

Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Stadienspezifische Expression und Lokalisation Kalzium-abhängiger Proteinkinasen
(CDPK) von *Cryptosporidium parvum* in der *In-vitro*-Kultur**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Manja Etzold
aus Rochlitz

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Arwid Dauschies

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Arwid Dauschies

Institut für Parasitologie

Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Dr. med. vet. Carlos Hermosilla

Institut für Parasitologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 13.01.2015

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 <i>Cryptosporidium parvum</i> (<i>C. parvum</i>)	2
2.1.1 Taxonomische Einordnung	2
2.1.2 Pathogenese, Klinik, Epidemiologie und Bekämpfung des Erregers	3
2.1.3 Lebenszyklus von <i>C. parvum</i>	4
2.1.4 Entwicklung des Erregers <i>in vitro</i> und Modulation der Apoptose.....	5
2.1.5 Ultrastrukturelle Besonderheiten der Sporozoiten und ihrer Organellen.....	8
2.1.6 Invasionsmechanismus und Egress	11
2.2 Bedeutung von Kalzium (Ca^{2+}) und Kalzium-abhängigen Proteinkinasen (CDPK) in Apikomplexa	12
2.2.1 Kalziumhomöostase, Kalziumspeicher und -transporter in Apikomplexa	12
2.2.2 Einteilung, Struktur und Modifikationen Kalzium-abhängiger Proteinkinasen ..	14
2.2.3 Funktionen und Lokalisation von CDPK in Pflanzen und Apikomplexa.....	16
2.2.4 Inhibitoren der CDPK in Apikomplexa	18
3 Tiere, Material, Methoden.....	19
3.1 Versuchstiere	19
3.1.1 Passage von <i>C. parvum</i> in Kälbern	19
3.1.2 Immunisierung eines Kaninchens	19
3.2 Puffer und Medien.....	20
3.2.1 Verwendete Stämme von <i>C. parvum</i>	21
3.2.2 Färbung nach HEINE.....	22
3.2.3 Aufreinigung von Oozysten	22
3.2.4 Exzystierung und Gewinnung der Sporozoiten	24
3.3 Molekulare Genetik.....	24
3.3.1 Analyse von Sequenzen und Domänenstruktur	24
3.3.2 Untersuchung auf N-Acylierung der Proteine	24
3.3.3 Phylogenie.....	25
3.4 Zellkultur	25

Inhaltsverzeichnis

3.4.1	Verwendete Zelllinien und Lagerung der Zellen.....	25
3.4.2	Infektion von HCT-8 Zellen mit <i>C. parvum</i>	26
3.4.3	<i>In-vitro</i> -Assay mit Anti- <i>Cp</i> CDPK1-Serum.....	27
3.4.4	Gewinnung von Material aus der Zellkultur	27
3.5	Nukleinsäuren	28
3.5.1	RNA Isolierung mit RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	28
3.5.2	RNA- und DNA - Isolierung mit Trizol®LS Reagent (Invitrogen).....	29
3.5.3	Reverse Transkription	30
3.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Transkripten	31
3.5.4.1	3'RACE-PCR mit anschließender nPCR	31
3.5.5	Darstellung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel	34
3.5.6	RT-PCR (ABgene)	35
3.6	Immunhistologischer Nachweis von <i>Cp</i> CDPK1	37
3.6.1	Fixierung von Sporozoiten und Oozysten	37
3.6.2	Fixierung von infizierten Zellkulturen	38
3.6.3	Indirekter Immunofluoreszenz-Antikörpertest (IFAT)	38
3.6.4	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	40
3.7	Proteine	41
3.7.1	Restriktionsverdau, Ligation zum Doppelkonstrukt und Klonierung in einen Expressionsvektor	41
3.7.2	Proteinexpression des NH ₂ -terminalen Peptids der <i>Cp</i> CDPK1 in <i>E. coli</i>	42
3.7.3	Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus <i>E. coli</i> -Lysaten	43
3.7.4	Dialyse.....	44
3.7.5	Fraktionierte Fällung	45
3.7.6	Methanol-Chloroform-Präzipitation.....	45
3.7.7	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.7.8	Coomassie Blau Färbung.....	47
3.7.9	Immunoblot	47
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Phylogenie	50
4.1.1	Sequenzen und Domänenstruktur von CDPK-Orthologen im Genom von <i>C. parvum</i>	50

Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Phylogenetischer Baum ausgewählter CDPK in Apicomplexa	50
4.2	Domänenstruktur ausgewählter <i>CpCDPK</i>	51
4.3	Myristoylierung / Palmitoylierung	52
4.4	Ergebnisse der 3'RACE PCR (Transkription von <i>CpCDPK</i>)	53
4.5	Klonierung, Proteingewinnung und Antikörperherstellung	56
4.6	Ergebnisse des Immunoblot	56
4.6.1	Reaktion des Anti- <i>CpCDPK1</i> -Serum mit rekombinantem Protein	56
4.6.2	Reaktion des Anti- <i>CpCDPK1</i> -Serums mit Antigen aus Entwicklungsstadien von <i>C. parvum</i> und infizierten Zellkulturen	57
4.7	Ergebnisse der Immunofluoreszenzuntersuchungen	58
4.7.1	<i>CpCDPK1</i> in Sporoziten und Oozystensuspensionen	58
4.7.2	Infizierte Zellkulturen	59
4.7.3	Affinitätsgereinigtes Antikörperserum	60
4.8	Ergebnisse des <i>In-vitro</i> -Assays mit Anti- <i>CpCDPK1</i> -Serum	62
4.9	Ergebnisse der RT-PCR	65
5	Diskussion	68
5.1	Vergleichende Untersuchungen der CDPK im Genom von <i>C. parvum</i>	68
5.2	Expression, Translation und Lokalisation der <i>CpCDPK1</i>	73
6	Zusammenfassung.....	78
7	Summary	80
8	Literaturverzeichnis.....	82
9	Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

aa	Aminosäuren
ABA	Abszisionsäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxosulfat
Aqua bidest	Aqua bidestillata
AQP1	Aquaporin 1
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAPTA-AM	Bis-[2-aminophenyl]-ethylenglycoltetraacetic acid, Acetoxymethylester
bp	Basenpaare
BKI	Bumped kinase inhibitors
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CAM	Kalmodulin
CaMK	Kalmodulin-abhängige Proteinkinasen
CBP	Kalzium-bindende Proteine
CCAMK	Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinasen
CDPK	Kalzium-abhängige Proteinkinasen / calcium-dependent protein kinases
CIPK	Kalzineurin-B-artige interagierende Proteinkinasen
COWP	<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
CRK	CDPK related kinases
Ct	Threshold cycle
d	Tag
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	Glideosom-assoziierte Proteine

Abkürzungsverzeichnis

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp	Glykoproteine
IMC	Innerer Membrankomplex
h	Stunde
H ⁺	Proton
HSP70	70 kDa Hitzeschockprotein
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
<i>Le</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MLC	Myosin leichte Kette
MROs	Mitochondium-related organelles
MTIP	Myosin A-tail domain interacting protein
MTOCs	Mikrotubuli-organisation-centers
Na ⁺	Natrium
NF	Nekrosefaktor
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion / polymerase chain reaction
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
p. i.	<i>post infectionem</i>
Pfa	Paraformaldehydlösung
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPasen
PV	Parasitophore Vakuole
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

RT-PCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
SDS	Sodium-dodecylsulfate
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasen vom sarkoendoplasmatischen Retikulum-Typ
Ser/Thr-Kinasen	Serin/Threonin-Kinasen
SGLT1	Na ⁺ /Glukose-Kotransporter 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TIM	Translocases of the inner membrane
TRAP	Thrombospondin-related anonymous proteins
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungsverzeichnis für Aminosäuren in Proteinsequenzdarstellungen

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

1 Einleitung

Cryptosporidium spp. stellen als zoonotische Erreger von Durchfallerkrankungen ein hohes Gesundheitsrisiko für Menschen und Tiere dar. Besonders bei Kindern und immunsupprimierten Individuen können infolge einer chronischen Enteritis lebensbedrohliche Zustände auftreten. Innerhalb der Gattung *Cryptosporidium* sind über 20 Arten beschrieben, von denen *C. parvum* und *C. hominis* als pathogenste Arten für den Menschen angesehen werden (HUNTER et al. 2007). Bei Kälbern wurden infolge von Infektionen mit *C. parvum* Mortalitäten von bis zu 30 % beschrieben, was zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führt (De GRAAF et al. 1999). Obwohl mehr als 200 Substanzen als Medikament gegen *C. parvum* getestet wurden (GARGALA 2008) ist derzeit keine zuverlässige Bekämpfung klinischer Symptome oder eine Erregerelimination möglich. Humanmedizinische Therapien sind für die Veterinärmedizin unwirtschaftlich. Daraus wird die Notwendigkeit zur Erforschung des Erregers deutlich.

Innerhalb des Unterstammes der Apikomplexa sind Kryptosporidien hinsichtlich ihrer intrazellulären, aber extrazytoplasmatischen Lokalisation einzigartig. Zu Beginn der Invasion führt der Parasit gleitende Bewegungen über die Wirtszelloberfläche aus und sezerniert Proteine aus apikalen Organellen (HUANG et al. 2004), was die Bildung einer parasitophoren Vakuole initiiert (BONNIN et al. 1999). Auch Kalziumabhängige Proteinkinasen (CDPK) sind in die Regulationsmechanismen von Invasion und Egress eingebunden. Diese Enzyme wurden in Pflanzen und Protisten beschrieben, jedoch nicht in Pilzen oder Säugetieren (HARPER und HARMON 2005) und stellen somit interessante Zielmoleküle für pharmakologische Wirkstoffe dar. Ein Einfluss der CDPK1 auf Motilität, Mikronemensekretion und Egress ist für *Toxoplasma gondii* (*TgCDPK1*) und *Plasmodium falciparum* (*PfCDPK1*) belegt (BANSAL et al. 2013, LOURIDO et al. 2010). *TgCDPK1* und *CpCDPK1* besitzen eine ATP-bindende Tasche mit Glycin in der „gatekeeper“ Position und können durch Pyrazolopyrimidinderivate erfolgreich blockiert werden (MURPHY et al. 2010, OJO et al. 2010, SUGI et al. 2010).

Trotz vielversprechender neuer Wirkstoffe ist zur Lokalisation und Funktion von CDPK in *C. parvum* wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher *CpCDPK* phylogenetisch einzuordnen und auf strukturelle Besonderheiten zu untersuchen. Weiterhin sollten die CDPK hinsichtlich ihres Expressionsmusters *in vitro* untersucht werden. Ein spezifischer Antikörper gegen *CpCDPK1* wurde zum Nachweis translatierten Proteins in den Stadien des Parasiten und zur Immunolokalisation eingesetzt.

2 Literaturübersicht

2.1 *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*)

2.1.1 Taxonomische Einordnung

- Reich: Protozoa
- Stamm: Alveolata
- Unterstamm: Apicomplexa
- Klasse: Coccidea
- Unterordnung: Eimeriorina
- Familie: Cryptosporidiidae
- Gattung: *Cryptosporidium*

Zur Gattung *Cryptosporidium* sind bisher über 20 Arten zusammengefasst mit zahlreichen Genotypen. Zu den wichtigsten Apikomplexa gehören *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Theileria* spp. und *Plasmodium* spp. (BECK et al. 2009). Kryptosporidien wurden ursprünglich basierend auf Merkmalen ihres Lebenszyklus den Kokzidien zugeordnet (LEVINE et al. 1988). In phylogenetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Cryptosporidium* spp. mit Gregarinen eine von anderen Apikomplexa separate Klade bilden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur derzeit gültigen Zuordnung der Kryptosporidien zu den Kokzidien (CARRENO et al. 1999, TEMPLETON et al. 2010). Das Vorkommen und die morphologischen Merkmale der extrazellulären Stadien von *Cryptosporidium* spp. unterstreichen die Verwandtschaft zu Gregarinen (HIJAWI et al. 2002). Unterschiede zu anderen Kokzidien bestehen in der epizellulären Lokalisation der parasitären Entwicklungsstadien in der parasitophoren Vakuole, dem Vorliegen sowohl dünn- als auch dickwandiger Oozysten, Autoinfektion, dem Fehlen von Strukturen wie Sporozyste, Mikropyle und polaren Granula in Oozysten sowie der Unempfindlichkeit gegenüber den meisten Antikokzidien (THOMPSON et al. 2005). Ein weiterer wesentlicher Unterschied zu anderen Apikomplexa ist das Fehlen des Apicoplasten. Die Herkunft dieses Plastids wird auf eine sekundäre Symbiose mit Rot- oder Grünalgen zurückgeführt und es wird ein nachträglicher Verlust der Gene bei *Cryptosporidium* spp. angenommen (ZHU et al. 2000, HUANG et al. 2004).

2.1.2 Pathogenese, Klinik, Epidemiologie und Bekämpfung des Erregers

Kryptosporidien wurden erstmals von TYZZER (1907) in der Maus beschrieben. Über eine Infektion mit dem Erreger beim Kalb berichteten PANCIERA et al. (1971) erstmals. Wirbeltiere aller Klassen sind empfänglich für Kryptosporidien. Laut DILLINGHAM et al. (2002) wurde der Erreger beim Menschen erstmals 1976 registriert. Zunächst wurde keine große Schädigung angenommen. Bedeutung erlangte die Kryptosporidiose in den 1980er und 1990er Jahren durch Infektionen bei AIDS-Patienten. Bereits geringe Infektionsdosen (etwa 10 Oozysten) führen zur klinisch manifesten Infektion. Während immunkompetente Wirte die Infektion auf ein bis zwei Wochen limitieren können, entwickeln immunsupprimierte Individuen eine chronische, lebensbedrohliche Erkrankung (PETRY et al. 2008). Wie BROCKMANN et al. (2008) beschrieben, können *Cryptosporidium* spp. auch bei gesunden, jungen Erwachsenen akute Enteritiden auslösen. Kritisch sind vor allem Dehydratation und Gewichtsverlust infolge der Diarrhoe. Bei Kälbern wurde eine Mortalität bis 30 % beschrieben, was hohe wirtschaftliche Verluste bedeutet (De GRAAF et al. 1999). *C. parvum* befällt den Bürstensaum der Enterozyten überwiegend im distalen Teil des Dünndarms (PEARSON et al. 1983) und führt dort zu einer Verkürzung der Mikrovilli sowie einer Kryptenhyperplasie (THOMPSON et al. 2005). Entwicklungsstadien von *Cryptosporidium* spp. wurden selten auch in anderen Organen, z. B. Lunge, Niere, Gallenblase, Gonaden, Uterus und Lymphknoten (POHLENZ 1987) gefunden. Neuere Untersuchungen an immunsupprimierten Mäusen zeigten Entwicklungsstadien von *C. parvum* Subtyp IIaA21G1R1 im Duodenum, Jejunum, Ileum, Cecum und Colon. Dabei scheint im proximalen Jejunum eine inverse Korrelation zwischen Infektion und Apoptose aufzutreten, weshalb diese Region für weitere Studien besonders interessant ist (DEL et al. 2012).

Die Übertragung von *Cryptosporidium* spp. geschieht in Entwicklungsländern meist auf anthroponotischem Weg, in Industriestaaten erfolgen Infektionen meist zoonotisch (XIAO 2010). Besonders Rinder, aber auch kleine Wiederkäuer (ROBERTSON et al. 2009), Reptilien und Igel (DYACHENKO et al. 2009) als Reservoir verschiedener Genotypen von *C. parvum* stellen ein Risiko für den Menschen dar. Durch FAYER (2012) wurden erstmals in drei bis acht Monate alten Kälbern Co-Infektionen mit den vier Pathogenen *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* und *Enterocytozoon bieneusi* beschrieben. Diese Tiere stellen als gesunde Träger der Pathogene eine Infektionsquelle dar. Für humane Infektionen sind *C. parvum* und *C. hominis* die zwei bedeutendsten Spezies (HUNTER et al. 2007). Weitere Spezies, darunter *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. baileyi*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. meleagridis* und *C. muris*, können ebenfalls infektiös für Menschen sein (FAYER 2004, RYAN et al. 2012). ELWIN und Mitarbeiter (2012) beschrieben *C. viatorum* als neue humanpathogene Art.

Laut einer retrospektiven Auswertung von BALDURSSON et al. (2011), der weltweit humane Infektionen über das Wasser im Zeitraum Januar 2004 bis Dezember 2010 untersuchte, konnten 60,3 % der Fälle auf *Cryptosporidium* spp. zurückgeführt werden. Kryptosporidien sind resistent gegenüber den konventionellen Wasseraufbereitungsmethoden mit Chlor und ihr Vorkommen korreliert nicht mit

Literaturübersicht

den biologischen Indikatororganismen (CAREY et al, 2004), daher besteht das Risiko einer trinkwasserbedingten Übertragung. Biofilme in Wasserleitungen schützen die Oozysten vor UV-Strahlung oder Desinfektionsmitteln und erhöhen somit das Gefährdungspotential (WINGENDER und FLEMMING 2011, DICESARE et al 2012).

Kryptosporidien sind sensitiv gegenüber Hitzeinaktivierung mittels Pasteurisierung (DAWSON 2005). Während eine Inkubation bei 30°C über 14 Tage die Infektiosität der Oozysten auf Null herabsetzt, bleiben Oozysten bei 10°C auch nach 90 Tagen infektiös (LI et al. 2010).

Hygiene und Desinfektion sind wesentliche Faktoren in der Kontrolle der Kryptosporidiose. Zuverlässige Desinfektionserfolge können durch chemische Desinfektionsmittel auf Kresolbasis erreicht werden. Neopredisan®135-1 und Aldecoc®TGE in der empfohlenen Anwendungskonzentration von 4% und einer Einwirkzeit von 2 h inaktivierten mehr als 99.5% der Oozysten im cc-qPCR-Modell (SHAHIDUZZAMAN et al. 2010). KENO™COX wird als neues aminbasiertes Desinfektionsmittel mit vielversprechenden Ergebnissen *in vitro* und im Mäuseassay beschrieben (NACIRI et al. 2011).

Obwohl mehr als 200 Substanzen als Medikament gegen *C. parvum* getestet wurden (GARGALA 2008) ist derzeit keine zuverlässige Bekämpfung klinischer Symptome oder Elimination des Erregers möglich. Bei Wiederkäuern wird seit einigen Jahren Halofuginon eingesetzt. Hierbei werden Neuinfektionen zwar nicht verhindert, aber eine signifikante Verbesserung des Gesundheitsstatus und eine signifikante Reduktion der Oozystenausscheidung erreicht (JOACHIM et al. 2003). Paromomycin wird u. a. bei Reptilien (PANTCHEV et al. 2008), Igelfindlingen (DYACHENKO et al. 2009) und kleinen Wiederkäuern (VIU et al. 2000) als Langzeittherapie eingesetzt und vermindert die Oozystenausscheidung sowie klinische Symptome. In der Humanmedizin werden Nitazoxanid (ABUBAKAR et al. 2007) und Azithromycin (HOLMBERG et al. 1998) in Kombination mit einer antiretroviralen Therapie bei AIDS-Patienten eingesetzt. Beide Therapien sind teuer und daher in der Nutztiermedizin unwirtschaftlich. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der intensiven Erforschung von *C. parvum* und seiner Stoffwechselwege, um neue Ansätze für pharmakologische Wirkstoffe zur Bekämpfung zu finden.

2.1.3 Lebenszyklus von *C. parvum*

Der Lebenszyklus von *C. parvum* beinhaltet asexuelle und sexuelle Vermehrungsstadien. Dabei stellen die widerstandsfähigen Oozysten das einzige exogene Stadium dar. Die endogene Entwicklung beginnt mit der Aufnahme der Oozyste aus der Umwelt und der Anheftung an gastrointestinale Epithelzellen über N-acetyl-galaktosamin-haltige Moleküle auf der Oozystenoberfläche (STEIN et al. 2006). Ausgelöst durch Veränderungen von Temperatur, pH-Wert, Gallensalzen und Pankreasenzymen werden durch eine Sollbruchstelle der Oozystenhülle vier bananenförmige Sporozoitien freigesetzt (REDUKER et al.1985). Diese führen zirkuläre oder helikale, gleitende

Literaturübersicht

Bewegungen aus, im Englischen treffend als „gliding motility“ bezeichnet (WETZEL et al. 2005, BOROWSKI et al. 2010). Organellen des Sporozoiten wie Mikronemen und Dichte Granula bewegen sich zur Region des Apikalkomplexes (HUANG et al 2004) und vakuoläre Strukturen am apikalen Ende des Sporozoiten werden mit dessen Plasmamembran zusammengelagert und interagieren mit der Wirtszellmembran. Dadurch wird die Bildung einer parasitophoren Vakuole (BONNIN et al. 1999) oder nach neueren Erkenntnissen eines parasitophoren Sackes (VALIGUROVA et al. 2008) initiiert, welcher die einzigartige epizelluläre oder im gebräuchlichen Terminus „intrazelluläre, aber extrazytoplasmatische“ Lokalisation von *C. parvum* in der Wirtszelle ermöglicht. Der so entstandene Trophozoit differenziert sich asexuell im Rahmen der Merogonie und jeder dabei entstehende Kern reift zu einem Merozoiten im sogenannten Meronten. BOROWSKI et al. (2010) beschrieben sowohl eine mittlere Teilung von Mikrogamonten in zwei Tochtergamonten als auch die Bildung von Syzygien, d.h. eine End-zu-End oder laterale Paarung von Gamonten vor der eigentlichen sexuellen Vermehrung. Diese Ergebnisse korrelieren mit Ereignissen im Lebenszyklus von Gregarinen (LANDERS 2001, TOSO und OMOTO 2007). Im Meronten Typ I entstehen sechs bis acht Merozoiten, der Meront Typ II enthält vier (FAYER 2008). Merozoiten Typ II entwickeln sich zu sexuellen Vermehrungsstadien, den Makrogamonten und Mikrogamonten mit 14-16 Mikrogameten. Die Verschmelzung von Mikrogamet und Makrogamont führt zur Bildung einer Zygote, welche zwei Teilungen durchläuft. Während dieser Sporogonie werden etwa 20% dünnwandige und 80% dickwandige Oozysten mit jeweils vier infektiösen Sporozoiten geformt (CAREY et al. 2004, FAYER 2008). Erstere führen zur Autoinfektion des Wirtes, letztere werden in die Umwelt ausgeschieden (CAREY et al. 2004).

2.1.4 Entwicklung des Erregers *in vitro* und Modulation der Apoptose

Die erste erfolgreiche *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* gelang WOODMANSEE und POHLENZ (1983) auf menschlichen Rektaltumorzellen. Eine Kultivierung auf HCT-8-Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ mit RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum erwies sich im Vergleich mit zehn weiteren Zelllinien als geeignetste Methode, da die Parasitenzahlen annähernd doppelt so hoch waren (UPTON et al.1994a,b). Die Kultivierung von Kryptosporidien in HCT-8-Zellkulturen wird mittlerweile als „Goldstandard“ angesehen (KARANIS und ALDEYARBI 2011). Die von HIJAWI et al. (2004) beschriebene zellfreie Kultivierung gelang anderen Forschern weder mit *C. parvum* noch *C. hominis* (PETRY et al. 2009). HCT-8-Monolayer können bis zu drei Wochen Alter verwendet werden (SIFUENTES und GIOVANNI 2007). Es wird jedoch eine Anzüchtung von 48 - 96 h zur Bildung eines konstanten Monolayers empfohlen. Zur Infektion einer 24-Well Zellkulturplatte wird eine Infektionsdosis von $3,5 \times 10^5$ Oocysten pro Well angegeben (ARROWOOD 2002).

Zur zeitlichen Entwicklung von *C. parvum* in der Zellkultur existieren recht unterschiedliche Angaben. Sporozoiten sind etwa $4 \times 0,6 \mu\text{m}$ groß und bananenförmig (REDUKER et al. 1985). Sie

Literaturübersicht

können laut FORNEY et al. (1999) bereits 5 min nach ihrer Exzystierung in Wirtszellen eindringen. Nach Beobachtungen von ROBERTSON et al. (1993) waren bei der *in vitro* Exzystierung 30 min p. i. die meisten freien Sporozoiten vorhanden, nach 4 h begannen sie sich aufzulösen. FLANIGAN et al. (1991) beobachteten über 90 % exzystierte Oozysten 6 h p. i. in HT29-Zellen. Zurück blieben leere Hüllen mit Residualkörperchen. FORNEY et al. (1999) konnten 48 h p. i. keine freien Sporozoiten mehr sehen. Einzelne frühe Trophozoiten wurden 6 h p. i. beobachtet. Sie besaßen eine Größe von ca. 1 µm (BOROWSKI et al. (2010). Innerhalb von 24 h p. i. bildeten sich zirkuläre Trophozoiten von etwa 2,5 µm Durchmesser (HIJAWI et al. 2001, BOROWSKI et al. 2010) oder frühe Meronten I aus, die bis zu einer Größe von 3,7 µm x 4 µm heranreiften und sechs bis acht Merozoiten enthielten. Freie Merozoiten vom Typ I besaßen eine stabförmige Form mit punktförmiger Apikalregion, waren 0,4 x 1 µm groß und konnten ab dem Zeitpunkt 24 h p. i. gesehen werden (HIJAWI et al. 2001). FLANIGAN et al. (1991) beobachteten 24 h p. i. bis zu drei Meronten in einer Zelle, mit jeweils acht Merozoiten. Diese Ergebnisse sind konform mit ROSALES et al. (1993) und HIJAWI et al. (2001). THOMPSON et al. (2005) beschrieben ebenfalls Aggregate von Meronten I, allerdings erst 48 h p. i. BOROWSKI et al. (2010) beobachteten Meronten I frühestens 24 h p. i. als von der apikalen Wirtszellmembran eingehüllte Strukturen. Frühe Meronten I waren dabei 1,5 µm groß, entwickelte späte Meronten I maßen 2,5 µm. Letztere enthielten sechs bis acht Merozoiten, welche in paralleler Orientierung angeordnet waren.

MELE et al. (2004) haben anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen den Anteil infizierter Zellen sowie der Parasitenstadien erfasst: bis 6 h p. i. fanden sich zu 100 % Sporozoiten, ¼ aller Zellen der HCT-8 Kultur waren infiziert. 24 h p. i. waren anteilig zu etwa ¾ Sporozoiten und etwa ¼ Meronten vorhanden. Über 80% der Zellen waren infiziert. 48 h p. i. waren 65 % aller Stadien Meronten und 35 % bereits freie Merozoiten. 72 h p. i. waren immer noch 50 % der Zellen infiziert und es konnten 66 % freie Merozoiten und 32 % Mikrogamonten ermittelt werden.

Es wurde zudem beschrieben, dass sich *C. parvum* in Zellkulturen auch ohne Wirtszellinvasion entwickeln kann (HIJAWI et al. 2004, BOROWSKI et al. 2010). Aus der Oozyste entsteht nach 48 h ohne Wirtszellkontakt ein Trophozoit von 2 µm Durchmesser mit rauer Oberfläche (BOROWSKI et al. 2010). Auch freie Meronten von 8 µm Durchmesser wurden beobachtet, dicht gepackt mit 2 µm großen Merozoiten nach 4 Tagen der Kultivierung. Dabei neigen freie Stadien zur Syzygienbildung. Möglicherweise gibt es daher hinsichtlich zeitlichem Auftreten und Größe des Meronten Typ II und späterer Stadien von *C. parvum* recht unterschiedliche Angaben.

HIJAWI und Mitarbeiter (2001) konnten im Zeitraum 48 h – 72 h p. i. alle Stadien sehen, einschließlich Merozoiten, Meronten I und II (Größe 3,1 x 2,8 µm), Makro – und Mikrogametozyten und Oozysten. Zum Zeitpunkt 48 h p. i. wurden Merozoiten während der Penetration neuer Zellen beobachtet. ROSALES et al. (1993) und SLIFKO et al. (1997) beschrieben 48 h p. i. Meronten Typ II mit 5,7 µm Durchmesser sowie Mikro- und Makrogamonten. THOMPSON et al. (2005) beschrieben Meronten Typ II mit rosettenartiger Struktur in drei Tage alten Zellkulturen. Auch BOROWSKI et al.

Literaturübersicht

(2010) sahen Meronten II frühestens 72 h p. i. als deutlich kleinere Stadien (3,5 µm Durchmesser). Sie besaßen eine dickere Membran. Die freien Merozoiten Typ II waren runder und 0,5 µm x 1 µm groß.

Makrogamonten wurden als 4 µm x 5 µm große Strukturen beschrieben mit einem exzentrischen, siegelringartigen Kern (BOROWSKI et al. 2010). Mikrogamonten waren runder und kleiner, maßen 2 µm x 2 µm und setzten eine Vielzahl von Mikrogameten frei (HIJJAWI et al. 2001). BOROWSKI et al. (2010) fanden dagegen nur jeweils 16 Mikrogameten pro Mikrogamont. Mikrogameten waren sphärisch und etwa 0,1 µm im Durchmesser. Die Hälfte der Mikrogamonten war durch eine stockartige Struktur mit der Wirtszelle verbunden (VALIGUROVA et al. 2008, BOROWSKI et al. 2010). Membranöse Strukturen, die eine mögliche Verbindung zwischen Mikrogameten und Wirtszelle darstellen, wurden auch von EDWARDS et al. (2012) in elektronenmikroskopischen Untersuchungen gesehen. BOROWSKI et al. (2010) beschrieben sowohl eine mittlere Teilung von Mikrogamonten in zwei Tochtergamonten als auch die Bildung von Syzygien, d.h. eine End-zu-End oder laterale Paarung von Gamonten vor der eigentlichen sexuellen Vermehrung. Diese Ergebnisse korrelieren mit Ereignissen im Lebenszyklus von Gregarinen (TOSO und OMOTO 2007). Oozysten wurden ab 72 h p. i. beobachtet (ROSALES et al. 1993). HIJJAWI et al. (2001) konnten dünnwandige Oozysten frühestens 72 h p. i. aufreinigen.

Zu Beginn der Infektion mit *C. parvum* wird **Apoptose** sowohl von freien Sporozoiten als auch von Sporozoiten, welche an die Wirtszelle angeheftet sind, ausgelöst. Proapoptotische Signale sowie die aktive Form der Kaspase 3 wurden 2 h und 6 h p. i. nachgewiesen (MELE et al. 2004). *Cryptosporidium* aktiviert den Nekrosefaktor (NF)-κB Stoffwechselweg in infizierten Zellen und überlebt, während die Wirtszelle die Infektion mit einer Zone der Apoptose umgibt und eingrenzt (LIU et al. 2009). MELE et al. (2004) konnten 24 h p. i. weder Apoptosesignale noch die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 nachweisen. LIU und Mitarbeiter (2009) fanden dagegen ein moderates Auftreten von Apoptose in infizierten Zellen ab dem Zeitpunkt 24 h p. i., weiterhin einen Wechsel zum proapoptotischen Status bei 36 bis 72 h p. i. und schließlich eine Unterdrückung der Parasitenentwicklung und Infektion in Verbindung mit Kaspase-Inhibition. Die Autoren vermuten, dass Apoptose bei fortgeschrittener Infektion die Freisetzung von Merozoiten für die Reinfektion mechanisch unterstützt. Auch MELE et al. (2004) nahmen an, dass 48 h p. i. freiwerdende Merozoiten aus infizierten Zellen die Apoptose über einen autokrinen Mechanismus triggern. Laut LIU et al. (2009) bedeutet dies im Umkehrschluss, dass eine Unterdrückung der Apoptose die Bildung von Meronten unterstützt und zu einer verminderten Anzahl freier Merozoiten führt. Die Analyse der Transkription der für Apoptose verantwortlichen Gene ergab, dass Kryptosporidiose zu einer Herunterregulierung der Apoptose in der Phase früher Entwicklungsstadien und zu einer Hochregulierung in der späteren Entwicklung führt. *Cryptosporidium* greift damit aktiv in den intrazellulären Lebenszyklus der Wirtszelle ein.

2.1.5 Ultrastrukturelle Besonderheiten der Sporozoiten und ihrer Organellen

Die Oozystenwand von *C. parvum* enthält zwei einzigartige Proteine: *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) 1 und COWP 8. Die Sporozoiten exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene mucin-ähnliche Glykoproteine (gp) mit serin- und threoninreichen Wiederholungen, z.B. gp40 und gp900. Sie sind an der Innenseite der Oozystenwand durch Fibrillen verankert. Bei einer Trennung dieser Verbindung kollabieren die fibrillären Strukturen zu Granula (CHATTERJEE et al. 2010). Die metabolische Aktivität der Oozysten wird vermutlich von den Sporozoiten im Inneren beeinflusst (EDWARDS et al. 2012).

Apikomplexa besitzen eine Reihe von charakteristischen morphologischen Merkmalen (Abbildung 1).

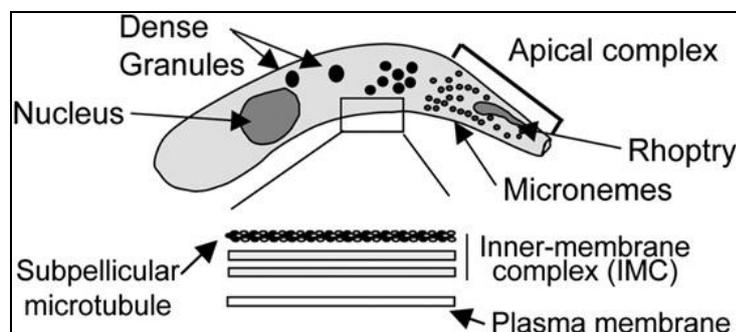


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines Sporozoiten von *C. parvum* (O'HARA und CHEN 2011)

Der Apikalkomplex ist namensgebend für den Unterstamm und beinhaltet als wichtigste Strukturen einen Polarring, ein Konoid, Rhoptrien, Mikronemen und dichte Granula (MORRISSETTE und SIBLEY 2002, BAUM et al. 2008). Diese sekretorischen Organellen setzen abhängig von weiteren Faktoren (Temperatur, intrazelluläres Kalzium und Zytoskelett) Schlüsselproteine für die Anheftung, Zellinvasion und Bildung der parasitophoren Vakuole (PV) frei (CARRUTHERS und SIBLEY 1997, CHEN et al. 2004). Der **Polarringkomplex** ist eines der drei „Microtubuli organisation centers“ (MTOCs) in Apikomplexa, daneben gibt es noch polare Spindelfaser-Plaques und Centriolen oder Basalkörperchen (CHOBOTAR und SCHOLTYSECK 1982). Sporozoiten von *C. parvum* enthalten zwei polare Ringe am apikalen Pol (LUMB et al. 1988). Das **Konoid** befindet sich eingezogen innerhalb der Polarringregion und kann bei der Invasion ausgestülpt werden (SCHOLTYSECK et al. 1970). Ein Ionomycin-getriggert Kalzium-Einstrom stimuliert die Ausstülpung des Konoids, Cytochalasin D inhibiert diesen Vorgang (MONDRAGON und FRIXIONE 1996). Das Konoid besteht aus einem Satz von spiraligen Filamenten, die zu einer punktförmigen oder konischen Struktur angeordnet sind (SCHOLTYSECK et al. 1970). Eine Mikropore wurde in dieser Region ebenfalls beschrieben (CHOBOTAR und SCHOLTYSECK 1982), war bei Untersuchungen von TETLEY et al.

Literaturübersicht

(1998) jedoch nicht immer nachweisbar. Sporozoiten von *C. parvum* verfügen über eine einzelne **Rhoptrie**, Merozoiten über zwei dieser Strukturen (CURRENT 1989). Rhoptrien sind flaschenartige, membrangebundene, elektronendichte Organellen, die sich aus dem endoplasmatischen Retikulum ableiten (SAM-YELLOWE 1996). EDWARDS et al. (2012) nahmen an, dass Merozoiten, ebenso wie Sporozoiten, Proteine ausscheiden, wenn sie über die Oberfläche der Wirtszelle gleiten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Rhoprien- und Mikronemen-Proteine (BOROWSKI et al. 2008). Ferner sind zahlreiche sphärische Mikronemen und einige größere dichte Granula vorhanden. Zusätzlich befinden sich ein oder zwei größere kristalloide Körperchen in der Nähe des Zellkerns und außerdem ein Organell ungeklärter Identität, welches ein Äquivalent zur plastidartigen Struktur anderer Apikomplexa darstellen könnte (TETLEY et al. 1998). Die **Mikronemen** sind relativ gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, vor allem entlang der Rhoptrie am apikalen Pol (TETLEY et al. 1998). In frisch exzystierten Sporozoiten lagern sie sich tendenziell in Reihen kurzer, rundlicher Organellen von 100 nm x 35 nm Größe an (LUMB et al. 1988). „Thrombospondin-related anonymous proteins“ (TRAP) sind in Mikronemen und auf der Oberfläche gleitender Parasiten lokalisiert, was auf eine apikale Sekretion während Motilität und Invasion schließen lässt (CARRUTHERS 1999). **Dichte Granula** von 300 nm Durchmesser befinden sich zentral im Sporozoiten, sind dunkel gefärbt und lichtmikroskopisch nicht unterscheidbar, obwohl Subpopulationen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschrieben wurden (BONNIN et al. 1995). In Merozoiten befinden sich die dichten Granula ebenfalls zentral, auch in Makrogamonten wurden diese Strukturen nachgewiesen (BONNIN et al. 1995). Proteine aus dichten Granula sind in die Formation negativ orientierter, gedrehter Filamente des tubulären Netzwerkes eingebunden, wie Untersuchungen an *T. gondii* zeigten (LODOEN et al. 2010).

Charakteristisch für die Ultrastruktur von Sporozoiten ist ein relativ weit posterior gelegener Zellkern, umgeben von endoplasmatischem Retikulum (TETLEY et al. 1998). Im kompakten Genom von *C. parvum* (ca. 9,1 Megabasen verteilt auf acht Chromosomen) fehlen Gene, die für ein **Mitochondrium** kodieren (ABRAHAMSEN et al. 2004). Im Allgemeinen wird angenommen, dass Mitochondrien durch Endosymbiose von α -Proteobakterien in den Ur-Eukaryonten entstanden. Neuere Studien identifizierten eine „mitochondrion-like“ Organelle in *C. parvum* (PUTIGNANI et al. 2004, MAKIUCHI und NOZAKI 2014). Diese auch als „relict“ Mitochondrium bezeichnete Struktur ist sphärisch, 150 – 300 nm groß und enthält interne kristae-artige Membranen (KEITHLY et al. 2005). Metabolische Fähigkeiten und mitochondrialer Proteinapparat sind stark reduziert, z.B. existiert nur ein einfacher Satz Translokasen der inneren Membran (TIM)-Proteine (normalerweise paarweise) vermutlich früher Eukaryonten (ALCOCK et al. 2012). Die Energiegewinnung scheint hauptsächlich über Glycolyse zu erfolgen (ABRAHAMSEN et al. 2004). ATP wird nur durch Phosphorylierung auf Substrat-Level synthetisiert. Eine zyanidunempfindliche alternative Oxidase ist vorhanden, um Sauerstoff zu reduzieren und Teile der Atmungskette zu vollziehen (ROBERTS et al. 2004). Der für andere Apikomplexa typische, in der Nähe des Zellkernes befindliche chloroplastartige Apikoplast

Literaturübersicht

(MORRISSETTE und SIBLEY 2002), fehlt bei *C. parvum*. Sequenzanalysen von ABRAHAMSEN und Mitarbeitern (2004) bestätigen, dass kein **Plastid**-Genom vorhanden ist. Die Fettsäuresynthese scheint im Zytoplasma stattzufinden. HUANG et al. (2004) konnten in *C. parvum* jedoch Gene von Cyanobakterien und Algen nachweisen, woraus TOSO und OMOTO (2007) auf das Vorhandensein eines Plastids ähnlich dem anderer Apikomplexa im gemeinsamen Vorfahr von Kryptosporidien und Gregarinen schließen, das später verloren ging.

Apikomplexa werden von einer dreischichtigen **Pellikula** umgeben. Diese Struktur besteht aus der Plasmamembran, dem eng angelagerten inneren Membrankomplex (IMC) sowie einer osmiophoben Zwischenschicht (CHOBOTAR und SCHOLTYSECK 1982). Der Aufbau des IMC unterscheidet sich zwischen den einzelnen Apikomplexa. Die Membranen sind durch eine parallele Ausrichtung intramembranöser Filamente charakterisiert (MORRISSETTE et al. 1997). Laut MORRISSETTE und SIBLEY (2002) dient der IMC der Verankerung von Transmembrandomänen von Rezeptoren des subpellikulären Netzwerks. Die Pellikula steht mit vielen Elementen des Zytoskelettes eng in Verbindung, einschließlich Aktin, Myosin, Mikrotubuli und einem Netzwerk intermediärer Filamente. Mikrotubuli sind extrem stabil gegenüber der Einwirkung von hohem Druck, Kälte und vieler Detergentien (MORRISSETTE et al. 1997). Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) koordinieren das Zusammenspiel subpellikulärer Mikrotubuli mit dem IMC. Elektronenmikroskopische Studien mit immunmarkierten Antikörpern von DOBROWOLSKI et al. (1997a,b) haben gezeigt, dass Aktin im Bereich des IMC lokalisiert ist und Myosin mit der Plasmamembran in Verbindung steht. Aktin wird in *C. parvum* von einem „single-copy“ Gen (ACT1) kodiert. Myosin A ist an der Bildung ungewöhnlich kleiner „neckless“ Motorkomplexe beteiligt, die „**gliding motility**“ ermöglichen. Dabei binden parasitäre TRAP an eine Zielzelle oder ein Substrat im Extrazellulärraum. Nach einem intrazellulären Schlüsselsignal, möglicherweise unter Beteiligung von Kalzium, lösen Formin und Profilin eine Aktinpolymerisation aus (BAUM et al. 2008). Unter Rekrutierung von Aldolase zur karboxyterminalen Region des TRAP-Invasin wird der Komplex an Aktinfilamente gebunden. Kurze, zum positiven Ende gerichtete Myosinmoleküle greifen zyklisch in die Filamentous (F)-Aktin-Halterungen und bewegen den gesamten Aktin-Aldolase-Invasin-Komplex zum posterioren Ende des Parasiten (MATUSCHEWSKI und SCHÜLER 2008). Myosin wird in cholesterolreichen Bereichen des IMC verankert. Die schwere Kette des Myosin-A wird durch die leichte Kette des Myosins (MLC) in *T. gondii* oder das „Myosin A-tail domain interacting protein“ (MTIP) in *P. falciparum* und die „Glideosome-associated proteins“ (GAP) GAP45 und GAP50 stabilisiert. Myosin-A baut dabei eine ATP-abhängige gerichtete Kraft auf (BAUM et al. 2008, GREEN et al. 2008). BAUM et al. (2006) beschreiben auch für Merozoiten von *Plasmodium* spp. den in Sporozoiten bereits bekannten Motorkomplex, welcher die amöbenartigen Bewegungsmuster der gleitenden Bewegung steuert. Homologe von TRAP, Aldolase, Aktin, MyosinA, MLC/MTIP, GAP45 sowie GAP50 wurden in allen derzeit verfügbaren Apikomplexa-Genomen identifiziert. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass der Motorkomplex innerhalb der Apikomplexa evolutionär konserviert ist. Es gibt nur wenige

Informationen zur Proteinphosphorylierung im Glideosom, PfCDPK1 wurde als potentielle Kinase zur Phosphorylierung von GAP45 und MTIP in *P. falciparum* identifiziert (GREEN et al. 2008).

2.1.6 Invasionsmechanismus und Egress

Neben der „gliding motility“ ist die Freisetzung von adhäsiven Proteinen aus den Speichern der apikalen Organellen essentiell für den Invasionsmechanismus der Apikomplexa (NAGAMUNE et al. 2008). Die ausgeschiedenen Oberflächenproteine führen unter Einbeziehung von Mikrovilli-Material zur Bildung von „gliding trails“ auf der Oberfläche des Mikrovillisaumes der Wirtszelle (BOROWSKI et al. 2010, EDWARDS et al. 2012).

Der Kontakt zur Wirtszelle führt zum Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels im Parasiten und stimuliert die Sekretion aus den Mikronemen (NAGAMUNE et al. 2008). Mikronemenproteine enthalten eine Vielzahl adhäsiver Motive, z. B. Epidermale Wachstumsfaktoren, Thrombospondine, Integrine und der von Willebrand Faktor sowie TRAP (SIBLEY 2004). CARRUTHERS und Mitarbeiter (1999) beschrieben in *T. gondii* die Freisetzung von Mikronemenprotein 2 (MIC2) während der apikalen Kontaktaufnahme zur Wirtszelle. MIC2 wird in Richtung des posterioren Endes des Parasiten verlagert, bevor dieser in die parasitophore Vakuole (PV) gelangt. Zytoplasmatische Anteile des MIC2 binden an Aldolase, welche eine Brücke zum F-actin des Motorkomplexes bildet (JEWETT und SIBLEY 2003). Ein Knockout von MIC2 führte zu zirkulären Bewegungen der Sporozoiten ohne erfolgreiche Invasion (HUYNH und CARRUTHERS 2006). Ein homologes Protein zu MIC2 stellt TRAP C1 in *C. parvum* dar (SIBLEY 2004). Untersuchungen von CHEN et al. (2005) an *In-vitro*-Kulturen von Cholangiozyten zeigten, dass *C. parvum* wirtszelleigenes Aquaporin 1 (AQP1) und Na⁺/Glukose-Kotransporter 1 (SGLT1) zur Anheftungsstelle rekrutiert. Daraus resultiert ein aktiver Glukosetransport und ein anschließender passiver Wassereinstrom durch AQP1. Dies führt lokal zu einer Vorwölbung der Wirtszellmembran und begünstigt die Bildung der PV. Auch VALIGUROVA et al. (2008) beschreiben die Bildung eines „parasitophoren Sackes“ als Hervorwölbung der epithelialen Zellmembran unter Verlust des Mikrovillisaumes, welche den Sporozoiten graduell einhüllt. Demnach dringen Kryptosporidien nicht in die Zelle ein und sind nicht intrazellulär. *C. parvum* löst eine Reorganisation des wirtszelleigenen Zytoskelettes aus und ruht auf einem Aktin-Filamentbett. Daran sind aktinbindende Proteine, etwa Talin, Ezrin, Vinculin, α -Actinin beteiligt (SIBLEY 2004). Es besteht lediglich ein direkter Kontakt zwischen Parasit und Zelle über die Bildung eines Tunnels an der Anheftungsstelle, welcher später durch die lamelläre Struktur der Fütterungsorganelle und das darunter befindliche dichte Band geschlossen wird. Die Formation eines dichten Bandes ist einzigartig für *Cryptosporidium* spp. (LUMB et al. 1988).

Infolge des Wirtszellkontaktes werden vom Parasiten neben MIC2 auch Rhoptrienproteine ins Zytosol der Wirtszelle ausgeschüttet. HAKANSSON et al. (2001) beschrieben dabei für *T. gondii* die Bildung kleiner Vesikel in der Wirtszelle, sogenannte Evakuolen. Zwischen Parasit und Wirtszelle wird eine

als „moving junction“ bezeichnete ringförmige Verbindung gebildet. Für *T. gondii* und *P. falciparum* wurde gezeigt, dass sich Rhoprien-neck Proteine (RONs) in diesem Bereich konzentrieren (LEBRUN et al. 2005, RICHARD et al. 2010). Infolge der Freisetzung von Rhoprienproteinen gleitet die „moving junction“ rückwärts und die PV entsteht. Rhoprienmaterial wird in die PV integriert, die Verteilung der Mikronemenproteine erstreckt sich über die gesamte Zoitenoberfläche mit einer größeren Ansammlung hinter der „moving junction“. Die Lipide der PV stammen aus der Plasmamembran der Wirtszelle. Erreicht die „moving junction“ das posteriore Ende des Parasiten, wird Material aus den dichten Granula in den vakuolären Raum sezerniert (DUBREMETZ et al. 1998).

Apikomplexa verlassen die Wirtszelle durch einen auf Aktin basierenden Prozess. NAGAMUNE et al. (2008) zeigten, dass das Pflanzenhormon Abszinsäure (ABA) zu einem Anstieg des cADPR und einer Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern in *T. gondii* führt und somit den Egress parallel zu einem bereits aus Pflanzen und frühen Metazoen bekannten Stoffwechselweg stimuliert. Mikronemenproteine unterstützen den Egress durch eine Permeabilisierung der Membranen der PV (KAFFSACK et al. 2009).

Dabei hat Kalzium als „second messenger“ entscheidenden Einfluss auf die Sekretion aus Mikronemen. CARRUTHERS et al. (1999) zeigten, dass eine Chelierung von intrazellulärem Kalzium mit BAPTA-AM in Tachyzoiten von *T. gondii* sowohl die Mikronemensekretion als auch die Invasion von Wirtszellen stark unterdrückt. Eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums unter Verwendung des Ionophors A23187 revidierte diesen Effekt partiell. In diesem Zusammenhang hat die Erforschung Kalzium-abhängiger Proteinkinasen (CDPK) zunehmend an Bedeutung gewonnen. So zeigten LOURIDO et al. (2010), dass CDPK1 von *T. gondii* die Ausschüttung von Proteinen aus Mikronemen kontrolliert.

2.2 Bedeutung von Kalzium (Ca^{2+}) und Kalzium-abhängigen Proteinkinasen (CDPK) in Apikomplexa

2.2.1 Kalziumhomöostase, Kalziumspeicher und -transporter in Apikomplexa

Kalzium dient als wichtiger „second messenger“ für Signalkaskaden der Genexpression, Proteinsekretion, zellulären Entwicklung und der Bewegung. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol von Apikomplexa entspricht der anderer Eukaryonten und beträgt z.B. im Zytosol eines Tachyzoiten von *T. gondii* etwa 100 nM. In der extrazellulären Umgebung werden zehntausendfach höhere Konzentrationen gemessen (BERRIDGE et al. 2000, MORENO und ZHONG 1996). In hohen Konzentrationen wirkt Ca^{2+} auf Dauer toxisch für die Parasitenzelle, daher sind effektive Mechanismen zur Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erforderlich. Ca^{2+} gelangt über rezeptorgesteuerte oder potentialgesteuerte Kanäle der Plasmamembran in die Zelle oder wird aus

Literaturübersicht

intrazellulären Speichern freigesetzt (MORENO und DOCAMPO 2003). Die wichtigsten intrazellulären Speicher sind Mitochondrien, Azidokalzisomen und das endoplasmatische Retikulum. Mitochondrien sequestrieren Ca^{2+} in *P. falciparum* und es gibt Hinweise auf einen Ca^{2+} -Uniporter in *T. gondii*. Azidokalzisomen sind durch ihren hohen Gehalt an Phosphaten, Kalzium, Magnesium und ihre Azidität charakterisiert. In *T. gondii* wird der Ca^{2+} -Einstrom in Azidokalzisomen über eine Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) reguliert. Zwei vakuoläre Protonen (V-H^+)-Pumpen (eine V-H^+ -ATPase und eine V-H^+ -Pyrophosphatase) erzeugen die Azidität. Interessanterweise verändert die V-H^+ -Pyrophosphatase in *T. gondii* ihre Lokalisation während des Invasionsmechanismus (DROZDOWICZ et al. 2003). Eine Ca^{2+} -Freisetzung ist nur über die Hydrolyse von Polyphosphaten oder eine Alkalinisierung möglich (LUO et al. 2001). In *P. falciparum* dienen Azidokalzisomen ebenfalls als Ca^{2+} -Speicherorganellen. Sie verfügen über eine Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} -Pumpe (NAGAMUNE et al. 2008). Azidokalzisomen konnten bisher weder morphologisch in Stadien von *C. parvum* nachgewiesen werden, noch wurden im Genom Hinweise auf eine V-H^+ -Pyrophosphatase oder ähnliche Enzyme gefunden (MIRANDA et al. 2008). Das Endoplasmatische Retikulum dient eukaryontischen Zellen als primäre Quelle von Ca^{2+} für die Signaltransduktion. Dabei wird der Einstrom von Ca^{2+} aus dem Zytosol durch Ca^{2+} -ATPasen vom sarkoendoplasmatischen Retikulum-Typ (SERCA) gesteuert, welche zwei Ca^{2+} im Austausch für die Hydrolyse von einem ATP-Molekül transportieren und sensitiv gegenüber hohen Konzentrationen von Thapsigargin und Ategin sind. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgt über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3)-Kanäle (NAGAMUNE et al. 2008, MORENO et al. 2011). Trotz pharmakologischer Hinweise auf IP_3/Ry -sensitive Speicher in *T. gondii* (LOVETT et al. 2002) konnten in Genomanalysen von Apikomplexa keine RyR- oder IP_3 -Kanal-kodierenden Gene identifiziert werden (NAGAMUNE und SIBLEY 2006). Der aktive Transport von Ca^{2+} aus der Zelle erfolgt über Natrium (Na^+)/ Ca^{2+} -Austauscher, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher oder PMCA. Laut MORENO und DOCAMPO (2003) existiert eine solche PMCA in *C. parvum*, die *CpATPase1*. Anderen Autoren zufolge existiert lediglich eine *TgA1* in der Plasmamembran und den Azidokalzisomen von *T. gondii*, während in *P. falciparum* und *C. parvum* keine Homologe dieses Proteins nachweisbar sind (LUO et al. 2001, NAGAMUNE und SIBLEY 2006). Apikomplexa enthalten Gene mit hoher Ähnlichkeit zu einer in Hefen vorkommenden Golgi-Typ Ca^{2+} -ATPase. Des Weiteren ergaben phylogenetische Analysen Homologe zu SERCA in *P. falciparum* (*PfATP6*) und *T. gondii* (*TgSERCA*) sowie *C. parvum* (*Cp90400*). Schließlich kodieren Gene dieser drei Apikomplexa auch für $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher. Potentialgesteuerte Kanäle wurden für Apikomplexa nicht charakterisiert, obwohl einige Orthologe im Genom von *T. gondii* vorhanden sind (NAGAMUNE und SIBLEY 2006).

Die Vielzahl der Regulationsmechanismen, Transporter und Kanäle zeigt, dass die Kalziumhomoöstase der Parasitenstadien ein fein reguliertes System ist. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration setzt eine Reihe von Signalkaskaden in Gang, welche von Kalzium-bindenden Proteinen (CBP) gesteuert werden (MORENO et al. 2011).

2.2.2 Einteilung, Struktur und Modifikationen Kalzium-abhängiger Proteinkinasen

Proteinkinasen vermitteln die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Aminosäuren der Zielproteine, woraus Veränderungen der Aktivität, Stabilität, Wechselwirkungen mit Liganden oder Veränderungen der Lokalisation der Zielproteine resultieren (LIM et al. 2012). Verschiedene Gruppen von Proteinkinasen sind in Ca^{2+} -Signalkaskaden eingebunden. CBP verfügen über hochkonservierte Helix-Schleife-Helix Strukturen, sogenannte EF-Hände (MORENO et al. 2011). Diese 29 aa großen Motive kommen paarweise vor und sind in der Lage, zwei Ca^{2+} je Domäne zu binden. HARMON (2003) vergleicht sie mit einer Hand, wobei der ausgestreckte Zeigefinger und der Daumen im rechten Winkel zueinander jeweils einer EF-Helix entsprechen und die restlichen Finger aufgerollt die 12 aa lange Schleife darstellen. Durch die Bindung von Ca^{2+} im Bereich der Schleife kommt es zur Konformationsänderung des Moleküls und eine hydrophobe Tasche wird freigelegt, welche mit einer Reihe von Proteinen interagieren kann. Laut MORENO et al. (2011) werden im Genom von *C. parvum* 45 Proteine mit EF-Hand-Domänen kodiert.

Im Wesentlichen werden CBP in drei Familien unterteilt: die Kalmodulin (CAM)-Familie, die Kalzineurin-B-ähnlichen Proteine und die Familie der Kalzium-abhängigen Proteinkinasen (CDPK) (HRABAK et al. 2003). Kalzium-abhängige Proteinkinasen wurden in Pflanzen und Protisten beschrieben, kommen jedoch nicht in Pilzen oder Säugetieren vor (HARPER und HARMON 2005). Die CAM-ähnlichen Domänen der Protisten-CDPK teilen aber genetisch einige Intron-Positionen mit CAM-Genen von Tieren und Pilzen (ZHANG und CHOI 2001). Da Pflanzen keine eigentlichen CAMs besitzen, wurde die CDPK Superfamilie später in CDPK, CDPK-related Kinasen (CRK), Ca^{2+} /CAM-abhängige Kinasen (CCAMK), CAM-abhängige Kinasen (CaMK) und Kalzineurin B-artige interagierende Proteinkinasen (CIPK) eingeteilt (HARPER und HARMON 2005, KLIMECKA und MUSZYNSKA 2007). Klassische CAMs bestehen aus zwei globulären Domänen mit jeweils einem Paar EF-Hand-Motiven, welche über eine flexible helikale Struktur verlinkt sind. Die meisten Apikomplexa-Genome kodieren für einzelne klassische CAMs und einige verwandte Proteine. *In vitro*-Studien mit CAM-Inhibitoren ergaben eine verminderte Infektiosität der Tachyzoiten von *T. gondii* und der Merozoiten von *P. falciparum*, daher wird eine essentielle Rolle der CAMs für die Wirtszellinvasion vermutet (PEZZELLA-D'ALESSANDRO et al. 2001, VAID et al. 2008). Das *C. parvum* Kinom enthält eine CAM (cgd2_810) und vier CAM-ähnliche Kinasen (ARTZ et al. 2011). Kalzineurin-B-ähnliche Proteine wurden bisher nur in Pflanzen sowie einigen Protisten beschrieben und einige homologe Sequenzen wurden in den Genomen von *T. gondii* und *P. falciparum* gefunden (MORENO et al. 2011). CDPK wurden zunächst intensiv in Pflanzen erforscht. Sie haben eine molekulare Masse von 40 bis 90 kDa und bestehen aus fünf Domänen: einer NH_2 -terminalen Domäne, einer Serin/Threonin (Ser/Thr)-Kinasedomäne, einer autoinhibitorischen Verbindungsdomäne, einer regulatorischen (CAM-ähnlichen) Domäne mit vier EF-Händen sowie einer COOH -terminalen Domäne variabler Länge (HARMON 2003). Es existieren zwei Modelle der Aktivierung von CDPK. Im inaktiven Status bei weniger als 100 nM zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration wird die CAM-ähnliche

Literaturübersicht

Domäne mit zwei globulären EF-Hand-Domänen (N-Schlinge und C-Schlinge) mit jeweils zwei Ca^{2+} Bindungsstellen über eine flexible Verbindung an die Kinasedomäne gebunden. Nach der Stimulation durch vier Ca^{2+} bindet die CAM-ähnliche Domäne an die Verbindungsdomäne und der Autoinhibitor wird verschoben (CHRISTODOULOU et al. 2004). Nach Ansicht von HARPER et al. (2004) ist die CAM-ähnliche Domäne schon mit zwei Ca^{2+} beladen und im Basalzustand (Ca^{2+} -Konzentration von 100 nM und mehr) bereits an die Verbindungsdomäne gebunden. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung von zwei weiteren Ca^{2+} an die N-Schlinge (statt vier an N- und C-Schlinge) bei einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf etwa 1 μM .

Neben einer Aktivierung durch Ca^{2+} -Signale reguliert eine reversible Phosphorylierung oder Autophosphorylierung die CDPK (CHENG et al. 2002). So zeigten ROMEIS et al. (2001), dass die Phosphorylierung der *Nicotiana benthamiana* (*Nt*) CDPK2 in einer 10 bis 200fachen Erhöhung der maximal durch Ca^{2+} erreichbaren Aktivität resultiert. Diese Phosphorylierung erfolgt möglicherweise durch mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Im Kinom von *C. parvum* wurden drei MAPK mit hoher Homologie zu PfMAP-1 und -2 sowie TgMAP-1 gefunden (ARTZ et al. 2011). PfMAPK sind atypisch und scheinen nicht in klassische Stoffwechselwege eingebunden zu sein (LIM et al. 2012). In CDPK von Apikomplexa konnte bisher keine Phosphorylierung durch andere Kinasen nachgewiesen werden, daher vermuten WERNIMONT und Mitarbeiter (2010) eine Aktivierung über Autophosphorylierung.

Inwiefern CDPK an Membranen gebunden sind oder frei im Zytosol vorliegen ist weitgehend unbekannt. MARTIN und BUSCONI (2000) wiesen erstmals eine Unterstützung der Membranverankerung des N-terminalen Teils einer pflanzlichen CDPK, der *Oryza sativa* (*Os*) CPK2, durch Myristoylierung und Palmitoylierung nach. Auch für *Lycopersicon esculentum* (*Le*) CPK1 (RUTSCHMANN et al. 2002) und *At*CPK2 (LU und HRABAK 2002) wurde eine Membranverankerung durch Myristoylierung gezeigt. Von 34 CDPK-Genen in *Arabidopsis* mit stark konservierten CAM-ähnlichen Domänen und variablen N-terminalen Regionen (HARMON et al. 2000) enthalten 27 vorhergesagte Myristoylierungsstellen mit Glycin an Position zwei (G^2). Myristoylierung ist eine irreversible kovalente Amidbindung von Myristat, einer gesättigten Fettsäure mit 14 Kohlenstoffatomen, an ein NH_2 -terminales Glycin (TOWLER et al. 1988). Sie erfolgt entweder co-translational nach Abspaltung des Startmethionins (M) durch das zelluläre Enzym Methionylaminopeptidase oder als post-translationale Modifikation (FARAZI et al. 2001). Inwiefern Proteine mit NH_2 -terminalem M-G^2 myristoyliert werden, hängt von der folgenden Aminosäuresequenz ab. Von BOLOGNA et al. (2004) wurde das Motiv PDOC0008 (G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-P) aus der PROSITE Datenbank übernommen und als Konsensussequenz für Myristoylierung zusammengefasst. Palmitoylierung ist eine reversible Thioesterbindung von Palmitat, einer gesättigten Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen, an Cystein (C). Bei doppelt azylierten Proteinen sind bevorzugt C an Position drei (C^3) in der Nähe zum myristoylierten G^2 palmitoyliert (CASEY 1995, RESH 1999). Die Membranverankerung von

Literaturübersicht

myristoylierten Proteinen erfordert ein weiteres Signal. Das kann erstens durch elektrostatische Wechselwirkungen mit einem Cluster basischer Aminosäuren der Folgesequenz des myristoylierten G mit sauren Gruppen in der Lipiddoppelschicht der Membran erfolgen. Zweitens können hydrophobe Wechselwirkungen durch palmitoylierte C auftreten und drittens sind Protein-Protein-Interaktionen mit integralen Membranproteinen denkbar. Es sind außerdem „Myristoyl switches“ möglich, d.h. die Myristoylgruppe liegt zunächst in einer hydrophoben Tasche des Proteins verborgen und wird erst nach Aktivierung, z.B. durch Liganden wie Ca^{2+} oder elektrostatische Kräfte phosphorylierter Aminosäuren, ausgeklappt (RESH 1999). MÖSKES et al. (2004) zeigten, dass *PfCDPK1* *in vivo* und *in vitro* myristoyliert wird und ein basisches Motiv die Membranverankerung unterstützt.

2.2.3 Funktionen und Lokalisation von CDPK in Pflanzen und Apikomplexa

CDPK vermitteln in Pflanzen im Zusammenspiel mit MAPK Stresstoleranz gegenüber biotischen und abiotischen Faktoren. In *Arabidopsis thaliana* (*At*) werden MPK4, MPK6 gemeinsam mit CPK3, welche frei im Zytosol vorkommt, bei Salzstress aktiviert. *AtMPK* 4 und 6 wirken mit CPK1 aus Peroxisomen bei Kältestress. Umgekehrt blockiert *NtCDPK2* die Aktivierung von MAPK, möglicherweise um das System nach erfolgreicher Reaktion zurückzusetzen. *OsCPK13* induziert Apoptose, während *LeCDPK2* bei Verwundung der Pflanze die Ethylenbiosynthese induziert und membrangebundene *LeCPK1* H^+ -ATPasen der Plasmamembran unterdrückt, um nur einige Beispiele zu nennen. Eine aktuelle Übersicht zu Funktionen und Lokalisationen aller 34 *AtCDPK* und weiterer Pflanzen-CDPK geben BOUDSOCQ und SHEEN (2013). Das Pflanzenhormon ABA wird bei Stressantworten aktiviert und sowohl CDPK als auch MAPK sind in die ABA-gesteuerte Genexpression eingebunden. So vermitteln *AtCPK3*, *AtCPK6*, ABA und Ca^{2+} das Schließen pflanzlicher Stomata bei Stress (WURZINGER et al. 2011).

In Apikomplexa sind CDPK vor allem auf Genomebene erforscht, über Stoffwechselwege, Funktionen und Lokalisation ist noch sehr wenig bekannt. *P. falciparum* und *C. parvum* besitzen je sieben CDPK, im *T. gondii*-Genom sind zwölf CDPK vorhanden (BILLKER et al. 2009). Ser/Thr-Proteinkinasen phosphorylieren *in vitro* eine Reihe von Substraten. Ob diese Ergebnisse *in vivo* übertragbar sind, bleibt fraglich. Eine der ersten näher beschriebenen Proteinkinasen in *P. falciparum* ist CDPK1 der asexuellen Parasitenstadien in Erythrocyten (ZHAO et al. 1993). MÖSKES et al. (2004) zeigten, dass *PfCDPK1* durch N-Myristoylierung und ein Cluster basischer Aminosäuren an Membranen assoziiert ist. *PfCDPK1* wurde dabei sowohl in „extrazellulären Kompartimenten“ als auch in der PV-Membran, im tubovesikulären System, in Ringstadien, Trophozoiten und Schizonten nachgewiesen. *PfCDPK1* hat einen Einfluss auf die späten Schizonten und Merozoiten und ist vor allem im Bereich der Plasmamembranen lokalisiert (GREEN et al. 2008, KATO et al. 2008). *PfCDPK1* phosphoryliert die MLC und GAP45 des Motorkomplexes von *P. falciparum* *in vitro*. Neuere Studien von BANSAL et al. (2013) schreiben *PfCDPK1* eine entscheidende Rolle für die Mikronemensekretion während der

Literaturübersicht

Erythrozyteninvasion zu. Über PfCDPK2 ist wenig bekannt, neuere Studien identifizierten ein myelin basic protein (MBP) als potentielles Substrat *in vitro* (LAUCIELLO et al. 2013). PfCDPK3 und 4 sind in Mechanismen der Gametogenese eingebunden (KATO et al. 2009, LI et al. 2000). Ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt zur PfCDPK4-abhängigen Aktivierung einer PfMAP2 in männlichen Gametozyten. Diese MAPK wird für die Stadiendifferenzierung benötigt, bevor die Gameten freigesetzt werden (BILLKER et al. 2004, TEWARI et al. 2005). In *Plasmodium berghei* wurden CDPK1 und CDPK4 im Genom der Ookineten nachgewiesen (LAL et al. 2009). PbCDPK3 beeinflusst die Gleitgeschwindigkeit und die Übertragung der Ookineten und scheint im Zytosol lokalisiert zu sein (ISHINO et al. 2006). PfCDPK5 wird als essentiell für den Egressmechanismus aus den Erythrozyten angesehen (DVORIN et al. 2010). PbCDPK6 ist eine atypische CDPK mit langer NH_2 -terminaler Domäne mit zwei EF-Händen, welche vom Oozystenstadium an exprimiert wird (BILLKER et al. 2009).

In *T. gondii* ist vor allem CDPK1 gut charakterisiert. Eine chemische Regulierung der TgCDPK1 Expression beeinflusst die Mikronemensekretion und die Ausschüttung von Adhäsinen für die „gliding motility“. Demzufolge werden die Anheftung an die Wirtszelle sowie deren Invasion unterdrückt. Ein Knockout der TgCDPK1 beeinflusst auch den Egress des Parasiten. Nach Stimulation mit einem Ca^{2+} -Ionophor verbleiben die Stadien unbeweglich in den Vakuolen. Vermutlich führt die Verhinderung der Mikronemensekretion zum Mangel an Perforinen und somit bleibt die Membran der PV intakt (LOURIDO et al. 2010). Die Bindung von Ca^{2+} an die C-terminale Domäne von TgCDPK1 und TgCDPK3 ist partiell irreversibel, während CpCDPK1 nach Ca^{2+} Entfernung wieder in den Basalzustand zurückkehrt (WERNIMONT et al. 2010). Knockout-Studien belegen eine Funktion von TgCDPK3 im Egress des Parasiten (McCOY et al. 2012). TgCDPK7 ist die einzige Kinase, die direkt in den Zellteilungsprozess des Parasiten involviert ist. Ein Knock-out führt zur Veränderung der Zentrosomenanzahl, die Zentrosomen sind gestreckt, zwischen zwei IMC oder um den Kern lokalisiert, die Knospung der Parasitenstadien ist herabgesetzt (MORLON-GYOT et al. 2013).

In *E. bovis* wurde durch ein Screening von cDNA Banken eine zu TgCDPK1 homologe Ser/Thr-Kinase mit einem CAM-ähnlichen C-terminalen Ende mit vier EF-Hand Motiven identifiziert. In Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde diese EbCDPK1 am apikalen Pol von Sporozoiten und Merozoiten vom Typ 1 nachgewiesen (DYACHENKO 2006).

Über CDPK in *C. parvum* ist wenig bekannt, auch existieren bisher kaum Untersuchungen zur Lokalisation oder Funktion im Parasiten. Ziel dieser Arbeit war es daher, die im Genom von *C. parvum* vorhandenen CDPK zunächst phylogenetisch einzuordnen, funktionelle Gruppen darzustellen und sie auf potentielle Azylierungsstellen zu überprüfen, um erste Hinweise auf mögliche Lokalisationen im Parasiten zu erhalten. Weiterhin sollten die CDPK hinsichtlich ihres Expressionsmusters *in vitro* untersucht werden. Vor einigen Jahren wurden erste Inhibitoren der CpCDPK1 beschrieben (MURPHY et al. 2010). Daraus ergab sich die Fragestellung, in welchen

Stadien des Parasiten die *CpCDPK1* translatiert wird. Ferner sollte eine Lokalisation der *CpCDPK1* in den Parasitenstadien erfolgen, um Hinweise auf mögliche Funktionen des Proteins zu erhalten.

2.2.4 Inhibitoren der CDPK in Apikomplexa

In Genomen von Säugetieren sind keine Orthologe zu CDPK von Apikomplexa vorhanden, lediglich Pflanzen, Pilze und weitere Protisten besitzen einige homologe CDPK. Damit stellen CDPK hochinteressante Zielproteine für pharmazeutische Therapeutika dar (LIM et al. 2012). Erste Möglichkeiten für eine Inhibition von CDPK zeigten KIESCHNICK et al. (2001), indem die Beweglichkeit der Tachyzoiten und die Anheftung von *T. gondii* an die Wirtszelle durch den Inhibitor KT5926 erfolgreich blockiert wurden. Die geblockte Kinaseaktivität war Ca^{2+} -abhängig, erforderte aber kein CAM. Nach einem Screening des *T. gondii* Genoms wurden zwei *TgCDPK* ermittelt. *TgCDPK2* wurde jedoch nur auf mRNA Ebene exprimiert. Somit konnten die negativen Effekte von KT5926 auf die Wirtszellinvasion auf eine Unterdrückung der *TgCDPK1* zurückgeführt werden. LOURIDO et al. (2010) griffen diese Ergebnisse auf und fanden durch Knock-out Studien eine spezifische Hemmung der *TgCDPK1* sowie der Mikronemensekretion durch Pyrazolopyrimidinderivate heraus. Die Effekte wurden durch die Aminosäuresequenz in der sogenannten „gatekeeper“ Position, welche sich am hinteren Ende der Adenin-bindenden Tasche von Ser/Thr-Kinasen befindet, erklärt. Kinasen mit kleinen „gatekeeper“ Bereichen, z.B. Glycin, können ATP Analoge mit Substituenten an der Puringruppe binden. Die als „Bumped kinase inhibitors“ (BKI) bezeichneten Pyrazolopyrimidinderivate mit umfangreichen aromatischen Substituenten hemmen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen *TgCDPK1* in submikromolaren Konzentrationen (OJO et al. 2010, SUGI et al. 2010). Interessanterweise besitzt *CpCDPK1* ebenfalls eine ATP-bindende Tasche mit Glycin in der „gatekeeper“ Position. BKI blockieren die Aktivität von *CpCDPK1* erfolgreich. Der Pyrazolopyrimidin-basierte Inhibitor 1294 reduziert die Anzahl von *C. parvum in vitro* signifikant und die Ausscheidung von Oozysten in immunsupprimierten Mäusen ist signifikant geringer (LARSON et al. 2012, CASTELLANOS-GONZALEZ et al. 2013).

3 Tiere, Material, Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Passage von *C. parvum* in Kälbern

Geräte und Material

- Stoffwechsellkäfig
- Kunststoff- und Tränkeimer
- Digitales Kurzzeitthermometer
- Stethoskop (3M Littmann®, Hilden)
- Milchaustauscher (LHG Landhandelsgesellschaft e.G., Schmöln)
- Ursolyt G oral (Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg)

Durchführung

Zur Passage wurde in Zeitabständen von etwa sechs Monaten jeweils ein neugeborenes männliches Kalb der Rasse Holstein-Schwarzbunt (Anzeige Verlängerung TVV-Nr. 24-9168.22-02-V8/07, Regierungspräsidium Leipzig, Leipzig, 06.03.2008) am ersten Lebenstag mit 9×10^6 bis 2×10^7 Oozysten von *C. parvum* des Stammes LE-08-Cp-08 (Blönsdorf) infiziert. Die Infektionsdosis richtete sich je nach Alter der zu passagierenden Oozysten. Die Kälber wurden in einem Stoffwechsellkäfig aus Metall gehalten und konnten über eine Selbsttränke ad libitum Milchaustauscher aufnehmen. Ab dem 3. Tag p. i. wurden den Tieren ein- bis dreimal täglich über einen Tränkeimer zusätzlich Elektrolyte verabreicht. Zur Überwachung des Gesundheitszustandes erfolgte jeden Morgen eine allgemeine Untersuchung und eine Beurteilung der Kotkonsistenz. Ab dem 4. Tag p. i. wurde der Kot im Schnellverfahren mit der Färbung nach HEINE (1982) bei 400facher Vergrößerung im Hellfeld mit Immersionsöl untersucht. Ab einer Oozystenanzahl von mindestens sieben pro Blickfeld wurde der Kot für die Aufreinigung gesammelt.

3.1.2 Immunisierung eines Kaninchens

Geräte und Material

- Serum
- Glycerol

Durchführung

Zur Gewinnung von Immunsereen gegen das rekombinante Protein wurde über His-Tag und SDS-PAGE gereinigtes *CpCDPK1*-Antigen aus *E.coli*-Extrakten verwendet, welches gegen 1x PBS dialysiert und mit Aceton präzipitiert wurde (Kapitel 3.7.4 und 3.7.5). Die Immunisierung eines

Kaninchens erfolgte nach dem Standard-Immunisierungsschema über zwei Monate durch die Firma SeqLab Göttingen GmbH. Die Seren (Präserum, Serum nach der 1. Boosterung und finales Serum) wurden im Verhältnis 1:1 mit Glycerol versetzt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2 Puffer und Medien

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

In einer 10 x konzentrierten Lösung waren 1,4 M NaCl, 30 mM KCl, 40 mM Na₂HPO₄ und 20 mM KH₂PO₄ und Aqua bidest enthalten. Die Verdünnung zu 1 x PBS erfolgte mit Aqua bidest dabei wurde der pH-Wert auf 7,4 mit 1 M Salzsäure eingestellt.

Wachstumsmedium

RPMI-Rohmedium, Fetales Kälberserum (FKS) in einer Endkonzentration von 10%, Natriumpyruvat 10%, Penicillin (100 Units/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin B (2,5 µg/ml).

Gelladepuffer (6x)

Zur Herstellung von 6 ml Gelladepuffer wurden 3,6 ml TE-Puffer (ph 8,0), bestehend aus 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, mit 1,8 ml Glycerol versetzt und 0,6 ml einer 1%igen Bromphenolblau-Stammlösung versetzt. Der Puffer wurde aliquotiert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

TBE-Puffer (10x)

Zur Herstellung von 500 ml Puffer wurden 85,14 g TBE-Pulver (AppliChem, Darmstadt) in Aqua bidest aufgelöst. Zur Anwendung wurde der TBE-Puffer auf eine einfache Konzentration mit Aqua bidest verdünnt.

10 %ige Paraformaldehydlösung (Pfa)

Zur Herstellung von 100 ml wurden zunächst 10 g Paraformaldehyd in 60 ml H₂O mit 2-3 Tropfen 1 N NaOH aufgelöst und anschließend mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

6x SDS-Probenpuffer

- 7 ml Tris/SDS (pH 6,8)
- 30 % Glycerol
- 10 % SDS (Endkonzentration)
- 1,2 M β-Mercaptoethanol
- 1,2 mg Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer

Dieser Puffer enthielt 125 mM Tris, 1 M Glycin und 20 mM SDS in einer entsprechenden Menge Aqua bidest.

4x Tris-Cl/SDS (pH 6,8)

6,05 g Tris Base werden in 40 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 1 N HCl eingestellt, dann wird mit Aqua bidest das Gesamtvolumen auf 100 ml gebracht und zuletzt 0,4 g SDS im Ansatz gelöst.

4x Tris-Cl/SDS (pH 8,8)

30 g Tris Base werden in 100 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 1 N HCl eingestellt, dann wird mit Aqua bidest das Gesamtvolumen auf 170 ml gebracht und zuletzt 0.7 g SDS im Ansatz gelöst.

Polyacrylamidgel

Tabelle 1: Ansatz für ein SDS-Polyacrylamidgel

Minigel	13 %iges Trenngel		3,9 %iges Sammelgel	
Aqua bidest	4,75 ml		3,05 ml	
Rotiphorese Gel 30	6,5 ml		650 µl	
4x Trishydroxymethylaminomethan / Sodiumdodecylsulfat (SDS) pH-Wert	1,5 M 0,4 % 8,8	3,75 ml	0,5 M 0,4 % 6,8	1,25 ml
10% Ammoniumperoxosulfat (APS)	50 µl		25 µl	
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl		5 µl	
Gesamtvolumen	15 ml		5 ml	

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

10 x konzentrierte TBS enthielt 500 mM Tris (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 1,5 M NaCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in Aqua dest.

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,5 mit konzentrierter Salzsäure eingestellt.

3.2.1 Verwendete Stämme von *C. parvum*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Stämme von *C. parvum* verwendet, wobei der Stamm LE-07-Cp-05 (Wilchwitz) lediglich zur Etablierung der Methoden verwendet wurde.

Aufgrund einer mit der Anzahl der Passagen abnehmenden Infektiosität des Stammes LE-07-Cp-05 (Wilchwitz) erfolgte die Isolierung eines neuen Stammes. Hierfür wurden drei Betriebe in Brandenburg mit vorberichtlicher Kryptosporidiose-Problematik in den Beständen beprobt und insgesamt 54 Kotproben mit der Färbung nach Heine (Kapitel 3.2.2) untersucht. Drei Proben waren stark positiv. Daraus konnten durch eine Aufreinigung (Kapitel 3.2.3) pro Probe ca. 3×10^7 Oozysten gewonnen werden. Ein Kalb wurde mit einer aus diesen drei positiven Proben gepoolten

Infektionsdosis von $1,5 \times 10^7$ Oozysten infiziert. Die ausgeschiedenen Oozysten wurden aufgereinigt und als neuer Stamm mit der Bezeichnung LE-08-Cp-08 (Blönsdorf) bei allen Passagen ab November 2008 eingesetzt. Es handelt sich bei diesem Stamm um einen GP60 Subtyp IIa A15G2RI (persönliche Mitteilung Dr. Viktor Dyachenko, Leipzig, 01.09.2009).

3.2.2 Färbung nach HEINE

Geräte und Material

- Lichtmikroskop (Leica DM LS, Leica Microsystems, Wetzlar)
- Pasteurpipette
- Glasobjektträger mit Deckglas (Heiland, Hamburg)
- Karbolfuchsin
- Immersionsöl

Durchführung

Aus einer homogenisierten Kotprobe wurde mit einer Pasteurpipette 1 Tropfen Kot entnommen, auf einen Glasobjektträger verbracht und im Verhältnis 1:1 mit Karbolfuchsin vermischt. Die Suspension wurde mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Der luftgetrocknete Ausstrich wurde mit zwei Tropfen Immersionsöl und einem Deckglas bedeckt und bei 400facher Vergrößerung im Hellfeld mäanderförmig durchmustert. Die Kryptosporidienoozysten stellten sich als kreisrunde, ungefärbte, lichtbrechende Strukturen von 5 µm Durchmesser dar, welche gut vom dunkelrosa Hintergrund abgrenzbar waren.

3.2.3 Aufreinigung von Oozysten

Geräte und Material

- Kunststoffeimer
- Waage (BP 310 P, Sartorius AG, Göttingen)
- Stabmixer
- Siebe (Maschenweite 250 µm und 100 µm)
- Holzspatel
- Einmalhandschuhe aus Latex und Mundschutz
- Zentrifuge (Rotina 46, Hettich Zentrifugen Typ 4605, Tuttlingen)
- Zentrifugengläser (250 ml)
- Wasserstrahlpumpe
- Becherglas (Volumen 1 l)
- Vortexer (REAX top, Heidolph, Schwabach)

Tiere, Material, Methoden

- 50 ml Zentrifugenröhrchen (TPP)
- Pasteurpipetten
- Lichtmikroskop (Leica DM LS, Microsystems, Wetzlar)
- Zählkammer nach Neubauer (0,0025 mm², Tiefe 0,1 mm, Superior Marienfeld)
- Diethylether (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- kalte gesättigte Natriumchloridlösung (Dichte 1,2 g/ml)
- Leitungswasser, Aqua dest.
- PBS (1x)
- Penicillin (100 Units/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) entspricht 1x Konzentration
- Amphotericin B (2,5 µg/ml)

Durchführung

Zur Gewinnung frischer Oozysten von *C. parvum* wurde der Kot des Passagekalbes bei einem Nachweis von mehr als sieben Oozysten/Blickfeld in der HEINE-Färbung in einem 10 l Kunststoffeimer gesammelt. Nach der Homogenisierung mit einem Stabmixer wurde der dünnflüssige Kot unter Verwendung eines Holzspatels durch Siebe der Maschenweite 250 µm sowie 100 µm passiert und anschließend in Zentrifugengläser gefüllt. Diese wurden genau austariert und bei 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand bis auf 2 cm über dem Sediment abgesaugt. Die Sedimente wurden mit einem Holzspatel und etwas Leitungswasser resuspendiert, aus den Zentrifugengläsern entfernt und in einem Becherglas vereinigt. Anschließend erfolgte die Zugabe von einem Teil Diethylether zu drei Teilen Kotsuspension bei gleichzeitiger sorgfältiger Durchmischung mit dem Stabmixer. Die entstandene Kot-Ether-Suspension wurde auf die Zentrifugengläser verteilt, austariert und bei 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Die Etherphase, der Schmutzkuchen und die wässrige Phase wurden dekantiert, die Sedimente mit etwas Leitungswasser und einem Holzspatel resuspendiert, vereinigt und in 50 ml Falconröhrchen überführt. Um Etherreste zu entfernen wurden die Sedimente zweimal mit Leitungswasser aufgefüllt, durch Vortexen homogenisiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in etwas Leitungswasser resuspendiert und mit kalter gesättigter Natriumchloridlösung der Dichte 1,2 g/ml im Verhältnis 1:10 versetzt. Das Gemisch von etwa 40 ml Volumen wurde vorsichtig mit 5 ml kaltem Aqua dest. überschichtet und im leicht verschlossenen Zentrifugenröhrchen ungebremst bei 2300 x g für 10 min zentrifugiert. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die als weiße, trübe Schicht an der Phasengrenzfläche des Gradienten sichtbaren Oozysten abgesaugt, in ein neues Falconröhrchen mit PBS überführt und bei 2500 x g für 8 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift mit PBS wurde zweimalig wiederholt.

Im Anschluss erfolgte die Zählung der Oozysten mit der Neubauer-Zählkammer und die Einstellung einer Oozystenkonzentration von 1×10^7 Oozysten pro ml. Die frischen *C. parvum*-Oozysten wurden in steriler, mit Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B versetzter PBS bei 4 °C gelagert.

3.2.4 Exzystierung und Gewinnung der Sporozoiten

Geräte und Material

- Zentrifuge Megafuge 2.0 R (Heraeus, Sepatech, Hanau)
- Zentrifugenröhrchen (15 ml, TPP)
- PBS (1x)
- Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, PAA, Linz)
- Natriumtaurocholat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

Durchführung

Eine Menge von 1×10^8 bei 4°C gelagerter *C. parvum*-Oozysten wurde in ein mit ca. 10 ml 1x PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und für 2 min bei 2500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml einer Lösung aus 1x PBS beziehungsweise DMEM mit 0,4 % Natriumtaurocholat resuspendiert. Die Exzystierung erfolgte durch die Inkubation der Oozystensuspension bei 37°C für 30 bis 45 min.

3.3 Molekulare Genetik

3.3.1 Analyse von Sequenzen und Domänenstruktur

Basierend auf den Aminosäuresequenzen von *Tg*CDPK1 wurde im NCBI Blast[®] Programm nach Orthologen im Genom von *C. parvum* gesucht. Die Sequenzen aller herausgegebenen CDPK und CDPK-like Kinasen wurden im Programm *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART[®], SCHULTZ et al. 1998) hinsichtlich ihrer Proteindomänenstruktur gescreent. Für nähere Untersuchungen wurden sechs CDPK ausgewählt, welche alle dem klassischen Aufbau einer CDPK entsprechen, eine Serin-Threonin-Kinasedomäne mit Phosphorylierungsaktivität besitzen sowie über vier kalziumbindende EF-Hände am C-terminalen Ende verfügen.

3.3.2 Untersuchung auf N-Acylierung der Proteine

Einige Proteine können an ihrem N-terminalen Ende mit Hilfe 14 C-gesättigter Fettsäuremoleküle an Membranen verankert werden. Dieser Prozess wird als N-Myristoylierung und Palmitoylierung bezeichnet. Basierend auf der von RESH (1999) sowie BOLOGNA et al. (2004) beschriebenen und von DYACHENKO (2006) tabellarisch zusammengefassten Konsensus-Sequenz (Tabelle 2.2) wurden die sechs ausgewählten Proteinsequenzen der CDPK auf N-Acylierung untersucht. Mittlerweile stehen online eine Reihe von Programmen zur Untersuchung von Proteinsequenzen auf N-Myristoylierung und Palmitoylierung zur Verfügung, wobei zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse geliefert werden. Für diese Arbeit wurden jeweils die ersten 20 Aminosäuren der *Cp*CDPK untersucht.

Tabelle 2: Darstellung einer Konsensussequenz für die potenzielle Myristoylierung (DYACHENKO 2006, BOLOGNA et al. 2004)

G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}		
Position	Aminosäuren	Legende
1	G	NH2-terminales Glycin, an den Myristilrest gebunden wird
2	{EDRKHPFYW}-	Aminosäuren, die an der Position 2 nicht zulässig sind
3-4	X(2)	zwei beliebige Aminosäuren
5	[STAGCN]	Aminosäuren, die an der Position 5 erwünscht sind
6	{P}	Prolin, an der Position 6 ist nicht erwünscht

3.3.3 Phylogenie

Die Sequenzen von CDPK verschiedener Apicomplexa aus der NCBI Gendatenbank (Tabelle 12 im Anhang) wurden ins *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 5* (MEGA5[®], TAMURA et al. 2011) Programm importiert und mit der ClustalW Funktion abgeglichen. Basierend auf diesem Alignment wurde mit der Neighbor Joining Methode ein phylogenetischer Baum erstellt. Hierbei fand ein 10000 Replikate umfassender Bootstrap-Test der Phylogenie Anwendung. Die Sequenz der Kalzium/Kalmodulinabhängigen Proteinkinase (Camk2B) der Maus diente dabei als „outgroup“.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Verwendete Zelllinien und Lagerung der Zellen

Für die Versuche zum Nachweis der Transkription von sechs ausgewählten Kinasen von *C. parvum* sowie für den Immunoblot wurden HCT-8 Zellen (*Human ileocecal adenocarcinoma tumor*, ECACC Nummer 90032006) der Zelllinie London verwendet, welche aus der *European Collection of Cell Cultures* bezogen wurden. Des Weiteren wurden alle Zellkultur-Versuche ab Januar 2010 mit HCT-8 Zellen des *Cell Lines Service* (CLS) in Eppelheim, Deutschland durchgeführt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C in 1 ml Kryoröhrchen aus Kunststoff. Das Einfriermedium bestand dabei aus RPMI-Rohmedium mit 40 % Fetalem Kälberserum (FKS) und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und wurde den Zellen im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Nach dem Einfrieren über Nacht bei -80°C wurde das Kryoröhrchen in den Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt, wo die Zellen bis zu ihrer Verwendung gelagert wurden. Dabei wurden verschiedene Passagen beider HCT-8-Zelllinien eingefroren.

3.4.2 Infektion von HCT-8 Zellen mit *C. parvum*

Geräte und Material

- Wasserbad
- Zentrifuge Megafuge 2.0 R (Heraeus, Sepatech, Hanau)
- Sterilwerkbank (HERA safe Typ KS 12, Kendro Laboratory Products, Hanau)
- Brutschrank (Binder, Tuttlingen)
- Tischzentrifuge (Mikro20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Vortexer REAX top (Heidolph, Schwabach)
- Mikroskop (Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar)
- Neubauer-Zählkammer mit geschliffenem Deckgläschen
- *C. parvum*-Oozysten
- HCT-8-Zellen (London)
- Zellkulturplatten (6-Well)
- sterile Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- sterile Glaspasteurpipette
- Pipettierhilfe
- sterile Pipettenspitzen und serologische Pipetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- sterile PBS (1x)
- RPMI-Rohmedium (PAA, Linz)
- Fetales Kälberserum (PAA, Linz)
- Wachstumsmedium
- Zentrifugenröhrchen (15 ml)
- Natriumtaurocholat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), 1,2 %ige Lösung in 1x PBS

Durchführung

Die kryokonservierten HCT-8-Zellen wurden aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff entnommen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Wachstumsmedium überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend wurden pro Well jeweils 5×10^5 HCT-8-Zellen unter sterilen Bedingungen auf die Zellkulturplatte aufgetragen und mit je 2 ml Wachstumsmedium versetzt. Die Kultivierung der HCT-8-Zellen erfolgte im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37°C.

Die Infektion mit *C. parvum*-Oozysten erfolgte, sobald die Zellen eine 90%ige Konfluenz aufwiesen. Die Exzystierung von Sporozoiten vor der Infektion erfolgte dabei direkt auf den Wirtszellen. Hierfür wurde das Wachstumsmedium unter sterilen Bedingungen vom Zellrasen abgesaugt. Die Zellen

wurden zweimal mit einfach konzentrierter PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 4 x 10⁵ Oozysten auf den Zellrasen gebracht und im Verhältnis 3:1 mit einer 1,2 %igen Natriumtaurocholatlösung zur Exzystierung von Sporozoiten versetzt. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank für 3 h. Schließlich wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Wachstumsmedium überschichtet.

3.4.3 *In-vitro*-Assay mit Anti-*Cp*CDPK1-Serum

Die HCT-8-Zellen wurden wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben in 24-Well-Zellkulturplatten angezüchtet und infiziert. Dem Wachstumsmedium wurde zum Zeitpunkt der Infektion Anti-*Cp*CDPK1-Serum zugegeben, sodass Endkonzentrationen des Antikörpers von 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 im Medium vorlagen. Die Kultivierung der HCT-8-Zellen erfolgte im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37°C. Das Material wurde analog der in Kapitel 3.4.4 beschriebenen Methode zu den Zeitpunkten 3 h, 24 h und 48 h p. i. isoliert. Im Anschluss erfolgte die Gewinnung von Gesamt-RNA (Kapitel 3.5.2) mit Trizol und die Reverse Transkription. Die cDNA wurde mit der Real-Time PCR (RT-PCR) unter Verwendung von Primern und einer TaqMan-Sonde für *Cp*HSP70 jeweils im Triplettansatz untersucht. Der Versuch wurde dreimal mit je vier Wells durchgeführt, so dass ein Stichprobenumfang von zwölf Proben ($n = 12$) für jede Konzentration und Zeit vorlag. Die unbehandelte Kontrolle bestand aus drei Wells je Zeitpunkt und Versuch, ergab also insgesamt $n = 9$ Proben. Die Daten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und mit dem IBM SPSS Statistics[®] 22 Programm (IBM, New York, USA) ausgewertet. Hierbei fand zunächst die Untersuchung auf Normalverteilung statt. Normal verteilte Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test sowie dem T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Lag keine Normalverteilung vor, fanden der Kruskal-Wallis-Test sowie der Mann-Whitney-U-Test Anwendung.

3.4.4 Gewinnung von Material aus der Zellkultur

Geräte und Material

- Wasserbad
- Sterilwerkbank (HERA safe Typ KS 12, Kendro Laboratory Products, Hanau)
- CO₂-Brutschrank CB 150 (Binder, Tuttlingen)
- Tischzentrifuge (Mikro20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Zellkulturplatten mit *C. parvum* infizierten HCT-8-Zellen
- Pipettierhilfe und serologische Pipetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- sterile Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- sterile PBS (1x)
- Accutase (PAA, Linz)

- RPMI-Rohmedium (PAA, Linz)
- Wachstumsmedium

Durchführung

Die Gewinnung von infizierten Zellen erfolgte zu ausgewählten Zeitpunkten im Zeitraum 3 h-54 h p. i. aus den im Triplettsatz vorhandenen mit *C. parvum* infizierten HCT-8-Zellkulturen. Ein Well jeder Platte entsprach jeweils einem Zeitpunkt oder wurde als Kontrolle mit uninfizierten HCT-8-Zellen mitgeführt und das Material zum jeweiligen Zeitpunkt isoliert. Unter sterilen Bedingungen wurde Wachstumsmedium vom Zellrasen abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit steriler, einfach konzentrierter PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 1 ml Accutase pro Well im Brutschrank bei 37°C bis zur vollständigen Ablösung aller Zellen. Der Ablösevorgang wurde mit 200-500µl Wachstumsmedium abgestoppt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 96 ×g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

3.5 Nukleinsäuren

3.5.1 RNA Isolierung mit RNeasy® Mini Kit (Qiagen)

Geräte und Material

- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- RNeasy® Mini Kit (50, Qiagen, Hilden, Cat. No. 74104)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)

Durchführung

Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß der im RNeasy® Mini Kit-Handbuch beschriebenen Methode für Zellen tierischen Ursprungs („Animal Tissue Spin“). Das bei -20°C gelagerte Probenmaterial (*C. parvum* infizierte HCT-8-Zellen, welche zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden) wurde aufgetaut, mit jeweils 350 µl RLT Puffer versetzt und ca. 1 min durch Vortexen homogenisiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 70 %igem Ethanol im Verhältnis 1:1. Das Lysat wurde auf eine RNeasy®-Säule aufgetragen und nacheinander mit Puffer RW1 und zweimalig mit Puffer RPE kurz zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Im letzten Schritt wurde ein neues Sammelröhrchen verwendet und die auf die Säule aufgeladene RNA durch Zentrifugation in 60 µl RNase-freiem Aqua bidest eluiert. Durch eine spektrophotometrische Messung war eine Abschätzung der RNA-Konzentration möglich.

3.5.2 RNA- und DNA - Isolierung mit Trizol®LS Reagent (Invitrogen)

Geräte und Material

- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Trizol® LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad)
- Chloroform
- Isopropylalkohol
- Ethanol (70 % und 100 %)
- Natriumcitrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Natriumhydroxid-Lösung (AppliChem, Darmstadt)

Durchführung

Trizol ermöglichte die Isolierung von RNA sowie DNA aus einer Probe. Als Ausgangsmaterial wurden 6×10^6 Sporozysten aus frisch exzystierten Oozysten eingesetzt. Diese wurden in einem Eppendorfgefäß mit 750 µl Trizol versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, eine erneute Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und eine 15 minütige Zentrifugation bei 13800 x g. Es war eine deutliche Auftrennung in zwei Phasen erkennbar. Die obere, klare, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 500 µl Isopropylalkohol gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13800 x g für 10 min. Im Anschluss wurde der Überstand abgezogen, das gelartige RNA Pellet verblieb im Eppendorfgefäß und wurde in 1 ml Ethanol resuspendiert, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Im letzten Schritt wurde die RNA in 15 µl RNase-freiem Aqua bidest aufgenommen.

Die dunkelrosa gefärbte, DNA-haltige Trizolphase wurde mit 300 µl reinem Ethanol versetzt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Material mit 1 ml einer 10 %igen Ethanolösung mit 0,1 M Natriumcitrat vermischt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach Zugabe von 2 ml 70%igen Ethanols, kurzer Inkubationszeit und einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Im letzten Schritt wurde das DNA-Pellet in 500 µl einer 8 mM Natriumhydroxidlösung aufgenommen, 10 min bei 12000 x g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand gewonnen. Mit einem Spektrophotometer war eine Abschätzung der RNA- bzw. DNA-Konzentration möglich. Die Lagerung der RNA und DNA erfolgte bei -80°C.

3.5.3 Reverse Transkription

Geräte und Material

- iCycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD, München)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg)
- Vortexer REAX top (Heidolph, Schwabach)
- Micro-Zentrifuge (Model AL, 6000rpm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- ImProm™ Reverse Transcription System
- Reaktionsgefäße (1,5 ml, Renner Laborbedarf, Dannstadt-Schauenheim)
- PCR-Tubes (G. Kisker GbR, Steinfurt)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) – Wasser (AppliChem, Darmstadt)

Durchführung

Die im Folgenden beschriebene Reaktion ermöglicht den Nachweis von Transkripten eines bestimmten Genabschnitts, welche in Form von mRNA vorliegen. RNA kann mit Hilfe eines zur reversen Transkription befähigten Enzyms in cDNA umgewandelt werden, die als Template in einer anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt wird.

Als Ausgangsmaterial für diesen Versuch diente die isolierte Gesamt-RNA (Kapitel 3.6.1 und 3.6.2) aus infizierten HCT-8 Zellen bzw. exzystierten Oozysten und Sporozoiten von *C. parvum* (Kapitel 3.5.3 und 3.3.4). Die reverse Transkription erfolgte in zwei Schritten gemäß der Anleitung des Herstellers ImProm. Zuerst wurden zwei Ansätze jeder Probe mit 3 µl RNA hergestellt. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle mit DEPC-Wasser und eine Positivkontrolle mit 2 µl Positivkontrolle des Herstellers angesetzt. Alle Ansätze enthielten außerdem 2 µl (dT)₁₅ Primer des Herstellers und wurden mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 µl ergänzt. Sie wurden kurz auf eine Temperatur von 70°C im vorgewärmten Heizblock erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und zentrifugiert. Die so aufbereiteten Proben dienten als Ausgangsmaterial für eine PCR in einem zweiten Schritt.

Die Reaktionen wurden nach dem in Tabelle 3 aufgeführten Schema angesetzt, wobei in einem zweiten Ansatz jeder Probe DEPC-Wasser an Stelle der reversen Transkriptase zugefügt wurde. Die Positivkontrolle wurde entsprechend der Angaben des Herstellers mit den mitgelieferten Upstream- und Downstream-Primern angesetzt, die Negativkontrolle entsprach dem Ansatz der Proben. Im Thermocycler erfolgten mit jeweils einem Zyklus ein Annealingschritt von 5 min bei einer Temperatur von 25°C, ein Elongationsschritt für 1 Stunde bei 40°C und ein Inaktivierungsschritt für 15 min bei 70°C.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für eine reverse Transkription

Reagenz	Menge pro Reaktion (µl)
H ₂ O	4,2
PCR-Puffer 5x	4,0
MgCl ₂	4,8
dNTP Mix	1,0
Primer 1	-
Primer 2	-
Reverse Transkriptase	1,0
Template	5,0
Gesamtvolumen	20,0

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Transkripten

3.5.4.1 3'RACE-PCR mit anschließender nPCR

Geräte und Material

- iCycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD, München)
- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Vortexer REAX top (Heidolph, Schwabach)
- Micro-Zentrifuge (Model AL, 6000 rpm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- PCR-Tubes (G. Kisker GbR, Steinfurt)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) – Wasser (AppliChem, Darmstadt)
- PCR-Puffer (5x)
- MgCl₂
- dNTP Mix (je NTP 25 mM, Fermentas, Schwerte)
- Taq-Polymerase (5 U/µl)
- Primer (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg)

Durchführung

Die 3'RACE-PCR zur schnellen Amplifikation der cDNA - Enden wurde eingesetzt, um im ersten Schritt möglichst vollständige PCR-Produkte zu erhalten. Es wurde ein modifizierter Oligo-dT-Primer (Tabelle 4; (dT)17-adapt-pr) verwendet, welcher an das Poly-A-Ende der cDNA hybridisierte und

dessen Anker-Sequenz am 5'Ende in der anschließenden nPCR als Zielsequenz für einen Adaptor-Primer diene. Aufgrund dieses anschließenden nPCR-Schrittes konnten fehlerhafte Amplifikationsprodukte ausselektiert werden und der Nachweis geringer Templatemengen war möglich. Für ausgewählten CDPK wurden spezifische Primer entworfen (Tabelle 4).

Als Positivkontrolle diene einerseits der Nachweis von polyadenylierten Transkripten des 70 kDa Hitzeschockprotein-kodierenden Gens (HSP70) von *C. parvum* (Primer CpHSP70tr_S1, Tabelle 4), des Weiteren der Nachweis der Transkription des für GAPDH kodierenden Gens (Primer Human GAPDH-d, Tabelle 4). Für HSP70 als „Housekeeping-Gen“ war eine kontinuierliche Expression zu erwarten. Dieses galt ebenso für GAPDH, welches als Enzym der Glykolyse in HCT 8-Zellen, aber nicht in Kryptosporidien vorkommt. Alle Primer wurden als Lyophilisate bezogen und nach Zugabe von DEPC-Wasser als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl bei -20°C eingefroren.

Tabelle 4: Übersicht über die in 3'RACE- und nPCR verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Erwartetes Produkt (bp)	Primer
3'RACE-PCR			
(dT)17-adapt-pr	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	---	1
Cgd-Tansk-d1	GAATATTCAGAATTTATTGCATCT	250	2
5_820d_for	CAGCTTGATCGTCAAGAATAA	419	
7_1840d_for	CATGTCTCTTTCTAGTAAGGC	222	
2_1300d_for	GCTCTTACATGTGTTGCATAC	599	
4_3330d_for	GCAAAATCAGCTCAAACATGC	477	
2_1060d_for	ATAGCGGGATTACTGAGCTC	358	
CpHSP70tr_S1	GAGCACAACCAAAGTCTGA	679	
humanGAPDH-d	TGCCAAGGCTGTGGGCAAG	570	
nPCR			
Adaptor-Primer	GACTCGAGTCGACATCG	---	1
Cgd-Trank-n1	GCATCTGCAATAGATAGAACAAT	241	2
5_820n_for	GATGGGTATTCAAAGTTATCTG	395	
7_1840n_for	CAGACGATGAACTAGCTCAAG	193	
2_1300n_for	CTTAATGACGCTGATATAGGC	575	
4_3330n_for	GATGGCACACCAATTAACGT	444	
2_1060n_for	GCTCCCCTCAGACTTGCT	342	
CpHSP70tr_S2	TGCTGAAAAGGACGAGTTTTGAAC	665	
humanGAPDH-n	TGGCATGGCCTTCCGTGT	522	

Die Herstellung von Template für die 3'RACE-PCR erfolgte wie nachfolgend beschrieben: das Ausgangsmaterial wurde 3 h, 6 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 26 h, 30 h, 36 h, 40 h, 44 h, 48 h, 50 h und 54 h p. i. aus den mit *C. parvum*-infizierten HCT-8-Zellkulturen gewonnen. Daraus wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy® Mini Kit isoliert. Im Falle der Sporozoiten von *C. parvum* wurde die Gesamt-RNA unter Verwendung von Trizol® LS Reagent (Kapitel 3.5.2) gewonnen. Im Anschluss erfolgte die Reverse Transkription, wobei die cDNA als Template für die 3'RACE-PCR diente. Entsprechend des in Tabelle 5 dargestellten Reaktionsschemas wurden zuerst Mastermix-Ansätze hergestellt. Nach kurzem Homogenisieren mit dem Vortexer und 1 min Zentrifugation wurden anschließend auf Eis je 48 µl des Mastermixes in PCR-Tubes pipettiert, 2 µl Template zugefügt und die Tubes mit einem Deckel fest verschlossen. Im Falle der nPCR wurden 2 µl des Reaktionsproduktes der 3'RACE-PCR als Template eingesetzt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für 3'RACE/nPCR

Reagenz	Menge pro Reaktion in µl
DEPC-H ₂ O	33,05
PCR-Puffer (5x)	10
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP Mix (je NTP 25 mM)	0,2
Primer 1 (25 µM)	0,8
Primer 2 (25 µM)	0,8
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,15 (nPCR 0,3)
Template	2
Gesamtvolumen	50

Nach nochmaligem kurzen Vortexen und Zentrifugieren wurden die Tubes in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Die PCR-Reaktion lief nach dem in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellten Verlauf ab.

Tabelle 6: Temperatur- und Zeitverlauf der 3'RACE und nPCR

	Temperatur in °C	Zeit		Zyklen
		3'RACE-PCR	nPCR	
Initiale Denaturierung	94	2 min	2 min	1
Denaturierung	94	40 sek	30 sek	30
Annealing	52	1 min	30 sek	
Amplifikation	72	2 min	2 min	
Finale Amplifikation	72	5 min	5 min	1
Kühlung	4	∞	∞	

3.5.5 Darstellung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Geräte und Material

- Waage (BP 310 P, Sartorius AG, Göttingen)
- Mikrowelle (Clatronic®, Kempen)
- Elektrophoresekammer (Compact L/XL, Biometra, Göttingen) mit Gelschlitten und -kämme
- Stromquelle (Power Pack P25, Biometra, Göttingen)
- Wipptisch (LTF Labortechnik, Wasserburg)
- Transilluminator (Vilber Lourmat, Eberhardzell)
- PC-gesteuerte Digitalkamera (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Software Argus X1 Version 4/5 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)
- Kunststoffbehälter mit Deckel
- Messzylinder
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Nitrilhandschuhe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Aqua bidest
- Agarose (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Gelladepuffer (6x)
- TBE-Puffer (10x)
- DNA Marker (1000 bp, Fermentas, Schwerte)
- Ethidiumbromid (10 mg Tabletten, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

Es wurde eine Stammlösung von 10 mg/ml mit Aqua bidest angefertigt, die Färbelösung enthielt pro 1 ml 0,5 µg Ethidiumbromid.

Durchführung

Die amplifizierte DNA wurde mittels der Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Im ersten Schritt wurde ein 1,5 %iges Agarosegel gegossen. Dazu wurde Agarose in einer entsprechenden Menge 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Das flüssige Gel wurde luftblasenfrei unter leichtem Schwenken in den Gelschlitten gegossen und die Gelkämme (48 bzw. 36 Zähne) wurden ebenfalls luftblasenfrei eingesetzt. Das Gel wurde bis zur Erstarrung auf einer ebenen Fläche stengelassen und nach Entfernung der Fixierungsvorrichtung und der Gelkämme wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingehängt. Die Kammer wurde mit 1x TBE-Puffer bis einige Millimeter oberhalb der Geloberfläche gefüllt.

Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 5:1 mit dem 6 x konzentrierten Gelladepuffer versetzt und pro Geltasche 12 µl Probe aufgetragen. Zwischen den Proben und am Rand wurde DNA-Marker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde bei 150 V für 90 min durchgeführt.

Zur Darstellung der Banden erfolgte die Färbung des Gels mit Ethidiumbromid. Das Gel wurde in einer Kunststoffschale mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 20 min unter Schwenken gefärbt. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde anschließend mit Aqua bidest in einer zweiten Kunststoffschale unter leichtem Schwenken entfernt. Nach 20 min konnten die Banden im UV-Licht des Transilluminators sichtbar gemacht und mit der an den PC angeschlossenen Digitalkamera fotografiert werden. Die Gelbilder wurden als *.tif-Dateien gespeichert.

3.5.6 RT-PCR (ABgene)

Geräte und Material

- Mx3000P® (Stratagene®, La Jolla, USA)
- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Vortexer REAX top (Heidolph, Schwabach)
- Micro-Zentrifuge (Model AL, 6000 rpm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Pipetten und Pipettenspitzen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- PCR-Tubes (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) – Wasser (AppliChem, Darmstadt)
- ABgene Master Mix (2x)
- Rox
- Sonde HSP_70 (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg)
- Primer (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg)

Durchführung

Zur Charakterisierung der Expression einer Kinase wird üblicherweise eine relative Quantifizierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA/gesamtRNA durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Annahme, dass sogenannte „Housekeeping-Gene“ konstant exprimiert werden und die Expression des zu untersuchenden Zielgenes in Relation hierzu quantifiziert werden kann. Die RT-PCR wurde nach SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) durchgeführt. Der mitgeführte Plasmid-Standard diente jedoch nur zur Ermittlung der Effizienz der RT-PCR. Die Effizienzen der in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR lagen im Bereich 91-99%. Unter Verwendung der in Tabelle 7 dargestellten Primer wurden Ct Werte für die Expression der *CpCDPK1* sowie *CpHSP70* ermittelt. Unter Verwendung der MX Pro Software des Cyclerherstellers Stratagene® wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Als Normalizer wurde HSP70 verwendet, ein „Housekeeping-Gen“, für welches eine konstante Expression angenommen wird. Als Kalibrator diente jeweils die Probe 3 h p. i. Das Programm verwendet die $\Delta\Delta$ -Ct-Methode zur relativen Quantifizierung.

Zur Auswertung des *In-vitro*-Assays mit Anti-*CpCDPK1*-Serum wurde DNA 3 h, 24 h und 48 h p. i. isoliert und unter Verwendung der RT-PCR (SHAHIDUZZAMAN et al. 2010) über einen *CpHSP70*-Plasmid-Standard absolut quantifiziert. Damit konnte die exakte *CpHSP70*-DNA-Kopienanzahl jeder Probe ermittelt werden.

Tabelle 7: Für Real-Time PCR verwendete Primer und Sonden

Name	Sequenz 5'→3'
Primer	
CP_hsp70_fwd	AACTTTAGCTCCAGTTGAGAAAGTACTC
CP_hsp70_rvs	CATGGCTCTTTACCGTTAAAGAATTCC
qPCR_cgd_3_920_f	GAAAAGCCATCTCAACCACAAATAC
qPCR_cgd_3_920_r	CCCGCTACCACTCTGAACAAAC
Sonde	
Sonde CP_hsp70	Fam-AATACGTGTAGAACCAACCAATACAACATC-Tamra
Sonde cgd 3_920	Fam-CTTCTGATGTTAAAAAGGGAGGAACTATGGGA-Tamra

3.6 Immunhistologischer Nachweis von *Cp*CDPK1

3.6.1 Fixierung von Sporozoiten und Oozysten

Geräte und Material

- Waage (BP 310 P, Sartorius AG, Göttingen)
- Magnetrührer (MR 3001, Heidolph, Schwabach) und Magnete
- Mikroskop (Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar)
- Fluoreszenzkamera
- Flaschen (250 ml)
- Bechergläser (150 ml)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Einmalspritze (20 ml)
- Nuclepore® Track-etched Membranes (3 µm Porengröße, Whatman®, Dassel)
- Swin-Lok™ Filter Holder (25 mm, Whatman®, Dassel)
- Diagnostische Objektträger (12 Well, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig)
- frisch exzystierte Sporozoiten von *C. parvum*
- 10 %ige Paraformaldehyd (Pfa)-Lösung
- gepufferte Paraformaldehyd
Stammlösung in 1 x PBS verdünnt, Endkonzentration 4 % Paraformaldehyd
- Methanol
- 1 x PBS

Durchführung

Zur Immobilisierung von Parasitenstadien wurde die Suspension aus frisch exzystierten Sporozoiten, intakten Oozysten und leeren Oozystenhüllen in einer Konzentration von ca. 1000 Parasitenstadien/µl auf diagnostische Objektträger zu je 10 µl pro Well aufgetragen und 3 bis 4 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger für 10 min bei Raumtemperatur in der gepufferten Formaldehyd-Lösung inkubiert. Danach erfolgte dreimal ein Waschschrift in 1x PBS für 5 min. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

Zur Fixierung mit Methanol wurden die Objektträger nach dem Trocknen im letzten Schritt für 10 min in -20°C kaltem Methanol inkubiert, getrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Vor dieser Fixierung erfolgte die teilweise Reinigung der Sporozoiten von Oozysten und leeren Oozystenhüllen durch Filtration über eine Nuclepore® Track-etched Membran.

3.6.2 Fixierung von infizierten Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden entsprechend der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Methode angezüchtet, infiziert und bebrütet. Zuvor wurde in die leeren 24-Well-Zellkulturplatten am Boden jedes Wells ein autoklaviertes Glasplättchen (rund, 1 cm Durchmesser, Spezialanfertigung aus Deckgläschen, Hersteller unbekannt) eingebracht.

3 h, 24 h und 48 h p. i. wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Glasplättchen am Boden der Platten zur Fixierung für 10 min mit -20°C kaltem Methanol überschichtet. Anschließend wurden die 24-Well-Zellkulturplatten einschließlich der Glasplättchen getrocknet und bis zur Verwendung im Immunfluoreszenz-Antikörpertest bei -20°C aufbewahrt.

3.6.3 Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IFAT)

Geräte und Material

- Waage (BP 310 P, Sartorius AG, Göttingen)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Mikroskop (Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar)
- Kamera Nikon Digital sight DS-L1
- Fluoreszenzlampe ebq 100-isolated (Leistungselektronik Jena GmbH, Jena)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Diagnostische Objektträger (12 Well, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) mit fixierten Sporoziten
- Deckgläser (24 x 60 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Färbetrog aus Glas mit Deckel
- Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Triton X-100 (0,2 %ige Lösung in 1x PBS)
- Blockierungspuffer I
100 mM Glycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 1x PBS
- Blockierungspuffer II
2 % BSA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 1x PBS
- Antikörper-Inkubationspuffer
1 % BSA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 1x PBS und der Antikörper in der gewünschten Verdünnung

Tiere, Material, Methoden

- Testsera
Anti-*Cp*CDPK1-Antikörper aus der Immunisierung eines Kaninchens, welche in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 in Antikörper-Inkubationspuffer eingesetzt wurden.
- Konjugatantikörper
Fluoreszein (FITC) gekoppelter, affinitätsgereinigter Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L) (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100
- DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindoldihydrochlorid, AppliChem, Darmstadt)
Die Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml DAPI wurde 1:2000 in 1x PBS verdünnt, so dass die Endkonzentration 1 µg DAPI pro ml betrug.
- Evans Blue (Fluka, St.Gallen)
0,2 % ige Lösung in 1x PBS
- Einbettungsmittel Mowiol 4.88
Der Ansatz mit 80 ml PBS, 40 ml Glycerol, 2,4 g Propylgalat, 20 g Mowiol 4.88 wurde über Nacht unter Rühren homogen vermischt, 30 min zentrifugiert und der Überstand wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert.
- PBS (1x)

Durchführung

In einem indirekten Immunfluoreszenz-Antikörpertest sollte die Expression der *Cp*CDPK1 in Sporozoiten von *C. parvum* durch die spezifische Bindung des hergestellten Antikörpers an dieses Protein nachgewiesen werden. Infolge der Bindung eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers erfolgte die Detektion gebundenen Primärantikörpers. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen von Sporozoiten erfolgte eine Vorbehandlung der auf dem Objektträger fixierten Kryptosporidienstadien mit Methanol bzw. Triton X-100. Dazu wurde ein solcher Objektträger für 10 min bei -20°C mit Methanol inkubiert und ein weiterer Objektträger wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,2 %iger Triton X-100-Lösung behandelt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff in einfacher PBS bei Raumtemperatur. Alle angefertigten Objektträger mit fixierten Parasitenstadien wurden 10 min bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer I inkubiert, um Reaktivität freier Aldehydgruppen zu unterbinden. Dieser Schritt entfiel bei der Fixierung mit Methanol. Nach dem Waschen in 1x PBS erfolgte die Inkubation mit Blockierungspuffer II für 30 min bei Raumtemperatur, um unspezifische Proteinbindungsreaktionen zu verhindern. Die Objektträger wurden dreimal für jeweils 10 min in 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem im Inkubationspuffer verdünnten Anti-*Cp*CDPK1-Serum, zur Kontrolle der Spezifität einer Antikörperbindung wurden Verdünnungen des Präserums in gleicher Konzentration eingesetzt. Nach

dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Objektträger mit dem 1:100 in Antikörperinkubationspuffer verdünnten, FITC-markierten Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich enthielt der Ansatz 0,2 % Evans Blue zur Gegenfärbung. Nach dem Waschen in 1x PBS zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper erfolgte eine Färbung mit DAPI für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für 10 min in 1x PBS gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckelt und vor Licht geschützt bei 4°C gelagert.

Die Auswertung des IFAT erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop im Phasenkontrastmodus mit verschiedenen Filtern bei 630facher Vergrößerung. Mit der Kamera Nikon Digital sight DS-L1 wurden Aufnahmen im Durchlicht, Fluoreszenzlicht und mit verschiedenen Filtern je nach Färbungen angefertigt und als Bitmap-Dateien auf den PC übertragen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software Corel PhotoPaint und Corel Draw X4.

3.6.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Geräte und Material

- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- NAb™ Protein A/G Spin Kit, 0,2 ml (Thermo Scientific, Rockford, Cat-No: 89950)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Anti-CpCDPK1-Serum
- PBS (1x)

Durchführung

Die Affinitätsreinigung erfolgte gemäß der NAb™ Protein A/G Spin Kit-Anleitung. Die Aufreinigungssäule wurde zunächst für 1 min bei 5000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von 400 µl Bindepuffer und Durchmischen erfolgte die Equilibrierung der Aufreinigungssäule. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 5000 x g wurden 500 µl des Anti-CpCDPK1-Serums auf die Aufreinigungssäule aufgetragen und 10 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Ungebundene Komponenten wurden nun durch eine Zentrifugation für 1 min bei 5000 x g aus der Säule entfernt. Es erfolgte vier Mal ein Waschschriff mit 400 µl Bindepuffer mit jeweiliger einminütiger Zentrifugation bei 5000 x g. Ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 40 µl Neutralisationspuffer wurde unter die Aufreinigungssäule platziert und diese mit 400 µl IgG-Elutionspuffer präpariert und gut durchmischt. Im anschließenden Zentrifugationsschritt für 1 min bei 5000 x g wurde der gereinigte Antikörper eluiert.

3.7 Proteine

3.7.1 Restriktionsverdau, Ligation zum Doppelkonstrukt und Klonierung in einen Expressionsvektor

Die Zielsequenz war ein für ein etwa 9 kDa großes Protein kodierender Bereich der *cgd3_920* Sequenz von *C. parvum*. Dieser Bereich umfasste etwa 240 Basenpaare. Zur Erhöhung der Antigenität des Proteins wurde durch eine Ligation zweier 240 bp Fragmente der entsprechenden *C. parvum*-Gensequenz ein Doppelkonstrukt erstellt, welches anschließend in einen Expressionsvektor kloniert wurde. Damit entstand ein rekombinantes Protein von 18,7 kDa. Zu Beginn dieser Arbeit lag das Konstrukt bereits als Klon in *E.coli* M15 vor. Die hierzu erforderlichen Experimente (Restriktionsverdau, Kolonien-PCR, Ligation und Klonierung) wurden im Vorfeld dieser Dissertation im Institut für Parasitologie in Leipzig durchgeführt.

Die in Tabelle 8 aufgeführten Primer wurden in verschiedenen Kombinationen verwendet, um zwei Fragmente für die Ligation in einer PCR zu amplifizieren. Im ersten Ansatz wurden *Cgd_3920_K1_A1* und *Cgd_3920_K1_S1* eingesetzt, im zweiten Ansatz *Cgd_3920_K1_A2* und *Cgd_3920_K1_S2*. Als Template diente aus *C. parvum* isolierte DNA. Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 9 dargestellten Zeit- und Temperaturverlauf.

Tabelle 8: Primer für PCR für Restriktionsverdau und Ligation

Name des Primers	Sequenz 5'→3'
<i>Cgd_3920_K1_A1</i>	tatggtaccCATAACAATATTGTAC
<i>Cgd_3920_K1_A2</i>	aacaagcttCATACATAACAATATTGTACCT
<i>Cgd_3920_K1_S1</i>	ttaggatccATGGGAAATACTGCAGTAGG
<i>Cgd_3920_K1_S2</i>	aaaggtaccATGGGAAATACTGCAGTA

Tabelle 9: Temperatur- und Zeitverlauf der PCR

	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	30 sec	35
Annealing	52	30 sec	
Amplifikation	72	1 min	
Finale Amplifikation	72	5 min	1
Kühlung	4	∞	

Die beiden Fragmente, welche als Amplifikationsprodukte der PCR Reaktionen 1 bzw. 2 vorlagen, wurden mit Na-Acetat präzipitiert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau unter Verwendung des Restriktionsenzym Kpn I bei 37°C für 2 h. Die Produkte des Restiktionsverdaus wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 3.5.5 Darstellung von Nucleinsäuren im Agarosegel). Die 261 bp großen Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus den Agarosegelstücken erfolgte mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Hierbei wurde zu den Gelstücken im Verhältnis 1:3 ADB Puffer zugefügt. Die DNA wurde in 10 µl DEPC-Wasser eluiert. Die Ligation beider Fragmente erfolgte mit je 5 µl beider Fragmente und unter Zusatz von 2,5 U Ligase für 2,5 h bei Raumtemperatur. Das so gewonnene DNA Konstrukt wurde anschließend in einen pQE30 Vektor kloniert und zunächst mit einer Kolonien-PCR in XL-1 blue überprüft.

Der Vektor mit dem *CpCDPK1* (cgd3_920) Doppelkonstrukt wurde anschließend in *E.coli* M15 [pREP4] [pCodon+] kloniert.

3.7.2 Proteinexpression des NH₂-terminalen Peptids der *CpCDPK1* in *E. coli*

Geräte und Material

- Schüttelinkubator
- Zentrifuge Megafuge 2.0 R (Heraeus, Sepatech, Hanau)
- Erlenmeyerkolben (250 ml)
- LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Ampicillin-SL (50 mg/ml)
- Kanamycinsulfat (50 mg/ml)
- Chloramphenicol (20 mg/ ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- *E.coli* M15 [pQE, pREP 4, pcodon +]
- IPTG (100mM)

Durchführung

Die Proteinexpression erfolgte gemäß Protokoll 8 des QiaExpressionist™ Handbuches der Firma Qiagen, Hilden. Zuerst wurde ein Ansatz von 5 ml LB-Medium, welcher 200 µg/ml Ampicillin, 100 µg/ml Kanamycin und 20 µg/ml Chloramphenicol enthielt, mit *E. coli* M15 [pQE, pREP 4, pcodon +] beimpft und über Nacht bis zu einer optischen Dichte (OD)₆₀₀ von 2 im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet. Dieser wurde in einem weiteren Ansatz von 150 ml mit Antibiotika versetztem LB-Medium nochmals über Nacht im Schüttelinkubator bebrütet. Anschließend wurden 10 Erlenmeyerkolben mit je 240 ml LB-Medium, Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml) und Chloramphenicol (20 µg/ml) und 15 ml des 150 ml Ansatzes bis OD₆₀₀ von 0,8 im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet.

Anschließend wurde 1 mM IPTG zugegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Nach dreistündiger Proteinexpression im Schüttelinkubator bei 37°C wurden die Ansätze bei 4000 ×g für 15 min zentrifugiert und die Pellets im Zentrifugenbecher anschließend bei -80°C eingefroren.

3.7.3 Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus *E. coli*-Lysaten

Geräte und Material

- Waage (BP 310 P, Sartorius AG, Göttingen)
- Schüttelinkubator
- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Reaktionsgefäße
- Falconröhrchen (50 ml)
- Qiagen Polypropylen Column (5 ml, Cat No. 34964, Qiagen, Hilden)
- Puffer B

Puffer B enthielt 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl und 8 M Harnstoff in Aqua bidest. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 8,0 unter Verwendung von NaOH eingestellt.

- Waschpuffer
Es wurden 100 ml einer 20 mM Imidazolösung in Puffer B hergestellt.
- Elutionspuffer
Es wurden 10 ml einer 250 mM Imidazolösung in Puffer B hergestellt.
- Ni-NTA-Agarose (50%ige Agarosesuspension, Qiagen, Hilden)

Durchführung

Im ersten Schritt wurde das Gewicht der Pellets ermittelt und je Gramm Pellet 5 ml Puffer B zugefügt. Nach 15 min Inkubationszeit unter Schütteln erfolgte ein Gefrierschritt bei -80°C für 15 min und anschließend erneut eine Inkubation bei RT im Schüttelinkubator. Ein Eppendorfgesäß mit 2 ml des produzierten Lysates wurde als spätere Kontrolle entnommen und bei -20°C eingefroren. Die verbleibende Lysatmenge wurde gleichmäßig auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 16250 ×g für 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in zwei 50 ml Falconröhrchen aufgenommen.

Bei der Klonierung und Expression der rekombinanten Proteine wurden sechs Histidine an die Aminosäuresequenz des CpCDPK1-Moleküls angefügt. Nach dem Funktionsprinzip der Aufreinigung von 6 His-gekoppelten Proteinen bindet Stickstoff aus dem Imidazolring der Aminosäure Histidin an Ni-NTA-Chelate, welche wiederum an die Agarose-Matrix gebunden sind. Im Folgenden wurde zuerst die Agarose, welche als Kügelchen im Verhältnis 1:1 mit Ethanol gemischt vorlag, in der fünffachen Menge Puffer B äquilibriert. Das Sediment wurde mit 50 ml Puffer B versetzt, zu gleichen Teilen dem Lysat zugefügt und 1 h geschwenkt. Anschließend erfolgte die

Filtration des gesamten Gemisches über eine Polypropylen-Säule der Firma Qiagen, Hilden. Über dem in der Säule befindlichen Filter setzte sich eine Schicht aus Ni-NTA-Agarose mit über His-tag gebundenem Protein ab. Darüber wurde ein weiterer Filter in die Säule eingebracht. Die Säule wurde nun fünfmal mit je 50 ml Puffer B und dreimal mit je 30 ml Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte die Elution des über His-tag gebundenen Proteins in 7 Reaktionsgefäße mit je 550 µl des Imidazol-haltigen Elutionspuffers.

3.7.4 Dialyse

Geräte und Material

- Magnetrührer und Magnete
- Becherglas (500 ml)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Kunststoffclips
- Dialyseschlauch (Spectra/Por® Dialysis Membrane, 18 mm, MWCO 3,5 kDa, Spectrum Laboratories Inc., Los Angeles)
- 4 M Harnstofflösung (Harnstoff, pulverförmig, AppliChem, Darmstadt)
- 1 M Harnstofflösung (Harnstoff, pulverförmig, AppliChem, Darmstadt)
- 1 x PBS
- Aceton (mindestens 75 %)

Durchführung

Ausgewählte Proteinfraktionen des über His-tag gereinigten und in Elutionspuffer gelösten cgd3_920 Fragments wurden in einen Dialyseschlauch pipettiert. Pro 1 ml des Eluats wurde 1 cm Dialyseschlauch verwendet und mit 2 Kunststoffclips verschlossen, wobei oberhalb des Eluats eine mindestens 1 cm große Luftblase im Schlauch verblieb. Diese Vorrichtung wurde in ein Becherglas mit 300 ml 4 M Harnstofflösung verbracht und unter leichtem Rühren im Schwebezustand dialysiert. Nach 2 h wurde die 4 M Harnstofflösung durch 500 ml 1 M Harnstofflösung ersetzt und diese nach weiteren 3 h gegen 1 x PBS ausgetauscht. Der Ansatz verblieb über Nacht im Kühlschrank, um die Aktivität von Proteinasen aus dem Lysat von *E. coli* einzuschränken. Am Folgetag wurde der Dialyseschlauch nochmals für 2 h in 1 x PBS unter leichtem Rühren stehen gelassen. Die Präzipitation des Proteins erfolgte in 75 %igem Aceton bei -80°C für 1 h. Der Ansatz wurde 20 min bei 16250 ×g zentrifugiert. Das gereinigte Proteinfragment konnte nun zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet werden. Die Herstellung von polyklonalem Anti-CpCDPK1-Serum in Kaninchen erfolgte durch die Firma SeqLab, Göttingen.

3.7.5 Fraktionierte Fällung

Geräte und Material

- Fraktionssammler (BioRad, München)
- Peristaltische Pumpe (Typ: PA-SK 4, IKA-Labortechnik)
- Mini Prep Cell (BioRad, München)
- Stromquelle (Power Pack P25, Biometra, Göttingen)
- Elutionsfrit
- Gelsäule für Mini Prep Cell

Es wurden 10 ml eines 14 %igen Trenngels mit 2,8 ml Aqua bidest, 2,5 ml einer 1,5 M Tris-HCl-Lösung, 4,7 ml Rotiphorese Gel 30, 25 µl APS und 2,5 µl TEMED hergestellt. Das Trenngel wurde als 9,5 cm hohe Säule in die entsprechende Vorrichtung der Mini Prep Cell eingebracht, über Nacht auspolymerisiert und mit einer 1 cm hohen Säule eines 4 %igen Stacking-Gels überschichtet.

- SDS-Probenpuffer
- 8 M Harnstoffpuffer
- Laufpuffer

Durchführung

Im ersten Schritt wurden Gelsäule und Elutionsfrit in die Mini Prep Cell eingebaut und die entsprechenden Kammern jeweils mit Laufpuffer oder Harnstoffpuffer gefüllt. Als Probe diente ein ausgewähltes Eluat aus der Proteinaufreinigung (Kapitel 3.7.3). Dieses wurde im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer versetzt und die Gelsäule der Mini Prep Cell mit 300 µl des Ansatzes beladen. Das Trenngel wurde bei 200 V gefahren. Mit dem angeschlossenen Fraktionssammler wurden 73 Fraktionen gewonnen, wobei an der Schlauchpumpe die Geschwindigkeit 008 ausgewählt wurde und der Fraktionssammler alle 4 Minuten zur nächsten Position wechselte. Es erfolgte eine Methanol-Chloroform-Präzipitation mit jeweils 100 µl jeder 4. Fraktion, beginnend ab der siebenten Probe.

3.7.6 Methanol-Chloroform-Präzipitation

Geräte und Material

- Tischzentrifuge (Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Vortexer REAX top (Heidolph, Schwabach)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Reaktionsgefäße
- Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Chloroform
- Aqua bidest

Durchführung

Jeweils 100 µl der gesammelten Fraktionen wurden mit 400 µl Methanol gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform und anschließend 300 µl Aqua bidest, jeweils bei intensiver Mischung durch Vortexen. Die Proben wurden bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Die obere wasserlösliche Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, da das Protein im Bereich der Phasengrenzfläche gelöst war. Nach erneuter Zugabe von 400 µl Methanol erfolgte die Zentrifugation des Ansatzes bei 13000 rpm für 2 min. Der methanolhaltige Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 1x konzentriertem SDS-Puffer aufgenommen.

3.7.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Geräte und Material

- Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg)
- Stromquelle (Power Pack P25, Biometra, Göttingen)
- Elektrophoresekammer mit Glasplatten und Spacern
- Bechergläser
- Pipetten
- SDS-Probenpuffer
- Elektrophoresepuffer
- Polyacrylamidgel (13 %)
- Aqua bidest

Durchführung

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Das Gel bestand dabei aus zwei Abschnitten: einem Trenngel und einem darüber befindlichen, grobporigeren Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid. Für die erwartete Proteingröße von 19 kDa wurde ein 13 %iges und somit feinporigeres Trenngel (geeignet für Molekülgrößen zwischen 8 und 50 kDa) angesetzt, mit Aqua bidest überschichtet und 30 min auspolymerisiert. Nach Entfernung des Aqua bidest wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und zur Auspolymerisation 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer versetzt und kurz im Thermomixer bei 99°C erhitzt. Anschließend wurden jeweils 5 µl Probe je Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 15 mA für 3 h 30 min, wobei sich die Spannung proportional zum steigenden Widerstand im Gel von initial 80 V auf 120 V erhöhte. Zur Auswertung des Gels erfolgte die Färbung mit Coomassie Blau.

3.7.8 Coomassie Blau Färbung

Geräte und Material

- Wipptisch (LTF Labortechnik, Wasserburg)
- Kunststoffgefäße mit Deckel
- Glasrichter mit Haltevorrichtung
- Filterpapier
- Aktivkohle
- Rotiphorese® Blau R (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
0,05 % Coomassie brilliant blue mit 50 % Methanol, 10 % Essigsäure und 40 % Aqua dest.
- Entfärbebad
45 % Ethanol, 10 % Essigsäure und 45 % Aqua dest.

Durchführung

Die Färbung mit Coomassie Blau führt zu einer Fixierung von Proteinen, wobei basische Proteine stärker als saure Proteine gefärbt wurden. Das SDS-Gel (Kapitel 3.7.7) wurde hierzu vorsichtig von der Glasplatte gelöst und für 2 h in einem mit Rotiphorese® Blau R-Lösung gefüllten Kunststoffgefäß mit Deckel unter leichtem Schwenken gefärbt. Die Färbelösung konnte mehrfach verwendet werden. Die Entfärbung erfolgte für 2 bis 3 h im Entfärbebad. Dieses wurde durch Aktivkohle-Filtration aufbereitet und konnte somit ebenfalls mehrmals eingesetzt werden. Zur Ergebnisdokumentation wurde das gefärbte Gel eingescannt und im JPEG-Format gespeichert.

3.7.9 Immunoblot

Geräte und Material

- Trans Blot® (Powerlimit 50 W, Voltagelimit 25 VCD, BioRad, München)
- Electrophoresis Power Supply-EPS 301 (GE-Healthcare Bio-Sciences AB, Freiburg)
- Inkubationskammer mit Slots (Kunststoffplatte mit 8 gefrästen Vertiefungen)
- Wipptisch (LTF Labortechnik, Wasserburg)
- Folien-Schneidegerät (Typ ha605, Hawid Hans Widmaier GmbH, Berlin)
- Scanner und PC
- Glaspasteurpipette
- Hybond™-P PVDF-Transfer-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala)
- Blotter Papier (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala)
- Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

Tiere, Material, Methoden

- Transferpuffer (Kathodenpuffer)
Dieser Puffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10 % Methanol und wurde auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt.
- Ponceau S
Zur Herstellung einer 0,5 %igen Färbelösung wurden 0,5 g Ponceau S in 1 ml Essigsäure gelöst und mit Aqua bidest auf 100 ml Gesamtvolumen ergänzt.
- Blockierungslösung
500 µl Tween 20 (AppliChem, Darmstadt) wurden in 500 ml TBS gelöst.
Zusätzlich wurde eine 3 %ige BSA-Lösung aus 30 ml der Blockierungslösung mit 1 g Bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) hergestellt.
- Primärantikörper
Mit dem Anti-cgd3_920-Antikörper aus der Immunisierung eines Kaninchens wurde eine Arbeitslösung in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS, 0,1 % Tween 20 und 0,8 % BSA hergestellt.
- Sekundärantikörper
Peroxidase-Goat-anti-Rabbit-IgG (Dianova) diente als Sekundärantikörper und wurde in einer Arbeitslösung 1:5000 verdünnt in TBS, 0,1 % Tween 20 und 0,8 % BSA eingesetzt.
- Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 4-Chloro-1-Naphthol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
Eine Tablette (32 mg) wurde zur Herstellung einer Stammlösung in 10 ml Methanol aufgelöst. Zur Herstellung einer Arbeitslösung wurden zu 2 ml dieser Lösung 10 ml PBS und 10 µl H₂O₂ zugegeben.

Durchführung

Zuerst erfolgte ein Western Blot, um die Proteine vom SDS-Gel (Kapitel 3.7.7) auf eine Trägermembran zu transferieren. In einer anschließenden Immunreaktion wurde das so geblottete Antigen nachgewiesen. In einem ersten Schritt wurden die Blotter-Papiere und die PVDF-Membran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Anschließend wurde die PVDF-Membran 10 Sekunden in reines Methanol getaucht, danach für 5 min in Aqua dest. gelegt und im Anschluss gemeinsam mit dem vom Sammelgel getrennten SDS-Gel sowie den Blotter-Papieren 15 min in Transferpuffer äquilibriert.

Tiere, Material, Methoden

Auf beide Elektroden der Trans Blot® Semi-dry Transfer Cell Apparatur wurden wenige ml Transferpuffer gegeben. Danach wurden von der positiven Elektrode zur negativen hin 2 Blotter-Papiere, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und erneut 2 Blotterpapiere so gestapelt, dass die Ränder bündig abschlossen. Luftblasen wurden mit einer Glaspipette entfernt, welche mehrmals über den Stapel gerollt wurde. Schließlich wurde die negative Elektrode auf die Kontakte gesetzt und das Gerät somit verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Spannung von 15 V und einer Stromstärke von 100 mA für 45 min. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Blau (Kapitel 3.7.3.1) gefärbt, um den Erfolg der Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran zu prüfen.

Zur Immundetektion wurde die Membran für 10 min in Ponceau S Lösung gefärbt, um die geblotteten Proteinbanden darzustellen. Anschließend wurde das Bandenmuster jeder Probe mit einem Schneidegerät in jeweils zwei Streifen geschnitten. Alle Membranstreifen wurden über Nacht in TBS mit Tween 20 und 3 % BSA gelagert, wobei jeder in einem separaten Slot der Inkubationskammer lag. Die Streifen mit dem Markerbereich wurden aufbewahrt. Ein Streifen jeder Probe wurde 1 h bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper unter leichtem Schwenken inkubiert. Dann erfolgte zweimal ein 5minütiger Waschschrift in TBS mit Tween 20. Alle Membranstreifen wurden für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit dem Sekundärantikörper inkubiert und wiederum zweimal in TBS mit Tween 20 gewaschen. Anschließend erfolgte die Darstellung positiver Reaktionen durch eine Reaktion der Peroxidase des Sekundärantikörpers mit einer 4-Chloro-1-Naphthol-Lösung. Hierfür wurden alle Membranstreifen für 10 min in der angefertigten Arbeitslösung geschwenkt.

Nach dem Trocknen wurden die Membranstreifen auf einem Filterpapier angeordnet, die Markerstreifen hinzugefügt und der Immunoblot zur Ergebnisdokumentation eingescannt.

4 Ergebnisse

4.1 Phylogenie

4.1.1 Sequenzen und Domänenstruktur von CDPK-Orthologen im Genom von *C. parvum*

Ein Grundansatz für diese Arbeit war die von KIESCHNICK et al. (2001) in Toxoplasmen beschriebene Rolle von CDPK1 im Invasionsmechanismus des Parasiten sowie die Möglichkeit einer Beeinflussung der Funktion mit geeigneten Inhibitoren. Hohe Homologien zu CDPK anderer Apikomplexa gaben den Anreiz zur Suche nach Orthologen im Genom von *C. parvum*.

Hierzu wurde die Sequenz von *TgCDPK1* unter Verwendung der blastx Funktion des NCBI Blast[®]-Programms mit dem Genom von *C. parvum* abgeglichen. Dabei wurden zunächst elf Proteinsequenzen mit hoher Homologie gefunden. Für sechs dieser putativen CDPK ergab eine Analyse im SMART-Programm die Vorhersage einer funktionellen N-terminalen Serin/Threonin-Kinasedomäne sowie von vier EF-Hand-Motiven am C-terminalen Ende, weshalb diese für weiterführende Untersuchungen ausgewählt wurden.

4.1.2 Phylogenetischer Baum ausgewählter CDPK in Apicomplexa

Mit der Neighbor Joining Methode wurde ein phylogenetischer Baum erstellt (Abb. 2). Hierbei fand ein 10000 Replikate umfassender Bootstrap-Test der Phylogenie Anwendung. Die Sequenz der Kalzium/Kalmodulin-abhängigen Proteinkinase (MmCamk2B) der Maus diente als Outgroup.

Eine Übersicht der Sequenzen mit Quellenangaben ist im Anhang (Tabelle 12) dargestellt.

Zunächst wird deutlich, dass für jede *CpCDPK* ein entsprechendes Äquivalent von *TgCDPK* vorhanden ist. Die statistische Sicherheit der Knoten dieser hohen Sequenzhomologien beträgt über 95%. Auffallend ist eine frühe Abspaltung zu einem *CpCDPK1/CpCDPK3* Cluster mit den zugehörigen Homologen *TgCDPK1* und *TgCDPK3* sowie *PfCDPK1* und *PfCDPK4*. Ein CDPK6 Cluster separiert sich ebenfalls früh, gefolgt von einem einzelnen *TgCDPK4*-Ast und einem *CpCDPK4*-Ast. Eine größere Klade wird aus *CpCDPK2A*, *TgCDPK2B*, *PfCDPK2* gebildet, weiterhin wird eine CDPK5-Gruppe dieser Apikomplexa gebildet, wobei hier eine geringere phylogenetische Sicherheit der Knoten vorliegt.

Ergebnisse

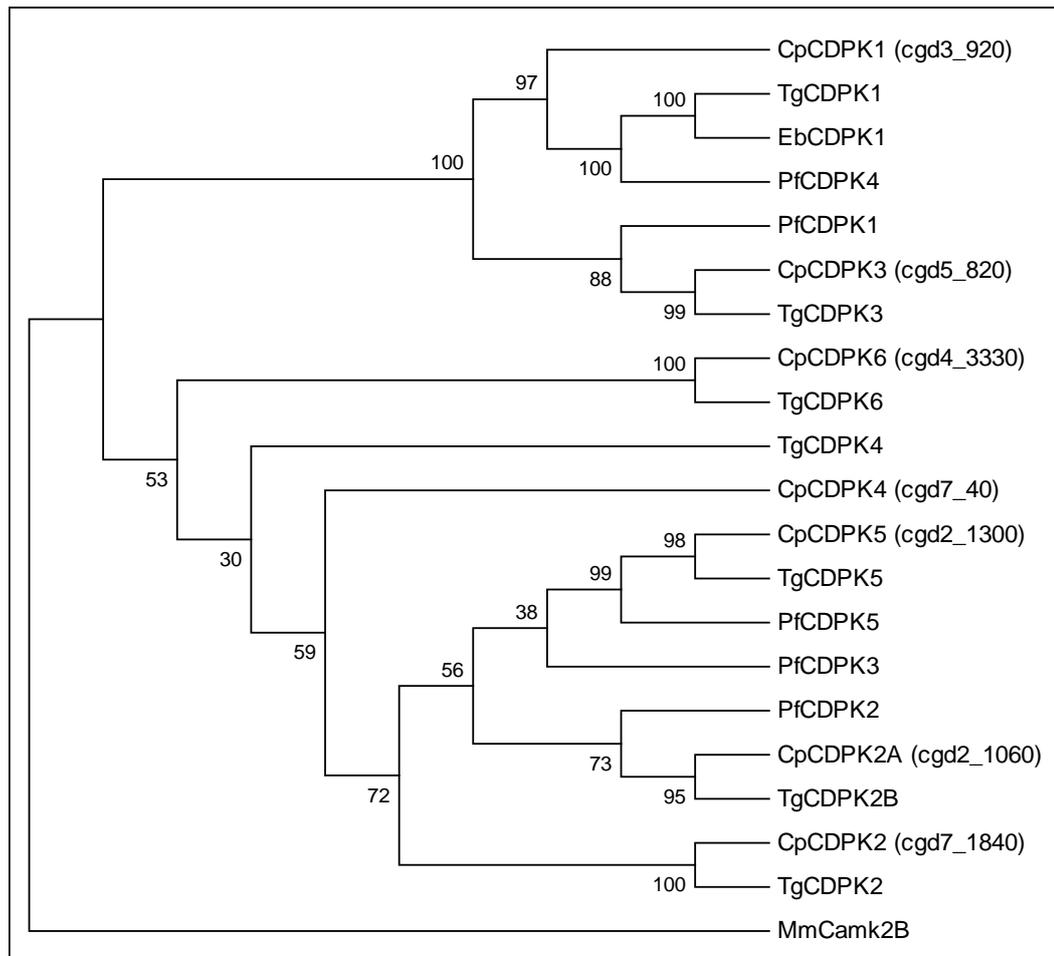


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum ausgewählter CDPK. Taxa: At, *Arabidopsis thaliana*; Cp, *C. parvum*; Eb, *Eimeria bovis*; Tg, *Toxoplasma gondii*; Pf, *Plasmodium falciparum*; als Outgroup wurde eine Säugerkinase von *Mus musculus* (MmCamk2B) gesetzt.

4.2 Domänenstruktur ausgewählter *Cp*CDPK

Die Aminosäuresequenzen sieben ausgewählter CDPK wurden mit dem SMART-Programm zur Charakterisierung der Domänenstruktur untersucht.

Die Grundstruktur einer klassischen CDPK besteht aus einer NH-terminalen, katalytisch aktiven Serin/Threonin-Kinasedomäne, gefolgt von einer autoinhibitorischen Verbindungsdomäne sowie vier kalziumbindenden EF-Hand-Motiven am C-terminalen Ende (HARPER et al. 2000). Sechs der untersuchten *Cp*CDPK entsprechen diesem Grundaufbau. *Cp*CDPK6 verfügt über zwei zusätzlich EF-Hände am NH-terminalen Ende. Eine siebente Kinase mit Homologie zu *Tg*CDPK, *Cp*CDPK4, besitzt nur zwei dieser EF-Hand-Motive C-terminal. Sie wurde in die folgenden Untersuchungen dieser Arbeit nicht näher einbezogen. Eine vergleichende Darstellung der Domänenstruktur der *Cp*CDPK unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl an Aminosäuren sowie der Position funktioneller Gruppen im Protein gibt Abb. 3.

Ergebnisse

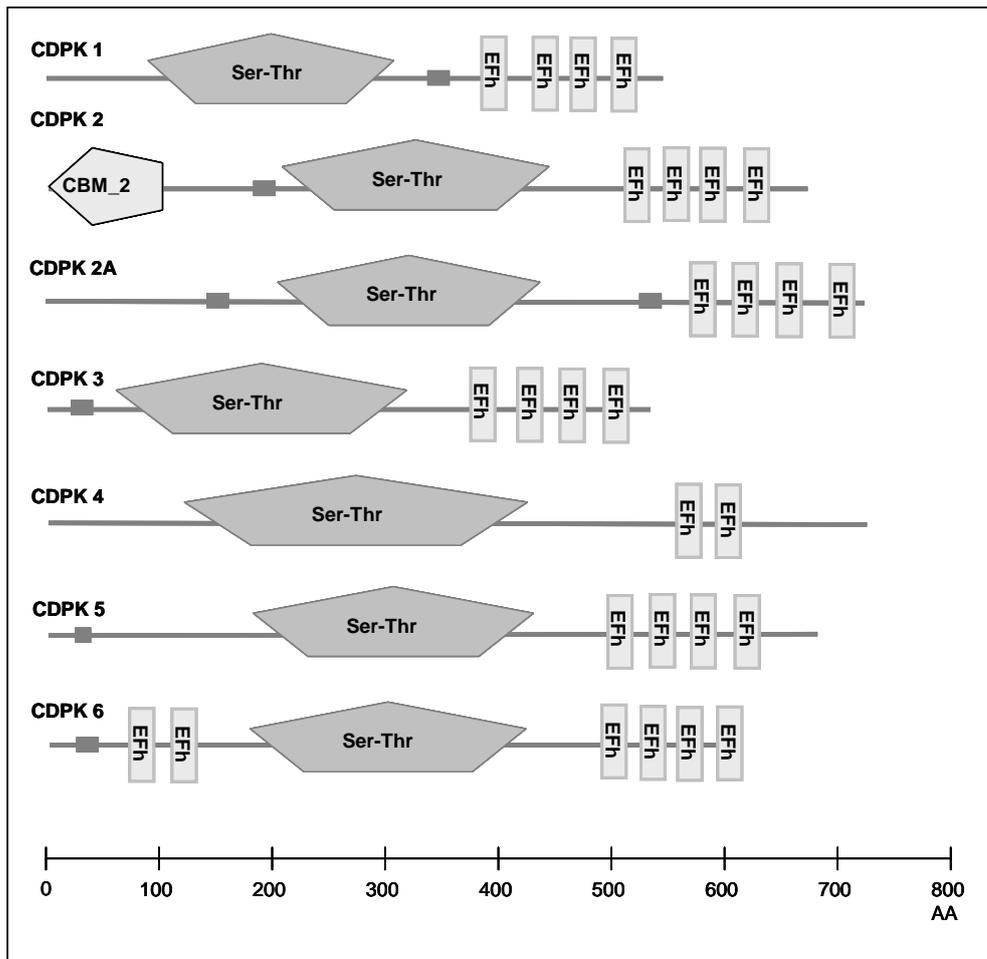


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Domänenstruktur von sieben *Cp*CDPK. Alle untersuchten *Cp*CDPK verfügen über eine funktionelle Serin-Threonin-Kinasedomäne und vier EF-Hand-Motive am C-terminalen Ende - mit Ausnahme von *Cp*CDPK4. Zusätzliche NH-terminale EF-Hand-Motive oder ein karbohydratbindendes Modul (CBM_2) treten ebenfalls auf. Als kleine, dunkelgrau ausgefüllte, rechteckige Kästchen dargestellte Bereiche kennzeichnen Regionen geringer Komplexität. Größen und Abstände der einzelnen Domänen sind anhand der Aminosäureanzahl (AA) in der unteren Leiste ablesbar.

4.3 Myristoylierung / Palmitoylierung

Die NH-terminalen Aminosäuresequenzen von sechs ausgewählten CDPK aus dem Genom von *C. parvum* wurden auf die Konsensussequenz für Myristoylierung nach BOLOGNA et al. (2004) basierend auf dem PROSITE-Motiv PDOC00008 (G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-P) überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt.

Ergebnisse

*Cp*CDPK1, *Cp*CDPK2A und *Cp*CDPK3 weisen ähnlich zu *Tg*CDPK1 ein oder mehrere Glycine am NH-terminalen Ende auf, welche als potentielle Bindungsstellen für Myristat dienen, sowie die entsprechenden an Position fünf erwünschten Aminosäuren. Das Vorkommen basischer Aminosäuren, z.B. Lysin (K) und Arginin (R), in einem Kluster unterstützt die Bindung von Myristat in diesen *Cp*CDPK ebenfalls. *Cp*CDPK2, *Cp*CDPK2A, *Cp*CDPK3 und *Cp*CDPK5 besitzen zusätzlich Cysteine in der Sequenz, welche mit Palmitat acyliert werden können.

<i>Tg</i> CDPK1	<u>MG</u> QQ <u>ES</u> TL <u>GGA</u> AGEPRSRGHAAGTSGGPGDHLHATPGMFV
<i>Cp</i> CDPK1	<u>MG</u> NTAV <u>GNTG</u> TRLRAPVDAVVNTTNKKAPVSEKPSQPQIP
<i>Cp</i> CDPK2	<u>MV</u> LISWE <u>CVC</u> DLTHPGQSLYVVGSHPRLGAWKITTEQEEN
<i>Cp</i> CDPK2A	<u>MG</u> Q <u>QNAL</u> <u>NGV</u> CSRRYEKDSIEINKNKEVRRKQSNKRGN
<i>Cp</i> CDPK3	<u>MG</u> <u>C</u> TP <u>SK</u> GKVEFTSRKRENEKEVEIKSVEIKNDLQATPG
<i>Cp</i> CDPK5	<u>ML</u> NIEQNADE <u>C</u> AKRVGAMMVPVLHNVTEECNIKAEKEIV
<i>Cp</i> CDPK6	<u>MS</u> SEYTDGDFVENEYDKYIDYANVGQLEDNQEQQYYDYG

Abbildung 4: NH₂-terminale Aminosäuresequenzen verschiedener CDPK und Markierung potentieller Stellen für Myristoylierung und Palmitoylierung. Start-Methionin und die in unmittelbarer Nähe befindlichen Glycine, welche als mögliche Anker für Myristat fungieren, sind fett und unterstrichen hervorgehoben. Die grün markierten Aminosäuren unterstützen diese Bindung. Rot unterlegte Cysteine stellen potentielle Bindungsstellen für Palmitat dar.

4.4 Ergebnisse der 3'RACE PCR (Transkription von *Cp*CDPK)

Es erfolgte zunächst eine 3'RACE-PCR, welche die 3'Enden der cDNA ohne Basenverlust amplifiziert. Die Produkte dieser PCR wurden als Template für die anschließende nPCR verwendet. Zunächst wurde cDNA frisch exzystierter Sporozoitien von *C. parvum* untersucht. Abb. 5 zeigt das nPCR Agarosegel. Produkte aller *Cp*CDPK wurden mit deutlichen Banden nachgewiesen. Des Weiteren erfolgten erste Untersuchungen mit 3 h, 21 h, 27 h, 43 h und 51 h nach der Infektion isoliertem Material infizierter HCT-8 Zellkulturen. Dabei wurden lediglich zu den Zeitpunkten 21 h,

Ergebnisse

43 h und 51 h Transkripte aller untersuchten *Cp*CDPK nachgewiesen. Es fiel auf, dass die aus den Sequenzen und Primerbindungsstellen errechneten PCR-Produkte zwischen 28 und 259 Basenpaare kleiner waren als die tatsächlich auf dem Gel sichtbaren PCR-Banden. Eine Sequenzierung der nPCR-Produkte bestätigte die Identität der jeweiligen *Cp*CDPK und damit die Ergebnisse der PCR. Bei den überzähligen Basenpaaren handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die 3'untranslatierte Region (3'UTR).

Diese Ergebnisse konnten in einer zweiten 3'RACE-PCR und nPCR mit neu gewonnenem Material weiterer Zeitpunkte nach der Infektion bestätigt werden (siehe Tabelle 10). Während 3-6 h p. i. lediglich schwache Banden darstellbar waren, wurde 24 h und 40 h p. i. eine deutlichere Expression mit starken Banden beobachtet. 44 h p. i. waren kaum Transkripte vorhanden. Im Gegensatz dazu waren 50 h und 54 h p. i. große Mengen PCR-Produkt nachweisbar. Lediglich *Cp*CDPK1 wurde über alle Zeitpunkte mehr oder weniger stark transkribiert. Die Länge der 3'-UTR Bereiche entsprach den im vorangegangenen Versuch erhobenen Daten (siehe Tabelle 11).

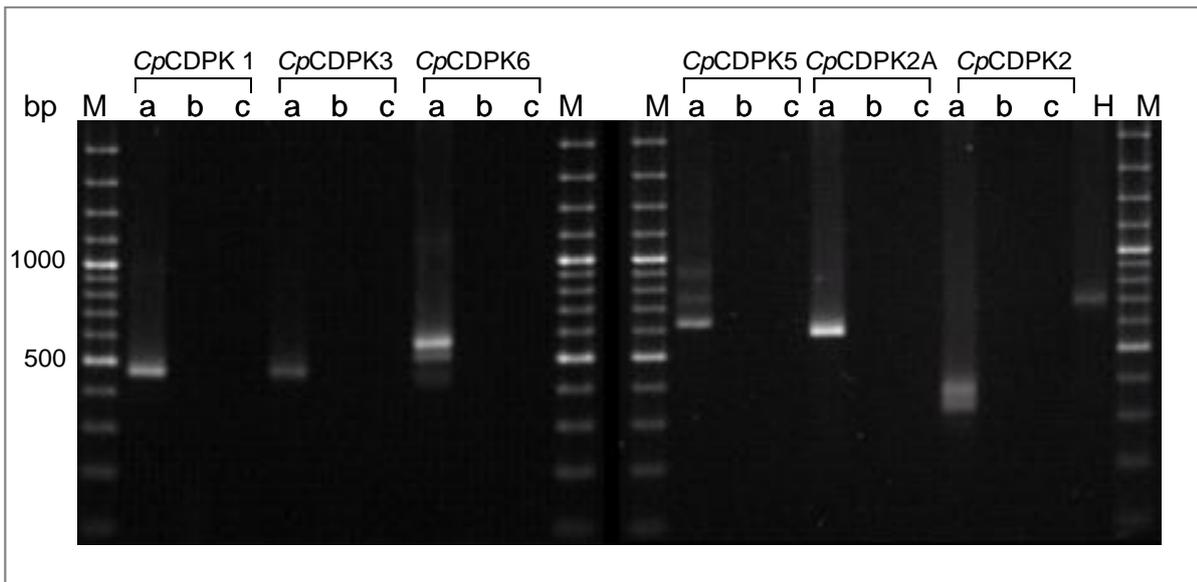


Abbildung 5: nPCR zum Nachweis ausgewählter *Cp*CDPK mit cDNA aus Sporozoiten von *C. parvum*. (M) Marker; (H) HSP70 als Positivkontrolle; die Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben, dabei erfolgte zu jeder Probe ein Ansatz mit (a) und ohne Reverse Transkriptase (b). DEPC-Wasser diente als weitere Negativkontrolle (c).

Ergebnisse

Tabelle 10: Nachweis von Transkripten sechs ausgewählter CpCDPK in der nPCR zu ausgewählten Zeitpunkten zwischen 3 h und 54 h p. i.

Kinase	Zeitpunkt nach der Infektion (h)*														uninf. HCT-8
	3	6	12	16	20	24	26	30	36	40	44	48	50	54	
<i>CpCDPK1</i>	(+)	(+)	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>CpCDPK2</i>	(+)	-	-	-	+	+	(+)	+	+	+	(+)	+	+	(+)	-
<i>CpCDPK2A</i>	+	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>CpCDPK3</i>	(+)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>CpCDPK5</i>	-	-	+	-	(+)	+	+	+	-	+	(+)	+	+	(+)	-
<i>CpCDPK6</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	(+)	(+)	(+)	-
Positivkontrolle (<i>CpHSP70</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Positivkontrolle (hGAPDH)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*starke Banden sind mit einem +, schwache mit einem (+) gekennzeichnet; - bedeutet, dass keine PCR-Produkte nachweisbar waren. Grau unterlegt sind Zeitpunkte, zu denen Transkripte aller sechs Kinasen nachgewiesen wurden.

Tabelle 11: Vergleich erwarteter und tatsächlich nachweisbarer PCR-Produkte und daraus ermittelter 3'UTR-Bereiche von sechs *CpCDPK*

Kinase	erwartetes Produkt (bp)	PCR-Produkt (bp)	3'UTR (bp)
<i>CpCDPK1</i>	241	500	259
<i>CpCDPK2</i>	193	340	147
<i>CpCDPK2A</i>	342	600	258
<i>CpCDPK3</i>	395	490	95
<i>CpCDPK5</i>	575	650	75
<i>CpCDPK6</i>	444	520	76
Positivkontrolle (<i>CpHSP70</i>)	665	720	55
Positivkontrolle (hGAPDH)	522	550	28

Ergebnisse

4.5 Klonierung, Proteingewinnung und Antikörperherstellung

Aufgrund der phylogenetisch hohen Homologie zur intensiver erforschten *Tg*CDPK1 sowie des Nachweises von Transkripten der *Cp*CDPK1 (*cgd3_920*) über alle Zeiträume in der *in vitro* Kultur wurde *Cp*CDPK1 für nähere Untersuchungen ausgewählt. Die Zielsequenz war ein für ein etwa 9 kDa großes Protein kodierender Bereich der *cgd3_920* Sequenz von *C. parvum*. Zur Erhöhung der Antigenität des Proteins wurde durch eine Ligation zweier 240 bp Fragmente der entsprechenden *C. parvum*-Gensequenz ein Doppelkonstrukt erstellt, welches anschließend in einen Expressionsvektor kloniert wurde. Damit entstand ein rekombinantes Protein von 18,7 kDa. Zu Beginn dieser Arbeit lag das Konstrukt bereits als Klon in *E. coli* M15 vor.

Nach Proteinexpression in *E. coli* M15 wurde das aufgereinigte Protein (Abb. 6) zur Immunisierung eines Kaninchens (SEQLAB, Göttingen, Deutschland) verwendet.

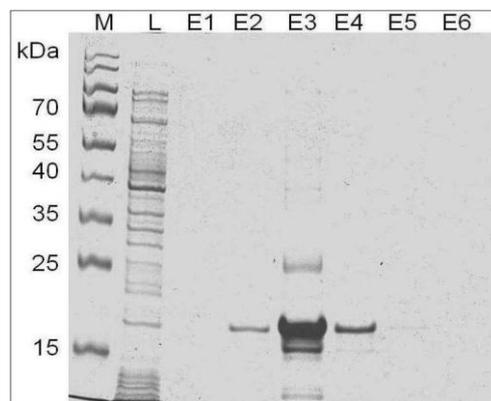


Abbildung 6: Aufreinigung des exprimierten *Cp*CDPK1-Konstruktes mittels SDS-PAGE im 12%igen Polyacrylamid-Gel und Färbung mit Coomassie brilliant blue. (M) Marker; (L) *E. coli* M15 Lysat; (E1-E6) eluierte Fraktionen. Für die Immunisierung wurde Eluat 4 verwendet.

4.6 Ergebnisse des Immunoblot

4.6.1 Reaktion des Anti-*Cp*CDPK1-Serum mit rekombinantem Protein

Zunächst wurde rekombinantes Protein aus *E. coli* M15 Lysat sowie zur Immunisierung eingesetztes, aufgereinigtes Eluat mittels SDS-PAGE in 13%igen Gelen aufgetrennt. Nach dem Blotten auf PVDF-Membranen wurden jeweils zwei Membranstreifen jeder Probe geschnitten und in Blockierungslösung, Antikörperverdünnungen sowie Entwicklungslösung inkubiert. Als Sekundärantikörper diente kommerzielles Peroxidase-gekoppeltes Goat-anti-Rabbit-IG-Serum,

Ergebnisse

welches 1:5000 verdünnt verwendet wurde. Um Kreuzimmunität des Sekundärantikörpers auszuschließen, erfolgte die Inkubation jeweils eines Streifens nur mit Sekundärantikörper. Hierbei waren keine Banden sichtbar. Das aus immunisierten Kaninchen gewonnene Anti-*Cp*CDPK1-Serum reagierte in einer Verdünnung von 1:1000 stark mit rekombinantem Protein aus *E. coli* M15-Lysat sowie mit zur Immunisierung eingesetztem Eluat (Abb. 7). Eine deutliche Bande von 18 kDa weist auf eine spezifische Bindung des Antikörpers hin, die Immunisierung war somit erfolgreich.

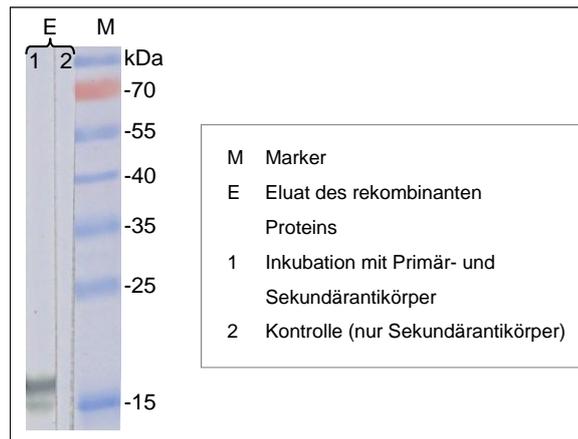


Abbildung 7: Immunoblot des Anti-*Cp*CDPK1-Serums (Primärantikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 mit zur Immunisierung eines Kaninchens verwendetem Eluat. Kreuzreaktionen des Peroxidase-gekoppelten Konjugatantikörpers (Sekundärantikörper) fanden nicht statt. Es war eine deutliche Bande von ca. 18 kDa sichtbar, welche dem zur Immunisierung verwendeten Antigen entsprach.

4.6.2 Reaktion des Anti-*Cp*CDPK1-Serums mit Antigen aus Entwicklungsstadien von *C. parvum* und infizierten Zellkulturen

Das Anti-*Cp*CDPK1-Serum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zum Nachweis von Antigen in Sporozoitenextrakten und infizierten HCT-8 Zellkulturen verwendet. Wie in Abb. 8 dargestellt, war in Extrakten aus frisch exzystierten Sporozoiten eine Bande bei 56 kDa detektierbar. Das kalkulierte Molekulargewicht für *Cp*CDPK1 betrug 55,72 kDa, daher war von einer spezifischen Reaktion des Antikörpers mit *Cp*CDPK1 auszugehen. Trotz zahlreicher Versuche gelang der Nachweis von *Cp*CDPK1-Antigen in Isolaten aus infizierten Zellkulturen nicht.

Ergebnisse

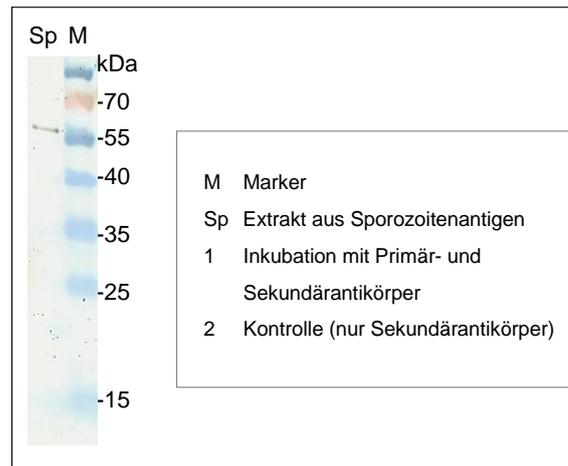


Abbildung 8: Immunoblot des Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers (Primärantikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 mit Sporozoitenextrakt. Eine klare Bande im Bereich 56 kDa verdeutlichte die spezifische Bindung des Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers an *Cp*CDPK1-Protein aus Sporozoitenextrakten.

4.7 Ergebnisse der Immunofluoreszenzuntersuchungen

Zum spezifischen Nachweis der *Cp*CDPK1 in verschiedenen Stadien von *C. parvum* wurde der Anti-CDPK1-Antikörper nativ aus dem Kaninchenserum sowie affinitätsgereinigt eingesetzt. Alle Untersuchungen erfolgten mit den Serumverdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000. Im Immunoblot wurde ein 56 kDa großes Protein in Extrakten von Suspensionen aus Sporozoiten und Oozysten erkannt, welches dem theoretisch erwarteten entspricht. Daher war von einer spezifischen Bindung des Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers auszugehen.

4.7.1 *Cp*CDPK1 in Sporozoiten und Oozystensuspensionen

Im Immunofluoreszenztest von auf speziellen Glasobjektträgern fixierten Sporozoiten erkannte der Antikörper Strukturen, welche sich nicht mehr als intakte Parasiten abgrenzen ließen (Abb. 9). Durch Vergleiche mit intakten Sporozoiten sowie Überlagerungen der Nativbilder mit DAPI-Färbungen konnten diese Strukturen als Kerne, teilweise mit 2 kondensierten Regionen, und je eine weiter apikal gelegene Struktur angesprochen werden. Eine genauere Differenzierung war aufgrund der technischen Grenzen der verwendeten Visualisierungsgeräte/-software nicht möglich.

Bei allen drei getesteten Fixierungsmethoden, Paraformaldehyd/Glutaraldehyd, Methanol sowie Triton X100, konnten entsprechende Fluoreszenzmuster beobachtet werden, daher wird im Folgenden auf eine vergleichende Darstellung verzichtet.

Ergebnisse

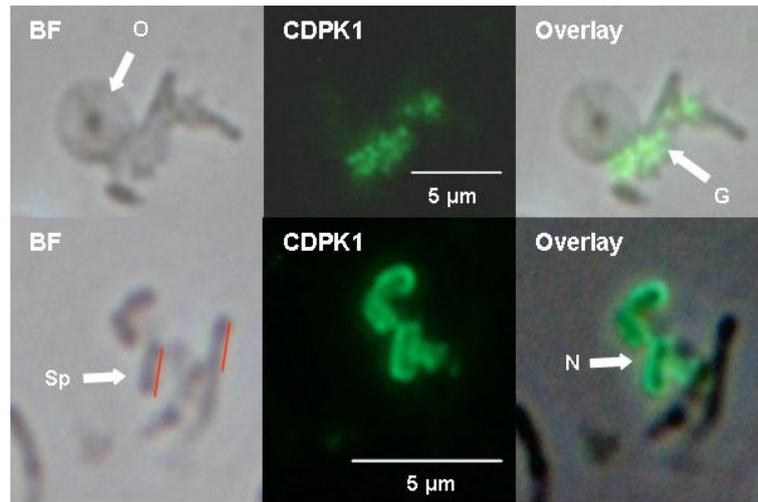


Abbildung 9: Bindung des Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers in einer Serumverdünnung von 1:100 mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Sporozoiten von *C. parvum*; Pfeile: (O) leere Oozystenhülle mit zentralem Restkörperchen; (G) granuläre Strukturen im Bereich der teils zerstörten Sporozoiten; (Sp) Reste eines Sporozoiten mit Kern im unteren Bereich, umliegende Strukturen nicht mehr erkennbar; rote Linien: Vergleich der Strukturen mit intaktem Sporozoiten; (N) spezifische Fluoreszenz in Kernnähe sowie apikalem Anteil der Sporozoitenfragmente.

4.7.2 Infizierte Zellkulturen

Um die *Cp*CDPK1 in verschiedenen Stadien von *C. parvum* nachzuweisen, wurden HCT-8 Zellkulturen in 24-Well-Platten auf am Boden befindlichen Glasplättchen mit dem Parasiten infiziert und nach 3 h, 24 h und 48 h Methanol-fixiert. Der Antikörper wurde in Serumverdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 eingesetzt. In Abbildung 10 und 11 sind die Fluoreszenzen der fixierten Zellkulturen nach Inkubation mit Anti-*Cp*CDPK1-Serum sowie DAPI-Färbung zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h dargestellt. Acht in der DAPI-Färbung erkennbare Kerne zwischen den Zellkernen der Wirtszellen zum Zeitpunkt 24 h p. i. erlauben die Identifikation der Strukturen als Meront Typ I mit Merozoiten I. Jeder Merozoit weist eine deutliche Fluoreszenz auf. 48 h p. i. können Meronten Typ II mit jeweils vier fluoreszierenden Merozoiten dargestellt werden.

Ergebnisse

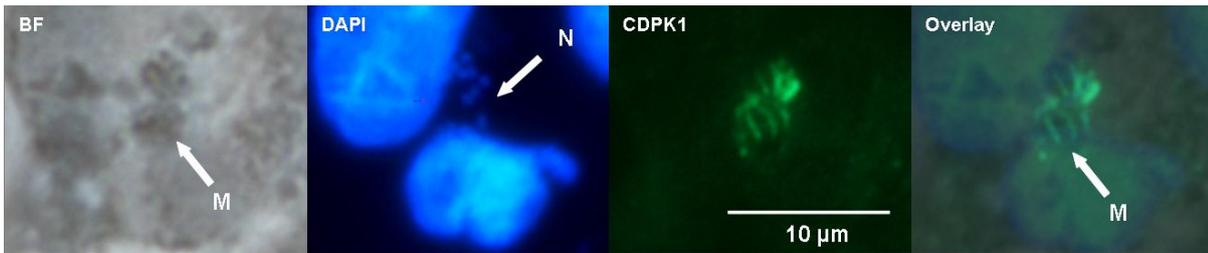


Abbildung 10: Bindung des Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers in einer Serumverdünnung von 1:10 in Methanol-fixierten Zellkulturen 24 h p. i.; Pfeile: (M) Meront I mit acht Merozoiten; (N) Acht Nuclei im Bereich des Meronten I.

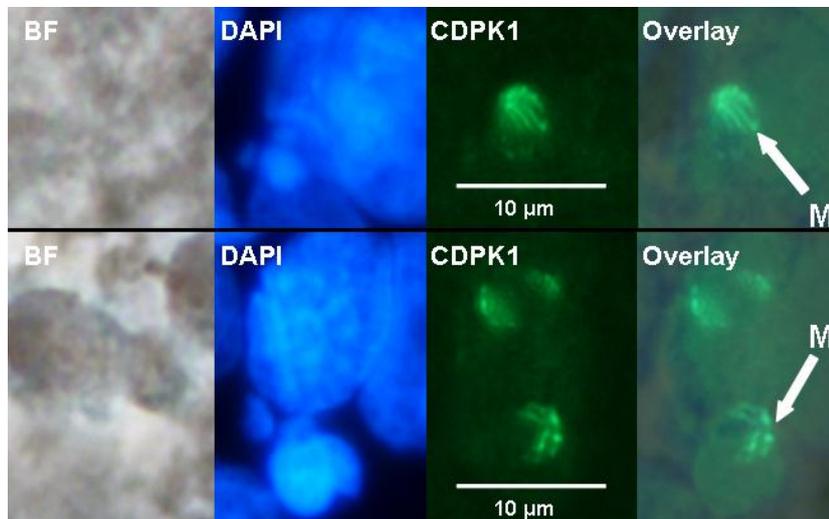


Abbildung 11: Bindung des Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers in einer Serumverdünnung von 1:100 in Methanol-fixierten Zellkulturen 48 h p. i.; Pfeile: (M) Meront II mit vier deutlich sichtbaren Merozoiten im Immunfluoreszenzbild und der Überlagerung.

4.7.3 Affinitätsgereinigtes Antikörperserum

Um die Spezifität des Anti-*Cp*CDPK1-Serums zu erhöhen, erfolgte eine Affinitätsreinigung und im Anschluss die Wiederholung des Immunfluoreszenzversuches. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 bis 14 dargestellt. Da HCT-8 Zellen stets in Haufen anwachsen, war eine Vereinzelung der Wirtszellen zur besseren Darstellung schwer möglich, wurde jedoch angestrebt. Abb. 12 zeigt im Nativbild 3 h p. i. einen Trophozoiten innerhalb der Zytoplasmaausläufer einer HCT-8 Zelle mit beginnender Knospung, gut sichtbar an zwei intakten Kernen sowie einem in Teilung befindlichen Nukleus. Die ringförmige Fluoreszenz entspricht dem Bereich der parasitophoren Vakuole.

Ergebnisse

Wie exemplarisch in Abb. 13 dargestellt, konnten 24 h p. i. fluoreszierende Merozoiten in Meronten Typ I beobachtet werden. Die Kerne sind in der DAPI-Färbung sichtbar. Im Gegensatz zu Abb. 10 sind die Fluoreszenzen punktförmig und erscheinen auf bestimmte Bereiche der Merozoiten konzentriert. In Abb. 14 sind punktförmig fluoreszierende Strukturen dargestellt, die sich von einem Zentrum kometenschweifartig entfernen. Derartige ausschwärmende Gebilde wurden zum Zeitpunkt 48 h p. i. mehrfach beobachtet. Eine Zuordnung von Kernen in der DAPI-Färbung oder eine Abgrenzung im Nativbild gelang nicht.

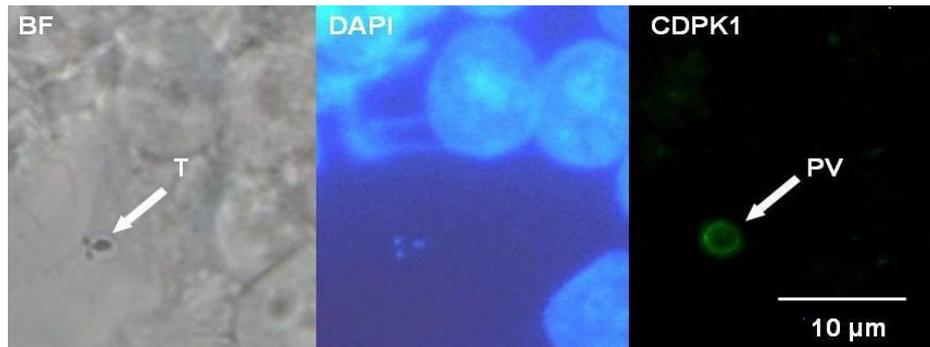


Abbildung 12: Bindung des affinitätsgereinigten Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers in einer Serumverdünnung von 1:10 in Methanol-fixierten Zellkulturen 3 h p. i.; Pfeile: (T) Trophozoit mit beginnender Teilung der Merozoiten; (PV) Fluoreszenz überwiegend im Bereich der parasitophoren Vakuole.

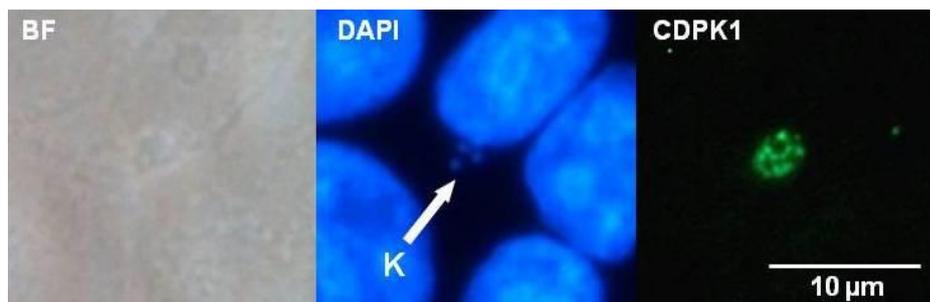


Abbildung 13: Bindung des affinitätsgereinigten Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers in einer Serumverdünnung von 1:100 in Methanol-fixierten Zellkulturen 24 h p. i.; Pfeil: (K) ringförmig angeordnete Kerne während der Reifung der Merozoiten im Meront I.

Ergebnisse

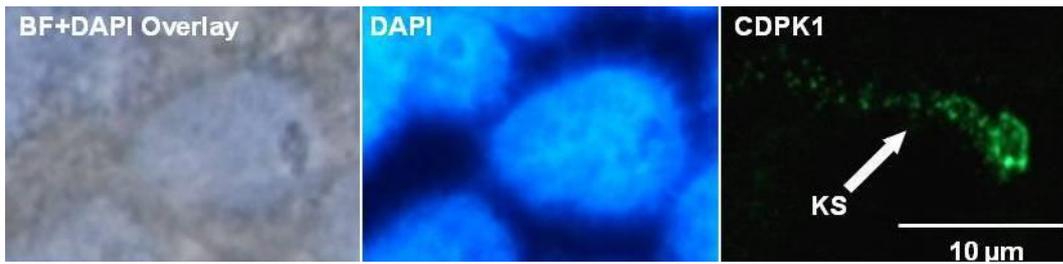


Abbildung 14: Bindung des affinitätsgereinigten Anti-*Cp*CDPK1-Antikörpers in einer Serumverdünnung von 1:100 in Methanol-fixierten Zellkulturen 48 h p. i. (KS) kometenschweifartige Immunfluoreszenzpunkte ausgehend von einem Zentrum mit ringförmiger Anordnung.

4.8 Ergebnisse des *In-vitro*-Assays mit Anti-*Cp*CDPK1-Serum

Aus *C. parvum* infizierten HCT-8 Zellkulturen mit Zusatz von Anti-*Cp*CDPK1-Antikörperhaltigem Serum zum Wachstumsmedium in Verdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100 sowie 1:500 wurde zu den Zeitpunkten 3 h, 24 h und 48 h Material gewonnen. Dabei wurden drei Versuche mit je vier Wells pro Zeitpunkt und Konzentration ($n = 12$) und drei Wells je Versuch für die unbehandelte Kontrolle ($n = 9$) ausgewertet. Die daraus isolierte DNA wurde in technischen Triplikaten mit einer RT-PCR basierend auf *Cp*HSP70 unter Verwendung eines Plasmidstandards absolut quantifiziert.

Die Daten wurden im IBM SPSS Statistics[®] 22-Programm ausgewertet. Die Grundgesamtheiten waren bei keinen der drei Isolationszeitpunkte normal verteilt (Kolmogorow-Smirnow-Test), deshalb fand im Anschluss der Kruskal-Wallis-Test Anwendung. Für die Zeitpunkte 3 h, 24 h sowie 48 h p. i. war die Nullhypothese abzulehnen. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden jeweils die vier Antikörperverdünnungen gegen die unbehandelte, infizierte Kontrolle geprüft, bei Werten $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt.

Der Mann-Whitney-U-Test ergab für den Zeitpunkt 3 h p. i. keine signifikanten Unterschiede zwischen den Antikörperverdünnungen und der Kontrollgruppe. Eine Tendenz zur Reduktion von *C. parvum*-DNA in behandelten Gruppen kann jedoch für die Serumverdünnung 1:10 mit $p = 0,111$ angenommen werden (Abbildung 15).

Für den Zeitpunkt 24 h p. i. lagen mit $p = 0,034$ sowie $p = 0,028$ statistisch signifikante Unterschiede der Anti-*Cp*CDPK1-Verdünnung 1:50 und 1:500 zur unbehandelten Kontrolle vor. In den Isolaten der mit Antikörperverdünnung 1:10 versetzten Wells zeigte sich eine deutliche Tendenz ($p = 0,058$) zur Reduktion der DNA-Menge von *C. parvum* (Abbildung 16).

Ergebnisse

Die Ergebnisse des Zeitpunktes 48 h p. i. sind in Abb. 17 dargestellt. Die Isolate mit Anti-*Cp*CDPK1-Verdünnungen 1:10 sowie 1:50 weisen hoch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen auf ($p = 0,000$), die Verdünnung 1:100 zeigt mit $p = 0,058$ eine deutliche Tendenz zur Reduktion der Menge an *C. parvum* DNA in den entsprechend inkubierten Kulturen.

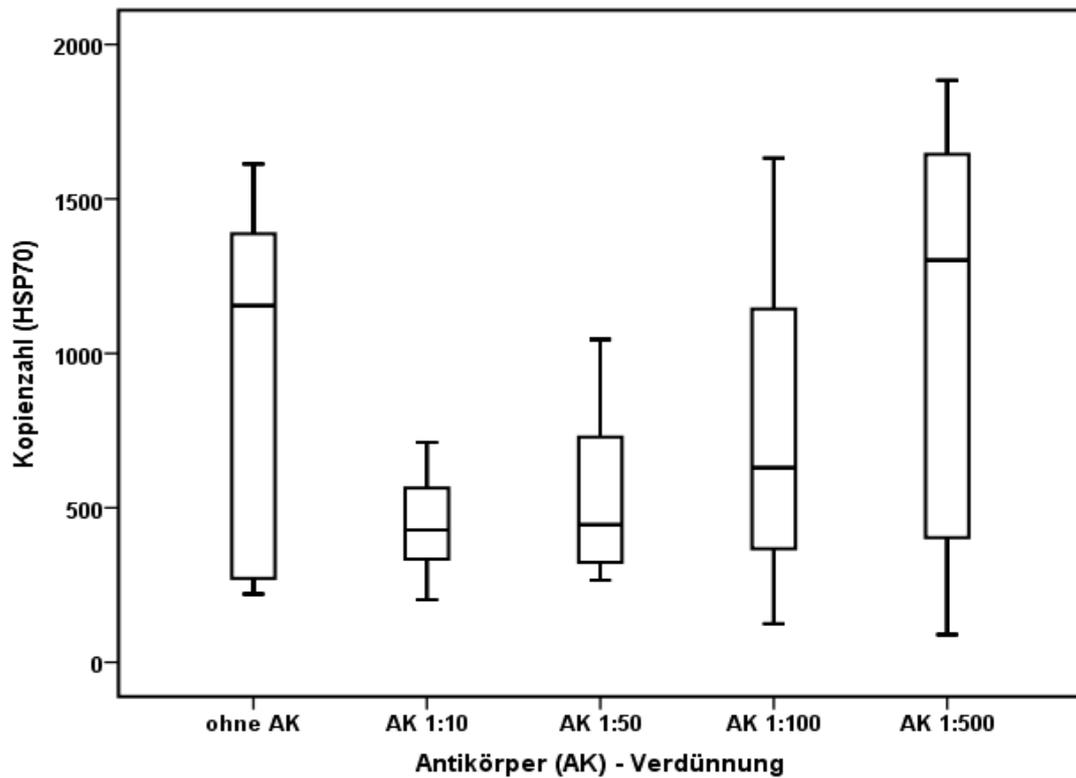


Abbildung 15: Box-Plot Darstellung der in einer auf *Cp*HSP70 basierenden RT-PCR quantifizierten DNA-Menge in Abhängigkeit zur Antikörperverdünnung im *In-vitro*-Assay mit Anti-*Cp*CDPK1-Serum 3 h p. i. Tendenziell ist eine Reduktion der Anzahl von HSP70-DNA-Kopien in den Gruppen mit Antikörperzusatz 1:10, 1:50 und 1:100 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Es liegen jedoch keine statistischen Signifikanzen vor.

Ergebnisse

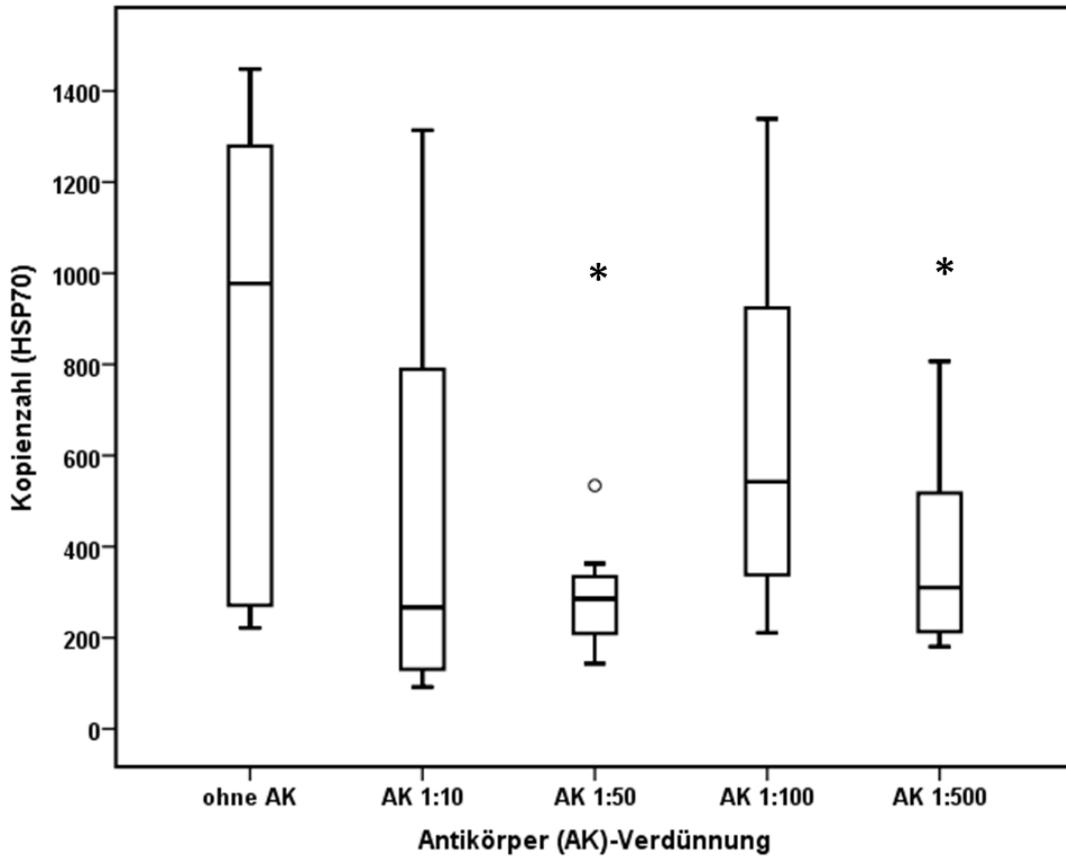


Abbildung 16: Box-Plot Darstellung der in einer auf *CpHSP70* basierenden RT-PCR quantifizierten DNA-Menge in Abhängigkeit zur Antikörperverdünnung im *In-vitro*-Assay mit Anti-*CpCDPK1*-Serum 24 h p. i. Eine statistisch signifikante Reduktion der Transkription von *C. parvum* im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle wurde durch Zusatz von Anti-*CpCDPK1*-Antikörper zum Zellkulturmedium in einer Konzentration von 1:50 und 1:500 erreicht.

Ergebnisse

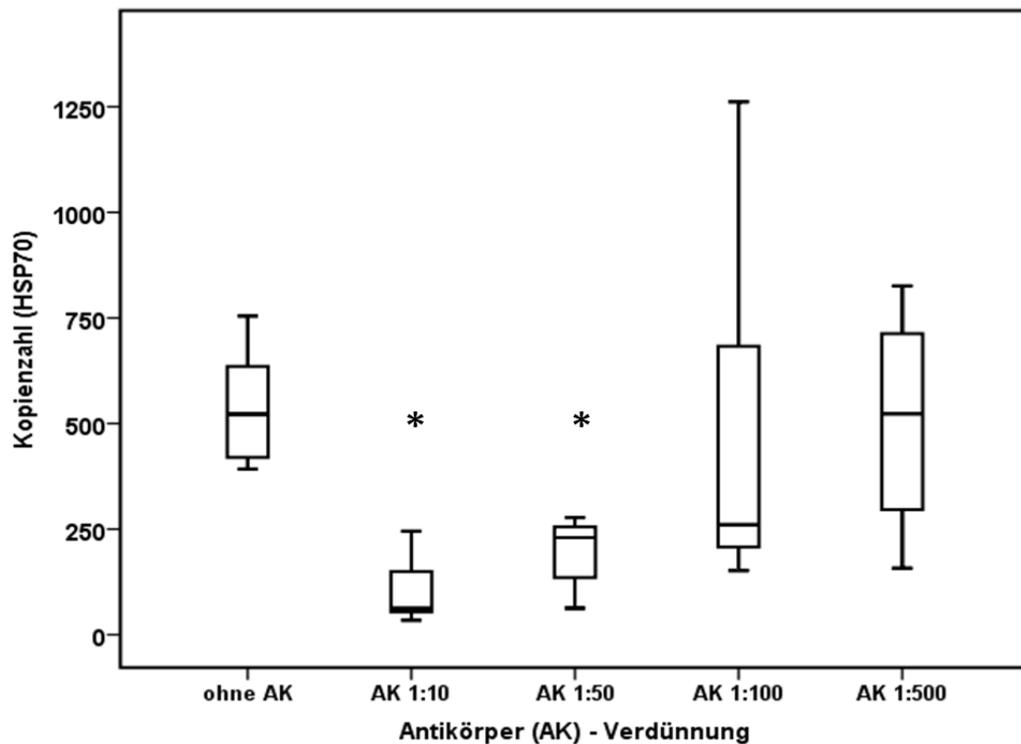


Abbildung 17: Box-Plot Darstellung der in einer auf *CpHSP70* basierenden RT-PCR quantifizierten DNA-Menge in Abhängigkeit zur Antikörperverdünnung im *In-vitro*-Assay mit Anti-*CpCDPK1*-Serum 48 h p. i. Eine statistisch signifikante Reduktion der Transkription von *C. parvum* im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle wurde durch Zusatz von Anti-*CpCDPK1*-Antikörper zum Zellkulturmedium in einer Konzentration von 1:10 und 1:50 erreicht.

4.9 Ergebnisse der RT-PCR

Aus mit *C. parvum* infizierten Zellkulturen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Verwendung von Trizol® ermöglichte die Gewinnung von RNA als auch DNA aus einer Probe und gewährleistete eine hohe Reinheit der RNA. Zusätzlich wurde ein DNase-Verdau der RNA-Proben vor der Reversen Transkription durchgeführt. Nach Einstellen der cDNA Konzentration erfolgte die RT-PCR mit spezifischen Primern und Taq-Man-Sonden für die *CpCDPK1* sowie *CpHSP70*. Die von SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) veröffentlichte Methode wurde für eine relative Quantifizierung weiterentwickelt. Die Auswertung erfolgte mit der MXpro® Software von Stratagene. Als Normalizer wurde cDNA von *CpHSP70* verwendet, einem Housekeeping-Gen, für welches eine konstante Expression angenommen wird. Als Kalibrator diente die Probe 3 h p. i. Das Programm verwendet die $\Delta\Delta$ -Ct-Methode zur relativen Quantifizierung, die Verwendung der uninfizierten HCT-8-Zellen als Kalibrator war daher aufgrund des Verbots der Division durch Null

Ergebnisse

nicht möglich. Datensätze waren nur bei spezieller, über alle Läufe hinweg identischer Plattenbelegung auswertbar. Daher konnten nur zwei Versuche in die Auswertung mit diesem Programm einbezogen werden (Anhang Tabelle 16 und 17). Die Versuche lieferten Daten, die für ein sich tendenziell wiederholendes Expressionsmuster sprachen, wie in Abb. 18 und 19 dargestellt.

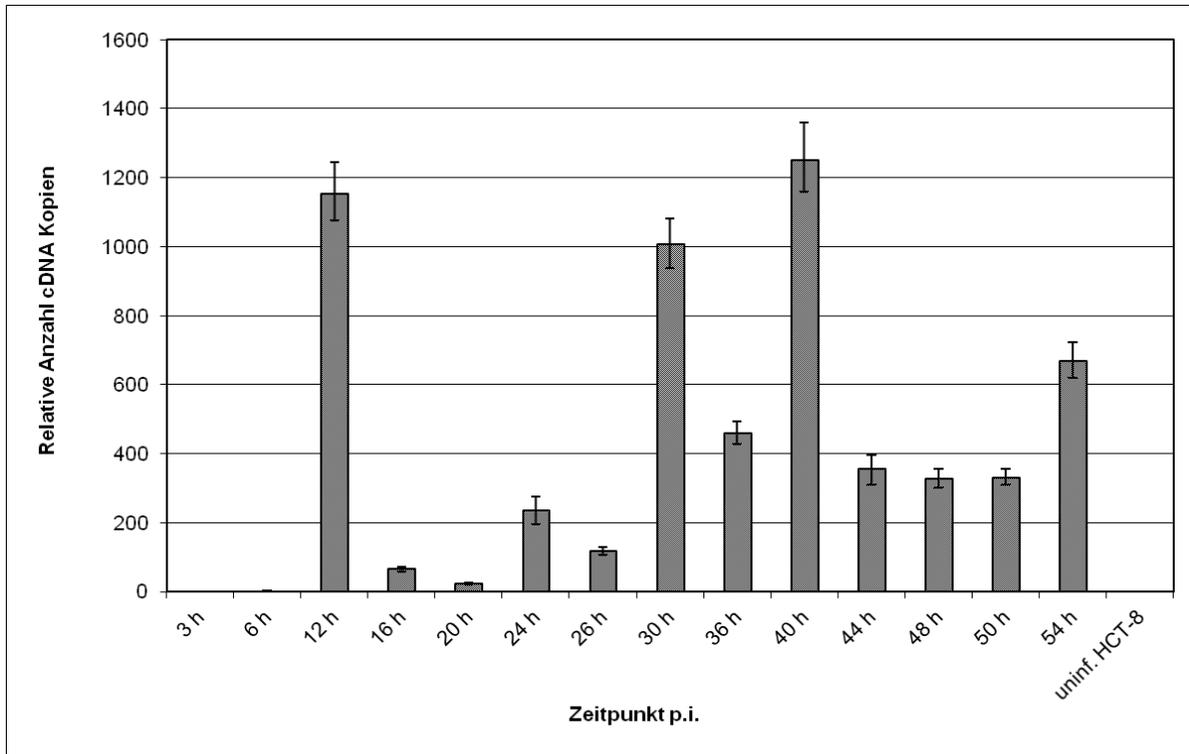


Abbildung 18: Versuch A: Relative Quantifizierung der *CpCDPK1*-Expression im Zeitraum 3 h bis 54 h p. i. mit Darstellung der relativen Anzahl cDNA-Kopien und der Standardabweichung. Die relative cDNA-Kopienanzahl von *CpCDPK1* wurde mit *CpHSP70*-cDNA normalisiert. Der Zeitpunkt 3 h p. i. diente als Kalibrator. Zu den Zeitpunkten 12 h, 30 h, sowie 40 h p. i. ist ein deutlicher Anstieg der *CpCDPK1* Expression sichtbar. Weniger stark ausgeprägt ist ein Anstieg bei 24 h und 54 h p. i.

In Versuch A war zu den Zeitpunkten 12 h, 30 h sowie 40 h p. i. ein deutlicher Anstieg der *CpCDPK1*-Expression bezogen auf den Kalibratorwert zum Zeitpunkt 3 h p. i. sichtbar. Danach sank die relative Anzahl der cDNA-Kopien jeweils wieder stark ab. Ein kleinerer Anstieg zeigte sich 24 h p. i. Im Zeitraum 44 h bis 50 h p. i. war eine Plateauphase mit hohen relativen cDNA-Kopienanzahlen zu sehen, 54 h p. i. wurde die Expression von *CpCDPK1* nochmals hochreguliert (Abb. 18).

Ergebnisse

Ein ähnliches Expressionsmuster zeichnete sich in Versuch B ab (Abb. 19). Zu den Zeitpunkten 12 h, 30 h sowie 40 h p. i. war ein deutlicher Anstieg der *CpCDPK1*-Expression bezogen auf den Kalibratorwert 3 h p. i. sichtbar. 16 h und 20 h p. i. sank die relative Anzahl an cDNA-Kopien stark, 24 h und 26 h p. i. wurde die Expression in geringem Maße hochreguliert. Im Zeitraum 36 h, 44 h, 50 h sowie 54 h p. i. wurden wieder hohen relativen cDNA-Kopienanzahlen detektiert.

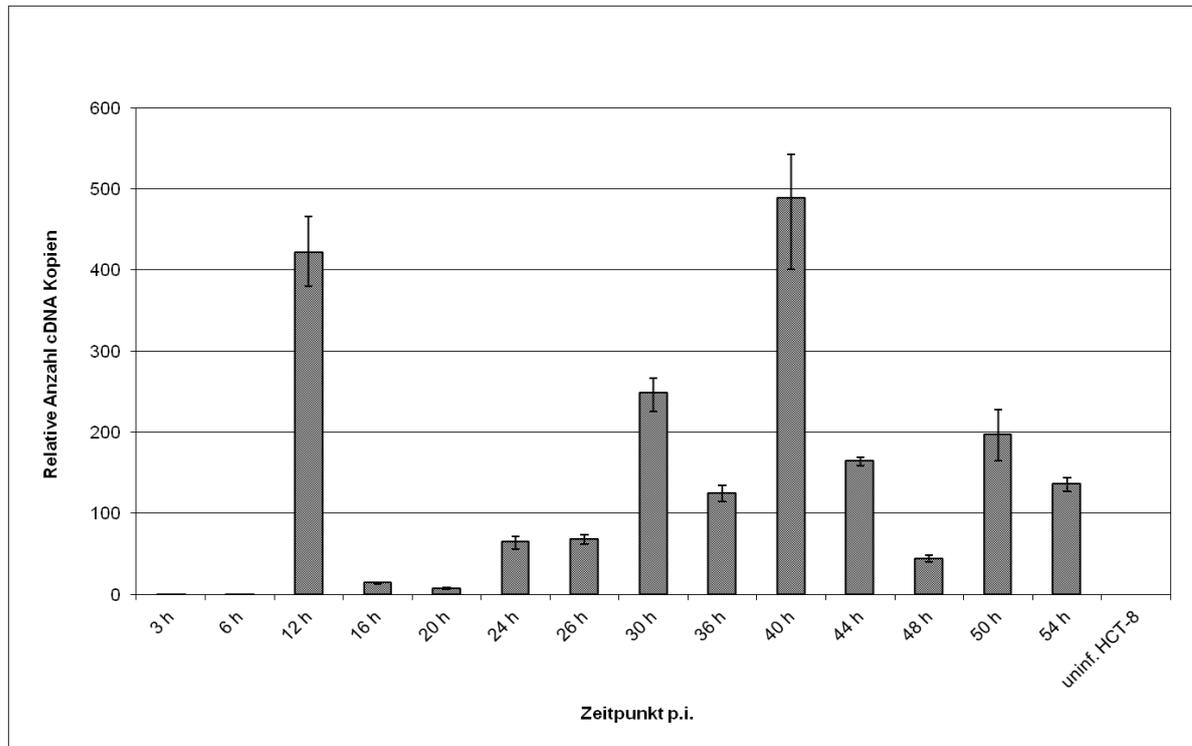


Abbildung 19: Versuch B: Relative Quantifizierung der *CpCDPK1*-Expression im Zeitraum 3 h bis 54 h p. i. mit Darstellung der relativen Anzahl cDNA-Kopien und der Standardabweichung. Die relative cDNA-Kopienanzahl von *CpCDPK1* wurde mit *CpHSP70*-cDNA normalisiert. Der Zeitpunkt 3 h p. i. diente als Kalibrator. Zu den Zeitpunkten 12 h, 30 h, sowie 40 h p. i. ist wie im vorangegangenen Versuch ein deutlicher Anstieg der *CpCDPK1* Expression sichtbar. Danach sinkt die Expression auf ein geringeres Level. 36 h, 44 h, 50 h sowie 54 h p. i. wird die Expression von *CpCDPK1* hochreguliert.

5 Diskussion

Die Notwendigkeit einer intensiven Erforschung von *C. parvum* und seiner Stoffwechselwege, um neue Ansätze für pharmakologische Wirkstoffe zu finden, ist sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin gegeben. Obwohl mehr als 200 Substanzen als Medikament gegen *C. parvum* getestet wurden (GARGALA 2008) ist derzeit keine zuverlässige Bekämpfung klinischer Symptome oder eine Elimination des Erregers möglich.

CDPK stellen in diesem Zusammenhang hochinteressante Zielproteine für pharmazeutische Therapeutika dar, da sie zwar in Apikomplexa, Pflanzen, Pilzen und einigen weiteren Protisten vorkommen, jedoch keine Orthologe im Genom von Säugetieren besitzen (LIM et al. 2012). In Apikomplexa gelang KIESCHNICK und Mitarbeitern (2001) erstmals eine Inhibition der *Tg*CDPK1 durch KT5926. Dabei wurden sowohl die Beweglichkeit der Tachyzoiten als auch die Anheftung von *T. gondii* an die Wirtszelle erfolgreich blockiert. Inzwischen wurden BKI, eine Reihe von Pyrazolopyrimidinderivaten, als vielversprechende Wirkstoffe gegen CDPK in *T. gondii* und *P. falciparum* beschrieben. Während CDPK in *T. gondii* und *Plasmodium* spp. zunehmend genau charakterisiert werden, ist das Wissen über Funktionen und Lokalisationen von CDPK in *C. parvum* sehr begrenzt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die im Genom von *C. parvum* kodierten CDPK zunächst phylogenetisch einzuordnen und sie hinsichtlich funktioneller Gruppen sowie potentieller Myristoylierungs- und Palmitoylierungsstellen zu charakterisieren. Weiterhin sollten die CDPK hinsichtlich ihres Expressionsmusters *in vitro* untersucht werden. Vor einigen Jahren wurden auch erste Inhibitoren der *Cp*CDPK1 beschrieben (MURPHY et al. 2010). Daher wurde diese Kinase für nähere Untersuchungen ausgewählt. Dabei sollte vor allem beschrieben werden, in welchen Stadien des Parasiten die *Cp*CDPK1 translatiert wird und wo die *Cp*CDPK1 in den Parasitenstadien lokalisiert ist, um Hinweise auf mögliche Funktionen des Enzyms zu erhalten.

5.1 Vergleichende Untersuchungen der CDPK im Genom von *C. parvum*

Mit dem NCBI Blast®-Programm konnten im Genom von *C. parvum* elf Proteinsequenzen mit relativ hoher Homologie zur *Tg*CDPK1 identifiziert werden. Bei näherer Analyse im SMART- Programm wurde für sechs dieser Proteinsequenzen jeweils eine NH₂-terminale, funktionelle Ser/Thr-Kinasedomäne, gefolgt von einer autoinhibitorischen Verbindungsdomäne sowie vier kalziumbindende „EF-Hand-Motive“ am C-terminalen Ende vorhergesagt. Dies entspricht dem von HARPER et al. (2000) beschriebenen Grundaufbau klassischer CDPK bei Pflanzen. *Cp*CDPK4 besaß dagegen nur zwei EF-Hand-Motive am C-terminalen Ende und wurde in die folgenden Untersuchungen dieser Arbeit nicht näher einbezogen. Bei den vier weiteren Proteinsequenzen handelt

Diskussion

es sich vermutlich um sogenannte „related“ Kinasen, da hier die funktionellen Gruppen verändert oder reduziert waren oder ganz fehlten.

Der in Abbildung 2 dargestellte phylogenetische Baum spiegelt den Versuch einer phylogenetischen Einordnung der gefundenen Proteinsequenzen nach globalem Alignment mit der ClustalW-Funktion und unter Verwendung der Neighbor Joining Methode des MEGA5[®]-Programmes wider. In der vorliegenden Arbeit fand ein 10000 Replikate umfassender Bootstrap-Test der Phylogenie Anwendung, welcher eine hohe statistische Sicherheit liefert. Die Sequenz der phylogenetisch weiter entfernten Kalzium/Kalmodulin-abhängigen Proteinkinase (MmCamk2B) der Maus diente als Outgroup.

Die Ergebnisse sind konform mit den von BILLKER et al. (2009) veröffentlichten phylogenetischen Untersuchungen der CDPK von Apikomplexa, Pflanzen und Ciliaten. Die Autoren arbeiteten ebenfalls mit der Neighbor Joining Methode, allerdings wurde das PAUP* Programm verwendet. Die Nomenklatur der *CpCDPK* wurde übernommen. Zunächst wird deutlich, dass für jede *CpCDPK* ein entsprechendes Äquivalent von *TgCDPK* vorhanden ist. Die statistische Sicherheit der Knoten der hohen Sequenzhomologien dieser beiden CDPK beträgt über 95%. BILLKER et al. (2009) vermerkten für diese Homologien sogar 100% statistische Sicherheit der Knoten.

Dem für Pflanzen beschriebenen klassischen Grundaufbau entsprechen laut BILLKER et al. (2009) die CDPK1/CDPK3-Gruppe sowie die große Gruppe aus CDPK2, CDPK2A und CDPK5 der Apikomplexa. In der vorliegenden Arbeit war eine frühe Abspaltung zu einem *CpCDPK1/CpCDPK3*-Kluster auffallend, deren Domänenstrukturen dem klassischen Aufbau mit kurzem NH₂-terminalem Ende entsprachen. BILLKER et al. (2009) verwiesen auch auf eine Acylierung der kurzen NH₂-terminalen Enden in dieser Gruppe, auf die in Kapitel 5.2 dieser Arbeit näher eingegangen wird. Im phylogenetischen Baum (Abbildung 2) wurde eine größere Klade aus *CpCDPK2A*, *TgCDPK2B*, *PfCDPK2* sowie der CDPK5-Gruppe geformt, wobei hier eine geringere Sicherheit der Knoten vorlag. *CpCDPK2A* und *CpCDPK5* entsprachen dem klassischen Grundaufbau, enthielten jedoch deutlich längere NH₂-terminale Enden. Für *CpCDPK2* wurde noch eine zusätzliche, karbohydratbindende Domäne ermittelt.

Ebenfalls konform zu den Ergebnissen von BILLKER et al. (2009) separiert sich ein CDPK6-Kluster. Die *CpCDPK6* entspricht dem klassischen Grundaufbau plus zwei weiteren „EF-Hand-Motiven“ am NH₂-terminalen Ende, deren Funktion in der Regulierung der Kinaseaktivität bisher unbekannt ist. In meiner Arbeit stellte sich *CpCDPK4* mit nur zwei C-terminalen EF-Hand-Motiven dar und bildete einen einzelnen phylogenetischen Ast neben einem einzelnen *TgCDPK4*-Ast. BILLKER et al. (2009) reihten noch einen einzelnen *TgCDPK8*-Ast ein und beschrieben drei EF-Hand-Motive ähnlich den Ca²⁺/CAM-abhängigen Kinasen in Pflanzen. Aufgrund von Variationen in Anzahl und Aminosäuresequenz der EF-Hand Motive unterscheiden sich CDPK in Pflanzen hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber Kalzium. So kann ein geringer Kalziumanstieg eine Isoform aktivieren, während

Diskussion

andere Isoformen wesentlich höhere Level benötigen (LEE et al. 1998). Es ist daher anzunehmen, dass *Cp*CDPK aufgrund ihrer unterschiedlichen Domänenstruktur auch differenziert auf Ca^{2+} -Signale ansprechen.

Von CDPK der Pflanzen ist bekannt, dass die Membranassoziation über Myristoylierung und Palmitoylierung einen wichtigen Faktor in der Funktionalität der Kinasen darstellt. Einige der Membranphospholipide sind als „second messenger“ in die Signaltransduktion von Pflanzen eingebunden und verwirklichen ihre Effekte möglicherweise durch CDPK (CHENG et al. 2002). Für Apikomplexa zeigten MÖSKES et al. (2004) anhand der *Pf*CDPK1 eine Myristoylierung *in vivo* und *in vitro*. Ein basisches Motiv unterstützt dabei die Membranverankerung. *Pf*CDPK1 wurde in extrazellulären Kompartimenten, der PV, in Ringstadien, Trophozoiten und Schizonten nachgewiesen. Ein Konsensusmotiv für Myristoylierung kann demnach ein erster Hinweis auf die Lokalisation der Kinase sein. Dies wird auch am Beispiel von *Pf*CDPK4 deutlich, die ein vorhergesagtes Konsensusmotiv für Myristoylierung besitzt und in der Peripherie von Gametozyten im Bereich der Membranen lokalisiert wurde (RANJAN et al. 2009).

Inwiefern CDPK von *C. parvum* myristoyliert oder palmitoyliert werden, ist bisher nicht beschrieben. Es existieren lediglich Rückschlüsse über homologe Kinasen, z.B. der *Tg*CDPK1. In den phylogenetischen Untersuchungen von BILLKER et al. (2009) wird von einer Azylierung der CDPK in der *Cp*CDPK1/*Cp*CDPK3-enthaltenden Gruppe ausgegangen, was sich auf die Erkenntnisse an *Pf*CDPK1 und *Pf*CDPK4 stützt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ein oder mehrere Glycine am NH_2 -terminalen Ende von *Cp*CDPK1 und *Cp*CDPK3 identifiziert, die potentielle Bindungsstellen für Myristat darstellen. Des Weiteren konnten in *Cp*CDPK2A drei Glycine als mögliche Stellen für Myristoylierung identifiziert werden. Ein oder mehrere basische Aminosäuren zur Unterstützung der Bindung wurden ebenfalls in allen drei CDPK gefunden (Abbildung 4 grün markiert). *Cp*CDPK1 erfüllt damit zwei Kriterien, die für eine Membranverankerung sprechen. In *Cp*CDPK2A sowie *Cp*CDPK3 kommt außerdem die Aminosäure Cystein in unmittelbarer Nähe zum potentiell myristoylierten Glycin bzw. an Position drei vor, was für eine mögliche Palmitoylierung spricht. Bei doppelt azylierten Proteinen sind bevorzugt Cystein an Position drei in der Nähe zum myristoylierten Glycin an Position zwei palmitoyliert (CASEY 1995, RESH 1999). Damit erfüllen diese CDPK sogar drei der Kriterien, die für eine Membranverankerung sprechen. Sie besitzen ein Kluster basischer Aminosäuren in der Folgesequenz des potentiell myristoylierten Glycins und es können hydrophobe Wechselwirkungen durch palmitoylierte Cysteine auftreten. Protein-Protein-Interaktionen mit integralen Membranproteinen sind denkbar (RESH 1999, MÖSKES et al. 2004). In *Cp*CDPK2 und *Cp*CDPK5 konnten lediglich Cysteine identifiziert werden, die palmitoyliert sein könnten, eine Membranverankerung ist jedoch unwahrscheinlich. *Cp*CDPK6 ist nicht azyliert und es kann nur spekuliert werden, inwiefern diese Kinase frei im Zytosol vorkommt. Möglicherweise stellen die zusätzlichen EF-Hand-Motive am NH_2 -terminalen Ende einen Aktivierungsimpuls für diese Kinase dar. Membranassoziierte CDPK werden über Phospholipide

Diskussion

aktiviert (CHENG et al. 2002). Zusammenfassend kann für *CpCDPK1*, *CpCDPK2A* und *CpCDPK3* von einer ständigen oder zeitweisen Verankerung in Membranen ausgegangen werden.

Mit Hilfe einer 3'RACE-PCR mit anschließender n-PCR sollte die Fragestellung geklärt werden, ob die gefundenen CDPK-Sequenzen tatsächlich exprimiert werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der vollständigen Amplifikation der 3'Enden der cDNA. Im n-PCR-Schritt werden fehlerhafte Amplifikationsprodukte zuverlässig hinwegselektiert und der Nachweis geringer Templatemengen ist möglich. Amplifikate aller sechs untersuchten *CpCDPK* wurden in cDNA frisch exzystierter Sporozoiten von *C. parvum* nachgewiesen (Abb. 5). In einer ersten PCR mit cDNA aus infizierten HCT-8-Zellkulturen gelang der Nachweis von Transkripten aller sechs *CpCDPK* nur zu den Zeitpunkten 21 h, 43 h und 51 h. In einem zweiten Versuch mit neu isoliertem Material waren 3-6 h p. i. schwache Banden darstellbar. Zu den Zeitpunkten 24 h, 40 h, 50 und 54 h p. i. war in diesem Experiment eine deutlichere Expression mit starken Banden zu beobachten.

Aus diesem Expressionsmuster lassen sich unter Einbeziehung der Entwicklungszeitpunkte von *C. parvum* in HCT-8-Kulturen einige interessante Schlussfolgerungen ziehen. Während in Sporozoiten Transkripte aller CDPK vorhanden waren, traten 3-6 h p. i. nur schwache oder gar keine Banden auf dem Agarosegel auf. Ebenso waren 24 h und 40 h p. i. deutliche Banden sichtbar, danach jedoch weniger Transkripte nachweisbar. Besonders deutlich wird dies zum Zeitpunkt 44 h p. i. (siehe Tabelle 10). Im Gegensatz dazu waren 48-54 h p. i. wieder große Mengen PCR-Produkt nachweisbar. Offenbar kommt es zu einer Aktivierung der Transkription in Sporozoiten sowie in infizierten HCT-8-Kulturen 24 h und 40 h p. i. bzw. 48-54 h p. i. mit einem anschließenden Abbau oder Verbrauch der Transkripte. Ein Verbrauch könnte durch Translation der RNA in Proteine stattfinden. Es ist davon auszugehen, dass CDPK eine Rolle bei der Invasion von Sporozoiten in die Wirtszelle spielen. Die essentielle Rolle von *CpCDPK1* für die Wirtszellinvasion wurde von MURPHY et al. (2010) durch Inhibitorstudien *in vitro* belegt.

Zum Zeitpunkt 24 h p. i. sind in HCT-8-Kulturen freie Merozoiten vom Typ I sichtbar (BOROWSKI et al. 2010, FLANIGAN et al. 1991, HIJAWI et al. 2001, ROSALES et al. 1993, THOMPSON et al. 2005). Das Expressionsmuster deutet darauf hin, dass CDPK eine Rolle beim Egress von Merozoiten aus den Meronten I oder bei der Invasion neuer Wirtszellen durch Merozoiten spielen. LOURIDO et al. (2010) zeigten, dass *TgCDPK1* die Micronemensekretion kontrolliert und essentiell für die Freisetzung des Parasiten aus der Wirtszelle ist. Obwohl *TgCDPK1* und *CpCDPK1* phylogenetisch und strukturell hohe Homologien aufweisen, muss ein Analogieschluss hinsichtlich ihrer Funktionen mit Vorsicht gesehen werden. Schwierig bleibt auch die Interpretation des Expressionsmusters der *CpCDPK* im Zeitraum 48-54 h p. i. Einige Autoren beschrieben das Auftreten von Meronten Typ II zum Zeitpunkt 48 h p. i. (ROSALES et al. 1993, SLIFKO et al. 1997). HIJAWI et al. (2001) identifizierten im Zeitraum 48 h – 72 h p. i. alle Stadien. Andere sahen Meronten Typ II frühestens 72 h p. i. (BOROWSKI et al. 2010, THOMPSON et al. 2005). HIJAWI et al. (2004) beobachteten *in vitro* eine Entwicklung von *C. parvum* auch ohne Wirtszellinvasion im Medium. BOROWSKI et al.

Diskussion

(2010) bestätigten diese Beobachtungen. Zusammenfassend ist daher nach dem Zeitpunkt 24 h p. i. eher von einer asynchronen Entwicklung der Stadien von *C. parvum* in HCT-8-Kulturen auszugehen. Eine Expression von CDPK zu den Zeitpunkten 40 h sowie 48-54 h p. i. kann einerseits auf eine Funktion bei Egress und Invasion der Merozoiten Typ II hindeuten, gleichzeitig aber auch auf eine Rolle der CDPK in sexuellen Entwicklungsstadien hinweisen. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann eine stadienspezifische Expression der sechs ausgewählten *CpCDPK* angenommen werden, da besonders zu den Zeitpunkten 24 h und 48-54 h p. i. sowie in den Sporozoiten deutliche Banden auf dem Agarosegel nachgewiesen wurden und dies gut mit den Zeitpunkten von Invasion und Egress der Merozoiten korreliert.

Bei der Auswertung der PCR-Ergebnisse beider Versuche fiel auf, dass die aus den Sequenzen und Primerbindungsstellen errechneten PCR-Produkte zwischen 28 und 259 Basenpaare kleiner waren als die tatsächlich auf dem Gel sichtbaren PCR-Banden. Amplifikationen falscher PCR-Produkte durch unspezifisch bindende Primer wurden durch eine Sequenzierung ausgeschlossen, die die Identität der jeweiligen *CpCDPK* und damit die Ergebnisse der PCR bestätigte. Bei den überzähligen Basenpaaren handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die 3'untranslatierte Region (3'UTR). Dabei handelt es sich um einen nicht-kodierenden Bereich der mRNA zwischen dem Stop-Codon der translatierten Sequenz und dem Poly(A)-Schwanz am 3'Ende der mRNA. Durch RNA-Protein-Interaktionen oder Wechselwirkungen mit dem 5'Ende der mRNA übernimmt die 3'UTR eine Reihe von regulatorischen Funktionen. Beispielsweise kann die Region selbst über ein Polyadenylierungssignal verfügen und damit die Stabilität der RNA beeinflussen. MAZUMDER et al. (2003) beschrieben, dass über Signalsequenzen der 3'UTR auch die Lokalisation der Transkripte innerhalb der Zelle bestimmt wird und vermuteten, dass die 3'UTR mit translatiertem Protein interagiert und eine Art Schleife bildet, welche die Information zum Translationsstart zurückgibt. Damit ist ein Ein- und Ausschalten der Translation möglich. Interessanterweise sind die 3'UTR in Pflanzen und Pilzen nur etwa 200 Nukleotide lang, während menschliche 3'UTR über mehr als 500 Nukleotide verfügen. Die über 200 Nukleotide langen 3'UTR der *CpCDPK1* und *CpCDPK2A* könnten auf eine verstärkte Regulation der Translation dieser Kinasen hinweisen. In Tabelle 11 dieser Arbeit wird erstmals die Länge der 3'UTR-Bereiche in *CpCDPK* beschrieben.

Schlussfolgernd aus den bisherigen vergleichenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit kann die *CpCDPK1* gegenüber den anderen CDPK im Genom von *C. parvum* als besonders interessant herausgestellt werden. Diese Kinase entspricht dem klassischen Aufbau einer CDPK. Sie besitzt phylogenetisch eine hohe Homologie zur *TgCDPK1* und damit auch mit hoher Wahrscheinlichkeit ähnliche Funktionen und mögliche Ansatzstellen für Inhibitoren (MURPHY et al. 2010). Eine Membranassoziation der *CpCDPK1* ist aufgrund zwei möglicher Myristoylierungsstellen in der Nähe des Startmethionins wahrscheinlich, die folgende Aminosäuresequenz würde die Bindung unterstützen. Nur Transkripte der *CpCDPK1* konnten zu allen Zeitpunkten in der 3'RACE-PCR nachgewiesen werden, zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 20 h p. i. waren jedoch nur schwache Banden

detektierbar. Es wird während der Entwicklung von *C. parvum in vitro* ständig in mehr oder weniger großen Mengen mRNA der CDPK1 produziert, eine relative Quantifizierung der Transkripte könnte Aufschluss über eine mögliche stadienspezifische Expression geben. Die lange 3'UTR der *CpCDPK1* kann vielfältige Signale für die Regulation der Translation enthalten. Ein Ein- und Ausschalten der Translation durch Schleifenbildung wäre möglich und könnte die Produktion des Enzyms steuern. Die *CpCDPK1* wurde daher für nähere Untersuchungen zur Expression und Lokalisation ausgewählt.

5.2 Expression, Translation und Lokalisation der *CpCDPK1*

Die RT-PCR lieferte Hinweise auf eine tatsächliche stadienspezifische Expression der *CpCDPK1* (Abb. 18 und 19). Der Zeitpunkt 3 h p. i. wurde als Kalibrator ausgewählt, da hier aus den Ergebnissen der 3'RACE-PCR nur geringe Mengen an *CpCDPK1*-RNA zu erwarten waren. Die Nullwerte der als Negativkontrolle dienenden uninfizierten HCT-8 Zellen konnten nicht als Kalibrator verwendet werden, da das verwendete Programm diese Einstellung aufgrund der erforderlichen Division durch den Nullwert nicht akzeptierte. Zum Zeitpunkt 6 h p. i. war gegenüber dem Kalibrator keine erhöhte Expression mit dieser Methode zur relativen Quantifizierung nachweisbar. Demgegenüber zeigten sich deutliche Anstiege der Expression in beiden Versuchen zu den Zeitpunkten 12 h, 30 h und 40 h p. i. Kleinere Anstiege wurden 24 h und 36 h p. i. detektiert. Im Zeitraum 44 h bis 50 h p. i. blieb die Expression in Versuch A in einer Plateauphase auf mittlerem Niveau. In Versuch B konnte 48 h p. i. nur eine geringe Expression von cDNA detektiert werden. Es scheint zu einer Hochregulierung der Expression unmittelbar vor und während der ersten Merogonie (12 h und 24 h p. i.) sowie dem Egress und der Invasion von Merozoiten Typ I (30 h, 36 h und 40 h p. i.) zu kommen. Eine Plateauphase der Expression im Zeitraum 44 h – 50 h p. i. könnte sich aus der asynchronen Entwicklung der Stadien um den Zeitpunkt der zweiten Merogonie erklären, welche etwa 48 h p. i. erfolgt. Damit würde die Hochregulierung der Expression von *CpCDPK1* während Egress und Invasion von Merozoiten Typ II zum Zeitpunkt 48 h p. i. möglicherweise verschleiert. Die Ergebnisse sind jedoch kritisch zu betrachten. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten und methodische Fehler zu minimieren, wurde anhand der „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines“ gearbeitet. Für die Materialgewinnung, die RNA-Gewinnung, die cDNA-Herstellung und die Lagerung wurden gesicherte, einheitliche Verfahren entsprechend der MIQE-Guidelines angewendet. Die Verwendung der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode zur Auswertung ist üblich (BUSTIN et al. 2009). Bei der verwendeten RT-PCR handelt es sich um eine etablierte Methode (SHAHIDDUZZAMAN et al. 2009). Die MIQE Guidelines empfehlen für die relative Quantifizierung die Verwendung mehrerer Referenzgene zur Normalisierung, da sich vielfach gezeigt hat, dass keine konstante Expression der Housekeeping-Gene vorliegt oder diese durch die Bedingungen während der RT-PCR-Reaktion reguliert werden (BUSTIN et al. 2009). Hier liegt ein großer Nachteil der Normalisierung mit HSP70. Eigene Versuche haben im Nachhinein gezeigt, dass HSP70 einer

Diskussion

Regulation unterliegt. Eine Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe mit mehreren Housekeeping-Genen, darunter 18S RNA, GAPDH sowie *cgd21750*, *cgd6_1480* und *cgd2_1360*, erbrachte jedoch ähnliche Ergebnisse wie die hier dargestellten Versuche mit HSP70. Auch in diesen Versuchen wurde ein Anstieg der Expression 18-20 h und 48-52 h p. i. sowie ein etwas geringerer Anstieg 26 h p. i. detektiert, während 3 h und 6 h p. i. kaum Transkripte nachgewiesen werden konnten (persönliche Mitteilung Dr. Matthias Lendner, Leipzig, 25.05.2013). Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen die Tendenz der Expression an, stellen jedoch keine exakte Quantifizierung dar. Interessanterweise fallen die Zeitpunkte der hochregulierten Expression mit der ersten und zweiten Merogonie von *C. parvum* in der HCT-8-Kultur zusammen. Es kann aufgrund der RT-PCR Ergebnisse eine Funktion der *CpCDPK1* für Invasion und Egress des Parasiten angenommen werden, da auch hier die Expression mit dem Egress und der Invasion der Zoitstadien korreliert.

Um eine Translation der *CpCDPK1* nachzuweisen, mussten zunächst geeignete Antigene zur Produktion polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Als Zielsequenz wurde ein für ein etwa 9 kDa großes Protein kodierender Bereich der CDPK1 (*cgd3_920*) Sequenz von *C. parvum* ausgewählt, welcher sich sehr weit NH₂-terminal befindet. Diese Lokalisation könnte einerseits mögliche Acylierungsstellen enthalten, andererseits hatte sich dieser Bereich im Alignment ausgewählter CDPK als eine für *CpCDPK1* spezifische Sequenz herausgestellt (persönliche Mitteilung Dr. Viktor Dyachenko, Leipzig, 04.04.2008). Zur Erhöhung der Antigenität des Proteins wurde ein Doppelkonstrukt erstellt, welches anschließend in einen Expressionsvektor kloniert wurde. Zu Beginn meiner Arbeit lag das Konstrukt bereits als Klon in *E. coli* M15 vor. Es erfolgte dreimalig eine Expression in *E. coli* M15 und eine Aufreinigung des Proteins. In SDS-Gelen wurden die Eluate anschließend überprüft (Abb. 6) und zur Immunisierung eines Kaninchens (SEQLAB, Göttingen, Deutschland) verwendet. Das gewonnene Anti-*CpCDPK1*-Serum reagierte in einer Verdünnung von 1:1000 stark mit rekombinantem Protein aus *E. coli* M15 Lysat sowie mit zur Immunisierung eingesetztem Eluat (Abb. 7) und erkannte spezifisch das *CpCDPK1*-Doppelkonstrukt von ca. 18 kDa. Die Immunisierung war somit erfolgreich.

In Extrakten aus frisch exzystierten Sporozoiten konnte, wie in Abbildung 8 dargestellt, in mehreren Versuchen eine 56 kDa große Bande detektiert werden. *CpCDPK1* besitzt ein spezifisches Molekulargewicht von 55,72 kDa. Dies deutet darauf hin, dass *CpCDPK1* translatiert wird und auch als Protein in Sporozoiten von *C. parvum* vorliegt und unterstreicht die Vermutung, dass *CpCDPK1* eine Funktion im Invasionsmechanismus besitzt. Trotz zahlreicher Versuche gelang der Nachweis von *CpCDPK1*-Antigen in Isolaten aus infizierten Zellkulturen nicht. Zunächst wurde angenommen, dass zu geringe Mengen an Protein vorlagen. Eine Konzentration des Proteins durch Fällung sowie die Verwendung von gefällten Proteinisolaten aus Zellkulturplatten mit 10 cm Durchmesser erlaubten aber ebenfalls keinen Nachweis von *CpCDPK1*. Dabei war verwunderlich, dass Protein im SDS-Gel vor dem Blot darstellbar war und die erfolgreiche Übertragung auf die PVDF-Membran anhand der Coomassie-Färbung des geblotteten Gels nachweisbar war. In einem weiteren Versuch wurde der

Diskussion

Einfluss der denaturierenden Bedingungen bei der Proteingewinnung untersucht, indem die Isolate jeweils in Probenpuffer mit und ohne β -Mercaptoethanol gelöst wurden und in letzterem Fall auch keine Erhitzung erfolgte. Auch auf diesem Weg gelang kein Nachweis von *CpCDPK1*-Protein zu den gewählten Isolationszeitpunkten 3 h, 24 h und 48 h p. i. Obwohl Transkripte von *CpCDPK1* vor allem zu den Zeitpunkten 24 h und 48 p. i. mit deutlichen Banden auf dem Agarosegel nachgewiesen wurden, scheint keine Translation in Protein stattzufinden. Methodische Fehler können weitestgehend ausgeschlossen werden, da das zur Immunisierung des Kaninchens eingesetzte Eluat stets als Positivkontrolle mitgeführt und vom Antikörper detektiert wurde. Zur Isolation der RNA wurde Trizol eingesetzt. Diese Methode ermöglicht auch die Gewinnung von Protein unter denaturierenden Bedingungen aus ein und derselben Probe. Aus allen Isolaten für die 3'RACE-PCR wurde damit sowohl RNA als auch Protein gewonnen, welches zusätzlich durch eine Proteinfällung konzentriert wurde. Zu keinem Zeitpunkt war mit dieser Vorgehensweise *CpCDPK1*-Protein im Immunoblot nachweisbar. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass *CpCDPK1* lediglich in Sporozoiten in adäquaten Mengen für einen Nachweis im Immunoblot vorliegt und im weiteren Entwicklungszyklus von *C. parvum* überwiegend auf der Stufe der mRNA exprimiert wird oder Protein nur in geringen Mengen produziert wird. KIESCHNICK et al. (2001) konnten in Tachyzoiten für *TgCDPK2* ebenfalls nur eine Expression auf mRNA-Level nachweisen und führten diesen Umstand auf eine posttranskriptionale Regulation zurück. *CpCDPK1* könnte in HCT-8-Zellen in ähnlicher Weise reguliert werden. Der Nachweis einer relativ langen 3'UTR der *CpCDPK1* bekräftigt diese Vermutung.

Im Gegensatz dazu ergaben die Immunfluoreszenzuntersuchungen ein anderes Bild. In Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Sporozoiten traten spezifische Fluoreszenzen granulärer Strukturen im Bereich von teilweise zerstörten Sporozoiten sowie in Kernnähe und am apikalem Pol von Sporozoiten auf. Dies stellt einen weiteren Nachweis der Translation der *CpCDPK1* in Sporozoiten dar und bestätigt das Ergebnis des Immunoblots. Da Pyrazolopyrimidin-Inhibitoren die *CpCDPK1* unmittelbar nach einer Infektion der HCT-8-Zellen erfolgreich blockieren und die Effekte 1 h p. i. schon weniger deutlich sind (MURPHY et al. 2010), kann eine Produktion und Akkumulation des Enzyms in reifen, noch nicht exzystierten Sporozoiten angenommen werden. Dies wäre konform zu den Ergebnissen von 3'RACE-PCR und Immunoblot.

In Methanol-fixierten infizierten HCT-8-Monolayern konnten 3 h p. i. ringförmige Fluoreszenzen dargestellt werden, die sich anhand der Nativbilder eindeutig dem Bereich der Parasitophoren Vakuole (PV) von Trophozoiten zuordnen ließen. Diese Ergebnisse sind zu denen von MÖSKES et al. (2004) konform. Diese Autoren konnten *PfCDPK1* in der PV, an der Membran der PV und auf Membranen des tubovesikulären Systems nachweisen. Analogieschlüsse sollten nur vorsichtig gezogen werden, aber da *CpCDPK1* Myristoylierungsstellen besitzt, ist eine Assoziation an Membranen der PV wahrscheinlich. Wie exemplarisch in den Abb. 9 und 10 dargestellt, konnten 24 h p. i. und 48 h p. i. fluoreszierende Merozoiten in Meronten Typ I oder Typ II nachgewiesen werden. MÖSKES et al.

Diskussion

(2004) wiesen *Pf*CDPK1-Antigen auch auf der Oberfläche unreifer Merozoiten nach und vermuteten eine Art „flip-flop“ Mechanismus, welcher acylierte Proteine des inneren Membrankomplexes (IMC) in infektiösen Stadien nach außen lokalisiert. Die Fluoreszenzen sind in bestimmten Bereichen der Merozoiten lokalisiert (Abb.11). Diese Beobachtung wird bei der Verwendung von affinitätsgereinigtem Antikörperserum (Abb. 13) noch deutlicher.

Zum Zeitpunkt 48 h p. i. konnten mehrfach punktförmige Fluoreszenzen beobachtet werden, die sich von einem Zentrum kometenschweifartig entfernen (Abb 14). Eine Zuordnung von Kernen in der DAPI-Färbung oder eine Abgrenzung im Nativbild war nicht möglich. Die Ergebnisse erlauben keine eindeutige Interpretation. Da von einer asynchronen Entwicklung der Stadien von *C. parvum* ausgegangen werden kann, könnte es sich bei den fluoreszierenden Strukturen um Mikrogameten handeln. HIJJAWI et al. (2001) hatten im Zeitraum 48 h -72 h p. i. neben Merozoiten auch sexuelle Stadien identifiziert. Der Nachweis reifer Mikrogamonten oder freiwerdender Mikrogameten als kometenschweifartige Struktur im eigenen Material 48 h p. i. ist möglich. BOROWSKI et al. (2010) beschrieben für Mikrogamonten eine stockartige Struktur, die mit der Wirtszelle verbunden war. Auch EDWARDS et al. (2012) wiesen elektronenmikroskopisch membranöse Strukturen nach, die eine mögliche Verbindung zwischen Mikrogameten und Wirtszelle darstellen. Da für *Cp*CDPK1 eine Membranassoziation durch Myristat wahrscheinlich ist, könnten die beobachteten Fluoreszenzmuster tatsächlich Mikrogameten und membranöse Verbindungsstrukturen darstellen. Dies würde auf eine Funktion des Enzyms in der sexuellen Entwicklungsphase hindeuten und wäre konform mit Funktionen verwandter Kinasen in *P. falciparum*, z.B. der Aktivierung von *Pf*MAP2 durch *Pf*CDPK4 für die Stadiendifferenzierung in Mikrogameten (BILLKER et al. 2004, TEWARI et al. 2005).

Andererseits könnte die kometenschweifartige Fluoreszenz einen Beleg für die Sezernierung von *Cp*CDPK1 darstellen. BOROWSKI et al. (2010) und EDWARDS et al. (2012) beschrieben „gliding trails“ auf der Oberfläche des Mikrovillisaumes der Wirtszelle, welche durch sezernierte Oberflächenproteine der Zooten und Mikrovillimaterial gebildet werden. Die zur Peripherie schwächer werdenden Fluoreszenzpunkte (Abb.14) könnten sezernierte *Cp*CDPK1 darstellen, die an der Oberfläche der Wirtszelle haftet. Im Zentrum der Fluoreszenz befindet sich möglicherweise ein Merozoit.

Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse des *In-vitro*-Assays mit Anti-*Cp*CDPK1-Serum. Eine Tendenz zur Reduktion von *C. parvum*-DNA nach Zugabe des Antiserums kann bereits 3 h p. i. für die Serumverdünnung 1:10 festgestellt werden. Für die Zeitpunkte 24 h p. i. und 48 h p. i. bestehen statistisch signifikante Unterschiede der mit Anti-CDPK1-Serum behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und es lassen sich dosisabhängige Effekte sehen (Abb. 15-17). Der dem Wachstumsmedium zugesetzte, polyklonale Antikörper blockiert die Entwicklung von *C. parvum*. Ähnliche Ergebnisse lieferte ein Invasionsassay mit spezifischen Antikörpern gegen CDPK3 von *Eimeria tenella* (HAN et al. 2013), der eine dosisabhängige Hemmung der Invasion von Sporozoiten ergab. *Cp*CDPK scheinen teilweise an der

Diskussion

Oberfläche von Merozoiten lokalisiert zu sein oder sezerniert zu werden und können somit von polyklonalen Antikörpern gebunden werden. Dass CDPK prinzipiell an die Oberfläche lokalisiert oder ausgeschleust werden können, wurde anhand der *Pf*CDPK1 gezeigt (MÖSKES et al. 2004).

Zusammenfassend kann für *Cp*CDPK1 anhand der Ergebnisse der RT-PCR eine stadienspezifische Expression angenommen werden. Der Immunoblot verdeutlicht die Translation der *Cp*CDPK1 und möglicherweise eine Akkumulation des Proteins in Sporozoiten vor oder unmittelbar nach der Exzystierung. Die Immunfluoreszenzresultate belegen ein Vorkommen von *Cp*CDPK1 in Sporozoiten und Merozoiten. Es wurde eine Lokalisation des Proteins auf der Oberfläche der Zysten und in der Parasitophoren Vakuole gezeigt. Die Zugabe von spezifischem Antiserum zur *In-Vitro*-Kultur sowie kometenschweifartige Fluoreszenzmuster weisen auf eine Sezernierung des Proteins hin. Eine Funktion der *Cp*CDPK1 in sexuellen Stadien von *C. parvum* ist ebenfalls möglich, kann anhand der Ergebnisse aber nicht eindeutig belegt werden. Schlussfolgend zeigt diese Arbeit eine stadienspezifische Expression von RNA und translatiertem Protein von *Cp*CDPK1 während des Entwicklungszyklus von *C. parvum in vitro*. *Cp*CDPK1 liegt in großer Menge als Enzym in Sporozoiten vor und wurde in Merozoiten lokalisiert. Da die Zeitpunkte der Transkription und Translation von *Cp*CDPK1 sehr gut mit dem in der Literatur angegebenen zeitlichen Ablauf von Invasion und Egress der Merozoiten Typ I und II korrelieren, kann eine essentielle Funktion des Enzyms für den Ablauf dieser Prozesse angenommen werden. Eine Sezernierung der *Cp*CDPK1 ist dabei wahrscheinlich.

In Weiterführung dieser Arbeit sind konfokalmikroskopische und elektronenmikroskopische Studien sowie Knock-out-Studien geplant, um die Lokalisation und Funktion der *Cp*CDPK1 und weiterer CDPK von *C. parvum* aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Manja Etzold

Stadienspezifische Expression und Lokalisation Kalzium-abhängiger Proteinkinasen (CDPK) von *Cryptosporidium parvum* in der *In-vitro*-Kultur

Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im August 2014

81 S., 19 Abb., 11 Tab., 176 Lit., 1 Anhang (6 Tabellen)

Schlüsselwörter: *Cryptosporidium parvum*, CDPK, Expression *in vitro*, 3'UTR, Real Time-PCR, Immunoblot, Immunolokalisation

Einleitung: Die Kryptosporidiose stellt aufgrund ihres zoonotischen Charakters und der Entwicklung chronischer Durchfälle bei Immunsupprimierten ein hohes Gesundheitsrisiko für den Menschen, aber ebenso für Tiere dar. Derzeit verfügbare Therapeutika ermöglichen keine zuverlässige Bekämpfung klinischer Symptome oder eine Erregerelimination, daher ist die Erforschung neuer Therapieansätze dringend notwendig. CDPK stellen in diesem Zusammenhang interessante Zielmoleküle dar, da sie zwar in Pflanzen und Protisten einschließlich Apikomplexa, jedoch nicht in Pilzen und Säugetieren vorkommen. Trotz der Entdeckung vielversprechender neuer Wirkstoffe gegen *CpCDPK1* in den letzten Jahren ist zur Lokalisation und Funktion von CDPK in *C. parvum* wenig bekannt.

Ziele der Untersuchungen: Zunächst sollten die im Genom von *C. parvum* vorhandenen CDPK phylogenetisch eingeordnet und auf strukturelle Besonderheiten sowie eine mögliche N-Acylierung untersucht werden. Weiterhin sollten diese CDPK hinsichtlich ihres Expressionsmusters *in vitro* charakterisiert werden und die Transkription von *CpCDPK1* relativ quantifiziert werden. Ferner sollte der Nachweis der Translation von *CpCDPK1* mit einem polyklonalen Anti-*CpCDPK1*-Antikörper erfolgen und das Enzym in verschiedenen Parasitenstadien lokalisiert werden.

Materialien und Methoden: Das Genom von *C. parvum* wurde gegen die Sequenz von *TgCDPK1* im NCBI Blast[®]-Programm abgeglichen. Anschließend erfolgte eine Strukturanalyse der ermittelten Sequenzen im SMART[®]-Programm und eine Untersuchung auf N-Acylierung nach BOLOGNA et. al (2004). Ein phylogenetischer Baum der CDPK von *C. parvum* und weiterer Apikomplexa wurde mit MEGA5[®] nach einem vorherigen Alignment mit der ClustalW-Funktion des Programmes erstellt.

Für die Untersuchungen zur Expression der CDPK wurde RNA zu ausgewählten Zeitpunkten *post infectionem* (p. i.) aus *C. parvum* infizierten HCT-8 Kulturen isoliert. Der Nachweis von Transkripten erfolgte durch Reverse Transkription in cDNA und einer 3'RACE-PCR mit anschließender nested PCR, um eine korrekte Amplifikation der cDNA-Enden sicherzustellen. Die Gewinnung der Parasiten erfolgte durch Passagen in neugeborenen Kälbern alle sechs Monate. Die HCT-8 Zellen wurden in 24-Well-Zellkulturplatten mit Wachstumsmedium angesetzt und bei 90% Konfluenz mit 4×10^5 Oozysten

Zusammenfassung

je Well infiziert. Für den Immunfluoreszenztest (IFAT) wurden vorher Glasplättchen auf den Boden der Wells verbracht, um später die Kulturen vollständig entnehmen zu können.

Für einen *In-vitro*-Assay wurde dem Wachstumsmedium in den Konzentrationen 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 Anti-*Cp*CDPK1-Serum zugesetzt. Die zur Antikörpergewinnung ausgewählte *Cp*CDPK1-Sequenz lag im Vorfeld als kloniertes Doppelkonstrukt in *E. coli* M15 vor, wurde im Rahmen dieser Arbeit exprimiert und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet (Firma SeqLab, Göttingen) und im Immunoblot eingesetzt. Für die Auswertung des *In-vitro*-Assay wurde *Cp*HSP70-DNA in den behandelten Gruppen (n = 12 je Serumverdünnung und Zeitpunkt p. i.) nach SHAHIDUZZAMAN et al. (2010) absolut quantifiziert und statistisch gegenüber der unbehandelten Kontrolle (n = 9) mittels IBM SPSS Statistics® 22 analysiert. Eine relative Quantifizierung von *Cp*CDPK1-cDNA erfolgte in einer weiteren RT-PCR mit *Cp*HSP70 als Normalizer und dem Zeitpunkt 3 h p. i. als Kalibrator.

Ergebnisse: Es konnten sieben CDPK im Genom von *C. parvum* identifiziert werden, welche laut Strukturanalyse bis auf *Cp*CDPK4 alle dem klassischen Grundaufbau mit einer NH₂-terminalen Domäne, einer funktionellen Ser/Thr-Kinasedomäne, einer autoinhibitorischen Verbindungsdomäne sowie vier kalziumbindenden „EF-Hand-Motiven“ am C-terminalen Ende entsprachen. Im phylogenetischen Baum wurde die hohe Homologie von *Cp*CDPK1 zu *Tg*CDPK1 herausgestellt. Sequenzanalysen ergaben für *Cp*CDPK1, *Cp*CDPK2A und *Cp*CDPK3 potentielle N-terminale Acylierungsstellen. Es konnten Transkripte aller sechs ausgewählten CDPK in Sporozoitien sowie in infizierten HCT-8 Kulturen nachgewiesen werden. Zu den Zeitpunkten 24 h, 40 h, 50 und 54 h p. i. war eine deutliche Expression mit starken Banden zu beobachten. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit dem Ablauf der ersten Merogonie 24 h p. i. sowie der zweiten Merogonie, die *in vitro* etwa 48 h p. i. angenommen wird. Die relative Quantifizierung der *Cp*CDPK1 spiegelt diese Ergebnisse wider, muss methodisch jedoch kritisch betrachtet werden. Im Immunoblot reagierte der Anti-*Cp*CDPK1-Antikörper stark mit einem Antigen von 56 kDa in Proteinextrakten frisch exzystierter Sporozoitien, welches mit dem spezifischen Molekulargewicht der *Cp*CDPK1 von 55,72 kDa korreliert. Im Immunoblot gelang kein Nachweis von *Cp*CDPK1 in infizierten HCT-8 Kulturen. Demgegenüber wurde *Cp*CDPK1 mit der Immunfluoreszenz auf der Oberfläche der Zoiten und in der Parasitophoren Vakuole gezeigt. Ein *In-vitro*-Assay mit Anti-*Cp*CDPK1-Serum sowie kometschweifartige Fluoreszenzmuster weisen auf eine Sezernierung des Proteins hin.

Schlussfolgerungen: Diese Arbeit belegt die Transkription von sechs *Cp*CDPK *in vitro* und beschreibt erstmals die Länge der 3'UTR von *Cp*CDPK. Die Translation wurde durch den Nachweis spezifischen Proteins in Sporozoitien im Immunoblot sowie die Lokalisation von *Cp*CDPK1 mit Hilfe der Immunfluoreszenz belegt. Möglicherweise wird die *Cp*CDPK1 durch N-Myristoylierung an Membranen gebunden, an die Oberfläche von Zoiten gebracht und sezerniert. Eine Rolle des Enzyms im Invasions- und Egressmechanismus des Parasiten wird diskutiert.

7 Summary

Manja Etzold

Stage-specific expression and localisation of calcium-dependent protein kinases (CDPK) of *Cryptosporidium parvum* under culture conditions

Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University Leipzig

Submitted in August 2014

81 pp., 19 fig., 11 tables, 176 ref., 1 app. (6 tables)

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, CDPK, Expression *in vitro*, 3'UTR, Real Time-PCR, Immunoblot, Immunolocalisation

Introduction: Cryptosporidiosis bears a high health risk for humans because of its zoonotic impact. It may cause chronic diarrhoea in immunocompromised individuals and disease in animals. Current therapies do not control clinical symptoms satisfactorily or eliminate the pathogen. Therefore investigating new therapeutic approaches is urgently required. In this context CDPK are interesting target molecules, because they are expressed in plants and protists including apicomplexa, but neither in fungi nor animals. Despite the detection of promising new agents against *CpCDPK1* within the last few years, little is known about the localisation and function of CDPK in *C. parvum*.

Aims of the research: For a start the phylogenetic classification of CDPK in the genome of *C. parvum* as well as the detection of their structural peculiarities and potential acylation sites should be analysed. Furthermore the *in vitro* expression pattern of CDPK should be characterised and the transcription of *CpCDPK1* should be quantified by means of relative RT-PCR. With a polyclonal antibody against *CpCDPK1* translated protein should be detected and localised in different parasite stages.

Material and methods: The genome of *C. parvum* was blasted against the sequence of *TgCDPK1* with NCBI Blast[®]. Afterwards the structure of the found sequences was analysed with the SMART[®]-program and N-acylation sites were searched according to BOLOGNA et al. (2004). A phylogenetic tree of CDPK of *C. parvum* considering also other apicomplexa was created using the MEGA5[®]-software after an alignment with the ClustalW-function of the program was built.

The expression was determined by isolating RNA at different points in time *post infectionem* (p. i.) from *C. parvum*-infected HCT-8 cultures. Transcripts were detected using reverse transcription and the 3-prime nested PCR to ensure the correct amplification of cDNA-ends. The parasites were produced by passages through neonatal calves every six months. The HCT-8 cells were seeded in monolayers to 90 % confluency in 24-well cell culture plates with growth medium and infected with 4 x 10⁵ oocysts per well. In the Immunfluorescence-Assay (IFA) culture plates were prepared with glass

Summary

platelets at the bottom of each well to allow the removal of the whole culture for analysis. The antiserum was produced by immunisation of rabbits (SeqLab, Göttingen) with a protein prepared from a unique sequence of *CpCDPK1* cloned in *E. coli* M 15 as a double construct. The antibody was used for immunoblot and immunofluorescence. In an *in-vitro* assay growth medium was supplemented with anti-*CpCDPK1* serum in ratios of 1:10, 1:50, 1:100 and 1:500 and applied to HCT-8 cultures infected with *C. parvum*. *CpHSP70*-DNA from the serum-treated groups ($n = 12$ for each dilution and time point) was quantified absolutely using the real-time (RT)-PCR method according to SHAHIDUZZAMAN et al. (2010). The results were statistically compared to the untreated samples ($n = 9$) with IBM SPSS Statistics® 22. For a relative quantification of *CpCDPK1*-cDNA another RT-PCR method normalised with *CpHSP70* was performed with the 3 h p. i. value as calibrator.

Results: Seven CDPK were identified in the genome of *C. parvum*. The structures of all *CpCDPK* correspond to the canonical domain structure with an NH₂-terminal domain, a functional Ser/Thr-kinase domain, an autoinhibitory junction and four calcium-binding EF-hands at the C-terminal end, except for *CpCDPK4*. The phylogenetic tree underlines the high homology between *CpCDPK1* and *TgCDPK1*. *CpCDPK1*, *CpCDPK2A* and *CpCDPK3* contain potential N-terminal acylation sites. Transcripts of all six selected CDPK were detected in sporozoites as well as in infected HCT-8 cultures at 24 h, 40 h, 50 and 54 h p. i. The expression pattern corresponded well to the course of the first merogony 24 h p. i. *in vitro* and the second merogony, which is assumed to proceed 48 h p. i. The relative quantification of *CpCDPK1* confirmed those results, but the method has to be regarded critically. In the immunoblot the anti-*CpCDPK1* antibody showed a strong reaction with an antigen of 56 kDa in extracts of freshly excysted sporozoites, which corresponded to the specific molecular weight of *CpCDPK1* of 55.72 kDa. A detection of *CpCDPK1*-protein in the immunoblot in extracts of infected HCT-8 cultures failed. In contrast, *CpCDPK1* was shown by IFA on the surface of zoites and in the parasitophorous vacuole. The results of *in vitro* culture in the presence of anti-*CpCDPK1* serum and fluorescence patterns like a comet's tail indicated that the protein is secreted.

Conclusions: The transcription of six *CpCDPK in vitro* was shown and the length of the 3'UTR is described for the first time. Translation is proven by the detection of specific protein in the immunoblot as well as the fluorescence of *CpCDPK* after immunostaining. *CpCDPK1* is possibly bound to membranes via N-myristoylation, flipped to the surface of zoites and secreted. *CpCDPK1* was found in the parasitophorous vacuole. The role of the enzyme within the mechanisms of invasion and egress is discussed.

8 Literaturverzeichnis

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 2004;304(5669):441-445.

Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, Usman NK, Hunter PR. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;63(4):387-393.

Alcock F, Webb CT, Dolezal P, Hewitt V, Shingu-Vasquez M, Likic VA et al. A small Tim homohexamer in the relict mitochondrion of *Cryptosporidium*. *Mol Biol Evol*. 2012;29(1):113-122.

Arrowood MJ. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(3):390-400.

Artz JD, Wernimont AK, Allali-Hassani A, Zhao Y, Amani M, Lin YH et al. The *Cryptosporidium parvum* kinome. *BMC Genomics*. 2011;12 (478). doi: 10.1186/1471-2164-12-478.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res*. 2011;45(20):6603-6614.

Bansal A, Singh S, More KR, Hans D, Nangalia K, Yogavel M et al. Characterisation of *Plasmodium falciparum* calcium dependent protein kinase 1 (*Pf*CDPK1) and its role in microneme secretion during erythrocyte invasion. *J Biol Chem*. 2013;288:1590-1602.

Barta JR, Thompson RC. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol*. 2006;22:463-468.

Baum J, Gilberger TW, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol*. 2008;24(12):557-563.

Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW et al. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem*. 2006;281(8):5197-5208.

Beck HP, Blake D, Darde ML, Felger I, Pedraza-Diaz S, Regidor-Cerrillo J et al. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int J Parasitol*. 2009; 39(2):175-189.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:11-21.

Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*. 2004;117:503-514.

Billker O, Lourido S, Sibley LD. Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites. *Cell Host Microbe*. 2009;5(6):612-622.

Literaturverzeichnis

- Bologna G, Yvon C, Duvaud S, Veuthey AL. N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics*. 2004;4(6):1626-1632.
- Bonnin A, Gut J, Dubremetz JF, Nelson RG, Camerlynck P. Monoclonal-antibodies identify a subset of dense granules in *Cryptosporidium parvum* zoites and gamonts. *J Eukaryot Microbiol*. 1995;42(4):395-401.
- Bonnin A, Lapillonne A, Petrella T, Lopez J, Chaponnier C, Gabbiani G et al. Immunodetection of the microvillous cytoskeleton molecules villin and ezrin in the parasitophorous vacuole wall of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). *Eur J Cell Biol*. 1999;78(11):794-801.
- Borowski H, Clode PL, Thompson RCA. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol*. 2008;24(11):509-516.
- Borowski H, Thompson RC, Armstrong T, Clode PL. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an *in vitro* model system. *Parasitology*. 2010;137(1):13-26.
- Boudsocq M, Sheen J. CDPK in immune and stress signaling. *Trends Plant Science*. 2013;18(1):30-40.
- Brockmann SO, Dreweck C, Wagner-Wiening C, Hagen RM, Kimmig P, Petry F et al. Serological and epidemiological analysis of an outbreak of gastroenteritis among military recruits in Germany caused by *Cryptosporidium parvum*. *Infection*. 2008;36(5):450-457.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*. 2004;38(4):818-862.
- Carreno RA, Martin DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res*. 1999;85(11):899-904.
- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. 1997;73(2):114-123.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol*. 1999;1(3):225-235.
- Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. 1999;31(2):421-428.
- Casey P. Protein lipidation in cell signaling. *Science*. 1995;268(5208):221-225.

Literaturverzeichnis

- Castellanos-Gonzalez A, White Jr. AC, Ojo KK, Vidadala RSR, Zhang Z, Reid MC et al. A novel calcium-dependent protein kinase inhibitor as a lead compound for treating cryptosporidiosis. *J Infect Diseases*. 2013;208(8):1342-1348.
- Chatterjee A, Banerjee S, Steffen M, O'Connor RM, Ward HD, Robbins PW et al. Evidence for mucin-like glycoproteins that tether sporozoites of *Cryptosporidium parvum* to the inner surface of the oocyst wall. *Eukaryot Cell*. 2010;9(1):84-96.
- Chen XM, O'Hara SP, Huang BQ, Nelson JB, Lin JJ, Zhu G et al. Apical organelle discharge by *Cryptosporidium parvum* is temperature, cytoskeleton, and intracellular calcium dependent and required for host cell invasion. *Infect Immun*. 2004;72(12):6806-6816.
- Chen XM, O'Hara SP, Huang BQ, Splinter PL, Nelson JB, LaRusso NF. Localized glucose and water influx facilitates *Cryptosporidium parvum* cellular invasion by means of modulation of host-cell membrane protrusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(18):6338-6343.
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*. 2002;129(2):469-485.
- Chobotar W, Scholtyseck E. Ultrastructure. In: Long PL, Hrsg. *Biology of the Coccidia*. Baltimore: University Park Press; 1982. p. 101-165.
- Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF, Chazin WJ. Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29092-29100.
- Current WL. *Cryptosporidium* spp. In: Walzer PW, Genta RM, Hrsg. *Parasitic Infections of the Immunocompromised Host*. New York, Basel: Marcel Dekker; 1989. P. 251-341.
- Danciger M, Kozak CA, Adamson MC, Farber DB. Chromosomal localization of the murine genes for the alpha- and beta-subunits of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Mamm Genome* 1992;3(2):122-125.
- Dawson D. Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol*. 2005;103(2):207-227.
- De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*. 1999;29(8):1269-1287.
- Del CV, Cordoba MA, Sidoti A, Santin M, Drut R, Basualdo JA. Experimental infection with *Cryptosporidium parvum* IIAA21G1R1 subtype in immunosuppressed mice. *Vet Parasitol*. 2012;190(3-4):411-417.
- DiCesare EA, Hargreaves BR, Jellison KL. Biofilms reduce solar disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(12):4522-4525.
- Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect*. 2002; 4(10):1059-1066.

Literaturverzeichnis

- Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol Microbiol. 1997a;26: 163-173.
- Dobrowolski JM, Niesman IR, Sibley LD. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. Cell Motil Cytoskeleton. 1997b;37:253-262.
- Drozdowicz YM, Shaw M, Nishi M, Striepen B, Liwinski HA, Roos DS et al. Isolation and characterization of TgVP1, a type I vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*. The dynamics of its subcellular localization and the cellular effects of a diphosphonate inhibitor. J Biol Chem. 2003;278(2):1075-1085.
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. Int J Parasitol. 1998;28(7):1007-1013.
- Dvorin JD, Martyn DC, Patel SD, Grimley JS, Collins CR, Hopp CS et al. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. Science. 2010;328(5980):910-912. doi: 10.1126/science.1188191
- Dyachenko V. Identifizierung einer Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne bei *Eimeria bovis* und Studien zu ihrer Lokalisation im Parasiten [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2006.
- Dyachenko V, Kuhnert Y, Schmaeschke R, Etzold M, Pantchev N, Dausgshies A. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. genotypes in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus* L.) in Germany. Parasitology. 2010;137(2):205-216.
- Edwards H, Thompson RCA, Koh WH, Clode PL. Labeling surface epitopes to identify *Cryptosporidium* life stages using a scanning electron microscopy-based immunogold approach. Mol Cell Probes. 2012;26(1):21-28.
- Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. Int J Parasitol. 2012;42(7):675-682.
- Farazi TA, Waksman G, Gordon JI. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. J Biol Chem. 2001;276(43):39501-39504.
- Färber PM, Graeser R, Franklin RM, Kappes B. Molecular cloning and characterization of a second calcium-dependent protein kinase of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1997;87(2):211-216.
- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol. 2004;126(1-2):37-56.
- Fayer R. General biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R, Xiao L, Hrsg. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press; 2008a. p. 1-56.

Literaturverzeichnis

- Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 2012;111(3):1349-1355.
- Flanigan TP, Aji T, Marshall R, Soave R, Aikawa M, Kaetzel C. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell-line. *Infect Immun.* 1991;59(1):234-239.
- Forney JR, DeWald DB, Yang S, Speer CA, Healey MC. A role for host phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal remodeling during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* 1999;67(2):844-852.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002;419(6906):498-511.
- Gargala G. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite.* 2008;15(3):275-281.
- Green JL, Rees-Channer RR, Howell SA, Martin SR, Knuepfer E, Taylor HM et al. The motor complex of *Plasmodium falciparum*: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2008;283(45):30980-30989. doi: 10.1074/jbc.M803129200
- Hakansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 2001;20(12):3132-3144.
- Han HY, Zhu SH, Jiang LL, Li Y, Dong H, Zhao QP et al. Molecular characterization and analysis of a novel calcium-dependent protein kinase from *Eimeria tenella*. *Parasitology.* 2013;140(6):746-755.
- Harmon AC. Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravit Space Biol Bull.* 2003;16(2):83-90.
- Harper JF, Breton G, Harmon A. Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:263-288.
- Harper JF, Harmon A. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signaling connection. *Mol Cell Biol.* 2005;6(7):555-566.
- Heine J. An Easy Technique for the Demonstration of Cryptosporidia in Feces. *J Vet Med.* 1982;29(4):324-327.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Morgan UM, Thompson RC. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol.* 2001;31(10):1048-1055.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ryan UM, Olson ME, Thompson RC. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 2002;32(14):1719-1726.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT et al. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol.* 2004;34(7):769-777.

Literaturverzeichnis

- Holmberg SD, Moorman AC, Von Bargen JC, Palella FJ, Loveless MO, Ward DJ et al. Possible effectiveness of clarithromycin and rifabutin for cryptosporidiosis chemoprophylaxis in HIV disease. HIV out patient study. *J Am Vet Med Assoc.* 1998;279(5):384-386.
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N et al. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 2003;132(2):666-680.
- Huang J, Mullapudi N, Lancto CA, Scott M, Abrahamsen MS, Kissinger JC. Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. *Genome Biol.* 2004;5(11):R88. doi: 10.1186/gb-2004-5-11-r88
- Hunter PR, Hadfield SJ, Wilkinson D, Lake IR, Harrison FC, Chalmers RM. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(1):82-88.
- Huynh MH, Carruthers VB. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathg.* 2006;2:753-762. doi: 10.1371/journal.ppat.0020084
- Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, Yuda M. A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol.* 2006;59(4):1175–1184.
- Jewett TJ, Sibley LD. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell.* 2003;11(4):885-894.
- Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Dauschies A. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet Parasitol.* 2003;112(4):277-288.
- Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science.* 2009;323(5913):530-533.
- Karanis P, Aldeyarbi HM. Evolution of *Cryptosporidium in vitro* culture. *Int J Parasitol.* 2011;41(12):1231-1242.
- Kato K, Sudo A, Kobayashi K, Tohya Y, Akashi H. Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;162(1):87-95.
- Kato K, Sudo A, Kobayashi K, Sugi Y, Tohya Y, Akashi H. Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4. *Parasitol. Int.* 2009;58(4):394-400.
- Keithly JS, Langreth SG, Buttle KF, Mannella CA. Electron tomographic and ultrastructural analysis of the *Cryptosporidium parvum* relict mitochondrion, its associated membranes, and organelles. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(2):132-140.
- Kieschnick H, Wakefield T, Narducci CA, Beckers C. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J Biol Chem.* 2001;276(15):12369-12377.
- Klimecka M, Muszynska G. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol.* 2007;54(2):219-233.

Literaturverzeichnis

- Lal K, Prieto JH, Bromley E, Sanderson SJ, Yates JR, Wastling JM, Tomley FM, Sinden RE. Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles: an ookinete microneme proteome. *Proteomics*. 2009;9(5):1142–1151.
- Landers SC. *Pterospira floridiensis*, a new species of acephaline gregarine (Apicomplexa) from the maldanid polychaete *Axiiothella mucosa* in St. Andrew Bay, Florida. *Syst Parasitol*. 2001;48(1):55-59.
- Larson ET, Ojo KK, Murphy RC, Johnson SM, Zhang ZS, Kim JE et al. Multiple determinants for selective inhibition of apicomplexan calcium-dependent protein kinase CDPK1. *J Med Chem*. 2012;55(6):2803-2810.
- Lauciello L, Kappes B, Scapozza L, Perozzo R. Expression, purification and biochemical characterization of recombinant Ca-dependent protein kinase 2 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protein Expr Pur*. 2013;90(2):170-177.
- Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, Poncet J, Bradley PJ, Vial HJ, Dubremetz JF. The rhoptry neck protein RON4 relocates at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol*. 2005;7:1823-1833.
- Lee JY, Yoo BC, Harmon AC. Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry*. 1998;37:6801-6809.
- Levine ND. The Protozoan Phylum Apicomplexa. CRC Press, Boca Raton, Fla 1988; Vol 1 and 2.
- Li JL, Baker DA, Cox LS. Sexual-stage-specific expression of a third calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1491(1-3):341-349.
- Li X, Atwill ER, Dunbar LA, Tate KW. Effect of daily temperature fluctuation during the cool season on the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(4):989-993.
- Lim DC, Cooke BM, Doerig C, Saeij JPJ. *Toxoplasma* and *Plasmodium* protein kinases: Roles in invasion and host cell remodelling. *Int J Parasitol*. 2012;42(1):21-32.
- Liu J, Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS, Enomoto S. Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected Human intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 2009;77(2):837-849.
- Lodoen MB, Gerke C, Boothroyd JC. A highly sensitive FRET based approach reveals secretion of the actin binding protein toxofilin during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Microbiol*. 2010;12(1):55-66.
- Lourido S, Shuman J, Zhang C, Shokat KM, Hui R, Sibley LD. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. *Nature* 2010;465(7296):359-362.
- Lovett JL, Marchesini N, Moreno SN, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem*. 2002;277(29):25870-25876.
- Lu SX, Hrabak EM. An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmatic reticulum. *Plant Physiol*. 2002;128(3):1008-1021.

Literaturverzeichnis

- Lumb R, Smith K, O'Donoghue PJ, Lanser JA. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol Res.* 1988;74(6):531-536.
- Luo S, Vieira M, Graves J, Zhong L, Moreno SN. A plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase co-localizes with a vacuolar H⁺-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *EMBO.* 2001;20(1-2):55-64.
- Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in aerobic parasitic protozoa. *Biochimie.* 2014;100:3-17. doi: 10.1016/j.biochi.2013.11.018
- Martin ML, Busconi L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant Journal.* 2000;24(4):429-435.
- Matuschewski K, Schüler H. Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem.* 2008;47:110-120.
- Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(2):91-98.
- McCoy JM, Whitehead L, Van Dooren GG, Tonkin CJ. *TgCDPK3* regulates calcium-dependent egress of *Toxoplasma gondii* from host cells. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003066. doi: 10.1371/journal.ppat.1003066
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun.* 2004;72(10):6061-6067.
- Miranda K, De Souza W, Plattner H, Hentschel J, Kawazoe U, Fang J, Moreno SN. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. *Exp Parasitol.* 2008;118(1):2-9.
- Mondragon R, Frixione E. Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43(2):120-127.
- Moreno SN, Ayong L, Pace DA. Calcium storage and function in apicomplexan parasites. *Essays Biochem.* 2011;51:97-110.
- Moreno SN, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(4):359-364.
- Moreno SN, Zhong L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem J.* 1996;313(Pt2):655-659.
- Morlon-Guyot J, Berry L, Chen CT, Gubbels MJ, Lebrun M, Daher W. The *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 7 is involved in early steps of parasite division and is crucial for parasite survival. *Cell Microbiol.* 2013;16(1):95-114. doi:10.1111/cmi.12186.
- Morrisette NS, Murray JM, Roos DS. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 1997;110(Pt1):35-42.

Literaturverzeichnis

- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(1):21-38.
- Möskes C, Burghaus PA, Wernli B, Sauder U, Durrenberger M, Kappes B. Export of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1 to the parasitophorous vacuole is dependent on three N-terminal membrane anchor motifs. *Mol Microbiol* 2004; 54(3):676-691.
- Murphy RC, Ojo KK, Larson ET, Castellanos-Gonzalez A, Perera BG, Keyloun KR et al. Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Calcium-Dependent Protein Kinase 1 (CDPK1) from *C. parvum* and *T. gondii*. *ACS Med Chem Lett* 2010;1(7):331-335.
- Naciri M, Mancassola R, Fort G, Danneels B, Verhaeghe J. Efficacy of amine-based disinfectant KENO™COX on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol.* 2011;179(1-3):43-49.
- Nagamune K, Hicks LM, Fux B, Brossier F, Chini EN, Sibley LD. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 2008;451(7175):207-210.
- Nagamune K, Moreno SN, Chini EN, Sibley LD. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem.* 2008;47:70-81.
- Nagamune K, Sibley LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol.* 2006;23(8):1613-1627.
- O'Hara SP, Chen XM. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect.* 2011;13(8-9):721-730.
- Ojo KK, Larson ET, Keyloun KR, Castaneda LJ, DeRocher AE, Inampudi KK et al. *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 is a target for selective kinase inhibitors. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(5):602-607.
- Pancieria RJ, Thomassen RW, Garner FM. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol.* 1971;8(5-6):479-484.
- Pantchev N, Rüschoff B, Kamhuber-Pohl A, Biron K. Kryptosporidiose-Therapie bei Leopardgeckos (*Eublepharis macularius*) mit Azithromycin (Zithromax®) und Paromomycinsulfat (Humatin®) – Fallbeispiele und Literaturübersicht. *Kleintierpraxis.* 2008;53:95-104.
- Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trend Biochem Sci.* 2005;30(6):286-290.
- Pearson GR, Logan EF. The pathology of neonatal enteritis in calves with observations on *E. coli*, rotavirus and *Cryptosporidium*. *Ann Rech Vet.* 1983;14(4):422-426.
- Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* 2011;585:1551-1562.

Literaturverzeichnis

- Petry F, Jakobi V, Wagner S, Tessema TS, Thiel S, Loos M. Binding and activation of human and mouse complement by *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and susceptibility of C1q- and MBL-deficient mice to infection. *Mol Immunol*. 2008;45(12):3392-3400.
- Petry F, Kneib I, Harris JR. Morphology and *in vitro* infectivity of sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol*. 2009;95(5):1243-1246.
- Pezzella-D'Alessandro N, Le Moal H, Bonhomme A, Valere A, Klein C, Gomez-Marin J et al. Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii*. *J Histochem Cytochem*. 2001;49:445-454.
- Pohlenz J. [Cryptosporidiosis in humans and animals]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*. 1987;94(2):67-70.
- Putignani L, Tait A, Smith HV, Horner D, Tovar J, Tetley L et al. Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. 2004;129(Pt 1):1-18.
- Ranjan R, Ahmed A, Gourinath S, Sharma P. Dissection of mechanisms involved in the regulation of *Plasmodium falciparum* calcium dependent protein kinase 4 (*PfCDPK4*). *J. Biol. Chem*. 2009;284(22):15267-76. doi: 10.1074/jbc.M900656200
- Reduker DW, Speer CA, Blixt JA. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. *J Protozool*. 1985;32(4):708-711.
- Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1451(1):1-16.
- Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, Chan JA, Foley M, Baum J et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14815-14822.
- Roberts CW, Roberts F, Henriquez FL, Akiyoshi D, Samuel BU, Richards TA et al. Evidence for mitochondrial-derived alternative oxidase in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: a potential anti-microbial agent target. *Int J Parasitol*. 2004;34(3):297-308.
- Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. 1993;106(Pt1):13-19.
- Robertson LJ. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiol Infect*. 2009;137(7):913-921.
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J*. 2001;20(20):5556-5567.
- Rosales MJ, Mascaro C, Osuna A. Ultrastructural study of *Cryptosporidium* development in Madin-Darby canine kidney cells. *Vet Parasitol*. 1993;45(3-4):267-273.

Literaturverzeichnis

- Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, Oecking C, Schaller A. *LeCPK1*, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol.* 2002;129(1):156-168.
- Ryan U, Power M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology.* 2012;139(13):1673-1688.
- Sam-Yellowe TY. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today.* 1996;12(8):308-316.
- Scholtyssek E, Mehlhorn H, Friedhoff K. The fine structure of the conoid of sporozoa and related organisms. *Z Parasitenkd.* 1970;34:68-94.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(11):5857-5864.
- Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Keidel J, Schmäsche R, Dauschies A. Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. *Vet Parasitol.* 2010;167(1):43-49.
- Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 2004;304(5668):248-253.
- Sifuentes LY, Di Giovanni GD. Aged HCT-8 cell monolayers support *Cryptosporidium parvum* infection. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(23):7548-7551.
- Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(9):3669-3675.
- Stein B, Stover L, Gillem A, Winters K, Leet JH, Chauret C. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst *in vitro* attachment to host cells. *J Parasitol.* 2006;92(1):1-9.
- Sugi T, Kato K, Kobayashi K, Watanabe S, Kurokawa H, Gong H et al. Use of the kinase inhibitor analog 1NM-PP1 reveals a role for *Toxoplasma gondii* CDPK1 in the invasion step. *Eukaryotic Cell.* 2010;9(4):667-670.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-2739.
- Templeton TJ, Enomoto S, Chen WJ, Huang CG, Lancto CA, Abrahamsen MS et al. A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. *Mol Biol Evol.* 2010;27(2):235-248.
- Tetley L, Brown SM, McDonald V, Coombs GH. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology.* 1998;144(12):3249-3255.
- Tewari R, Dorin D, Moon R, Doerig C, Billker O. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol.* 2005;58(5):1253-1263.

Literaturverzeichnis

- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Adv Parasitol.* 2005;59:79-137.
- Toso MA, Omoto CK. *Gregarina niphandrodes* may lack both a plastid genome and organelle. *J Eukaryot Microbiol.* 2007;54(1):66-72.
- Towler DA, Gordon JI, Adams SP, Glaser L. Biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:66-99.
- Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Exp Biol Med.* 1907;5:12-13.
- Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiol Lett.* 1994a;118(3):233-236.
- Upton SJ, Tilley M, Nesterenko MV, Brillhart DB. A simple and reliable method of producing in vitro infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiol Lett.* 1994b;118(1-2):45-49.
- Vaid A, Thomas DC, Sharma P. Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5589-97.
- Valigurova A, Jirku M, Koudela B, Gelnar M, Modry D, Slapeta J. *Cryptosporidia*: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int J Parasitol.* 2008;38(8-9):913-922.
- Viu M, Quilez J, Sanchez-Acedo C, Del Cacho E, Lopez-Bernad F. Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Vet Parasitol.* 2000;90(3):163-170.
- Wernimont AK, Artz J, Finerty PJ, Lin YH, Amani M, Allali-Hassani A et al. Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal to mechanism of activation by calcium. *Nat Struc Mol Biol.* 2010;17(5):596-602.
- Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibley LD. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect Immun.* 2005;73(9):5379-5387.
- Wingender J, Flemming HC. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(6):417-423.
- Woodmansee DB, Pohlenz JFL. Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line. Proceedings of the 4th International Symposium on Neonatal Diarrhea; 1983 Oct 3-5; Saskatoon, Canada. Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, 1984.
- Wurzinger B, Mair A, Pfister B, Teige M. Cross-talk of calcium-dependent protein kinase and MAP kinase signaling. *Plant Signal Behav.* 2011;6(1):8-12.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):80-89.
- Zhang XS, Choi JH. Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J Mol Evol.* 2001;53(3):214-224.

Literaturverzeichnis

Zhao Y, Kappes B, Franklin RM. Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. J Biol Chem. 1993;268(6):4347-4354.

Zhu G, Keithly JS, Philippe H. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(Pt4):1673-1681.

9 Anhang

Tabelle 12: Übersicht in dieser Arbeit verwendeter Proteinsequenzen für molekulare und phylogenetische Analysen

Sequenzbezeichnung	Accession number (PubMed)	Referenz
<i>Cp</i> CDPK1 (cgd3_920)	XP_001388096	ABRAHAMSEN et al. (2004)
<i>Cp</i> CDPK2 (cgd7_1840)	XP_628361	
<i>Cp</i> CDPK2A (cgd2_1060)	BAJ77864	YAMAGISHI et al. (2011)
<i>Cp</i> CDPK3 (cgd5_820)	XP_626035	ABRAHAMSEN et al. (2004)
<i>Cp</i> CDPK4 (cgd7_40)	XP_628201	
<i>Cp</i> CDPK5 (cgd2_1300)	XP_626355	
<i>Cp</i> CDPK6 (cgd4_3330)	EAZ51264	
<i>Tg</i> CDPK1	AAG53993	KIESCHNICK et al. (2001)
<i>Tg</i> CDPK2	AAG53994	
<i>Tg</i> CDPK2B	EEA99629	LORENZI et al. (2008) direkt bei NCBI-GenBank® eingereicht
<i>Tg</i> CDPK3	EEB03218	
<i>Tg</i> CDPK4	EEB04882	
<i>Tg</i> CDPK5	EEA99028	
<i>Tg</i> CDPK6	EEB03506	
<i>Eb</i> CDPK1	ACP74204	DYACHENKO (2006)
<i>Pf</i> CDPK1	CAA47704	ZHAO et al. (2006)
<i>Pf</i> CDPK2	O15865	FÄRBER et al. (2007)
<i>Pf</i> CDPK3	Q9NJU9	LI et al. (2000)
<i>Pf</i> CDPK4	Q8IBS5	GARDNER et al. (2002)
<i>Pf</i> CDPK5	CAD52514	HARRIS et al. (2009) direkt bei NCBI-GenBank® eingereicht
Camk2B <i>Mus musculus</i>	NP_031621	DANCIGER et al. (1992)

Anhang

Tabelle 13: In Vitro-Assay mit Anti-CpCDPK1-Serum 3 h p. i.: Ct-Werte und CpHSP70-DNA-Kopienzahlen aus drei Versuchen der RT-PCR

Versuch 3 h p. i.	Well Name	Ct (dRn)	Kopienzahl (CpHSP70)
16.02.2010	AK 1:10	32,78	2,68E+02
16.02.2010	AK 1:10	33,15	2,02E+02
16.02.2010	AK 1:10	32,82	2,60E+02
16.02.2010	AK 1:10	32,19	4,20E+02
25.10.2011	AK 1:10	31,94	5,08E+02
25.10.2011	AK 1:10	32,25	4,00E+02
25.10.2011	AK 1:10	32,95	4,13E+02
25.10.2011	AK 1:10	32,85	4,43E+02
29.02.2012	AK 1:10	32,87	4,37E+02
29.02.2012	AK 1:10	32,79	6,21E+02
29.02.2012	AK 1:10	32,73	6,47E+02
29.02.2012	AK 1:10	32,58	7,12E+02
16.02.2010	AK 1:50	32,79	2,66E+02
16.02.2010	AK 1:50	32,62	3,02E+02
16.02.2010	AK 1:50	32,73	2,79E+02
16.02.2010	AK 1:50	32,4	3,58E+02
25.10.2011	AK 1:50	32,19	4,20E+02
25.10.2011	AK 1:50	32,45	3,45E+02
25.10.2011	AK 1:50	32,76	4,70E+02
25.10.2011	AK 1:50	32,37	6,04E+02
29.02.2012	AK 1:50	32,4	5,94E+02
29.02.2012	AK 1:50	32,3	8,53E+02
29.02.2012	AK 1:50	31,98	1,05E+03
29.02.2012	AK 1:50	32,23	8,90E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,26	1,86E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,79	1,24E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,34	1,75E+02
16.02.2010	AK 1:100	31,69	6,13E+02
25.10.2011	AK 1:100	31,68	6,17E+02
25.10.2011	AK 1:100	31,83	5,49E+02

Anhang

25.10.2011	AK 1:100	32,28	6,43E+02
25.10.2011	AK 1:100	30,85	1,63E+03
29.02.2012	AK 1:100	30,87	1,61E+03
29.02.2012	AK 1:100	31,78	1,19E+03
29.02.2012	AK 1:100	31,94	1,07E+03
29.02.2012	AK 1:100	31,91	1,10E+03
16.02.2010	AK 1:500	34,22	8,96E+01
16.02.2010	AK 1:500	33,88	1,16E+02
16.02.2010	AK 1:500	34,21	9,00E+01
16.02.2010	AK 1:500	31,46	7,31E+02
25.10.2011	AK 1:500	31,53	6,92E+02
25.10.2011	AK 1:500	30,63	1,88E+03
25.10.2011	AK 1:500	30,63	1,88E+03
25.10.2011	AK 1:500	30,69	1,82E+03
29.02.2012	AK 1:500	31,45	1,47E+03
29.02.2012	AK 1:500	31,45	1,47E+03
29.02.2012	AK 1:500	31,64	1,30E+03
29.02.2012	AK 1:500	no CT	---
16.02.2010	ohne AK	33,03	2,21E+02
16.02.2010	ohne AK	32,88	2,47E+02
16.02.2010	ohne AK	32,76	2,71E+02
25.10.2011	ohne AK	31,4	1,14E+03
25.10.2011	ohne AK	31,35	1,18E+03
25.10.2011	ohne AK	31,38	1,16E+03
29.02.2012	ohne AK	31,31	1,61E+03
29.02.2012	ohne AK	31,54	1,39E+03
29.02.2012	ohne AK	31,38	1,55E+03

AK: Antikörper

Ct: Threshold cycle

dRn: Baseline-korrigierte normalisierte Fluoreszenz

Anhang

Tabelle 14: *In Vitro*-Assay mit Anti-CpCDPK1-Serum 24 h p. i.: Ct-Werte und CpHSP70-DNA-Kopienzahlen aus drei Versuchen der RT-PCR

Versuch 24 h p. i.	Well Name	Ct (dRn)	Kopienzahl (CpHSP70)
16.02.2010	AK 1:10	31,33	1,13E+03
16.02.2010	AK 1:10	31,13	1,31E+03
16.02.2010	AK 1:10	31,17	1,27E+03
16.02.2010	AK 1:10	32,51	4,53E+02
25.10.2011	AK 1:10	32,72	3,86E+02
25.10.2011	AK 1:10	32,79	3,66E+02
25.10.2011	AK 1:10	36,85	9,18E+01
25.10.2011	AK 1:10	36,35	1,28E+02
29.02.2012	AK 1:10	35,95	1,67E+02
29.02.2012	AK 1:10	34,62	1,15E+02
29.02.2012	AK 1:10	34,32	1,41E+02
29.02.2012	AK 1:10	34,4	1,33E+02
16.02.2010	AK 1:50	33,73	1,77E+02
16.02.2010	AK 1:50	33,69	1,83E+02
16.02.2010	AK 1:50	34,01	1,43E+02
16.02.2010	AK 1:50	33,15	2,77E+02
25.10.2011	AK 1:50	33,07	2,94E+02
25.10.2011	AK 1:50	33,36	2,36E+02
25.10.2011	AK 1:50	34,78	3,63E+02
25.10.2011	AK 1:50	34,81	3,54E+02
29.02.2012	AK 1:50	34,19	5,34E+02
29.02.2012	AK 1:50	33,11	3,14E+02
29.02.2012	AK 1:50	33,46	2,48E+02
29.02.2012	AK 1:50	33,19	2,97E+02
16.02.2010	AK 1:100	32,66	4,04E+02
16.02.2010	AK 1:100	32,71	3,90E+02
16.02.2010	AK 1:100	32,65	4,08E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,51	2,11E+02
25.10.2011	AK 1:100	33,11	2,86E+02
25.10.2011	AK 1:100	33,11	2,86E+02
25.10.2011	AK 1:100	33,01	1,17E+03

Anhang

25.10.2011	AK 1:100	33,11	1,09E+03
29.02.2012	AK 1:100	32,8	1,34E+03
29.02.2012	AK 1:100	31,78	7,57E+02
29.02.2012	AK 1:100	31,95	6,77E+02
29.02.2012	AK 1:100	31,84	7,25E+02
16.02.2010	AK 1:500	32,95	3,24E+02
16.02.2010	AK 1:500	33,41	2,27E+02
16.02.2010	AK 1:500	33,58	1,99E+02
16.02.2010	AK 1:500	32,82	3,58E+02
25.10.2011	AK 1:500	33,06	2,96E+02
25.10.2011	AK 1:500	32,94	3,27E+02
25.10.2011	AK 1:500	35,83	1,80E+02
25.10.2011	AK 1:500	35,71	1,96E+02
29.02.2012	AK 1:500	35,37	2,45E+02
29.02.2012	AK 1:500	31,68	8,07E+02
29.02.2012	AK 1:500	31,94	6,78E+02
29.02.2012	AK 1:500	31,84	7,27E+02
16.02.2010	ohne AK	33,28	9,77E+02
16.02.2010	ohne AK	33,34	9,39E+02
16.02.2010	ohne AK	32,68	1,45E+03
25.10.2011	ohne AK	30,89	1,36E+03
25.10.2011	ohne AK	31,02	1,25E+03
25.10.2011	ohne AK	30,98	1,28E+03
29.02.2012	ohne AK	33,03	2,21E+02
29.02.2012	ohne AK	32,88	2,47E+02
29.02.2012	ohne AK	32,76	2,71E+02

AK: Antikörper

Ct: Threshold cycle

dRn: Baseline-korrigierte normalisierte Fluoreszenz

Anhang

Tabelle 15: *In Vitro*-Assay mit Anti-CpCDPK1-Serum 48 h p. i.: Ct-Werte und CpHSP70-DNA-Kopienzahlen aus drei Versuchen der RT-PCR

Versuch 48 h p. i.	Well Name	Ct (dRn)	Kopienzahl (CpHSP70)
16.02.2010	AK 1:10	34,95	5,80E+01
16.02.2010	AK 1:10	34,91	5,97E+01
16.02.2010	AK 1:10	35,62	3,41E+01
16.02.2010	AK 1:10	35,06	5,31E+01
25.10.2011	AK 1:10	35,26	4,54E+01
25.10.2011	AK 1:10	35,02	5,47E+01
25.10.2011	AK 1:10	37,38	6,51E+01
25.10.2011	AK 1:10	37,26	7,03E+01
29.02.2012	AK 1:10	36,67	1,04E+02
29.02.2012	AK 1:10	33,83	1,95E+02
29.02.2012	AK 1:10	33,66	2,17E+02
29.02.2012	AK 1:10	33,48	2,45E+02
16.02.2010	AK 1:50	34,85	6,27E+01
16.02.2010	AK 1:50	34,46	8,47E+01
16.02.2010	AK 1:50	34,43	8,73E+01
16.02.2010	AK 1:50	32,99	2,69E+02
25.10.2011	AK 1:50	33,23	2,22E+02
25.10.2011	AK 1:50	32,95	2,77E+02
25.10.2011	AK 1:50	35,8	1,84E+02
25.10.2011	AK 1:50	35,36	2,46E+02
29.02.2012	AK 1:50	35,46	2,31E+02
29.02.2012	AK 1:50	33,41	2,57E+02
29.02.2012	AK 1:50	33,43	2,53E+02
29.02.2012	AK 1:50	33,59	2,28E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,21	2,26E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,1	2,47E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,72	1,52E+02
16.02.2010	AK 1:100	33,11	2,45E+02
25.10.2011	AK 1:100	32,96	2,75E+02
25.10.2011	AK 1:100	32,97	2,74E+02

Anhang

25.10.2011	AK 1:100	35,85	1,79E+02
25.10.2011	AK 1:100	35,76	1,90E+02
29.02.2012	AK 1:100	35,08	2,96E+02
29.02.2012	AK 1:100	31,21	1,10E+03
29.02.2012	AK 1:100	31	1,26E+03
29.02.2012	AK 1:100	31,25	1,07E+03
16.02.2010	AK 1:500	32,33	4,51E+02
16.02.2010	AK 1:500	32,25	4,80E+02
16.02.2010	AK 1:500	32,39	4,30E+02
16.02.2010	AK 1:500	33,64	1,62E+02
25.10.2011	AK 1:500	33,67	1,57E+02
25.10.2011	AK 1:500	33,67	1,58E+02
25.10.2011	AK 1:500	34,1	5,66E+02
25.10.2011	AK 1:500	33,84	6,72E+02
29.02.2012	AK 1:500	33,87	6,58E+02
29.02.2012	AK 1:500	31,64	8,26E+02
29.02.2012	AK 1:500	31,69	8,00E+02
29.02.2012	AK 1:500	31,78	7,53E+02
16.02.2010	ohne AK	32,42	4,20E+02
16.02.2010	ohne AK	32,51	3,92E+02
16.02.2010	ohne AK	32,48	4,01E+02
25.10.2011	ohne AK	34,51	4,34E+02
25.10.2011	ohne AK	34,22	5,22E+02
25.10.2011	ohne AK	33,67	7,55E+02
29.02.2012	ohne AK	31,9	6,98E+02
29.02.2012	ohne AK	32,04	6,35E+02
29.02.2012	ohne AK	32,21	5,68E+02

AK: Antikörper

Ct: Threshold cycle

dRn: Baseline-korrigierte normalisierte Fluoreszenz

Anhang

Tabelle 16: Relative Quantifizierung Versuch A

Experiment	Well Name	Ct (dR)	Rel. Quant. to Norm. (dR)	Rel. Quant. to Cal. (dR)	Log Fold Change to Cal. (dR)
qPCR CDPK1 29- Nov-2012	3 h	33,93	Calibrator	Calibrator	Calibrator
	6 h	32,95	1,20E-10	1,96	0,971
	12 h	23,76	7,06E-08	1152	10,2
	16 h	27,89	4,03E-09	65,8	6,04
	20 h	29,36	1,45E-09	23,6	4,56
	24 h	26,05	1,44E-08	235	7,88
	26 h	27,05	7,21E-09	118	6,88
	30 h	23,95	6,16E-08	1005	9,97
	36 h	25,09	2,81E-08	458	8,84
	40 h	23,64	7,67E-08	1251	10,3
	44 h	25,46	2,17E-08	354	8,47
	48 h	25,57	2,00E-08	327	8,35
	50 h	25,56	2,02E-08	330	8,37
	54 h	24,54	4,09E-08	667	9,38
	uninf. HCT-	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
qPCR HSP70 28- Nov-2012	3 h	30,58	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	6 h	24,06	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	12 h	27	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	16 h	22,26	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	20 h	24,74	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	24 h	24,76	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	26 h	23,26	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	30 h	24,59	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	36 h	22,76	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	40 h	25,3	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	44 h	24,6	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	48 h	26,04	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	50 h	26,42	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	54 h	27,08	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	uninf. HCT-	No Ct	Normalizer	Normalizer	Normalizer

Ct: Threshold cycle

dRn: Baseline-korrigierte normalisierte Fluoreszenz

Rel. Quant. To Norm: normalisierte relative cDNA-Kopienanzahl

Rel. Quant. To Cal.: normalisierte relative cDNA-Kopienanzahl bezogen auf den Kalibratorwert

Log Fold Change to Cal.: Vielfaches der Expression des Zielgens gegenüber dem Kalibrator auf Basis des Logarithmus zur Basis 2

Anhang

Tabelle 17: Relative Quantifizierung Versuch B

Experiment	Well Name	Ct (dRn)	Rel. Quant. to Norm. (dRn)	Rel. Quant. to Cal. (dRn)	Log Fold Change to Cal. (dRn)
qPCR CDPK1, 25-Apr-2013	3 h	32,73	Calibrator	Calibrator	Calibrator
	6 h	32,06	2,23E-10	1,59	0,668
	12 h	24,01	5,93E-08	422	8,72
	16 h	28,89	2,00E-09	14,3	3,83
	20 h	29,8	1,07E-09	7,59	2,92
	24 h	26,7	9,18E-09	65,3	6,03
	26 h	26,64	9,53E-09	67,8	6,08
	30 h	24,77	3,49E-08	249	7,96
	36 h	25,76	1,76E-08	125	6,97
	40 h	23,79	6,87E-08	489	8,93
	44 h	25,37	2,31E-08	164	7,36
	48 h	27,25	6,25E-09	44,4	5,47
	50 h	25,11	2,77E-08	197	7,62
	54 h	25,64	1,91E-08	136	7,09
	uninf. HCT-8	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
qPCR HSP 70 cDNA, 25-Apr-2013	3 h	27,6	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	6 h	22,98	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	12 h	26,05	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	16 h	22,81	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	20 h	24,4	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	24 h	24,63	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	26 h	22,01	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	30 h	23,63	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	36 h	22,12	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	40 h	25,02	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	44 h	24,39	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	48 h	27,84	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	50 h	25,73	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	54 h	25,98	Normalizer	Normalizer	Normalizer
	uninf. HCT-8	No Ct	Normalizer	Normalizer	Normalizer

Ct: Threshold cycle

dRn: Baseline-korrigierte normalisierte Fluoreszenz

Rel. Quant. To Norm: normalisierte relative cDNA-Kopienanzahl

Rel. Quant. To Cal.: normalisierte relative cDNA-Kopienanzahl bezogen auf den Kalibratorwert

Log Fold Change to Cal.: Vielfaches der Expression des Zielgens gegenüber dem Kalibrator auf Basis des Logarithmus zur Basis 2

Danksagung

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

An erster Stelle gilt mein Dank **Prof. Dr. Arwid Dauschies** für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme ins Institut für Parasitologie sowie die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei **Dr. Viktor Dyachenko** für die geniale Idee zu dieser Arbeit, die Bereitstellung des klonierten Konstruktes, die Betreuung meiner praktischen Tätigkeit im Labor und vor allem für sein offenes Ohr und die Hilfestellung bei allen Fragen und Problemen, sei es in Leipzig oder den schönen bayrischen Alpen.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an **Dr. Berit Bangoura**, die mir stets helfend mit Rat und Tat zur Seite stand, mir die Statistik verständlich gemacht hat, das zähe Schreiben häufig durch aufmunternde Worte und ein Lächeln erleichterte und zu einer guten Freundin geworden ist.

Weiterhin gilt mein Dank **Dr. Matthias Lendner** für die Ratschläge, Ideen und Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung und Interpretation meiner Daten.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei **Dr. Ronald Schmäsche** und **Gerd Kunz** für die freundliche und geduldige Einführung in die parasitologische Diagnostik und die angenehme Atmosphäre im Labor. Ein großes Dankeschön auch an **Sandra Gawlowska**, die mir die molekularbiologischen Methoden gezeigt und bei allen Problemen und Fragen zu den Experimenten geholfen hat sowie an **Janet Reichenbach** für die Hilfe bei der Formatierung.

Außerdem möchte ich mich ganz lieb bei allen ehemaligen und aktuellen **Doktoranden** des Institutes für die schöne Zeit, Aufmunterung, Kritik und nicht zuletzt den Spaß während der Arbeit und in der Freizeit bedanken.

Einige Menschen geben unserer Welt etwas Besonderes, einfach, weil es sie gibt.

Frank, mehr als ein Allgäuer kann man nicht werden, danke für einfach alles.

Mein ganz besonderes Dankeschön geht an meine **Familie**, ohne deren Unterstützung, Geduld und Liebe mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen wären.