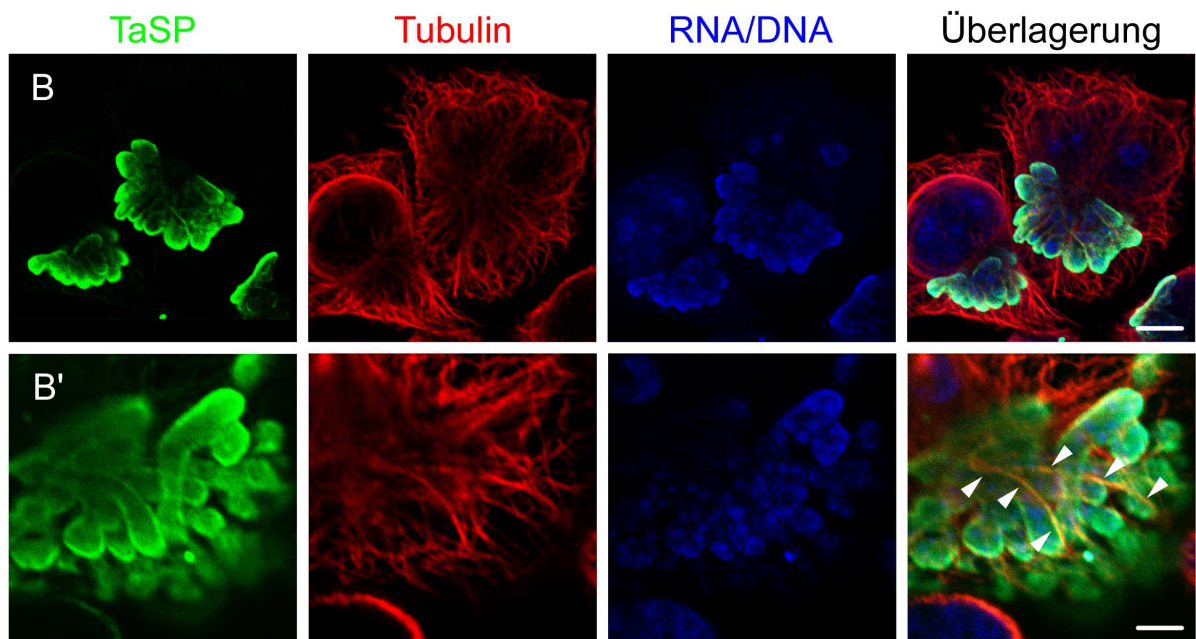
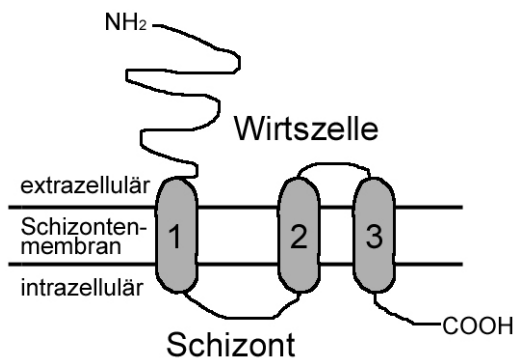
Eine wesentliche Bedeutung für die Vermehrung des Parasiten in der befallenen Wirtszelle hat seine gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen während der Mitose. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Prozess das Zusammenwirken von Wirtszell- und Parasitenproteinen erfordert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass *Theileria parva*-Schizonten mit den Mikrotubuli der Wirtszelle eng assoziiert vorliegen (Fawcett *et al.*, 1984). Da das Mikrotubuligerüst der Zelle eine wesentliche Funktion während der Mitose hat, wird postuliert, dass der Parasit durch die enge Assoziation dieses Gerüst nutzt, um die Verteilung des Schizonten auf die Tochterzellen bei der Mitose sicherzustellen. Als Kandidaten für eine solche Interaktion gelten Parasitenmembranproteine, die dem Zytoplasma der Wirtszelle zugewandt sind und damit mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle interagieren könnten. In diesem Zusammenhang wurden einige Parasitenmoleküle beschrieben, die an der Oberfläche der Schizonten exprimiert werden, z. B. TaSP (Schnittger *et al.*, 2002). Die bioinformatischen Daten des Proteins sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Danach ist TaSP ein Typ IIIa-Membranprotein mit einem abspaltbaren Signalpeptid an Aminosäure 20. Dabei ist die N-terminale Domäne, die auch die polymorphe Region des Proteins umfasst (Schnittger *et al.*, 2002), dem Zytoplasma zugewandt. Ein gegen diese polymorphe Region hergestelltes Antiserum wurde für Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des Proteins in Schizonten-infizierten Zellen herangezogen. Dabei konnte gezeigt werden, dass TaSP mit der Parasitenmembran kolokalisiert. Außerdem wurde durch Mikroinjektion des Fluorochrom- markierten anti-TaSP-Antiserum in das Zytoplasma der Wirtszelle gezeigt, dass der Antikörper an die Parasitenmembran bindet (Seitzer *et al.*, 2007). Durch diese vorangegangenen Experimente konnte belegt werden, dass TaSP ein Parasitenmembranmolekül darstellt und dass die polymorphe Region des TaSP-Proteins dem Zytoplasma der Wirtszelle zugewandt ist. Somit ist eine Kolokalisation von TaSP mit  $\alpha$ -Tubulin möglich. Um der Frage nachzugehen, ob TaSP einen möglichen Interaktionspartner des Tubulins der Wirtszelle darstellt, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Schizonten-infizierten Zellen durchgeführt und anschließend eine mögliche Kolokalisation auf subzellulärer Ebene mit konfokaler Mikroskopie analysiert.

Eigenschaft		Programm (Quelle)	TaSP
Molekulargewicht		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	35,45 kDa
Theoretischer pI		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	4,68
Aminosäurezusammensetzung		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	Leucin 9,6 % Prolin 9,6 %
Halbwertszeit		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	30 h
Stabilität		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	nicht stabil
Subzelluläre Lokalisation		PsortII <a href="http://psort.nibb.ac.jp/form2.html">http://psort.nibb.ac.jp/form2.html</a> Nakai and Horton, 1999	ER: 43.5 % Zellmembran: 26.1 % Mitochondrial: 13 %
		TopPred II <a href="http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/">http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/</a> Claros and von Heijne, 1994	3 Transmembran- helices (TypIIa)
Signalpeptid		TargetP 1.1 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP.html">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP.html</a>	AS 19/20: CEC-GP
Typ		SignalP 3.0 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.html">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.html</a>	sekretorisch
Post- translationale Modifikationen	Sumoylierung	SUMOplot <a href="http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot">http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot</a>	4
	Phosphorylierung	NetPhos 2.0 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>	Ser: 14 Thr: 4 Tyr: 2
	Kinase-abh. Phosphorylierung	NetPhosK 1.0 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/</a>	PKA/PKC CK I/CK II P38 MAPK GSK3 RSK
	Tyrosin- Sulfinierung	Sulfinator <a href="http://www.expasy.ch/tools/sulfinator/">http://www.expasy.ch/tools/sulfinator/</a>	AS 152

**Tab. 3.1 Vorhergesagte physikalische und biochemische Parameter von TaSP**

Dazu wurden TaA288-Zellen mit anti-TaSP-Antiserum zur Detektion des TaSP-Proteins und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper zur Detektion des Zytoskeletts inkubiert und die Bindung der Antikörper mit entsprechenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie detektiert und analysiert (Abb. 3.1 A und B). Dabei zeigte die Struktur der Schizontenmembran durch die Detektion des TaSP-Proteins eine starke Assoziation mit dem Mikrotubuliskelett der Wirtszelle. In der Überlagerung wirkt der Schizont in das Mikrotubulinetzwerk geradezu eingebettet (Abb. 3.1 A). Bei höherer Vergrößerung zeigte sich eine partielle Kolokalisation von TaSP (grünes Signal) mit  $\alpha$ -Tubulin (rotes Signal) in gelb (Abb. 3.1 B, Überlagerung), welche durch Überlagerung von rot und grün hervorgerufen wurde.

A



**Abb. 3.1 TaSP kolokalisiert mit dem Zytoskelett der Wirtszelle**

**A** Transmembrantopologie, vorhergesagt mit TMHMM 2.0. TaSP besitzt drei Transmembranhelices AS 204-226, AS 247-269 und AS 274-296. Der N-terminale Bereich des Proteins ragt ins Zytoplasma der Wirtszelle. Der C-terminale Bereich zeigt ins Zytoplasma des Schizonten. **B** und **B'** TaA288-Zellen wurden auf Objektträgern 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend mit Formaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Die Schizontenmembran wurde mit anti-TaSP-Antiserum (grünes Signal) und das Zytoskelett mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (rotes Signal) detektiert. Die DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid (blaues Signal) nachgewiesen. **B** zeigt drei mit *T. annulata* infizierte Leukozyten. **B'** zeigt Vergrößerung des Schizonten. Gelbe Bereiche markieren Kolokalisation von TaSP mit Tubulin. Pfeilspitzen zeigen die Kolokalisation von TaSP und Tubulin in gelb. Der Größenbalken in **B** entspricht 10  $\mu$ m und in **B'** 1  $\mu$ m.

Um zu testen, ob TaSP auch mit anderen Komponenten des Zytoskeletts kolokalisiert, wurde eine Doppelfärbung mit Aktin, nachgewiesen mit Rhodamin-Phalloidin, untersucht. Es konnte jedoch keine Kolokalisation mit den Aktinfilamenten der Wirtszelle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

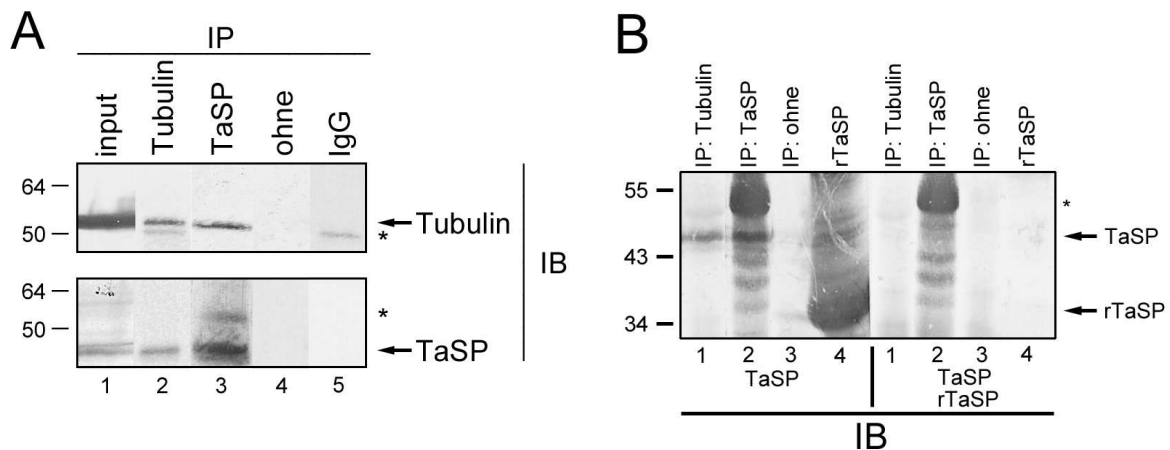
Diese Ergebnisse zeigen, dass TaSP teilweise mit Tubulin im Zytoplasma der infizierten Zellen kolokalisiert.

### 3.1.2 TaSP interagiert mit Tubulin *in vivo*

Die Kolo-kalisation von TaSP mit Tubulin veranlasste nun zu fragen, ob TaSP direkt mit dem Mikrotubulinnetzwerk der Wirtszelle interagiert. Dazu wurden reziproke Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Zelllysate von *T. annulata*-infizierten Leukozyten (TaA288) wurden mit anti-TaSP-Antiserum oder anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunpräzipitiert und mittels Western blot analysiert. Abbildung 3.2 zeigt, dass TaSP mit Tubulin koimmunpräzipitiert als auch umgekehrt (Abb. 3.2 A, Bahn 2 und 3). Dies ist an der 55 kDa-Bande des Tubulins und der 47 kDa-Bande des TaSP-Proteins zu erkennen. Diese Daten wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Protein-A-Agarose alleine präzipitierte kein TaSP bzw. Tubulin (Abb. 3.2 A, Bahn 4).

Um sicherzustellen, dass es sich bei der detektierten Proteinbande um das TaSP-Protein handelte, wurde der anti-TaSP-Antikörper mit seinem entsprechendem Antigen (rekombinantes TaSP-Protein) absorbiert und anschließend auf einen Western blot mit immunpräzipitiertem TaSP und rekombinantem TaSP als Kontrolle appliziert (Abb. 3.2 B). Mit dem präabsorbierten anti-TaSP-Antiserum wurde kein Signal detektiert, weder für das endogene TaSP (Abb. 3.2 B, Bahn 1) noch für das rekombinante TaSP (Abb. 3.2 B, Bahn 4, 34 kDa). Es handelte sich also bei der 47-kDa-Proteinbande in den Koimmunpräzipitations-Experimenten um TaSP.

Somit konnte gezeigt werden, dass TaSP *in vivo* direkt oder indirekt mit Tubulin interagiert.



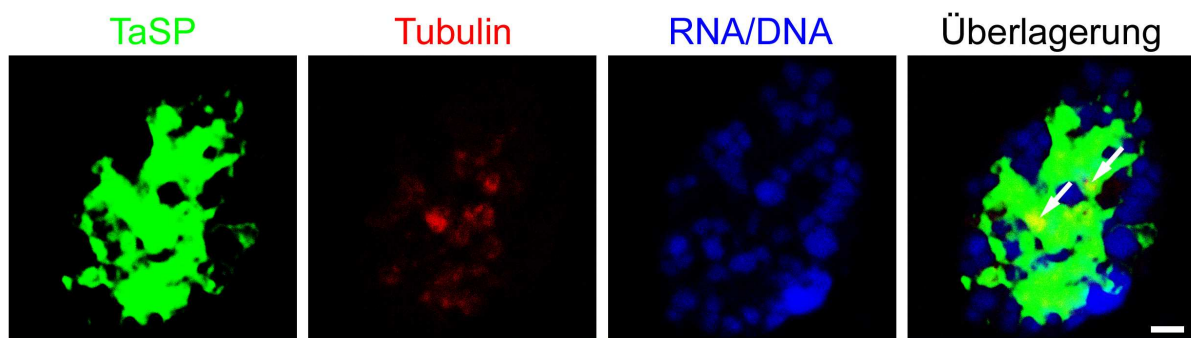
**Abb. 3.2 *in vivo*-Interaktion von TaSP mit Tubulin**

**A** Koimmunpräzipitation von TaSP und Tubulin. TaA288-Zelllysate wurde mit anti-TaSP-Antiserum, anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (Klon DM 1A) und ohne Antikörper (ohne) immunpräzipitiert (IP). Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und eine Immunblot-Analyse (IB) mit dem polyklonalen anti-TaSP-Antikörper und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper angeschlossen. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysat. Der Stern zeigt die leichte Kette des IgGs des jeweiligen Antikörpers. **B** Spezifität des detektierten Signals für TaSP-Koimmunpräzipitation. Der polyklonale TaSP-Antikörper wurde mit 16  $\mu$ g rekombinantem TaSP für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, bei 16000 g für 10 min abzentrifugiert und für den Immunblot eingesetzt. Rekombinantes TaSP (rTaSP), mit anti- $\alpha$ -Tubulin immunpräzipitiertes TaSP (IP Tubulin) und mit anti-TaSP immunpräzipitiertes TaSP (IP TaSP) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Immunblot (IB) mit dem anti-TaSP-Antikörper und dem absorbierten Antikörper (TaSP rTaSP) analysiert. Der Stern zeigt die IgG Bande (schwere Kette) des Antikörpers. Die TaSP-Bande ist nach der Präabsorption mit rTaSP nicht mehr detektiert.

### 3.1.3 Nachweis von $\alpha$ -Tubulin auf isolierten Schizonten

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass TaSP mit  $\alpha$ -Tubulin interagiert. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob diese Interaktion auch an isolierten Schizonten nachweisbar ist. Um Schizonten zu isolieren, ist es erforderlich, das Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle durch Behandlung mit Nocodazol zu zerstören. Anschließend wurden an diesen isolierten Schizonten eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung wie unter 3.1.1 durchgeführt und die Präparate am konfokalen Lasermikroskop analysiert (Abb. 3.3). Das TaSP-Signal (grün) und das  $\alpha$ -Tubulin-Signal (rot) wurden überlagert, um die Kolokalisation in gelb sichtbar zu machen. Die Pfeile in Abbildung 3.3 zeigen die kolokalisierten Bereiche von  $\alpha$ -Tubulin mit endogen exprimiertem TaSP. Trotz der Behandlung mit Nocodazol, einem Mikrotubuli-destabilisierenden Agens, bleibt Tubulin an der Oberfläche der isolierten Schizonten gebunden. Die Spezifität des Nachweises von  $\alpha$ -Tubulin wurde durch Präabsorptionsexperimente von anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper mit dem entsprechenden Antigen (isoliertes Tubulin aus Rinderhirnen) bestätigt (Daten nicht gezeigt). Keine Immunreaktivität konnte mit Maus-IgG (Isotypkontrolle) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass  $\alpha$ -Tubulin an isolierten Schizonten gebunden vorliegt und ein Teil dieses gebundenen  $\alpha$ -Tubulins mit dem Parasitenmembranprotein TaSP kolokalisiert. Da die Isolierung der Schizonten eine Zerstörung des Mikrotubulinetzwerkes mit Nocodazol beinhaltet, ist dieser Befund ein starker Hinweis für eine Interaktion von TaSP mit Tubulin, die entweder direkt oder indirekt über andere Parasiten- bzw. Wirtszellproteine vermittelt werden könnte.



**Abb. 3.3 Isolierte Schizonten binden Tubulin**

Schizonten aus TaA288-Zellen wurden isoliert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen TaSP und mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (Klon DM 1A), gefolgt von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid sichtbar gemacht. Die Pfeile zeigen die Kolokalisation von TaSP mit Tubulin. Der Größenbalken entspricht 1  $\mu$ m.

### 3.1.4 Assoziation von TaSP mit $\alpha$ -Tubulin im heterologen System

Um die oben beschriebenen Ergebnisse der Interaktion von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin in *T. annulata*-infizierten Zellen zu untermauern, wurde die polymorphe Region des TaSP-Proteins in verschiedenen Zelllinien exprimiert und anschließend eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen durch Kolokalisationsstudien und Koimmunpräzipitationsexperimente analysiert.

Dafür wurde ein N-terminales Fusionskonstrukt mit GFP (‘grün fluoreszierendes Protein’) mit der postulierten, extrazellulären, dem Wirtszellzytoplasma zugewandten Domäne des TaSP-Proteins hergestellt (Abb. 3.4 A) und in COS-7-Zellen exprimiert. Das TaSP-GFP-Konstrukt kodiert für ein 55 kDa-Protein als auch für ein 57 kDa-Protein (Daten nicht gezeigt), was auf die zwei verschiedenen Leserahmen von GFP zurückzuführen ist. Danach wurde die subzelluläre Lokalisation dieser exprimierten Proteine durch die Detektion der GFP-Fluoreszenz oder durch den Nachweis mit anti-TaSP-Antiserum bestimmt. Das TaSP-Protein wurde im Zytoplasma in granulären Strukturen, jedoch nicht in der Plasmamembran der Zellen nachgewiesen. Dies ist damit zu erklären, dass nur die extrazelluläre Domäne von TaSP ohne das N-terminale Signalpeptid und die Transmembranbereiche mit GFP fusioniert und exprimiert wurde. Die Verteilung von TaSP in granulären Strukturen im Zytoplasma wurde auch in anderen transfizierten Zellen wie HeLa- und CHO-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

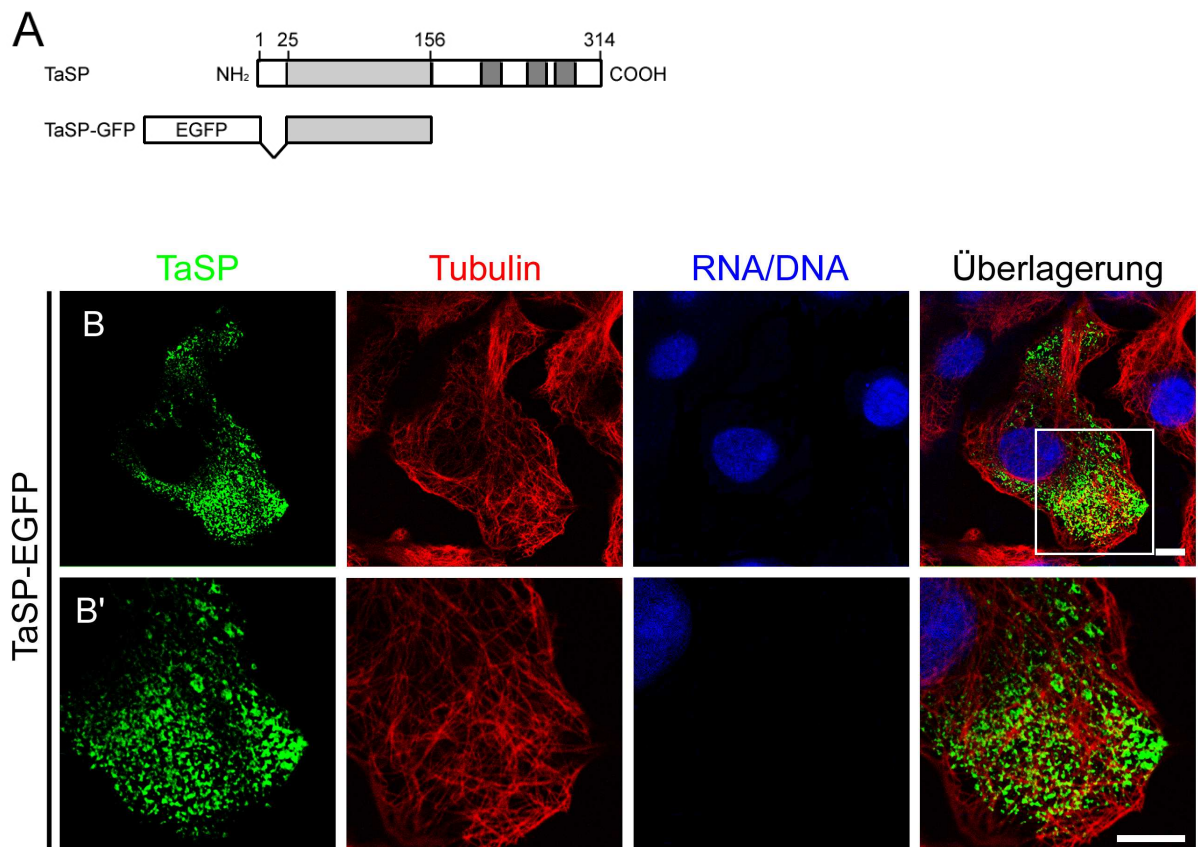
Interessanterweise zeigte TaSP-GFP eine partielle Kolokalisation mit dem Mikrotubulinnetzwerk (Abb. 3.4 B und B’). Die Assoziation mit den Mikrotubuli war besonders deutlich an der mitotischen Spindel in den verschiedenen Phasen der Mitose erkennbar. Die Abbildung 3.4 stellt die unterschiedlichen Zellzyklusphasen dar: die Prophase (C), Metaphase (D und D’) und Zytokinese (E). In der Zytokinese (E) ist das überexprimierte TaSP auch am Midbody lokalisiert.

Der Phänotyp der TaSP-überexprimierenden Zellen zeigte keine auffallenden Merkmale. Es wurden keine Mikrotubulibündel gebildet, die mit TaSP kolokalisierten, was für eine stabilisierende Wirkung von TaSP auf das Mikrotubulinnetzwerk sprechen würde. Des Weiteren wurde die Zytokinese offenbar nicht unterbrochen, was an multiplen Zellkernen zu erkennen gewesen wäre. Diese Interpretation wird dadurch untermauert, dass nur in sehr wenigen (1 von 50) der transfizierten Zellen (COS-7 und HeLa) eine Multinukleation beobachtet wurde.

Als Kontrolle wurden Zellen nur mit einem GFP-exprimierenden Konstrukt transfiziert. In diesen Zellen wurde GFP auch im Zytoplasma nachgewiesen, wobei die Verteilung des Proteins diffus war und keine besonderen Strukturen aufwies (Abb. 3.4 F). Zur Kontrolle des spezifischen Nachweises von TaSP wurden nicht-transfizierte Zellen mit dem TaSP-Antiserum untersucht, wobei kein TaSP nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

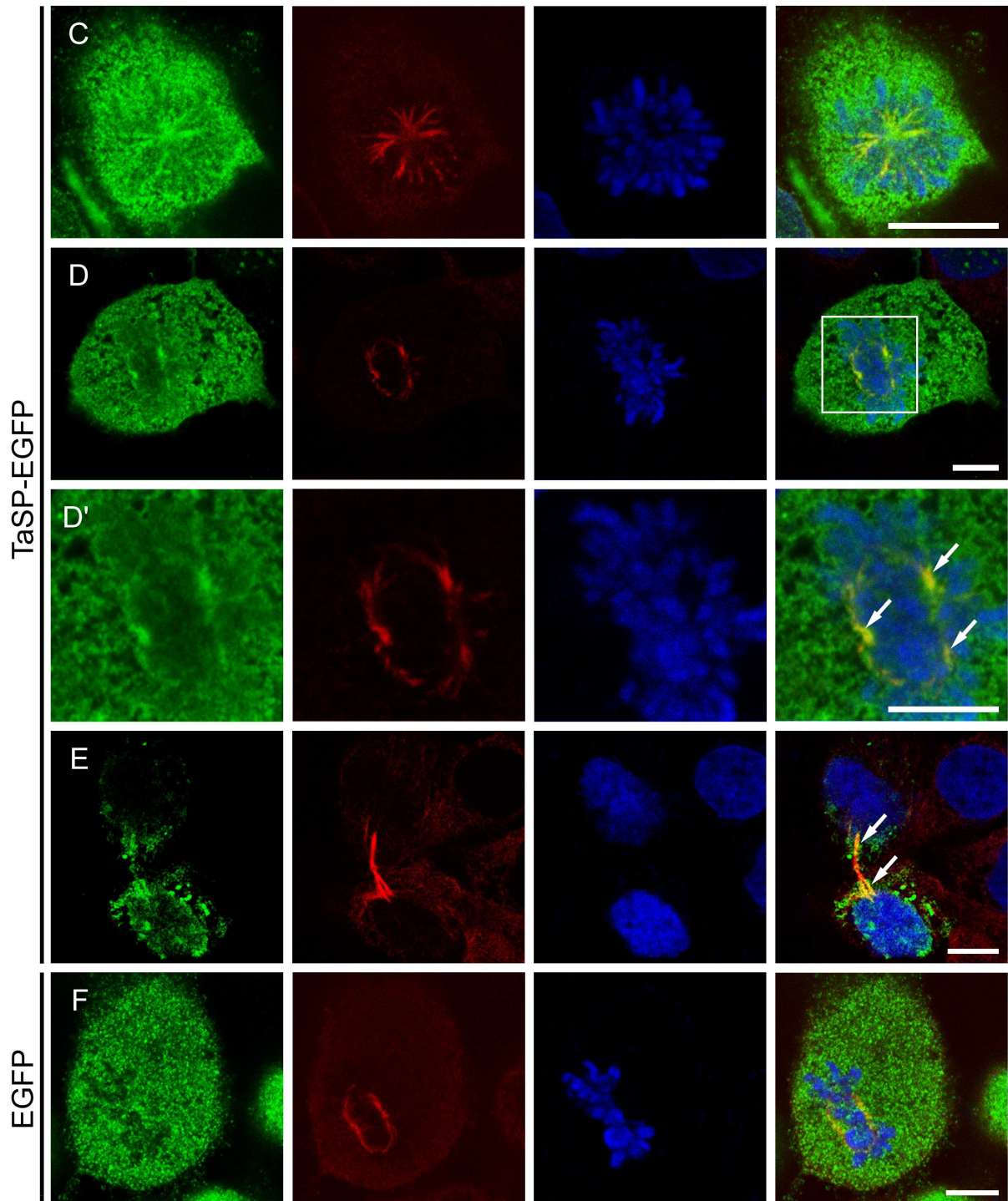
Laut bioinformatischer Analyse mit dem Programm ProtPara besitzt das GFP-Fusionsprotein allerdings ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 44 bzw. 46 kDa. Das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE sind Hinweise für eine posttranslationale Modifikation des Proteins.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der überexprimierte zytoplasmatische Bereich von TaSP in granulären Strukturen im Zytoplasma der transfizierten COS-7-Zellen lokalisiert und mit Tubulin kolokalisiert, wobei dies besonders an der mitotischen Spindel zu beobachten war.



**Abb. 3.4 TaSP kolokalisiert *in vivo* mit den Mikrotubuli in verschiedenen Zellphasen des Zellzyklus**

**A** Schema des cDNA-Konstrukts, das für die Überexpression im heterologen System verwendet wurde. Das Expressionskonstrukt wurde aus cDNA von *T. annulata* hergestellt. Das Protein besitzt einen N-terminalen GFP-Tag. In Dunkelgrau sind die Transmembrandomänen von TaSP dargestellt; hellgrau zeigt die klonierte extrazelluläre Domäne von TaSP. **B - G** Kolokalisationsstudien von TaSP in COS-7-Zellen. Das mit GFP fusionierte TaSP wurde in COS-7 überexprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit anti-TaSP-Antiserum und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper angefärbt. DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid gegengefärbt. **B** Interphase **B'** Interphase, vergrößert DNA bzw. RNA wurde ebenfalls mit Toto-3-jodid nachgewiesen. Der Größenbalken entspricht 5  $\mu$ m.

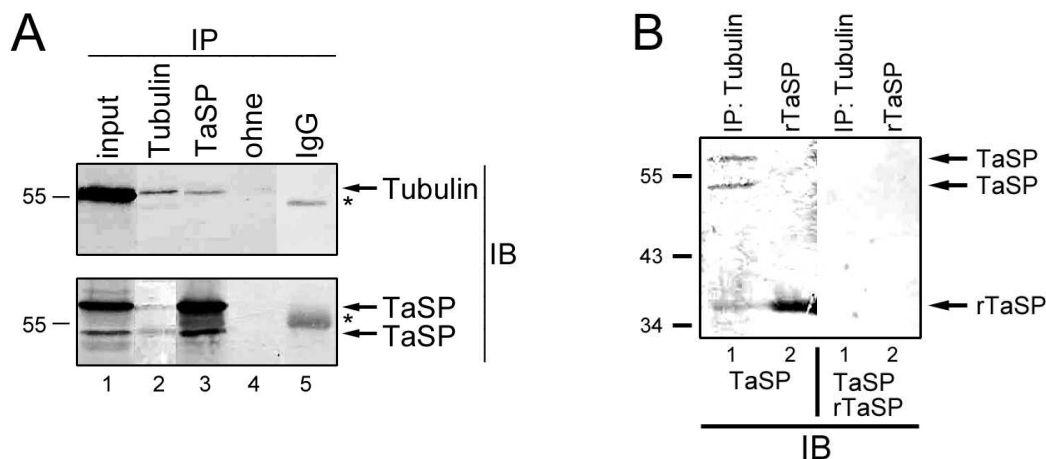


**Abb. 3.4 TaSP kolokalisiert *in vivo* mit den Mikrotubuli in verschiedenen Zellphasen des Zellzyklus**

**A** Schema des cDNA-Konstrukts, das für die Überexpression im heterologen System verwendet wurde. Das Expressionskonstrukt wurde aus cDNA von *T. annulata* hergestellt. Das Protein besitzt einen N-terminalen GFP-Tag. In Dunkelgrau sind die Transmembrandomänen von TaSP dargestellt; hellgrau zeigt die klonierte extrazelluläre Domäne von TaSP. **B - G** Kolokalisationsstudien von TaSP in COS-7-Zellen. Das mit GFP fusionierte TaSP wurde in COS-7 überexprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit anti-TaSP-Antiserum und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper angefärbt. DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid gegengefärbt. **C** Prophase **D** Metaphase **D'** Metaphase, vergrößert **E** Telophase. Die Pfeile zeigen die partielle Kolokalisation von TaSP mit der mitotischen Spindel in der Metaphase und Telophase. **F** GFP wurde in COS-7 Zellen transfiziert und mit anti- $\alpha$ -Tubulin angefärbt. DNA bzw. RNA wurde ebenfalls mit Toto-3-jodid nachgewiesen. Der Größenbalken entspricht 5  $\mu$ m.

Weiterführend zu den Kolokalisationsstudien wurden Koimmunpräzitationen durchgeführt, um eine physikalische Interaktion zwischen TaSP und Tubulin zu untersuchen. Dazu wurde das TaSP-GFP-Konstrukt in COS-7-Zellen transient überexprimiert und das Zelllysate mit anti-TaSP-Antiserum bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin oder ohne Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 3.5 A). TaSP kopräzipitierte mit Tubulin (Abb. 3.5 A, Bahn 3 oben) und umgekehrt (Abb. 3.5 A, Bahn 2 unten). Das immunpräzipitierte Tubulin besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDa, wohingegen das immunpräzipitierte TaSP in zwei unterschiedlich großen Banden - bedingt durch die zwei verschiedenen Leserahmen - bei ca. 55 kDa und 57 kDa detektiert wurde. In der Kontroll-Immünpräzipitation ohne Antikörper konnte kein Signal detektiert werden (Bahn 4). In Bahn 5 ist die schwere Kette des immunpräzipitierenden Antikörpers zu sehen. In mit dem Leervektor transfizierten Zellen konnte durch Koimmunpräzipitation im Immunblot kein Tubulin und auch kein TaSP nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Spezifität des Nachweises von TaSP wurde durch Präabsorptionsexperimente von anti-TaSP-Antiserum mit dem Antigen in Form von rekombinarem TaSP bestätigt (Abb. 3.5 B). Das Signal für TaSP war hier nicht mehr nachweisbar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die vorher in infizierten Zellen nachgewiesene Interaktion von TaSP mit Tubulin auch im heterologen System mit transfizierten Zellen sowohl in Kolokalisations- als auch in Koimmunpräzitations-Experimenten nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die postulierte zytoplasmatische Domäne von TaSP, die in das Zytoplasma der Wirtszelle gerichtet ist, die Interaktion mit Tubulin vermittelt.

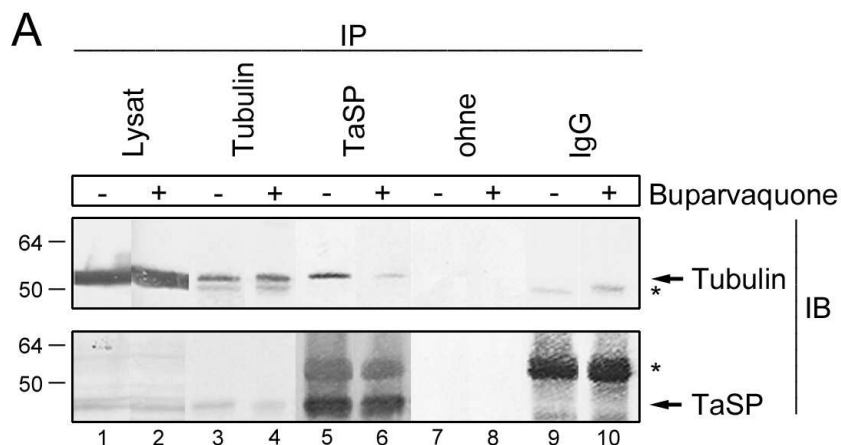


**Abb. 3.5 TaSP interagiert mit Tubulin in transfizierten COS-7-Zellen**

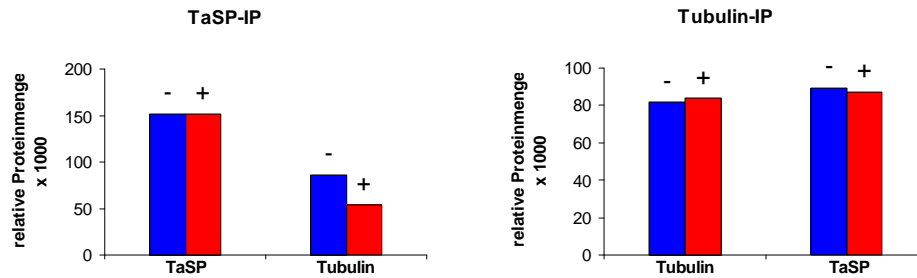
Koimmunpräzitation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin in transfizierten COS-7-Zellen. **A** Das Fusionsprotein TaSP-GFP (Abb. 3.4 A) wurde transient in COS-7-Zellen exprimiert. Die Lysate wurden mit anti-TaSP-Antiserum und anti- $\alpha$ -Tubulin oder ohne Antikörper (ohne) immunpräzipitiert (IP). Immunpräzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließend Immunblot (IB) mit anti-TaSP bzw.  $\alpha$ -Tubulin analysiert. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysat. Der Stern markiert das IgG (schwere Kette) des entsprechenden Antikörpers. **B** Spezifität der TaSP-Immünpräzipitation. Der TaSP-Antikörper wurde gegen rekombinantes TaSP (rTaSP) absorbiert und auf den Immunblot (IB) appliziert. Die TaSP Banden (55 kDa und 57 kDa) sind nach der Präabsorption des TaSP Antikörpers nicht mehr nachweisbar.

### 3.1.5 Die TaSP-Tubulin-Assoziation ist parasitenabhängig

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, interagiert der Schizont mit den Mikrotubuli der Wirtszelle. Dieser Prozess ist ein wichtiger Schritt für die Verteilung der Parasiten auf die Tochterzellen der infizierten Zellen und die Aufrechterhaltung der Transformation (Dobbelaere & Heussler, 1999). Ferner ist bekannt, dass eine Behandlung mit dem theileriziden Wirkstoff Buparvaquone zur Abtötung der Parasiten und damit zur Inhibierung der Wirtszellproliferation führt. Deshalb stellt sich die Frage, ob die Behandlung der Zellen mit Buparvaquone einen Einfluss auf die beobachtete Interaktion von TaSP mit Tubulin hat. Zu diesem Zweck wurden TaA288-Zellen für 24 h mit 0,05 µg/µl Buparvaquone behandelt und anschließend einer reziproken Koimmunpräzipitation (Abb. 3.6 A) unterzogen. Es wurde sowohl mit anti-TaSP-Antiserum als auch mit anti- $\alpha$ -Tubulin immunpräzipitiert. Die resultierten Immunkomplexe wurden dann in einer SDS-PAGE getrennt und nachfolgend im Immunblot analysiert. Durch Western blot konnte gezeigt werden, dass nach der Buparvaquonebehandlung weniger Tubulin mit anti-TaSP-Antiserum immunkoppräzipitiert (Abb. 3.6 A, Bahn 6 oben) als ohne Behandlung (Bahn 5 oben), obwohl die gleiche Menge an TaSP mit anti-TaSP-Antiserum mit (Bahn 6 unten) oder ohne Buparvaquonebehandlung (Bahn 5 unten) immunpräzipitiert. Umgekehrt war keine Veränderung in der relativen Proteinmenge von immunkoppräzipitierten TaSP mit  $\alpha$ -Tubulin zu erkennen (Bahn 3 und 4 unten). Eine Erklärung für diese Beobachtung liegt wahrscheinlich darin, dass im Vergleich zur anti-TaSP-Immunkoppräzipitation relativ wenig Tubulin mit dem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunpräzipitiert werden konnte, sodass eine Veränderung der Menge an koimmunpräzipitierten TaSP nicht offensichtlich wird. In Abwesenheit der spezifischen Antikörper konnte weder TaSP noch Tubulin immunpräzipitiert werden (Abb. 3.6 A, Bahn 7 und 8). Die semiquantitative densitometrische Auswertung der Proteinbanden im Western blot mit Image J unterstreicht die oben ausgeführten Beobachtungen (Abb. 3.6 B). Nach der Buparvaquonebehandlung wurden also etwa 37 % weniger Tubulin mit TaSP koimmunpräzipitiert, wohingegen keine wesentliche Änderung in den Koimmunpräzipitations-Experimenten mit dem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper vorlag (Abb. 3.6 B, rechte Grafik).



B



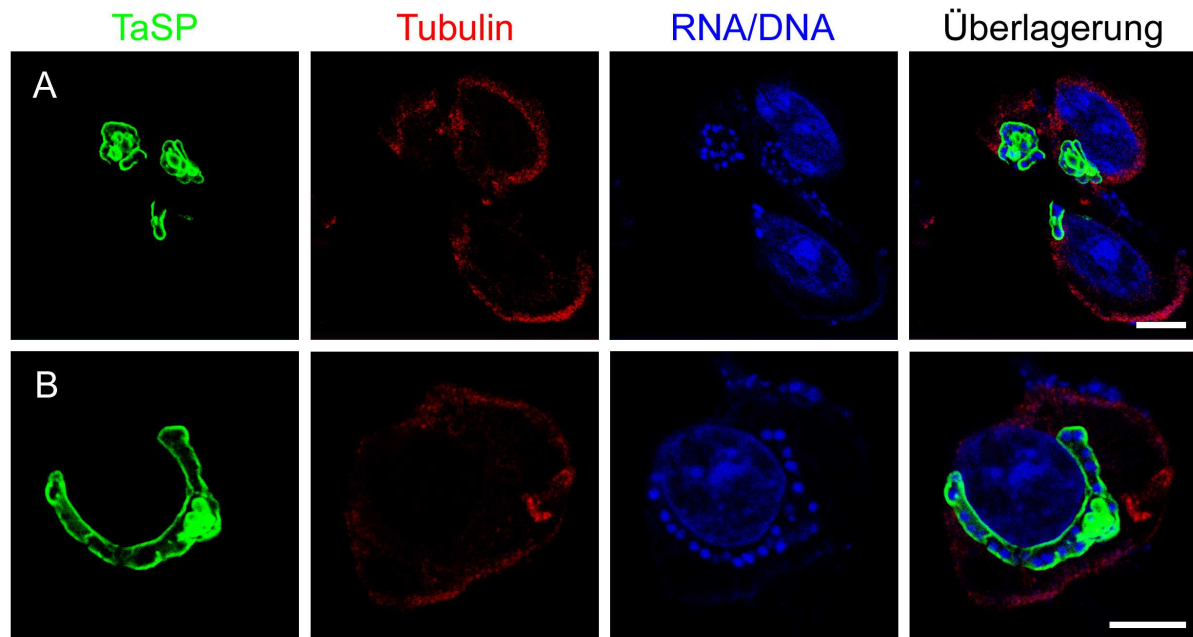
**Abb. 3.6 Die TaSP-Tubulin-Interaktion ist abhängig vom Parasiten**

**A** Koimmunpräzipitation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin mit und ohne Buparvaquonebehandlung. TaA288-Zellen wurden mit 0,05  $\mu$ g Buparvaquone für 24 h behandelt. Lysat von behandelten (+) und unbehandelten (-) TaA288-Zellen wurde mit anti-TaSP- bzw.  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunpräzipitiert (IP) und in einer SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, gefolgt von einem Immunblot (IB) mit anti-TaSP und  $\alpha$ -Tubulin. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysat. Der Stern kennzeichnet das IgG (schwere Kette) des Antikörpers. **B** Semiquantitative Auswertung der Immunblots der Koimmunpräzipitation. Die Western blots wurden eingescannt und die Proteinbanden semiquantitativ mit Image J ausgewertet. Links, die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit anti-TaSP; Rechts, die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Tubulin. Es wird weniger Tubulin koimmunpräzipitiert nach Buparvaquonebehandlung.

### 3.1.6 Einfluss von Nocodazol auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubulinetzwerk

Die Behandlung von infizierten Zellen mit Nocodazol führt zur Zerstörung des Mikrotubulinetzwerkes und ermöglicht damit die Aufhebung der Assoziation des Schizonten mit dem Mikrotubulinetzwerk (Shaw, 1999). Unter Einbeziehung der oben beschriebenen Daten bezüglich der Bindung von TaSP an Tubulin, ist die Frage zu stellen, ob die Behandlung der infizierten Zellen mit Nocodazol diese Bindung beeinflussen kann.

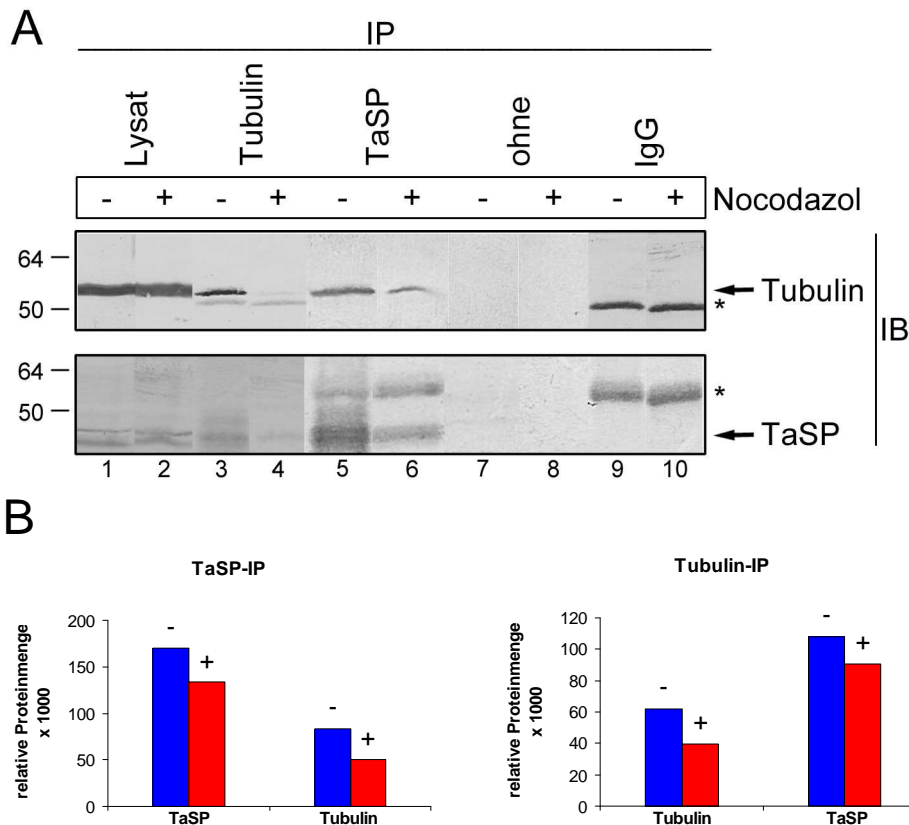
Um dies zu untersuchen, wurden *T. annulata*-infizierte Zellen für 16 h mit dem Mikrotubulidepolymerisierenden Reagenz Nocodazol (40  $\mu$ M) behandelt, mit anti-TaSP- und  $\alpha$ -Tubulin-Antiserum immundoppelgefärbt und die Lokalisation der beiden Proteine anschließend am konfokalen Lasermikroskop bestimmt (Abb. 3.7). Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol führte zur Zerstörung der Mikrotubuli, welches sich in einem amorphen Verteilungsmuster der  $\alpha$ -Tubulin-Färbung in den Zellen zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte TaSP ein unverändertes Verteilungsmuster auf der Parasitenoberfläche sowohl in behandelten Abb. 3.7 A und B) als auch in unbehandelten Zellen (Abb. 3.1, S. 64). Dennoch war eine Kollokalisierung mit Tubulin nicht detektierbar.



**Abb. 3.7 TaSP kolokalisiert nicht mit Tubulin nach Nocodazolbehandlung**

**A** und **B** TaA288-Zellen wurden auf Objektträgern 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und danach mit 40 µM Nocodazol behandelt. Nach 16 h wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Die Schizontenmembran wurde mit anti-TaSP-Antiserum (grünes Signal) und das Zytoskelett mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (rotes Signal) detektiert. Die DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid (blaues Signal) nachgewiesen. Das Mikrotubulinetzwerk ist komplett zerstört und es ist keine Kolokalisation von TaSP mit  $\alpha$ -Tubulin mehr nachweisbar. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Parallel zu den Kolokalisationsstudien an Nocodazol-behandelten infizierten Zellen wurden reziproke Koimmunpräzipitationsversuche mit anti-TaSP-Antiserum und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper durchgeführt, um die Auswirkung der Zerstörung des Mikrotubulinetzwerkes auf die biochemische Interaktion zwischen TaSP und Tubulin zu untersuchen. Dazu wurden mit *T. annulata*-infizierte Leukozyten über Nacht mit 40 µM Nocodazol behandelt und das Zelllysate mit anti-TaSP-Antiserum oder mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper einer Immunpräzipitation unterzogen. Die Präzipitate wurden mit einer SDS-PAGE, gefolgt von einem Immunblot, analysiert. Es wurden sowohl Nocodazol-behandelte als auch unbehandelte Zellen untersucht (Abb. 3.8 A). Es zeigte sich, dass nach der Nocodazolbehandlung weniger Tubulin zusammen mit TaSP kopräzipitierte (Abb. 3.8 A, Bahn 6 oben). Im Gegensatz dazu konnte in den Nocodazol-behandelten Zellen nur sehr wenig  $\alpha$ -Tubulin mit dem anti-Tubulin-Antikörper präzipitiert werden (Bahn 4 oben). Folglich wurde auch eine verringerte Kopräzipitation von TaSP beobachtet (Bahn 4 unten). Dies wurde ebenfalls durch die semiquantitative Auswertung der Proteinbanden im Western blot bestätigt (Abb. 3.8 B). Demzufolge war deutlich weniger Tubulin mit TaSP in den behandelten Zellen assoziiert (Abb. 3.8 B, linke Grafik).



**Abb. 3.8 TaSP bindet weniger Tubulin nach Nocodazolbehandlung**

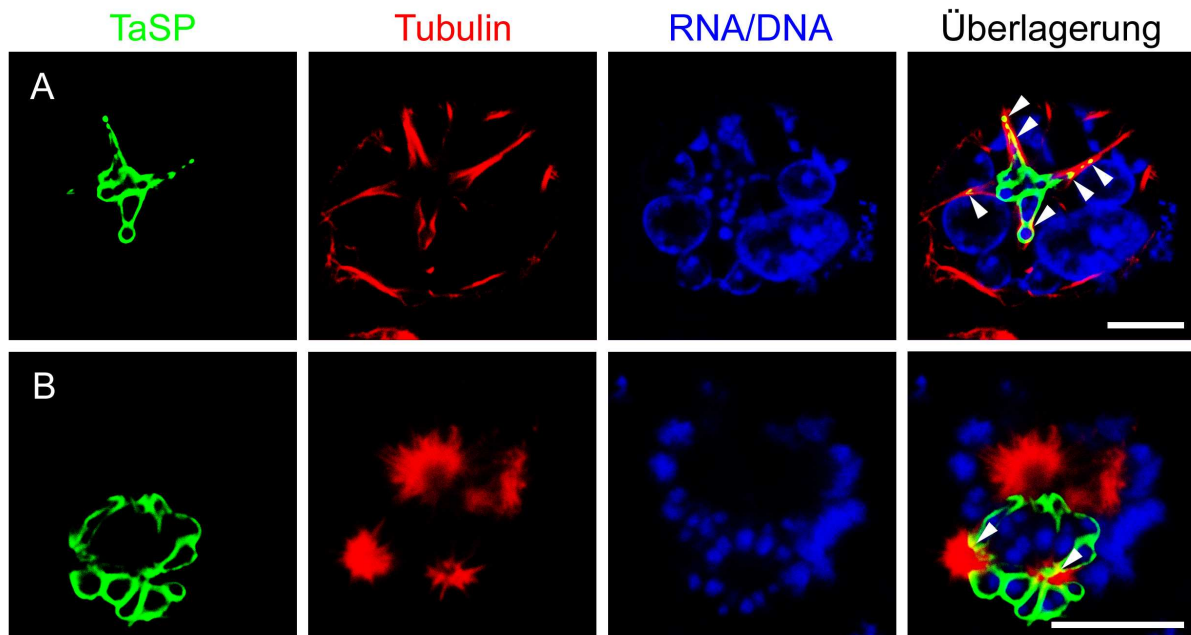
**A** Koimmunpräzipitation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin mit und ohne Nocodazolbehandlung. TaA288-Zellen wurden mit 40  $\mu$ M Nocodazol über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lysate der behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurden mit anti-TaSP-Antiserum oder anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunpräzipitiert (IP), der Immunkomplex wurde elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunblot (IB) mit anti-TaSP und  $\alpha$ -Tubulin analysiert. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysat. Der Stern kennzeichnet das IgG (schwere Kette) des jeweiligen Antikörpers. **B** Semiquantitative Auswertung der Immunblots der Koimmunpräzipitation. Die Western blots wurden eingescannt und die Proteinbanden semiquantitativ mit Image J ausgewertet. Der linke Graph zeigt die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit anti-TaSP-Antiserum; der rechte Graph die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper.

### 3.1.7 Einfluss von Taxol auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubulinnetzwerk

Wie bereits zuvor gezeigt, wirkt Nocodazol destabilisierend auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubuli-Netzwerk. Deshalb stellt sich die Frage, wie sich eine Stabilisierung der Mikrotubuli unter Verwendung eines Mikrotubuli-stabilisierenden Agens, wie z. B. Taxol, auf die beobachtete Interaktion zwischen TaSP und  $\alpha$ -Tubulin auswirkt.

Dazu wurden TaA288-Zellen mit 10  $\mu$ M Taxol für 18 Stunden inkubiert, mit anti-TaSP- und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antiserum behandelt, die Bindung der Antikörper mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern nachgewiesen und durch konfokale Lasermikroskopie analysiert (Abb. 3.9). Dabei zeigte sich ein auffallend verändertes Verteilungsmuster von TaSP, welches vermehrt mit den assemblierten Mikrotubuli kolokalisierte (Abb. 3.9 A). Da Taxol das Fortschreiten der Mitose inhibiert und die Zellen in der G<sub>2</sub>- und M-Phase des Zellzyklus anhält, konnten in einigen Zellen multiple mitotische Astern beobachtet werden. An diesen konnte ebenfalls eine partielle Kolokalisation mit TaSP beobachtet werden (Abb. 3.9 B). Verglichen mit unbehandelten Zellen (Abb. 3.1, S. 64)

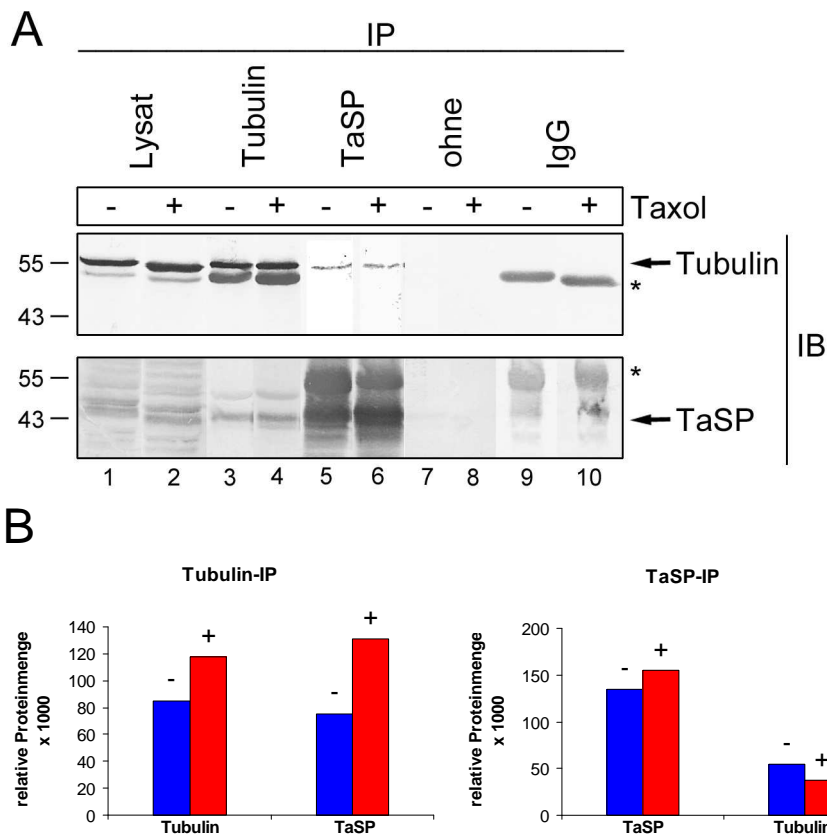
scheint es eine vermehrte Kollokalisierung von TaSP mit den Mikrotubuli in Taxol-behandelten Zellen zu geben.



**Abb. 3.9 TaSP zeigt eine stärkere Kollokalisierung mit dem Mikrotubulinetzwerk nach Taxolbehandlung**

**A** und **B** TaA288-Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und mit 10  $\mu\text{M}$  Taxol behandelt. Nach 18 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert, permeabilisiert und einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit anti-TaSP-Antiserum (grünes Signal) und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (rotes Signal) unterzogen. DNA bzw. RNA (blau) wurde mit Toto-3-jodid gegengefärbt. Die Pfeilspitzen zeigen die Überlagerung des grünen und des roten Signals in gelb. **A** zeigt stabilisierte Mikrotubuli. In **B** sind mitotische Astern zu sehen. Der Größenbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Um dies biochemisch zu untersuchen, wurden anschließend Immunpräzipitationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden *T. annulata-infizierte* Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Taxol für 18 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert und mit anti- $\alpha$ -Tubulin- oder anti-TaSP-Antiserum immunpräzipitiert. Abbildung 3.10 zeigt, dass der anti-Tubulin-Antikörper TaSP (Bahn 3 und 4 unten) und umgekehrt der polyklonale anti-TaSP-Antikörper Tubulin mit und ohne Taxolbehandlung kopräzipitierte (Bahn 5 und 6 oben). In den Kontrollansätzen (IgG, IP ohne Antikörper) war kein Signal detektierbar. Die semiquantitative Auswertung ergab zwar, dass etwas mehr TaSP zusammen mit  $\alpha$ -Tubulin nach Inkubation mit Taxol kopräzipitierte (Abb. 3.10 B, linke Grafik), umgekehrt war allerdings kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 3.10 B, rechte Grafik). Es lässt sich also festhalten, dass TaSP biochemisch nicht verstärkt polymerisierte Mikrotubuli bindet.



### Abb. 3.10 Assemblierte Mikrotubuli assoziieren mit TaSP

Koimmunpräzipitation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin mit und ohne Taxolbehandlung. **A** TaA288-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Taxol über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lysate der behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen wurden mit anti-TaSP-Antiserum oder anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunpräzipitiert (IP). Der Immunkomplex wurde elektrophoretisch getrennt und im Immunblot (IB) mit anti-TaSP-Antiserum und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper analysiert. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysat. Der Stern kennzeichnet das IgG (schwere Kette) des jeweiligen Antikörpers. **B** Semiquantitative Auswertung der Immunblots der Koimmunpräzipitation. Die Western blots wurden eingescannt und die Proteinbanden semiquantitativ mit Image J ausgewertet. Der linke Graph zeigt die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit anti-TaSP-Antiserum; der rechte Graph die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper.

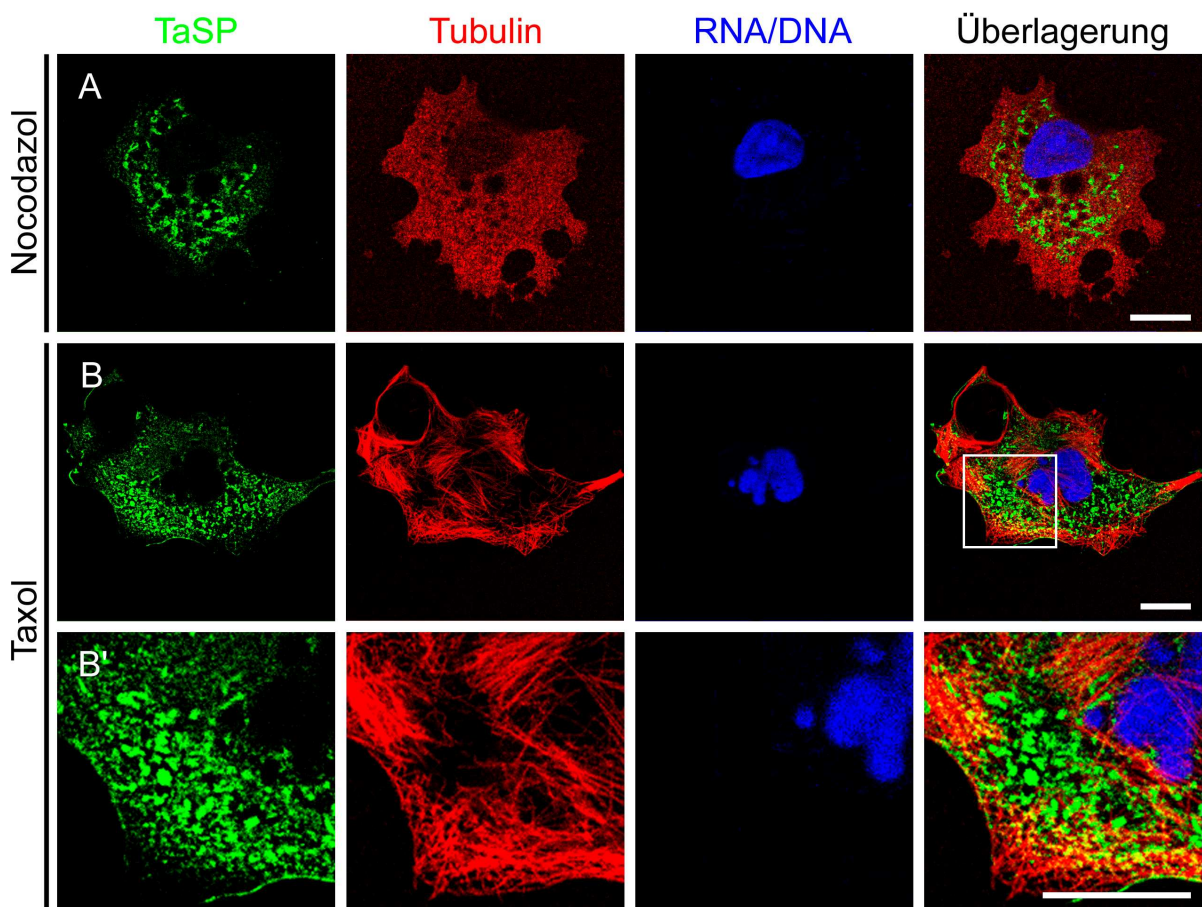
### 3.1.8 Einfluss von Taxol und Nocodazol auf die Assoziation von TaSP mit dem Mikrotubulinetzwerk in transfizierten Zellen

Wie zuvor dargestellt, sind TaSP und Tubulin sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen miteinander assoziiert. Darüber hinaus wurde in infizierten Zellen nachgewiesen, dass Nocodazol zu einer verminderten Interaktion führte, während Taxol keinen auffälligen Einfluss auf diese Assoziation ausübte. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde TaSP ektopisch in COS-7-Zellen exprimiert. Diese Zellen wurden anschließend für 16 h mit Nocodazol oder Taxol behandelt und daraufhin immundoublegefärbt, um die subzelluläre Lokalisation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin durch konfokale Lasermikroskopie zu analysieren (Abb. 3.11 A und B).

Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol führte zur Zerstörung der Mikrotubuli. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war die Lokalisation von TaSP unverändert und lag im Zytoplasma in granulären Strukturen vor (Abb. 3.11 A). Es war keine Kolo-kalisation mit Tubulin detektierbar.

Die Behandlung der transfizierten Zellen mit Taxol resultierte in polymerisierten und gebündelten Mikrotubuli. Exogenes TaSP wurde in den Zellen in granulären Strukturen detektiert (Abb. 3.11 B). In der Überlagerung der Signale für TaSP und Tubulin zeigte sich eine stärkere Kolo-kalisation als in unbehandelten Zellen (Abb. 3.4 B und B', S. 68), besonders in den peripheren Bereichen der Zellen (Abb. 3.11 B'). Dies bestätigt noch mal das Ergebnis der zuvor gewonnenen Daten in infizierten Zellen.

Als Kontrolle für die oben durchgeführten Versuche dienten COS-7-Zellen, in denen nur GFP exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Es wurde kein Einfluss auf die Verteilung von GFP in der Zelle nach Nocodazol- bzw. Taxolbehandlung beobachtet.



**Abb. 3.11 Einfluss von Nocodazol und Taxol auf die TaSP-Tubulin-Assoziation in transfizierten Zellen**

**A - C** Das Fusionsprotein TaSP-GFP (Abb. 3.4 A) wurde in COS-7-Zellen exprimiert und anschließend entweder mit 10  $\mu\text{M}$  Taxol oder 10  $\mu\text{M}$  Nocodazol für 16 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Zellen wurden mit anti-TaSP-Antiserum (grünes Signal) und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (rotes Signal) doppelgefärbt. DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid (blau) sichtbar gemacht. **A** Transfizierte COS-7-Zelle nach Nocodazolbehandlung. **B** Transfizierte COS-7-Zelle nach Taxolbehandlung. **B'** Transfizierte COS-7-Zelle nach Taxolbehandlung; vergrößert. Der Größenbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.9 TaSP interagiert mit Tubulin in den verschiedenen Zellzyklusphasen

In diesem Teil der Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin in verschiedenen Zellzyklusphasen infizierter Zellen untersucht werden.

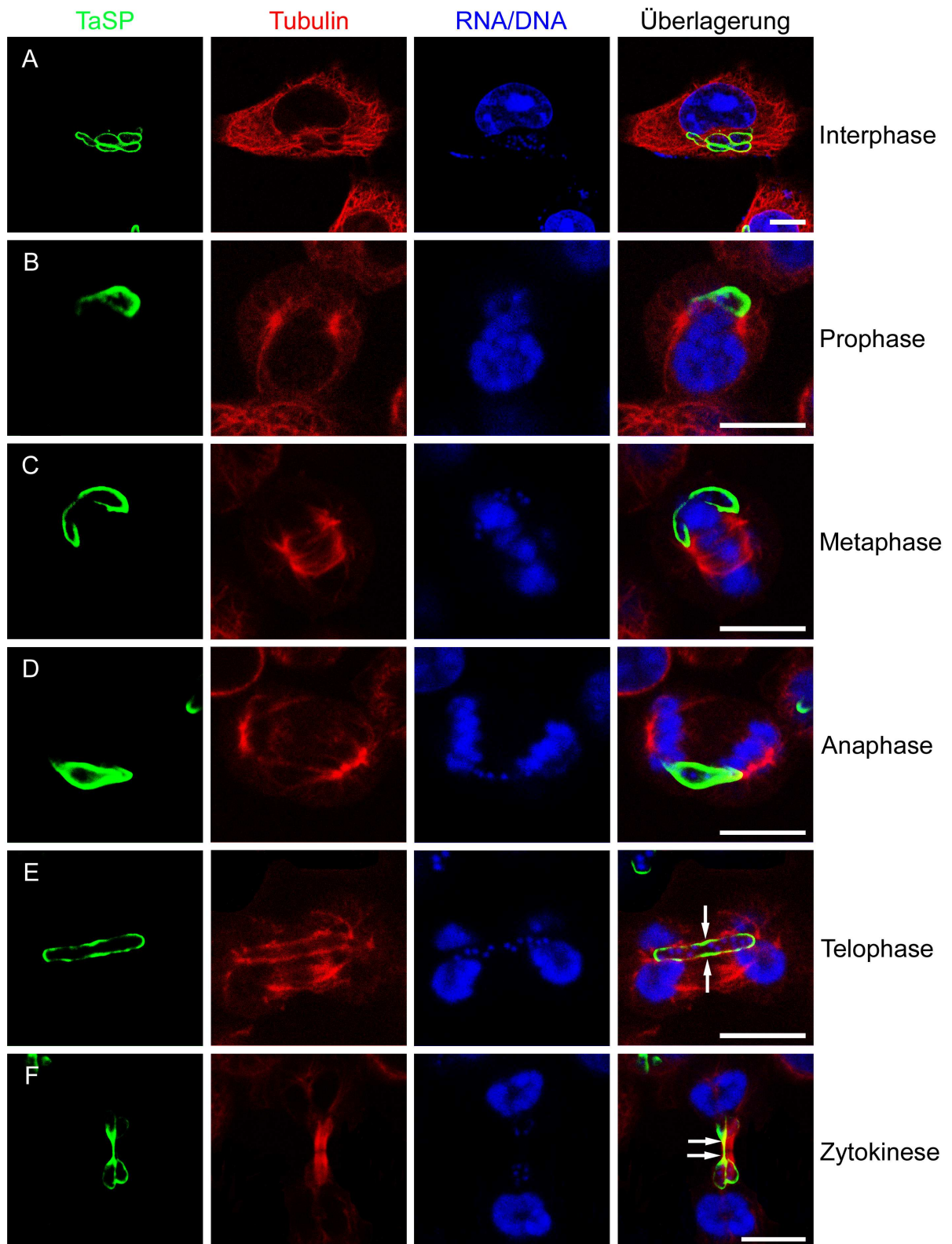
Dazu wurden Doppelimmunfluoreszenzanalysen mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper und anti-TaSP-Antiserum durchgeführt, um die Kolo­kalisierung der beiden Proteine zu analysieren. Dabei wurden die Zellzyklusphasen anhand der Strukturen des Mikrotubulinnetzwerkes und des Zellkerns bestimmt.

Hierfür wurden TaA288-Zellen in einem Mikrotubuli-stabilisierenden Puffer inkubiert, mit Methanol fixiert und permeabilisiert (s. Material und Methoden). Diese Prozedur wurde gewählt, um mitotische Zellen in den Präparaten zu erhalten, die durch die sonst verwendete Fixierungsmethode mit Formaldehyd abgelöst wurden.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 3.12 A - F dargestellt. Eine Kolo­kalisierung von TaSP und Tubulin war sowohl in der Interphase (A) als auch in den verschiedenen Stadien der Mitose (B - F) detektierbar, wobei der Hauptanteil des TaSP-Signals im Bereich der Parasitenmembran im Zytoplasma der Wirtszelle zu erkennen war. In der Prophase (B), der Metaphase (C) und der Anaphase (D) kolo­kalisierte TaSP mit den Spindelpolen des Spindelapparats. Besonders auffallend war die Kolo­kalisierung in der Telophase (E) und Zytokinese (F). In der Zytokinese, der Abschnürung der beiden Tochterzellen, zeigte sich eine deutliche Überlagerung des TaSP-Signals mit dem  $\alpha$ -Tubulin-Signal des Midbody (F). Der Midbody besteht aus auffällig komprimierten Spindeln und befindet sich zwischen den beiden sich teilenden Tochterzellen.

Wenn der polyklonale TaSP-Antikörper mit seinem Antigen (rekombinantes TaSP) präabsorbiert wurde, konnte kein TaSP nachgewiesen werden. Keine Markierung konnte mit der Isotypkontrolle (Maus-IgG bzw. Kaninchen-IgG) sichtbar gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

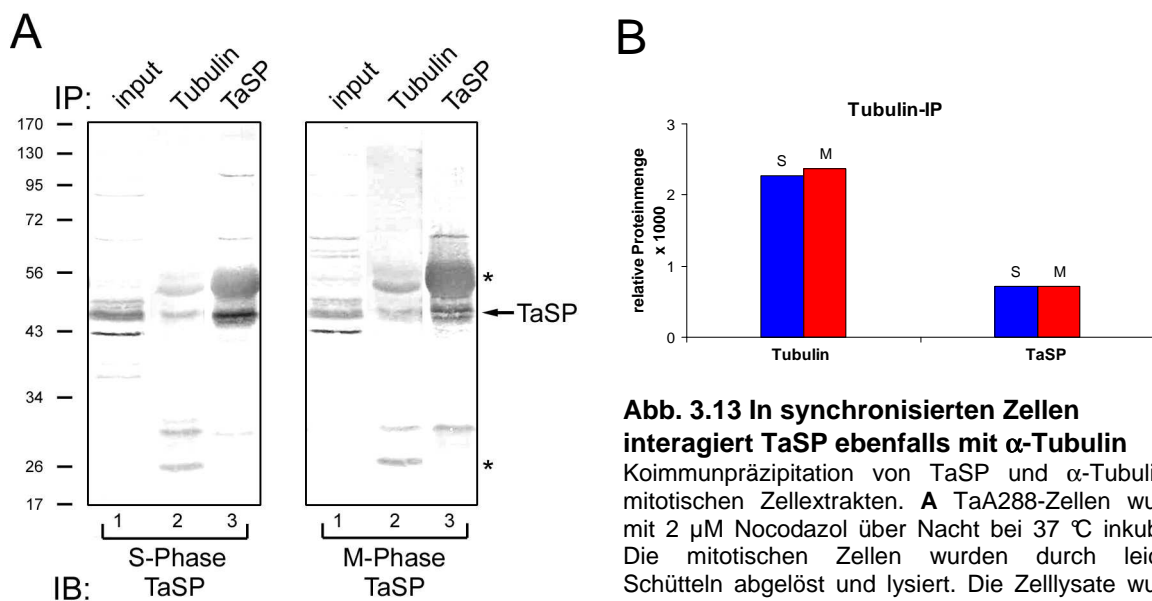
Zusammenfassend ist zu sagen, dass endogenes TaSP mit den Spindeln und den Spindelpolen der Wirtszelle während der Mitose assoziiert.



**Abb. 3.12 TaSP kolokalisiert mit dem Zytoskelett der Wirtszelle in den verschiedenen Zellzyklusphasen**

A - F TaA288-Zellen wurden auf Objektträgern 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend mit Methanol fixiert und permeabilisiert. Der Schizont wurde mit anti-TaSP-Antiserum (grünes Signal) und das Zytoskelett mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (rotes Signal) detektiert. Die DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid nachgewiesen. Die Pfeile kennzeichnen eine Kolokalisation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin. Der Größenbalken entspricht 5  $\mu$ m.

Eine mögliche physiologische Interaktion zwischen TaSP und Tubulin während der Mitose sollte nun auch biochemisch untersucht werden. Dazu wurden TaA288-Zellen in ihrem Zellzyklus synchronisiert, indem sie für 16 h mit 2  $\mu$ M Nocodazol inkubiert wurden. Bei dieser Konzentration hält Nocodazol den Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase an, ohne das Mikrotubulinetzwerk zu zerstören. Behandelt man Theilerien-infizierte Zellen mit 2  $\mu$ M Nocodazol, so gehen die meisten Zellen in Mitose, ohne apoptotisch zu werden (Baumgartner *et al.*, 1999). Nach der Behandlung mit Nocodazol konnten die mitotischen Zellen leicht durch Abklopfen von den adhären Interphasezellen separiert werden. Sowohl der mitotische Zellextrakt als auch die Interphasezellen wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper oder anti-TaSP-Antiserum koimmunpräzipitiert und mit anti-TaSP-Antiserum im Immunblot analysiert (Abb. 3.13 A). Tubulin koimmunpräzipitierte in synchronisierten Zellen (M-Phase-Zellen) mit TaSP (Bahn 2, rechts) und umgekehrt (nicht gezeigt). Das gleiche Bild zeigte sich in der Immunpräzipitation mit den Interphasezellen (S-Phase-Zellen, Bahn 2, links). Dies wurde auch durch die semiquantitative Auswertung der relativen Proteinmenge im Western blot bestätigt (Abb. 3.13 B). Die Mengen an TaSP, die mit dem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper isoliert wurden, sind vergleichbar zwischen S-Phase- und M-Phase-Zellextrakt, was darauf hinweist, dass das TaSP während der S-Phase und der Mitose mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Es konnte allerdings kein signifikanter quantitativer Unterschied der Präzipitation von TaSP mit dem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (Abb. 3.13 B) bzw. der Präzipitation von Tubulin mit anti-TaSP-Antiserum (nicht gezeigt) zwischen mitotischen und ruhenden Zellen nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz bleibt festzuhalten, dass auch in mitotischen Zellen, TaSP biochemisch mit Tubulin interagiert.



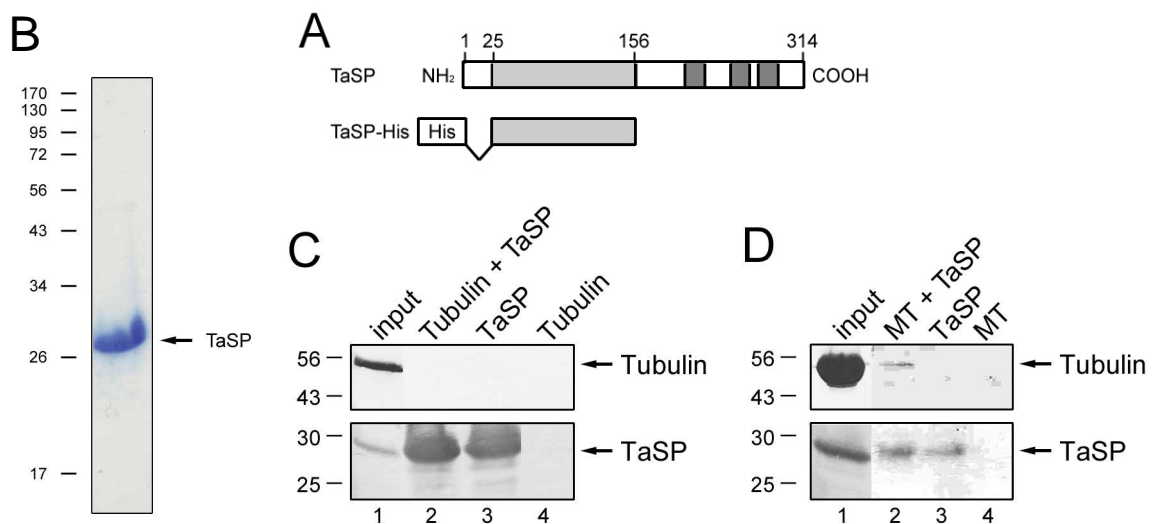
**Abb. 3.13 In synchronisierten Zellen interagiert TaSP ebenfalls mit  $\alpha$ -Tubulin**

Koimmunpräzipitation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin in mitotischen Zellextrakten. **A** TaA288-Zellen wurden mit 2  $\mu$ M Nocodazol über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die mitotischen Zellen wurden durch leichtes Schütteln abgelöst und lysiert. Die Zelllysate wurden mit anti-TaSP-Antiserum oder anti- $\alpha$ -Tubulin-

Antikörper oder ohne Antikörper (ohne) immunpräzipitiert (IP) und der Immunkomplex wurde elektrophoretisch getrennt und im Immunblot (IB) mit anti-TaSP-Antiserum analysiert. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysat. Die Sterne kennzeichnen das IgG (schwere und leichte Kette) des jeweiligen Antikörpers. **B** Semiquantitative Auswertung der Immunblots der Koimmunpräzipitation. Die Western blots wurden eingescannt und die Proteinbanden semiquantitativ mit Image J ausgewertet. Der Graph die densitometrische Auswertung der Immunpräzipitation mit dem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper.

### 3.1.10 *In vitro*-Interaktion von TaSP mit den Mikrotubuli

In den vorangegangenen Experimenten konnte eine *in vivo*-Interaktion zwischen TaSP und Tubulin durch verschiedene Versuchsansätze nachgewiesen werden. Es ließ sich allerdings nicht ausschließen, dass die TaSP-Tubulin-Interaktion noch über andere Proteine vermittelt wird. Um die Möglichkeit einer direkten TaSP-Tubulin-Interaktion zu untersuchen, wurde das bakterielle Fusionsprotein der extrazellulären Domäne von TaSP aufgereinigt (Abb. 3.14 A und B) und seine Bindung an Tubulin getestet. Das Protein wurde mit löslichen und reinem Tubulin aus Rinderhirnen inkubiert und an TaSP-gebundenes Protein über magnetischen Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose beads isoliert. Die Eluate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Western blot analysiert (Abb. 3.14 C und D). Mit dieser Methode konnte *in vitro* keine Affinität von TaSP zu Tubulin nachgewiesen werden (Abb. 3.14 C, Bahn 2 oben). TaSP bindet demnach zumindest nicht direkt an Tubulin. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, ob es stattdessen an assemblierte Mikrotubuli bindet. Dazu wurden Taxol-stabilisierte Mikrotubuli unter Bedingungen, die die Tubulinassemblierung begünstigen, gleichzeitig mit dem rekombinanten TaSP-His-Tag-Protein inkubiert und der Proteinkomplex eluiert. Wie in Abbildung Abb. 3.14 D zu sehen ist, konnte TaSP (Bahn 2 unten) zusammen mit den stabilisierten Mikrotubuli (Bahn 2 oben) isoliert werden. In den Kontrollen mit immobilisiertem TaSP ohne zusätzliche Mikrotubuli (Bahn 3) und nicht-immobilisierte Agarose beads mit polymerisiertem Tubulin (Bahn 4) ist keine Immunreaktivität vorhanden.



**Abb. 3.14 TaSP interagiert *in vitro* mit Mikrotubuli, aber nicht mit Tubulin**

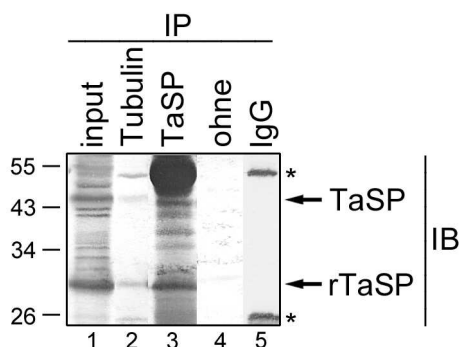
'*in vitro* binding assay' von TaSP-His mit Mikrotubuli bzw. Tubulin. **A** Schema des cDNA-Konstrukts, das in dieser Untersuchung verwendet wurde. Das Expressionskonstrukt wurde aus cDNA von *T. annulata* hergestellt. Das Protein besitzt einen N-terminalen His-Tag. In dunkelgrau sind die Transmembrandomänen von TaSP dargestellt, in hellgrau die klonierte, extrazelluläre Domäne von TaSP. **B** Coomassie-gefärbtes Gel der Aufreinigung von TaSP mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie unter nativen Bedingungen. **C** 15 µg rekombinantes und aufgereinigtes TaSP-His wurde für 1 h bei 4 °C an magnetische Ni<sup>2+</sup>-NTA beads immobilisiert und für 1 h bei 4 °C mit 25 µg α-Tubulin inkubiert. Danach wurde der TaSP-Interaktionskomplex mit Imidazol eluiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Western blot mit anti-TaSP-Antiserum bzw. anti-α-Tubulin-Antikörper analysiert. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für den 'pull down' eingesetzten Lysat. Als Kontrollen wurde TaSP alleine immobilisiert (TaSP) oder nichtimmobilisierte Ni<sup>2+</sup>-NTA beads mit Tubulin inkubiert. **D** Durchführung siehe **C** mit Assemblierung der Mikrotubuli. Mit TaSP immobilisierte beads wurden für 30 min bei 37 °C mit 25 µg α-Tubulin zur Assemblierung der Mikrotubuli (MT) unter Mikrotubuli-stabilisierenden Bedingungen (20 µM Taxol) inkubiert (Tubulin + TaSP). Es wurden die gleichen Kontrollen wie unter **C** verwendet. Der Input (Bahn 1) entspricht 20 % vom für den 'pull down' eingesetzten Lysat.

Daher bindet TaSP *in vitro* direkt an polymerisierte Mikrotubuli. Trotzdem war nur eine geringe an TaSP-gebundene relative Proteinmenge der Mikrotubuli im Vergleich zum Input zu erkennen. Obwohl nur wenig Mikrotubuli an TaSP binden, spiegelt dieses Ergebnis somit sehr gut die *in situ*- und *in vivo*-Situation wieder, in der nur eine partielle Kolokalisation zu beobachten war.

Auffallend ist, dass das Molekulargewicht des rekombinanten TaSP von der durch ProtPara vorhergesagten Größe von 17 kDa stark abweicht. TaSP-His wurde immer mit einem Molekulargewicht von 29 kDa detektiert. Das gleiche Verhältnis ist auch beim endogen exprimiertem TaSP nachweisbar. Die Größe wurde hier mit 35 kDa vorhergesagt und mit 47 kDa mit dem polyklonalen TaSP-Antikörper nachgewiesen. Es besteht also immer ein Unterschied von 12 kDa zwischen berechnetem und experimentell bestimmtem Molekulargewicht, sodass es sich bei beiden Proteinen um die gleiche Modifikation handeln muss. Eine Oligomerisierung kommt aufgrund der Größe nicht in Frage. Dieses Phänomen könnte zum einem auf ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE oder auf mögliche posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein. Letzteres gilt als sehr wahrscheinlich, da die Diskrepanz zwischen vorhergesagtem und beobachtetem Molekulargewicht auch bei dem nativen Protein zu sehen war und auch nicht unter denaturierenden Bedingungen verschwand. Möglicherweise beeinflussen diese posttranslationalen Modifikationen auch die Bindungseigenschaften von Tubulin an TaSP.

Um festzustellen, ob eine *in vivo*-Interaktion zwischen rekombinatem TaSP und Tubulin vorliegt, wurde eine Koimmunpräzipitation mit infizierten Zellen und TaSP durchgeführt. Hierzu wurde TaA288 Zelllysate vor der Immunpräzipitation mit 15 µg aufgereinigtem rekombinatem TaSP versetzt und mit anti-TaSP-Antiserum bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 3.15). Die Präzipitation mit Tubulin führte sowohl zur Präzipitation von endogenem als auch exogenem TaSP (Bahn 2), wohingegen ohne Antikörper (Bahn 4) kein Protein immunpräzipitiert werden konnte.

Rekombinantes TaSP interagiert demzufolge auch *in vivo* mit Tubulin. Dies bestätigt noch einmal, dass wahrscheinlich die zytoplasmatische Domäne die Bindung an die Mikrotubuli vermittelt.



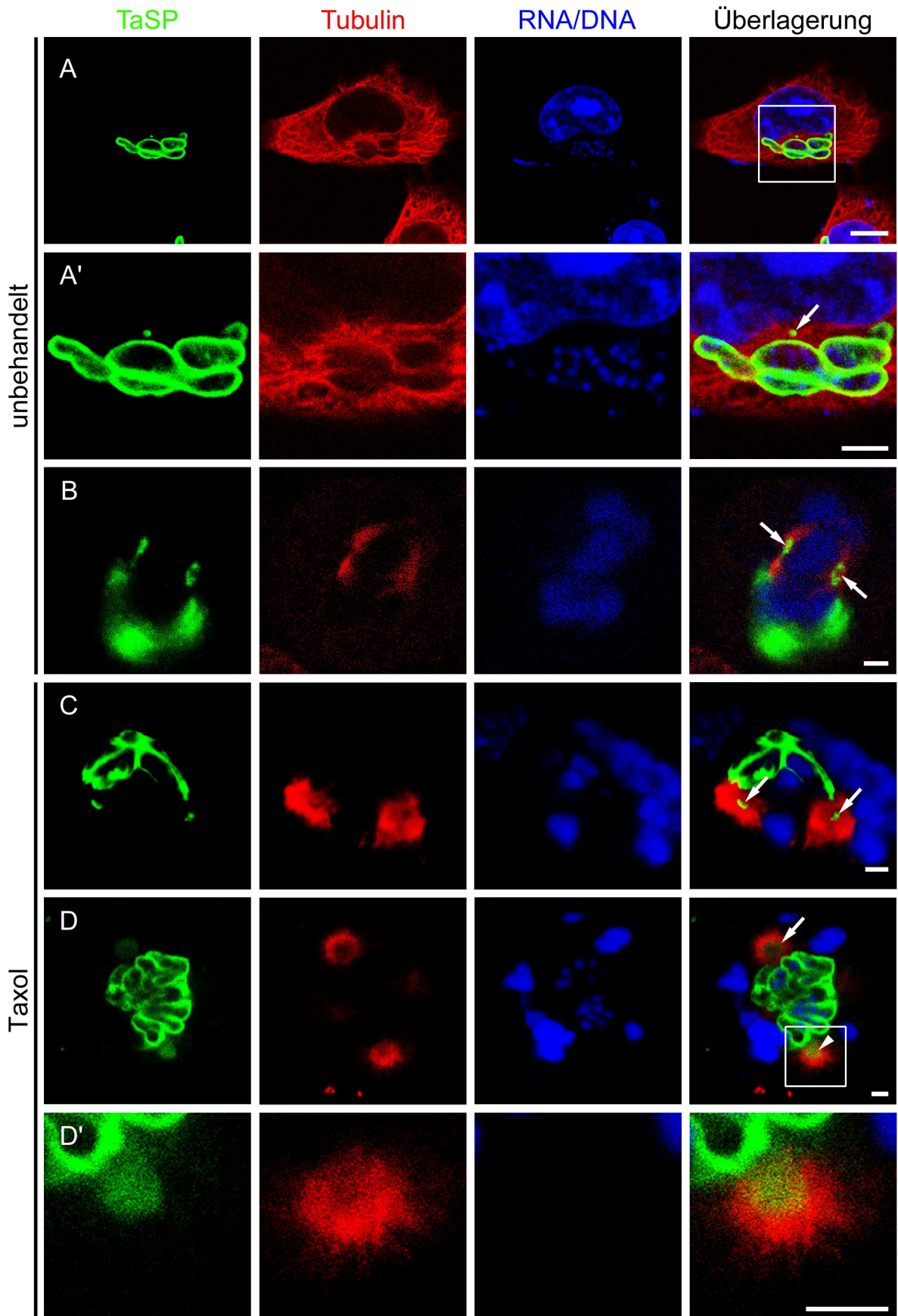
**Abb. 3.15 Rekombinantes TaSP interagiert mit  $\alpha$ -Tubulin**  
Koimmunpräzipitation von rekombinatem TaSP und Tubulin. TaA288-Zelllysate wurde mit 15 µg rekombinatem und aufgereinigtem TaSP-His (rTaSP) versetzt und mit anti-TaSP-Antikörper und  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (Klon DM 1A) immunpräzipitiert (IP). Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE und anschließend Immunblot (IB) mit anti-TaSP-Antiserum analysiert. Der Input (Bahn 1) entspricht 10 % der eingesetzten Proteinmenge. Die Sterne markieren die schwere und leichte Kette des entsprechenden Antikörpers.

### 3.1.11 TaSP lokalisiert partiell am Zentrosom

In vorangegangenen Lokalisationsstudien wurde nachgewiesen, dass TaSP über den ganzen Zellzyklus hinweg partiell mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszellen assoziiert, vor allem mit der mitotischen Spindel während der Zellteilung. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob TaSP darüber hinaus mit dem Zentrosom in ruhenden und sich teilenden Zellen kolokalisiert.

Hierfür wurden infizierte Zellen fixiert, permeabilisiert und auf eine mögliche Kolokalisation von  $\alpha$ -Tubulin und TaSP mittels konfokaler Lasermikroskopie hin überprüft (Abb. 3.16 A-D'). In unbehandelten Zellen (Abb. 3.16 A-B) lokalisierte TaSP sowohl in den Interphasezellen (Abb. 3.16 A und A') als auch in sich teilenden Zellen (hier Metaphase, B) punktuell am Zentrosom. Dieses Ergebnis wurde durch die Behandlung der Zellen mit Taxol, in der die Formation von asymmetrischen Spindeln mit zusätzlichen Spindelpolen künstlich hervorgerufen wird, bestätigt (Abb. 3.16 C-D'). Besonders auffallend war die Kolokalisation zwischen dem Tubulin und TaSP in sich teilenden Zellen an den beiden sich gebildeten Zentrosomen (D und D'). Die Zentrosomen verdoppeln sich während der Zellteilung, und die Bildung der Mikrotubuli - und somit der mitotischen Astern - geht von ihnen aus. Die beiden mitotischen Astern wandern an die Pole der mitotischen Spindel, welche an die Chromosomen bindet. An das MTOC (Mikrotubuli-organisierende Zentrum) wird das  $\alpha$ -Tubulin eines Dimers (Minus-Ende) angelagert, das freie Plus-Ende kann dann durch Anlagerung weiterer Dimere elongiert werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass TaSP *in vitro* und *in vivo* mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle interagiert. Diese Interaktion ist nicht vergleichbar mit anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen ('MAP'), da TaSP keine stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli ausübt. Ob TaSP möglicherweise eine destabilisierende Wirkung in der Mitose hat, konnte nicht abschließend geklärt werden. Fest steht aber, dass TaSP *in vivo* in sich teilenden Zellen mit den Spindeln und den Spindelpolen und mit dem Zentrosom der Zelle assoziiert. Diese Assoziation mit dem Mikrotubulinetzwerk konnte auch durch *in vivo* - Immunpräzipitationsexperimente und *in vitro* Bindungsversuche bestätigt werden.



**Abb. 3.16 TaSP lokalisiert teilweise am MTOC**

**A - D'** TaA288-Zellen wurden auf Objekträgern 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend mit Methanol fixiert und permeabilisiert. Der Schizont wurde mit anti-TaSP-Antiserum (grünes Signal), das Zytoskelett mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper detektiert. Die DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid (blau) nachgewiesen. **C - D'** TaA288-Zellen wurden für 18 h mit 10  $\mu$ M Taxol behandelt. Die Pfeile kennzeichnen die Kolokalisation von TaSP und  $\alpha$ -Tubulin am Zentrosom. Der Größenbalken in **A** entspricht 5  $\mu$ m und in **A' - D'** 1  $\mu$ m.

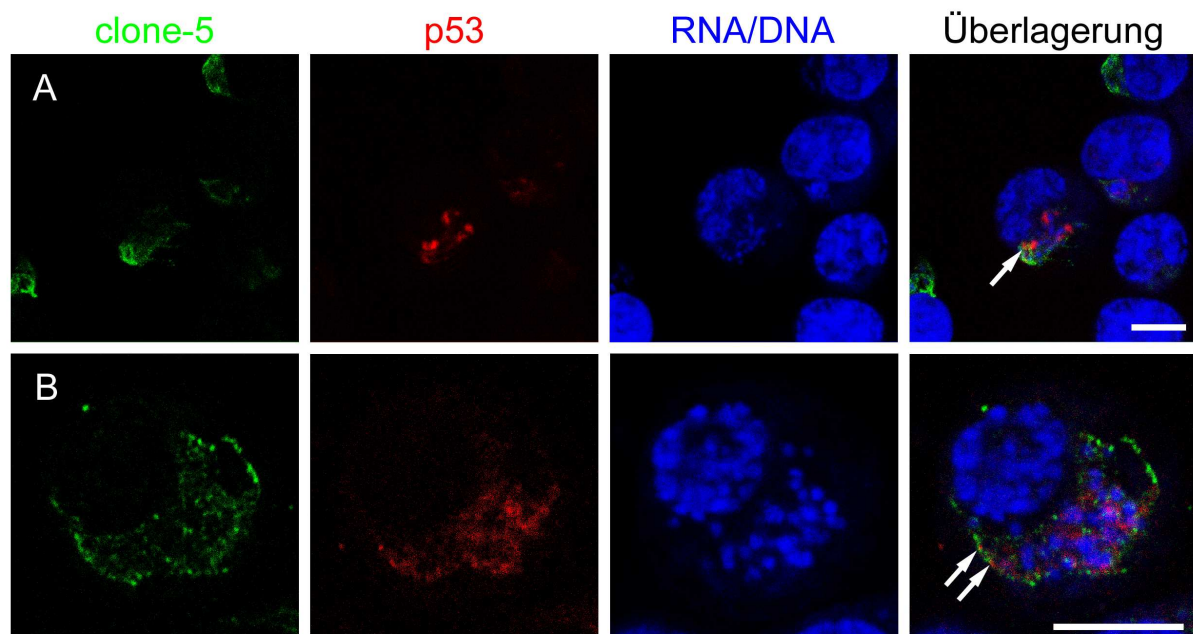
## 3.2 p53 – Lokalisationsstudien in Theilerien-infizierten Leukozyten und isolierten Schizonten

### 3.2.1 p53 bindet an die Schizontenoberfläche in *T. annulata*

Wie in der Einleitung dargestellt, lokalisiert p53 im Zytoplasma von *Theileria annulata*-infizierten Leukozyten in der Nähe des Parasiten. Weiterhin wurde gezeigt, dass dieses Phänomen von der Anwesenheit des Parasiten in der Wirtszelle abhängig ist, da nach dessen Eliminierung durch Behandlung mit Buparvaquone eine Translokation des p53-Proteins in den Wirtszellkern auftritt. Folglich wird der Apoptose-Signalweg aktiviert, und die Zelle geht in Apoptose (Haller, 2004).

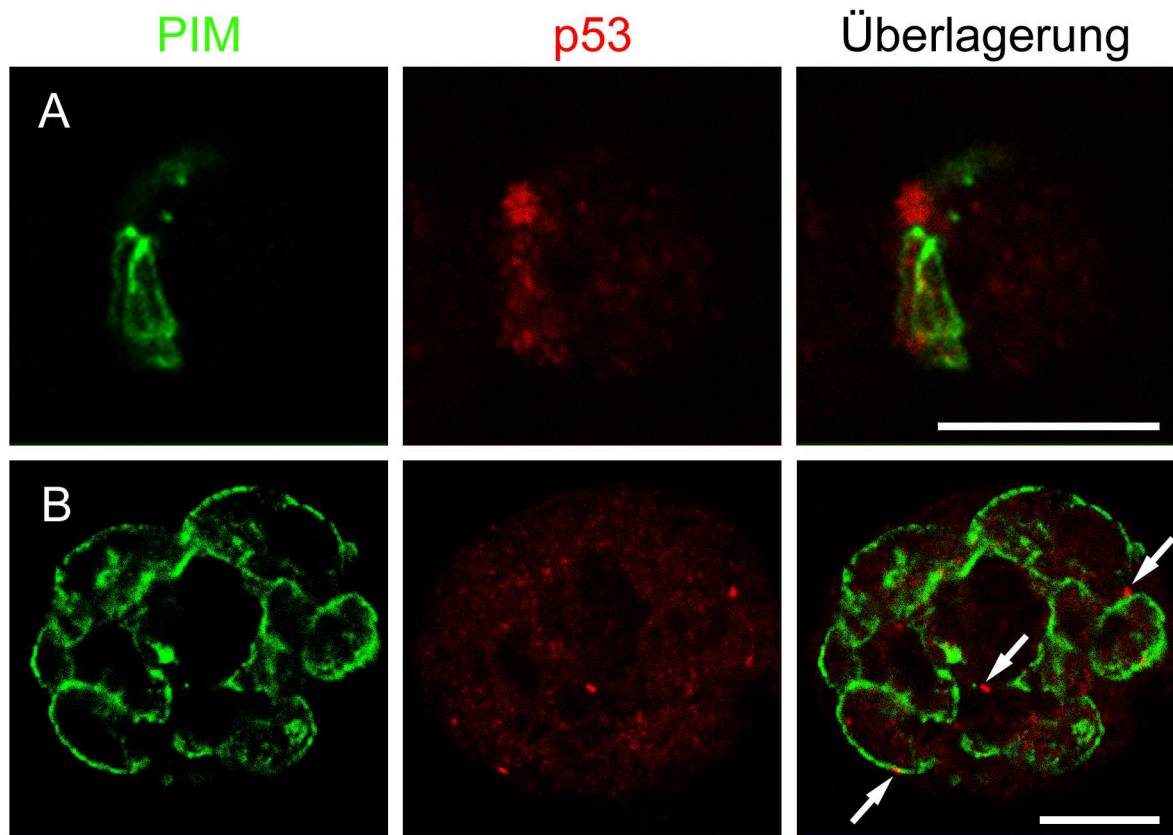
In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob p53 auch in anderen leukoproliferativen Theilerien-infizierten Zellen, wie *T. parva* und *T. lestoquardi* im Zytoplasma der Wirtszelle arretiert wird. Hierfür wurde p53 mit einem Antikörper nachgewiesen. Der Parasit wurde im Falle von *T. parva* mit dem Oberflächenantikörper PIM ('Polymorphic Immunodominant Molecule') und im Falle von *T. lestoquardi* mit dem Antikörper clone-5 (Bakheit *et al.*, 2006) detektiert und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. 3.17 und Abb. 3.18).

Das p53-Signal wurde im Zytoplasma der Wirtszelle und nicht im Wirtszellkern detektiert. Es zeigte sich hier ebenfalls eine starke Assoziation von p53 mit dem Schizonten. Diese wurden sowohl im Fall von *T. lestoquardi* (Abb. 3.17) als auch im Fall von *T. parva* (Abb. 3.18) beobachtet. p53 kolokalisierte an der Parasitenmembran oder befand sich in enger Nachbarschaft zum Schizonten.



**Abb. 3.17 p53 assoziiert mit Schizonten von *T. lestoquardi***

**A** und **B** *T. lestoquardi*-Zellen wurden mit einem Parasitenantikörper clone-5 (grün) und mit anti-p53-Antikörper (rot) gefärbt, gefolgt von Alexa 488-markierten (grün) und Alexa 546-markierten (rot) anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern. Die DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid nachgewiesen. **A** Übersicht von *T. lestoquardi*-infizierten Zellen **B** *T. lestoquardi*-infizierte Zelle. Die Pfeile markieren die Kolokalisation von p53 (rot) mit dem Schizonten (grün). Der Größenbalken entspricht 5 µm.



**Abb. 3.18 p53 bindet an Schizonten von *T. parva***

**A** *T. parva*-Zellen-Lebendfärbung mit anti-PIM- (grün) und anti-p53-Antikörper (rot) **B** Isolierte Schizonten von *T. parva*-Zellen wurden mit dem Parasitenoberflächenantikörper PIM ('Polymorphic Immunodominant Molecule') und mit anti-p53-Antikörper (rot) gefärbt, gefolgt von Alexa 488 markierten (grün) und Alexa 546 markierten (rot) anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern. Die Pfeile markieren die Kolokalisation von p53 (rot) mit dem Schizonten (grün). Der Größenbalken entspricht 5  $\mu$ m.

Die Antikörperspezifität von p53 wurde durch Präabsorptionsexperimente mit dem p53-GST-Antigen (Daten nicht gezeigt) und durch ausschließliche Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa-546-IgG bestätigt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in *T. annulata* war p53 auch in *T. parva* und *T. lestoquardi* im Wirtszellzytoplasma arretiert.

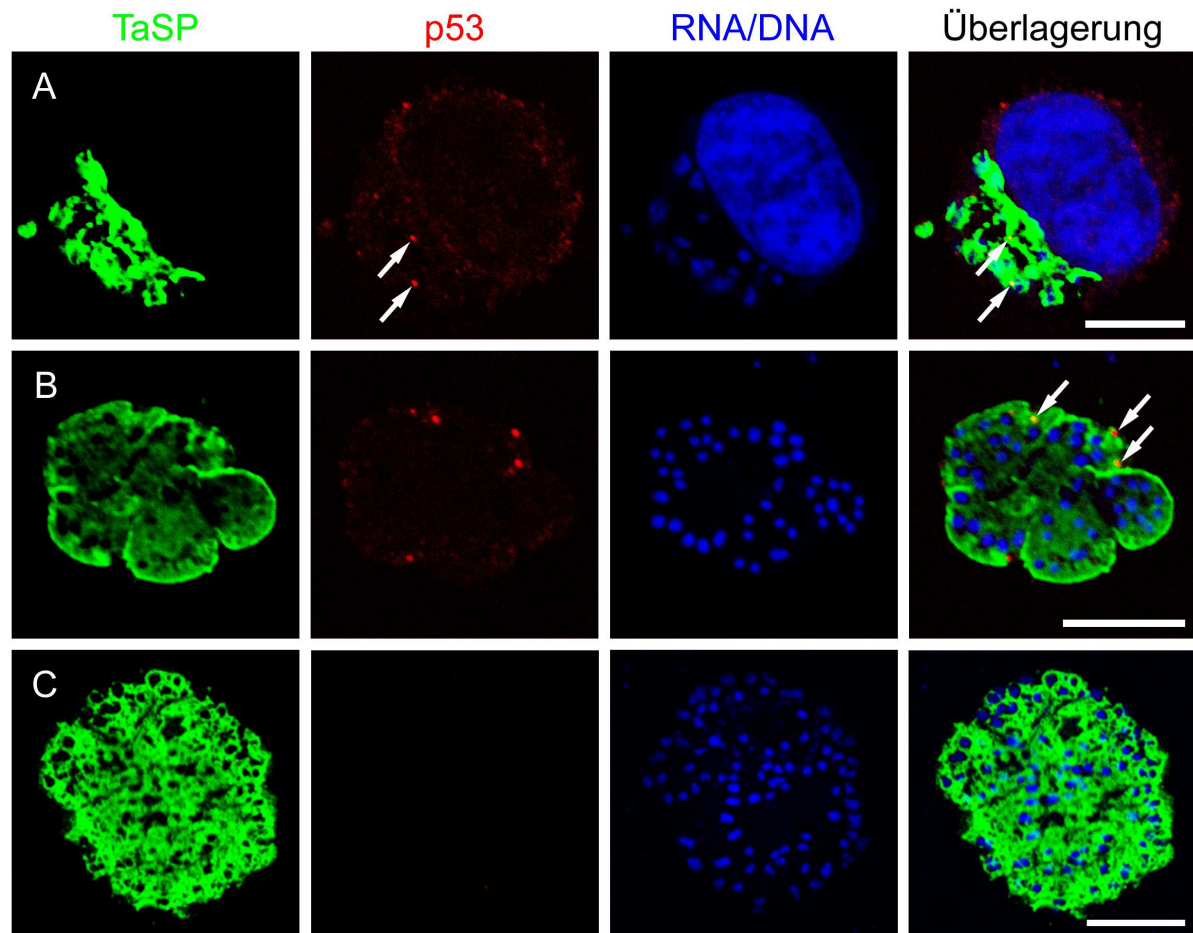
Die Inhibierung der Translokation von p53 in den Kern der Wirtszelle scheint also ein allgemeiner Mechanismus leukoproliferativer Theilerien zu sein, um den entsprechenden Apoptosesignalweg zu blockieren.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, ob p53 an isolierten Schizonten nachweisbar ist. Dazu wurden Schizonten aus infizierten Leukozyten nach der Methode von Baumgartner *et al.* isoliert (Baumgartner *et al.*, 1999), und deren Reinheit mit Hilfe einer Giemsa-Färbung bestimmt. Diese Methode basiert auf der Lyse der Zellmembran mit dem bakteriellen Toxin Aerolysin unter Ausnutzung des Mikrotubuli-Inhibitors Nocodazol. Bevor die infizierten Zellen lysiert werden, müssen die Mikrotubuli der Wirtszelle mit Nocodazol zerstört werden. Die Toxin-Moleküle binden an eukaryotische Zellmembranen, wo sie aggregieren und schließlich unspezifische Ionenkanäle ausbilden. Dadurch wird die Permeabilitätsgrenze der Membran zerstört, und es kommt zur osmotischen Zellyse. Anschließend wurden die Zytozentrifugenpräparate mit einem anti-p53-Antikörper und im

Fälle von *T. annulata* mit dem bereits beschriebenen Antikörper gegen das Parasitenmembranprotein TaSP gefärbt und mit konfokaler Laserscanningmikroskopie analysiert (Abb. 3.19). p53 lokalisierte punktuell auf der Schizontenmembran (Abb. 3.19 B), die mit anti-TaSP nachgewiesen wurde. Dass die p53-Färbung spezifisch war, wurde durch folgende Kontrollexperimente bewiesen. Zum einem wurden die Signale in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung durch die Präinkubation des p53-Antikörpers mit rekombinatem p53-GST-Antigen blockiert (Abb. 3.19 C). Dies beweist die Spezifität des Antikörpers gegen p53. Zum anderen wurde keine Immunfluoreszenz in einer Negativkontrolle mit unspezifischen Maus-IgG und der Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa-546-IgG detektiert (Daten nicht gezeigt). Bei isolierten Schizonten von *T. parva*-Zellen (Abb. 3.18 B) zeigte sich das gleiche Verteilungsmuster wie bei den isolierten Schizonten von *T. annulata* (Abb. 3.19 B).

Darüber hinaus konnte das p53-Protein im Lysat von isolierten Schizonten anhand eines Western blots (Abb. 3.19 D) detektiert werden. Die erfolgreiche Isolationsprozedur und die Reinheit der Schizonten wurden durch Anfärben der isolierten Parasiten mit Giemsa-Färbelösung überprüft, in der das Zytoplasma blau erscheint und die Zellkerne rot angefärbt werden. Die Schizontenisolate waren kaum mit Wirtszellmaterial verunreinigt. Als Positivkontrolle diente das Zelllysate einer Tumorzelllinie (CEM, Bahn 1), die nachweislich p53 exprimiert. Es zeigte sich eine Bande bei 53 kDa, die sowohl bei den isolierten Schizonten (Bahn 2) als auch in der p53-exprimierenden Zelllinie CCRF-CEM im Western blot auftrat. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass p53 nicht an den Schizonten gebunden vorliegt.

Anhand der Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie ist davon auszugehen, dass p53 mit der Schizontenmembran assoziiert vorliegt (Abb. 3.19 A und B). Um diese Frage durch eine biochemische Methode zu beantworten und die Immunfluoreszenzdaten zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitations-Experimente und *in vitro*-Versuche durchgeführt, in denen aber keine indirekte oder direkte Interaktion zwischen TaSP und p53 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass möglicherweise ein anderes Membranprotein, wie bereits von Haller (2004) angenommen, an p53 bindet.



**Abb. 3.19 p53 bindet an die Schizontenmembran**

**A - C** *T. annulata*-Zytozentrifugenpräparate wurden mit einem Parasitenoberflächenantikörper gegen TaSP ('*T. annulata* surface protein', grün) und mit anti-p53-Antikörper (rot) gefärbt, gefolgt von Alexa 488-markierten (grün) und Alexa 546 markierten (rot) anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Sekundäntikörpern. Die DNA bzw. RNA wurde mit Toto-3-jodid nachgewiesen. Die Zytozentrifugenpräparate wurden mit konfokaler Laserscanningmikroskopie analysiert.

**A** Zytozentrifugenpräparate von *T. annulata*. **B** Zytozentrifugenpräparate isolierter Schizonten von *T. annulata*. **C** Nachweis der Spezifität des p53-Antikörpers durch Präabsorption mit p53-Antigen. p53-Antikörper wurde mit rekombinantem p53-Protein (GST-p53-Fusionsprotein) 1 h bei 25 °C inkubiert und danach für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. p53-Signal (rot) ist nicht mehr detektierbar. Die Pfeile markieren die Kollokalisierung von p53 (rot) mit TaSP (grün). Der Größenbalken entspricht 5 µm. **D** Detektion von p53 im Lysat von isolierten Schizonten mit Hilfe des Western blots. Als Positivkontrolle wurde die Tumorzelllinie CCRF-CEM (T-Zell-Leukämie) verwendet.

### 3.3 Charakterisierung und Untersuchungen des *T. annulata*-Proteins Ta6TMP, einem potentiellen Interaktionspartner von p53

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, bindet p53 direkt an die Schizontenoberfläche. Diese Bindung kann sowohl direkt über ein Parasitenprotein oder möglicherweise über ein oder mehrere Wirtszellproteine erfolgen. Ein möglicher Interaktionspartner mit p53 könnte das von Haller (2004) beschriebene Ta6TMP sein, welches eine Homologie zu dem Humanen Papillomvirus E6-Protein aufweist. Dieses Protein wurde in anderen Systemen als transformationsrelevant beschrieben, indem es p53 bindet und durch proteosomale Degradierung inaktiviert (Scheffner *et al.*, 1990).

### 3.3.1 Sequenzanalyse von Ta6TMP

In Tabelle 3.2 sind die wichtigsten physikalischen und biochemischen Daten von Ta6TMP, die mit bioinformatischen Analyseprogrammen vorhergesagt wurden, dargestellt. Es handelt sich um ein 46 kDa-Transmembranprotein mit sechs membranspannenden Domänen ohne vorhergesagtes Signalpeptid. Interessanterweise besitzt Ta6TMP drei Sumoylierungsstellen. SUMO-('Small Ubiquitin-related Modifier') Proteine binden kovalent an andere Proteine. Die Sumoylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die in verschiedenen Zellprozessen, u. a. in der Apoptose eine Rolle spielt. Sie markiert Proteine, die abgebaut werden sollen.

Da die N-terminale und die C-terminale Domäne in den extrazellulären Bereich der Zelle gerichtet ist (Abb. 1.16 C, S. 33), ist somit eine Interaktion mit Wirtszellproteinen wie z. B. p53 möglich.

Eigenschaft		Programm (Quelle)	Ta6TMP
Molekulargewicht		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	46,322 kDa
Theoretischer pl		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	9,13
Aminosäurezusammensetzung		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	Leucin 12,9 % Isoleucin 10,9 %
Halbwertszeit		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	30 h
Stabilität		ProtPara <a href="http://us.expasy.org/tools/protparam.html">http://us.expasy.org/tools/protparam.html</a>	stabil
Subzelluläre Lokalisation		PsortII <a href="http://psort.nibb.ac.jp/form2.html">http://psort.nibb.ac.jp/form2.html</a> Nakai and Horton, 1999	Zellmembran: 56.5 % ER: 30.4 %
		TopPred II <a href="http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/">http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/</a> Claros and von Heijne, 1994	6 Transmembran- helices (TypIIa)
Signalpeptid		TargetP 1.1 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP.html">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP.html</a>	nein
Typ		SignalP 3.0 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.html">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.html</a>	nicht-sekretorisch
Post- translationale Modifikationen	Sumoylierung	SUMOplot <a href="http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot">http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot</a>	3
	Phosphorylierung	NetPhos 2.0 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>	Ser: 10 Thr: 1 Tyr: 4
	Kinase-abh. Phosphorylierung	NetPhosK 1.0 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/</a>	PKA/PKC/PKG DNAPK CK I/CK II P38 MAPK

Tab. 3.2 Vorhergesagte physikalische und biochemische Parameter von Ta6TMP

### 3.3.2 Lokalisationsstudien von Ta6TMP in transfizierten eukaryotischen Zellen

In der Arbeit von Haller (2004) konnte gezeigt werden, dass Ta6TMP in infizierten Zellen mit p53 kolokalisiert. Um herauszufinden, ob exogenes Ta6TMP auch im heterologen System und vor allem welche Domäne von Ta6TMP mit p53 kolokalisiert, wurden das komplette Ta6TMP, der N-Terminus von Ta6TMP und der C-Terminus von Ta6TMP N-terminal an GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) fusioniert (Abb. 3.20 A), in verschiedenen Zelllinien überexprimiert und durch konfokale Mikroskopie analysiert.

In COS-7-Zellen, die das komplette Protein exprimierten, war Ta6TMP ausschließlich im Zytoplasma der Zelle in definierten Bereichen zu finden (Abb. 3.20 C). Es konnte keine Kolokalisation mit p53 nachgewiesen werden, welches ausschließlich im Zellkern der COS-7-Zellen zu finden war.

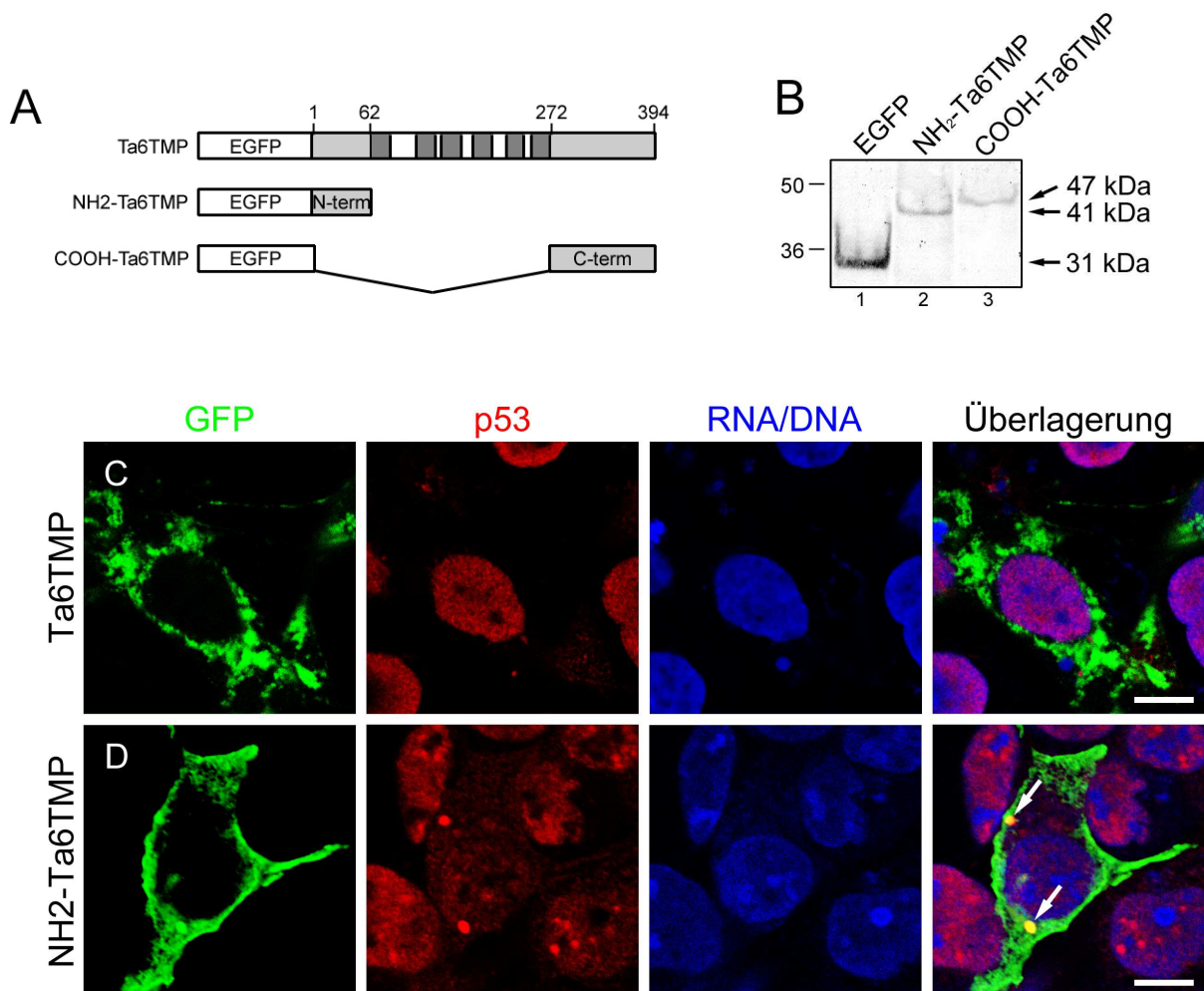
NH<sub>2</sub>-Ta6TMP lokalisierte ebenfalls im Zytoplasma der Zelle, allerdings wurde hier eine partielle Kolokalisation mit p53 detektiert (Abb. 3.20 D). An den umliegenden, nicht transfizierten Zellen ist zu erkennen, dass p53 im Kern lokalisiert ist. In den Zellen, die das N-terminale Konstrukt exprimierten, werden im Vergleich geringe Mengen an p53 im Zytoplasma detektiert. Teilweise kolokalisiert dieses zytoplasmatische p53 mit der N-terminalen Domäne von Ta6TMP. Diese Kolokalisation konnte in etwa 5 % (n = 50) der Zellen, die das Konstrukt exprimierten, beobachtet werden.

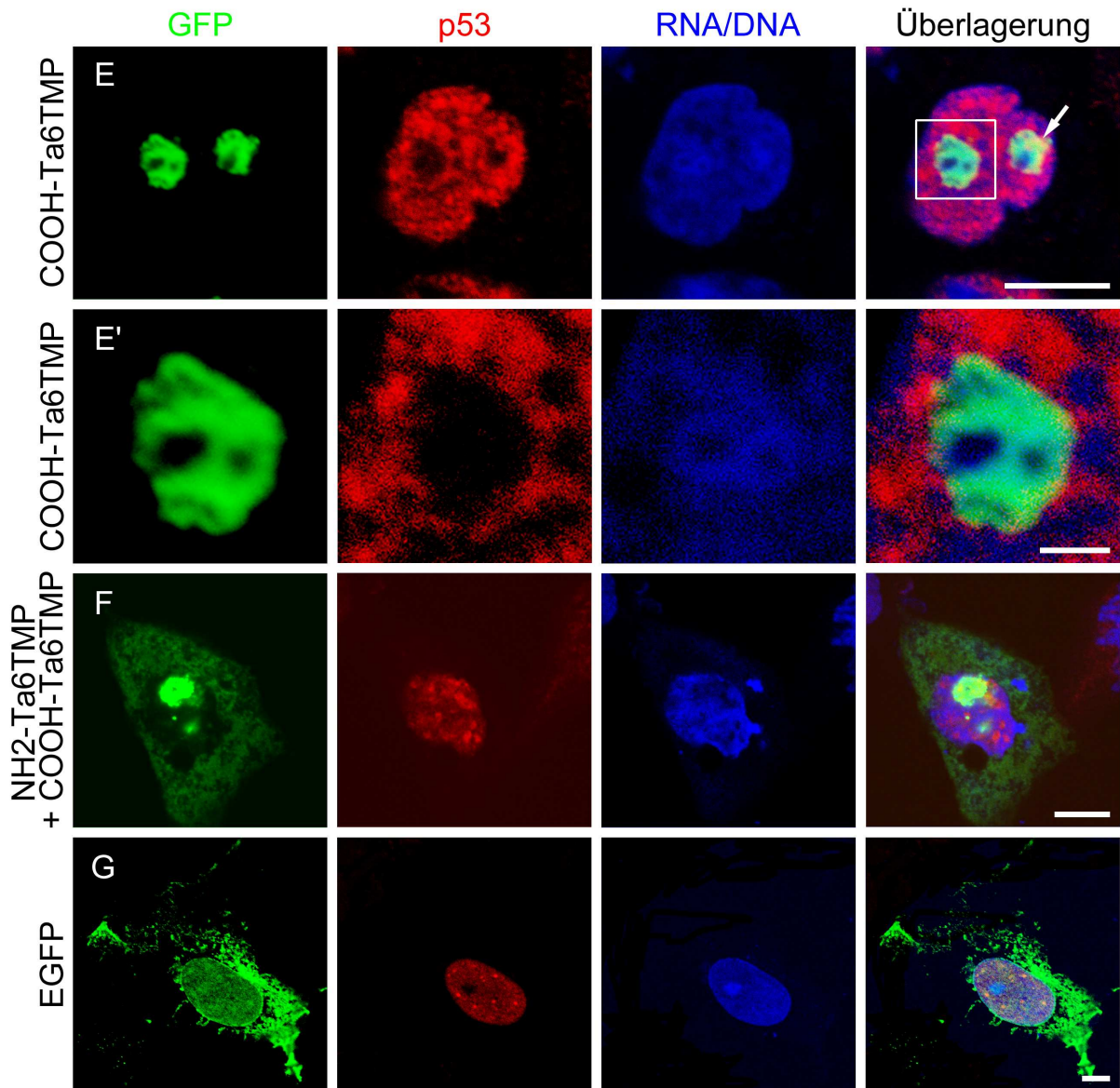
Überexprimiertes COOH-Ta6TMP zeigte ein sehr interessantes Lokalisationsmuster innerhalb der Zelle. Das Protein konnte im Zellkern, und zwar in den Nukleoli, nachgewiesen werden (Abb. 3.20 E und E') und zeigte dort an der Peripherie der Nukleoli eine Kolokalisation mit p53. Dieses Phänomen wurde in 100 % (n= 30) der Zellen und auch in anderen Zelllinien (CHO-, HeLa- und HEK-Zellen; Daten nicht gezeigt) bestätigt. COS-7-Zellen, die ausschließlich mit GFP transfiziert wurden, zeigten eine diffuse Verteilung von GFP über das gesamte Zytoplasma der Zelle (Abb. 3.20 G). Das GFP-Signal konnte entgegen anderen Literaturquellen nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Dies beweist, dass COOH-Ta6TMP unabhängig von der GFP-Fusion in den Zellkern transportiert wird, wobei nach Sequenzanalysen Ta6TMP in der C-terminalen Domäne keine Kernsignalsequenz (NLS-Sequenz) und keine Nukleoli-Lokalisationssequenz (NOLS) besitzt. Bei näherer Betrachtung der Verteilung von COOH-Ta6TMP in den Nukleoli zeigte sich, dass es nur in bestimmten Bereichen der Nukleoli vorkommt. Es handelte sich dabei um Bereiche die eine dichtere DNA/RNA-Menge enthielten, was an der stärkeren Anfärbung mit Toto-3-jodid zu sehen war. Demzufolge akkumuliert COOH-Ta6TMP in der granulären Komponente Pars granulosa, die den größten Teil der Nukleoli ausmacht. In ihr findet die Synthese von präribosomalen Partikeln statt. Weil das GFP-markierte COOH-Ta6TMP-Protein mit einem Molekulargewicht von 47 kDa in den Zellen exprimiert wird (Abb. 3.20 B), muss es sich um einen aktiven Transport des Proteins in den Zellkern

und folglich in die Nukleoli handeln. Denn alle Proteine, die kleiner sind als 40 kDa gelangen passiv durch Diffusion über die Kernporen in den Nukleus. Der aktive Transport geschieht über sogenannte Importine, die die Kernlokalisierungssignale erkennen, die Proteine binden und sie unter Hydrolyse von GTP in den Zellkern transportieren. Da COOH-Ta6TMP aber keines der bekannten Kernlokalisierungssignale besitzt, muss es ein bislang noch unbekanntes NLS- bzw. NOLS-Signal besitzen, welches vielleicht sogar spezifisch für den Parasiten ist.

Kotransfektionen der N- und C-terminalen Konstrukte von Ta6TMP zeigten keine gegenseitige Beeinflussung. Die GFP-Signale wurden sowohl im Zytoplasma als auch in den Nukleoli detektiert (Abb. 3.20 F). Dies ist ein Hinweis darauf, dass beide Domänen voneinander unabhängig in der Zelle agieren.

Die beobachtete Kolo-kalisation von NH<sub>2</sub>-Ta6TMP und COOH-Ta6TMP sollte nun biochemisch untersucht werden. Es wurden sowohl reziproke Koimmunpräzitationen mit anti-p53- und anti-GFP-Antikörper als auch *in vitro*-Interaktionsassays mit dem GST-p53-Fusionsprotein und His-markiertem NH<sub>2</sub>-Ta6TMP und COOH-Ta6TMP durchgeführt. Es konnte jedoch weder eine indirekte noch eine direkte Interaktion von p53 mit Ta6TMP nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



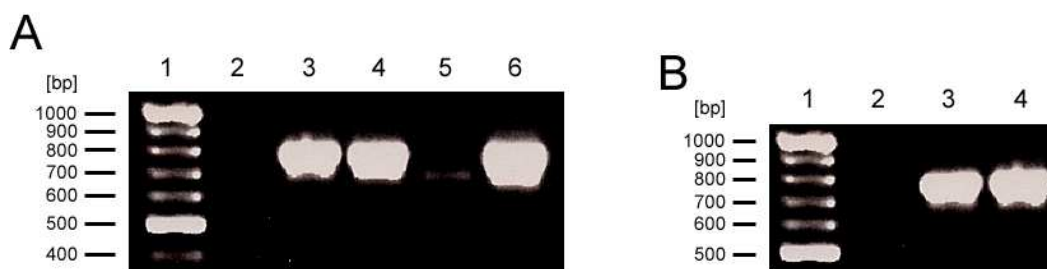


**Abb. 3.20 Ta6TMP kolokalisiert mit p53 in COS-7-Zellen**

**A** Die Grafik zeigt das Schema der cDNA-Konstrukte, die in dieser Untersuchung verwendet wurden. Alle Expressionskonstrukte wurden aus cDNA von *T. annulata* hergestellt; komplette Ta6TMP (AS 1-394);  $\Delta$  63-394 Ta6TMP (AS 1-62);  $\Delta$  1-271 Ta6TMP (AS 272-394), dem die AS 1-271 fehlen. Alle Proteine besitzen einen N-terminalen GFP-Tag. In dunkelgrau sind die Transmembrandomänen von Ta6TMP dargestellt, in hellgrau die klonierten, extrazellulären Domänen von Ta6TMP. **B - G** COS-7-Zellen wurden transient mit den beschriebenen Konstrukten transfiziert und nach 24 h - 48 h wurde die Proteinexpression gestoppt und schließlich entweder mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (C-G) oder mittels Western blot (B) analysiert. Grün, GFP; Rot, p53; Blau, Toto-3-jodid. **B** Western blot der Lysate der transfizierten Zellen, immunodetektiert mit anti-GFP-Antikörper: EGFP-Leervektor, NH<sub>2</sub>-Ta6TMP ( $\Delta$  63-394) und COOH-Ta6TMP ( $\Delta$  1-271). **C** Ta6TMP exprimierende COS-7-Zellen **D**  $\Delta$  63-394 Ta6TMP exprimierende COS-7-Zellen **E, E'**  $\Delta$  1-271 Ta6TMP exprimierende COS-7-Zellen. **G** GFP wurde in COS-7 überexprimiert und die Zellen wie oben beschrieben gefärbt. Der Größenbalken entspricht 5  $\mu$ m außer in E' (1  $\mu$ m).

### 3.3.3 Die Ta6TMP-Proteinsequenz ist konserviert in leukoproliferativen Theilerien-Spezies

Um herauszufinden, ob Ta6TMP auch in anderen Theilerien-Spezies auf Genebene vorhanden ist, wurden Primer generiert, die in den hochkonservierten Bereichen von Ta6TMP in *T. annulata* und *T. parva* lagen. Diese Primer in Position 299 bp für den 5'-Primer und in Position 1084 bp für den 3'-Primer amplifizierten Ta6TMP von cDNA in *T. annulata*, *T. parva* und *T. lestoquardi* (Abb. 3.21 A, Bahn 3, 4 und 6), aber nicht in *T. uilenbergi* (Bahn 5) ein PCR-Produkt. Auch mit anderen Primerpaaren konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Um die komplette Sequenz von Ta6TMP zu erhalten, wurde das 3'-Ende von Ta6TMP mit den Brady-Primern amplifiziert. Die Anlagerung des „Brady's“-Primer am Poly-A-Schwanz ermöglichte die Amplifikation des vollständigen offenen Leserahmens. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und die Proteinsequenz mit einem Alignment-Programm (Vector NTI, Clustal W) analysiert (Abb. 3.21 C). Es zeigte sich, dass Ta6TMP in den leukoproliferativen Theilerien hochkonserviert ist. Ta6TMP ist in den untersuchten Spezies zu 74 % identisch und weist eine Ähnlichkeit von 99 % auf. Dabei sind sich die Ta6TMP-Sequenzen von *T. lestoquardi* und *T. annulata* phylogenetisch ähnlicher (86,5 % identisch) als die von *T. parva* und *T. annulata* (80 % identisch). Es wurden neben *T. uilenbergi* auch noch andere nicht-leukoproliferativen Apikomplexa-Spezies wie z. B. *T. seperata* und *Babesia motassi* auf Vorhandensein von Ta6TMP untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnte aber nur ein hochkonservierter Bereich (bp 201 - 259) amplifiziert und sequenziert werden.



C

		1		50
T. annulata	(1)	MDSTLIVDSKSKSLDVSDSKHDLFEVDYPLPFNIDSSTSIEIEIESSIK		
T. lestoquardi	(1)	MNSSLILDSQSKSLDVSDSNNDLIDVDYPLPFTIDSSTSIEDEIKSAIK		
T. parva	(1)	MNSSLILDPKVKSQEIISDSPPDLVIDVDYPLPFTIDASTSMEIEMKSALK		
Consensus	(1)	MNSSLILDSKSKSLDVSDS  DLIIDVDYPLPFTIDSSTSIEIEIEKSAIK		100
		51		100
T. annulata	(51)	QFMSMLKSYIFRIVLITIALIVVLFQGLLMLKSDTYYMTNRIPLLDRI		
T. lestoquardi	(51)	QFMTMLKSYLFRIFLITIVLVVLFQGLLMMSDRYYLKTNRIPLLDRI		
T. parva	(51)	QCMSMLKSYLFRIFIIIIAIIAVLYFQGLLMLMSDYYMKTNRIPLLDRI		
Consensus	(51)	QFMSMLKSYLFRIFLITIALIIVVLFQGLLMLMSDYYMKTNRIPLLDRI		150
		101		150
T. annulata	(101)	HELLEDVNHFPFPAMCNIFMFTIVWAGILRIILFTPLFYLFEMALRYIFL		
T. lestoquardi	(101)	HELLEGVNHFPFGKMCNIFMFLIVWTGILRIILFTPLFYLFELALRYIFL		
T. parva	(101)	HELLEGVNHFPSPALCNTLMFIIVWVGILRIVFTPLFYLFQMALRYIFL		
Consensus	(101)	HELLEGVNHFPFPAMCNIFMFIIVW  GILRIILFTPLFYLFEMALRYIFL		200
		151		200
T. annulata	(151)	FGTAYFIRGFFIFATTIPSCYYNCNPDLKRSFFPLLIRIISGYMGIATN		
T. lestoquardi	(151)	FGTAYFIRGIFVYVTVVPSCHYNCNPDLKRSFFPMIRIVSGYMGIATN		
T. parva	(151)	FGSAYFIRGFIIFATTVPSCYLCNPDLKRSFFPLLIRIAGYMLVTN		
Consensus	(151)	FGTAYFIRGFFIFATTVPSCYYNCNPDLKRSFFPLLIRIISGYMGIATN		250
		201		250
T. annulata	(201)	CTDLIVSGHTMFTVITCILFVENAKYLI TKVILVLYTGFVFLIVACKYH		
T. lestoquardi	(201)	CTDLILSGHTMFTVITCILFVENCKYLI TKVILVLYTGFVFLIVACKYH		
T. parva	(201)	CTDLIVSGHTVFTVIAAILFVENSKYLVTKIITLYTGFVFLIVACKYH		
Consensus	(201)	CTDLIVSGHTMFTVITCILFVENAKYLI TKVILVLYTGFVFLIVACKYH		300
		251		300
T. annulata	(251)	YTVDVLLGLSIAILLHFYYYSRIDDFGTYTHNKIFNYGSESFIGAKKTKL		
T. lestoquardi	(251)	YTVDVLLGLTISILLHFYYYSRIDDFGTYTHNKIFNYGSESFVGAKKTKL		
T. parva	(251)	YTVDVLLGLTISVLLHYFYTRVDDFGTYIHNKIFNSGSEIFLGARKTKL		
Consensus	(251)	YTVDVLLGLTISILLHFYYYSRIDDFGTYTHNKIFNYGSESFIGAKKTKL		350
		301		350
T. annulata	(301)	YYSPIITRFIVRMEMLEEKMILGQKLRLYL RVNDQKSLIDKLLKKNFHL		
T. lestoquardi	(301)	YYSPIITRFVVKMEMLEEKMILGQKLRTLYL RVNDQKSLIDKNLLKKNFHL		
T. parva	(301)	HYSLITKFIIVKMELEERLILGQKLRTLYL RVNDQKSLIDKNLLKKNFHM		
Consensus	(301)	YYSPIITRFIVKMEMLEEKMILGQKLRTLYL RVNDQKSLIDKNLLKKNFHL		394
		351		394
T. annulata	(351)	VRLFAGDESDDLTL YRGTRNMNFYYWKYLYRKMFKKKKIVEVI		
T. lestoquardi	(351)	VRLFAGDESDDLTL YRGTRNLFYYWKYLYRKMFKKKKIVEVI		
T. parva	(351)	VRLFAGDESDDLTLFRGTRMNFYYWKYLYRKMFKKKKIVEVI		
Consensus	(351)	VRLFAGDESDDLTL YRGTRNMNFYYWKYLYRKMFKKKKIVEVI		

**Abb. 3.21 Ta6TMP ist in den leukoproliferativen Theilerien Spezies konserviert**

**A** PCR-Amplifikate von Ta6TMP-cDNA in verschiedenen Theilerienarten. Primer wurden anhand der bekannten *T. annulata*- und *T. parva*-Sequenz generiert, ein 785 bp-Produkt wurde von der cDNA amplifiziert und anschließend sequenziert. 1 Größenmarker, 2 Negativkontrolle, 3 *T. annulata*, 4 *T. lestoquardi*, 5 *T. uilenbergi* und 6 *T. parva*. Bei *T. uilenbergi* konnte kein Produkt amplifiziert werden. **B** PCR-Amplifikate von Ta6TMP-cDNA in verschiedenen Stadien der Infektion mit *T. annulata*. Verwendete Primer siehe A 1 Größenmarker 2 Negativkontrolle 3 Piroplasmen 4 Schizonten **C** Alignment von kloniertem und sequenziertem Ta6TMP aus verschiedenen leukoproliferativen Theilerien. Grau unterlegte Bereiche mit roten Buchstaben kennzeichnen identische Aminosäuren in den drei Spezies, Blau zeigt identische Bereiche in zwei Spezies, grüne Buchstaben zeigen geringere Ähnlichkeit.

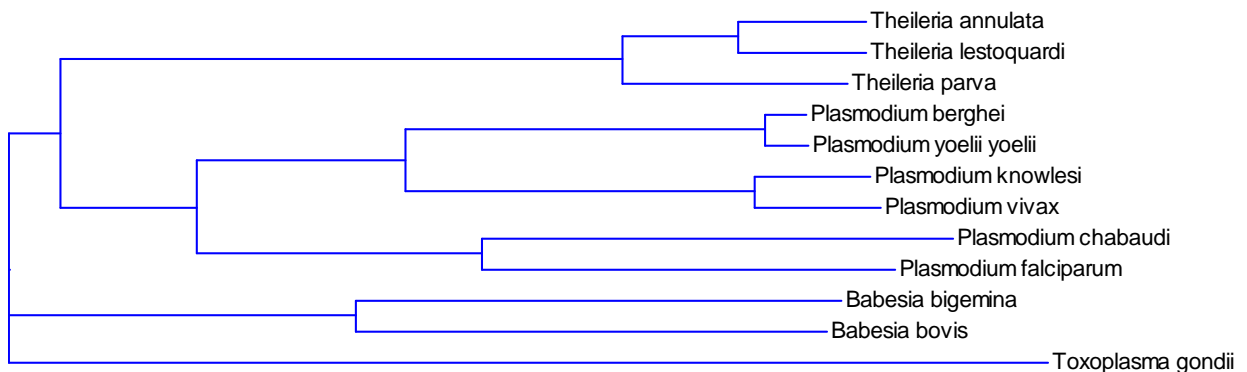
Des Weiteren konnte gezeigt werden, das Ta6TMP auch im späteren Stadium des Parasitenzyklusses, im Piroplasmenstadium exprimiert wird (Abb. 3.21 B, Bahn 3). Dies widerspricht der Vorhersage von GeneDB, aus der hervorgeht, dass Ta6TMP nur im Makroschizonten exprimiert wird.

### 3.3.4 Phylogenetische Analyse von Ta6TMP

Die zuvor gewonnenen Sequenzdaten legten einen kompletten Sequenzvergleich nahe. Dazu wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt.

Um evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse zwischen verschiedenen Apikomplexa-Spezies zu erhalten, wurde eine Blast-Suche mit der Proteinsequenz von Ta6TMP in den verschiedenen schon sequenzierten Genomen der Apikomplexa-Spezies durchgeführt. In fast allen untersuchten Apikomplexa-Spezies konnte ein Homolog von Ta6TMP gefunden werden, ausgenommen in *Cryptosporidium parvum* und in *Cyclospora cayetanensis*. Es wurde dann ein multiples Sequenzalignment durchgeführt. Anhand dieser gefundenen Proteine wurde dann ein phylogenetischer Baum mithilfe des Programms Phylip 3.67 erstellt (Abb. 3.22).

Der phylogenetische Baum bestätigt erneut die zuvor gewonnenen Daten: *T. annulata* ist mit *T. lestoquardi* näher verwandt als mit *T. parva*. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die leukoproliferativen Theilerienarten ein eigenes Cluster bilden. Der nächste Verwandte zu den Theilerien sind die Plasmodien. Die Babesien und *Toxoplasma gondii* sind phylogenetisch weiter von den Theilerien entfernt als die Plasmodien.



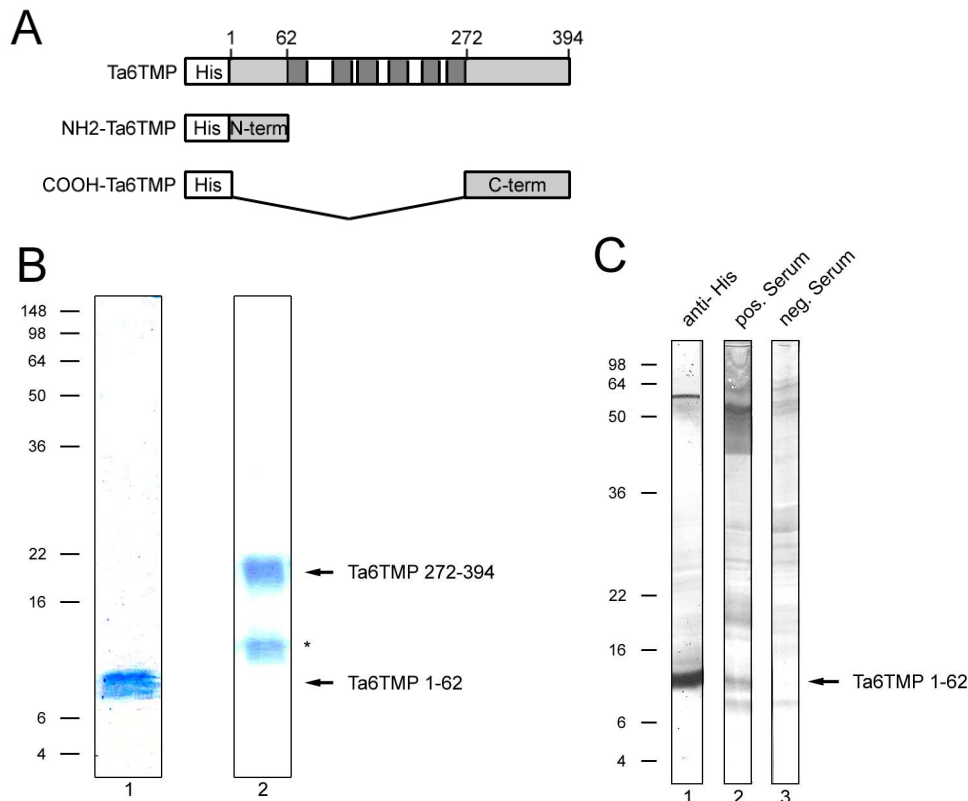
#### Abb. 3.22 Phylogenetischer Baum von Ta6TMP-Homologen in Apikomplexa

Phylogenetische Analyse von Ta6TMP in verschiedenen Apikomplexa (Plasmodien, Babesien und *T. gondii*). Anhand von BLAST-Suchen wurden in verschiedene Apikomplexa-Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu Ta6TMP gefunden und mittels des Programms Phylip 3.67 ein phylogenetischer Baum erstellt.

### 3.3.5 NH<sub>2</sub>-Ta6TMP besitzt Immunreaktivität mit Seren von infizierten Tieren

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Proteinen ist ihre Immunogenität. Diese wird bei der Diagnostizierung von Infektionskrankheiten wie Theileriose ausgenutzt. Hier sollte untersucht werden, ob das Antigen Ta6TMP eine Immunantwort in infizierten Tieren auszulöst. Dazu wurden beide aufgereinigten Fusionskonstrukte mit dem His-Tag (Abb. 3.23 A und B) in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot auf verschiedene Seren von natürlich und künstlich infizierten Tieren getestet (Abb. 3.23 C). Dabei zeigte nur der N-terminale Teil von Ta6TMP eine Immunreaktivität mit dem positiven Serum von infizierten Tieren. Der C-terminale Teil von Ta6TMP kreuzreagierte im Western blot auch mit dem Negativserum von nichtinfizierten Tieren (Daten nicht gezeigt). Im Western blot ist im Gegensatz zum Negativserum deutlich eine Proteinbande bei 11 kDa zu erkennen (Abb. 3.23 C, Bahn 2),

obwohl die Seren auch eine Kreuzreaktivität mit anderen vor allem höhermolekularen Proteinen zeigten. Als Positivkontrolle diente die Detektion mit dem anti-His-Antikörper (Bahn 1). NH<sub>2</sub>-Ta6TMP wäre also ein potentieller Marker für die Diagnose von East Coast Fieber (ECF). Dazu müssten aber noch weitere Untersuchungen bezüglich der Kreuzreaktivität mit anderen *Theileria*-Spezies und weitere immunologische Tests wie z. B. ELISA angeschlossen werden.



### Abb. 3.23 Ta6TMP ist ein immunreaktives Protein

**A** Die Grafik zeigt das Schema der cDNA-Konstrukte, die in dieser Untersuchung verwendet wurden. Alle Expressionskonstrukte wurden aus cDNA von *T. annulata* hergestellt; komplettes Ta6TMP (AS 1-394);  $\Delta$  63-394 Ta6TMP (AS 1-62);  $\Delta$  1-271 Ta6TMP (AS 272-394), dem die AS 1-271 fehlen. Alle Proteine besitzen einen N-terminalen His-Tag. In dunkelgrau sind die Transmembrandomänen von Ta6TMP dargestellt, in hellgrau die klonierten, extrazellulären Domänen von Ta6TMP. **B** Coomassie-gefärbtes Gel der Aufreinigung von  $\Delta$  63-394 Ta6TMP und  $\Delta$  1-271 Ta6TMP mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen. In Bahn 1 ist das 11 kDa Ta6TMP 1-62 zu sehen. Bahn 2 zeigt das 20 kDa große Ta6TMP 272-394. Stern markiert ein zusätzliches kleineres Fragment von  $\Delta$  1-271 Ta6TMP. **C** Western blot von  $\Delta$  63-394 Ta6TMP nachgewiesen mit Seren von infizierten Tieren. 20  $\mu$ g  $\Delta$  63-394 Ta6TMP wurden auf eine SDS-PAGE appliziert und immungeblottet mit dem anti-His-Antikörper, mit dem Positivserum eines infizierten Tieres, und mit dem Negativserum eines nichtinfizierten Tieres. Das 11 kDa große Ta6TMP konnte mit positivem Serum nachgewiesen werden. Mit dem Negativserum zeigte sich keine Bande auf dieser Höhe.

## 4 Diskussion

Die Sporozoiten von Theilerien dringen in Rinderleukozyten ein, wo sie sich über Makro- zu Mikroschizonten entwickeln. Die Leukozyten werden transformiert und zur permanenten Proliferation angeregt. Aus den Mikroschizonten entstehen Merozoiten, die in Erythrozyten eindringen. Die der Transformation der Wirtszellen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch ungeklärt. Diese Transformation muss jedoch von Parasitenproteinen hervorgerufen und aufrechterhalten werden, die Zugang zum Signaltransduktionsweg der Wirtszellen haben. Solche Proteine sollten entweder auf der Oberfläche der Parasiten lokalisiert sein oder aber in das Zytoplasma der Wirtszellen abgegeben werden. Das Schizontenstadium ist auch aufgrund der Interaktion des Parasiten mit dem Wirtszell-Mikrotubuli-System von großem biologischem Interesse.

Basierend auf diesen Daten waren wir daran interessiert, Parasitenproteine zu identifizieren, die eine Mikrotubuli-assoziierte Funktion besitzen und/oder in der Transformation der Wirtszelle eine Rolle spielen. Als potentieller Kandidat kam dabei das ‚*Theileria annulata* surface Protein‘ (TaSP) in Frage. TaSP ist ein Transmembranprotein mit einer polymorphen Struktur. Die Funktion von TaSP in infizierten Zellen ist aber völlig ungeklärt. Es besitzt Prolin- und Glutamin-reiche Sequenzen (Schnittger *et al.*, 2002; Seitzer *et al.*, 2007), die eine Interaktion mit Tubulin möglich machen (Dehmelt & Halpain, 2005). TaSP besitzt eine konservierte Domäne zwischen AS 184-303, die zu den Kupferionentransportern (‚copper transport proteins‘, Crt Proteine) zählt (Puig *et al.*, 2002). Das redoxaktive Metallion Kupfer ist ein essentieller Kofaktor in vielen biologischen Prozessen wie z. B. Atmung, Eisentransport, Schutz vor oxidativem Stress, Produktion von Hormonen und Pigmentbildung.

Ein weiteres Protein, welches in dieser Arbeit hinsichtlich seiner möglichen transformierenden Eigenschaften näher untersucht wurde, ist das 6-Transmembranprotein Ta6TMP.

### 4.1 TaSP assoziiert mit dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle

#### 4.1.1 Biochemische und funktionelle Interaktion zwischen TaSP und Tubulin

Mikrotubuli sind filamentöse Polymere, die in fast allen eukaryotischen Zellen gefunden werden. Die Mikrotubuli sind an der Aufrechterhaltung der Zellstruktur und -integrität, und der Organisation der subzellulären Komponenten beteiligt, sie agieren also auch als Bahnen für den intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen (Gundersen & Cook, 1999; Joshi, 1998). Sie sind die Hauptkomponenten der mitotischen Spindel und deshalb essentiell für die Zellteilung. Diese verschiedenen Funktionen spiegeln sich in den molekularen Eigenschaften der Mikrotubuli wieder. Die bedeutendste dieser Eigenschaften ist die Fähigkeit der Mikrotubuli reversibel zu polymerisieren (assemblieren) und zu depolymerisieren

(assemblieren), abhängig von den sie umgebenden Bedingungen und der Anwesenheit von Ionen, kleinen Molekülen und spezifischen Bindeproteinen. Die Assemblierung/Disassemblierung von aufgereinigtem Tubulin/Mikrotubuli findet *in vitro* in Anwesenheit von GTP spontan statt.

Die Mikrotubuli-Disassemblierung kann auch durch bestimmte Medikamente wie z. B. Colchicin, Vinblastin oder Nocodazol ausgelöst werden. Nocodazol bildet mit den Tubulin-Dimeren einen inaktiven Komplex. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration an freiem Tubulin abnimmt; bis sie unter einen kritischen Wert fällt, und die Mikrotubuli abgebaut werden. Tubulin-bindende Medikamente zerstören die Dynamik der Mikrotubuli und können deshalb als Medikament in der Krebstherapie verwendet werden. Die Stabilisierung der Mikrotubuli z. B. durch Taxol stoppt den Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase der Mitose und blockiert somit die Zellteilung. Taxol bindet  $\beta$ -Tubulin in einer Tasche in der Nähe der M-Schleife und  $\alpha$ -Tubulin in einer Schleife zwischen S9 und S10 (Orr *et al.*, 2003).

Während andere intrazelluläre Erreger mit dem Wirtszellzytoskelett interagieren oder es sogar umformen (Cudmore *et al.*, 1997; Dramsi & Cossart, 1998), ist die Assoziation des Schizonten mit dem Wirtszell-Mikrotubulinetzwerk noch ungewöhnlicher. Nachdem der *Theileria*-Sporozoit in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt wurde, assoziiert er mit dem von der Wirtszelle gebildeten Mikrotubulinetzwerk (Shaw, 2003). Diese Assoziation wird wahrscheinlich durch Proteine, die von den Mikrosphären auf dem Parasiten sekretiert werden, vermittelt. Um welche biochemische Interaktion es sich aber dabei handelt und welche Parasitenproteine mit den Mikrotubuli der Wirtszelle interagieren, ist noch nicht geklärt. Bisher konnte nur ein potentieller Kandidat identifiziert werden: das TaSE Protein („*Theileria annulata* sekretorisches Protein“), welches ins Wirtszellzytoplasma sekretiert wird (Ravindran & Boothroyd, 2008; Schneider *et al.*, 2007). Mithilfe von konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass das Protein die Fähigkeit besitzt, sich entlang der Wirtszellmikrotubuli zu orientieren. Eine spezifische Assoziation mit  $\alpha$ -Tubulin wurde weiterhin durch die Fähigkeit von TaSE mit dem  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper zu kopräzipitieren, nachgewiesen. Trotzdem zeigten die Kolokalisations- und Koimmunpräzipitationsexperimente, dass nur ein Teil des exprimierten TaSE mit Tubulin interagiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass TaSE eher mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen als mit Tubulin direkt interagiert. Die Tatsache, dass TaSE assoziiert mit der mitotischen Spindel vorliegt, spricht weiterhin für eine mögliche Rolle in der Sicherstellung der gleichmäßigen Verteilung der *Theileria*-Schizonten während der Zellteilung.

Ein anderes Parasitenprotein, das als möglicher Interaktionspartner mit der Wirtszelle eine Rolle spielen könnte, TaSP, ist Gegenstand dieser Arbeit. Es wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, die eine spezifische Interaktion zwischen TaSP und Tubulin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bewiesen.

Als Erstes konnte durch Immunfärbungen mit anti-TaSP- und anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern an mit *Theileria annulata*-infizierten Leukozyten eine Kolokalisation von  $\alpha$ -Tubulin mit TaSP spezifisch nachgewiesen werden. Diese beobachtete partielle Kolokalisation konnte auch im heterologen System in transfizierten Zellen mit exogen überexprimiertem TaSP bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung des Mikrotubulinnetzwerkes mit Nocodazol zu einer Aufhebung der Kolokalisation des TaSP mit  $\alpha$ -Tubulin führte. Im Gegensatz zu Nocodazol bewirkt Taxol eine vermehrte Polymerisation der Tubulindimere. Hierbei zeigte sich in Taxol behandelten Zellen, dass TaSP mit den Tubulin-Clustern assoziiert bleibt.

Zweitens wurde in reziproken Koimmunpräzipitations-Experimenten die Existenz eines Komplexes zwischen TaSP und  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen. Die Kopräzipitation mit  $\alpha$ -Tubulin wurde aus Zelllysaten, das entweder exogenes oder endogenes TaSP exprimiert, detektiert. Drittens konnte in ‚pull down‘-Experimenten mit aufgereinigten polymerisierten Mikrotubuli und aufgereinigtem rekombinanten TaSP eine direkte Interaktion mit den Mikrotubuli bewiesen werden. Diese direkte Assoziation konnte aber nicht für die Tubulin-Dimere nachgewiesen werden. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Proteine wie z. B. MAP2 oder tau nötig sind, um seine Mikrotubuli-interagierende Eigenschaft auszuführen (Dehmelt & Halpain, 2005).

Darüber hinaus ist die beobachtete Interaktion zwischen TaSP und  $\alpha$ -Tubulin von der Anwesenheit des Parasiten in der Wirtszelle abhängig, da eine Eliminierung des Parasiten durch Buparvaquone-Behandlung eine verminderte Koimmunpräzipitation von  $\alpha$ -Tubulin mit TaSP zur Folge hatte.

Diese zytologischen und biochemischen Experimente liefern starke Hinweise auf einen TaSP-Tubulin-Komplex sowohl in Theilerien-infizierten als auch in transfizierten Zellen. Darüber hinaus weisen die Daten auf eine Mikrotubuli-Bindungsaffinität von TaSP hin, die ähnlich der von anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen ist.

Die Dynamik der Mikrotubuli wird von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) bestimmt. Diese können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: einige MAPs stabilisieren die Mikrotubuli, andere führen zur Destabilisierung der Mikrotubuli. Stabilisierende MAPs besitzen eine Mikrotubulus-Binde-Domäne am C-Terminus und eine saure Projektionsdomäne, welche an Intermediärfilamente oder Membranen bindet und den Abstand zwischen gebündelten Mikrotubuli bestimmt. Solche Mikrotubuli-assoziierten Proteine sind in verschiedenen Systemen angefangen von Hefe bis hin zu Säugetieren beschrieben worden. Das Vorhandensein von MAPs in Apikomplexa allerdings ist aufgrund der hochorganisierten Struktur der Parasiten nicht ganz geklärt (Morrissette & Sibley, 2002). Trotzdem gibt es Hinweise darauf, dass MAPs mit den Mikrotubuli assoziieren (Morrissette *et al.*, 1997; Morrissette *et al.*, 1994; Morrissette & Roos, 1998). Darüber hinaus wurden u. a. in

Genomdatenbanken von *Plasmodium*, *Toxoplasma* und *Theileria* putative Sequenzen von Kinesinen und Dyneinen gefunden.

Eine nähere Betrachtung der 131 großen Aminosäureregion von TaSP, die in dieser Arbeit untersucht wurde, zeigt aber keine Sequenzähnlichkeit mit anderen bekannten MAPs. Während Proteine der MAP2/tau-Familie und MAP4 vier Repeats einer konservierten 31 Aminosäuren langen Sequenz enthalten, die die Bindung an die Mikrotubuli vermittelt (Lewis *et al.*, 1988; West *et al.*, 1991; Doll *et al.*, 1993), und MAP 1B verschiedene Repeats der Sequenz KKEE, KKEI oder KKEV (Noble *et al.*, 1989) enthält, konnten keine entsprechenden sich wiederholenden Sequenzmotive in der Sequenz von TaSP, die an der Interaktion mit Tubulin beteiligt sein muss, identifiziert werden. Außerdem ist die Aminosäure-Zusammensetzung der Mikrotubuli-Bindungsregion in TaSP signifikant verschieden von anderen MAPs: Im Allgemeinen sind Mikrotubuli-Bindedomänen basisch und enthalten sehr viele Lysin- (K), Valin- (V), Prolin- (P) und Glycinreste (G) (Nogales, 2001). So besteht die tau-Sequenz aus Ratten aus 23 % basischen Aminosäuren und hat einen isoelektrischen Punkt von 10,3. Diese Aminosäurereste sind ebenfalls in vermehrter Anzahl in der Proteinsequenz der extrazellulären Domäne von TaSP enthalten (Abb. 1.5 A, S. 19). Allerdings beträgt der pI von TaSP 3,95 (nach ProtPara, Tab. 3.1). Das Protein verhält sich somit eher sauer. Aus diesen Betrachtungen kann geschlossen werden, dass es sich bei der Interaktion von TaSP und Tubulin um eine noch unbekannte mit der Mikrotubuli-interagierenden Domäne im TaSP handeln muss.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine stärkere Assoziation mit Tubulin mit dem kompletten TaSP-Protein möglich ist, die vielleicht durch den C-terminalen Teil von TaSP vermittelt wird, da in dieser Arbeit nur der extrazelluläre Bereich (AS 25-156) von TaSP untersucht wurde.

#### **4.1.2 Mögliche Rolle von TaSP in der Verteilung des Parasiten auf die Wirtszellen**

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung eine Interaktion zwischen intrazellulären Parasiten und dem Mikrotubulinetzwerk für das Überleben und die Vermehrung des Parasiten in den Wirtszellen hat. Obwohl bisher keine direkte Assoziation mit den Mikrotubuli der Wirtszelle für die intrazellulären Parasiten wie *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* und *Toxoplasma gondii* nachgewiesen werden konnte, wurde vor kurzem in dem Apikomplexa-Parasiten *Toxoplasma gondii* gezeigt, dass er aktiv Wirtszellmikrotubuli rekrutiert, um sich über die parasitäre Vakuole (PVM) mit Nährstoffen zu versorgen (Coppens *et al.*, 2006; Gruenberg & van der Goot, 2006). Dabei dienen Mikrotubuli-basierte Einstülpungen der PVM als Leitung für den Transport von Wirtsorganellen, den Endolysosomen, in den Vakuolarraum des Parasiten. Dies stellt einen neuen Mechanismus für einen einseitigen Organellentransport und -sequestrierung dar. Dabei spielt das Parasitenprotein GRA7 in der Sequestrierung von endozytischen Organellen der Wirtszelle

eine wichtige Rolle. Auch spielen die Wirtszellmikrotubuli in der Zellteilung von *Toxoplasma gondii* eine wichtige Rolle (Shaw *et al.*, 2000).

Zellteilung in eukaryotischen Zellen ist eine zusammenhängende Serie von komplexen, aber genau koordinierten makromolekularen Prozessen. Diese beinhalten sowohl die DNA-Synthese, die Chromosomenseparation und die Zellkernteilung (Karyokinese) als auch die Aufteilung von Zytoplasma und Organellen auf die Tochterzellen (Zytokinese). Das Voranschreiten durch den Zellteilungszyklus wird kontrolliert und koordiniert durch eine Reihe von Haltepunkten, die sicherstellen, dass Mitose und Zytokinese nicht stattfinden, bevor die DNA-Replikation erfolgreich vollendet ist (Hartwell & Weinert, 1989; Elledge, 1996).

Die DNA-Synthese des Wirtszellkerns und des Makroschizonten verlaufen nicht synchron (Irvin *et al.*, 1982) und sind darüber hinaus unabhängig voneinander, da die G<sub>2</sub>-Phase des Parasiten verkürzt bzw. nicht vorhanden ist. Dieses Phänomen wurde auch für andere Apikomplexa-Parasiten beschrieben und scheint ein allgemeiner Mechanismus von intrazellulären Parasiten zu sein. Für *Toxoplasma* konnte z. B. nachgewiesen werden, dass die Zellzykluskontrollpunkte fehlen oder herunterreguliert sind (Shaw *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Inhibitoren, die die DNA-Synthese inhibieren (z. B. Aphidocolin) oder durch Mikrotubuli-beeinflussende Agenzien wie z. B. Nocodazol, Taxol oder Oryzalin die Replikation des Parasiten unterbrochen wurde. Andere Gruppen konnten hingegen zeigen, dass durch Inhibitionsexperimente und Untersuchung von Temperatur-sensitiven Mutanten von *Toxoplasma*, der Zellzyklus an bestimmten Punkten wie dem G<sub>1</sub>/S- oder dem S/M-Kontrollpunkt angehalten werden kann (White *et al.*, 2005; Radke *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass der Zellzyklus der Wirtszelle vom Parasiten kontrolliert wird.

Welche Rolle die Interaktion von TaSP, ein Oberflächenprotein von *Theileria annulata*, mit den Mikrotubuli bei der Zellteilung bzw. Verteilung des Schizonten auf die Tochterzellen spielt, ist weitgehend unbekannt. Allerdings ist bekannt, dass sich der *Theileria*-Parasit durch die Anheftung an die mitotische Spindel auf die beiden Tochterzellen während der Wirtszellteilung verbreitet (Shaw *et al.*, 1991). Formal existieren drei prinzipielle Möglichkeiten im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung der zuvor beschriebenen Interaktion: (1) TaSP könnte bei der Assemblierung des Tubulins mitwirken. (2) Die Schizonten könnten durch TaSP eine oder mehrere der vielen verschiedenen funktionellen Eigenschaften der Mikrotubuli nutzen. (3) Tubulin und/oder Mikrotubuli können die TaSP-Funktion modulieren, indem sie seine zelluläre Lokalisation regulieren. Noch wichtiger ist, dass sich diese Möglichkeiten nicht zwangsläufig ausschließen, was das Potential für komplexe funktionelle Beziehungen in den Zellen erlaubt.

Die Zellzyklus-abhängige Lokalisation der Schizonten - nachgewiesen durch den TaSP-Antikörper - war besonders auffällig an der mitotischen Spindel. Während der

Interphase lag der Parasit eingebettet im Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle vor und verteilte sich während der Mitose zu den Spindelpolen um. Die Zellzyklus-abhängige Assoziation von TaSP mit den Mikrotubuli konnte durch Koimmunpräzipitations-Experimente an mitotischen und Interphasezellen bestätigt werden. Ein ähnliches Phänomen wurde in transfizierten Zellen beobachtet.

TaSP lokalisiert dabei an allen drei Typen von Spindelmikrotubuli (Mastronarde *et al.*, 1993): den Kinetochormikrotubuli, den Nichtkinetochormikrotubuli der Zentralspindel in der Anaphase und den astralen Mikrotubuli. Während der Zytokinese kolokalisierten endogenes und überexprimiertes TaSP mit der zentralen Spindel der ‚Midzone‘ und am kompletten Midbody, wo TaSP möglicherweise den Fortschritt und die Vervollständigung der Zytokinese beeinflusst. Die Zytokinese wird an verschiedenen Punkten durch die Beteiligung von verschiedenen Molekülen, die sich am Midbody ansammeln, kontrolliert (McCollum, 2005). Diese Beobachtungen sprechen für eine Beteiligung von TaSP an der Verteilung des Parasiten auf die Tochterzellen.

Da TaSP mehrere vorhergesagte Phosphorylierungsstellen für die Cdc2/Cyclin-B Kinasen besitzt (Tab. 3.1), die eine Rolle in der Regulation des Zellzyklusses spielen, kann spekuliert werden, dass diese Cyclin-abhängigen Kinasen vielleicht eine Funktion bei der Regulierung der TaSP-Lokalisation während der Mitose ausüben. Cdc2 (oder Cdk1) ist eine Cyclin-abhängige Kinase (CDK), die, wenn sie an Cyclin B gebunden vorliegt, den Übergang einer sich teilenden Zelle von der G<sub>2</sub>-Phase in die Mitose erlaubt (Jackman & Pines, 1997).

TaSP besitzt noch weitere vermeintliche Phosphorylierungsstellen (s. Anhang) für PKA (AS 304, 217), PKC (AS 133, 188, 295, 298) und CKII (AS 74, 93, 100). Eine Reihe von Hinweisen zeigt, dass CKII, PKC und PKA mit dem mitotischen Apparat und dem Zellzyklus verbunden sind.

Auffallend war außerdem die partielle Lokalisation von TaSP am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (‚MTOC‘). Sowohl während der Interphase als auch der Zellteilung assoziierte TaSP mit dem MTOC der Wirtszelle. Dies spricht für eine funktionelle oder strukturelle Rolle des Proteins an der Mikrotubulinukleation und -polymerisation. Ob die Beteiligung von TaSP in der Mikrotubulidynamik von Motorproteinen oder anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen abhängig ist, bleibt noch zu untersuchen. Die Bildung (Nukleation) der Mikrotubuli in der Zelle geht vom MTOC aus. Das MTOC besteht aus verschiedenen Proteinen wie  $\gamma$ -Tubulin (Oakley, 1992) und Percentrin (Dichtenberg *et al.*, 1998). Die Mikrotubuli richten ihr Minus-Ende zum MTOC. Im Allgemeinen hat jede eukaryotische Zelle ein primäres MTOC, das Zentrosom. Das Zentrosom besteht aus einem Paar Zentriolen, das von amorphem Material, der perizentriolären Matrix (PCM) umgeben ist und verschiedene Proteine für die Regulierung der Zentrosomenverdopplung und Funktion bereitstellt. In vielen Zellen ist

$\gamma$ -Tubulin mit anderen Proteinen in einem 2,2 MDa großem Tubulin-Ringkomplex ( $\gamma$ -TuRC) assoziiert. Während der Interphase ist das Zentrosom in der Nähe des Zellkerns lokalisiert. Verschiedene mitotische Kinasen der Aurora-, Polo- und Nek-Familie lokalisieren zumindest zeitweise an den mitotischen Mikrotubulstrukturen und nehmen an der Kontrolle des Zentrosomenzyklusses sowie der Bildung der mitotischen Spindel teil. Es wird spekuliert, dass die Zentrosomen neben ihren etablierten Funktionen auch in verschiedene regulatorische Ereignisse des Zellzyklusses wie den Eintritt in die Mitose, die Zytokinese, den G<sub>1</sub>/S-Übergang und die Kontrolle von DNA-Schäden involviert sind. Das Zyklin B1-Cdk1 lokalisiert zum Beispiel am Zentrosom und induziert die mitotischen Ereignisse. Dies sind Hinweise darauf, dass es eine Verbindung zwischen zentrosomalen Prozessen und der Initiierung der Mitose gibt. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Zentrosomen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklusübergangs von der G<sub>2</sub>-Phase in die Mitose spielen (Kramer *et al.*, 2004) und auch für den Übergang zwischen Metaphase und Anaphase von Bedeutung sind (Doxsey *et al.*, 2005b). Es konnten auch bestimmte Proteine identifiziert werden, die sowohl am Zentrosom in der frühen Mitose als auch später am Midbody lokalisieren und für die Zellteilung wichtig sind (Doxsey *et al.*, 2005a).

Trotz ihrer Bedeutung ist wenig darüber bekannt, wie die Zentrosomen mit den Mikrotubuli auf molekularer Ebene interagieren und in welche Prozesse zentrosomale Proteine involviert sind. Eine Reihe dieser Proteine konnte bislang identifiziert werden. Es scheint, dass sie neben ihrer abweichenden Aminosäuresequenz eine gemeinsame Sekundärstruktur teilen: Alle sind coiled-coil Proteine. TaSP weist allerdings keine Sequenzidentität mit schon bekannten zentrosomalen Proteinen, wie z. B. Zentrosomin (Li *et al.*, 1998), Kendrin (Flory *et al.*, 2000), Ninein (Bouckson-Castaing *et al.*, 1996), PACT-Domänen- (Gergely *et al.*, 2000) oder den TACC-Domänen-Proteinen (Gillingham & Munro, 2000) auf. Durch die Sekundärstruktur sind zentrosomale Proteine in der Lage, ein Gerüst zu formen, an das assoziierte Proteine sowie der sogenannte  $\gamma$ -TURC-Komplex zu binden. Vielleicht ist TaSP in der Rekrutierung oder Verankerung von  $\gamma$ -TURCs ( $\gamma$ -tubulin ring complex') an das Zentrosom, welches eine Grundvoraussetzung für die Mikrotubulinukleation ist, involviert. Für andere Apikomplex-Parasiten konnte ebenfalls eine Assoziation mit den Zentrosomen nachgewiesen werden. So wurde in *Toxoplasma gondii* gezeigt, dass der Parasit während der Zellteilung eng mit den Zentrosomen verbunden ist (Striepen *et al.*, 2000). Die biologische Signifikanz der Zentrosomenlokalisierung von TaSP ist allerdings nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Tubulin und Mikrotubuli in der Lage sind, zelluläre Signalwege über die direkte Interaktion mit einer Reihe von Signalmolekülen zu beeinflussen (Roychowdhury & Rasenick, 1997; Roychowdhury & Rasenick, 1994). Da sich die Schizonten in der perinukleären Region der Wirtszelle aufhalten und dort mit dem

Tubulingerüst der Wirtszelle assoziiert vorliegen, ist eine direkte Nutzung des Tubulingerüsts als Transportweg zu vermuten. Nach einer interessanten Hypothese interagiert der Parasit über seine Assoziation mit dem Mikrotubulinetzwerk mit den Signaltransduktionswegen der Wirtszelle. *T. annulata*-Parasitenproteine der AT-hook-Familie (TashAT, TashHN und SuAT1) konnten im Wirtszellkern detektiert werden (Swan *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2001; Shiels *et al.*, 2004). Daher kann die Ausnutzung des Mikrotubulinetzwerkes als Transportweg nicht ausgeschlossen werden. Zudem wurde eine Einflussnahme der Parasiten auf das Zytoskelett der Wirtszelle durch das vermutlich sezernierte Protein SuAT1 von Shiels *et al.* (2004) beschrieben. Das Protein SuAT1 scheint vermehrt im Wirtszellkern infizierter Makrophagen lokalisiert zu sein und übt nach einer Transfektion in eine bovine Makrophagen-Zelllinie (BoMac) direkten Einfluss auf das Expressionsprofil von Zytokeratin aus.

Nicht ganz ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass das Tubulingerüst im Falle des TaSP-Proteins als Transportmatrix genutzt wird, wie dies bei einigen Viren der Fall ist. Jedoch muss dies noch durch gezielte Untersuchungen mit den Motorproteinen Kinesin und Dynein, die sich zusammen mit ihrer Fracht entlang der Mikrotubuli bewegen, gezeigt werden. Es kann des Weiteren nicht ausgeschlossen werden, dass der Parasit über die Assoziation mit den Mikrotubuli an andere Wirtszellproteine bindet, die er für die Aufrechterhaltung seines eigenen Metabolismus benötigt.

Basierend auf der beobachteten verlangsamten elektrophoretischen Beweglichkeit von TaSP in der SDS-PAGE ist es sehr wahrscheinlich, dass es posttranslational modifiziert wird. Posttranslationale Modifikationen wie z. B. die Phosphorylierung finden in eukaryotischen Zellen, aber nicht in prokaryotischen Zellen wie *E. coli* statt. Die Fähigkeit der MAPs Mikrotubuli zu binden, kann durch die Phosphorylierung der MAPs durch MAP-Kinasen beeinflusst werden (Drewes *et al.*, 1998). Für die Phosphorylierung konnte weiterhin demonstriert werden, dass sie die Fähigkeit von Tubulin mit Membranen zu interagieren, reguliert (Hargreaves *et al.*, 1986). Im Western blot zeigte sich eine verschobene immunreaktive Bande von endogenem TaSP bei einer Größe von ca. 47 kDa. Die Natur dieser Modifikation, die für diese Bandenverschiebung verantwortlich ist, ist allerdings unbekannt und muss noch näher untersucht werden. Die Identität der 47 kDa anti-TaSP-Bande als TaSP konnte jedoch durch Präabsorptionsexperimente mit dem TaSP-Antigen bestätigt werden. Im Moment kann über die funktionelle Bedeutung dieser Modifikation allerdings nur spekuliert werden. Auffallend war, dass sowohl im Fall endogenen als auch im Fall des exogenen TaSP eine Diskrepanz von ca. 12 kDa zwischen vorhergesagter und im Western blot bestimmter Proteingröße bestand. Interessanterweise ist dieser Größenunterschied im Molekulargewicht von 12 kDa für die Sumoylierung beschrieben worden. Die SUMO-(**S**mall **U**biquitin-like **M**odifier') Proteine bilden eine Familie

von 12 kDa großen Proteinen, die kovalent an andere Proteine binden, um ihre Funktion zu modifizieren. Darüber hinaus besitzt das TaSP Protein vier mit SUMOplot vorhergesagte Sumoylierungsstellen (Tab. 3.1 und s. Anhang), sodass eine solche posttranslationale Modifikation sehr wahrscheinlich ist. Sumoylierung ist in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zellkern-Zytoplasma-Transport, transkriptionelle Regulation, Apoptose, Proteinstabilität, Stressantwort und Fortschreiten des Zellzyklus beteiligt (Hay, 2005). SUMO-Proteine ähneln dem Ubiquitin. Die Sumoylierung steht unter der Regie einer enzymatischen Kaskade, die analog zu der in der Ubiquitinierung ist, nur dass die mit SUMO markierten Proteine im Gegensatz zu Ubiquitin nicht degradiert werden. Die Sumoylierung der Zielproteine zeigt sich in einer Reihe von verschiedenen Auswirkungen wie z. B. einer veränderten Lokalisation oder veränderten Bindungspartnern. Die SUMO-Modifikation von hNinein z. B. führt zu einer Translokation vom Zentrosom in den Zellkern (Cheng *et al.*, 2006). In vielen Fällen korreliert die SUMO-Modifikation von transskriptionellen Regulatoren mit der Inhibition der Transkription (Gill, 2005).

Interessanterweise besitzt TaSP eine weitere vorhergesagte Modifikation (s. Anhang), die Sulfatierung eines Tyrosin-Restes (AS 152). Dabei wird eine Sulfatgruppe an die Tyrosinseitengruppe angehängt. Sekretierte Proteine und der extrazelluläre Teil von Membranproteinen, die durch den Golgi-Apparat transportiert werden, können sulfatiert werden. Diese posttranslationale Modifikation verstärkt Protein-Protein-Interaktionen und könnte deshalb auch eine entscheidene Rolle in der Bildung des TaSP-Tubulin-Komplexes spielen. Dies muss aber noch weiter untersucht werden.

Ein Tumorsuppressor-Protein, welches ebenfalls eine Prolin-Glutamin-reiche Region mit Transkriptions-regulierender Funktion aufweist, ist WT1, das Wilms-Tumor-Genprodukt (Rauscher, III, 1993). Es ist also nicht auszuschließen, dass TaSP auch eine Funktion als Transkriptionsfaktor erfüllt. Ein Hinweis hierauf ist die Tatsache, dass Teile von TaSP im Zellkern nachgewiesen werden konnten, so wie es auch für andere Tumorsuppressoren beschrieben ist.

Des Weiteren besitzt TaSP ebenso wie PIM zwei Cysteinaminosäuren am C-terminalen Ende, die als Zielsequenz für die Isoprenylierung von verschiedenen Proteinen, wie solche der ras-verwandten rab-Proteinfamilie beschrieben sind. Es wird angenommen, dass solche Prenylgruppen die Anheftung an Zellmembranen, ähnlich den GPI-Ankern, erleichtern. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Modifikation für die Protein-Protein-Bindung wichtig ist.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die TaSP-Tubulin-Interaktion und eine mögliche Interaktion des TaSP-Tubulin-Komplexes mit anderen Proteinen, die die Assoziation zwischen TaSP und Tubulin begünstigen, zu bestimmen.

## 4.2 p53 ist möglicherweise durch Ta6TMP am Schizonten arretiert

### 4.2.1 Funktion von p53 in *T. annulata*-infizierten Lymphozyten und anderen leukoproliferativen Theilerien

Vor mehr als einem Jahrzehnt gab es zum ersten Mal Hinweise darauf, dass einzellige Parasiten wie z. B. *Leishmania donovani* den apoptotischen Zelltod ihrer Wirtszelle manipulieren wie es zuvor schon für Viren und Bakterien beschrieben wurde (Benedict *et al.*, 2002). Seitdem konnte die Zahl der Parasiten, die die Apoptosesignalwege in der Wirtszelle modulieren - darunter auch bestimmte Theilerien-Spezies - erweitert werden. Die unterschiedlichen Einzeller verwenden verschiedene Strategien, um die Wirtszelle zu manipulieren. Dies schließt die Induktion und die Inhibition des apoptotischen Zelltodes als auch die gleichzeitige Auslösung von sowohl pro-apoptotischen als auch anti-apoptotischen Aktivitäten ein (Heussler *et al.*, 2001b). Intrazelluläre Protozoen wie *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* und *Theileria* spp. haben Mechanismen entwickelt, die die Apoptose in der infizierten Wirtszelle unterdrücken oder verzögern (Schaumburg *et al.*, 2006).

Die Infektion von Zellen mit intrazellulären Parasiten ist normalerweise ein Stresssignal der Zelle, das zur Apoptose führt. Sie ist deshalb im Allgemeinen ein angeborener Verteidigungsmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene. Dies konnte bereits für einige Viren beschrieben werden. Die Gruppe der intrazellulären Einzeller bildet damit eine Ausnahme, indem Sie die spontane Wirtszellapoptose oder die durch stressverwandte pro-apoptotische Stimuli induzierte Apoptose inhibiert und somit das natürliche Selbstmordprogramm der Zelle blockiert. Zu diesen Einzellern gehören *Leishmania* spp., *T. cruzi*, *T. gondii*, *C. parvum*, *Theileria* spp. und *P. berghei*. Das Ausmaß der Inhibierung variiert aber sowohl zwischen den verschiedenen Parasitenspezies als auch zwischen den verschiedenen Wirtszelltypen. Im Fall von *T. parva*, *T. annulata*, *Toxoplasma* und *Leishmania* scheint die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) für den Schutz der infizierten Zelle vor Apoptose entscheidend zu sein (Heussler *et al.*, 2002; Moore & Matlashewski, 1994; Nash *et al.*, 1998).

*Theileria*-Parasiten sind Meister in der Manipulation der Wirtszelle, da sie nicht nur die apoptotischen Signalwege inhibieren, sondern auch die unkontrollierte Proliferation im infizierten Leukozyten induzieren und die Wirtszelle somit transformieren (Heussler *et al.*, 2006). Diese parasitierten Zellen können *in vitro* kultiviert werden und zeigen verschiedene phänotypische Eigenschaften, die für Tumorzellen charakteristisch sind. Eine wichtige Aufgabe ist es deshalb, Parasiten-induzierte Ereignisse und Moleküle zu identifizieren, die direkt zur Induktion und Aufrechterhaltung des Phänomens der Transformation beitragen. Obwohl schon Veränderungen im Expressionprofil von wichtigen regulatorischen Wirtszellmolekülen (z. B. NF $\kappa\text{B}$ ) in immortalisierten Zellen charakterisiert wurden, ist bis jetzt

unbekannt, wie die Infektion der Wirtszelle durch den Parasiten diese Veränderungen initiiert.

Vor Kurzem wurde der p53-Apoptose-Signalweg mit den beteiligten pro- und anti-apoptotischen Proteinen in *Theileria annulata* untersucht (Haller, 2004). Dabei zeigte sich, dass der klassische p53-Apoptose-Signalweg inhibiert ist und pro-apoptotische Gene wie Apaf-1 und Bax herunterreguliert und das anti-apoptotische Gen Bcl-2 hochreguliert werden. Die Inhibierung der p53-vermittelten Apoptose ist auf die Arretierung von p53 im Zytoplasma der Wirtszelle zurückzuführen. Dass diese zytoplasmatische Arretierung parasitenabhängig ist, konnte durch Behandlung des Parasiten mit einem theileriziden Medikament bewiesen werden. Nach der Tötung des Parasiten konnte p53 im Zellkern der Wirtszelle nachgewiesen werden. Die Translokation von p53 korrelierte mit der vermehrten Expression von pro-apoptotischen und der verminderten Expression von anti-apoptotischen Proteinen.

Des Weiteren konnte in der Arbeit von Haller (2004) gezeigt werden, dass das p53-Wirtszellprotein in infizierten Leukozyten am Parasiten lokalisiert, sodass die Vermutung nahe liegt, dass p53 mit einem Parasitenprotein interagiert.

Deshalb wurde in dieser vorliegenden Arbeit die Lokalisation von p53 an isolierten Schizonten untersucht. Dabei zeigte sich eine direkte spezifische Assoziation von p53 mit der Membran des Parasiten. Dass es sich hierbei um einen allgemeinen Mechanismus für lymphoproliferative *Theileria* spp. zur Inhibierung des Apoptosesignalweges von p53 handeln muss, konnte ebenfalls durch die Assoziation von p53 mit der Membran isolierter *T. parva* Schizonten nachgewiesen werden. Weiterhin wurde bewiesen, dass p53 auch in mit *T. lestoquardi* infizierten Zellen mit der Membran des Schizonten kolokalisiert. p53 wird also möglicherweise durch ein oder mehrere Parasitenproteine an die Oberfläche des Schizonten rekrutiert und arretiert, wodurch der Apoptose-Signalweg von p53 inhibiert wird.

Die Immortalisierung der Wirtszelle wird entweder durch Proteine, die direkt über die Schizontenmembran ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert werden oder durch Proteine, die auf der Parasitenoberfläche vorhanden sind und somit ebenfalls in direkten Kontakt mit dem Wirtszellzytosol stehen, hervorgerufen.

Ein möglicher Interaktionspartner von p53 könnte das von Haller (2004) beschriebene Ta6TMP sein, welches eine Homologie zu dem Humane Papillomvirus 18 E6-Protein aufweist. Dieses virale Protein wurde in anderen Systemen als transformationsrelevant beschrieben, indem es p53 bindet und durch proteosomale Degradierung inaktiviert (Scheffner *et al.*, 1990).

#### 4.2.2 Charakterisierung und Untersuchungen zur Funktion eines potentiellen Interaktionspartners von p53 – Ta6TMP

Die phylogenetische Analyse des Ta6TMP-Proteins in verschiedenen Apikomplexa-Spezies ergab verschiedene Cluster. Dabei bildeten die Theilerien spp. eine eigene Gruppe, in der *T. annulata* näher mit *T. lestoquardi* als mit *T. parva* verwandt ist. Da Ta6TMP hochkonserviert in leukoproliferativen Theilerienarten vorhanden ist (*T. lestoquardi*, *T. parva*), ist es möglich, dass das Protein an der Transformation der Wirtszelle beteiligt ist, z. B. durch die Arretierung des p53-Proteins im Zytoplasma und damit verbundene Inhibierung des p53-Apoptoseweges.

Bei Ta6TMP handelt es sich um ein nicht-sekretorisches Membranprotein. Es konnten in der vorliegenden Arbeit vermehrt Hinweise dafür erbracht werden, dass Ta6TMP an der Inhibierung des p53-Apoptose-Signalweges beteiligt sein könnte. So konnte im heterologen System eine partielle Kolo-kalisation von Ta6TMP mit p53 in exogen Ta6TMP-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Dies war sowohl für den N-terminalen wie auch den C-terminalen Teil von Ta6TMP zu beobachten.

Besonders auffallend war die Lokalisation des C-terminalen Teils von in COS-7-Zellen überexprimierten Ta6TMP, der in den Nukleoli detektiert wurde. Die funktionelle Bedeutung dieser nukleolisomalen Lokalisation ist allerdings unbekannt. Möglicherweise spielt die nukleoläre Lokalisation von COOH-Ta6TMP eine wichtige Rolle in der Vermittlung der p53-Aktivität, und die Relokalisation ist notwendig, um vorgeschaltete Signalwege zu beeinflussen.

Eine PEST-Domäne, die für den proteosomalen Abbau von Proteinen verantwortlich sind, konnte in der Ta6TMP-Sequenz nicht identifiziert werden.

Ta6TMP besitzt ebenfalls verschiedene vorhergesagte Sumoylierungsstellen (Tab. 3.2 und s. Anhang), die wahrscheinlich für die Lokalisation von COOH-Ta6TMP im Nukleolus verantwortlich ist. Möglicherweise reguliert Ta6TMP die Aktivität seiner Bindungspartner über posttranslationale Modifikationen.

Als Nukleolus bezeichnet man das Kernkörperchen eukaryotischer Zellen. Es ist eine membranlose Organelle im Zellkern (Shaw & Jordan, 1995). Der Nukleolus ist die hervorstechendste Struktur in einem Zellkern. Dort findet die Transkription der ribosomalen RNA (rRNA), die präRNA-Prozessierung und der Zusammenbau der Untereinheiten des Ribosoms statt. Man kann sie als Ribosomenfabriken der Zelle ansehen. Einige weitere Funktionen schließen die Interaktion mit viralen Komponenten, die Regulation mit Tumorsuppressor-Proteinen, die Kontrolle der Zellalterung und die Modulation der Telomerasefunktion ein (Olson *et al.*, 2002).

Strukturell lässt sich der Nukleolus in drei Regionen unterteilen: eine fibrilläre Region, die dichte fibrilläre Komponente (DFC) und die granuläre Komponente (GC). In vielen Nukleoli lässt sich noch eine weitere Substruktur finden: das fibrilläre Zentrum (FC), das vom DFC

und GC umgeben wird. Interessanterweise lokalisierte die C-terminale Domäne von Ta6TMP nur in der granulären Region der Nukleoli.

Kern- bzw. Nukleoluslokalisierungssignale an Proteinen wurden intensiv untersucht. Die Lokalisation im Zellkern ist zurückzuführen auf ein kurzes NLS-Sequenzmotiv ('nuclear localisation motif') aus einer oder zwei kurzen AS-Sequenzen, die reich an den positiv geladenen AS-Resten von Lysin und Arginin sind. In einigen Krebsarten konnte eine erhöhte nukleoläre Aktivität nachgewiesen werden. Auch in viralen Infektionen ist der Nukleolus eine Zielstruktur (Wurm *et al.*, 2001; Siomi *et al.*, 1990; Matthews & Russell, 1998). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass verschiedene Tumorsuppressoren und Protoonkogene die Produktion von Ribosomen beeinflussen (Ruggero & Pandolfi, 2003). Die Zerstörung von einem oder mehreren Schritten, die die Proteinbiosynthese kontrollieren, konnte mit Änderungen im Zellzyklus und der Regulation des Zellwachstums in Verbindung gebracht werden. Es wird deshalb angenommen, dass bestimmte Tumorsuppressoren und Protoonkogene das Tumorwachstum regulieren, indem sie die Proteinbiosynthese beeinflussen. Zum Beispiel konnte eine gesteigerte rRNA-Synthese durch c-myc nachgewiesen werden. Für das Tumorsuppressor-Protein p53 hingegen führte die Abnahme der Ribosomenproduktion zu einer p53-abhängigen und nichtabhängigen Apoptose, wohingegen die Zerstörung des Nukleolus zu einer p53-Stabilisierung führte. Zumindest die Verbindung zwischen dem p53-Signalweg und dem Nukleolus ist durch die Lokalisation des MDM2-Proteins im Nukleolus geschaffen (Olson & Dundr, 2005). MDM2 ist eine E3-Ubiquitinligase, die an der Degradierung von p53 involviert ist.

Interessanterweise ist die nukleoläre Lokalisierung für einige Virusproteine beschrieben (Hiscox, 2002). In diesem Zusammenhang sind sogenannte NOS- ('nucleolar targeting sequence') Sequenzen bekannt, die verschiedene virale Proteine in den Nukleolus leiten. Die nukleoläre Lokalisation des Rev-Proteins des HI-Virus hängt von der Interaktion des viralen Proteins mit B23, einem nukleolären Phosphoprotein, ab (Dundr *et al.*, 1995). Dies gilt auch für das Rex-Protein von HTLV-I. Die Interaktion wird durch eine basische Sequenz in den viralen Proteinen vorangetrieben. Eine solche Sequenz konnte in Ta6TMP allerdings nicht vorhergesagt werden, sodass anzunehmen ist, dass eine bis jetzt unbekannte Sequenz die nukleoläre Lokalisation bestimmt. Die bevorzugte nukleäre Lokalisation von COOH-Ta6TMP kann nicht durch einfache Diffusion erklärt werden, da unfusioniertes GFP nicht bevorzugt innerhalb des Zellkerns lokalisiert. Kleine Proteine bis etwa 40 kDa können durch die Kernporen passiv hindurch diffundieren, während größere Proteine aktiv in den Kern durch Importine transportiert werden müssen. Importine erkennen Kernlokalisierungssignale, binden die entsprechenden Proteine und transportieren sie durch die Pore in den Zellkern. Trotzdem kann ausgeschlossen werden, dass die bevorzugte nukleäre Lokalisation von COOH-Ta6TMP zusätzlich von einem gestörten Zellkernexport als Folge der fehlenden Aminosäuresequenzen abhängig ist, da das komplett exprimierte

exogene Ta6TMP-Protein zytoplasmatisch und nicht nukleär lokalisiert war. Im Gegensatz zu ektopisch exprimierten COOH-Ta6TMP konnte das endogene Ta6TMP nicht im Zellkern gefunden werden. Dies könnte allerdings auf quantitative Unterschiede zurückzuführen sein.

Als Transfektionsmodell wurden in dieser Arbeit vorrangig COS-7-Zellen verwendet, die stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert sind und das sogenannte T-Antigen exprimieren. Es wird angenommen, dass SV40 die transkriptionellen Eigenschaften von p53 durch das SV40 Antigen supprimiert (Sheppard *et al.*, 1999). p53 liegt in dieser Zelle im Kern vor. Die gleichen Transfektionsstudien wurden auch in der HeLa-Zelllinie mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine HPV-18-positive humane Gebärmutterhalskrebszelllinie, in der p53 vorrangig im Zellkern vorliegt. Weitere Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren die CHO- und HEK-Zellen, in denen p53 funktionell intakt ist. Trotzdem konnten keine Veränderungen des Phänotyps in mit dem HPV-E6-Homolog überexprimierten Ta6TMP in diesen Zelllinien beobachtet werden.

Zur Aufrechterhaltung der Transformation ihrer Wirtszellen müssen Schizonten die Transformation initiieren, aufrechterhalten, ihre eigene Teilung mit der der Wirtszelle synchronisieren und sich in den entstehenden neuen Zellen etablieren. In diesem Zusammenhang könnten die beiden zuvor beschriebenen Proteine, TaSP und Ta6TMP, eine Rolle spielen. Die Bedeutung von TaSP könnte darin liegen, dass es eine direkte Interaktion mit dem Zytoskelett der Wirtszelle eingeht. Diese Interaktion könnte eine Rolle bei der Verteilung der Schizonten während der Teilung der Wirtszelle erfüllen. Auf der anderen Seite ist es anzunehmen, dass Ta6TMP an der Arretierung von p53 in der Wirtszelle beteiligt sein könnte, wodurch der p53-Apoptoseweg inhibiert wird.

**Literaturverzeichnis**

Adams JM & Cory S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.

Adams JM & Cory S (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 715-720.

Ahmed JS, Schnittger L, & Mehlhorn H (1999). Review: Theileria schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitol Res* **85**, 527-538.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P (2003). *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.

Bakheit MA, Schnittger L, Salih DA, Boguslawski K, Beyer D, Fadl M, & Ahmed JS (2004). Application of the recombinant Theileria annulata surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis. *Parasitol Res* **92**, 299-302.

Bakheit MA, Scholzen T, Ahmed JS, & Seitzer U (2006). Molecular characterization of a Theileria lestoquardi gene encoding for immunogenic protein splice variants. *Parasitol Res* **100**, 161-170.

Barbosa MS, Lowy DR, & Schiller JT (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* **63**, 1404-1407.

Barry M & McFadden G (1998). Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr Opin Immunol* **10**, 422-430.

Baumgartner M, Chaussepied M, Moreau MF, Werling D, Davis WC, Garcia A, & Langsley G (2000). Constitutive PI3-K activity is essential for proliferation, but not survival, of Theileria parva-transformed B cells. *Cell Microbiol* **2**, 329-339.

Baumgartner M, Tardieux I, Ohayon H, Gounon P, & Langsley G (1999). The use of nocodazole in cell cycle analysis and parasite purification from Theileria parva-infected B cells. *Microbes Infect* **1**, 1181-1188.

Baylis HA, Megson A, & Hall R (1995). Infection with Theileria annulata induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Mol Biochem Parasitol* **69**, 211-222.

Benedict CA, Norris PS, & Ware CF (2002). To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* **3**, 1013-1018.

- Bhat KM & Setaluri V (2007). Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* **13**, 2849-2854.
- Biermann R, Schnittger L, Beyer D, & Ahmed JS (2003). Initiation of translation and cellular localization of Theileria annulata casein kinase IIalpha: implication for its role in host cell transformation. *J Cell Physiol* **196**, 444-453.
- Blackman MJ & Bannister LH (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* **117**, 11-25.
- Botteron C & Dobbelaere D (1998). AP-1 and ATF-2 are constitutively activated via the JNK pathway in Theileria parva-transformed T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 418-421.
- Bouckson-Castaing V, Moudjou M, Ferguson DJ, Mucklow S, Belkaid Y, Milon G, & Crocker PR (1996). Molecular characterisation of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J Cell Sci* **109 ( Pt 1)**, 179-190.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, & Vogelstein B (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501.
- Burns RG (1991). Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil Cytoskeleton* **20**, 181-189.
- Chaussepied M, Lallemand D, Moreau MF, Adamson R, Hall R, & Langsley G (1998). Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in Theileria-transformed leukocytes. *Mol Biochem Parasitol* **94**, 215-226.
- Chaussepied M & Langsley G (1996). Theileria transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation. *Res Immunol* **147**, 127-138.
- Cheng TS, Chang LK, Hwang SL, Lu PJ, Lee CI, & Hong YR (2006). SUMO-1 modification of centrosomal protein hNinein promotes hNinein nuclear localization. *Life Sci* **78**, 1114-1120.
- Cooper B, Schneider S, Bohl J, Jiang Y, Beaudet A, & Vande PS (2003). Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology* **306**, 87-99.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, & Joiner KA (2006). Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* **125**, 261-274.

- Cory S & Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656.
- Cudmore S, Reckmann I, & Way M (1997). Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol* **5**, 142-148.
- Cuschieri L, Nguyen T, & Vogel J (2007). Control at the cell center: the role of spindle poles in cytoskeletal organization and cell cycle regulation. *Cell Cycle* **6**, 2788-2794.
- Dehmelt L & Halpain S (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* **6**, 204.
- DeMartini JC & Baldwin CL (1991). Effects of gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-2 on infection and proliferation of Theileria parva-infected bovine lymphoblasts and production of interferon by parasitized cells. *Infect Immun* **59**, 4540-4546.
- Desai A & Mitchison TJ (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.
- Dessaige F, Hilaly S, Baumgartner M, Blumen B, Werling D, & Langsley G (2005a). c-Myc activation by Theileria parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene* **24**, 1075-1083.
- Dessaige F, Lizundia R, Baumgartner M, Chaussepied M, & Langsley G (2005b). Taking the Myc is bad for Theileria. *Trends Parasitol* **21**, 377-385.
- Dessaige F, Lizundia R, & Langsley G (2005c). Constitutively activated CK2 potentially plays a pivotal role in Theileria-induced lymphocyte transformation. *Parasitology* **130 Suppl**, S37-S44.
- Dicthenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, & Doxsey SJ (1998). Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol* **141**, 163-174.
- Dobbelaere D, Fernandez P, Machado J, Botteron C, & Heussler V (1999). Interference by the intracellular parasite Theileria parva with T-cell signal transduction pathways induces transformation and protection against apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* **72**, 95-100.
- Dobbelaere D & Heussler V (1999). Transformation of leukocytes by Theileria parva and T. annulata. *Annu Rev Microbiol* **53**, 1-42.
- Dobbelaere DA, Coquerelle TM, Roditi IJ, Eichhorn M, & Williams RO (1988). Theileria parva infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4730-4734.

Dobbelaere DA, Fernandez PC, & Heussler VT (2000). Theileria parva: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell Microbiol* **2**, 91-99.

Dobbelaere DA & Kuenzi P (2004). The strategies of the Theileria parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Curr Opin Immunol* **16**, 524-530.

Dobbelaere DA, Spooner PR, Barry WC, & Irvin AD (1984). Monoclonal antibody neutralizes the sporozoite stage of different Theileria parva stocks. *Parasite Immunol* **6**, 361-370.

Dobbelaere DAE & McKeever DJ (2002). *Theileria* Kluwer Academic Publishers.

Dobrowolski JM & Sibley LD (1996). Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **84**, 933-939.

Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, & Matus A (1993). An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci* **106 ( Pt 2)**, 633-639.

Dong C, Davis RJ, & Flavell RA (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**, 55-72.

Downward J (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 262-267.

Doxsey S, McCollum D, & Theurkauf W (2005a). Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 411-434.

Doxsey S, Zimmerman W, & Mikule K (2005b). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* **15**, 303-311.

Dramsi S & Cossart P (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 137-166.

Drewes G, Ebner A, & Mandelkow EM (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* **23**, 307-311.

Dundr M, Leno GH, Hammarskjöld ML, Rekosh D, Helga-Maria C, & Olson MO (1995). The roles of nucleolar structure and function in the subcellular location of the HIV-1 Rev protein. *J Cell Sci* **108 ( Pt 8)**, 2811-2823.

Eichhorn M & Dobbelaere DA (1994). Induction of signal transduction pathways in lymphocytes infected by Theileria parva. *Parasitol Today* **10**, 469-472.

El-Deiry WS (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **8**, 345-357.

El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, & Vogelstein B (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-49.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, & Vogelstein B (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.

Elledge SJ (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664-1672.

Fawcett D, Musoke A, & Voigt W (1984). Interaction of sporozoites of *Theileria parva* with bovine lymphocytes in vitro. I. Early events after invasion. *Tissue Cell* **16**, 873-884.

Fawcett DW, Doxsey S, Stagg DA, & Young AS (1982). The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Electron microscopic observations. *Eur J Cell Biol* **27**, 10-21.

Fell AH, Preston PM, & Ansell JD (1990). Establishment of *Theileria*-infected bovine cell lines in scid mice. *Parasite Immunol* **12**, 335-339.

Fernandez PC, Machado J, Jr., Heussler VT, Botteron C, Palmer GH, & Dobbelaere DA (1999). The inhibition of NF-kappaB activation pathways and the induction of apoptosis by dithiocarbamates in T cells are blocked by the glutathione precursor N-acetyl-L-cysteine. *Biol Chem* **380**, 1383-1394.

Flory MR, Moser MJ, Monnat RJ, Jr., & Davis TN (2000). Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5919-5923.

Galley Y, Hagens G, Glaser I, Davis W, Eichhorn M, & Dobbelaere D (1997). Jun NH2-terminal kinase is constitutively activated in T cells transformed by the intracellular parasite *Theileria parva*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5119-5124.

Gao LY & Kwaik YA (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **8**, 306-313.

Gardner MJ, Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, Hall N, Ren Q, Paulsen IT, Pain A, Berriman M, Wilson RJ, Sato S, Ralph SA, Mann DJ, Xiong Z, Shallom SJ, Weidman J, Jiang L, Lynn J, Weaver B, Shoaibi A, Domingo AR, Wasawo D, Crabtree J, Wortman JR, Haas B, Angiuoli SV, Creasy TH, Lu C, Suh B, Silva JC, Utterback TR, Feldblyum TV, Perteau M, Allen J, Nierman WC, Taracha EL, Salzberg SL, White OR, Fitzhugh HA, Morzaria S, Venter JC, Fraser CM, & Nene V (2005). Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* **309**, 134-137.

Gergely F, Karlsson C, Still I, Cowell J, Kilmartin J, & Raff JW (2000). The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14352-14357.

Gill G (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 536-541.

Gillingham AK & Munro S (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep* **1**, 524-529.

Glascodine J, Tetley L, Tait A, Brown D, & Shiels B (1990). Developmental expression of a *Theileria annulata* merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* **40**, 105-112.

Gordon JA (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* **201**, 477-482.

Gruenberg J & van der Goot FG (2006). Toxoplasma: guess who's coming to dinner. *Cell* **125**, 226-228.

Guccione E, Massimi P, Bernat A, & Banks L (2002). Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins. *Virology* **293**, 20-25.

Guernon J, Chaussepied M, Sopp P, Lizundia R, Moreau MF, Blumen B, Werling D, Howard CJ, & Langsley G (2003a). A tumour necrosis factor alpha autocrine loop contributes to proliferation and nuclear factor-kappaB activation of *Theileria parva*-transformed B cells. *Cell Microbiol* **5**, 709-716.

Guernon J, Dessauge F, Langsley G, & Garcia A (2003b). Apoptosis of *Theileria*-infected lymphocytes induced upon parasite death involves activation of caspases 9 and 3. *Biochimie* **85**, 771-776.

Gundersen GG & Cook TA (1999). Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 81-94.

Hall R, Boulter NR, Brown CG, Wilkie G, Kirvar E, Nene V, Musoke AJ, Glass EJ, & Morzaria SP (2000). Reciprocal cross-protection induced by sporozoite antigens SPAG-1 from *Theileria annulata* and p67 from *Theileria parva*. *Parasite Immunol* **22**, 223-230.

Hall R, Hunt PD, Carrington M, Simmons D, Williamson S, Mecham RP, & Tait A (1992). Mimicry of elastin repetitive motifs by *Theileria annulata* sporozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* **53**, 105-112.

Haller D. Untersuchungen des Tumorsuppressorproteins p53 in *Theileria annulata*-infizierten, leukoblastoiden Zellen. 2004.

Hargreaves AJ, Wandosell F, & Avila J (1986). Phosphorylation of tubulin enhances its interaction with membranes. *Nature* **323**, 827-828.

- Hartwell LH & Weinert TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, & Haupt Y (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**, 4077-4085.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, & Oren M (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299.
- Hay RT (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
- Hemmings BA (1997). Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* **275**, 628-630.
- Hermann P & Dobbelaere DA (2006). Theileria-induced constitutive IKK activation is independent of functional Hsp90. *FEBS Lett* **580**, 5023-5028.
- Heussler V, Sturm A, & Langsley G (2006). Regulation of host cell survival by intracellular Plasmodium and Theileria parasites. *Parasitology* **132 Suppl**, S49-S60.
- Heussler VT, Fernandez PC, Machado J, Jr., Botteron C, & Dobbelaere DA (1999a). N-acetylcysteine blocks apoptosis induced by N-alpha-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone in transformed T-cells. *Cell Death Differ* **6**, 342-350.
- Heussler VT, Kuenzi P, Fraga F, Schwab RA, Hemmings BA, & Dobbelaere DA (2001a). The Akt/PKB pathway is constitutively activated in Theileria-transformed leucocytes, but does not directly control constitutive NF-kappaB activation. *Cell Microbiol* **3**, 537-550.
- Heussler VT, Kuenzi P, & Rottenberg S (2001b). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* **31**, 1166-1176.
- Heussler VT, Machado J, Jr., Fernandez PC, Botteron C, Chen CG, Pearse MJ, & Dobbelaere DA (1999b). The intracellular parasite Theileria parva protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7312-7317.
- Heussler VT, Rottenberg S, Schwab R, Kuenzi P, Fernandez PC, McKellar S, Shiels B, Chen ZJ, Orth K, Wallach D, & Dobbelaere DA (2002). Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite Theileria. *Science* **298**, 1033-1036.
- Hiscox JA (2002). The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* **147**, 1077-1089.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, & Harris CC (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **22**, 3551-3555.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, & Harris CC (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.

Hudson AT, Randall AW, Fry M, Ginger CD, Hill B, Latter VS, McHardy N, & Williams RB (1985). Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology* **90 ( Pt 1)**, 45-55.

Huibregtse JM & Beaudenon SL (1996). Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol* **7**, 317-326.

Huibregtse JM, Scheffner M, & Howley PM (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* **10**, 4129-4135.

Hulliger L (1965). Cultivation of three species of Theileria in lymphoid cells in vitro. *J Protozool* **12**, 649-655.

Hulliger L, WILDE KH, Brown CG, & TURNER L (1964). MODE OF MULTIPLICATION OF THEILERIA IN CULTURES OF BOVINE LYMPHOCYTIC CELLS. *Nature* **203**, 728-730.

Irvin AD, Brown CG, Kanhai GK, & Stagg DA (1975). Comparative growth of bovine lymphosarcoma cells and lymphoid cells infected with Theileria parva in athymic (nude) mice. *Nature* **255**, 713-714.

Irvin AD, Ocamo JG, & Spooner PR (1982). Cycle of bovine lymphoblastoid cells parasitised by Theileria parva. *Res Vet Sci* **33**, 298-304.

Ivanov V, Stein B, Baumann I, Dobbelaere DA, Herrlich P, & Williams RO (1989). Infection with the intracellular protozoan parasite Theileria parva induces constitutively high levels of NF-kappa B in bovine T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **9**, 4677-4686.

Jackman MR & Pines JN (1997). Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* **29**, 47-73.

Jones DT (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**, 195-202.

Joshi HC (1998). Microtubule dynamics in living cells. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 35-44.

Jura WG, Brown CG, & Kelly B (1983). Fine structure and invasive behaviour of the early developmental stages of Theileria annulata in vitro. *Vet Parasitol* **12**, 31-44.

Kern P, Dietrich M, Hemmer C, & Wellinghausen N (2000). Increased levels of soluble Fas ligand in serum in Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* **68**, 3061-3063.

- Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, & Simizu B (1997). Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* **232**, 53-61.
- Ko LJ & Prives C (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**, 1054-1072.
- Kramer A, Lukas J, & Bartek J (2004). Checking out the centrosome. *Cell Cycle* **3**, 1390-1393.
- Kubbutat MH, Jones SN, & Vousden KH (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Kuenzi P, Schneider P, & Dobbelaere DA (2003). Theileria parva-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *J Immunol* **171**, 1224-1231.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Le Roux LG & Moroianu J (2003). Nuclear entry of high-risk human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways. *J Virol* **77**, 2330-2337.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, & Laimins LA (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* **11**, 3045-3052.
- Lee S, Elenbaas B, Levine A, & Griffith J (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* **81**, 1013-1020.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.
- Levine AJ, Momand J, & Finlay CA (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453-456.
- Lewis SA, Wang DH, & Cowan NJ (1988). Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* **242**, 936-939.
- Li K, Xu EY, Cecil JK, Turner FR, Megraw TL, & Kaufman TC (1998). Drosophila centrosomin protein is required for male meiosis and assembly of the flagellar axoneme. *J Cell Biol* **141**, 455-467.
- Lizundia R, Chaussepied M, Huerre M, Werling D, Di Santo JP, & Langsley G (2006). c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling promotes survival and metastasis of B lymphocytes transformed by Theileria. *Cancer Res* **66**, 6105-6110.

- Lizundia R, Chaussepied M, Naissant B, Masse GX, Quevillon E, Michel F, Monier S, Weitzman JB, & Langsley G (2007). The JNK/AP-1 pathway upregulates expression of the recycling endosome rab11a gene in B cells transformed by Theileria. *Cell Microbiol* **9**, 1936-1945.
- Lizundia R, Sengmanivong L, Guernon J, Muller T, Schnelle T, Langsley G, & Shorte SL (2005). Use of micro-rotation imaging to study JNK-mediated cell survival in Theileria parva-infected B-lymphocytes. *Parasitology* **130**, 629-635.
- Luder CG, Gross U, & Lopes MF (2001). Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* **17**, 480-486.
- Luduena RF (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* **178**, 207-275.
- Machado J, Jr., Fernandez PC, Baumann I, & Dobbelaere DA (2000). Characterisation of NF-kappa B complexes in Theileria parva-transformed T cells. *Microbes Infect* **2**, 1311-1320.
- Mandelkow E & Mandelkow EM (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 72-81.
- Mantovani F & Banks L (1999). The interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* **9**, 387-395.
- Marechal E & Cesbron-Delauw MF (2001). The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci* **6**, 200-205.
- Margolis RL & Wilson L (1981). Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature* **293**, 705-711.
- Mastrorade DN, McDonald KL, Ding R, & McIntosh JR (1993). Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* **123**, 1475-1489.
- Matlashewski G, Banks L, Pim D, & Crawford L (1986). Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells. *Eur J Biochem* **154**, 665-672.
- Matthews DA & Russell WC (1998). Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *J Gen Virol* **79 ( Pt 7)**, 1671-1675.
- McCollum D (2005). Cytokinesis: breaking the ties that bind. *Curr Biol* **15**, R998-1000.
- McHardy N & Morgan DW (1985). Treatment of Theileria annulata infection in calves with parvaquone. *Res Vet Sci* **39**, 1-4.

- McHardy N, Wekesa LS, Hudson AT, & Randall AW (1985). Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. *Res Vet Sci* **39**, 29-33.
- Mehlhorn H & Schein E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv Parasitol* **23**, 103.
- Mehlhorn H, Schein E, & Ahmed J.S. (1994). In: Kreier, J.P. (ed). pp. 217-304. Academic Press, London.
- Meissner M, Schluter D, & Soldati D (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* **298**, 837-840.
- Mitchison T & Kirschner M (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Moore KJ & Matlashewski G (1994). Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* **152**, 2930-2937.
- Morrisette NS, Bedian V, Webster P, & Roos DS (1994). Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* **79**, 445-459.
- Morrisette NS, Murray JM, & Roos DS (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **110** ( Pt 1), 35-42.
- Morrisette NS & Roos DS (1998). *Toxoplasma gondii*: a family of apical antigens associated with the cytoskeleton. *Exp Parasitol* **89**, 296-303.
- Morrisette NS & Sibley LD (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 21-38.
- Musoke A, Nene V, & Morzaria SP (1993). A Sporozoite-based vaccine for *Theileria parva*. *Parasitol Today* **9**, 385-388.
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, & Curiel TJ (1998). *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* **160**, 1824-1830.
- Nene V, Iams KP, Gobright E, & Musoke AJ (1992). Characterisation of the gene encoding a candidate vaccine antigen of *Theileria parva* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **51**, 17-27.
- Nene V, Inumaru S, McKeever D, Morzaria S, Shaw M, & Musoke A (1995). Characterization of an insect cell-derived *Theileria parva* sporozoite vaccine antigen and immunogenicity in cattle. *Infect Immun* **63**, 503-508.

Nene V, Musoke A, Gobright E, & Morzaria S (1996). Conservation of the sporozoite p67 vaccine antigen in cattle-derived *Theileria parva* stocks with different cross-immunity profiles. *Infect Immun* **64**, 2056-2061.

Noble M, Lewis SA, & Cowan NJ (1989). The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol* **109**, 3367-3376.

Nogales E (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 397-420.

Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, & Downing KH (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.

Norval RAI (1992). *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* Academic Press.

O'Shea CC (2005). Viruses - seeking and destroying the tumor program. *Oncogene* **24**, 7640-7655.

Oakley BR (1992). Gamma-tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol* **2**, 1-5.

ole-MoiYoi OK (1995). Casein kinase II in theileriosis. *Science* **267**, 834-836.

ole-MoiYoi OK, Brown WC, Iams KP, Nayar A, Tsukamoto T, & Macklin MD (1993). Evidence for the induction of casein kinase II in bovine lymphocytes transformed by the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *EMBO J* **12**, 1621-1631.

ole-MoiYoi OK, Sugimoto C, Conrad PA, & Macklin MD (1992). Cloning and characterization of the casein kinase II alpha subunit gene from the lymphocyte-transforming intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *Biochemistry* **31**, 6193-6202.

Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, & Vogelstein B (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857-860.

Olson MO & Dundr M (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol* **123**, 203-216.

Olson MO, Hingorani K, & Szebeni A (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* **219**, 199-266.

Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, & Horwitz SB (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**, 7280-7295.

Pain A, Renauld H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, Weir W, Kerhornou A, Aslett M, Bishop R, Bouchier C, Cochet M, Coulson RM, Cronin A, de Villiers EP, Fraser A, Fosker N, Gardner M, Goble A, Griffiths-Jones S, Harris DE, Katzer F, Larke N, Lord A, Maser P, McKellar S, Mooney P, Morton F, Nene V, O'Neil S, Price C, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlings ND, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Shah T, Squares R, Squares S, Tivey A, Walker AR, Woodward J, Dobbelaere DA, Langsley G, Rajandream MA, McKeever D, Shiels B, Tait A, Barrell B, & Hall N (2005). Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* **309**, 131-133.

Palmer GH, Machado J, Jr., Fernandez P, Heussler V, Perinat T, & Dobbelaere DA (1997). Parasite-mediated nuclear factor kappaB regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12527-12532.

Puig S, Lee J, Lau M, & Thiele DJ (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem* **277**, 26021-26030.

Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, & White MW (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 165-175.

Rauscher FJ, III (1993). The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J* **7**, 896-903.

Ravindran S & Boothroyd JC (2008). Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. *Traffic* **9**, 647-656.

Robinson PM (1982). *Theileria annulata* and its transmission-a review. *Tropical Animal Health and Production* **14**, 3-12.

Roychowdhury S & Rasenick MM (1994). Tubulin-G protein association stabilizes GTP binding and activates GTPase: cytoskeletal participation in neuronal signal transduction. *Biochemistry* **33**, 9800-9805.

Roychowdhury S & Rasenick MM (1997). G protein beta1gamma2 subunits promote microtubule assembly. *J Biol Chem* **272**, 31576-31581.

Ruggero D & Pandolfi PP (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* **3**, 179-192.

Sager H, Davis WC, Dobbelaere DA, & Jungi TW (1997). Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with *Theileria annulata*. *J Leukoc Biol* **61**, 459-468.

Salih DE, Ahmed JS, Bakheit MA, Ali EB, El Hussein AM, Hassan SM, Shariff OE, Fadl M, & Jongejan F (2005). Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Parasitol Res* **97**, 302-308.

- Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, & Luder CG (2006). Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology* **132 Suppl**, S69-S85.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, & Howley PM (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, & Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136.
- Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed JS, & Seitzer U (2007). Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitol Res* **101**, 1471-1482.
- Schnittger L, Katzer F, Biermann R, Shayan P, Boguslawski K, McKellar S, Beyer D, Shiels BR, & Ahmed JS (2002). Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 247-256.
- Scholtyssek E & Mehlhorn H (1970). Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms. *Z Parasitenkd* **34**, 97-127.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, & zur HH (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-114.
- Schwarz SE, Rosa JL, & Scheffner M (1998). Characterization of human hect domain family members and their interaction with Ubch5 and Ubch7. *J Biol Chem* **273**, 12148-12154.
- Seitzer U, Bakheit MA, Salih DE, Ali A, Haller D, Yin H, Schnittger L, & Ahmed J (2007). From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP. *Parasitol Res* **101 Suppl 2**, S217-S223.
- Seitzer U, Schnittger L, Boguslawski K, & Ahmed JS (2006). Investigation of MAP kinase activation in *Theileria*-infected cell lines. *Ann N Y Acad Sci* **1081**, 473-475.
- Seldin DC & Leder P (1995). Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* **267**, 894-897.
- Shaw MK (1997). The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells. *Int J Parasitol* **27**, 457-474.
- Shaw MK (1999). *Theileria parva*: sporozoite entry into bovine lymphocytes is not dependent on the parasite cytoskeleton. *Exp Parasitol* **92**, 24-31.

- Shaw MK (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends Parasitol* **19**, 2-6.
- Shaw MK, Compton HL, Roos DS, & Tilney LG (2000). Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **113 ( Pt 7)**, 1241-1254.
- Shaw MK, Roos DS, & Tilney LG (2001). DNA replication and daughter cell budding are not tightly linked in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* **3**, 351-362.
- Shaw MK & Tilney LG (1992). How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa). *J Cell Sci* **101 ( Pt 1)**, 109-123.
- Shaw MK, Tilney LG, & Musoke AJ (1991). The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC class I involvement. *J Cell Biol* **113**, 87-101.
- Shaw MK, Tilney LG, Musoke AJ, & Teale AJ (1995). MHC class I molecules are an essential cell surface component involved in *Theileria parva* sporozoite binding to bovine lymphocytes. *J Cell Sci* **108 ( Pt 4)**, 1587-1596.
- Shaw PJ & Jordan EG (1995). The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 93-121.
- Sheppard HM, Corneillie SI, Espiritu C, Gatti A, & Liu X (1999). New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* **19**, 2746-2753.
- Shiels B, Aslam N, McKellar S, Smyth A, & Kinnaird J (1997). Modulation of protein synthesis relative to DNA synthesis alters the timing of differentiation in the protozoan parasite *Theileria annulata*. *J Cell Sci* **110 ( Pt 13)**, 1441-1451.
- Shiels B, Fox M, McKellar S, Kinnaird J, & Swan D (2000). An upstream element of the TamS1 gene is a site of DNA-protein interactions during differentiation to the merozoite in *Theileria annulata*. *J Cell Sci* **113 ( Pt 12)**, 2243-2252.
- Shiels B, Kinnaird J, McKellar S, Dickson J, Miled LB, Melrose R, Brown D, & Tait A (1992). Disruption of synchrony between parasite growth and host cell division is a determinant of differentiation to the merozoite in *Theileria annulata*. *J Cell Sci* **101 ( Pt 1)**, 99-107.
- Shiels BR, McDougall C, Tait A, & Brown CG (1986). Identification of infection-associated antigens in *Theileria annulata* transformed cells. *Parasite Immunol* **8**, 69-77.
- Shiels BR, McKellar S, Katzer F, Lyons K, Kinnaird J, Ward C, Wastling JM, & Swan D (2004). A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryot Cell* **3**, 495-505.
- Sibley LD (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* **304**, 248-253.

Siomi H, Shida H, Maki M, & Hatanaka M (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J Virol* **64**, 1803-1807.

Skulachev VP (1998). Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* **423**, 275-280.

Soldati D, Foth BJ, & Cowman AF (2004). Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol* **20**, 567-574.

Stagg DA, Chasey D, Young AS, Morzaria SP, & Dolan TT (1980). Synchronization of the division of *Theileria macroschizonts* and their mammalian host cells. *Ann Trop Med Parasitol* **74**, 263-265.

Striepen B, Crawford MJ, Shaw MK, Tilney LG, Seeber F, & Roos DS (2000). The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J Cell Biol* **151**, 1423-1434.

Striepen B, Jordan CN, Reiff S, & van Dooren GG (2007). Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog* **3**, e78.

Swan DG, Phillips K, Tait A, & Shiels BR (1999). Evidence for localisation of a *Theileria* parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. *Mol Biochem Parasitol* **101**, 117-129.

Swan DG, Stadler L, Okan E, Hoffs M, Katzer F, Kinnaird J, McKellar S, & Shiels BR (2003). TashHN, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. *Cell Microbiol* **5**, 947-956.

Swan DG, Stern R, McKellar S, Phillips K, Oura CA, Karagenc TI, Stadler L, & Shiels BR (2001). Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. *J Cell Sci* **114**, 2747-2754.

Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, & Van DT (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* **78**, 703-711.

Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, & Banks L (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* **21**, 5088-5096.

Tilney LG & Tilney MS (1996). The cytoskeleton of protozoan parasites. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 43-48.

- Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, & Roussilhon C (1996). Plasmodium falciparum induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun* **64**, 744-750.
- Toye P, Gobright E, Nyanjui J, Nene V, & Bishop R (1995a). Structure and sequence variation of the genes encoding the polymorphic, immunodominant molecule (PIM), an antigen of Theileria parva recognized by inhibitory monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* **73**, 165-177.
- Toye PG, Goddeeris BM, Iams K, Musoke AJ, & Morrison WI (1991). Characterization of a polymorphic immunodominant molecule in sporozoites and schizonts of Theileria parva. *Parasite Immunol* **13**, 49-62.
- Toye PG, Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Nene V, Iams K, Roose J, Nyanjui JK, Gobright E, Musoke AJ, & Clevers HC (1995b). Characterization of the gene encoding the polymorphic immunodominant molecule, a neutralizing antigen of Theileria parva. *J Immunol* **155**, 1370-1381.
- Vaeteewoottacharn K, Chamutpong S, Ponglikitmongkol M, & Angeletti PC (2005). Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. *Virology* **2**, 50.
- Vaux DL, Haecker G, & Strasser A (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* **76**, 777-779.
- Vaux DL & Strasser A (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2239-2244.
- Verhey KJ & Gaertig J (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* **6**, 2152-2160.
- Vogelstein B, Lane D, & Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Wang Y, Reed M, Wang P, Stenger JE, Mayr G, Anderson ME, Schwedes JF, & Tegtmeyer P (1993). p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* **7**, 2575-2586.
- Watson RA, Thomas M, Banks L, & Roberts S (2003). Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J Cell Sci* **116**, 4925-4934.
- Webster P, Dobbelaere DA, & Fawcett DW (1985). The entry of sporozoites of Theileria parva into bovine lymphocytes in vitro. Immunoelectron microscopic observations. *Eur J Cell Biol* **36**, 157-162.
- West RR, Tenbarger KM, & Olmsted JB (1991). A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences. *J Biol Chem* **266**, 21886-21896.

White MW, Jerome ME, Vaishnava S, Guerini M, Behnke M, & Striepen B (2005). Genetic rescue of a *Toxoplasma gondii* conditional cell cycle mutant. *Mol Microbiol* **55**, 1060-1071.

Wiese C & Zheng Y (2006). Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci* **119**, 4143-4153.

Williams GT (1994). Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol* **2**, 463-464.

Wu X, Bayle JH, Olson D, & Levine AJ (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-1132.

Wurm T, Chen H, Hodgson T, Britton P, Brooks G, & Hiscox JA (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* **75**, 9345-9356.

Wyllie AH & Golstein P (2001). More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11-13.

Yuan J (1997). Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 247-251.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, & O'Connor MJ (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* **73**, 6209-6219.

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an...

... Prof. Dr. J. S. Ahmed für die Bereitstellung des spannenden Themas und sein stets offenes Ohr bei Fragen.

... Prof. Dr. U. Seitzer für die hervorragende Betreuung, die vielen Ideen und konstruktiven Diskussionen.

... Prof. Dr. O. Holst für die Übernahme des Gutachtens.

... Dr. T. Scholzen für die Einarbeitung in die konfokale Fluoreszenzmikroskopie und seine ständigen Anregungen.

... Dr. J. Bullwinkel für die Hilfe bei experimentellen Fragen und für seine ständig aufbauenden Worte, vor allem in den letzten Monaten meiner Arbeit.

... Birgit Kullmann, Doreen Beyer und Jessica Dobschanski für die hilfreiche Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

... die vielen Auszubildenden (Susann Malik, Stefan Kruse, Doreen Weigel, Michael Wölke), die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

... all meine Kollegen (Heike Müller, Steffi Renneker, Zhijie Liu, Jassim Abdo, Diaeldin Hassan, Awadia Ali), die zu einem freundschaftlichen und angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben.

... und die vielen anderen Kollegen am Forschungszentrum Borstel, die hier nicht erwähnt werden können, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

... Karsten Schüler und Cindy Jäger für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit und der Suche nach dem Fehlerteufel.

... all meine Freunde, die mich immer wieder aufbauten und erfolgreich ablenkten. Danke, dass ihr meine Launen besonders in den schwierigen Phasen meiner Arbeit mit viel Geduld ertragen habt.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir diese Promotion erst ermöglicht haben und die in allen Situationen hinter mir stehen.

## Anhang

Bioinformatische Daten für TaSP:**SUMOplot™ Prediction für TaSP**

Developed by Abgent, copyright 2003-2004

<b>Protein ID:</b>	N/A
<b>Defintion:</b>	N/A
<b>Length:</b>	314 aa

1 MKFFYLFLVLF PILLKFCECG PFLPLDRQLN PIDFDPNDQ  
HPLDPDQLID  
51 QIEPSEQPAQ QEPIEQOPT QPSTEPEELQ PETVTVEVPE  
PVTSEEPKES  
101 DQTEEQKHEE PEASPAPEPV DEPAVHATES TPTKASSGD  
GAAVCHGKHH  
151 DYSDGKESK SDHDKRPKDK KPFVPKTSQC CGSYFTNSYK  
ITVAFDWWLC  
201 DKPWQYALTL LALFGFSLLS PCLKAYREVL RAKAIRSFIF  
DCFLTHLFLF  
251 LIAFCAYALD FLLMLVVMVF NVGVFFAVIT GYTVGYLVSS  
LAYSTLRSH  
301 ARSSFSRIN EDCC

■ Motifs with high probability

■ Motifs with low probability

■ Overlapping Motifs

No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K107	DQTEE <b>QKHE</b> EPEAS	0.50	4	K165	SKSDH <b>DKRP</b> KDKKP	0.39
2	K2	<b>MKFF</b> YLFVL	0.45	5	K171	KRPKD <b>KKPF</b> VPKTS	0.13
3	K170	DKRPK <b>DKKP</b> FVPKT	0.39				

**Sulfinator**

Input processed on Wed May 7 21:37:22 CEST 2008:

E-cutoff value is 55

Protein / sequence name	Position	E-value	Sequence
TaSP	152	[11]	GKHHDYDSDGKESKSDH +++dYd + e + +

Sequence(s) processed: **1**Sulfated tyrosines detected: **1** (of 10)Number of proteins with at least one hit: **1**

# NetPhosK 1.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Method: NetPhosK without ESS filtering:

Query: Sequence

Site	Kinase	Score
T-70	DNAPK	0.55
T-70	cdc2	0.51
T-74	CKII	0.60
T-85	cdc2	0.51
T-93	CKII	0.63
S-94	CKII	0.52
S-100	CKII	0.65
T-103	CKII	0.52
S-114	p38MAPK	0.50
S-130	PKC	0.56
T-131	cdk5	0.60
<b>T-133</b>	<b>PKC</b>	<b>0.75</b>
S-137	cdc2	0.55
Y-152	INSR	0.52
S-154	CKII	0.59
S-154	PKC	0.53
S-159	CKII	0.57
S-161	CKII	0.57
S-161	cdc2	0.50
S-183	PKC	0.58
<b>S-188</b>	<b>PKC</b>	<b>0.77</b>
T-192	PKC	0.58
T-209	PKC	0.56
S-217	PKA	0.52
S-217	cdc2	0.50
S-220	p38MAPK	0.61
Y-226	EGFR	0.53
S-237	PKC	0.55
S-289	PKC	0.64
S-289	cdc2	0.53
S-290	DNAPK	0.53
S-294	PKC	0.54
S-294	cdc2	0.56
S-294	GSK3	0.50
<b>T-295</b>	<b>PKC</b>	<b>0.87</b>
<b>S-298</b>	<b>PKC</b>	<b>0.79</b>
S-304	PKC	0.59
S-304	PKA	0.52
S-304	cdc2	0.51
S-305	RSK	0.57
S-305	cdc2	0.54
S-307	CKI	0.54

Highest Score: 0.87 PKC at position 295

Bioinformatische Daten für Ta6TMP:**SUMOplot™ Prediction für Ta6TMP**

Developed by Abgent, copyright 2003-2004

<b>Protein ID:</b>	N/A
<b>Defintion:</b>	N/A
<b>Length:</b>	394 aa

1 MDSTLIVDSK SKSLDVSDSK HDLFIEVDYP LPFNIDSSTS  
 IEIEIESSIK  
 51 QFMSMLKSYI FRIVLITIAL IVLFFQGLL MLKSDTTYMT  
 TNRIPLLDRI  
 101 HELLEDVNHP FTPAMCNIFM FTIVWAGILR IILFTPLFYI  
 FEMALRYIFL  
 151 FGTAYFIRGF FIFATTIPSC YYNCNPDLKK RSFFPLLIRI  
 ISGYMGIATN  
 201 CTDLIVSGHT MFTVITCILF VENAKYLITK VILVLYTGFV  
 LFLIVACKYH  
 251 YTVDVLLGLS IAILLHFYYY SRIDDFGTYT HNKIFNYGSE  
 SFIGAKKTKL  
 301 YYSPITRFLV RMEMLEEKMI LGQKLRALYL RVNDQKSLID  
 KLLKKNHF  
 351 VRLFGAEDSD DLLTLYRGTR NMNFYYWKYL YRKMFKKKKI VEVI

■ Motifs with high probability

■ Motifs with low probability

■ Overlapping Motifs

No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K83	QGLLM <b>LKSD</b> TYYMT	0.91	3	K345	IDKKL <b>LKKF</b> NHFVR	0.56
2	K50	EIESS <b>IKQF</b> MSMLK	0.59	4	K383	WKYLY <b>RKMF</b> KKKKI	0.09

# NetPhosK 1.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

---

Method: NetPhosK without ESS filtering:

Query: Sequence

Site	Kinase	Score
T-4	PKC	0.55
S-13	GSK3	0.50
S-17	CKII	0.51
S-38	CKII	0.56
S-38	cdc2	0.50
T-39	CKII	0.69
T-39	PKC	0.53
S-40	CKII	0.59
S-40	CKI	0.57
S-47	CKII	0.50
S-48	PKC	0.62
S-58	PKC	0.79
S-84	PKA	0.54
T-86	cdc2	0.51
Y-88	INSR	0.50
T-90	PKC	0.72
T-91	PKC	0.69
T-112	p38MAPK	0.51
T-112	cdk5	0.52
T-112	GSK3	0.50
T-165	PKC	0.57
S-182	PKA	0.73
S-182	PKG	0.52
S-192	PKA	0.76
T-213	PKC	0.61
Y-251	INSR	0.51
S-260	PKA	0.69
Y-269	INSR	0.50
T-278	PKC	0.68
T-280	PKC	0.51
S-291	CKI	0.55
S-291	PKC	0.66
T-298	PKC	0.73
S-303	cdk5	0.55
S-337	PKC	0.62
S-359	CKII	0.65
S-359	PKA	0.59
T-364	PKC	0.64
T-369	PKA	0.64
Y-376	INSR	0.51

---

Highest Score: 0.79 PKC at position 58

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Silke Gerber  
Parkallee 37  
23845 Borstel  
\* 29.09.1979/ Merseburg  
ledig, keine Kinder  
  
Tel. (01 73) 3 80 88 60  
Email: silke\_gerber@web.de

## Schule

---

1986 - 1991/1991 - 1998      Grundschule/Novalis-Gymnasium, Bad Dürrenberg  
07/1998                              Abitur

## Studium

---

10/1998 - 12/2004              **Biochemie**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Vertiefungsrichtungen: Technische Biochemie  
Molekularbiologie  
Analytische Umweltbiochemie  
Abschluss: **Diplom – Biochemikerin**

01/ - 12/2004                      Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Klonierung, Expression,  
Produktion und Reinigung eines künstlichen  
Proteins mit repetitiven Sequenzen“

## Beruf

---

06/2005 - 12/2008              **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Forschungszentrum  
Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Lebenswissenschaften;  
Abteilung Immunologie und Zellbiologie, Laborgruppe  
Veterinärinfektiologie und -immunologie  
Thema: „Assoziation mit dem Wirtszell-Mikrotubulinnetzwerk und  
zytoplasmatische Arretierung von p53: Untersuchungen zur  
Überlebensstrategie von *Theileria annulata* in transformierten  
Rinderleukozyten“

## Publikationen

---

Gerber, S., Kirchhof, K., Kressler, J., Schmelzer, CE., Scholz, C., Hertel, TC., Pietzsch, M.  
(2008). Cloning, expression, purification, and characterization of a designer protein with  
repetitive sequences. *Protein Expr Purif* 59, 203-214.

Renneker, S., Kullmann, B., Gerber, S., Dobschanski, J., Bakheit, M. H., Geysen, D., Shiels,  
B., Tait, A., Ahmed, JS., Seitzer, U. (2008) Development of a Competitive ELISA for  
Detection of *Theileria annulata* Infection. *Transbound Emerg Dis* **55**, 249-256

## Kongressbeiträge

---

Gerber, S., Dobschanski, J., Beyer, D., Haller, D., Kullmann, B., Ahmed, JS., Seitzer, U.  
(2008) *Theileria annulata* surface protein (TaSP) co-localizes and interacts with tubulin of the  
bovine host cell. *Eur J Cell Biol.* 87S1(58):54

S Renneker, B Kullmann, S Gerber, J Dobschanski, MA Bakheit, D Geysen, B Shiels, A Tait,  
JS Ahmed, U Seitzer Detection of *Theileria annulata* infection with competitive ELISA.  
VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, Buenos Aires, Argentina,  
Sept. 21-26, 2008

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt habe bzw. wörtlich oder sinngemäß entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Borstel, den 22. Oktober 2008

A handwritten signature in black ink, reading "Silla Geske". The signature is written in a cursive style with a large initial 'S' and a distinct 'G'.

Unterschrift