

KfK 4699
März 1990

Isolierung und Charakterisierung des Aktin-Gens des intrazellulären Parasiten Theileria Parva

A. Y. B. Ehrfeld
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4699

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DES AKTIN-GENS DES INTRAZELLULÄREN PARASITEN
THEILERIA PARVA

Angelika Y.B. Ehrfeld

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Der Parasit *Theileria parva* ist ein Protozoon, das eine akute, meist tödlich endende Krankheit bei Rindern verursacht, die als "East Coast fever" (ECF) oder als Theileriosis bezeichnet wird. *Theileria parva*-infizierte Rinderlymphozyten sind als permanente, transformierte Zelllinien leicht in Kultur zu halten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Parasit *Theileria parva* zum ersten Mal molekularbiologisch analysiert, indem es gelang, das Aktin-Gen und die -cDNA dieses Parasiten zu isolieren und zu sequenzieren. Damit konnte der Nachweis des Parasiten auf genomischer und transkriptioneller Ebene ermöglicht werden. Für die Forschungsarbeit mit *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten ist eine solche spezifische Genprobe unerlässlich.

Aus einer genomischen *Theileria*-Genbank wurde mit einer α -Aktin-Maus-Probe ein 10 kb-großes EcoRI-Fragment isoliert, das Aktinsequenzen enthält. Die Kartierung dieses Fragmentes ergab, daß nur eine Genkopie des Aktin-Gens innerhalb des Fragmentes vorhanden ist. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, denn bis auf zwei Ausnahmen, Hefe und Tetrahymena, ist Aktin in allen bisher untersuchten Organismen durch eine Multigenfamilie repräsentiert.

Innerhalb des 10 kb EcoRI-Fragmentes ist das *Theileria*-Aktin-Gen 5' auf einem 1,2 kb Accl- und 3' auf einem 2,3 kb Accl-Fragment lokalisiert. Das Aktin-Gen wurde vollständig einschließlich der 3'- und 5'-flankierenden Regionen sequenziert.

Eine Northern Blot-Analyse zeigte ein *Theileria*-Aktintranskript mit einer Länge von 1,4 kb. Das theilerizide Medikament 720C hemmt bereits nach 24 Stunden die Transkription des Parasiten in infizierten Lymphozyten.

Mit dem genomischen *Theileria*-Aktinfragment, das als spezifische Probe diente, konnte ein cDNA-Klon aus einer cDNA-Genbank, hergestellt aus *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten, isoliert und sequenziert werden. Die Aktin-cDNA besitzt eine kurze 3'-nichttranslatierte Region von 37 Basen. Innerhalb dieser Region befindet sich keine bekannte Sequenz, wie [AATAAA], die für den Transkriptionsstop und die Anhängung der PolyA-Sequenz funktioniert und bei den meisten Eukaryonten identifiziert wurde.

Der Vergleich von cDNA und Gen ergab ein Intron in der 5'-Nichttranslatierten Region mit einer Länge von 94 Basen. Der 5'-flankierende Bereich des *Theileria*-Aktin-Gens besitzt einen sehr hohen AT-Gehalt von 88%. In diesem Bereich befinden sich 11 TATA-ähnliche Sequenzen. Ein CAT-Fusionskonstrukt der 5'-Region des Aktin-Gens zeigte nach Transfektion in HeLa Zellen und *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten keine Promotoraktivität. Dies läßt darauf schließen, daß der Parasit entweder andere Mechanismen zur Regulation der Genexpression besitzt als Säugerzellen oder daß die Regulationssequenzen des Aktin-Gens an einem weiter entfernt liegenden chromosomalen Bereich lokalisiert sind.

Einige Indizien lassen vermuten, daß der Parasit einen anderen Mechanismus der Transkription seiner Gene besitzt, als die bisher bei den meisten anderen Eukaryonten gefundenen Mechanismen. Eine S1-Analyse zeigte ein um 50 Basen kürzeres Fragment, als es die 'Primer Extension'-Analyse ergab. Vielleicht besitzen die *Theileria*-mRNA's eine sogenannte 'Trans-Spliced leader'-Sequenz am ihrem 5'-Ende, wie man es bei Trypanosomen gefunden hat? Um diese Annahme zu bestätigen, müssen jedoch noch weitere vertiefende Arbeiten auf diesem Gebiet geleistet werden.

Schließlich bestätigt der Vergleich des Aktin Proteins des Parasiten *Theileria parva* mit dem Aktin von *Plasmodium falciparum* die enge Verwandtschaft zu diesem Malariaerreger.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ACTIN GENE FROM THE INTRACELLULAR PARASITE THEILERIA PARVA

SUMMARY

The protozoan parasite *Theileria parva* causes an acute and usually fatal disease in cattle, called 'East Coast fever' or Theileriosis. *Theileria*-infected lymphocytes can easily be established and maintained in cell culture as immortalized transformed cell lines.

In the current work the parasite is investigated for the first time on the molecular level by isolating the *Theileria* actin gene and corresponding cDNA. Using this probe the parasite could be demonstrated on the genomic and transcriptional level. For research purposes with *Theileria*-infected lymphocytes such a specific probe is indispensable.

A 10kb EcoRI-fragment was isolated from a genomic *Theileria* library by hybridization with a mouse α -actin probe. Restriction mapping showed that there is only one copy of the actin gene within this fragment. This is a surprising result because actin is represented in all organisms, so far analyzed, by a multigene family with the exception of yeast and Tetrahymena.

Within the 10 kb EcoRI-fragment the *Theileria* actin gene is located 5' on a 1.2 kb Accl- and 3' on a 2.3 kb Accl-fragment. The actin gene was sequenced entirely including the 3'- and 5'-flanking regions.

Transcription in *Theileria* was inhibited already 24 hours after addition of the theilerizidial drug 720C to parasite-infected lymphocytes as shown in Northern blot analysis.

Using the genomic *Theileria* actin as a specific probe it was possible to isolate and sequence a *Theileria* actin cDNA from a library constructed from *Theileria*-infected lymphocytes.

The *Theileria* actin has a short 3'-UTR with 37 bases. Within this sequence there was no known consensus sequence, like [AATAAA] which is known for the stop of transcription and addition of the PolyA tail as it was found in most eucaryotes.

Within the 5'-UTR an intron with 94 bases was discovered by comparison of the cDNA with the gene. The 5'-flanking region of the *Theileria* actin gene revealed an extremely high AT-content of 88%. Within this region there are 11 TATA-like sequences. A CAT-fusion construct of the 5'-region of the gene showed no definitive promoter activity after transfection into HeLa cells and *Theileria*-infected lymphocytes.

This allows the conclusions that either the parasite has other mechanisms in gene regulation than mammalian cells, or that sequences for gene regulation may be localized on a chromosomal region far from the actin gene.

Some results indicate that the parasite has a different mechanism in transcription than other eucaryotes. Using S1-analysis the length of the actin transcript was determined 50 bases shorter than measured by primer extension. Perhaps *Theileria* mRNAs have a transspliced leader sequence at their 5'-end as it was found in trypanosomes. In order to verify these findings additional research is necessary in this area.

Finally the comparison of the actin protein of *Theileria parva* and *Plasmodium falciparum* allows the conclusion that there exists a close relationship of both organisms.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Theileria parva | 1 |
| 1.2 | Der Lebenszyklus und die durch den Parasiten verursachte Krankheit | 2 |
| 1.3 | Immunologie | 5 |
| 1.4 | Zielzellen von Theileria parva und Proliferation infizierter Lymphozyten in vitro | 6 |
| 1.5 | Die Wirt-Parasit-Beziehung | 9 |
| 1.6 | Aktin | 12 |
| | ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 11 |
| 2 | MATERIAL | 14 |
| 2.1 | Chemikalien, Radioisotope und Arbeitsmittel | 14 |
| 2.2 | Zellen | 16 |
| 2.3 | Gewebekultur-Medien | 17 |
| 2.4 | Nährmedien für Bakterien | 17 |
| 2.5 | Puffer und Lösungen | 19 |
| 3 | METHODEN | 22 |
| 3.1 | Zellkulturtechniken | 22 |
| 3.1.1. | Zellkultivierung | 22 |
| 3.1.2 | Bestimmung der Zelldichte | 22 |
| 3.1.3 | Isolierung von peripheren Rinderblut-Lymphozyten (PBL) | 22 |
| 3.1.4 | Morphologische Untersuchung der Zellen | 23 |
| 3.2 | Allgemeine Arbeitsmethoden mit Nucleinsäuren | 23 |
| 3.2.1 | Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration | 23 |
| 3.2.2 | Phenol/Chloroform-Extraktion einer Nucleinsäure Lösung | 23 |
| 3.2.3 | Fällung von Nucleinsäuren | 24 |
| 3.3 | DNA-Klonierungstechniken | 24 |
| 3.3.1 | Restriktionsverdau | 24 |
| 3.3.2 | Auffüllen von 5'-Überhängen | 24 |
| 3.3.3 | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 25 |
| 3.3.4 | Synthese und Reinigung von Oligonucleotiden | 25 |
| 3.3.5 | Ligation | 25 |
| 3.3.6 | Präparation von Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten | 26 |
| 3.3.7 | Isolierung von DNA aus Gelen | 26 |
| 3.3.8 | Bal 31 Exonuclease-Verdau | 27 |
| 3.3.9 | Transformation von Bakterienzellen | 28 |
| 3.3.10 | Kolonie-Hybridisierung | 29 |

| | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4 | Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren | 30 |
| 3.4.1 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA | 30 |
| 3.4.2 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Acrylamid Gelen | 30 |
| 3.4.3 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Acrylamid /Harnstoff-Gelen:Sequenzier-Gel | 31 |
| 3.4.4 | Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarose Gelen | 31 |
| 3.5 | Präparative Methoden | 32 |
| 3.5.1 | Herstellung eines Proteinextraktes für Enzymtests | 32 |
| 3.5.2 | Präparation von Gesamt-RNA aus Lymphozyten | 32 |
| 3.5.3 | Präparation von polyadenylierter-RNA aus Gesamt- RNA | 33 |
| 3.5.4 | Präparation von Schizonten-RNA aus infizierten Lymphozyten | 33 |
| 3.5.5 | Präparation von genomischer DNA aus Lymphozyten | 34 |
| 3.5.6 | Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab | 34 |
| 3.5.7 | Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab | 35 |
| 3.5.8 | Präparation von Lambda-DNA in kleinem Maßstab | 36 |
| 3.5.9 | Präparation von Lambda-DNA in großem Maßstab | 37 |
| 3.6 | "Screening" einer Lambda-Genbank | 38 |
| 3.6.1 | Ausplattieren der Phagenkulturen (Plaques-Hybridi- sierung) | 38 |
| 3.6.2 | Filterabdruck der Phagen-Plaques | 39 |
| 3.6.3 | "Rescreening" der Lambda-Klone | 39 |
| 3.7 | Präparation radioaktiv markierter Proben | 39 |
| 3.7.1 | Markierung über die gesamte Länge | 39 |
| 3.7.2 | Endmarkierung | 40 |
| 3.3.3 | Präparation einer einzelsträngigen und über die ganze Länge markierten DNA: Prime Cut-Probe | 41 |
| 3.8 | Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen | 41 |
| 3.9 | Analytische Methoden | 42 |
| 3.9.1 | Transfer von DNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N-Nylonfilter | 43 |
| 3.9.2 | Transfer von RNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N-Nylonfilter | 43 |
| 3.9.3 | Hybridisierung der Northern- bzw. Southern Blots | 43 |
| 3.9.3.1 | Hybridisierung des Southern Blots mit radioaktiv markierten DNA-Proben | 43 |
| 3.9.4 | Autoradiographie | 45 |
| 3.9.5 | Restriktionskartierung von rekombinanten Lambda- Klonen | 45 |
| 3.9.5.1 | Partieller Restriktionsverdau | 45 |
| 3.9.5.2 | Hybridisierung mit ON-L und ON-R | 46 |
| 3.9.5.3 | Gelelektrophorese und Autoradiographie | 46 |
| 3.9.5.4 | Erstellung der Restriktionskarten | 46 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.9.6 | Sequenzierung | 47 |
| 3.9.6.1 | Präparation von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen | 47 |
| 3.9.6.2 | Sequenzierung von Nukleinsäuren nach der Ketten- abbruch-Methode nach Sanger | 47 |
| 3.9.7 | S1-Analyse von RNA | 49 |
| 3.9.8 | "Primer Extension"- Analyse von RNA | 49 |
| 3.9.9 | Proteinbestimmung nach Lowry | 50 |
| 3.9.10 | Bestimmung der Chloramphenicoltransferase- Aktivität (CAT-Aktivität) | 50 |
| 3.9.11 | Polymerase Chain Reaction | 51 |
| 4 | ERGEBNISSE | 52 |
| 4.1 | Nachweis von Aktin im Genom von <i>Theileria parva</i> und <i>Theileria parva</i> -infizierten Lymphozyten mit einer heterologen α Aktin Maus-Probe | 52 |
| 4.2 | Isolierung von Aktin aus einer <i>Theileria</i> Genbank | 54 |
| 4.2.1 | Subklonierung des 2,3 kb <i>AccI</i> -Fragments | 58 |
| 4.3 | Das klonierte 2,3 kb <i>AccI</i> -Fragment ist <i>Theileria</i> Aktin | 60 |
| 4.4 | Kartierung von Restriktionsschnittstellen im isolierten <i>Theileria parva</i> CH4A Aktin-Klon | 63 |
| 4.4.1 | Kartierung des CH4A-Klones durch partiellen Verdau | 63 |
| 4.4.2 | Kartierung des CH4A Aktin-Klons durch Einzel-und Doppelverdau | 66 |
| 4.5 | Das Aktin Gen ist durch eine Einzelkopie im Genom von <i>Theileria parva</i> vertreten | 70 |
| 4.6 | Expression des <i>Theileria parva</i> Aktin Gens | 80 |
| 4.7 | Isolierung einer <i>Theileria parva</i> Aktin cDNA und des genomischen 5'-benachbarten <i>AccI</i> -Fragments | 83 |
| 4.8 | Sequenz des <i>Theileria</i> Aktin Gens und der cDNA | 88 |
| 4.8.1 | Sequenzierungsstrategie | 88 |
| 4.8.2 | Sequenzanalyse des Aktin Gens | 97 |
| 4.8.3 | Die <i>Theileria</i> Aktin cDNA | 98 |
| 4.9 | Das Aktin Gen zeigt in Säugerzellen keine Promotoraktivität im 5'-flankierten Bereich des 1,2 kb <i>AccI</i> -Fragments | 100 |
| 4.10 | Transkriptionsstart der <i>Theileria</i> Aktin mRNA | 102 |
| 4.10.1 | Bestimmung der Transkriptlänge von <i>Theileria</i> Aktin | 102 |
| 4.10.2 | S1-Analyse | 104 |
| 4.10.3 | Isolierung weiterer <i>Theileria</i> Aktin cDNA-Klone | 108 |
| 4.10.4 | 'Polymerase Chain Reaction'(PCR) | 108 |
| 4.11 | Das <i>Theileria</i> Aktin Protein | 112 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 5 | DISKUSSION | .118 |
| 5.1 | Aktin ist durch eine Einzelkopie im Genom von Theileria parva repräsentiert | 118 |
| 5.2 | Theileria Aktin besitzt ein Intron im 5' Nicht- translatierten Bereich | 121 |
| 5.3 | Theileria Aktin besitzt kein bekanntes Polyadeny- lierungssignal | 123 |
| 5.4 | Der Transkriptionsstart von Theileria Aktin ist ungeklärt | 124 |
| 5.5 | Das 1,2 kb AccI-Fragment zeigt keine Promotor- aktivität in Säugerzellen | 127 |
| 5.6 | Das Theileria Aktin Protein | 128 |
| 6 | LITERATUR | 132 |

n

1. EINLEITUNG

1.1 Theileria parva

Der Parasit *Theileria parva* ist ein Protozoon, das eine akute und meist tödlich endende Krankheit bei Rindern verursacht, die als "East Coast fever" (ECF) oder als Theileriosis bezeichnet wird (Irvin & Cunningham, 1981; Neitz, 1955).

Nach Trypanosomiasis (Schlafkrankheit) ist Theileriosis die bedeutendste Rinderkrankheit auf dem afrikanischen Kontinent. (Morrison et al., 1986a)

Parasiten der Gattung *Theileria* werden hauptsächlich bei Wiederkäuern gefunden und eine Anzahl der Spezies sind wichtige Krankheitserreger bei domestizierten Rindern, Schafen und Ziegen (Uilenberg, 1981). Als ein weiteres wichtiges Mitglied der Gattung *Theileria* sei hier *Theileria annulata* erwähnt. *Theileria annulata* ist der Verursacher der Mediterranen Theileriosis und wird durch zwei andere Zeckenarten, *Hyalomma excavatum* und *H. detritum*, übertragen. Die Mediterrane Theileriosis kommt hauptsächlich in Nordafrika, Südeuropa, Asien, Ostindien und Südrußland vor (Ahmed et al., 1988; Hashemi-Fesharki, 1988).

"East Coast fever" dagegen ist in Ost- und Zentralafrika endemisch. Die Ausbreitung der Krankheit ist eng mit der Schildzeckenart *Rhipicephalus appendiculatus*, Ordnung Ixodidae, verknüpft, die der alleinige Überträger der Theileriosis ist und in warmen und feuchten Klimazonen bis zu 2000m ü.M. lebt (Irvin & Cunningham, 1981; Neitz, 1955).

Der afrikanische Kaffernbüffel (*Syncerus caffer*), der ebenfalls ein Wirtstier für *Theileria parva* ist, zeigt jedoch nicht das bei den Rindern zu beobachtende, schwerwiegende Krankheitsbild. Innerhalb des Parasit-Wirt-Ökosystems fungiert er als ständiges Parasitenreservoir und stellt daher den epidemiologisch wichtigsten Faktor der Krankheit dar (Morrison et al., 1986a; Barnett & Brocklesby, 1966).

Obwohl *Theileria* für den Menschen nicht infektiös ist, belastet der Parasit die Bevölkerung indirekt sowohl mit den durch ihn verursachten ökonomischen Einbußen aus der beeinträchtigten Rinderzucht, Fleisch- und Milchproduktion als auch mit deren sozialen Folgeerscheinungen (Irvin, 1977; Dolan & Young, 1981; Dolan, 1986).

Neben der sozioökonomischen Bedeutung ist *Theileria parva* von großem biologischen Interesse, da der Parasit die Fähigkeit besitzt, Rinderzellen des lymphatischen Systems zu infizieren und zu transformieren. Damit stellt der Parasit *Theileria parva* ein außergewöhnliches Modellsystem dar, um Regulations- und Kontrollmechanismen krebsartig entarteter Zellen studieren zu können. *Theileria*-infizierte Rinderlymphozyten kann man entweder durch Biopsie der Lymphorgane oder durch *in vitro*-Infektionen von Rinderlymphozyten mit *Theileria*-Sporozoen aus infizierten Zecken erhalten. Diese infizierten Lymphozyten kann man leicht als immortalisierte, transformierte Zelllinien in Gewebekultur halten (Brown et al., 1973). Der Mechanismus, der dieses immortalisierte Stadium *in vitro* reguliert und aufrechterhält, ist bis heute noch nicht geklärt.

1.2 Der Lebenszyklus und die durch den Parasiten verursachte Krankheit

Eine Übersicht des Lebenszyklus von *Theileria parva* ist in Abbildung 1 gezeigt. Das infektiöse Stadium von *Theileria parva* für das Wirtstier sind die Sporozoitien [SP], die durch die Zecke *Rhipicephalus appendiculatus* übertragen werden [1]. Die Piroplasmen, die sich in den Erythrozyten *Theileria*-infizierter Rinder bzw.- Kaffernbüffel befinden, sind das infektiöse Stadium für die Zecke (s. Lebenszyklus, Abb. 1).

Die Sporozoitien gelangen während des Blutsaugens mit dem Speichel der Zecke in das Wirtstier [1], dringen in die Lymphozyten ein [2] und differenzieren sich dort im Zytoplasma zu Makroschizonten, die man lichtmikroskopisch als membraneingeschlossene, vielkernige Parasitenzellen erkennen kann [2] [KB=Koch's body=Schizont; NH=Nukleus der Wirtszelle; N=Schizontenkern].

Die Ereignisse, die unmittelbar nach der Übertragung der Sporozoitien eintreten, sind sehr schwierig zu beobachten und daher noch weitgehend unbekannt. Der erste Hinweis für eine Infektion ist eine erhöhte Körpertemperatur und angeschwollene Lymphknoten nahe der Bißwunde (Jarrett et al., 1969). Durch Biopsie dieser angeschwollenen Lymphknoten lassen sich die Makroschizonten im Zytoplasma der infizierten Lymphozyten lichtmikroskopisch nachweisen. Die Mehrheit der Lymphozyten hat anfangs keine

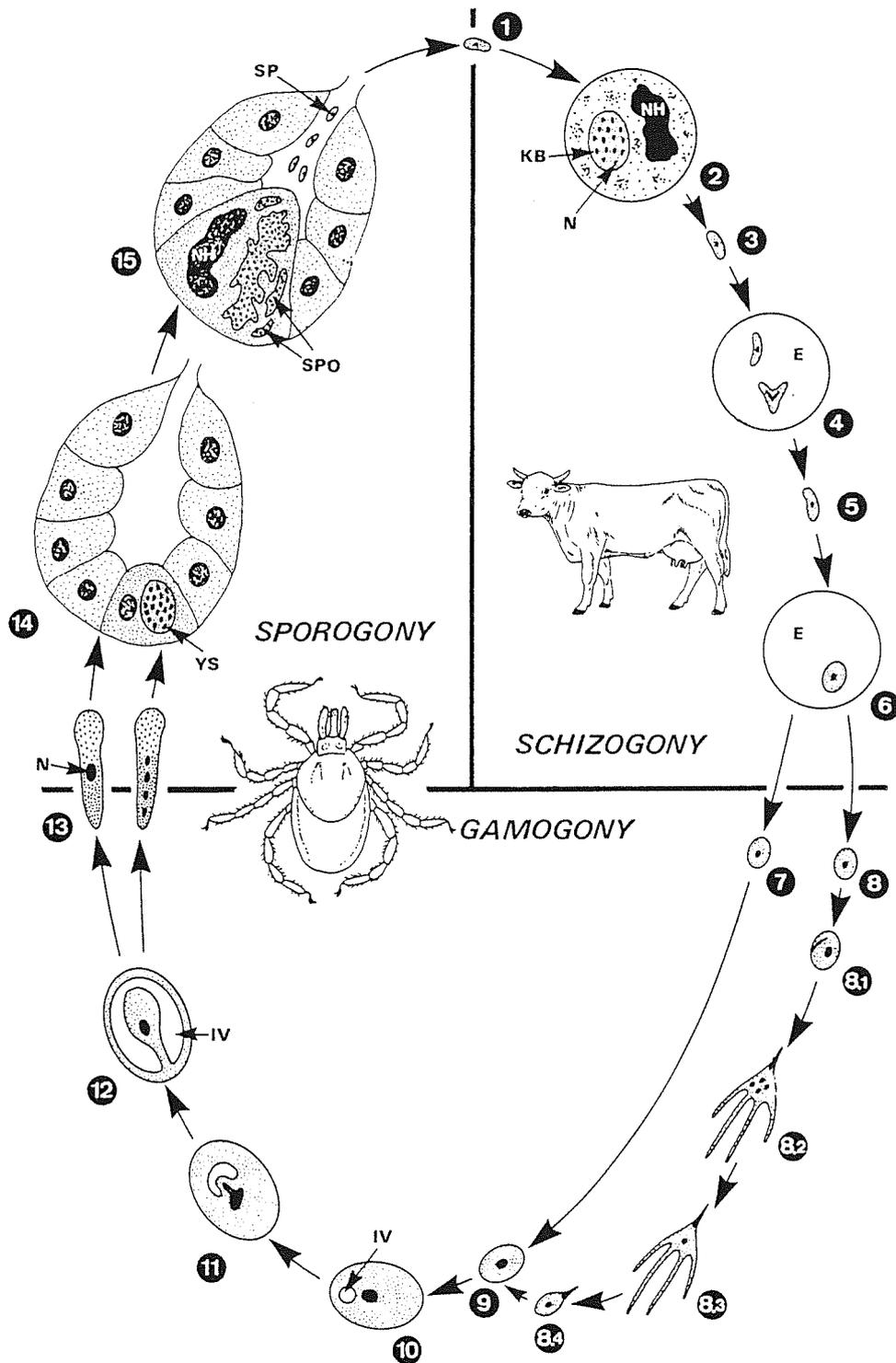


Abb. 1: Lebenszyklus des Parasiten *Theileria parva*. Mehlhorn, H. & Walldorf, V. (1988): Parasitology in Focus. H.Mehlhorn (ed.). Die jeweiligen Parasitenstadien sind im Text unter 1.2 beschrieben [].

Makroschizonten und die infizierten Zellen betragen nur 0,01-0,5%, bezogen auf die Zahl der Gesamtymphozyten. Aber bald danach dominieren die parasitierten Zellen aufgrund ihrer starken Proliferation und verbreiten sich schnell in den Lymphorganen, Thymus und Knochenmark. Diese schnelle Expansion der parasitierten Zellpopulation begründet sich zum einen darin, daß die Makroschizonten sich synchron mit der Wirtszelle teilen und zum anderen durch die vom Parasiten induzierte Mitoseaktivität (Jarret et al., 1969). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium entwickelt sich ein Teil der Makroschizonten zu Mikroschizonten, indem der Makroschizont seine Parasitenkerne vermehrt. Dieses Parasitenstadium ist in Abbildung 1 nicht gezeigt. Durch weitere Differenzierung in der Wirtszelle entwickeln sich aus den Mikroschizonten die sogenannten Merozoiten, die nach Lysis der Lymphozyten freigesetzt werden [3]. In diesem späten Stadium lysieren auch nichtinfizierte Zellen. Die dadurch verursachte Leukopenie führt schließlich zum Tod des Rindes.

Schließlich dringen die freigesetzten Merozoiten [3] in die Erythrozyten ein und entwickeln sich dort zu Piroplasmen [4]. Diese Piroplasmen sind, wie anfangs erwähnt, das infektiöse Stadium für die Zecke [4]; [5]; [6].

Da die Zecke während ihrer Entwicklung dreimal Blut saugt, kann sie sich als Larve oder Nymphe durch Aufnahme infektiösen Blutes infizieren und mit der nächsten Blutmahlzeit als Nymphe oder Adulttier die Parasiten (Sporozoit) auf ein anderes Rind übertragen. [1]. Im Darm der Zecke lysieren die Piroplasmen-infizierten Rindererythrozyten [6] und männliche [8] Mikro -und weibliche [9] Makrogameten werden freigesetzt, die zu Zygoten fusionieren [10]. Die Zygoten dringen in das Epithel der Darmwand ein und entwickeln sich dort zu Kineten [11]; [12]; [IV=innere Vakuole] (Mehlhorn & Schein 1984)). Die beweglichen Kineten gelangen durch die Darmwand mit der Hämolymphe zu den Speicheldrüsen [13]; [14]; [N=Nukleus] (Young & Leitch 1980) und können dort ohne weitere Vermehrung bis zu zwei Jahren vor der nächsten Blutmahlzeit der Zecke ruhen [14]. Im Zytoplasma der Speicheldrüsenzellen durchlaufen die Kineten die Sporogonie [YS=Junger Sporont]. Es entstehen mehrkernige Sporoblasten-Syncytien [SPO=Sporont] und nach Differenzierung schließlich tausende von Sporozoit.

Eine Sporogonie tritt erst dann ein, wenn die Zecke mit dem Blutsaugen beginnt. Dies geschieht durch eine erhöhte Umgebungstemperatur: unter natürlichen Bedingungen durch

Blutsaugen am Rind (Irvin, 1977; Büscher & Tanguis, 1986), im Labor durch Inkubation der Zecken bei 37 °C (Young et al., 1979; Fujisaki et al., 1988).

Die Zeitspanne zwischen Infektion und Tod des Rindes beträgt nur drei Wochen. Die Wahrscheinlichkeit, daß nach lethaler Infektion das Krankheitsbild exprimiert wird (Morbidity) beträgt 100%, die Mortalitätsrate > 95% (Jarret et al., 1969; Brocklesby et al., 1961).

Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß das dort seit langem gezüchtete Zebu-Rind, *Bos indicus*, das in den gefährdeten Gebieten ständig einer *Theileria*-Infektion ausgesetzt ist, mit der Zeit ein weniger starkes Krankheitsbild entwickelt und eine geringere Mortalitätsrate aufweist (Moll et al., 1981). Der Grund für diese *Theileria*-Resistenz, ist nicht geklärt.

1.3 Immunologie

Es ist schon seit langem bekannt, daß Rinder, die "East Coast fever" überlebt haben, immun gegen weitere Infektionen des gleichen Parasiten *Theileria* sind (Neitz, 1955; Morrison et al., 1986a). Solche nicht-lethalen Infektionen können mit niedrigen Dosen von *Theileria*-Sporozoiten und gleichzeitiger Behandlung mit Medikamenten wie z.B. Parvaquon (Chema et al., 1986), Oxytetracyclin (Dolan et al., 1981) oder BW720c induziert werden. Die dadurch erworbene Immunität bietet allerdings in der Regel keinen Schutz vor Infektion durch eine andere Subspezies von *Theileria parva*. (Baldwin et al., 1986; Mbwambo et al., 1987).

Keine Immunisierung konnte durch Impfung von Rindern mit durch Bestrahlung getöteten Parasiten erzielt werden. Versuche, eine Immunität passiv durch Serum bereits infizierter Rinder zu übertragen, scheiterten ebenso. Jedoch gelang eine passive Immunisierung in einem Versuch mit chimären Zwillingskälbern. Durch Injektion von thorakalen Lymphozyten des einen, zuvor immunisierten Zwillings konnte eine Immunität des anderen Geschwisters erreicht werden (Emery, 1981).

Versuche mit Antikörpern gegen Antigene auf der Oberfläche von Sporozoiten zeigten, daß dadurch eine Infektion durch Sporozoiten *in vitro* neutralisiert werden kann (Dobbelaere & Spooner, 1985; Dobbelaere et al., 1985). Ebenso konnte man im Blut von

Rindern, die zuvor mit wiederholten, nicht-lethalen Dosen von Sporozoiten infiziert wurden, einen Titer an Antikörpern gegen Sporozoiten nachweisen. Zwar wurde eine geringere Infektionsrate bei Rindern durch eine einmalige Gabe von Antikörpern gegen Sporozoiten beobachtet, jedoch konnte eine Immunisierung allein durch Antikörper nicht erreicht werden. Eine Immunisierung allein durch Antikörper ist vor allem auch wegen der Geschwindigkeit, mit der die Sporozoiten ihre Wirtszelle auffinden und in sie eindringen, unwahrscheinlich (Fawcett et al., 1982).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß eine Immunität eher durch eine zelluläre und nicht durch eine humorale Immunantwort vermittelt wird. Den ersten klaren Hinweis darauf, daß eine zellvermittelte Immunantwort gegen infizierte Lymphozyten gebildet wird, lieferten Pearson et al. (1979). Sie konnten zeigen, daß bestrahlte, infizierte Zelllinien in der Lage sind eine proliferative Antwort in autologen peripheren Blutlymphozyten (=PBL) *in vitro* zu induzieren. Diese Proliferationsantwort geht mit der Bildung cytotoxischer Zellen einher. Diese Effektorzellen besitzen eindeutige Merkmale von T-Lymphozyten (Emery, 1988) und sind genetisch restringiert, da sie autologe infizierte Zellen töten, nicht aber infizierte Zellen anderer Rinder, die mit dem gleichen Parasiten infiziert waren.

Diese Beschränkung der Lysis auf autologe Lymphozyten weist auf cytotoxische Zellen hin, die parasitär induzierte, antigene Veränderungen auf der Oberfläche infizierter Zellen in Verbindung mit "selbst"-MHC-Produkten erkennen und lysieren können (Emery et al., 1988; Baldwin et al., 1988). Vor kurzem gelang die Isolierung Theileria-spezifischer cytotoxischer T-Zellklone, die Klasse I MHC-restringiert sind und spezifisch mit einem Parasitenstamm infizierte Zellen töten können (Godderies et al., 1986; Morrison et al., 1986b; Baldwin et al., 1987). Allerdings sind die Eigenschaften noch nicht geklärt, die die Theileria-induzierten Zelloberflächen-Antigene und die der Wirtsmoleküle auszeichnen.

1.4 Zielzellen von Theileria parva und Proliferation infizierter Lymphozyten *in vitro*

Sporozoiten von *Theileria parva* können *in vitro* Leukozyten von Zuchtrindern und Kaffernbüffeln infizieren. Von mehr als 10 weiteren getesteten, wilden Rinderarten gelang eine Infektion nur bei dem Defassa Wasserbock (*Kobus defassa*) (Stagg et al., 1983).

Versuche ruhende oder proliferierende Milzzellen der Maus oder menschliche periphere Blutlymphozyten (PBL) zu infizieren, gelangen nie (Morrison et al., 1986a).

Theileria-infizierte Zelllinien konnten jedoch von Rindern mit Zellen aus PBL, Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark erhalten werden. Obwohl verschiedene Zellarten als Zielzellen dienen können, werden nur T-Zellen, B-Zellen und Null-Zellen nach einer Infektion mit Theileria-Sporozoiten auch transformiert. Gereinigte Monozyten und Neutrophile beispielsweise, können von dem Parasiten zwar infiziert nicht aber transformiert werden (Goddeeris & Morrison, 1987). Aus Arbeiten mit Zelllinien und -klonen geht hervor, daß eine Selektion (Präferenz) von Zellen mit T-Zellmarkern stattfindet. Dies läßt vermuten, daß die Mehrheit der in vivo infizierten Zellen der T-Linie angehören (Emery et al., 1988).

Theileria-infizierte Rinderlymphozyten kann man entweder durch Biopsie von Lymphknoten infizierter Rinder oder durch in vitro - Infektion mit Theileria-Sporozoiten erhalten. Diese infizierten Lymphozyten sind als permanente, transformierte Zelllinien leicht in Gewebekultur zu halten. Das einzige Stadium des Parasiten, das in vitro kultiviert werden kann, sind Makroschizont-infizierte Lymphozyten. Lichtmikroskopisch sind gefärbte Zellen nicht nur einfach an den Schizonten im Zytoplasma der Wirtszelle zu erkennen, sondern auch durch die blastoide Vergrößerung der infizierten und transformierten Zellen. Diese blastoiden Zellen besitzen viele für Krebszellen charakteristische Eigenschaften. Neben ihrer Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum, sind Theileria-infizierte Zellen in der Lage lymphoide Tumore in nackten Mäusen zu erzeugen und Foci in Weichagar zu bilden (Irvin , 1977; Irvin et al., 1977).

Elektronenmikroskopische Arbeiten von Fawcett und Mitarbeitern (Fawcett et al., 1982 und 1984) zeigen das Eindringen von Theileria-Sporozoiten in Lymphozyten in vitro. Die Sporozoiten binden nach einer Art Rezeptor-Liganden-Interaktion an die Zelloberfläche. Die Bindung an die Wirtsmembran und das Eindringen in die Zelle läuft innerhalb von 10 Minuten ab. Das Eindringen erfolgt durch Endozytose. Allerdings ist diese Endozytose nicht unbedingt mit der Endozytose von Makrophagen vergleichbar. Es wurde gezeigt, daß Bindung und Aufnahme der Theileria-Sporozoiten durch die Lymphozyten selbst bei einer Temperatur von 1-2 °C stattfindet. Außerdem sind keine strukturellen Elemente des Zytoskellets der Wirtszelle, wie Pseudopodien, beteiligt. Diese Ergebnisse, zusammen mit

der Beobachtung, daß selbst durch Bestrahlung getötete Sporozoiten noch in die Lymphozyten eindringen können, lassen vermuten, daß es sich hier um einen energieunabhängigen Prozeß handelt (Morrison et al., 1986a).

Während der ersten 24 Stunden nach Eindringen des Parasiten in die Zelle gelangt dieser in die Nähe von Zellkern und Golgi Apparat. Die Wirtszellmembran, die bis dahin den Parasiten eingehüllt hat, ist teilweise zerstört, sodaß schließlich der Parasit, umgeben von seiner eigenen Membran, frei im Zytoplasma des Lymphozyten vorliegt.

Fawcett und Mitarbeiter vermuten, daß die Mikronema des Parasiten membranabbauende Enzyme freisetzen, weil zu beobachten war, daß die Mikronema innerhalb der ersten 24 Stunden nach Eindringen des Parasiten verschwinden.

2-3 Tage nach der Infektion findet eine Kernteilung des Parasiten statt. Während der folgenden 6-10 Tage vergrößert er sein Zytoplasma und die Kernzahl wächst in dem entstehenden Syncytium auf 6-16 Kerne pro Parasitenzelle (=Makroschizont). Gleichzeitig mit einem hohen Mitoseindex ist nun eine blastoide Vergrößerung des Zytoplasmas der Wirtszelle deutlich zu erkennen.

Die infizierten Zellen haben eine Generationszeit von 16-20 Stunden und der Parasit teilt sich synchron mit der Wirtszelle. Die Makroschizonten lagern sich in der Interphase eng an den Mitoseapparat an. Während Pro- und Metaphase wird er in die Mitose-Spindel der Wirtszelle einbezogen, und während Ana- und Telophase trennen sich die Chromosomenpaare und die Zellteilung folgt. Oft verteilt sich der Makroschizont ungleich auf beide Tochterzellen. Verliert eine Zelle dadurch den Parasiten, teilt sie sich nicht mehr, kehrt in ihr Ruhestadium zurück und stirbt in Kultur alsbald ab. In stabilen Zellkulturen bleiben jedoch in der Regel 95% der Zellen infiziert und proliferieren weiter (Morrison et al, 1986a).

Ausschlaggebend für das transformierte, immortalisierte Stadium der Lymphozyten ist einzig und allein die Anwesenheit des Parasiten. Tötet man den Parasiten mit einem Medikament, leben die noch zuvor infizierten Lymphozyten zwar kurze Zeit weiter, verhalten sich dann aber wie normale, nichttransformierte Zellen und sterben in Kultur ab (Dobbelaere et al., 1988, Pinder et al., 1980).

In den letzten 10 Jahren wurde eine Reihe solcher theilerizider Medikamente entwickelt. Als Beispiele seien hier die Naphthochinon-Derivate 993c und BW720c genannt, die spezifisch den Parasiten *Theileria parva* töten (Coopers Animal Health LTD.). Diese Medikamente können einerseits der Gewebekultur infizierter Lymphozyten appliziert, andererseits infizierten Rindern injiziert werden. Sie schädigen die Wirtszelle in keiner Weise. Man nimmt an, daß sie mit der Elektronentransportkette des Parasiten interagieren. Eine erfolgreiche Behandlung der Rinder kann allerdings nur durch rechtzeitiges Erkennen der Krankheit gewährleistet werden, was den Einsatz dieser Medikamente für Weidetiere nahezu aussichtslos macht (Pinder et al. 1980; Dolan & Young, 1981; Dolan, 1986; Irvin et al., 1982).

Mit Medikament behandelte Zellen proliferieren nur kurze Zeit weiter und zeigen bereits nach 2-3 Wochen wieder die Morphologie primärer ruhender Lymphozyten. Für die Forschungsarbeit ist solch ein reversibles System von großem Nutzen.

1.5 Die Wirt-Parasit-Beziehung

Über die Beziehung von Wirt und Parasit ist bis heute noch wenig bekannt. So ist nicht geklärt, was die Ursache für die Induktion der unbegrenzten Proliferation *Theileria*-infizierter Lymphozyten ist und wie der Mechanismus aussieht, der dies steuert und aufrechterhält. In anfänglichen Arbeiten von R.O. Williams und Mitarbeitern (IGT) versuchte man herauszufinden, ob eine Überexpression bestimmter Onkogene mit dem unkontrollierten Wachstum dieser Zellen in Zusammenhang stehen könnte. Mittels Northern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß bestimmte Onkogene wie *myc* und *raf* in *Theileria*-infizierten Lymphozyten deutlich exprimiert werden. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Expression dieser Onkogene im Vergleich zu Mitogen-stimulierten Rinderlymphozyten entdeckt werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

Goddeeris und Morrison (1987) gaben bereits Hinweise darauf, daß Rinder T-Zellklone, die normalerweise in Kultur von einem Wachstumsfaktor abhängig sind, nach einer Infektion durch *Theileria parva* unabhängig von exogen zugefügten Wachstumsfaktoren werden. Durch Einbau von ^{125}I -UdR konnten Brown und Logan (1986) zeigen, daß Überstände von Gewebekulturen *Theileria*-infizierter Zellen geringe Mengen eines IL2-ähnlichen Wachstumsfaktors enthalten, der eine Proliferation sowohl in Mitogen-

stimulierten Blutlymphozyten (PBL) als auch in Il2-abhängigen T-Zellklonen bewirken kann.

Jedoch gab es bis vor kurzem keinen Hinweis darauf, ob Theileria-infizierte Lymphozyten selbst von einem solchen Wachstumsfaktor abhängig sind. Dobbelaere und Mitarbeiter (1988) zeigten, daß das Wachstum Theileria-infizierter Zellen *in vitro* wahrscheinlich von einem autokrinen Mechanismus gesteuert wird. Sie sezernieren einen Il2-ähnlichen Wachstumsfaktor und exprimieren konstitutiv funktionelle Il2-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Die autokrine Stimulation ist allein abhängig von der Anwesenheit des Parasiten im Zytoplasma der Zelle. Wird der Parasit mittels des Medikaments BW720c eliminiert, und dem Zellmedium rekombinantes Il2 zugegeben wird, hört die Expression der Il2-Rezeptoren auf (Coquerelle et al., 1989).

Die Tatsache, daß die Zugabe von menschlichem, rekombinanten Il2 (rIl2) zum Zellmedium BW720c-behandelter Zellen den mutmaßlichen Wachstumsfaktor ersetzt und die Beobachtung, daß Theileria-infizierte Zellen durch Il2 sogar sehr viel schneller wachsen, zeigt, daß die Il2-Rezeptoren auf diesen Lymphozyten biologisch funktionell sein müssen (Dobbelaere et al., 1988). Es wurde gezeigt, daß Il2/Il2-Rezeptor-Komplexe innerhalb 10 Minuten bis zu 50% internalisiert werden (Coquerelle et al., 1989).

ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Hauptinteresse der Forschungsarbeiten der letzten 10 Jahre konzentrierte sich auf zwei zentrale Probleme: 1. Wie und womit ist es möglich "East Coast fever" entweder zu heilen oder Rinder vor einer Infektion durch den Parasiten zu schützen, ohne die Sozialstruktur und die Ökonomie in den betroffenen Gebieten Afrikas noch mehr zu beeinträchtigen ? 2. Was ist der Grund dafür, daß der Parasit *Theileria parva* Rinderlymphozyten transformiert und ein tumorigenes, immortalisiertes Stadium der infizierten Zellen *in vitro* reguliert und aufrechterhält ?

Zwar weiß man heute schon viel über die Biologie und die Immunologie des Parasiten. So hat man bereits Antikörper gegen alle Parasitenstadien, mit Ausnahme der Merozoiten, isolieren können (Waweru-Kinuthia 1987; Dobbelaere et al., 1985; Morrison et al., 1986a).

Jedoch war bis zu Beginn meiner Dissertation noch nichts über die Molekularbiologie des Parasiten *Theileria parva* selbst bekannt. So konnte man den Parasiten weder auf genomischer noch auf transkriptioneller Ebene nachweisen. Ebenso ist noch nichts über die Genomstruktur und über die Transkription dieses intrazellulären Parasiten bekannt.

Im Rahmen meiner Dissertation sollte daher ein *Theileria*-spezifisches Gen und Transkript untersucht werden. Es bot sich an ein Gen zu wählen, welches in allen bisher untersuchten Eukaryonten nachgewiesen werden konnte, um eine Vergleichsbasis mit anderen Organismen herzustellen : AKTIN. Außerdem sollte dadurch eine Analyse des evolutionären Ursprungs von *Theileria parva* im Vergleich seines Aktin Gens (Gene?) mit der Struktur anderer eukaryontischer Aktin Gene vereinfacht werden.

Neben der Isolierung und Sequenzierung von Aktin sollten folgende Fragen beantwortet werden können:

1. Wird *Theileria* Aktin transkribiert ?
2. Gibt es intervenierende Sequenzen ?
3. Gibt es ein Signal für eine Polyadenylierung ?
4. Wie sieht die Promotorregion aus ?
5. Gibt es am 5`-Ende der mRNA vielleicht sogenannte "Trans Spliced Leader"-Sequenzen, wie man es von Trypanosomen und *Caenorhabditis elegans* her kennt ?
6. Ist Aktin in *Theileria parva* durch eine Multigen Familie kodiert, wie man es von anderen Eukaryonten her kennt ?

1.6 AKTIN

Aktin ist ein weitverbreitetes, hochkonserviertes Protein, das zu linearen Filamenten polymerisiert und für viele Formen der Zellbewegung essentiell ist, wie für Muskelkontraktion, für Struktur und mechanische Eigenschaften der zytoplasmatischen Matrix. Aktin ist bis jetzt in allen eukaryontischen Zellen gefunden worden, angefangen von den Pilzen über die Protozoen bishin zu den Säugern.

Die Literatur über Aktin und Aktin-bindende Proteine ist nahezu unüberschaubar und eine angemessene Zusammenfassung würde den Rahmen einer solchen Einleitung überschreiten.

Heute besteht ein nahezu komplettes Bild darüber inwieweit die Primärstruktur innerhalb des phylogenetischen Stammes variiert und eine detaillierte dreidimensionale Struktur des Aktins ist durch Röntgen Kristallographie mittlerweile fast aufgeklärt (Kabsch et al., 1985; Pollard & Cooper 1986).

Im Gegensatz dazu besteht noch immer eine große Streitfrage über die Aktinstruktur im Filament und wie das Aktin Monomer in diesem Filament orientiert ist (Pollard, 1984).

Der Großteil der neueren Arbeiten auf diesem Gebiet handelt von Proteinen, die an das Aktin Monomer oder Filamente binden und die Polymerisation regulieren bzw. an anderen Filamenten, Mikrotubuli, Membranen oder anderen Strukturen in der Zelle haften. Der Mechanismus der Wirkungsweise einiger dieser Proteine ist mittlerweile aufgeklärt. Obwohl die meisten dieser Proteine in den Zellen lokalisiert sind, gibt es bisher keinen experimentellen Hinweis über die Funktion dieser vermutlichen regulatorischen und strukturellen Proteine in lebenden Zellen (Pollard & Cooper 1986).

Ähnlich wie bei den Invertebraten und den Säugern ist Aktin auch bei niederen Eukaryonten bis auf zwei Ausnahmen, *Tetrahymena* (Cupples & Pearlsman, 1986; Hirono et al., 1987) und *Saccharomyces cervisiae* (Mertin & Gallwitz, 1987), durch eine Multigen Familie repräsentiert. Die Anzahl der Aktin Gene variiert, wie eben genannt, zwischen einem Aktin Gen und beispielsweise 17-20 Aktin Genen in *Dictyostelium* (Kindle & Firtel, 1978). Die Aktin Genfamilie in *Drosophila* weist z.B. 6 Gene auf, welche 3 Hauptklassen in der Größe der mRNA bilden und sich durch 3 verschiedene isoelektrische Punkte in den Aktin Proteinen unterscheiden (Tobin et al., 1980).

Andere Organismen zeigen die Präsenz von 6-15 Aktin-Genen in Seeigeln (Cox et al., 1986) und 4-7 Genen im Hühnchen (Cleveland et al., 1980). Drei mutmaßliche Gene wurden in dem Ciliaten *Oxytricha fallax* entdeckt (Kaine & Spear, 1980; Greselin et al., 1988). Mindestens drei Gene für Aktin wurden in *Acanthamoeba castellanii* gefunden und es liegt hier lediglich eine Größenklasse an mRNA Molekülen mit einer Länge von 1300 Nukleotiden vor (Nellen & Gallwitz, 1982).

Die sechs unterschiedlichen Aktin-Gene beim Menschen weisen Einzelkopien für die vier verschiedenen Muskel-Aktine auf, jedoch Multikopien für die zytoskelettalen Aktin-Gene. Viele von ihnen sind jedoch Pseudogene (Erba et al., 1986).

In Säugern, *Drosophila*, *Dictyostelium* und Seeigel gibt es unterschiedliche Längen der Aktin-mRNA. Während die proteinkodierenden Regionen eine identische Länge von 374 oder 375 Aminosäuren aufweisen, müssen die zusätzlichen Nukleotide in der 5'- und /oder in der 3'-Region der mRNA liegen.

Hybridisierung mit einer Probe des 3'-Endes einer Ratten α -Aktin mRNA zeigte, daß es α -Aktin - spezifische Sequenzen gibt, welche nicht mit β oder γ -Aktin kreuzhybridisierten (Kocher & Gabbiani, 1987). Ähnlich dazu ergab eine Sequenzierung der 5' nichttranslatierten Region (=UTR) der 17 *Dictyostelium* Aktin-Gene keine Sequenzhomologie untereinander (Firtel et al., 1979). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß transkribierte, nichttranslatierte Regionen nicht unbedingt innerhalb eines Organismus konserviert sein müssen.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien, Radioisotope und Arbeitsmittel

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| Actinomycin D | Sigma, München |
| Agarose, Typ II, Typ VII | Sigma, München |
| Alkalische Phosphatase | Boehringer, Mannheim |
| Amberlite | Serva, Heidelberg |
| Ammoniumpersulfat | Bio Rad, München |
| Ampicillin | Sigma, München |
| AMV-Reverse Transkriptase | Live Science, Genf |
| Bacto-Agar | Difco Laboratories, Detroit |
| Bacto-Hefeextrakt | Difco Laboratories, Detroit |
| Bacto-Trypton | Difco Laboratories, Detroit |
| Bakterienplatten 9cm | Greiner, Nürtingen |
| Bakterienplatten, 25cm | Gibco, Eggenstein |
| Bal 31-Exonuklease | New England Biolabs, Schwalbach |
| Caesiumchlorid | Biomol, Ilvesheim |
| desoxy-Nukleosidtriphosphate | Boehringer, Mannheim |
| dideoxy-Nukleosidtriphosphate | Boehringer, Mannheim |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma, München |
| Dithiothreitol, DTT | Gibco, Eggenstein |
| DNase | Boehringer, Mannheim |
| E.coli DNA-PolymeraseI (Klenow) | New England Biolabs Schwalbach |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma, München |
| Ficoll | Serva, Heidelberg |
| Fötales Kälberserum, FCS | Gibco, Karlsruhe |
| Glycerin | BRL Inc., Neu-Isenburg |
| Glyoxal | Sigma, München |
| Harnstoff | BRL (Gibco), Karlsruhe |
| Hepes | Sigma, München |

| | |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Kieselgel-DC-Platten | Macherey-Nagel, Düren |
| K-Morpholinethansulfonsäure | Fluka, Neu-Ulm |
| Lysozym | Boehringer, Mannheim |
| N,N'-Methylen-bisacrylamid | Bio Rad Laboratories, München |
| NACS-Prepac Säulen | BRL Inc, Neu-Isenburg |
| Nick-Translations-Kit | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| Nitrocellulose Filter | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Nukleosidtriphosphate | Boehringer, Mannheim |
| oligo-dT-Cellulose | Pharmacia, Heidelberg |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Karlsruhe |
| PIPES | Sigma, München |
| Proteinase K | Merck, Darmstadt |
| Restriktions-Endonukleasen | ABL, Basel |
| | Boehringer, Mannheim |
| | Promega Biotek, Heidelberg |
| | Pharmacia, Freiburg |
| | New England Biolabs, Schwalbach |
| | BRL Inc., Neu-Isenburg |
| | Boehringer Mannheim |
| | Promega, Biotec, Heidelberg |
| | Fluka, Neu-Ulm |
| | Pharmacia, Freiburg |
| | Serva, Heidelberg |
| | Pharmacia, Freiburg |
| | Amersham Buchler, Braunschweig |
| | New England Biolabs, Schwalbach |
| | Bio Rad Laboratories, München |
| | Boehringer, Mannheim |
| | Sigma, München |
| | Gibco, Karlsruhe |
| | Bender & Hobein, Karlsruhe |
| | Bender & Hobein, Karlsruhe |
| | Bender & Hobein, Karlsruhe |
| RNase A | |
| RNasin | |
| Rubidiumchlorid | |
| S1 Nuklease | |
| SDS | |
| Sepharose | |
| T4 DNA Ligase | |
| T4 Polynukleotid-Kinase | |
| TEMED | |
| transfer RNA (Hefe) | |
| Tris | |
| Trypsin | |
| Whatman GF/C -Filter | |
| Whatman 3MM-Papier | |
| Whatman DE 81-Papier | |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| α - ³² P-dCTP (370 MBq/ml, >15 TBq/mmol) | Amersham Buchler, Braunschweig |
| γ - ³² P-ATP 370 MBq/ml, >185 TBq/mmol) | Amersham Buchler, Braunschweig |
| α - ³⁵ S-dATP (296 MBq/ml, >14,8 TBq/mmol) | Amersham Buchler, Braunschweig |
| α -threo-(dichloroacetyl-1- ¹⁴ C)- Chloramphenicol | Amersham Buchler, Braunschweig |

Chemikalien, soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden von den Firmen Merck, Serva oder Sigma bezogen.

2.2 ZELLEN

Bakterien :

- E. coli TG1 : Derivat von JM 101
 Genotyp Δ (lac pro) , supE, thi , hsd Δ 5 (r-m-)
 F' traD 36, proAB, lacI q Z , dN15 (Gibson, Tobi , 1984)
- E. coli C600 : F-, thi -1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44

Eukaryontische Zellen :

Theileria parva (Muguga) infizierte Rinderlymphozyten, TpM Klon 803
(Emery et al., 1981).

Periphere Rinderblutlymphozyten = PBL, (Con A stimuliert).

2.3 GEWEBEKULTUR-MEDIEN

Complete Leibovitz 15-Medium (cL15) für TpM Zellen:

10% FCS, 1h bei 56 °C inaktiviert
10% Tryptose Phosphate Broth
20 µg/ml Glutamin
20 mM HEPES (pH 7,1)
1% Penicillin/Streptomycin

Complete RPMI-Medium (cRPMI) für ConA-stimulierte Lymphocyten:

10% FCS, 1 h bei 56 oC inaktiviert
20 µg/ml L-Glutamin
20 mM HEPES (pH 7,1)
50 µg 2-Mercaptoethanol

2.4 NÄHRMEDIEN FÜR BAKTERIEN

2 x YT Bakterienmedium:

0,8% Bacto-Trypton
0,5% Bacto-Hefeextrakt
0,5% NaCl

NZCYM-Medium:

10% NZ-Amin
5% Bacto-Hefeextrakt
5% NaCl
1% Casaminosäuren
2% MgSO₄·7H₂O
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.

SOB-Medium:

20% Bacto-Trypton
5% Bacto-Hefeextrakt
10 mM NaCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
2,5 mM KCl
die Mg²⁺-Salze nach dem Autoklavieren steril filtriert
zugeben,

LB-Medium:

10% Bacto-Trypton
5% NaCl
5 % Hefe-Extrakt
1% Glukose

H-Medium:

10 % Bacto-Trypton
8% NaCl

Alle Medien wurden in Wasser suspendiert und autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurde 15% Agar, zur Herstellung von Top-Agar 7,5% Agar zugegeben.

SM-Medium:

5,8% NaCl
2% MgSO₄·7H₂O
50 ml/l 1M Tris, pH 7,5
5 ml/l 2% Gelatine

RNA Waschpuffer:

0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1% SDS

RNA Elutionspuffer:

10 mM Tris pH7,4, 1 mM EDTA, 0,05% SDS

RNA-Denaturierungspuffer:

30 µl 30% deionisiertes Glyoxal, 105 µl DMSO, 4,2 µl 50xRNA Laufpuffer

RNA Ladungspuffer:

50% Glycerin, 10 mM Na₂HPO₄, 0,4% Bromphenolblau

Kern-Lysis-Puffer:

10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.

2x Hybridisierungspuffer für Primer Extension:

500 mM KCl, 20 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA

RT-Reaktionspuffer:

750 mM Tris pH 7,5, 150 mM DTT, 60 mM MgCl₂

Hybridisierungspuffer für S1:

80% Formamid frisch umkristallisiert, 400 mM NaCl, 40 mM Pipes pH 6,4, 5 mM EDTA

S1-Reaktionspuffer:

1250 mM NaCl, 150 mM Na Acetat, 5 mM ZnSO₄

Restriktionspuffer:

10xlow, medium, high = 0, 500, 1000 mM NaCl,
+ jeweils 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA

5x Ligationspuffer:

250 mM Tris pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM Spermidin, 5 mM ATP

5xKinasierungspuffer:

50 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 350 mM Tris pH7,6

Lowry Reagenz I:

2% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH

Lowry Reagenz IV:

1 ml 2% Na/K Tartrat, 1 ml CuSO₄, 100 ml Lowry Reagenz I.

Lysozym-Lösung für Plasmid Präparation:

2 mg/ml Lysozym, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8

Sanger-Ladungspuffer:

100 ml deionisiertes Formamid, 4 ml 500 mM EDTA pH8, 0,03 g Xylencyanol, 0,03 g Bromphenolblau.

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTURTECHNIKEN

3.1.1 Zellkultivierung

Alle Zelllinien und primäre Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Das Zellmedium wurde mit HEPES gepuffert.

Die Stammkulturen wuchsen als Suspensionskulturen in 175 cm² oder in 75 cm² Gewebekulturflaschen.

Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in frisches Medium überführt und mit einer Zelldichte von ca 1 x 10⁵ Zellen/ml angesetzt.

3.1.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde auf zwei Arten bestimmt: 1. Zählung in der Zählkammer (Trypanblau-Färbung). 2. Zählung im Coulter Counter (Model ZBI, Coulter Electronocs LTD) in geeigneten isotonverdünnten Lösungen.

3.1.3. Isolierung von peripheren Rinderblut-Lymphozyten (PBL) (Mastro & Pepin, 1980)

Die Lymphozyten wurden aus Lymphknoten (Leistengegend) eines frischgeschlachteten Rindes isoliert. Der Lymphknoten wurde zunächst von Fett befreit und dann mit Skalpell und Schere in RPMI-Medium (1% P/S, 0,1% DNase) zerkleinert. Dieses Gemisch aus Zellen und Gewebepartikeln wurde über eine feinmaschige Gaze filtriert. Die so erhaltenen Zellen wurden 15 min mit 2000rpm zentrifugiert, das Sediment in RPMI-Medium (1% P/S, 0,1% DNase) resuspendiert und wieder 15 min mit 2000rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in cRPMI-Medium resuspendiert und gezählt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2x10⁶/ml auf 75 cm² Gewebekulturflaschen verteilt.

3.1.4 Morphologische Untersuchung der Zellen

Ca. 1×10^4 Zellen wurden in einem Volumen von 100-200 μl in den Cytospin (Shandon & Southern, UK) pipettiert und 5 min mit 1000rpm auf ethanolgereinigte Objektträger zentrifugiert. Die Zellen, die sich nun auf dem Objektträger befanden, wurden 5 min bei RT getrocknet, 5 min in 100% Methanol fixiert und anschließend in einer 6% Giemsa-Lösung bei 37 °C 45 min inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Giemsa-Lösung dekantiert und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Die so hergestellten Präparate konnten mit Hilfe von Immersionsöl im Mikroskop bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet und photographiert werden.

3.2 ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN MIT NUKLEINSÄUREN

3.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde über die optische Dichte (OD) der wässrigen Lösung bestimmt. Einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprechen 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 24 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid-DNA. Aus dem Verlauf der spektralen Absorption wird die Verunreinigung der Nukleinsäure-Lösung ersichtlich. So sollte die OD bei 280 nm höchstens zwischen 50 und 70% der OD bei 260 nm betragen.

3.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion einer Nukleinsäure-Lösung

Um Proteinverunreinigungen aus einer Nukleinsäure-Lösung zu entfernen, wurde diese mit Wasser auf mindestens 50 μl aufgefüllt. Nach Zugabe eines gleichen Volumens Phenol (TNE-gesättigt) und eines gleichen Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde kräftig gemischt und kurz zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige wässrige Oberphase wurde zweimal mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

3.2.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit NaAcetat (pH 4,8) oder mit NaCl auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und ein 2,5-faches Volumen an Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte entweder 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden 10 min bei 10000rpm abzentrifugiert und anschließend im Vakuum getrocknet.

3.3 DNA - KLONIERUNGSTECHNIKEN

3.3.1 Restriktionsverdau

Eine Enzymeinheit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg Lamda-DNA in einer Stunde vollständig verdaut. Pro µg zu schneidender DNA wurde ein Überschuß von 2-3 Einheiten Enzym in 20-100 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über mindestens 2 Stunden oder über Nacht unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Es wurde ein Satz von 3 Reaktionspuffern mit unterschiedlichem Salzgehalt verwendet ("high", "medium" und "low"). Bei einem Verdau mit mehr als einem Enzym wurde, ausgenommen es handelte sich um Enzyme mit gleichen Pufferbedingungen, nacheinander im gleichen Reaktionsgefäß verdaut und die Puffer in der Reihenfolge von "low" nach "high" zugegeben.

3.3.2 Auffüllen von 5'-Überhängen

Etwa 1 µg des DNA-Fragmentes wurden mit 5 Einheiten DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) in Polymerase-Reaktionspuffer in einem Volumen von 20 µl für 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden 2 µl einer 2 mM dNTP-Lösung zugegeben und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion. Die DNA wurde gefällt, zentrifugiert und das Sediment mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

3.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die DNA wurde in einem Endvolumen von 100 µl Dephosphorylase-Puffer mit 4 Enzymeinheiten Alkalische Phosphatase versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit bei 37 °C wurden weitere 4 Enzymeinheiten zugesetzt und noch einmal 30 min inkubiert. Anschließend erfolgten 10 min Inkubation bei 68 °C. Zur Entfernung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

3.3.4 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden mit einem Gene-Assembler der Firma Pharmacia von Dr. Renate Burckhardt, IGT, synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden sie über Nacht in 1 ml 25% Ammoniak bei 50 °C inkubiert und dann aus der Reaktions-Kassette herausgelöst. Daraufhin wurde die Ammoniaklösung in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und das Sediment nach zweimaligem Waschen mit Wasser in 500 µl H₂O gelöst und die Konzentration bestimmt.

Sollten die Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung eingesetzt werden, mußten die Oligonukleotide alle die gleiche Länge besitzen. Hierfür wurden ca 250 µg des Oligonukleotids eingetrocknet, in 50 µl Sanger-Ladungspuffer gelöst und über ein 1 mm dickes, 20% Acrylamid/8.3 M Harnstoff - Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTBE bei 1200 Volt über 2 Stunden, bzw. so lange, bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend in 200 ml 1xTBE mit 20 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 15 min gefärbt. Die größte Bande wurde unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten und in 1 ml Wasser über Nacht bei 37 °C eluiert. Anschließend wurde die DNA über eine NACS-Prepac Säule gereinigt (s 3.7.2).

3.3.5 Ligation

Ligation in wässriger Lösung

1 µl 10x Ligase-Puffer wurde mit 1 µl einer 10 mM ATP-Lösung und 50 ng Vektor-DNA gemischt. Dazu wurde soviel Insert-DNA gegeben, daß das molare Verhältnis von Vektor-

DNA zu Insert-DNA etwa 2:1 betrug. Mit Wasser wurde auf 9 µl aufgefüllt und 1 µl T4 DNA-Ligase (2,5 U/µl) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 15 °C.

In unseren Versuchen konnten bei blunt-end-Ligationen nur mit der T4 DNA-Ligase von Amersham befriedigende Resultate erreicht werden, während bei sticky-end-Ligationen auch Enzyme anderer Hersteller gut funktionierten.

Ligation im Agarose-Gel

Häufig wurden die DNA-Fragmente nicht erst als Insert-DNA aus dem Gel isoliert, sondern noch im Gel ligiert. Dazu wurde die DNA in Agarose Typ VII (low gelling temperature) aufgetrennt, ausgeschnitten und die miteinander zu ligierenden Fragmente zusammengegeben. Anschließend wurden die Gelstücke 10 min bei 68 °C geschmolzen, auf 42 °C abgekühlt und mit Reaktionspuffer und Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl ligiert. Die Reaktionsbedingungen sind dieselben wie bei der Ligation in wässriger Lösung.

3.3.6 Präparation von Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten

5 µg der Vektor-DNA wurden mit dem gewünschten Enzym in einer 50 µl-Reaktion verdaut, wobei mit dieser Methode je nach verwendetem Enzym Vektoren mit stumpfen ("blunt") oder überstehenden ("sticky") Enden erzeugt werden konnten.

Ein Aliquot von 500 ng wurde durch den Vergleich mit ungeschnittenem Vektor in einem Agarose-Minigel auf Vollständigkeit des Verdauens hin überprüft. Der verbleibende Rest der DNA wurde dephosphoryliert (s 3.3.3), Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, zentrifugiert und das Sediment mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst.

3.3.7 Isolierung von DNA aus Gelen

Isolierung aus Agarose-Gelen

Die gewünschte Bande wurde im UV-Licht lokalisiert. In einen mit dem Skalpell unterhalb der Bande eingeführten Schnitt wurde ein Stück DEAE-Zellulosepapier eingeführt. Die

Elektrophorese wurde danach solange fortgesetzt, bis die Bande in den Papierstreifen hineingewandert war. Der Papierstreifen wurde aus dem Gel entfernt und in ein Eppendorf-Röhrchen mit 500 µl einer 1,5 M NaCl-Lösung überführt. Nach sehr kräftigem Schütteln (Vortex) und 20 min Inkubation bei 65 °C war die DNA in den Puffer eluiert. Das Papier wurde wie folgt abfiltriert: Ein Eppendorf-Röhrchen wurde an seinem konischen Ende mit einer Kanüle durchbohrt, eine Spatelspitze Quarzsand hineingegeben und auf ein intaktes Eppendorf-Röhrchen gesetzt. In das obere Röhrchen wurde die papierhaltige DNA-Lösung gegeben und beide Röhrchen aufeinandersitzend in der Eppendorf-Zentrifuge einige Sekunden zentrifugiert. Die eluierte DNA befand sich nun im unteren Röhrchen und konnte wie üblich gereinigt und gefällt werden.

Isolierung aus Acrylamid-Gelen

Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht lokalisiert und ausgeschnitten. Aus einem 0,8% Agarose-Gel wurde ein der Bandengröße entsprechender Block herausgeschnitten und das Acrylamid-Gelstück in die entstehende Aussparung gebracht. Das Gel wurde auf die Gelapparatur gelegt und ein Stück DEAE-Zellulose-Papier wurde an der der Kathode näher gelegenen Seite zwischen Acrylamid und Agarose geschoben. Das Gel wurde mit Laufpuffer überschichtet und solange Spannung angelegt bis sich die DNA im Papier befand. Die Elution aus dem Papier erfolgte wie oben.

3.3.8 Bal 31 Exonuklease-Verdau

10 µg des Plasmids mit dem zu sequenzierenden 2,3 Kb AccI-Fragment wurden entweder EcoRI/PstI oder mit EcoRI/PstI doppelverdaut, um das Insert herauszuschneiden. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurde die DNA in 25 µl Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 25 µl 2xBal31-Puffer (1200 mM NaCl, 24 mM CaCl₂ 24 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl pH 8) und 0,5 µl Bal 31 (Biolabs, 0,75 U/µl), erfolgte der Start des Exonuklease-Verdau bei 30 °C. Nach 30 sek, 2-, 4-, 6-, und 10 min wurden der Reaktion je 10 µl entnommen und zum Stoppen der Reaktion in 50 µl Phenol/ 20 µl 50 mM EGTA/17,5 µl Wasser gegeben. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Überprüfung der

Größe der Deletionen in einem 0,8% Agarosegel wurde in Ethanol gefällt und in 100 µl Wasser resuspendiert. Eventuell überhängende Enden wurden aufgefüllt (s. 3.3.2). Bei den Einzelverdaus wurde mit dem anderen Enzym der multiplen Vektor Klonierungsstelle, also bei EcoRI mit PstI und bei PstI mit EcoRI, nachgeschnitten, gereinigt und gefällt. Anschließend wurde in entsprechend geschnittene Vektoren die deletierte DNA subkloniert (s. 3.3.6). Somit war es möglich, gerichtete und nicht gerichtete Subklone für die Sequenzierung zu erhalten. Schließlich wurden die Subklone transformiert (s. 3.3.9) und mittels Plaque-Hybridisierung nach den Klonen gescreent (s. 3.6.2), isoliert und Einzelstrang-DNA für die Sequenzierung präpariert (s. 3.9.6).

3.3.9 Transformation von Bakterienzellen (Hanahan, 1983)

Präparation von kompetenten Zellen für die Transformation

Eine Übernacht-Kultur von E. coli. TG1 in SOB-Medium mit Magnesiumsalzen wurde 1:50 in frischem SOB + Magnesiumsalzen verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 herangezüchtet. Die Zellen wurden in einer ungekühlten Zentrifuge bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert und in einem Drittel ihres ursprünglichen Volumens in kaltem T-Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte wieder eine Zentrifugation bei 3000rpm für 10 min, diesmal aber in einer gekühlten Zentrifuge bei 4 °C.

Das Zellsediment wurde nun in einem Zehntel des Ursprungs-Volumens in kaltem T-Puffer resuspendiert und sofort für die Transformation der Bakterien verwendet.

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| T-Puffer: 100 ml | 0,2 g MES-KOH (pH mit KOH auf 6,2 einstellen, bevor andere Salze zugegeben werden) |
| | 1,2 g RnCl |
| | 0,9 g MnCl ₂ |
| | 0,08 g [Co(NH ₃) ₆]C |
| | 0,147 g CaCl ₂ |
| | mit Wasser auf 100 ml auffüllen und steril filtrieren. |

Transformation mit Plasmiden

Zu 200 µl kompetenten Zellen wurden maximal 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und für 1 h auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock durch 90 sek Inkubation bei 42 °C und wieder 1 h auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl SOB-Medium wurden die Zellen für 1 h in ein 37 °C-Wasserbad gestellt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl 2% X-Gal und 30 µl 2% IPTG als Indikator. Die Zellen wurden in Petrischalen auf LB-Agar + Ampicillin 100 µg/ml als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation mit M13-Phagen

Zu 200 µl kompetenten Zellen wurden max. 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und 45 min auf Eis inkubiert. Nach 90 sek Hitzeschock bei 42 °C erfolgte erneute Inkubation auf Eis für 15 min.

Zu jedem Ansatz wurde nun 3 ml H-Top-Agar, der bei 45 °C flüssig gehalten worden war und 50 µl 2% X-Gal, 30 µl 2% IPTG und 30 µl TG1-Übernacht-Kultur enthielt, gegeben.

Nach kurzem Mischen wurde der Top-Agar auf Petrischalen mit H-Agar gegossen und die Platten nach dem Erstarren über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei jeder Transformation wurden 3 Kontrollen mitgeführt: 1. Um die Effizienz der Transformation beurteilen zu können, wurde ein Ansatz mit 25 pg unverdaulichem Vektor (also ohne Insert-DNA) transformiert. 2. Je ein Ansatz erfolgte auch mit geschnittenem, dephosphoryliertem, nicht aber ligiertem Vektor, um die Menge restlicher, evtl. nicht geschnittener DNA erkennen zu können. 3. Schließlich wurden 100 ng verdaute, dephosphorylierte Vektor-DNA einer Ligasereaktion unterzogen und anschließend transformiert, um die Güte der Dephosphorylierung beurteilen zu können.

3.3.10 Kolonie-Hybridisierung

Zur Identifizierung der gewünschten Bakterienklone nach der Transformation wurde ein Filterabdruck der Kulturplatte und anschließende Kolonie-Hybridisierung mit der entsprechenden, radioaktiv markierten Probe durchgeführt.

Dazu wurden die Kolonien der Musterplatte auf ein Nitrozellulose-Filter mittels eines Abdrucks transferiert. Die Filter wurden zuvor in Wasser, dann in 2 M NaCl getaucht und kurz auf 3MM-Papier gelegt, um zu verhindern, daß die Kolonien vollständig auf dem Filter anhaften. Die aufgelegten Filter wurden auf der Platte so markiert, daß nach der Hybridisierung des Filters die ursprüngliche Orientierung wiedergefunden werden konnte.

Die Filterabzüge wurden 2 min denaturiert (0,5 M NaOH/1,5 M NaCl) und 3 min neutralisiert (0,5 M Tris pH8/1,5 M NaCl). Danach wurde die DNA für 2 Stunden in einem Vakuumofen bei 80 °C auf die Filter festgebacken.

Die Filter konnten so bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

3.4 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

3.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in 0,5% - 1,5% Agarose Gelen mit 1xTBE + 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Das Gel wurde in einen horizontalen Gel-tank gelegt, der 1xTBE-Puffer + 0,5 µg/ml Ethidiumbromid als Laufpuffer enthielt. Die Proben wurden nun in 5xLadungspuffer TypIII in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte je nach Größe der Gelkammer bei 75-100 Volt in einer Laufzeit von 1-3 Stunden oder bei 20-50Volt über Nacht.

Das Gel wurde anschließend auf eine UV-Lampe an einen Maßstab angelegt und mit Hilfe einer Polaroidkamera photographiert.

3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Acrylamid Gelen

Als Gellösung wurde 6% Acrylamid(57 g Acrylamid + 3 g Methylenbisacrylamid pro l 1xTBE), 0,03% TEMED und 0,07% APS verwendet, die zwischen zwei Glasplatten (15x14 cm, 1 mm Abstand) gegossen wurde. Nach der Polymerisation wurden die Platten vertikal in einer Gelapparatur fixiert und die DNA-Proben unter Zusatz von Probenpuffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt durchgeführt und als Laufpuffer diente 1xTBE. Die Gele wurden danach 15 min in H₂O mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, um die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen.

3.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Acrylamid/Harnstoff-Gelen: Sequenzier-Gel

50 ml einer 6% Acrylamid/Harnstoff Stammlösung (7M Harnstoff, 6% Acrylamid: pro 1 1xTBE, 57 g Acrylamid+3g Methylbisacrylamid) wurden mit 80 µl 25% APS und 80 µl TEMED versetzt, in eine Gelkammer (20x40 cm, 0,4 mm Abstand) gegossen und für 30 min polymerisiert. Die Geltaschen wurden durch einen 48-zähligen Kamm der Firma BRL gebildet. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Das Gel wurde bei einer Stromstärke von 28 mA wenigstens soweit laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Bande am unteren Gelrand angekommen war.

Nach dem Lauf wurde eine der Glasplatten vorsichtig abgehoben, sodaß das Gel an der anderen Platte haftete. Es wurde zur Fixierung in eine 10% Methanol/10% Essigsäure-Lösung gelegt, anschließend mit Whatman-3MM-Papier von der Platte abgezogen und 30 min bei 70 °C auf dem Geltrockner unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde mit einem Röntgenfilm exponiert.

3.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarose Gelen

Maximal 10 µg RNA in einem Volumen von 4 bzw. 8 µl Wasser, wurde mit 7,2 bzw. 14,4 µl Denaturierungspuffer versetzt und 5 min bei 50 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde dem Gemisch 1 µl Ladungspuffer zugegeben und auf ein 1,4% Agarosegel (11x14 cm) geladen.

Die Elektrophorese wurde mit 75 Volt 2,5 Stunden in einer horizontalen Gelapparatur gefahren. Danach wurde das Gel mit 150 µl Acridinorange (30 µg/ml) in 150 ml RNA-Laufpuffer 10 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte jeweils durch dreimaliges Waschen in 20 min in Laufpuffer. Die RNA wurde anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert. Für die Bereitung des 1,4% Agarose Gels s. 2.5.

3.5 PRÄPARATIVE METHODEN

3.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes für Enzymtests

Alle transfizierten Zellen der 9 cm Kulturschale wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und in Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde bei 10000rpm abzentrifugiert und das Sediment in 100 µl 250 mM Tris-HCl, pH 7,6, resuspendiert.

Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch dreimaliges Schockfrieren und Wiederauftauen im Ethanol/Trockeneisbad und im 37 °C Wasserbad für jeweils 10 min. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 10000rpm abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Lymphozyten

Diese Methode ist für mehr als 4×10^7 Zellen geeignet. Die Ausbeute an Gesamt-RNA betrug zwischen 100 µg und 500 µg.

In einer sterilen Glasflasche wurden 19 ml NTE, 1 ml 10% SDS und 20 ml Phenol (Tris pH 8 gesättigt) gemischt und auf 80 °C erhitzt. Die Zellen wurden auf 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und 10 min bei 2500rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in insgesamt 50 ml NTE resuspendiert, in ein Röhrchen vereint und 5 min bei 2500rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml NTE aufgenommen und tropfenweise in die heiße Phenol-Lösung gegeben. Diese Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen auf neue 50 ml Röhrchen verteilt und für 10 min bei 3000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und auf Eis gestellt. Die untere Phenolphase wurde mit 10 ml NTE für 5 min reextrahiert.

Nach der Vereinigung der wässrigen Phasen wurden diese erneut mit 20 ml Phenol versetzt und für 10 min bei 3000rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen Chloroform vereinigt und für 5 min bei 2000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 2,5-fachem Volumen Ethanol in 200ml Plastikgefäßen bei -20 °C über Nacht gefällt. Die gefällte RNA wurde bei 11000rpm in der Beckman Zentrifuge (Model J2-21) für 30-60 min zentrifugiert, das Sediment getrocknet und anschließend in Wasser gelöst. Nach Bestimmung der OD wurde die RNA erneut über Nacht bei -20 °C gefällt, das Sediment gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst.

3.5.3 Präparation von polyadenylierter-RNA aus Gesamt-RNA

1 mg Gesamt-RNA wurde auf 0,25 ml Oligo dT-Zellulose (No. 2), die mit Bindungspuffer gesättigt war, in ein steriles 2 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Zu diesem Gemisch wurde 500 µl 2xRNA-Bindungspuffer pipettiert und das Ganze 5 min bei 65 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch zur Adsorption von polyadenylierter RNA an die Zellulose 1 h geschüttelt. Danach wurde 5 min bei 2000rpm zentrifugiert, der Überstand 5 min auf 65 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis wieder der Oligo dT-Zellulose zugegeben und 1 Stunde geschüttelt. Danach wurde das Gemisch jeweils zweimal mit Bindungspuffer und zweimal mit Waschpuffer gewaschen und dazwischen jeweils bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Elution der polyadenylierten RNA erfolgte durch zweimaliges Waschen mit Elutionspuffer. Die so erhaltene polyA-RNA wurde mit 1/10 Volumen 5M NaCl + 1/10 Volumen 2xRNA-Bindungspuffer 5 min auf 65 °C erhitzt, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wieder auf die Zellulose gegeben und die ganze Prozedur von Anfang an wiederholt.

Das Eluat wurde vereinigt und in einem 15 ml Corexröhrchen mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat und 2,5-fachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällte RNA wurde 30-60 min bei 11000rpm zentrifugiert, das Sediment gewaschen, getrocknet und schließlich in 10 µl Wasser gelöst.

3.5.4 Präparation von Schizonten-RNA aus infizierten Lymphozyten (Gerhards et al., 1989)

Dem Prinzip dieser Methode liegt eine Kernisolierung zugrunde. 24 Stunden vor der Isolierung wird dem Zellmedium Cycloheximid (2mg/l cL15) zugesetzt. Die Zellen wurden so angesetzt, daß sie sich zum Zeitpunkt der Isolierung in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (ca 5×10^5 Zellen/ml). Für eine Schizonten-Isolation benötigt man 10^9 Zellen.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf 200 ml Zellen was ungefähr 10^7 Zellen entspricht. Die Zellen wurden in großen Zentrifugenbechern (500 ml) für 10 min bei 1200rpm/4 °C zentrifugiert, das Sediment in 25 ml eiskaltem NTE resuspendiert und wieder mit 1200rpm sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in soviel kaltem NTE resuspendiert, daß $3-4 \times 10^7$ Zellen auf 1 ml NTE kamen. Die Zellen wurden nun

in einem vorgekühlten Douncer aufgebrochen und zwar so lange, bis keine ganzen Zellen unter dem Mikroskop mehr sichtbar waren. Danach wurde die Suspension auf einen Percoll-Stufengradienten gegeben. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen: 10 ml 5% Percoll +5 ml 25% Percoll darunterschichten; geladen wurden 7 ml Suspension; die Percoll-Lösungen wurden in NTE angesetzt. Danach wurde 10 min bei 1500rpm/4 °C zentrifugiert. Die Kerne waren zwischen den beiden Gradienten sichtbar und wurden mit einer ausgezogenen, gebogenen Pasteurpipette abgezogen, mit 10-15 ml NTE aufgefüllt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml NTE gelöst. Die Zeit zwischen dem Aufbrechen der Zellen bis hier sollte nicht mehr als 20 min betragen. Die Kerne, samt den Schizonten, wurden dann in eine 80 °C heiße Phenol-Lösung gegeben (7 ml Phenol, 6 ml NTE, 700 µl SDS 10%), vorsichtig geschüttelt und für weitere 5 min inkubiert. Der Rest des Arbeitsganges ist wie in 3.5.2 beschrieben.

3.5.5 Präparation von genomischer DNA aus Lymphozyten (Miller et al., 1988)

Etwa 3×10^7 Zellen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in 30 ml Kern-Lysis-Puffer resuspendiert und Proteinase K (0,2 mg/ml) zugegeben, kurz gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 10 ml 6 M NaCl-Lösung zugegeben, gemischt und 30 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde, möglichst ohne Protein, dekantiert und zur Fällung der DNA ein 2-faches Volumen an Ethanol zugegeben. Ohne zu zentrifugieren wurden die DNA-Fäden mit einer Pasteurpipette herausgenommen, in 70% Ethanol gewaschen und die DNA luftgetrocknet und in 0,3-0,5 ml TE gelöst. Anschließend wurde die OD gemessen und die DNA bei 4 °C aufbewahrt.

3.5.6 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Eine Kolonie der Bakterien, die das entsprechende Plasmid enthielten, wurde in 2 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C über Nacht geschüttelt.

1 ml der Bakteriensuspension wurde in 100 µl frisch hergestellter Lysozym-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung, weiteren 5 min Inkubation auf Eis und Zugabe von 150 µl 3M NaAcetat wurde

weitere 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 5 min bei 10000rpm zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand in einem neuen Röhrchen mit Ethanol gefällt. Das Sediment wurde in 100 µl 0,1 M NaAcetat, 50 mM Tris, pH 7,8 resuspendiert und erneut mit Ethanol gefällt und in 40 µl Wasser aufgenommen.

Zur Beseitigung von RNA wurde ein Verdau mit DNase-inaktivierter RNase A (20 µg/ml) für 30 min bei 37 °C vorgenommen.

3.5.7 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab

200 ml 2xYT-Medium + Ampicillin (100µg/ml) wurden mit der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 5000rpm und 4 °C 10 min abzentrifugiert, das Sediment in 10 ml frischer Lysozym-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml alkalischer SDS-Lösung, 5 weiteren min auf Eis und Zugabe von 20 ml 3 M NaAcetat pH 4,8, wurde weitere 60 min auf Eis inkubiert.

Zellfragmente und hochmolekulare DNA wurden anschließend durch 40 min Zentrifugation bei 10000rpm und 4 °C sedimentiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand ohne weitere Salzzugabe ausgefällt und durch 20 min Zentrifugation bei 10000rpm und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml 0,1 M NaAcetat / 50 mM Tris pH 8 resuspendiert und erneut ausgefällt. Dieser Niederschlag wurde in 4 ml 50 mM Tris / 1mM EDTA pH 8 aufgenommen und nach Auflösung mit soviel CsCl versetzt, sodaß die Endkonzentration 1 g CsCl pro g Lösung betrug. Zuvor wurden pro ml Lösung 5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die fertige Lösung wurde mit einer Spritze in ein 5 ml VTI65 Beckman Quick-Seal Zentrifugenröhrchen gefüllt. Mit einer Lösung, die CsCl und Ethidiumbromid in den entsprechenden Anteilen enthielt, wurde der Inhalt des Röhrchens bei Bedarf ergänzt. Die Röhrchen wurden zugeschmolzen und 16 Stunden bei 55000rpm in einem Beckman Vertikalrotor zentrifugiert. Im entstehenden Dichtegradienten wurde die Plasmid-DNA von verbleibender bakterieller genomischer DNA, RNA und Protein getrennt und sammelte sich zu einer Bande, die durch Interkalation von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar war und mit einer Spritze abgezogen werden konnte.

Die abgezogene Lösung wurde wie oben beschrieben aufgefüllt und unter denselben Bedingungen noch einmal 6 Stunden zentrifugiert. Die plasmidhaltige Bande wurde dann erneut abgezogen und mit Wasser auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Das Ethidiumbromid

wurde zweimal mit wassergesättigtem Butanol-1 extrahiert und die Plasmid-DNA ohne weitere Salzzugabe mit Ethanol gefällt.

Das CsCl wurde durch Dialyse bei 4 °C gegen ein 1000-faches Volumen 1xNTE entfernt. Nach 1 Stunde erfolgte ein Wechsel des NTE-Puffers, dann wurde über Nacht weiter dialysiert. Schließlich wurde die DNA wie gewöhnlich in Ethanol und Salzlösung gefällt und in Wasser resuspendiert.

3.5.8 Präparation von Lambda-DNA in kleinem Maßstab

100 µl einer Übernacht-Kultur des jeweiligen Wirtsbakteriums, E.coli NM538hfl⁻ oder C600 hfl⁻, in NZCYM-Medium, dem zur Induktion der Lambda-Pore 0,4% Maltose zugesetzt worden war, wurde mit dem Phagenlysat beimpft und zur Infektion der Bakterien bei 37 °C für 30 min inkubiert ohne zu schütteln.

Die Phagenkonzentration sollte etwa 1 Phage pro 100 Bakterien betragen; die richtige Menge an Phagen ist allerdings schlecht voraussagbar, wenn die Kultur mit einem Lysat beimpft wird, dessen Titer unbekannt ist. Deshalb wurde mit zwei Ansätzen gearbeitet, die sich in der Menge der zugesetzten Phagen um einen Faktor 10 unterschieden.

Nach der Infektion wurden 12 ml NZCYM-Medium zugegeben und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach etwa 8 Stunden war die Kultur mit der richtigen Menge an Phagen lysiert. Zur Lysis der restlichen Bakterien wurde 500 µl Chloroform gegeben und die Kultur über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Um die Zellfragmente zu entfernen, erfolgte am nächsten Tag eine Zentrifugation bei 5000rpm für 10 min, der Überstand (=Phagenlysat) wurde in ein frisches Röhrchen dekantiert. Nach dem Verdau der bakteriellen DNA und RNA durch Zugabe von DNase und RNase (je 10 µg/ml) und einstündiger Inkubation bei 37 °C, wurden die Phagen in 20% PEG6000/2,5 M NaCl gefällt, indem sie für mindestens eine halbe Stunde auf Eis gestellt wurden. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000rpm für 10 min, wurde der Überstand dekantiert und alle am Rand des Röhrchens haftende Flüssigkeit mit einem Zellstofftuch entfernt. Nach der Aufnahme des Phagensedimentes in 250 µl 1xTE-Puffer (10 mM Tris pH 8 / 10 mM EDTA) wurde Phenol/Chloroform-extrahiert und die DNA in Ethanol und NaAcetat gefällt, erneut in TE-Puffer resuspendiert und wieder gefällt.

Die so gewonnene und gereinigte Lambda-DNA wurde schließlich in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris pH 8 / 1 mM EDTA) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

3.5.9 Präparation von Lambda-DNA im großen Maßstab (Maniatis et al., 1982)

Die Phagenlösung mußte zuerst titriert werden. Dafür wurden 10 Verdünnungen von 1:10 von der Phagenstammlösung angesetzt und die Übernacht-Kultur der entsprechenden E.coli-Bakterien in NZCYM-Medium + 0,4% Maltose zugegeben. Zur Absorption der Phagen an die Bakterien wurde nun 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert.

In jedes Röhrchen wurden dann 3 ml H-Top-Agar gegeben, der in einem 45 °C-Wasserbad flüssig gehalten wurde. Sogleich wurde der Top Agar auf H-Agar-Platten gegossen und nach dem Erstarren über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch das Auszählen der Plaques konnte die Konzentration der Phagenstammlösung errechnet werden.

Für die DNA-Präparation wurden 250 ml NZCYM-Medium + 0,4% Maltose mit einer 10 ml Übernacht-Kultur des entsprechenden Bakteriums angeimpft. Diese Vorkultur wurde für ca 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt.

Die Bakterienzahl wurde bei einer OD₆₀₀ bestimmt: 1 OD₆₀₀ = 8x10⁸ Bakterienzellen/ml. Für einen großen 400 ml-Ansatz wurden Phagen und Bakterien in einem Verhältnis von 1:100 und einer Größenordnung von 10¹⁰ : 10⁸ in 20 ml 10 mM CaCl₂/10 mM MgCl₂ zur Absorption, wie beschrieben, vorinkubiert und dann zu den 400 ml NZCYM-Medium + 0,4% Maltose zugegeben und bei 37 °C für 6-10 Stunden geschüttelt. Nach der Lysis der Bakterien wurde 3 ml Chloroform zugesetzt und über Nacht inkubiert. Lambda-Phagen im großen Maßstab heranzuzüchten ist oft eine schwierige und langwierige Angelegenheit. Dies hängt von dem Verhältnis von Phagen zu Bakterien ab. Lysieren beispielsweise die Bakterien zu früh, d.h., schon nach ca 4 Stunden ist die DNA-Ausbeute später zu gering, als daß es wert wäre die Prozedur weiterzuführen. In Regel verändert man das Verhältnis, indem man weniger Phagen einsetzt.

Zur Phagenisolierung wurden die Zellbruchstücke am nächsten Tag 10 min bei 6000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit RNase/DNase, jeweils 1 µg/ml, für 1 Stunde bei 37 °C zum Abbau der bakteriellen Nukleinsäuren inkubiert. Danach wurde wieder für 10 min bei 10000rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden dann die Phagen mit 10% PEG6000/1 M NaCl gefällt, indem mindestens 1 Stunde auf Eis stengelassen wurde.

Anschließend wurden die Phagen bei 8000rpm zentrifugiert und das Sediment in 6 ml TM-Puffer resuspendiert. Die Entfernung des PEG's erfolgte durch Extrahieren mit gleichem Volumen Chloroform. Der Überstand, mit 0,5 g/ml CsCl, wurde auf einen CsCl-Stufengradienten vorsichtig pipettiert und in einem SW40-Rotor bei 22000rpm für 2 Stunden und 20 °C zentrifugiert. Der CsCl-Stufengradient wurde wie folgt hergestellt: die kleinste

Dichte ($\rho=1,35$) wurde als erstes in das Zentrifugenröhrchen pipettiert, dann die beiden anderen Dichten ($\rho=1,5$; $\rho=1,7$) vorsichtig unterschichtet.

Die Phagen sammelten sich, entsprechend ihrer Dichte, zwischen den beiden ersten Dichtestufen als eine bläulich schimmernde Bande an und waren somit von der verbliebenen bakteriellen DNA getrennt worden. Die Bande wurde mittels einer großen Kanüle abgezogen und in 0,817 g CsCl/ml in einem SW 50 Swing-Out Rotor mit 37000rpm für 16-20 Stunden bei 20 °C zentrifugiert. Die Phagenbande wurde wieder mit einer Spritze abgezogen und 2x gegen ein 1000-faches Volumen TM-Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die dialysierten Phagen wurden für 1 Stunde bei 65 °C mit Proteinase K in einem Volumen von 20 ml verdaut (20 mM EDTA/0,1% SDS/50 µg/ml Proteinase K).

Danach wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und erneut gegen ein 1000-faches Volumen TE-Puffers dialysiert. Schließlich wurde die DNA wie üblich gefällt, in Wasser gelöst und die Ausbeute photometrisch bestimmt. Eine gute Ausbeute sollte zwischen 200-500 µg DNA aufweisen.

3.6 "SCREENING" EINER LAMBDA-GENBANK

Hierunter versteht man das Aufsuchen und Isolieren eines Phagen-Klones aus einer Genbank, der das gesuchte Gen bzw. Genfragment enthält. Dazu müssen die Phagen mehrfach ausplattiert werden um schließlich einzelne Phagen-Klone zu erhalten, die jeweils durch Plaque-Hybridisierung nach dem gewünschten Gen abgesucht werden.

3.6.1 Ausplattieren der Phagenkulturen (Plaque-Hybridisierung)

Nach der Bestimmung des Phagentiters der Gen- bzw cDNA-Bibliothek (s. 3.5.9) wurden etwa zwischen 10000 und 50000 Phagen auf einen Bakterienrasen in großen Petrischalen (24x24 cm) auf NZCYM Agar plattiert. Die Phagen wurden mit 200 µl der entsprechenden Bakterien (Übernacht-Kultur) und 200 µl 10 mM CaCl₂/10 mM MgCl₂ versetzt und bei 37 °C inkubiert. Mit 40 ml NZCYM-Top-Agar wurde das Inkubations-Gemisch auf die Platten gegeben. Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die Platten für 6-10 Stunden bei 37 °C inkubiert bis Plaques zu erkennen waren.

3.6.2 Filterabdruck der Phagen-Plaques

Der Phagentransfer auf Nitrozellulose-Filter erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der Kolonie-Hybridisierung, nur wurden die Filter hier zuvor nicht befeuchtet. Die Musterplatten wurden bei 4 °C, versiegelt mit Parafilm, aufbewahrt.

Fixierung und Hybridisierung, sowie die Zuordnung der spezifischen Signale, erfolgte wie bei der Kolonie-Hybridisierung (s. 3.3.10).

3.6.3 "Rescreening" der Lambda-Klone

Bei der ersten Plaque-Hybridisierung werden aufgrund der hohen Phagendichte mit großer Wahrscheinlichkeit Phagengemische isoliert. Deshalb ist mindestens eine zweites Rescreening der isolierten Plaques erforderlich. Hierzu wurden die Phagen aus den Plaques durch Zugabe von 1 ml SM-Puffer herausgelöst und die Phagendichte durch Titration bestimmt. Anschließend werden die Phagen so ausplattiert, daß einzelne Plaques isoliert werden konnten (s. 3.5.8 und 3.5.9).

Nach Filterabdruck und Hybridisierung mit der entsprechenden, radioaktiv markierten Probe wurden wieder mit einem Zahnstocher die positiven Plaques gepickt. Im Idealfall sollten alle Phagen des letzten Rescreens ein positives Signal geben.

3.7 PRÄPARATION RADIOAKTIV MARKIERTER PROBEN

3.7.1 Markierung über die gesamte Länge (Feinberg & Vogelstein, 1984)

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß ein Primergemisch an die zu markierende, hitzedenaturierte DNA-Probe hybridisiert und eine DNA-Polymerase I, unter Einbau radioaktiver Nukleotide, den zweiten Strang teilweise synthetisiert. Mit dieser Methode können DNA-Proben mit einer spezifischen Aktivität von $>10^9$ cpm/ μ g DNA erhalten werden.

Es wurde ein "Multi Prime Kit" der Firma Amersham benutzt. 25 ng DNA wurden durch 2 min Kochen und Abkühlen auf Eis denaturiert. In einem Reaktionsvolumen von 50 μ l wurden Puffer, dNTP (außer dCTP), Hexanukleotid-Primer-Gemisch, 50 μ Ci 32 P-dCTP

und 2 Einheiten DNA-PolymeraseI (Klenow-Fragment) für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 μ l 5 mM EDTA gestoppt.

Die Abtrennung der freien Nukleotide von der markierten Probe erfolgte mittels einer Sephadex G50-Säule (Spin Column). Als Säule diente eine 1 ml Spritze, verdichtet mit Glaswolle. Die Säule wurde zuerst 1 min bei 1000rpm zentrifugiert, das radioaktive Reaktionsgemisch auf die Säule gegeben und anschließend wieder 2 min bei 1200rpm zentrifugiert. 2 μ l des Säulendurchlaufs wurden im Scintillations-Zähler gezählt. Die spezifische Aktivität wurde durch TCA-Fällung von 2 μ l markierter Probe, zusammen mit Carrier-DNA, ermittelt.

3.7.2 Endmarkierung

Kinasierung von DNA-Fragmenten

Zur Endmarkierung von 0,2-0,5 μ g dephosphorylierter DNA (s. 3.3.3) wurden 5 Einheiten T4-Polynukleotidkinase mit ca 100 μ Ci γ ³²P-ATP eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C in einem Endvolumen von 30 μ l und 1xKinasierungs-Puffer. Zur Reinigung wurde die markierte Probe über eine G50-Säule gegeben (s. 3.7.1).

Kinasierung von Oligonukleotiden

20-30 ng Oligonukleotid wurden unter denselben Reaktionsbedingungen, wie oben beschrieben, in einem Endvolumen von 20 μ l kinasiert.

Die Reinigung erfolgte hier mit einer NACS-Prepac-Säule. Diese wurde zunächst mit 1 ml 1 M NaCl hydriert und mit 5 ml 0,2 M NaCl äquilibriert. Dann wurde das kinasierte Oligonukleotid aufgetragen, mit 1 ml 0,2 M NaCl gewaschen. Das markierte Oligonukleotid wurde anschließend 3x mit 100 μ l 1 M NaCl eluiert und 1 μ l der radioaktiven Probe im Scintillationszähler gezählt.

3.7.3 Präparation einer einzelsträngigen und über die ganze Länge markierten DNA: Prime Cut-Probe

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß durch Hybridisierung eines Primers an die gewünschte, hitzedenaturierte bzw. einzelsträngige M13-DNA mittels DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), unter Einbau radioaktiver Nukleotide eine DNA mit sehr hoher spezifischer Aktivität ($>10^{10}/\mu\text{g DNA}$) synthetisiert werden kann. Die Reaktionsbedingungen sind die gleichen, wie bei der Sanger-Sequenzierung, nur daß hier 90 $\mu\text{Ci } [^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ und natürlich keine Dideoxynukleotide mitgeführt wurden.

Die so entstandene, teilweise doppelsträngige DNA wurde mit einem Restriktionsenzym so geschnitten, daß die Schnittstelle auf der entgegengesetzten Seite des Synthesestarts lag und nirgendwo zusätzlich innerhalb der synthetisierten DNA eine Schnittstelle auftrat.

Das Reaktionsgemisch wurde über ein 6% Acrylamid/Harnstoff-Gel (s. 3.4.3) unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Gleichzeitig wurden ca 100000 cpm eines radioaktiven Markers mit aufgetrennt. Die gewünschte DNA wurde durch 5-minütige Autoradiographie sichtbar gemacht und mit dem Skalpell ausgeschnitten und über Nacht in 500 μl Wasser bei 50 °C eluiert. Das Eluat wurde anschließend über eine NACS-Prepac-Säule (s. NACS-Prepac-Manual für geeignete Salzlösungen) von den verbliebenen Radionukliden getrennt, gefällt und zu einer Endkonzentration von 100000 cpm/ μl in Wasser gelöst.

3.8 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN (Kawai & Nishizaku, 1984; Luthman & Magnusson, 1983)

Transfektion von HeLa-Zellen

8×10^5 Zellen wurden pro Petrischale (9 cm) ausgesät und 24-36 Stunden später für die Transfektion verwendet. Die Kulturmedien wurden abgesaugt und die Zellen mit 10 ml 1xTBS zweimal gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Transfektionslösung (10 μg Plasmid-DNA und 500 μg DEAE-Dextran in 1xTBS) auf die Zellen gegeben, 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, und danach wieder abgesaugt. Die Zellen wurden mit 10 ml 1xTBS gewaschen, und ein DMSO-Schock mit 20% DMSO für 2 min durchgeführt, anschließend wieder mit 10 ml 1xTBS gewaschen und 0,1 mM Chloroquin-diphosphat in

Medium zugegeben und für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach 2x mit 1xTBS gewaschen und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 5 ml 1xTBS gewaschen und mit Hilfe eines Gummispatels von der Petrischale abgeschabt. Die Zellsuspension, in 1 ml TBS, wurde in ein Eppendorfgefäß transferiert und die Zellen abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren wurde die Zellen in 100 µl 0,25 M Tris pH 7,8, durch dreimaliges Einfrieren (Gefrierschock s. 3.5.1) aufgebrochen.

Transfektion von Theileria parva-infizierten Lymphozyten

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,25 \times 10^5$ Zellen/ml angesetzt. Am Tag der Transfektion sollte die Zelldichte zwischen $2,5 \times 10^5$ und 3×10^5 Zellen/ml betragen. 20 ml der Zellsuspension, also insgesamt 5×10^6 Zellen, wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen 5 min bei 1500rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. 10 ml vorgewärmtes 1xTBS wurden zugegeben und nochmals bei 1500rpm zentrifugiert. Bereitung der DNA-Lösung: 10 µg Plasmid-DNA wurde in 1050 µl 1xTBS + 150 µl DEAE-Dextran (2mg/ml) angesetzt und das Ganze gut geschüttelt (vortexen!). Anschließend wurden die Zellen in der DNA-Lösung resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei zwischendurch vorsichtig gemischt wurde. Danach erfolgte ein DMSO-Schock von 3 min (733 µl 25% DMSO in 1xTBS). Die Inkubation wurde durch Gabe von 10 ml warmem TBS gestoppt und 5 min mit 1500rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder in 10 ml 1xTBS resuspendiert und erneut 5 min zentrifugiert mit 1500 rpm. Schließlich wurden die Zellen in 20 ml cL15 resuspendiert und nach 36 Stunden Protein extrahiert (s. 3.5.1).

3.9 ANALYTISCHE METHODEN

3.9.1 Transfer von DNA auf Nitrozellulosefilter bzw. Hybond N -Nylonfilter (Southern, 1975)

Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA (s. 3.4.1) wurde im Gel mit 0,25 M HCl für 10-12 min teilweise hydrolysiert und anschließend 45 min denaturiert (0.5 M NaOH/1,5 M NaCl). Danach wurde das Gel für mindestens 1 Stunde neutralisiert (1 M Tris pH 8/1,5 M NaCl). Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf ein entsprechendes Filter wurde wie folgt

durchgeführt: Das Gel lag auf einem mit 3 MM-Papier bedeckten und 20xSSC getränkten Schwamm. Ein befeuchtetes Nitrozellulosefilter wurde zuerst mit Wasser, dann mit 20xSSC befeuchtet und auf das Gel gelegt. Falls Nylonfilter eingesetzt wurden, wurde das Filter trocken, also unbehandelt, auf das Gel gelegt. Danach kamen 2 Lagen 3MM-Papier, darauf mehrere Lagen Papierhandtücher. Das Ganze wurde mit einem etwa 1 kg schweren Gewicht belegt. Der Transfer war im Fall von genomischer DNA über Nacht vollständig erfolgt. Für Plasmid-DNA genügte bereits 3-4 Stunden. Anschließend wurde die DNA bei 80 °C in einem Vakuumofen auf das Filter festgebacken. Bei Nylonfiltern genügte auch eine 5 min UV-Bestrahlung.

3.9.2 Transfer von RNA auf Nitrozellulosefilter bzw auf Hybond N-Nylonfilter: (Northern Blot)

Der Transfer von RNA auf das jeweilige Filter erfolgte wie in 3.9.1 beschrieben, nur daß durch die Bedingungen des Gellaufs bereits die RNA denaturiert vorliegt (s. 3.4.4). Ebenso ist auch keine saure Hydrolyse erforderlich, da die zu transferierenden RNA-Größen relativ klein sind.

3.9.3 Hybridisierung der Northern- bzw. Southern Blots

3.9.3.1 Hybridisierung des Southern Blots mit radioaktiv markierten DNA-Proben

A) Heparin-Hybridisierung

Die Filter wurden jeweils in eine Plastikfolie eingeschweißt und zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 2 Stunden in Hybridisierungs-Lösung vorhybridisiert. Die Vorhybridisierungs-Temperatur erfolgte, falls nicht anders angegeben, bei 65 °C und für Hybridisierung mit Oligonukleotiden bei 37 °C. Die Hybridisierung erfolgte in derselben Lösung. Dazu wurde die radioaktiv markierte DNA für 3-5 min hitzedenaturiert und für 5 min auf Eis gestellt. Im Fall der Hybridisierung von Plasmid- bzw. Lambda-DNA wurden 1×10^5 cpm der markierten Probe/ml Hybridisierungs-Lösung und bei genomischer DNA $1-2 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung zugegeben. Hybridisiert wurde

über Nacht in einem Schüttelwasserbad in der Regel bei 65 °C, im Fall von Oligonukleotiden bei 37 °C.

| | |
|--------------------------------|---------------------|
| Heparin-Hybridisierungslösung: | 0,5% Heparin |
| | 5xSSC |
| | 0,1% SDS |
| | 0,5% PiPPi |
| | 5xDenhardt's-Lösung |

Gewaschen wurde das Filter wie folgt:

- 1) Bei homologen Proben wurde das Filter für 30 min mit 1xSSC/0,1% SDS und 2x 30 min mit vorgewärmten Waschlösungen (0,1xSSC/0,1% SDS) bei 65 °C geschüttelt.
- 2) Bei der Hybridisierung mit Oligonukleotiden wurde 3x30 min mit 5xSSC gewaschen.
- 3) Bei heterologen Proben, wie der Aktin Maus-Probe wurde unterschiedlich hybridisiert und gewaschen (s. Ergebnisse 4.1).

B) Formamid-Hybridisierung

Die Hybridisierung genomischer DNA sowie RNA erfolgte stets mit dieser Methode. Es mußte streng darauf geachtet werden, daß sowohl Vorhybridisierung, als auch Hybridisierung bei exakt 42 °C durchgeführt wurden.

Die Filter wurden, wie oben beschrieben eingeschweißt in Plastikfolien. Beim RNA-Blot wurde zuvor das Glyoxal des Filters durch kurzes Kochen der Lösung (20 mM Tris pH 8) und Abkühlen auf Raumtemperatur entfernt.

| | |
|---------------------------|-----------------------|
| Vorhybridisierungslösung: | 50% Formamid |
| | 4xSSC |
| | 0,1% SDS |
| | 0,1% PPI |
| | 10x Denhardt's-Lösung |

| | |
|------------------------|----------------------|
| Hybridisierungslösung: | 50x Formamid |
| | 6x SSC |
| | 0,1% SDS |
| | 0,1% PPI |
| | 5x Denhardt's-Lösung |

Alles weitere wurde, wie unter A) beschrieben, durchgeführt.

3.9.4 Autoradiographie

Das Sichtbarmachen radioaktiv markierter DNA oder RNA erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilmes der Marken Kodak X-AR oder Amersham Hyperfilm™ in Kassetten mit Verstärkerfolie bei -80 °C.

3.9.5 Restriktionskartierung von rekombinanten Lambda-Klonen (Räckwitz et al., 1984; Zehetner et al., 1986)

Die rasche Kartierung von Lambda-Klonen wurde nach der von Rackwitz et al. (1984) beschriebenen Methode durchgeführt. Rekombinante Klone wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen partiell verdaut, das Reaktionsgemisch selektiv am linken bzw. rechten cos-Ende mit den dazu komplementären, radioaktiv markierten Dodekanukleotiden (ON-L bzw. ON-R) markiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Autoradiographie konnten die Restriktionskarten direkt aus der "Leiter" der partiell verdauten DNA abgelesen werden.

3.9.5.1 Partieller Restriktionsverdau

In einem Volumen von 30 µl wurde auf Eis ein Restriktionsverdau von 1 µg DNA mit 2 Einheiten des jeweiligen Enzyms angesetzt, die Reaktion durch Transfer in ein 37 °C-Wasserbad gestartet und nach 30 sek, 1, 2, 4, und 10 min ein Aliquot von 6 µl entnommen und auf Eis in einem Eppendorf-Röhrchen gesammelt, in das zuvor 2 µl 0,5 mM EDTA pipettiert worden war.

3.9.5.2 Hybridisierung mit ON-L und ON-R (Biolabs)

Je 30 ng der Dodekamere ON-L bzw. ON-R wurden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP endmarkiert (s. 3.7.2). Ein Fünftel (20 μl) jeder Reaktion wurde mit 10 μl 5M NaCl und 220 μl Gellade-Puffer (Loehning 1967) versetzt. 5 μl des so präparierten Oligo-Mix wurde getrennt mit je 5 μl des partiell verdauten Klones (ca 150 ng) gemischt, zum Aufschmelzen der kohäsiven Enden (cos-Enden) 2 min bei 75 °C inkubiert, danach sofort bei 42 °C weiter für 30 min inkubiert.

3.9.5.3 Gelelektrophorese und Autoradiographie

Die Hybridisierungsreaktionen wurden direkt auf 25 cm lange 0,5% Agarose Gele aufgetragen und 16 oder 36 Stunden bei 50 Volt laufen gelassen. Dazu wurde das Loehning Gel-System verwendet (Loehning 1967). Zur Vermeidung von pH-Gradienten wurde der Laufpuffer während der Elektrophorese mit einer Schlauchpumpe ständig zwischen Anode und Kathode zirkuliert. Als Größenmarker diente eine mit mehreren Enzymen geschnittene Lambda-DNA (BamHI, EcoRI, HindIII, HpaI, PstI und Sall), an welche ebenfalls die markierten ON-L und ON-R- Dodekane hybridisiert wurden. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem Vakuum-Geltrockner bei einer Temperatur von 40 °C getrocknet. Dazu wurde das Gel auf DEAE-Zellulosepapier gelegt. Die getrockneten Gele wurden je nach spezifischer Aktivität der Dodekanukleotide zwischen 2 und 16 Stunden mit Verstärkerfolie und Röntgenfilm bei -80 °C exponiert.

3.9.5.4 Erstellung der Restriktionskarten

Mit Hilfe des Markers, der eine zusätzliche Kontrolle für das Hybridisieren der markierten Oligonukleotide mit den Restriktionsfragmenten ist, wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Fragmentgrößen des Partialverdaus ermittelt werden konnten. So konnten die Lage und die Reihenfolge der Schnittstellen ermittelt werden.

Als zusätzliche Kontrolle diente ein Komplettdau des Klones mit dem jeweiligen Enzym. Dieser wurde auf einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt und diente der Bestimmung der Gesamt-Schnittstellen eines Enzyms des Lambda-Klones und der jeweiligen Fragmentgrößen.

3.9.6 Sequenzierung von Nukleinsäuren

3.9.6.1 Präparation von Einzelstrang-DNA aus M13-Phagen

Eine Übernacht-Kultur von E.coli TG1 wurde in 2xYT-Medium 1:100 verdünnt und zu je 1,5 ml in Glasröhrchen aliquotiert. Mit einem Zahnstocher wurden die gewünschten M13-Plaques gepickt und damit die Bakterien angeimpft. Infektion und Vermehrung der Phagen erfolgte in einem Schüttler bei 37 °C für 5-6 Stunden.

Um die Zellen von den Phagen zu trennen, wurde 4 min bei 10000rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verwendet und das Sediment im restlichen Medium als Phagenstock bei 4 °C aufbewahrt.

Durch Zugabe von 150 µl 20% PEG6000/2,5 M NaCl und 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Phagen gefällt, dann abzentrifugiert und der Überstand vollständig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette entfernt. Das Sediment wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und die DNA je einmal mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, sowie in Ethanol und NaAcetat gefällt. Nach Zentrifugation und Trocknen des Sediments an der Luft wurde die DNA in 60 µl TE-Puffer (10 mM Tris ph 8)/0,1 mM EDTA) aufgenommen. 5 µl davon konnten in einem Agarose Minigel auf Reinheit und Ausbeute getestet werden.

3.9.6.2 Sequenzierung von Nukleinsäuren nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977)

Das Prinzip dieser Methode ist eine in vitro-Synthese eines DNA-Stranges von einem synthetischen Startermolekül aus an einer einzelsträngigen DNA-Matrize. Als Enzym dient DNA-PolymeraseI (Klenow-Fragment). Durch Zugabe von entsprechenden Didesoxynukleotiden wird die Synthese jeweils abgebrochen und startet wieder von neuem.

Folgende Zusammensetzungen an Reagentien haben sich für die Sequenzierungsreaktion am besten bewährt:

Pro Klon, der sequenziert werden sollte, wurden 2 µl Primer (1 µg/ml, 1212 Biolabs, bzw. synthetisierte Oligonukleotide 2 µg/ml) mit 1 µl TM-Puffer und 5 µl Wasser gemischt. Je 8 µl dieser Mischung wurden zu 8 µl der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA gegeben

und zur Hybridisierung des Primers an die Matritze für 20 min bei 55 °C inkubiert. Pro Reaktion wurden dann 4 µl dieses 'template'/Primer-Gemisches mit 2 µl des jeweiligen Nukleotid-Mix (T-, C-, G-, A-Mix) und 2 µl der frisch angesetzten Enzym-Lösung zusammengegeben und zur Synthese des neuen Stranges für 20 min bei 30 °C inkubiert.

Zur Verlängerung der neusynthetisierten Stränge wurde nochmals 2 µl einer 0,25 mM NTP-Lösung zugegeben ('chase') und für 15 min weiterinkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von je 4µl Formamid-Ladungspuffer gestoppt.

Vor dem Laden auf das Gel wurden die Proben 3 min bei 95 °C hitzedenaturiert, 5 min auf Eis gestellt und ca 1-2 µl auf ein 6% Acrylamid/Harnstoff Gel geladen (s. 3.4.3).

Lösungen:

T-Mix: 5 µl 0,5 mM dTTP
 100 µl 0,5 mM dCTP
 100 µl 0,5 mM dGTP
 10 µl 10 mM ddTTP
 200 µl TE-Puffer

G-Mix: 100 µl 0,5 mM dTTP
 100 µl 0,5 mM dCTP
 5 µl 0,5 mM dGTP
 3 µl 10 mM ddGTP
 200 µl TE-Puffer

C-Mix: 100 µl 0,5 mM dTTP
 5 µl 0,5 mM dCTP
 100 µl 0,5 mM dGTP
 1,6 µl 10 mM ddCTP
 200 µl TE-Puffer

A-Mix: 100 µl 0,5 mM dTTP
 100 µl 0,5 mM dGTP
 100 µl 0,5 mM dCTP
 3 µl 1 mM ddATP
 200 µl TE-Puffer

Enzym-Mix: 2 µl [³⁵S]-dATP
 4 µl 100 mM DDT
 1 µl Klenow (5U/µl)
 25 µl Wasser

Formamid-Ladungspuffer: 100 ml deionisiertes Formamid
 4 ml 500 mM EDTA pH 8
 0,03 g Xylencyanol
 0,03 g Bromphenolblau

3.9.7 S1-Analyse von RNA

10 µg Gesamt-RNA bzw. 4 µg PolyA-RNA wurden zusammen mit einer Prime Cut-DNA-Probe einer Ethanol-fällung unterzogen und in 10 ml S1-Hybridisierungspuffer aufgenommen. Nach 10 min Denaturierung bei 80 °C wurden die Proben direkt in ein 50 °C-Wasserbad überführt und über Nacht hybridisiert. Anschließend wurden die Ansätze 40 min bei 30 °C mit 60 Einheiten S1-Nuklease, 2 µg Hefe-tRNA in 100 µl S1-Reaktionspuffer einem Einzelstrangverdau unterzogen. Die Lösung wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die RNA-DNA-Hybride, nach Zugabe von 2 µg Hefe-tRNA, aus der wässrigen Phase mit Ethanol, ohne Salzzugabe, gefällt. Das Sediment wurde in 5 µl Formamidpuffer (s. 3.9.6.2) gelöst und auf ein Acrylamid/Harnstoff Gel geladen (s. 3.4.3).

3.9.8 "Primer Extension"-Analyse von RNA (McKnight & Kingsbury, 1982)

Ein synthetisches Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zur entsprechenden Region der RNA wurde endmarkiert (s. 3.7.2). 20 µg Gesamt-RNA bzw. 4 µg PolyA-RNA wurden mit Ethanol ausgefällt und der Niederschlag mit 100000 cpm des Oligonukleotids in 20 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 1 Stunde bei 60 °C hybridisiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und mit 40 µl Reverse-Transkriptase-Mix versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 40 min bei 42 °C inkubiert und anschließend die Nucleinsäuren mit Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 5 µl Formamidpuffer (s. 3.9.6.3) aufgenommen und auf einem 6% Acrylamid/Harnstoff Gel aufgetrennt.

Mix:

- 12 µl dNTP 2,5 mM
- 6 µl Actinomycin D (500 mg/ml)
- 4 µl 10xRT-Puffer (s. 2.4)
- 0,5 µl RNAsin (38U/µl)
- 15,5 µl Wasser
- 2 µl Reverse Transkriptase (5U/µl)

3.9.9 Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

5 µl des Proteinextraktes (s. 3.5.1) wurden mit 995 µl Reagenz I versetzt, mit 2 ml frischem Lowry-Reagenz IV gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden 200 µl frisch angesetzte 50% Folin-Lösung zugegeben, sofort untergemischt und die Extinktion der Proben bei 600 nm gegen einen Leerwert gemessen. Über eine Eichkurve, ermittelt aus parallel angesetzten Standard-Protein-Konzentrationen (BSA), wurde die Proteinkonzentration abgeleitet.

3.9.10 Bestimmung der Chloramphenicoltransferase-Aktivität (CAT-Aktivität) (Gorman et al., 1982)

1,25 µl ¹⁴C-Chloramphenicol-Lösung (=0,25 µCi oder 4,62 nmol) wurden mit einer bestimmten Proteinmenge (s. 3.5.1), der zu 180 µl fehlenden Menge 250 mM Tris/HCl pH 7,8 und 20 µl 4 mM Acetyl-CoenzymA 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden acetyliertes und nichtacetyliertes Chloramphenicol mit 1 ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert, in der Vakuumzentrifuge eingedampft und in 20 µl Ethylacetat wieder aufgenommen. Die Proben wurden auf eine Kieselgel Dünnschicht Folie aufgetragen und in einer Glaskammer mit Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel chromatographisch aufgetrennt. Danach wurden die Folien an der Luft getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert.

3.9.11 "Polymerase Chain Reaction" (PCR) (Saiki et al., 1988)

Das Prinzip dieser Methode besteht in der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels einer hitzestabilen DNA Polymerase. Der Vorteil dieser TaqI Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, besteht darin, daß das Enzym seine höchste Aktivität bei einer Temperatur von 70 °C hat und selbst noch bei 95 °C stabil bleibt. Bei der PCR werden zwei Oligonukleotide als Primer so eingesetzt, daß TaqI-Polymerase zwischen diesen beiden Primern die DNA amplifiziert. Der Vorteil liegt vor allem darin, daß bei der jeweiligen Hitzedenaturierung der entstandenen Doppelstränge kein neues Enzym zugesetzt werden muß, da TaqI-Polymerase hitzestabil ist.

Die Methode wurde in dieser Arbeit angewendet um eine RNA-Sequenz am 5'-Ende der Aktin mRNA nachzuweisen. Das Enzym TaqI-Polymerase wurde von der Firma Perkin Elmer Cetus bezogen.

Es wurden 2 µg gesamt-RNA von *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten eingesetzt.

A) Synthese des ersten cDNA-Stranges mittels AMV-RT (s. 3.9.8) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Danach wurde gefällt, gewaschen und das Sediment in Wasser gelöst.

B) Für PCR wurde ein Aliquot von A) eingesetzt das 500 ng oder 100 ng Gesamt-RNA entsprach.

Das Reaktionsgemisch wurde

1. 2 min bei 95 °C inkubiert
2. die Primer 3 min bei 60 °C hybridisiert
3. für die DNA-Synthese 2,5 min bei 72 °C inkubiert und
4. die synthetisierte DNA bei 95 °C für 1 min hitzedenaturiert.

Schritt 3. und 4. wird hier als ein Zyklus bezeichnet, der 35 mal wiederholt wurde. Es mußte darauf geachtet werden, daß Temperatur und Inkubationszeiten genau eingehalten wurden. Danach wurde Phenol/Chloroform-extrahiert und 20 µl des Reaktionsgemisches in einem 1,4 % Agarosegel aufgetrennt.

Verwendet wurde ein Reaktions Kit der Firma Perkin Elmer Cetus:

Gene Amp™ DNA Amplification Reagent Kit, (N 801-0043).

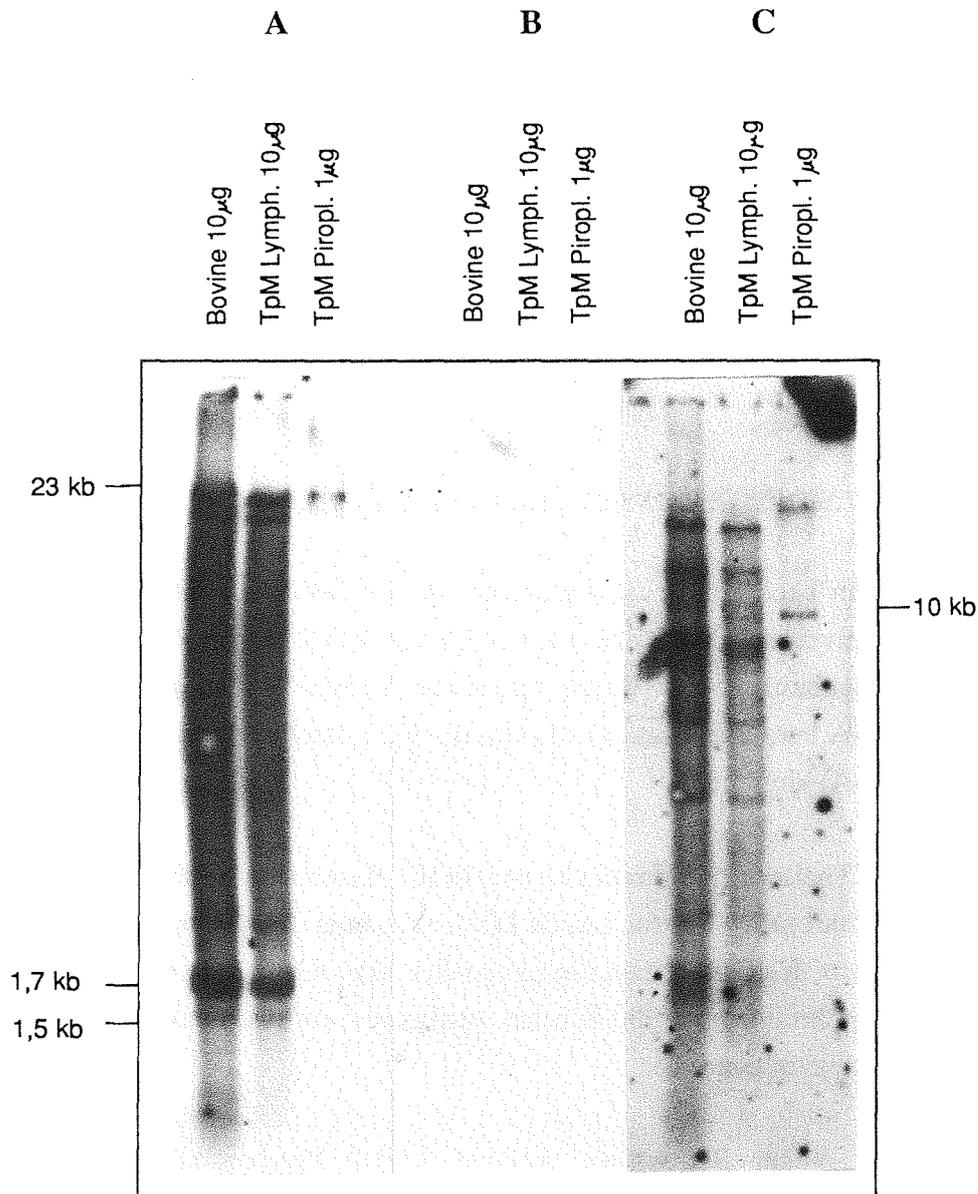
4 ERGEBNISSE

4.1 Nachweis von Aktin im Genom von Theileria parva und Theileria parva-infizierten Lymphozyten mit einer heterologen α Aktin Maus-Probe

Vor der Isolierung eines Aktin-Gens des Parasiten *Theileria parva* aus einer genomischen *Theileria parva*-Genbank mit der α Aktin Maus-Probe (Minty et al., 1981), war es notwendig geeignete Hybridisierungsbedingungen zu etablieren, unter welchen *Theileria*-Aktin sichtbar wird. Es war zwar bekannt, daß die Aktine in der Evolution hochkonserviert sind, jedoch konnte man daraus nicht unbedingt schließen, daß mit der hier verwendeten Aktinprobe von der Maus auch ausschließlich Aktinklone aus einer Genbank eines Protozoons hybridisieren würden. Außerdem war bis zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt, daß gerade die niederen Eukaryonten, wie *Plasmodium falciparum* (Wesseling et al., 1988) und *Tetrahymena thermophila* (Cupples & Pearlman, 1986), im Vergleich zu Säugern eine wesentlich niedrigere Homologie ihrer Aktin Gene aufweisen.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis, das durch variierte Bedingungen der Hybridisierung mit der Mausprobe erhalten wurde. Genomische DNA, isoliert aus Rinderleber (Bovine liver), *Theileria parva*-infizierten Rinderlymphozyten (TpM Lymphozyten) und Piroplasmen (TpM Piroplasmen), wurde mit EcoRI geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt, danach geblottet und mit der radioaktiv markierten Aktinprobe der Maus unter verschiedenen Bedingungen hybridisiert und gewaschen. 2A und 2B zeigen deutlich eine 'Alles- oder Nichts-Hybridisierung' mit der heterologen Aktinprobe.

In Abbildung 2A hybridisieren hoch- und mittelrepetitive Sequenzen des Rindergenoms, welche den sichtbaren repetitiven Banden im ethidiumbromidgefärbten Gel entsprechen (nicht gezeigt), während in Abbildung 2B bei höherer Hybridisierungstemperatur und niedrigerer Ionenkonzentration selbst nach 14 Tagen keine Signale zu erkennen waren. Nach längerer Expositionszeit von Abbildung 2A war ebenso ein deutlicher Schmier über die ganze Länge bei der Piroplasmen DNA zu sehen (unspezifische Hybridisierung).



| | | | |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Hybridisierung: | 6 x SSC bei 50 °C; | 4 x SSC bei 65 °C; | 4 x SSC bei 60 °C; |
| Waschung: | 3 x SSC bei 50 °C; | 3 x SSC bei 65 °C; | 3 x SSC bei 50 °C; |
| Expositionszeit: | 48 h | 14 d | 14 d |

Abb. 2 : Hybridisierung von genomischer DNA mit einer heterologen Aktin-Probe: cDNA α Aktin Maus. Die jeweilige DNA wurde mit EcoRI verdaut. A, B und C wurden zusammen in einem 0,8% Agarose Gel aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Hybridisiert und gewaschen wurde jeweils unter den angegebenen Bedingungen. Die spezifische Aktivität der nicktranslatierten Aktin Maus-Probe betrug 7×10^7 CPM / μ g DNA. Als Marker diente lambda BstEII.

Abbildung 2C zeigt die geeigneten Bedingungen. Hier ergibt die Hybridisierung mit der Aktinprobe der Maus ein Bandenmuster, das nicht den repetitiven Sequenzen in 2A zuzuordnen ist und wahrscheinlich Aktinsequenzen der Rinder- und Theileria-DNA entspricht. Auffällig ist, daß in der DNA der Piroplasmen und der Tpm-infizierten Lymphozyten eine 10 kb-Bande sichtbar wurde, die bei der Rinder-DNA fehlte und damit wahrscheinlich Aktinsequenzen von *Theileria parva* enthielt.

Die unter Abb. 2C ermittelten Hybridisierungsbedingungen konnten somit zur Isolierung von *Theileria*-Aktin aus der *Theileria parva*-Genbank ('Screening') mit der Aktinprobe der Maus eingesetzt werden.

4.2 Isolierung von Aktin aus einer *Theileria parva*-Genbank

Eine Genbank von *Theileria parva*, hergestellt von R.O. Williams in Nairobi, Kenya, wurde nach positiven Aktin-Klonen mit der Aktin Maus cDNA-Probe abgesucht (s. 3.6). Die Genbank wurde durch partiellen EcoRI-Verdau aus gereinigter Piroplasmen-DNA hergestellt und in die EcoRI-Schnittstellen des Lambda-Phagen Charon 4A (CH4A) kloniert.

Das Genom von *Theileria parva* umfaßt etwa 1×10^7 Basenpaare (Allsopp & Allsopp 1988). In den Charon 4A-Vektor wurde DNA mit einer Länge von 12000-20000 Basenpaaren ligiert. Kalkuliert man die Länge des Aktin Gens mit etwa 1,5-3 kb, so müßte im Durchschnitt unter 1000 Klonen wenigstens ein Klon enthalten sein, der *Theileria*-Aktinsequenzen enthält.

Zur Isolierung dieser Sequenzen wurden 12000 Phagen ausplattiert. Die Filterabdrücke wurden mit der Aktinprobe der Maus unter den geeigneten Bedingungen hybridisiert und gewaschen (Abb. 2C). Aus diesem ersten 'Screening' wurden 10 positive Signale erhalten. Nach erneuter Ausplattierung zur Isolierung von Einzelphagen, dem sogenannten 'Rescreening', verblieben 3 Phagen-Klone, die mit der Maus Aktinprobe hybridisierten.

Um festzustellen, ob diese Lambda-Klone identische oder unterschiedliche Insertionen enthielten, wurden deren Restriktionsfragmente verglichen.

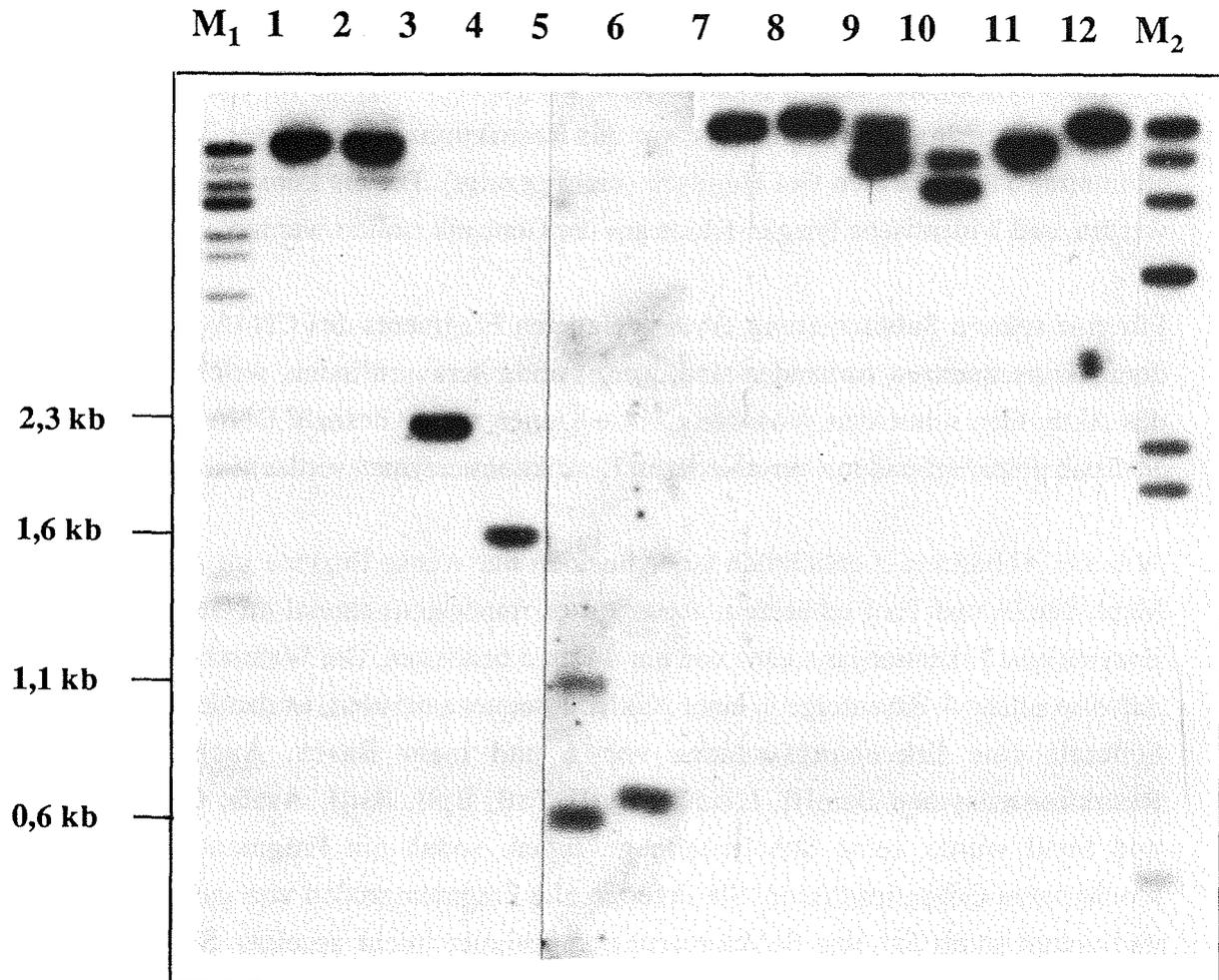


Abb. 3: Jeweils 500 ng des CH4A Aktin-Klons wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer nicktranslatierten α Aktin Maus-Probe unter geeigneten Bedingungen hybridisiert (s. Abb. 2C). 1+2= EcoRI; 3= AccI; 4= MspI; 5= Sau3A; 6= TaqI; 7= XbaI; 8= NheI; 9= SphI; 10= SacI, 11= KpnI; 12= XhoI. M₁=Lambda BstII, endmarkiert: 14140, 8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702 bp. M₂= Lambda HindIII, endmarkiert: 23130, 9419, 6559, 4361, 2322, 2023, 564 bp.

Von den Klonen wurde DNA isoliert, mit EcoRI, HindIII, BamHI und PstI verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und mit der Aktinprobe der Maus hybridisiert. Alle 3 Klone zeigten die gleichen Signale für die jeweiligen Restriktionsenzyme. Darüberhinaus war das Restriktionsmuster dieser 3 Klone im ethidiumbromidgefärbten Gel identisch (nicht gezeigt). Daraus konnte geschlossen werden, daß 3 identische Phagen-Klone aus der Genbank isoliert wurden.

Für eine spätere Subklonierung eines geeigneten Fragments des CH4A-Klons, auf dem Aktinsequenzen vorhanden sind, war es nötig herauszufinden, welche Enzyme das Aktin-Gen schneiden. Von den CH4A-Klonen wurde deshalb DNA in großem Maßstab präpariert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, schneiden nur wenig Enzyme im Aktin-Gen. MspI, Sau3A und TaqI schneiden, wie erwartet, mindestens einmal im Gen, da diese Enzyme eine Erkennungssequenz von nur 4 Basen benötigen. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine solche 4-Basenfolge in einer Nukleotidsequenz existiert, ist damit wesentlich höher als eine Erkennungssequenz von 6 und mehr Basen. Auch mit den Restriktionsenzymen BamHI, HindIII, BglII, PstI, BglI, BstII, AvaII, ClaI, PvuII und SmaI wurde keine Schnittstelle gefunden, sodaß ein Fragment mit einer klonierbaren Größe resultierte. Sie lieferten alle Fragmentgrößen von mehr als 8 kb und waren somit für eine Subklonierung ungeeignet (nicht gezeigt). So blieb als einziges Fragment das 2,3 kb AccI-Fragment, das aufgrund seiner Größe eventuell das gesamte Aktin-Gen enthalten könnte.

Aus diesen genannten Gründen erschien es vielversprechend das 2,3 kb AccI-Fragment zur Subklonierung zu wählen (s. 4.2.1).

Die kleineren Fragmente, die durch TaqI, Sau3A und MspI erhalten wurden, sind deshalb nicht gewählt worden, da sie zum einen nicht die ganze Länge des Aktin Gens versprachen und wahrscheinlich zu viele weitere Schnittstellen im Gen besaßen, was eine gezielte Umklonierung erschwert hätte.

Die nächste Frage war, ob weitere Aktin-Fragmente im Genom von Theileria identifiziert werden könnten.

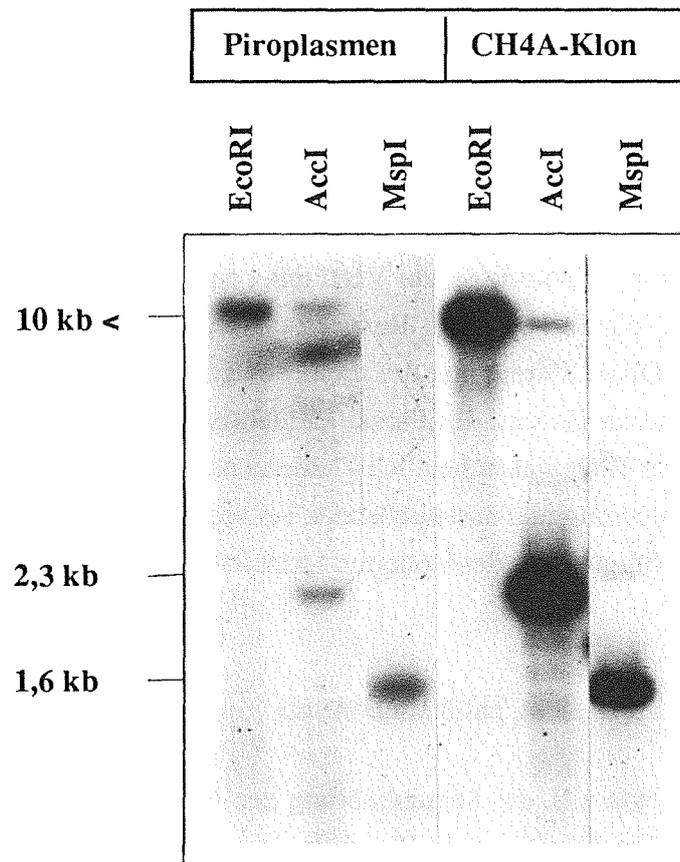


Abb. 4: Southern-Blot. Genomische Theileria-DNA (Piroplasmen-DNA) und DNA, isoliert aus CH4A Aktin-Klon, wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Hybridisiert wurde mit einer nicktranslatierten Aktin Maus-Probe unter geeigneten Bedingungen (s. Abb. 2C). Als Marker diente Lambda-DNA, BstEII-verdaut, mit welcher die oben angegebenen Größen ermittelt wurden.

Dazu wurden die mit der Maus-Probe hybridisierenden Restriktionsfragmente des CH4A Aktin-Klons mit den Restriktions-Fragmenten gereinigter Theileria-DNA verglichen.

Abbildung 4 zeigt einen Southern-Blot, bei welchem DNA des CH4A Aktin-Klons im Vergleich zu Theileria-DNA, isoliert aus Piroplasmen, mit EcoRI verdaut und mit der Aktinprobe der Maus hybridisiert wurde. Die Piroplasmen-DNA wurde freundlicherweise von B. Allsopp, Cambridge, zur Verfügung gestellt.

Das Ergebnis zeigt ein identisches Aktin-Restriktionsmuster für Lambda-DNA und genomische Theileria-DNA. Daraus konnte nicht nur geschlossen werden, daß die Fragmente im Klon und im Genom des Parasiten identisch sind, sondern auch, daß der isolierte CH4A Aktin-Klon wahrscheinlich *Theileria parva* Aktin enthält.

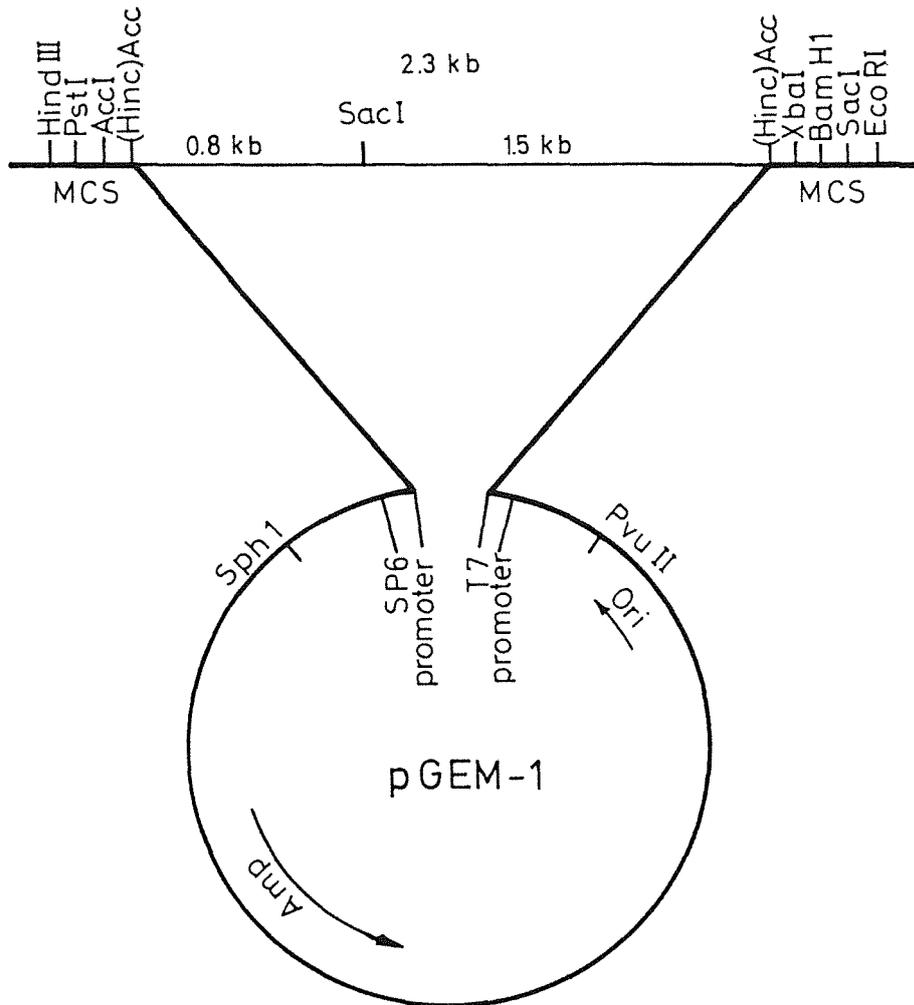
Dies sollte nach Subklonierung und anschließender Teilsequenzierung des oben- genannten 2,3 kb AccI-Fragmentes des isolierten Lambda-Klones bestätigt werden.

4.2.1 Subklonierung des 2,3 kb Aktin-Fragmentes

Um weitere Analysen, wie z.B. die Sequenzierung des Aktin Gens zu ermöglichen, mußte das 2,3 kb AccI-Fragment in einen Plasmidvektor subkloniert werden.

Erste Versuche, das 2,3 kb AccI-Fragment in die entsprechende AccI-Schnittstelle des Vektors pGEMI zu ligieren gelangen nicht. Das Restriktionsenzym AccI schneidet Hexa-nukleotide mit multipler Erkennungssequenz (Abb. 5B). Die spätere Sequenzierung des Fragmentes zeigte (Abb. 21, Position im Gen: +110/+115), daß das 5'-Ende des 2,3-kb-Fragmentes eine andere Sequenz als die AccI-Schnittstelle im Polylinker des pGEMI-Vektors besitzt, was eine Ligation unmöglich machte. Die Subklonierung erfolgte dann in die HincII-Stelle des Plasmid-Polylinkers. Dazu wurde der Lambda-Klon mit AccI verdaut, die 5'-Überhänge mit DNA-Polymerase I (Klenow) zu stumpfen Enden synthetisiert und elektrophoretisch in einem niedrigschmelzenden Agarosegel aufgetrennt. Die 2,3 kb-Bande wurde ausgeschnitten und in den mit HincII-verdauten pGEMI-Vektor ligiert (Abb. 5A).

A.



B.

AccI schneidet folgende Sequenzen:

| | | | |
|--|-------|--------------|-------|
| | 5' GT | [AG] [CG] | AC 3' |
| | | [AT] [CT] | |

Die AccI-Klonierungsseite hat die Sequenz:

| | | |
|-------|----|-------|
| 5' GT | CG | AC 3' |
|-------|----|-------|

Die AccI-Sequenz des 2,3 kb-Fragments am 3'-Ende ist:

| | | |
|-------|----|-------|
| 5' GT | AG | AC 3' |
|-------|----|-------|

Die AccI-Sequenz des 2,3 kb-Fragments am 5'-Ende ist:

| | | |
|-------|----|-------|
| 5' GT | CG | AC 3' |
|-------|----|-------|

Abb. 5: A. Subklonierung des 2,3 kb AccI-Fragmentes des CH4A Aktin-Klones in pGEM1. Die 5'-Überhänge der AccI-Schnittstellen des Fragmentes wurden mit Klenow aufgefüllt und in die HincII-Stelle des pGEM1-Polylinkers ligiert. B. Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym AccI.

4.3 Das klonierte 2,3 kb AccI-Fragment ist Theileria parva-Aktin

Die zuvor beschriebenen Hybridisierungsexperimente zeigten, daß es sich bei den isolierten Sequenzen wahrscheinlich um *Theileria parva*-Aktinsequenzen handelte, da sie bei der Hybridisierung mit der Aktinprobe der Maus ein identisches Restriktionsmuster im Lambda-Klon und genomischer *Theileria*-DNA ergaben. Möglich war allerdings auch eine Isolierung von Rinder-Aktin, da bei der Herstellung der genomischen *Theileria parva*-Bank aus Piroplasma-DNA eine Kontamination mit *Theileria parva*-infizierten Rinderlymphozyten nicht ausgeschlossen werden konnte. Um sicher zu stellen, daß das klonierte 2,3 kb AccI-Fragment tatsächlich *Theileria*-Aktinsequenzen enthielt, sollte ein Sequenzvergleich mit bekannten Aktin Genen durchgeführt werden. Dazu wurden beide Enden des Fragmentes teilweise sequenziert.

Außerdem wurde die Orientierung des klonierten Fragmentes ermittelt. Das AccI-Fragment wurde mit EcoRI und PstI aus dem Vektor pGEM1 herausgeschnitten und in M13 mp18 und M13 mp19 in die entsprechende Stelle, EcoRI/PstI, des Polylinkers ligiert und anschließend transformiert. M13 mp18 und M13 mp19 unterscheiden sich durch die umgekehrte Orientierung ihrer Polylinker. Da die Vektorsequenzen von pGEM1 und M13 kreuzhybridisieren, wurden die Filterabzüge der transformierten M13-Klone mit gereinigter und radioaktiv markierter 2,3 kb AccI Insert-DNA unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen. Positive Klone wurden isoliert und einzelsträngige DNA präpariert. Die isolierten M13-Klone wurden nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977).

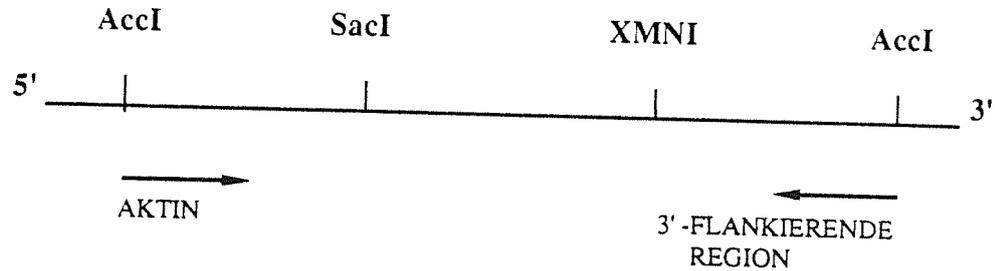
Abbildung 6A zeigt die Orientierung des Fragmentes. Durch die gerichtete Umklonierung in mp18 und mp19 war es möglich, von beiden Seiten her zu sequenzieren. Es wurden jeweils etwa 150 Basen gelesen und mit der Datenbank im Computer verglichen. Für die in M13 mp19 klonierte Sequenz, fanden sich eine Vielzahl von Aktin Genen anderer Organismen (Abb. 6B) . Für die Sequenz, die in M13 mp18 kloniert wurde, fanden sich in der gesamten Datenbank keine Homologien. Es handelt sich hierbei vermutlich um 3'-flankierende Sequenzen des *Theileria*-Aktin Gens.

Wie einleitend schon erwähnt (s. 1.6), sind die Aktine in der Evolution hoch konserviert, was eine Orientierung innerhalb des Aktin Gens sehr vereinfacht. Durch einen direkten Vergleich konnten die untersuchten Sequenzen dem 5'-Bereich des Aktin Gens zugeordnet werden. Außerdem zeigte der Vergleich, daß noch mindestens 100 Basen in der kodierenden Region 5' des 2,3 kb AccI-Fragmentes liegen mußten. Hierbei waren eventuell vorhandene Introns und die 5'-Nichttranslatierte Region nicht miteinbezogen.

Abbildung 6 zeigt einen Teil der Homologien, die für 150 Basen der 5'-Region des 2,3 kb AccI-Fragmentes in der Datenbank des Computers für entsprechende Sequenzen gefunden wurde. Bei diesen Homologien handelt es sich um den Sequenzbereich, der zwischen den Aminosäurepositionen 36 und 86 liegt.

Diese Teilsequenzierung des 2,3 AccI-Fragmentes und die gezeigten Hybridisierungsexperimente ergaben folgende Informationen:

1. Der Vergleich mit der Datenbank zeigte eindeutig, daß das subklonierte 2,3 kb AccI-Fragment Aktinsequenzen enthält. Aufgrund der niedrigen Homologie dieser Teilsequenz zu Nukleotidsequenzen des Rinder Aktins von nur 78% konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß ein Rinder Aktin-Klon isoliert wurde. Das aus dem 10 kb EcoRI-Klon isolierte 2,3 kb AccI-Fragment muß demnach *Theileria parva*-Aktinsequenzen enthalten.
2. Der Vergleich der Teilsequenzen mit anderen Aktin Genen ergab, daß nicht das ganze Aktin-Gen im 2,3 kb AccI-Fragment vorhanden war. Die ermittelte Orientierung der Aktinsequenzen in diesem Fragment zeigte, daß sich die fehlenden Sequenzen auf dem 5'-benachbarten AccI-Fragment befinden mußten (s. 4.7).

A.**B. Homologien zu Aktin-Sequenzen:**

| | | |
|------------------------|-----|---------------------------|
| Maus | 76% | [Hu et al., 1986] |
| Bovine | 78% | [Degen et al., 1983] |
| Acanthamoeba | 77% | [Nellen & Gallwitz, 1982] |
| Caenorhabditis elegans | 72% | [Krause & Hirsh, 1986] |
| Drosophila | 76% | [Fyrberg et al., 1981] |
| Seeigel | 78% | [Cooper & Crain 1982] |

Abb. 6: **A.** Orientierung des 2,3 kb AccI-Fragmentes im Lambda-Vektor CH4A-Aktin. Das 2,3 kb AccI-Fragment wurde in M13 mp18 und M13 mp19 umklont und von beiden Seiten etwa 150 Basen sequenziert. Für das 3'-Ende wurden keine homologen Sequenzen in der Datenbank des Computers gefunden. **B.** Aufgelistet ist ein Teil der Aktin-Homologien, die in der Datenbank für 150 Basen vom 3'-Ende des 2,3 kb AccI-Fragmentes gefunden wurden. Bei diesen Homologien handelt es sich um den Sequenzbereich, der zwischen den Aminosäureposition 36-86 liegt.

Von großem Interesse war als nächstes, wo sich die Aktin-Sequenzen im CH4A Aktin-Klon von *Theileria parva* befinden und ob vielleicht, wie es bei fast allen anderen Organismen der Fall ist, mehrere Kopien des Aktin Gens innerhalb oder außerhalb des 10 kb EcoRI-Fragmentes vorhanden sind.

Um die Aktin-Sequenzen im 10 kb EcoRI-Fragment weiter zu charakterisieren, sollte daher zuerst eine Restriktionskarte des isolierten CH4A-Klones erstellt werden.

4.4 Kartierung von Restriktionsschnittstellen im isolierten Theileria parva-CH4A Aktin-Klon

Um die Aktinsequenzen innerhalb des CH4A-Klones zu lokalisieren, wurde eine Genkarte des Lambda-Klones (Abb. 10) mittels Einzel-, Doppel- und Partialverdau erstellt.

4.4.1 Kartierung des CH4A-Klones durch partiellen Verdau

Diese Analyse wurde durch die Methode 'Partial Mapping' durchgeführt (Rackwitz et al., 1984), einem rasch durchführbaren Verfahren, dessen Prinzip am Beispiel der SacI-Schnittstellen des Lambda-Klons CH4A-Aktin dargestellt wird (Abb. 7).

Diese Methode macht sich die Eigenschaft zunutze, daß alle Lambda-DNA's an beiden Enden zueinander komplementäre Einzelstrangsequenzen von je 12 Basen besitzen ('cos-Enden'). Durch Hybridisierung der partiell verdauten DNA mit den zu den 'cos-Enden' komplementären, radioaktiv markierten Dodekanukleotiden ON-L und ON-R, werden selektiv nur diejenigen Fragmente markiert, die das linke - oder rechte Vektorende (die 'cos-Enden') noch besitzen und werden somit auf einem Röntgenfilm sichtbar (Abb. 8). Wie aus dem Beispiel in Abbildung 7 ersichtlich ist, kann von der Länge dieser Fragmente auf die Lage der Schnittstellen geschlossen werden. Um die jeweiligen Schnittstellen bestätigen zu können, muß ein Vergleich der Fragmentgrößen von beiden Seiten her (ON-L und ON-R) durchgeführt werden. Die Lage der Schnittstellen sollte in beiden Ansätzen ein identisches Muster ergeben.

Wie aus Abbildung 7 und 8 ersichtlich ist, werden Fragmente zwischen 11-25 kb im Gel aufgetrennt. Aufgrund der geringen Größenauflösung dieses DNA-Bereiches ist eine exakte Bestimmung der Fragmentgrößen zwischen den einzelnen Schnittstellen schwierig. Dazu wurden anschließend Einzel- und Doppelverdaus des CH4A Aktin-Klons durchgeführt.

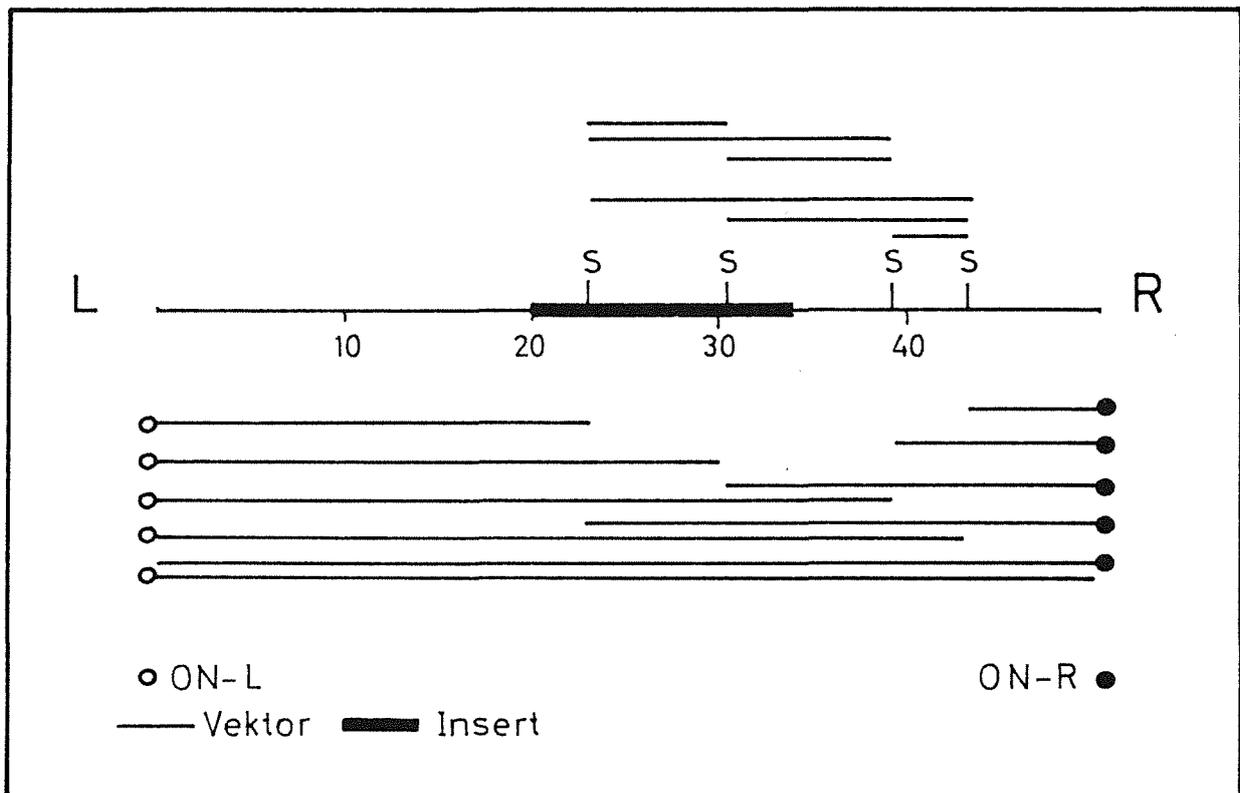


Abb. 7: Prinzip der Kartierung von Restriktionsschnittstellen (Rackwitz et al., 1984) im Lambda-Klon CH4A-Aktin am Beispiel mit *SacI*. Ein partieller Restriktionsverdau der DNA mit *SacI* ergibt 16 Fragmente. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Dodekanukleotiden (ON-L bzw. ON-R) an die kohäsiven Enden, werden jeweils 5 Fragmente markiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarose Gel und anschließender Autoradiographie kann somit die Reihenfolge der Schnittstellen von beiden Seiten, vom linken (L) - und vom rechten (R) Vektorarm, ermittelt werden.

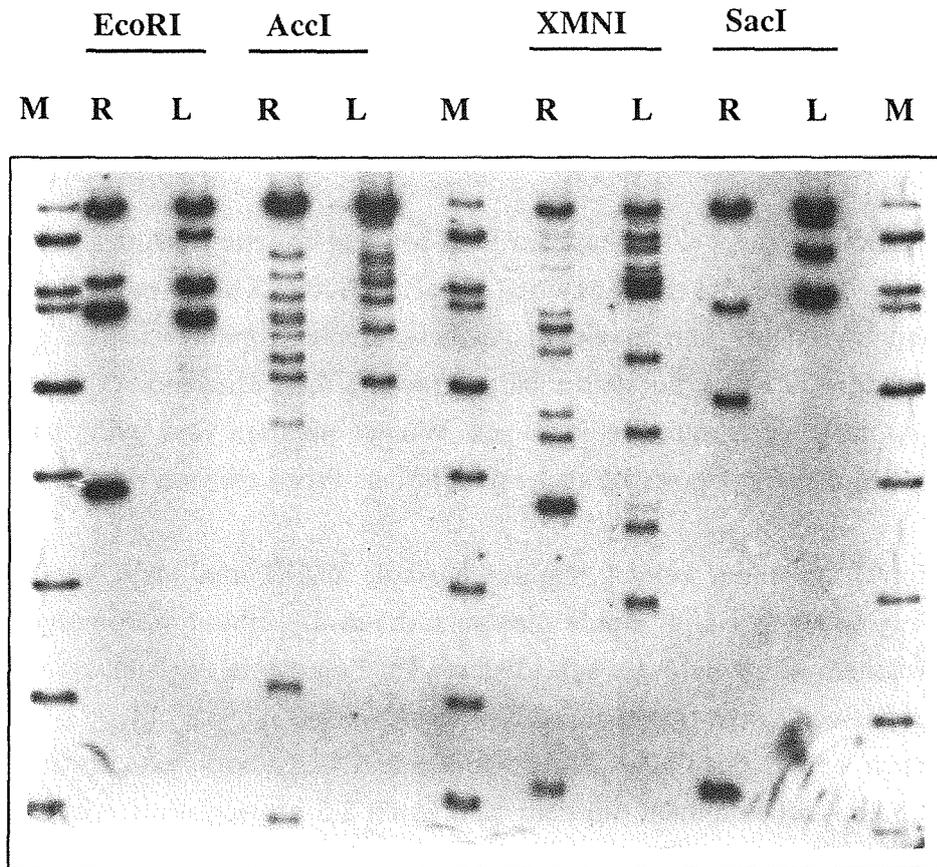


Abb. 8: Jeweils 1 μg des CH4A Aktin-Klones wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen partiell verdaut. 200 ng-Aliquots dieser Reaktion wurde mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden ON-R (R) bzw. ON-L für 30 Minuten bei 42 °C hybridisiert und in einem 0,5% Agarose Gel elektrophoretisch 36 Stunden bei 50 Volt aufgetrennt. Als Größenmarker (M) diente ein Gemisch aus unverdauter und mit verschiedenen Restriktionsenzymen (BamHI, EcoRI, HindIII, HpaI, PstI, Sall) verdaute Lambda-DNA (Wildtyp), die mit beiden Oligonukleotiden gleichzeitig hybridisiert wurde. Folgende Größen sind als Marker aufgetrennt: 48502, 32745, 23130, 21226, 15258, 11497, 8666, 6770 und 5505 bp.

4.4.2 Kartierung des Charon 4A Aktin-Klons durch Einzel- und Doppelverdau

Zur Bestätigung der Ergebnisse, die durch die partiellen Verdau erhalten wurden und zur genaueren Bestimmung der Größe der Restriktionsfragmente wurden Einzel- und Doppelverdau durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt einen Southern-Blot, bei dem isolierte DNA des CH4A Aktin-Klons mit den Restriktionsenzymen EcoRI, AccI, XMNI und MspI einzel- und doppelverdaut und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Hybridisiert wurde mit dem subklonierten 2,3 AccI Theileria-Aktinfragment (s. Abb. 5A) unter stringenten Bedingungen. Wie zu erwarten war, hybridisierten dieselben Restriktionsfragmente, die auch mit der Maus-Probe erhalten wurden.

EcoRI schneidet keines, der durch AccI, XMNI und MspI verdauten Lambda-Fragmente. Bestätigt wurde dies auch durch das ethidiumbromidgefärbte Gel, bei welchem die jeweiligen hybridisierenden Fragmente eine unveränderte Länge im Doppelverdau mit EcoRI aufwiesen (nicht gezeigt).

Beim Verdau des CH4A Aktin-Klons mit AccI, hybridisierte erwartungsgemäß das 2,3 kb AccI-Fragment mit dem markierten 2,3 kb AccI-Fragment, welches aus der gleichen Bande des CH4A-Klons isoliert wurde.

Der Verdau mit MspI bestätigte ein 1,6 kb-Fragment, welches auch mit der Maus-Probe hybridisierte (Abb. 3 und 4). Jedoch zeigte sich bei der Hybridisierung mit dem 2,3 kb AccI-Fragment noch zusätzlich ein schwächeres Signal bei 0,8 kb. Daraus war zu schließen, daß MspI wenigstens 1 Schnittstelle im 2,3 kb AccI-Fragment haben mußte. Die spätere Sequenzierung bestätigte, daß das 1,6 kb MspI-Fragment innerhalb der 2,3 kb AccI-Bande liegt. Die schwächere Hybridisierung der 0,8 kb-Bande ist damit zu erklären, daß hier nur eine Länge von 235 Basen dieser kleineren MspI-Bande mit dem 2,3 kb AccI-Fragment hybridisierte (s. Abb. 10 u. 20).

Der Doppelverdau von MspI/XMNI zeigte, ebenfalls wie der von AccI/MspI, daß XMNI im 2,3 kb AccI-Fragment mindestens eine Schnittstelle haben mußte.

Die zusätzlichen MspI-Schnittstellen im 2,3 kb AccI-Fragment, sowie innerhalb des 5'-benachbarten AccI-Fragments, wurden später durch Sequenzierung ermittelt, da die Fragmente zu klein sind, um im Einzel- bzw. Doppelverdau hätten bestimmt werden können. Ein partieller - sowie ein vollständiger Verdau mit Restriktionsenzymen,

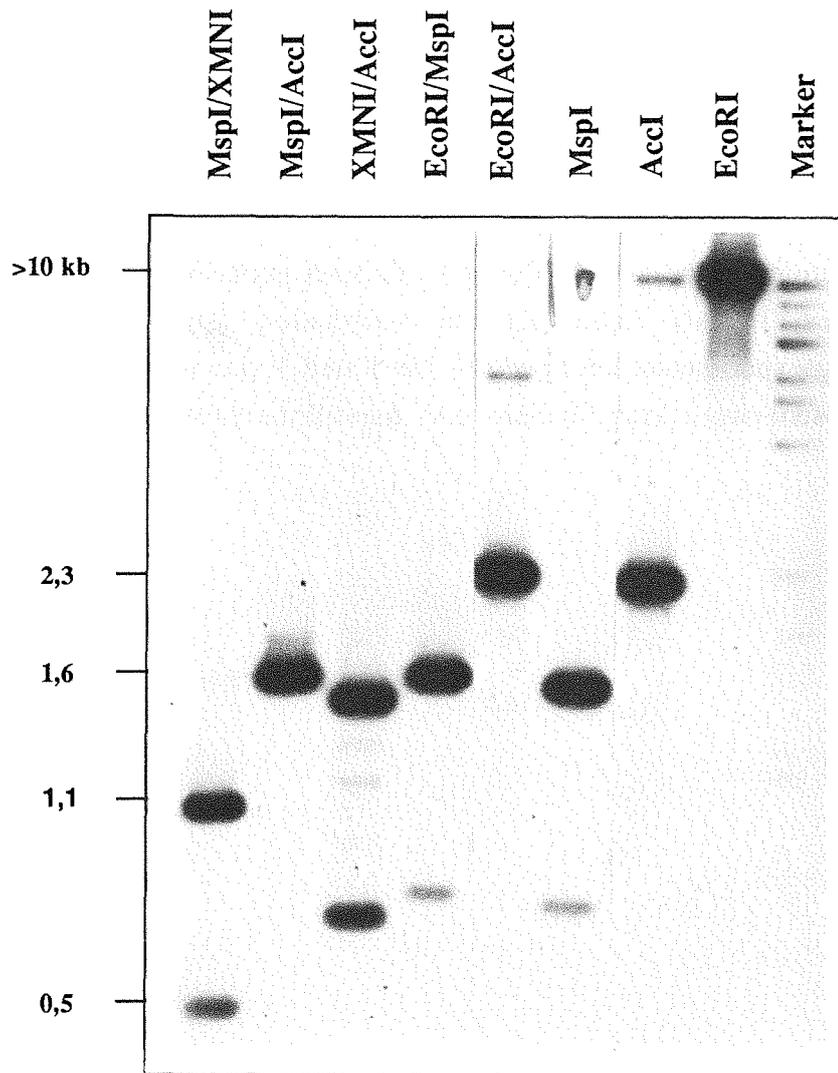


Abb 9: Zur Kartierung des Ch4A Aktin-Klones wurde mit den oben angegebenen Enzymen Einzel- und Doppelverdaus durchgeführt. Die geschnittene DNA wurde in einem 0,8% Agarose Gel aufgetrennt und auf ein Nitrozellulosefilter geblottet. Als Probe diente das nicktranslatierte 2,3 kb Aktin-Fragment, kloniert in pGEM1. Hybridisiert wurde mit 4xSSC bei 65°C und gewaschen mit 0,1 SSC bei 65°C. Marker= lambda BstEII, endmarkiert.: 14140, 8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702 bp.

die Tetranukleotid-Sequenzen erkennen, war aussichtslos, da zu viele Schnittstellen entstanden wären. Beispielsweise besitzt der linke Vektorarm schon 229 Schnittstellen für MspI. Die Restriktionskarte des CH4A-Klones zeigt, daß das *Theileria parva*-Aktin-Gen auf einem 2,3 kb und 1,2 kb AccI-Fragment lokalisiert ist. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt.

Um die Vermutung zu bestätigen, daß das *Theileria parva*-Aktin als Einzelkopie innerhalb des 10 kb EcoRI-Klones vorhanden ist, wurden weitere Hybridisierungsexperimente durchgeführt, die 5' und 3' des kartierten Aktin Gens weitere Aktinsequenzen ausschließen bzw. identifizieren sollten (vgl. nächster Abschnitt).

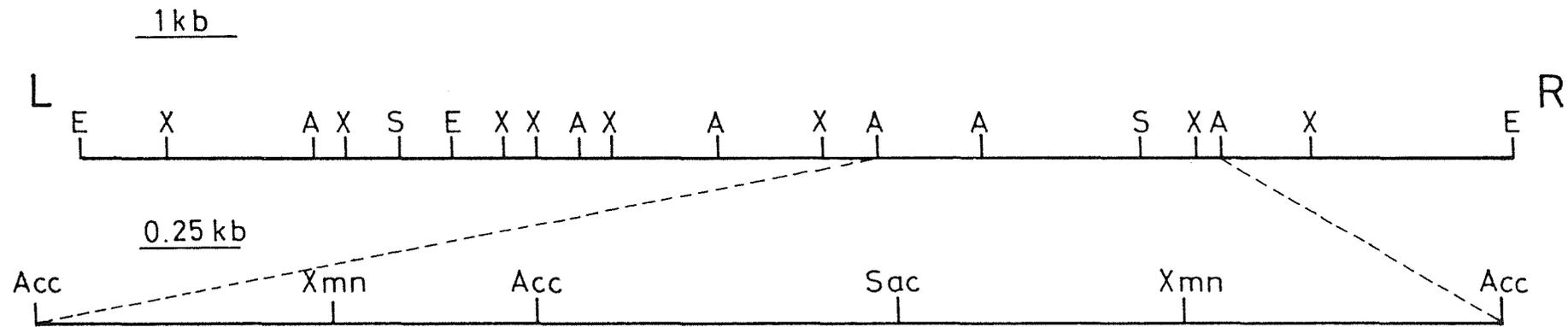


Abb. 10: Restriktionskarte des Theileria Aktin Lambda Klones.
 Die Restriktionsschnittstellen des Theileria Aktin CH4A-Klones wurden durch Einzel-, Doppel- und Partialverdau ermittelt. L=linker und R=rechter Vektorarm des CH4A-Klones. E=EcoRI=Insertionsstelle des CH4A-Vektors.; X=XMNI; A=AccI; S=SacI. Darunter, in 4-facher Vergrößerung das 2,3 kb AccI und das 5' angrenzende AccI Aktin-Fragment.

4.5 Das Aktin Gen ist durch eine Einzelkopie im Genom von Theileria parva vertreten

Um die Kartierung des Theileria parva Aktin Gens in dieser Reihenfolge abschließen zu können, wird den Ergebnissen insofern vorgegriffen, als hier in Abbildung 11 und 12 eine Theileria parva Aktin cDNA, isoliert aus einer cDNA-Bank (s. 4.7), als Hybridisierungsprobe verwendet wurde. Diese Theileria Aktin cDNA hat eine Länge von 1,35 kb und hybridisierte zusätzlich zu dem 2,3 kb AccI-Fragment, mit einem 5'-benachbarten 1,2 kb AccI-Fragment (Abb. 11). Dieses 1,2 kb AccI-Fragment mußte 5' des subklonierten 2,3 kb AccI-Fragmentes lokalisiert sein und enthielt somit die fehlenden 5'-Sequenzen des Theileria Aktin Gens (vgl. 4.3). Die Isolierung dieses Fragmentes wird in Abschnitt 4.7 beschrieben.

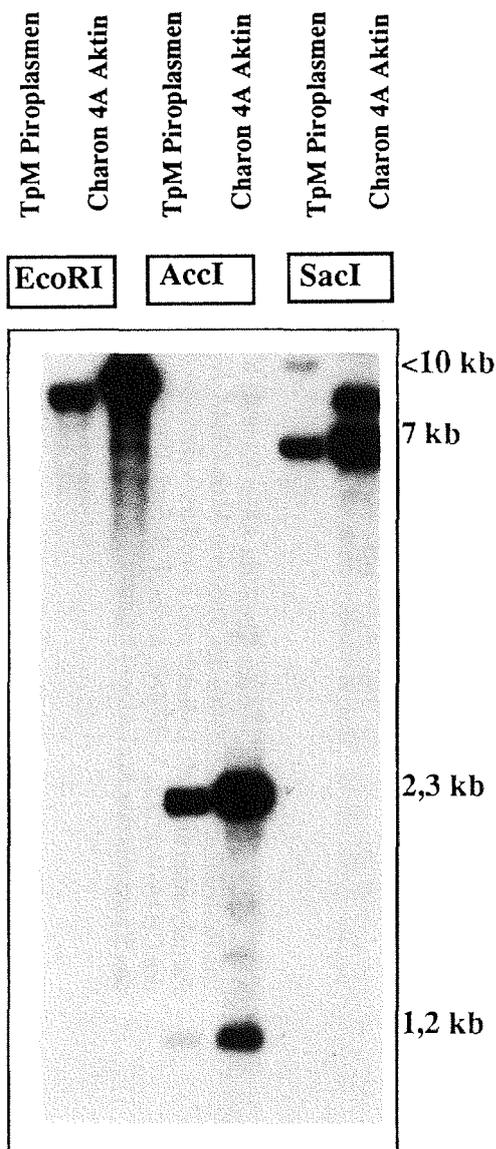


Abb 11: Southern-Blot. Genomische Theileria parva-DNA (TpM Piroplasmen, 5 µg) und DNA, isoliert aus CH4A Aktin-Klon (50 ng), wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter gebロットet. Als Hybridisierungsprobe diente Theileria parva Aktin cDNA. Hybridisiert und gewaschen wurde unter stringenden Bedingungen. Als Marker diente Lambda-DNA, BstEII-verdaut, mit der die angegebenen Größen ermittelt wurden.

Aus den Abbildungen 2, 3, 4 und 9 lag bereits die Vermutung nahe, daß *Theileria parva*-Aktin nur durch eine Genkopie vertreten ist. EcoRI resultierte in nur einem Fragment mit einer Größe von 10 kb und AccI war ebenfalls nur durch ein Fragment vertreten, das mit Aktinsequenzen hybridisierte.

Es wäre natürlich möglich, daß innerhalb des 10 kb EcoRI-Fragmentes mehr als eine Kopie des Aktin-Gens lokalisiert sein könnte. So könnte das 2,3 kb AccI-Fragment doppelt oder mehrfach im 10 kb EcoRI-Fragment vorhanden sein. Dies sollte im Folgenden überprüft werden.

Abbildung 11 zeigt einen Southern-Blot, bei dem DNA von CH4A-Aktin und genomische *Theileria*-DNA, geschnitten mit EcoRI, AccI und SacI parallel im Gel aufgetrennt und mit der 1,35 kb Aktin-cDNA unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen wurde. Die Kartierung des CH4A Aktin-Klons ergab, daß innerhalb des 10 kb EcoRI-Fragmentes zwei SacI-Schnittstellen vorhanden sind, welche ein SacI-Fragment mit der Größe von 7 kb einschließen. Die cDNA-Probe des *Theileria parva*-Aktins hybridisierte stark mit dem 7 kb SacI-Fragment. Die zusätzliche SacI-Bande mit 8,8 kb setzt sich aus 3,6 kb von der 3'-SacI-Schnittstelle bis zur EcoRI-Insertionsstelle und aus 5,2 kb bis zur SacI-Stelle im rechten Vektorarm zusammen. Die zweite SacI-Bande in der Piroplasmen-DNA zeigte das 3'-benachbarte Fragment mit ca. 14 kb im Genom von *Theileria parva*.

Beim Verdau mit AccI zeigten beide, Klon und genomische DNA, die 2,3 kb-Bande und zusätzlich das 5'-benachbarte AccI-Fragment (s. auch Abb. 18).

Ebenfalls wie in Abbildung 11, wurde in Abbildung 12 DNA des CH4A-Klons und genomische *Theileria*-DNA, geschnitten mit verschiedenen Restriktionsenzymen, nebeneinander im Gel aufgetrennt und mit der *Theileria parva*-Aktin-cDNA-Probe hybridisiert.

BamHI schneidet nur einmal im Insert des CH4A-Klons und zwar, wie durch Sequenzierung ermittelt wurde, bei Position [-302] im Aktin-Gen. Der Doppelverdau EcoRI/BamHI resultiert in einem 5,8 kb-Fragment sowohl im Lambda-Klon als auch in der Piroplasmen-DNA. Der Einzelverdau mit BamHI zeigt eine 11 kb-Bande im Klon. Eine Kalkulation der Größe von der BamHI-Stelle im Insert bis zur nächsten BamHI-Stelle im rechten Vektorarm ergibt ebenso 11 kb. Das BamHI-Fragment im Genom von *Theileria* hat ebenfalls ungefähr die gleiche Größe. In diesem

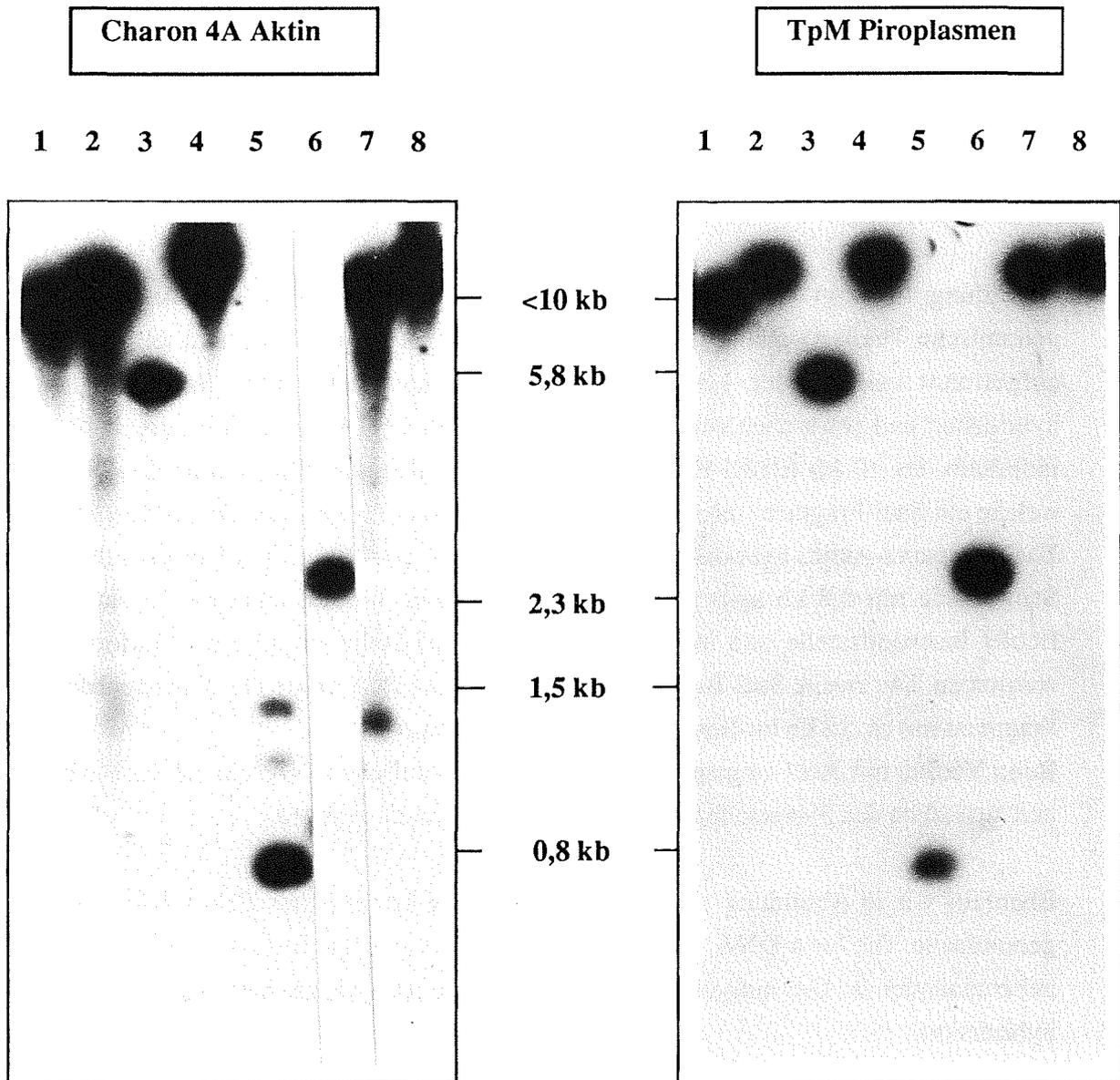


Abb 12: Southern-Blot. Genomische *Theileria parva*-DNA (TpM Piroplasmen, 2 μ g) und DNA, isoliert aus CH4A Aktin-Klon (100ng), wurden einzel- und doppelverdaut in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch parallel aufgetrennt und auf Nylonfilter gebロットet. Als Hybridisierungsprobe diente *Theileria parva* Aktin-cDNA. Hybridisiert und gewaschen wurde unter stringenten Bedingungen. Die Expositionszeiten betragen für Aktin-Klon 16 Stunden und für TpM Piroplasmen-DNA 8 Tage.

Als Marker diente Lambda-DNA, BstEII-verdaut, mit der die oben angegebenen Größen ermittelt wurden.
 1= EcoRI; 2= BamHI; 3= EcoRI/BamHI; 4= XbaI; 5= SacI/AccI; 6= BamHI/AccI; 7= BamHI/XhoI; 8= XhoI

Größenbereich ist es allerdings nicht möglich eine exakte Größe der Fragmente zu ermitteln.

XbaI schneidet ebenfalls nur einmal im Insert, und zwar bei Position [-767] im Aktin-Gen. Dieses Enzym besitzt aber keine Schnittstelle im Vektor. Somit wird beim Verdau mit XbaI der CH4A Aktin-Klon in zwei Hälften geschnitten, in ein 17 kb- und ein 30 kb-Fragment, was im ethidiumbromidgefärbten Gel gut erkennbar war (nicht gezeigt). Die Aktin cDNA-Probe hybridisiert eindeutig mit der 17 kb-Bande.

XhoI schneidet weder im Insert noch im Vektor und ergibt im Doppelverdau XhoI/BamHI die Fragmentgröße des BamHI-Einzelverdaus.

Der Doppelverdau AccI/SacI zeigt ebenfalls ein identisches Restriktionsmuster für CH4A-Aktin und Piroplasma-DNA. Die 0,8 kb-Bande hybridisierte stark, da dieses Fragment vollständig auf der cDNA Aktinprobe vorhanden ist. Die beiden anderen Banden hybridisierten schwächer, da das 1,5 kb-Fragment mit nur 180 Basen zum 3'-Ende der cDNA hybridisiert. (Das 3'-Ende der cDNA entspricht im Gen der Position [+1168], die SacI-Schnittstelle der Position [+948]). Ebenso hybridisierte das 1,2 kb AccI-Fragment schwächer, da auch hier nur 280 Basen des Gens hybridisieren, die zudem noch durch ein 94 Basen langes Intron unterbrochen ist, welches nicht mit der cDNA hybridisiert (s. Abb. 21 u. 23: Gensequenz und Vergleich Gen/cDNA). Nach längerer Expositionszeit wurden diese beiden schwächer hybridisierenden Banden auch in der genomischen *Theileria*-DNA sichtbar (nicht gezeigt).

Der Doppelverdau AccI/BamHI ergab ebenso die erwarteten Fragmente: das 2,3 kb AccI-Fragment und ein 400 Basen langes Fragment. Das kleine Fragment wurde auch nach längerer Expositionszeit sichtbar, da auch hier, wie beim Doppelverdau mit AccI/SacI, aufgrund des Introns nur ein kleiner Teil der cDNA hybridisierte.

Abbildung 13 zeigt einen Southern-Blot, bei dem DNA von CH4A-Aktin, Piroplasma-DNA und DNA *Theileria parva*-infizierter Lymphozyten, verdaut mit EcoRI und AccI, im Gel aufgetrennt wurden. Hybridisiert wurde mit dem 2,3 kb AccI Aktin-Fragment. Das Ergebnis zeigt, wie erwartet, auch für DNA aus *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten die 10 kb EcoRI- und die 2,3 kb AccI-Bande.

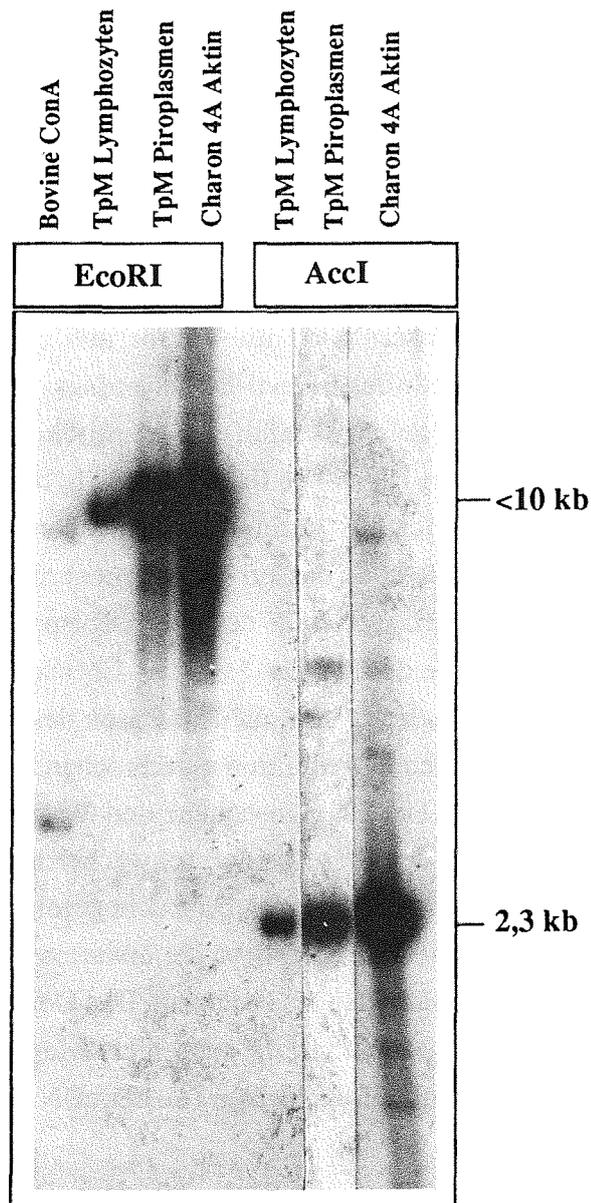
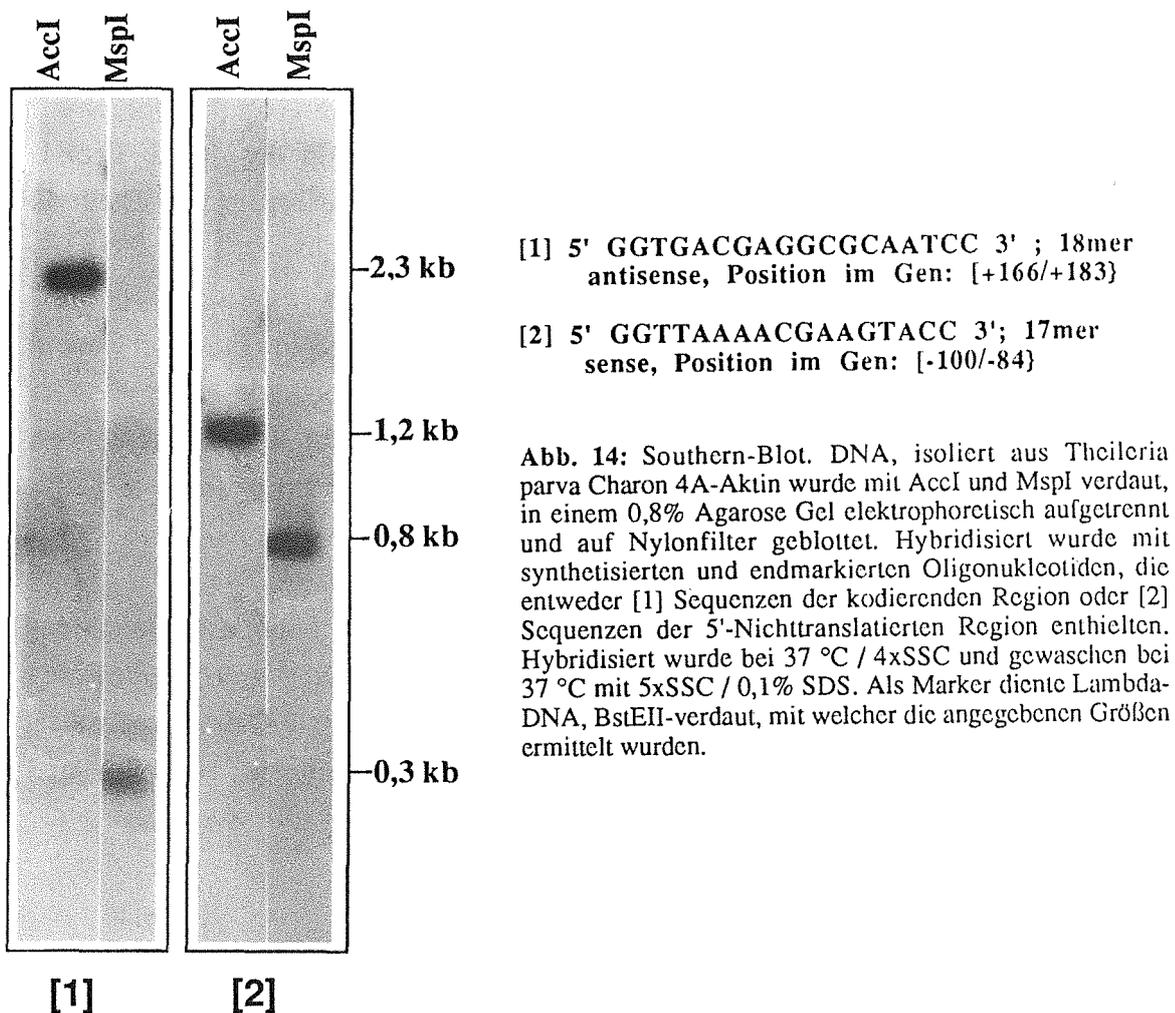


Abb. 13 : Southern-Blot Genomische Rinder-DNA (ConA-stimulierte Lymphozyten, 10 μ g), DNA Theileria-infizierter Lymphozyten (TpM Lymphozyten, 10 μ g), genomische Theileria-DNA (TpM Piroplasmen, 100 ng) und DNA des CH4A Aktin-Klones (1 ng) wurden jeweils mit EcoRI und AccI verdaut, parallel in einem 0,8% Agarose Gel aufgetrennt, auf Nylonfilter geblottet und mit dem Theileria Aktin 2,3 kb AccI-Fragment (Insert) unter stringenden Bedingungen hybridisiert und gewaschen. Die Hybridisierungsprobe hatte eine spezifische Aktivität von 2×10^9 CPM/ μ g DNA. Die Expositionszeit betrug 14 Tage. Als Marker diente Lambda-DNA, BstEII-verdaut, mit welcher die angegebenen Größen ermittelt wurden.

Um sicherzustellen, daß spezifische *Theileria parva*-Aktinsequenzen ausschließlich auf dem 2,3 kb *AccI*- und 5' auf dem benachbarten 1,2 kb *AccI*-Fragment vorhanden waren, wurde der Lambda CH4A Aktin-Klon mit *AccI* und *MspI* verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Hybridisierungsproben dienten jeweils synthetisierte, endmarkierte Oligonukleotide, die zum einen Sequenzen der kodierenden Region und zum andern Sequenzen der 5'-Nichttranslatierten Region besitzen.

Wie in Abbildung 14A gezeigt, hybridisierte das 2,3 kb *AccI*-Fragment spezifisch mit dem Oligonukleotid der kodierenden Region. Daneben hybridisierte ein 0,3 kb *MspI*-Fragment, dessen Schnittstelle durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Das Oligonukleotid, synthetisiert aus Sequenzen der 5'-Nichttranslatierten Region (Abb. 14B), hybridisierte beim *AccI*-Verdau mit dem erwarteten 1,2 kb-Fragment und beim Verdau mit *MspI* mit einem 0,8 kb-Fragment, dessen Schnittstelle ebenfalls durch Sequenzierung bestätigt werden konnte (s. auch Abb. 10 u. 20).



Eine kurze Zusammenfassung soll einen Überblick der bis hier unter 4.4 gezeigten Ergebnisse geben (Zur Orientierung s. auch Abb. 20).

- 1) Das Aktin-Gen von *Theileria parva* ist auf einem 10 kb EcoRI-Fragment lokalisiert.
- 2) Das Aktin-Gen liegt auf dem 5'-1,2 kb-AccI-Fragment und dem 3'-angrenzenden 2,3 kb AccI-Fragment.
- 3) BamHI und XbaI schneiden nur einmal im Insert und 5' dieser Schnittstellen hybridisieren keine Aktinsequenzen.
- 4) 3' des 2,3 AccI-Fragmentes ist ein AccI-Fragment, dessen Schnittstelle im rechten Vektorarm liegt und mit 3,7 kb wesentlich größer ist als das 5'-benachbarte 2,3 kb-Fragment. Dieses Fragment hybridisiert nicht mit Aktin.
- 5) Die Restriktionsmuster im Charon 4A Aktin-Klon und in der genomischen *Theileria*-DNA. sind identisch.
- 6) Hybridisierung des Charon 4A Aktin-Klons mit Oligonukleotiden, die spezifische Sequenzen der kodierenden Region und der 5'-Nichttranslatierten Region besitzen, bestätigen die beiden AccI Aktin-Fragmente als auch die, später durch Sequenzierung bestätigten, MspI-Fragmente.

Diese Ergebnisse zeigen, daß nur eine Genkopie innerhalb des 10 kb EcoRI-Fragmentes, sowohl im Charon 4A Aktin-Klon als auch im Genom von *Theileria parva*-DNA, vorhanden ist.

Schließlich blieb nur noch eine Frage offen: ist das 10 kb EcoRI-Fragment im Genom von *Theileria parva* vielleicht mehrfach vorhanden? Die folgende Analyse sollte zeigen, ob das mit *Theileria parva*-Aktin hybridisierende 10 kb EcoRI-Fragment an einem weiter entfernten Bereich der chromosomalen DNA noch einmal vorkommt (Abb. 15).

Zum Nachweis weiterer Kopien eines Gens im Genom können verschiedene Methoden angewendet werden: z.B. 1) *in situ* Hybridisierung, d.h., Hybridisierung einer spezifischen Probe an intakte Chromosomen und 2) Pulsfeld-Gelelektrophorese, d.h., Auftrennung langkettiger DNA-Moleküle bis mehrere 1000 kb und anschließende Hybridisierung mit der gefragten Sequenz.

Eine in situ Hybridisierung konnte nicht durchgeführt werden, da die Chromosomen von *Theileria parva* noch nicht charakterisiert sind. Zum Einsatz kam die Pulsfeld-Gelelektrophorese-Technik, die im folgenden kurz erläutert wird.

Um zu gewährleisten, daß die DNA bei der Präparation unbeschädigt bleibt, wurden Zellen in Agarose eingebettet. Alle nachfolgenden Schritte der DNA-Präparation und des Restriktionsverdauus erfolgten mit den Agarose-Gelstücken. Als Restriktionsenzyme wurden selten schneidende Enzyme (sogenannte 'rare cutters') eingesetzt, um große Restriktionsfragmente zwischen 50 und 2000 kb zu erhalten. Die Gelstücke mit der eingebetteten, verdauten DNA wurden dann in die Geltaschen eines 1% Agarose Gels gegeben und mit der FIGE-Methode (Field Inversion Gel Electrophoresis) aufgetrennt (Carle et al., 1986). Im Gegensatz zur herkömmlichen Gelelektrophorese, mit der nur DNA-Moleküle bis zu einer Größe von maximal 40-50 kb im Agarosegel aufgetrennt werden, können bei der FIGE-Methode DNA-Moleküle bis zu einer Größe von 2000 kb getrennt werden. Dies wird durch eine periodische Änderung der Richtung des elektrischen Feldes in einem Winkel von 180° erreicht.

Das in unserem Labor angewandte Pulsfeld-Gelelektrophorese-System wurde von G. Langlotz (1989) entwickelt. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde von I. Baumann (Institut für Genetik, Universität Karlsruhe) freundlicherweise durchgeführt.

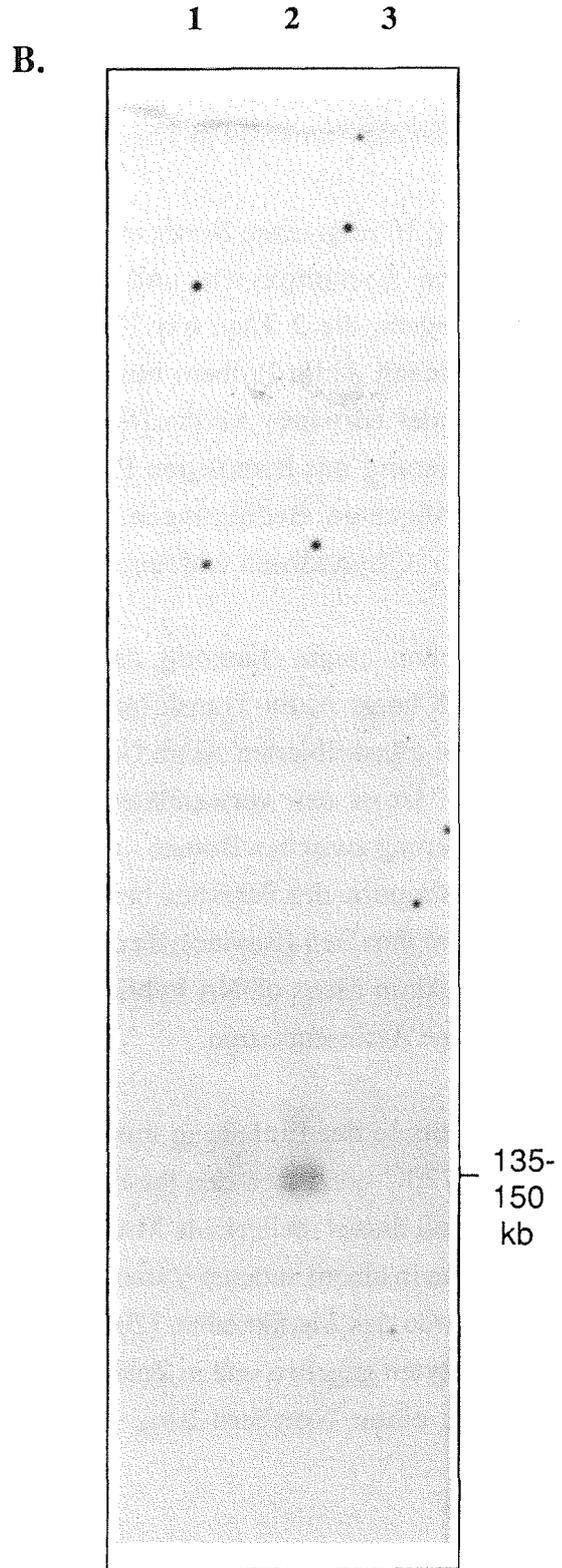
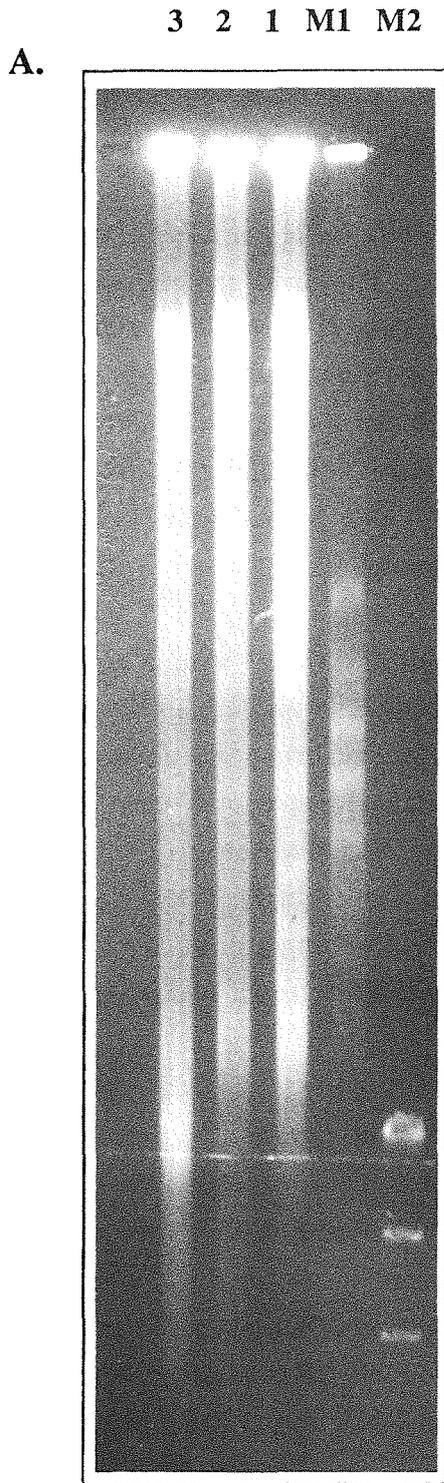
Das Ergebnis in Abbildung 15A zeigte in *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten ein MluI-Fragment mit einer Größe von etwa 135-150 kb. Hybridisiert wurde mit *Theileria parva*-Aktin-cDNA (Insert) unter stringenten Bedingungen.

Wie erwartet zeigen die 2 Tage mit 720C-behandelten TpM-infizierten Lymphozyten ein schwächeres Signal. Nach Abtötung des Parasiten wird die parasitäre DNA somit bereits nach 2 Tagen zum Teil abgebaut. Deutlich erkennbar ist, daß DNA, isoliert aus ConA-stimulierten Lymphozyten, kein Signal für *Theileria parva*-Aktin zeigen. *Theileria parva*-Aktin befindet sich somit in einem etwa 150 kb-Bereich der chromosomalen DNA des Parasiten. Ein zusätzliches Fragment, das auf eine weitere Genkopie in einem weiter entfernten chromosomalen Bereich hindeuten würde, wurde nicht nachgewiesen.

Die Untersuchung des *Theileria parva*-Genoms mittels Pulsfeld Gelelektrophorese lieferte somit einen Hinweis, daß weitere Kopien des Aktin-Gens im Genom, zumindest nicht auf verschiedenen Chromosomen, lokalisiert sind, da nur ein MluI-Fragment hybridisierte. Dies gilt natürlich nur unter der Annahme, daß dieses große Fragment nicht auch auf einem anderen Chromosom vertreten ist.

Abb. 15: FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis). 8×10^5 Zellen *Theileria parva*- infizierter Lymphozyten = [2] (TpM Lymphozyten), ConA-stimulierte Rinderlymphozyten = [3] (ConA Lymphozyten) und 2 Tage 720C-behandelte, *Theileria*-infizierte Lymphozyten = [1] (TpM 720C Lymphozyten) wurden in Agarose eingebettet, mit Proteinase K inkubiert und mit MluI verdaut. Die DNA wurde mit 300 Volt für 16 Stunden aufgetrennt. Die Zeiten der Umpolung ändern sich dabei kontinuierlich (Vorwärts 3 bis 24 Sekunden; Rückwärts 1-8 Sekunden), wobei das Verhältnis zwischen Vorwärts- und Rückwärtslauf 3:1 beträgt.

A. Ethidiumbromidgefärbtes Agarose Gel nach der Elektrophorese. Das Gel wurde auf Nylonfilter geblottet (B.) und mit *Theileria parva* Aktin-cDNA (Insert) unter stringenden Bedingungen hybridisiert und gewaschen. Als Marker dienten Konkatemere von Lambda-DNA, mit welchen die angegebene Größe ermittelt wurde.



4.6 Expression des Theileria parva-Aktin-Gens

Bevor eine cDNA-Bank nach einem Theileria parva-Aktin-Klon abgesucht wurde, sollte zuerst das Transkript in Theileria parva infizierten Zellen nachgewiesen werden.

Abbildung 16 zeigt einen Northern-Blot, mit PolyA-RNA, isoliert aus Theileria parva-infizierten Lymphozyten und PolyA-RNA aus Theileria parva-infizierten Lymphozyten, die 2 Tage mit 720C behandelt wurden. Hybridisiert wurde mit 3 verschiedenen Aktin-Proben: mit dem Theileria 2,3 kb AccI Aktin-Fragment, mit einer Rinder (Bovine) Aktin-cDNA (1 kb) und mit der λ Aktin Maus-cDNA. Die Hybridisierung mit homologen Proben, also Theileria- und Rinder- Aktin, wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Mit der Maus-Probe wurde mit 4xSSC/60 °C hybridisiert und mit 2xSSC/60°C gewaschen.

Das Ergebnis zeigte eindeutig, daß Theileria-Aktin transkribiert wird. Zwei unterschiedlich lange Aktin-Transkripte mit 1,4 kb für Theileria und 2,3 kb für Bovine, lassen die transkribierten Aktin Gene von Bovine und Theileria parva einfach unterscheiden. Unter den verwendeten stringenten Bedingungen gab es keine Kreuzhybridisierung zwischen Bovine - und Theileria-Aktin. Das Medikament 720C hemmt die Transkription des Parasiten bereits nach 2 Tagen, aber nicht die Transkription der Rinderlymphozyten (Bovine), da die Stärke der Hybridisierungssignale fast identisch ist. Die λ Aktin Maus-cDNA hybridisierte unter den beschriebenen Bedingungen nur mit Bovine Aktinsequenzen.

Wie bereits in der Einleitung unter 1.3 und 1.4 erwähnt, tötet das Naphthochinon-Derivat 720C spezifisch den Parasiten Theileria parva. Es war bisher nicht bekannt, wie schnell dieses theilerizide Medikament auf die Transkription des Parasiten wirkt. Dies sollte in einem anderen Versuch untersucht werden.

Dazu wurde das Medikament 720C in das Kulturmedium Theileria parva-infizierter Lymphozyten gegeben und in Zeitabständen von 12 Stunden RNA isoliert. Abbildung 17 zeigt einen Northern-Blot, bei dem Gesamt-RNA aus 720C-behandelten,

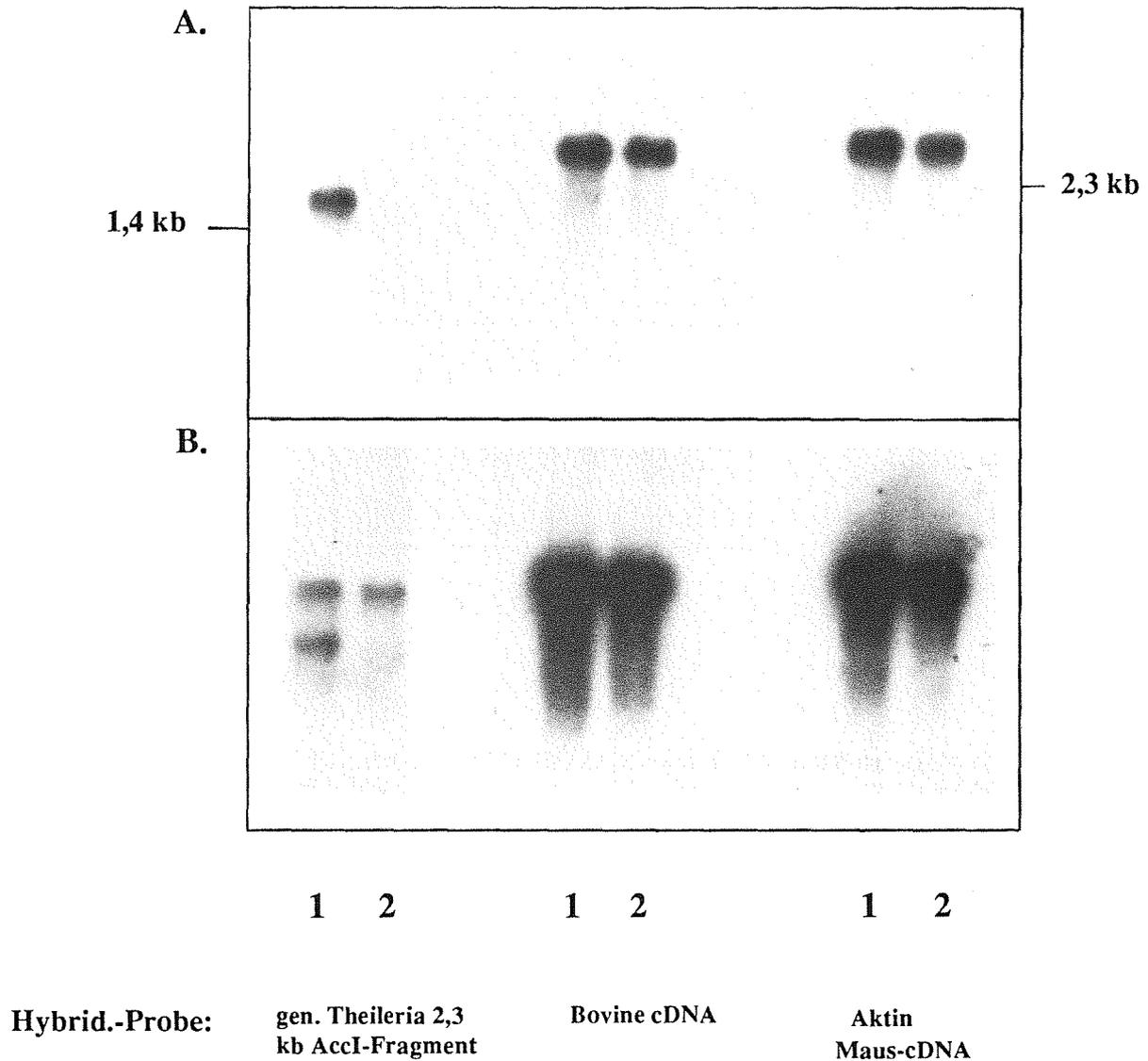


Abb. 16: Northern-Blot. A. PolyA-RNA, isoliert aus *Theileria* infizierten Lymphozyten (1) und für 2 Tage mit 720C-behandelten, infizierten Lymphozyten (2), wurden zusammen in einem 1,4% Agarose Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonfilter geblottet. Hybridisiert wurde mit den angegebenen Aktin-Proben, mit stringenden Bedingungen für *Theileria* - und Bovine Aktin. Für Maus Aktin-Probe wurde mit 4xSSC/60 °C hybridisiert und mit 2xSSC/55 °C gewaschen. B. Der mit der *Theileria* Aktin-Probe hybridisierte Nylonfilter wurde mit Bovine cDNA nachhybridisiert und die anderen Filter daneben noch einmal exponiert. Die schwächeren Signale sind dadurch zu erklären, daß die markierte Bovine cDNA-Probe bereits 10 Tage alt war. Als Marker diente prokaryontische und eukaryontische rRNA, mit welcher die angegebenen Größen ermittelt wurden.

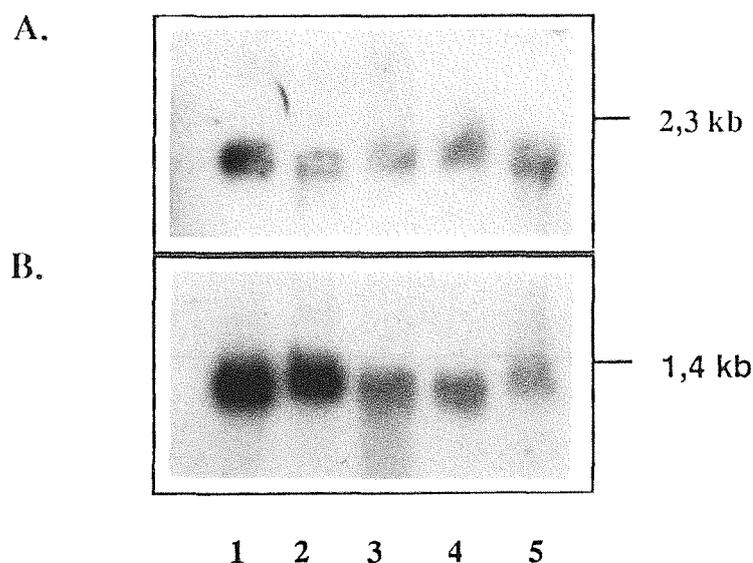


Abb. 17: Northern-Blot. **B.** Gesamt-RNA 720C-behandelter, *Theileria parva*-infizierter Lymphozyten wurde in Abständen von 12 Stunden isoliert, in einem 1,4% Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonfilter geblottet und mit *Theileria parva*-Aktin-cDNA unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Aufgetrennt wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA A. Das gleiche Nylonfilter wurde später mit Bovine-cDNA unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Als Marker diente prokaryontische und eukaryontische rRNA, mit welcher die angegebenen Größen ermittelt wurden.

Theileria parva-infizierten Lymphozyten, isoliert nach 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden, mit der *Theileria parva*-Aktin-cDNA hybridisiert wurde (s. 4.7). Es ist deutlich erkennbar, daß die Transkription des parasitären Aktins bereits nach 24 Stunden erheblich gehemmt wird, obwohl nach 24 Stunden mikroskopisch noch keine Zerstörung des Parasiten erkennbar ist. Als Kontrolle wurde das gleiche Filter danach mit der Bovine-cDNA hybridisiert. Abbildung 17A zeigt zum einen, daß ungefähr gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden und daß das Medikament keinerlei Einfluß auf die Transkription des Rinder Aktins hat, was in Abbildung 16 ebenso gezeigt wurde.

Diese Northern-Analyse zeigte somit, daß das *Theileria parva*-Aktin-Gen ein Transkript mit einer Größe von 1,4 kb aufweist, dessen Expression nach Zugabe des Medikaments 720C gehemmt wird.

Für weitere Analysen der Genstruktur des *Theileria parva*-Aktins sollte nun eine Aktin cDNA aus einer cDNA-Bank isoliert werden.

4.7 Isolierung einer *Theileria parva*-Aktin cDNA und des genomischen 5'-benachbarten AccI-Fragments

Da sichergestellt war, daß *Theileria parva*-Aktin transkribiert wird, war es sinnvoll eine cDNA-Bank, hergestellt aus PolyA-RNA *Theileria parva*-infizierter Lymphozyten, mit dem homologen 2,3 kb AccI Aktin-Fragment unter stringenten Bedingungen zu 'screenen'.

Bevor die Subklonierung des 2,3 kb AccI-Fragmentes gelang, wurde bereits mit der [Aktin Maus-Probe versucht, *Theileria parva* Aktinsequenzen aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten und kloniert in Lambda NM 1149, zu isolieren. 12 Lambda-Klone wurden identifiziert, direkt in M13 umklont und vom 3'-Ende her teilsequenziert. Der Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank des Computers ergab für alle isolierten Aktinklone eine 100%-ige Homologie zu Bovine Aktin. Damit wurde auch deutlich, daß in einer cDNA-Bank, die aus *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten hergestellt wurde, Bovine-Transkripte überrepräsentiert sind und damit die Isolierung eines *Theileria parva*-Transkriptes mit einer heterologen Aktinprobe der Maus aussichtslos war.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es nur mit einer homologen Probe, wie dem 2,3 kb AccI-Fragment möglich eine, cDNA-Bank nach *Theileria parva*-Aktin-Klonen abzusuchen.

Mit der isolierten cDNA als Probe wurde dann das fehlende genomische 5'-Fragment im Lambda CH4A-Klon identifiziert und konnte anschließend isoliert werden.

Die cDNA-Genbank wurde aus *Theileria parva* infizierten Lymphozyten von M. Carrington, Cambridge, hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde mittels AMV-Reverse-Transkriptase, RNaseH und DNA-Polymerase I synthetisiert, die EcoRI-Schnittstellen methyliert, die Enden mit T4-Polymerase

repariert und mit EcoRI-Linkern in die EcoRI-Schnittstelle des Lambda-Vektors NM 1149 kloniert.

Zur Isolierung eines Aktin cDNA-Klons wurden 10^6 Lambda-Phagen ausplattiert. Die Filterabzüge wurden mit der 2,3 kb AccI Aktinprobe unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen.

Die Autoradiographie zeigt 21 positive Signale, von welchen nach dem 'Rescreening' 18 positive Signale für Theileria-Aktin verblieben. Um die Insertgröße dieser 18 Lambda-Klone zu ermitteln, wurde im kleinen Maßstab DNA präpariert, mit EcoRI die Inserts ausgeschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das ethidiumbromidgefärbte Gel, sowie die Autoradiographie des geblotteten und hybridisierten Gels zeigten, daß 10 dieser 18 Aktin cDNA-Klone Inserts mit weniger als 600 Basen besaßen (nicht gezeigt). Der Klon mit dem größten Insert von etwa 1,35 kb wurde für Kartierungs- und Hybridisierungszwecke in die EcoRI-Schnittstellen des Plasmidvektors pUC 9 und zur Sequenzierung in die EcoRI-Schnittstelle des Polylinkers von M13 mp18 subkloniert.

Um festzustellen, ob der isolierte cDNA-Klon tatsächlich Theileria-Aktinsequenzen enthält, wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Eine Hybridisierung der cDNA an verdaut genomische DNA sollte die gleichen Restriktionsfragmente zeigen, die auch mit der Maus-Probe erhalten wurden. Dazu wurde der Lambda-Klon und genomische Theileria-DNA mit EcoRI und AccI verdaut und mit verschiedenen Aktin-Proben hybridisiert (Abb. 18). Die Hybridisierung mit der 2,3 kb AccI Theileria-Aktinprobe bestätigt wieder das 10 kb EcoRI- und das 2,3 kb AccI-Fragment im CH4A-Klon und in der genomischen Theileria-DNA (Piroplasmen-DNA). Nur die Hybridisierung des CH4A-Aktin-Klons mit der isolierten 1,35 kb Aktin-cDNA-Probe zeigte ein zusätzliches AccI-Fragment mit einer Größe von 1,2 kb. Wie später gezeigt wurde, handelte es sich dabei um das fehlende 5'-Fragment des Aktin Gens. Dieses 1,2 kb genomische 5'-AccI-Fragment wurde dann aus dem CH4A-Klon isoliert und in die HincII-Stelle des pUC 9-Polylinkers ligiert.

Ein Hinweis, daß es sich bei dem isolierten 1,2 kb AccI-Fragment tatsächlich um die fehlenden 5'-Sequenzen des singulären Aktin Gens handelte, wurde durch Hybridi-

sierung dieses Fragmentes an genomische DNA erhalten, da nur ein genomisches Fragment hybridisierte.

Dazu wurde DNA, isoliert aus dem Charon 4A Aktin-Klon und genomische Theileria-DNA mit EcoRI, AccI und SacI geschnitten (Abb. 19B). Hybridisierung mit dem 1,2 kb AccI Aktin-Fragment zeigte wieder ein identisches Restriktionmuster, sowohl im Charon 4A Aktin-Klon als auch in der genomischen Theileria-DNA. Der Verdau zeigt für jedes Enzym nur eine Bande. Die 7 kb SacI-Bande bestätigt die unter 4.5 aufgeführten Ergebnisse, wo gezeigt wird, daß 3' des 2,3 AccI-Fragmentes keine weitere Aktin-Sequenz liegt. Beim Verdau mit SacI ist deutlich kein weiteres Fragment zu erkennen, das mit dem 1,2 kb AccI-Fragment hybridisiert. 3' dieses Fragmentes lagen also keine weiteren Aktinsequenzen (s. auch 4.5).

Aufgrund der später erfolgten vollständigen Sequenzierung des Theileria-Aktins (4.8) konnte erklärt werden, warum die [Aktin Maus-Probe nicht mit dem 1,2 kb AccI-Fragment hybridisierte. Der Maus-Probe fehlen am 5'-Ende etwa 50 Basen der kodierenden Region. Auf dem 1,2 kb AccI-Fragment befinden sich 100 Basen der 5'-kodierenden Region, zu welchen die 50 Basen der Maus-Probe unter den angewandten Bedingungen nicht hybridisierten.

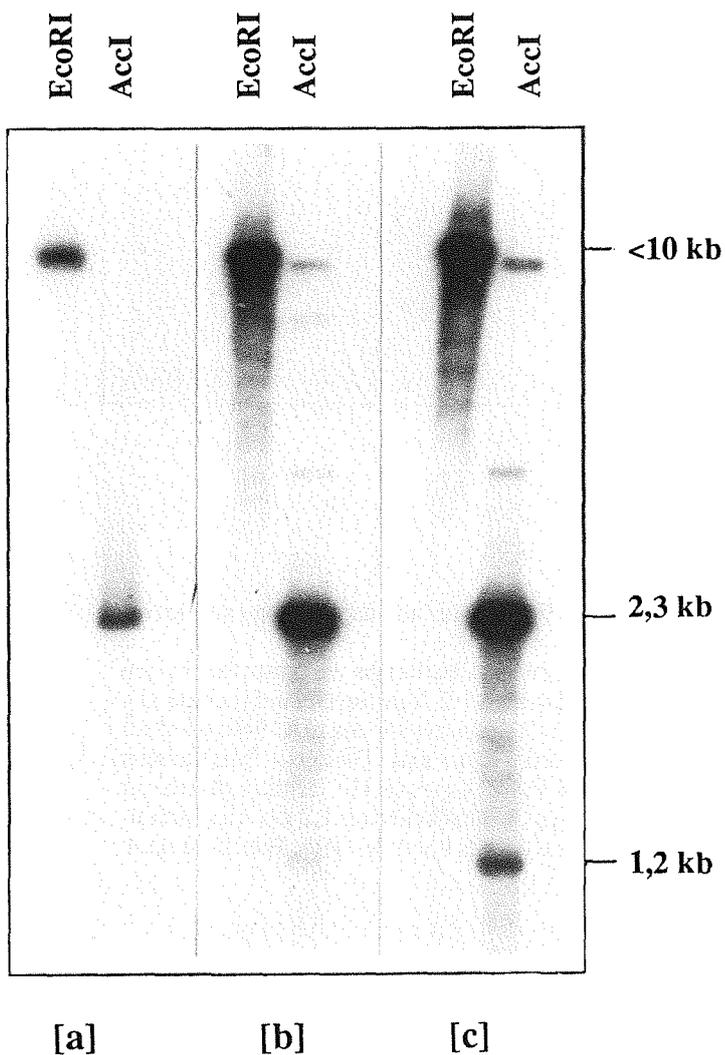


Abb. 18: Southern-Blot. DNA, isoliert aus CH4A-Aktin [b] und [c] (250 ng) und genomischer Theileria-DNA [a] (Piroplasmen, 5 µg), wurde mit EcoRI und AccI verdaut, zusammen in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch auftrennt und geblottet. Hybridisiert wurden die Filter mit dem 2,3 AccI Theileria Aktin-Fragment in [a] und [b] oder mit Theileria Aktin-cDNA [c] unter stringenden Bedingungen. Als Marker diente Lambda-DNA, BstEII-verdaut, mit welcher die angegebenen Größen ermittelt wurden.

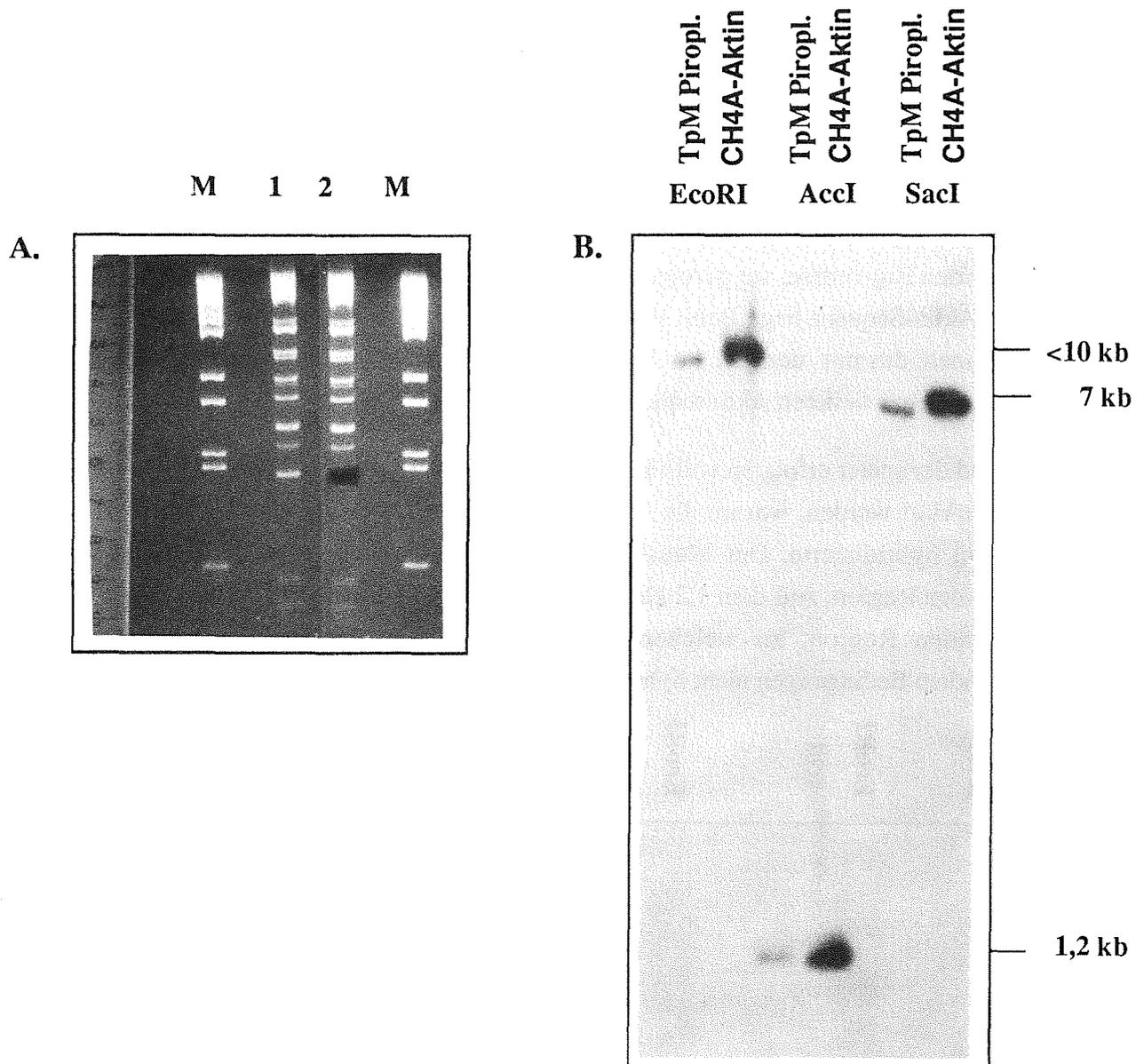


Abb 19: Subklonierung des 5'-benachbarten 1,2 kb AccI-Fragmentes aus dem Charon 4A Aktin-Klon.

A. CH4A-Aktin wurde mit AccI verdaut, mit Klenow die 5'-Überhänge zu stumpfen Enden synthetisiert und elektrophoretisch in einem niedragschmelzenden 1% Agarose Gel aufgetrennt (1). Die 1,2 kb-Bande wurde ausgeschnitten (2) und in die HincII-Schnittstelle des pUC 9-Polylinkers ligiert. **B.** Southern-Blot DNA, isoliert aus CH4A-Aktin-Klon und Theileria Piroplasmen wurden mit EcoRI, AccI und SacI verdaut, in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Hybridisiert wurde mit dem aus A. umklonierten 1,2 kb AccI Aktin-Fragment unter stringenden Bedingungen. Als Marker diente jeweils Lambda-DNA, BstEII-verdaut, mit welcher die angegebenen Größen ermittelt wurden

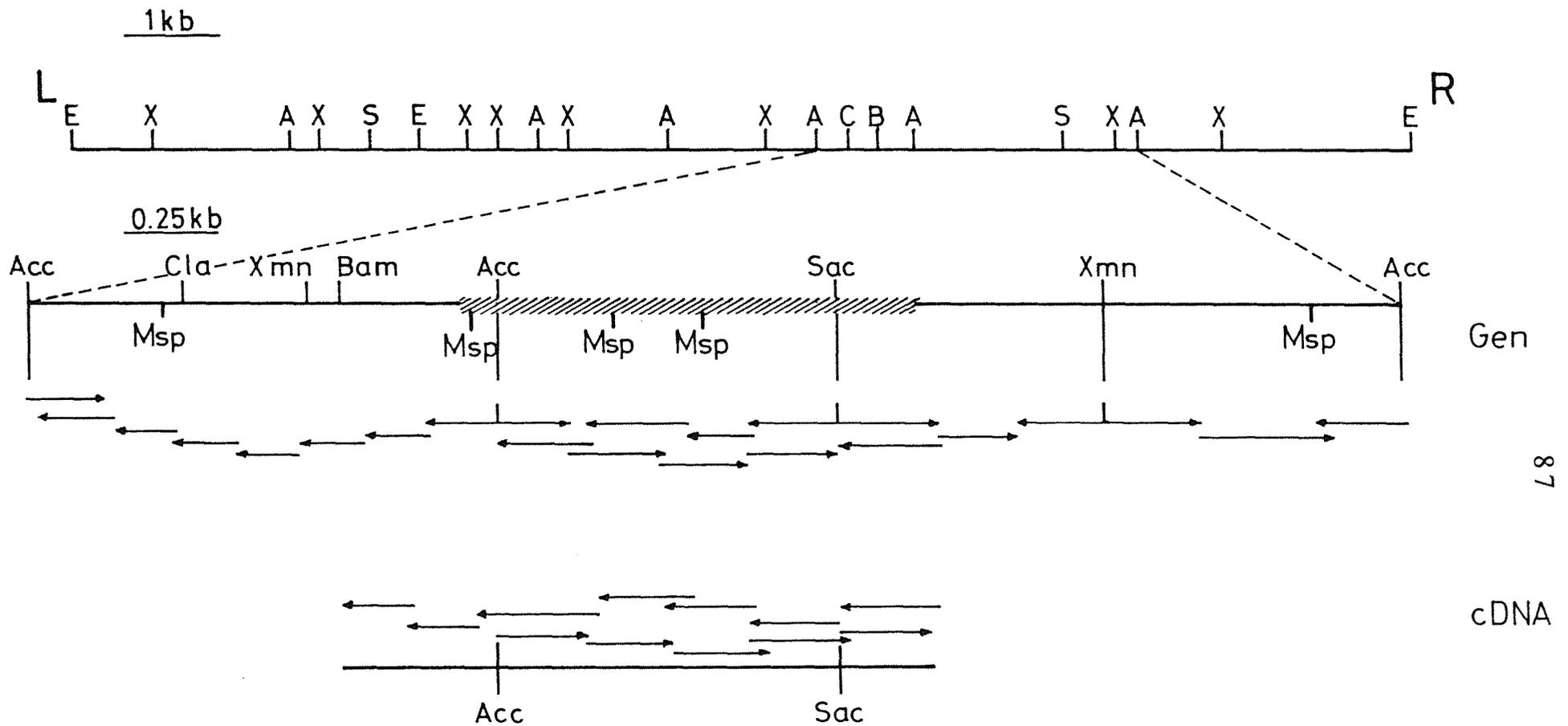


Abb 20 : Restriktionskarte des Lambda-Klones Charon 4A-Aktin von *Theileria parva*. R und L= Inesrtionsschnittstellen des rechten - bzw linken Vektorarms. Die kodierende Region des *Theileria parva* Aktin Gens ist schraffiert gezeichnet. Darunter ist die Sequenzierungsstrategie des 2,3 kb-, des 1,2 kb-AccI-Frgamentes und die der Aktin-cDNA mittels Pfeilen dargestellt

Die Schnittstellen in der Genkarte wurden durch Sequenzierung bestätigt und können mit folgenden Positionen im Gen angegeben werden (Zur Orientierung siehe auch Abb.22: Genomische Sequenz des *Theileria parva* Aktin Gens.) Die angegebenen Positionen zeigen nicht die Schnittstellen , sondern das 5'-Ende der Erkennungssequenz der jeweiligen Restriktionsenzyme.

Für das 1,2 kb AccI-Fragment (von 5' nach 3'): AccI [-1107]; MspI [-753]; ClaI [-705]; XMNI [-382]; BamHI [-302]; MspI [+44]; AccI [+110].

Für das 2,3 kb AccI-Fragment (von 5' nach 3'): AccI [+110]; MspI [+307]; MspI [+545]; Sac/ [+948]; XMNI [+2169]; AccI [+2398];

4.8 Sequenz des Theileria-Aktin-Gens und der -cDNA

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß das klonierte 2,3 kb AccI-Fragment Theileria-Aktinsequenzen enthält. Das 1,2 kb AccI-Fragment, welches durch Hybridisierung mit der Theileria-Aktin cDNA identifiziert wurde, enthielt also vermutlich die fehlenden 5'-Sequenzen des Aktin Gens. Dies sollte durch eine Sequenzierung bestätigt werden. Die Sequenzanalyse sollte außerdem dazu dienen, folgende Fragen zu beantworten:

- Ist die isolierte cDNA das Transkript des bereits teilsequenzierten Theileria-Aktin-Gens?
- Wie groß ist die 3'-Nichttranslatierte Region und gibt es hier ein bekanntes Signal, welches das Transkriptionseende und das Anhängen der PolyA-Sequenzen an die mRNA kodiert?
- Gibt es Introns?
- Wie sieht das Aktin-Gen aus, das durch die Nukleotidsequenzen kodiert ist?
- Wie groß ist die 5'-Nichttranslatierte Region; gibt es sogenannte Leader-Sequenzen am 5'-Ende der cDNA, wie es bei Trypanosomen und Caenorhabditis elegans bekannt ist?
- Gibt es einen Promotor in der 5'-flankierenden Genregion des 1,2 kb AccI-Fragmentes?

Um diese Fragen beantworten zu können, genügte nicht nur eine Teilsequenzierung der entsprechenden Fragmente, sondern es mußte sowohl das gesamte Gen einschließlich der flankierenden Bereiche als auch die cDNA sequenziert werden. Alle Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977).

4.8.1 Sequenzierungsstrategie

Das 1,2 kb AccI-Fragment wurde als ganzes Fragment mit EcoRI/PstI aus dem pUC9-Vektor ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von M13 mp18 und -mp19 ligiert. Das größere 2,3 kb AccI-Fragment wurde durch Kenntnis der Restriktionsschnittstellen wie folgt verdaut und umkloniert:

| pGEMI/2,3 kb AccI-Insert | Modifikation | M13 |
|--------------------------|--------------|--------------------|
| PstI/EcoRI | - | PstI/EcoRI, mp18 |
| XMNI | Klenow/PstI | PstII/HincII, mp18 |
| PstI/SacI | - | PstI/SacI, mp18 |
| EcoRI/PstI | - | EcoRI/PstI, mp19 |
| XMNI | Klenow/EcoRI | EcoRI/HincII, mp19 |
| EcoRI/SacI | - | EcoRI/SacI, mp19 |

Durch die gezielte Umklonierung in M13 mp18 und - mp19 war es möglich, die subklonierten Fragmente von beiden Seiten zu sequenzieren.

Um überlappende Fragmente für die Sequenzierung zu erhalten, wurden zusätzlich Bal 31-Deletionen von dem 2,3 kb AccI-Fragment hergestellt. Um auch hier beide Richtungen für die Sequenzierung zu erhalten, wurde pGEMI/2,3 kb AccI einmal mit PstI linearisiert, mit Bal 31-Exonuklease verdaut und mit EcoRI nachgeschnitten, sodaß in die EcoRI/HincII-Stelle des M13 mp19 kloniert werden konnte. Die andere Orientierung der deletierten Fragmente in den mp 18-Vektor erfolgte mit den gleichen Enzymen; die DNA wurde allerdings in umgekehrter Reihenfolge verdaut. Die überlappenden Sequenzen, wurden mittels synthetisierter Oligonucleotide, die als Primer eingesetzt wurden, ermittelt. Abbildung 20 zeigt die Sequenzierungsstrategie. Um eine exakte Sequenz zu erhalten, wurde das Theileria-Aktin-Gen und die cDNA in beiden Richtungen sequenziert.

Abb. 21: *Theileria parva*: genomische Sequenz des Aktin Gens

ACATCTAAAT CATTTTAAGA TATCTGGTTT GTGGAAGATT ACGGAATCTA GTACTTAACA -1048
 TATATGAATA TTTTGGATTC AAGAAATAAT ATTTTTTTAA CAATCTAATT TAAATAAAAA -988
TATAAGGTTA AATATATAAT ATGTTATAAT TTTGAGGTAA AATGGTAAAA ATTAACCTCGG -928
 GTTTGTTTAC TGTC AATTTA AATGCATAAA TGATTCTAAT GTATATATGC GATGTGTAAA -868
 ATAATTCCTG TTTTAAAAAT TAGAAATTTT TAAAATACCA AGTAATTAAA TATCAATCCT -808
 GTAAAAAAC TGATGATTCT TAATTTTTTA TAGAATCTTC TAGACAAGAT CACCCGGAAA -748
 TTAAATAATA TTTATAATAT ATGAATAAAA ATAATAAGAA TATCGATAGA AGATTAATAA -688
 CTAGTTATGA ATTTGTAAAG GCTGTAAAAT TTGAAGGATG GTGTGTTGGT AAAAATCAAA -628
 AAAATGTAAA TATCTATTAA TTAAACTAAA AGACAAACAC ATAATTTTAA GGAATTTTAA -568
 TTTGAAATAA TAGTGGAAGA AAGATAAATT ATTACCTAGT GAAATTGTGA AGTTATTAAA -508
 TAGGGGAAGT TGTA AAAAATT TTTTGTGAAT CTTTATGGAA GTTGTTATTT AAAAGGATTT -448
 TTTGAATTAA AATAATAAAA AAAGTGTCAT CGGTAGATCT ACATATAAAA TTTTACTCCT -388
 GTAAGAAAAT ATTCGTGATT CACGGGCCAA AAAGCAGGTC AAGCACCCAT TAAATTTGAC -328
 GTCGATTTTC CCTAGCACCC CACTGGATCC ATTTGAATGT ACCACATGCA TCGGTGTGTA -268
 TGGCGTTTTA GAATATATTT ATATTTATAA GAGGAICTAC TACTAATTAT ATTTTTCTTC -208
 ACTGACAGAT AAGCTAAAAG CAACTGTAAA AAGTTAAACT CTCTGTAAAT TATTGTTTTG -148
 TACATTATTT TCCTAAAAAT ATTACTCATT AGTTGATCTA TATAAAAGGT ACTTCGTTTT -88
 AAGCTAATTT GTCTCAATTT TAATATTTTT GAATCCTATC AATATCAAAC CCTGTCATAC -28
 CAGTTTCTAA TCATTTTTCA GGATAAAAATG TCTGACGAAG AGACTACTGC TTTAGTTGTG +1 +33
 GACAATGGTT CCGGAAACGT TAAGGCAGGT TTCGCCGGTG ATGACGCCCC CAGGTGCGTT +93

TTCCCCGAGCA TTGTCGGTAG ACCGAAAAAT CCAGCACTCA TGGTTGGAAT GGACGAAAAG +153
 GATACCTATG TAGGTGACGA GGCGCAATCC AAAAGGGGTA TCTTGACCCT CAAATATCCT +213
 ATTGAACACG GSTATCGTTAC GAATTGGGAA GATATGGAGA AAATCTGGCA TCATACCTTC +273
 TACAATGAAC TAAGGATTGC ACCTGAGGAA CACCCGGTTC TCTTGACAGA AGCTCCCATG +333
 AACCCCAAGG CCAATCGTGA GAAGATGACC ACTATCATGT TCGAGACCCA CAATGTGCCA +393
 GCCATGTATG TTGCAATCCA GGCCGTACTA TCACTTTACT CCTCGGGAAG AACTACCGGT +453
 ATTGTGCTCG ACTCTGGAGA TGGTGTACC CACACTGTGC CCATCTACGA AGGTTACGCG +513
 CTTCCCTCATG CGATCATGAG ACTCGATTTG GCCGGAAGAG ACTTGACTGA GTTCATGCAG +573
 AAGATTCTGG TTGAACGTGG ATTCTCTTTC ACCACCACCG CTGAGAAGGA GATTGTCCGT +633
 GACATCAAGG AGAAGTTGTG CTACATTGCC CTCGACTTCG ACGAGGAAAT GACCACCTCA +693
 TCATCATCAT CCGAAGTTGA GAAGTCATAC GAGTTGCCAG ACGGTAACAT CATAACAGTT +773
 GGAAACGAAA GGTTCAGGTG TCCTGAAGTG CTCTTCCAGC CCACCTTCAT CGGTATGGAG +813
 GCCCCTGGAA TCCACACCAC CACCTACAAC TCAATTGTTA GATGTGACGT GGACATTAGG +873
 AAGGATCTTT ATGCCAACGT GGTGCTGTCA GGAGGCACGA CCATGTTCTGA GGGTATTGGT +933
 CAGAGGATGA CTAAGGAGCT CAACGCGCTC GTACCTTCCA CTATGAAGAT CAAGGTTGTA +993
 GCCCCACCAG AACGCAAGTA CTCTGTCTGG ATTGGTGGTT CGATCCTGTC TTCACTCTCC +1053
 ACATTCCAGC AAATGTGGAT CACCAAGGAA GAGTTCGACG AAAGTGGGCC CAATATTGTG +1113
 CACCGTAAAT GCTTTTAATT TTTACGACCC CCTTCAATAT GCTTTCATTG AGTCCAAATT +1173
 CATTGTTAAT TATTAATAAT ACGCAACTAT CTTAGTATAG TTCATTATAG ATATAGTCAG +1233
 TGGTATTAAT AGTCTATAGT GGTAATAATA CAGTTAAGGA ATAATACAGT TGATGCAGTT +1293
 AATAGTACTA ACTAGTGTG GGGTCGTATA ATGTACAGAG TAGATTAGCG TGACTTTAGG +1353

+1413
 TTTTGGACAC CCATCCTTAT GTAGTAGATT AAAATTGGGA AGACAAAGGG GAAAACGTCA
 +1473
 CACATGAAAA CAGCGAGGTT GTGTTCTAGG GAAAGAATGT TCCTGGGGAA CATCTGGTCG
 +1533
 TCAGAAAGAG CCTCAAGACT CTGAGAATAG GCAAACCTAG CCAGACACAA GGCCCGCTGG
 +1593
 TTCATGTCCA TGGAGCCAAG ATTGGGAAAC AAAGTGTCTG GAGAGTTCTC AGATTGTGAG
 +1563
 AAGAGGTGAC CCATCGAATA CTCAAGAGCG TAGAAAGTCT TCTAGGTTAT ATTGAGCAAT
 +1713
 CGTGAATTAA TATAGATTTA GATAACTAAA GCTAATTGTA GTTAGGGAAG AGGTACCTTG
 +1773
 ACAAATTCAG ATGTGGATTT AGGAACCTGG TTGTTGAAGT AAACCTTCTT AACTTGAGAC
 +1833
 ACTTTCTTCA AGTTTATAAG CGCCCCCTTA ATGTAACAAT GGTAGAAAAA CTTGGAAAGT
 +1893
 TTGAGTAGCT CAAACCTGTA AAATGAGACA TTGGCGGAGT GTCAAACGTG AGTTGAAATG
 +1953
 AGCCAGAAAT GGATATATTG TTAGAATCTG AGCCCTTTGA AATCAGGTAT TCAGTGTCTG
 +2013
 AAATCATCCT TCACATTTTC GTCTAAGTTA CATAGTCATA GCACATATTC ACTTAAGCTG
 +2073
 GCTGGAAGAC TGTGCATGTG CGAATGTATG TTGCCCAAGT CGATACTAGT TCGGAAACAT
 +2133
 CCTCTTCAGT TAACTTGTA T GATCAGATT GGGGTCGATT ATTTAAAAA GTAAATACTC
 +2193
 CTAGATTATC AATTGTGAAA CTGTCACGTT TTTGACCGGT GAAGGGATCT TTTAGAAAAG
 +2253
 TAGGCCTTGA GGATAGAATA ACAAAAAAGT TCAGCGAGTG TCTGAAGGAG TGTTGATCCT
 +2313
 TCATTGAAAT ATCAGTGTTG GAAATTCCTT CAAAAAAGTT ATAAAAATTG GTTTCCTGGT
 +2373
 TCCTTAACTC AAAGACTGCT TCGTTGCTTT GTTCTTCGGA TTCTCCCTG TTGGAAGTTA
 +2403
 AGTTAAGACC ATCTTCTTGT AGTAGTCGAC

Abb. 22. Vergleich der Aktin-Nukleotidsequenzen von *Theileria parva* (oben) und α Aktin Maus cDNA (unten).

```

7      GACGAAGAGACTACTGCTTTAGTTGTG GACAATGGTTCCGGAAACGTTAAGGCAGGTTT
60     GAAGACGAGACCACCGCUCUUGU GUGUGACAACGGCUCUGGCCUGGUGAAAGCUGGCUU
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
67     CGCCGGTGATGACGCCCCAGGTGCGTTTCCCGAGCATTGTCGGTAGACCGAAAAATCC
119    UGCCGGGAUGAUGCCCCAGGGCUGUGUCCCAUCCAUCGUGGGCCGACCCCGUCACCA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
127    AGCACTCATGGTTGGAATGGACGAAAAGGATACCTATGTAGGTGACGAGGCGCAATCCAA
179    GGGUGUCAUGGUAGGUAUGGGUCAGAAGGACUCCUACGUGGGUGAUGAGGCCAGAGCAA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
187    AAGGGGTATCTTGACCCCTCAAATATCCTATTGAACACGGTATCGTTACGAATTGGGAAGA
239    GCGAGGUAUCCUGACCCUGAAGUACCCCAUUGAACAUUGGCAUACCAACUGGGACGA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
247    TATGGAGAAAATCTGGCATCATACCTTCTACAATGAACTAAGGATTGCACCTGAGGAACA
299    CAUGGAGAAGAUUGGCACCACACCUUCUACAAUGAGCUGCGUGUGGCCCCUGAGGAGCA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
307    CCCGTTCTCTTGACAGAAGCTCCCATGAACCCCAAGCCAATCGTGAGAAGATGACCAC
359    CCCGACUCUGCUCACCGAGGCCCCCGAACCCTAAAGCUAACCGGGAGAAGAUGACUCA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
367    TATCATGTTTCGAGACCCACAATGTGCCAGCCATGTATGTTGCAATCCAGGCCGTACTATC
419    AAUCAUGUUUGAGACCUUCAACGUGCCUGCCAUGUAUGUGGCUAUCCAGGCCGUGUCGUC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
427    ACTTTACTCCTCGGGAAGAACTACCGGTATTGTGCTCGACTCTGGAGATGGTGTACCCCA
479    CCUCUAUGCUUCCGGCCGUACCACCGCAUCGUGUUGGAUUCUGGGGACGGUGUCACCCA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
487    CACTGTGCCATCTACGAAGTTACGCGCTTCCCTCATGCGATCATGAGACTCGATTTGGC
539    CAACGUGCCCAUCUAUGAGGGCUAUGCCUGCCACACGCCAUCAUGCGUCUGGACCUGGC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
547    CGGAAGAGACTTGACTGAGTTCATGCAGAAGATTCTGGTTGAACGTGGATTCTCTTTCAC
599    CGGUCGCGACCUCACUGACUACCUGAUGAAAUCCUCACUGAGCGUGGCUAUUCCUUCGU
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
607    CACCACCGCTGAGAAGGAGATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGTTGTGCTACATTGCCCT
659    GACCACGCUAACGUGAGAUUGUGCGCGACAUCAAGAGAAGCUGUGCUAUGUGGCCCU
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
667    CGACTTCGACGAGGAAATGACCACCTCATCATCATCCTCCGAAGTTGAGAAGTCATACGA
719    GGACUUCGAGAAUGAGAUGGCCACCGCUGCCUCUCCUCCUCCUGGAGAAGAGCUAUGA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
727    GTTGCCAGACGGTAACATCATAACAGTTGGAAACGAAAGGTTGAGGTGCTTGAAGTGCT
779    GCUGCCCGACGGGCAGGUCAUCACCAUCGGCAAUGAGCGUUUCCGUUGCCCGGAGACGCU
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
787    CTTCAGCCACCTTCATCGGTATGGAGGCCCTGGAATCCACACCACCACCTACAACCTC
839    CUCCAGCCUCCUUAUCGGUAUGGAGUCUGCGGGGAUCCAUGAGACCACCUACAACAG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
847    AATTGTTAGATGTGACGTGGACATTAGGAAGGATCTTTATGCCAACGTGGTGCTGTCAGG
899    CAUCAUGAAGUGCGACAUCGACAAGGACCGUAUGCCAACAACGUAUGUCAGG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
907    AGGCACGACCATGTTGAGGGTATTGGTCAGAGGATGACTAAGGAGCTCAACCGCGCTCGT
959    GGGCACCACCAUGUACCCUGGUAUCGUGACCGCAUGCAGAAGGAGAUACAGCUCUGGC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
967    ACCTTCCACTATGAAGATCAAGGTTGTAGCCCCACCAGAACGCAAGTACTCTGTCTGGAT
1019  UCCAGCACC AUGAAGAUCAAGAUCAUCGCCCCCUGAGCGCAAGUACUCAGUGUGAU
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1027  TGGTGGTTGATCCTGTCTTCACTCTCCACATTCCAGCAAATGTGGATCACCAGGAAGA
1079  CGGUGGCUCCAUCCUGGCCUCGUGUCCACCUUCCAGCAGAUGUGGAUCACCAAGCAGGA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1087  GTTCGACGAAAGTGGGCCCAATATTGTGCACCGTAAATGCTTTTA 2237
1139  GUACGACGAGGCUGGCCCUCCAUUGUGCACCAGCAAUGCUUCUA 1183
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abb. 23: Vergleich der Nukleotidsequenzen von *Theileria parva* Aktin Gen und cDNA.

Die cDNA-Sequenzen sind unterhalb der Gen-Sequenzen.

-278
 ATCGGTGTGTATGGCGTTTTAGAATATATTTATATTTATAAGAGGATCTACTACTAATTA
 |||||
 ACTAATTA

-218
 TATTTTTCTTCACTGACAGATAAGCTAAAAGCAACTGTAAAAAGTTAAACTCTCTGTAAA
 |||||
 TATTTTTCTTCACTGACAGATAAGCTAAAAGCAACTGTAAAAAGTTAAACTCTCTGTAAA

-158
 TTATTGTTTTGTACATTATTTTCCTAAAAATATTACTCATTAGTTGATCTATATAAAAAGG
 |||||
 TTATTGTTTTGTACATTATTTTCCTAAAAATATTACTCATTAGTTGATCTATATAAAAAG

-98
 TACTTCGTTTTAAGCTAATTTGTCTCAATTTTAATATTTTTGAATCCTATCAATATCAAA

-38 +1
 CCCTGTCATACCAGTTTCTAATCATTTTTTCAGGATAAAATGTCTGACGAAGAGACTACTG
 |||||
 GATAAAATGTCTGACGAAGAGACTACTG

+23
 CTTTAGTTGTGGACAATGGTTCGGAAACGTTAAGGCAGGTTTCGCCGGTGATGACGCC
 |||||
 CTTTAGTTGTGGACAATGGTTCGGAAACGTTAAGGCAGGTTTCGCCGGTGATGACGCC

+83
 CCAGGTGCGTTTTTCCCGAGCATTTGTCGGTAGACCGAAAAATCCAGCACTCATGGTTGGAA
 |||||
 CCAGGTGCGTTTTTCCCGAGCATTTGTCGGTAGACCGAAAAATCCAGCACTCATGGTTGGAA

+143
 TGGACGAAAAGGATACCTATGTAGGTGACGAGGCGCAATCCAAAAGGGGTATCTTGACCC
 |||||
 TGGACGAAAAGGATACCTATGTAGGTGACGAGGCGCAATCCAAAAGGGGTATCTTGACCC

+203
 TCAAATATCCTATTGAACACGGTATCGTTACGAATTGGGAAGATATGGAGAAAATCTGGC
 |||||
 TCAAATATCCTATTGAACACGGTATCGTTACGAATTGGGAAGATATGGAGAAAATCTGGC

+263
 ATCATACCTTCTACAATGAACTAAGGATTGCACCTGAGGAACACCCGGTTCTCTTGACAG
 |||||
 ATCATACCTTCTACAATGAACTAAGGATTGCACCTGAGGAACACCCGGTTCTCTTGACAG

+323

AAGCTCCCATGAACCCCAAGGCCAATCGTGAGAAGATGACCACTATCATGTTTCGAGACCC
 |||
 AAGCTCCCATGAACCCCAAGGCCAATCGTGAGAAGATGACCACTATCATGTTTCGAGACCC

+383

ACAATGTGCCAGCCATGTATGTTGCAATCCAGGCCGTACTATCACTTTACTCCTCGGGAA
 |||
 ACAATGTGCCAGCCATGTATGTTGCAATCCAGGCCGTACTATCACTTTACTCCTCGGGAA

+443

GAACTACCGGTATTGTGCTCGACTCTGGAGATGGTGTACCCACACTGTGCCCATCTACG
 |||
 GAACTACCGGTATTGTGCTCGACTCTGGAGATGGTGTACCCACACTGTGCCCATCTACG

+503

AAGGTTACGCGCTTCCTCATGCGATCATGAGACTCGATTTGGCCGGAAGAGACTTGACTG
 |||
 AAGGTTACGCGCTTCCTCATGCGATCATGAGACTCGATTTGGCCGGAAGAGACTTGACTG

+563

AGTTCATGCAGAAGATTCTGGTTGAACGTGGATTCTCTTTCACCACCACCGCTGAGAAGG
 |||
 AGTTCATGCAGAAGATTCTGGTTGAACGTGGATTCTCTTTCACCACCACCGCTGAGAAGG

+623

AGATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGTTGTGCTACATTGCCCTCGACTTCGACGAGGAAA
 |||
 AGATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGTTGTGCTACATTGCCCTCGACTTCGACGAGGAAA

+683

TGACCACCTCATCATCATCCGAAGTTGAGAAGTCATACGAGTTGCCAGACGGTAACA
 |||
 TGACCACCTCATCATCATCCGAAGTTGAGAAGTCATACGAGTTGCCAGACGGTAACA

+743

TCATAACAGTTGGAAACGAAAGGTTTCAGGTGTCCTGAAGTGCTCTTCCAGCCCACCTTCA
 |||
 TCATAACAGTTGGAAACGAAAGGTTTCAGGTGTCCTGAAGTGCTCTTCCAGCCCACCTTCA

+803

TCGGTATGGAGGCCCTGGAATCCACACCACCACCTACAACCTCAATTGTTAGATGTGACG
 |||
 TCGGTATGGAGGCCCTGGAATCCACACCACCACCTACAACCTCAATTGTTAGATGTGACG

+863

TGGACATTAGGAAGGATCTTTATGCCAACGTGGTGTGTCAGGAGGCACGACCATGTTTCG
 |||
 TGGACATTAGGAAGGATCTTTATGCCAACGTGGTGTGTCAGGAGGCACGACCATGTTTCG

+923

AGGGTATTGGTCAGAGGATGACTAAGGAGCTCAACGCGCTCGTACCTTCCACTATGAAGA
 |||
 AGGGTATTGGTCAGAGGATGACTAAGGAGCTCAACGCGCTCGTACCTTCCACTATGAAGA

+983

TCAAGGTTGTAGCCCCACCAGAACGCAAGTACTCTGTCTGGATTGGTGGTTCGATCCTGT
 |||
 TCAAGGTTGTAGCCCCACCAGAACGCAAGTACTCTGTCTGGATTGGTGGTTCGATCCTGT

4.8.2 Sequenzanalyse des Aktin-Gens

Abbildung 21 zeigt die Nukleotidsequenz des *Theileria parva*-Aktin-Gens im 1,2 kb - und 2,3 kb AccI-Fragment einschließlich der 5'- und 3'-flankierenden Regionen mit einer Gesamtlänge von 3510 Basen. Die mit [-] gekennzeichneten Positionen zeigen die Sequenzen 5' des Translationsstarts [ATG], wobei das erste Nukleotid [A] als [+1] gesetzt wurde. Die durch Sequenzierung ermittelten Positionen für die Restriktionsschnittstellen sind unter Abbildung 20 aufgeführt.

Sequenzhomologien zu anderen Organismen wurden durch Vergleich mit der Computer-Datenbank ermittelt und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Für den Bereich zwischen [+1] und [+1120] fanden sich in der Datenbank mehrere Homologien zu Aktinsequenzen anderer Organismen, von denen hier nur einige gezeigt sind (Tab. 1).

| | | |
|----------------------------------|-----|---------------------------|
| Mensch: α -Muskel-Aktin | 74% | (Hanauer et al., 1983) |
| Maus: α -Muskel-Aktin | 70% | (Hu et al., 1986) |
| Hühnchen: α -Muskel-Aktin | 71% | (Chang et al., 1985) |
| Hühnchen: zytoplasm. Aktin | 74% | (Kost et al., 1983) |
| Seeigel | 73% | (Cooper & Crain, 1982) |
| Drosophila: | 69% | (Fyrberg et al., 1981) |
| Dictyostelium: | 71% | (Romans & Firtel, 1985) |
| Amoeba castellani: | 68% | (Nellen & Gallwitz, 1982) |
| Hefe: | 71% | (Ng & Abelson, 1980) |
| Plasmodium falciparum | 69% | (Wesseling et al., 1988) |

Tab. 1: Gezeigt sind Homologien der Nukleotidsequenzen von *Theileria parva*-Aktin im Vergleich zu anderen Organismen. Diese Homologien beziehen sich auf den *Theileria*-Aktinsequenzbereich zwischen [+1] und [+1120]. Bovine-Aktin ist nicht gezeigt, da von diesem Gen bisher nur die Sequenzen des 5'- und 3'- Bereichs der kodierenden Region publiziert wurden.

Die Homologien befinden sich alle ungefähr in der gleichen Größenordnung. Bemerkenswert ist, daß gerade die niederen Organismen, wie *Amoeba castellani* und *Plasmodium falciparum* die niedrigste Übereinstimmung ihrer Aktin-Nukleotidsequenzen zu *Theileria parva* besitzen (s. 4.11).

Theileria-Aktin wurde mit einer α Aktin-Maus-cDNA-Probe isoliert. Der Sequenzvergleich in Tabelle 1 zeigt hier eine Homologie von 70%. Diese läßt auf den ersten Blick auf eine relativ hohe Homologie beider Aktine schließen.

Für die erfolgreiche Hybridisierung mit einer heterologen Probe sind zwei Informationen von Bedeutung: 1. Wie groß sind die Sequenzbereiche, die eine hohe Homologie im gesuchten Gen haben und 2) wie hoch ist deren AT-Gehalt?

Betrachtet man den Vergleich beider Sequenzen im Detail (Abb. 22), so kann man leicht erkennen, daß übereinstimmende Sequenzen eine Länge von 10-14 Basen nicht überschreiten und der AT-Gehalt in den homologen Regionen teilweise mehr als 70% beträgt. Dies erklärt, warum anfangs zuerst verschiedene Hybridisierungsbedingungen getestet werden mußten (4.1).

Um den Translationsstart des Aktins zu ermitteln, wurden die Nukleinsäure-Sequenzen in 3 Leserastern übersetzt. Ein offenes Leseraster ergab eine Proteinelänge von 376 Aminosäuren. Dieses Protein wurde durch Vergleich mit Proteinen anderer Organismen (in der Datenbank) als Aktin bestätigt. Der Translationsstart beginnt mit Methionin. Das Stopkodon [TAA] ist bei Position [+1129].

Das offene Leseraster zwischen Position [+1] und [+1129] zeigt außerdem, daß es kein Intron im kodierenden Bereich von Theileria-Aktin gibt.

4.8.3 Die Theileria-Aktin-cDNA

Die Nukleotidsequenz der Theileria-Aktin cDNA ist in Abbildung 22 im Vergleich zur genomischen Sequenz gezeigt. Bis auf 1 Nukleotid in Position [+1101] ergab die cDNA 100% Homologie zum entsprechenden Bereich der genomischen Sequenzen. Daraus kann geschlossen werden, daß die isolierte cDNA das Transkript des isolierten Aktin Gens ist. Der Unterschied in Position [+1101] bewirkt jedoch aufgrund der 'Wobble'-Position keine Änderung der Aminosäure Cytosin. Für 5 weitere isolierte cDNA-Klone konnte dieses Nukleotid bestätigt werden. Im genomischen Klon handelt es sich höchstwahrscheinlich um keinen Sequenzierfehler, da diese Region in beiden Richtungen sequenziert wurde.

Die *Theileria*-Aktin-cDNA hat 3' des Stopkodons eine Nichttranslatierte Region mit einer Länge von 37 Basen, an deren Ende die PolyA-Sequenz angehängt ist. Der Vergleich der cDNA mit der genomischen Sequenz ergab eine 100%-ige Homologie im entsprechenden Bereich und zeigt außerdem, daß der 3'-Nichttranslatierte Bereich durch keine Intronsequenz unterbrochen ist. Innerhalb dieser 37-Basenregion gibt es keine bekannte Sequenz, wie das Pentanukleotid [AATAAA], welches für das Schneiden der pre-mRNA und für das Anhängen der PolyA-Sequenzen eine essentielle cis-agierende Sequenz ist (Ryner et al., 1989).

Für die 37 Basen der 3'-Nichttranslatierten Region fanden sich keine Homologien zum 3'-Bereich anderer Aktin Gene.

Vom 3'-flankierenden Bereich wurden 1274 Basen sequenziert, Position [+1130-+2403], also bis zum 3'-Ende des 2,3 kb *AccI*-Fragmentes. Zu diesen Sequenzen konnten keine Homologien in der Datenbank zu anderen Organismen gefunden werden. Die 3'-flankierende Region besitzt mehrere offene Leseraster in beiden Orientierungen mit Längen von 20-50 Aminosäuren. Vergleiche dieser Aminosäuren mit der Datenbank ergaben jedoch keine Homologie zu anderen bekannten Proteinen.

Durch diesen Vergleich von Gen und cDNA war es möglich ein Intron im 5'-Nichttranslatierten Bereich nahe des Translationsstarts zu identifizieren. Das Intron befindet sich zwischen Position [-5] und [-100], hat eine Länge von 94 Basen und besitzt einen hohen AT-Gehalt von 74%. Im kodierenden Bereich befindet sich, wie bereits erwähnt, kein Intron, was durch den Gen/cDNA-Vergleich bestätigt wurde.

Betrachtet man die Sequenzen 3' und 5' der Intron-Spleißstellen, so kann man nicht exakt bestimmen, wo genau die Schnittstellen des Introns liegen. Dies soll die Darstellung in Abbildung 23 verdeutlichen. Theoretisch gibt es 3' sowie 5' vier mögliche Schnittstellen, an welchen das Intron ausgeschnitten werden könnte, da hier jeweils drei identische Sequenzen vorhanden sind. Bei Anwendung der bekannten GT-AG-Regel (Seif et al., 1979), die bisher für alle untersuchten Intronsequenzen bestätigt wurde, liegt die Schnittstelle des Introns 3' zwischen Position [-6/-5] und 5' zwischen Position [-100/-99].

4.9 Das Aktin-Gen zeigt in Säugerzellen keine eindeutige Promotoraktivität im 5' flankierenden Bereich des 1,2 kb AccI-Fragmentes

Die sequenzierte Aktin-cDNA hat einen 5'-Nichttranslatierten Bereich mit einer Länge von 131 Basen und besitzt, ebenso wie das Intron, einen hohen AT-Gehalt von 74%.

5' dieser Nichttranslatierten Region wurden 829 Basen des 5' flankierenden Bereichs bis zur 1,2 kb AccI-Schnittstelle sequenziert. Dieser 5'-flankierende Bereich besitzt einen noch höheren AT-Gehalt mit 88%, was die Sequenzierung erheblich erschwerte. Innerhalb dieser Region befinden sich 11 TATA-ähnliche Sequenzen.

Die Transkription von proteinkodierenden Genen steht unter der Kontrolle von Regulationssequenzen (Promotoren), die sich 5' von der Nichttranslatierten Region befinden. Dazu gehören sogenannte TATA- oder CAAT-Sequenzen, an die die RNA-Polymerase bindet.

Aufgrund der Häufigkeit dieser TATA-ähnlichen Sequenzen konnte die Bindestelle der Polymerase nicht ohne weiteres bestimmt werden.

Zunächst sollte geklärt werden, ob innerhalb dieser AT-reichen Region eine Promotoraktivität nachzuweisen ist. Dazu wurde ein Fusionsgen konstruiert, das die Sequenzen des 1,2 kb AccI-Fragments vor einem Indikatorgen enthielt. Bei diesem Indikatorgen handelt es sich um das bakterielle Chloramphenicoltransferase-Gen (CAT-Gen), dessen Genprodukt in einem Enzymtest einfach nachzuweisen ist.

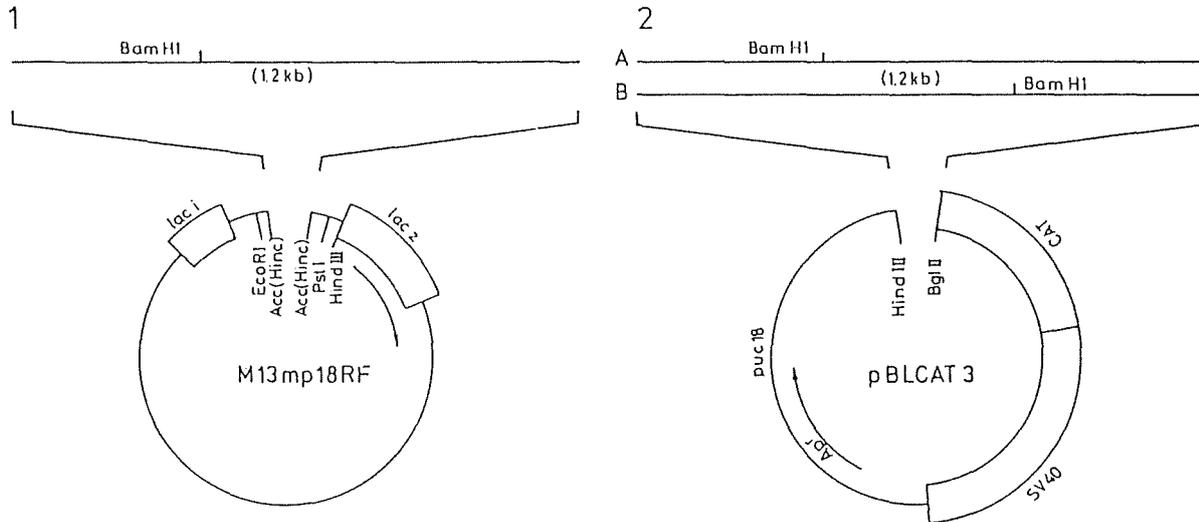
Es wurden zwei Fusions-Konstrukte hergestellt, die sich darin unterscheiden, daß die Orientierung des 1,2 kb AccI-Fragmentes zum CAT-Gen umgekehrt ist (Abb. 25). Diese beiden Konstrukte wurden beide, sowohl in HeLa-Zellen als auch in *Theileria parva*-infizierte Lymphozyten transient transfiziert. Als Kontrolle wurde ein Fusionskonstrukt, das unter der Kontrolle des SV40-Promotors steht (pSV₂CAT) und der pBLCAT-Vektor allein transfiziert.

Das Ergebnis zeigt fast keine CAT-Aktivität für das 5'-1,2 kb AccI-Fragment in beiden Zellarten im Vergleich zur Vektorkontrolle.

Das CAT-Konstrukt beinhaltet ca. 100 Basen der kodierenden Aktin Region. Die Wahrscheinlichkeit, daß durch diesen funktionellen Translationsstart des Aktin Gens im CAT-Gen ein Stopcodon entstehen und somit die Translation des CAT-Gens inhibieren könnte, ist auszuschließen, da sich das klonierte Fragment, nach Überprüfung der Klonierungsstelle, im Leseraster zum CAT-Gen befindet (s. Diskussion 5.5).

A.

1. M13mp18 RF (1,2 kb AccI-Fragment)
 - EcoRI/HindIII-Verdau
 - Klenow (Auffüllen von 5'-Überhängen)
 - Ligation in
2. pBLCAT3 präpariert:
 - HindIII/BglII-Verdau
 - Klenow (Auffüllen von 5'-Überhängen)



B.

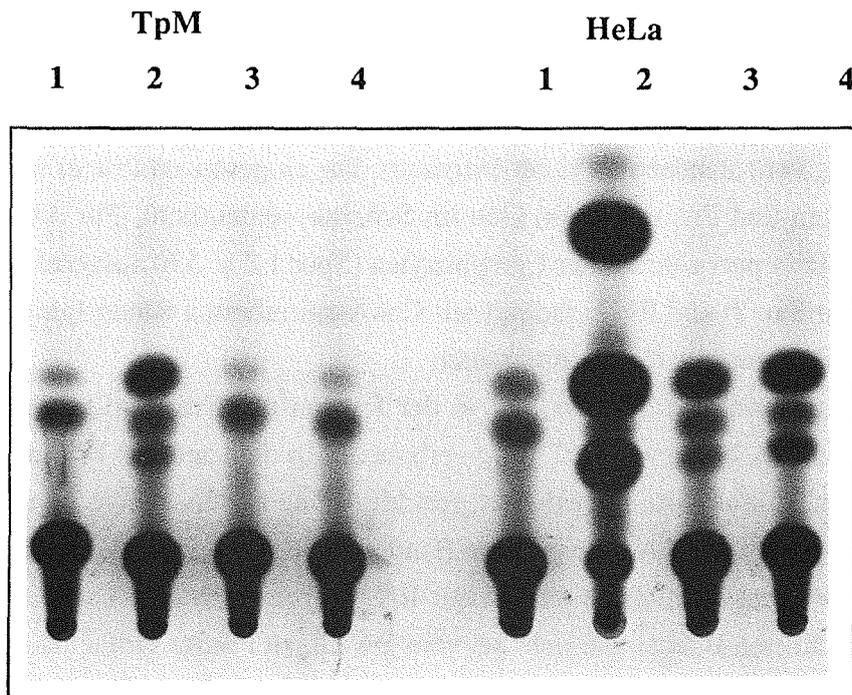


Abb.: 25

Abb. 25: A Subklonierung des 1,2 kb AccI-Fragmentes in den pBLCAT3-Vektor.
 B. CAT-Enzymtest. *Teileria parva* infizierte Lymphozyten und HeLa-Zellen wurden mit 10 µg DNA transient transfiziert und nach 36 Stunden geerntet. Im Proteinextrakt wurde die β-Galaktosidase Aktivität gemessen und eine standardisierte Proteinmenge für den CAT-Enzymtest eingesetzt. 1= pBLCAT3-Vektor; 2= pSV2CAT; 3= pBLCAT-Aktin in richtiger (2A) und 4= umgekehrter (2B) Orientierung.

Die nächstliegende Frage war, ob diese isolierte und sequenzierte Theileria-Aktin-cDNA vollständig ist? Im Northern-Blot wurde eine Transkriptlänge von etwa 1400 Basen kalkuliert. Die cDNA besitzt eine Länge von 1300 Basen, nicht gerechnet den PolyA-Schwanz und könnte vollständig sein. Dies wurde im Folgenden überprüft.

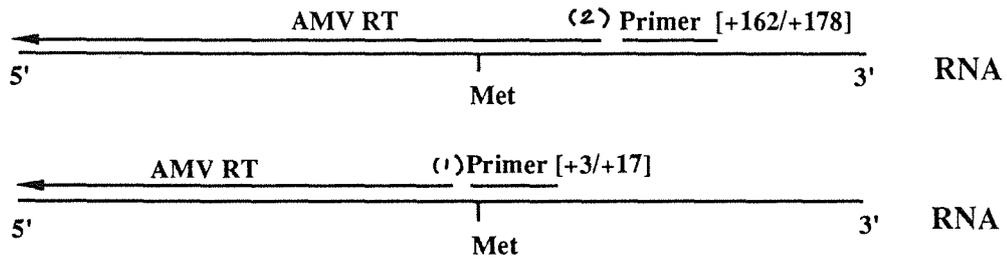
4.10 Transkriptionsstart der Theileria parva-Aktin mRNA

4.10.1 Bestimmung der Transkriptlänge von Theileria-Aktin

Um die korrekte Länge des Theileria-Aktin-Transkriptes zu ermitteln, wurde eine 'Primer Extension'-Analyse durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode entspricht der Synthese des ersten Strangs der cDNA bei der Herstellung einer cDNA-Bank mittels 'AMV Reverse Transkriptase'. Der Unterschied besteht nur darin, daß nicht ein universeller Primer benutzt wird, wie OligodT-Nukleotide, sondern ein Primer, der spezifische Sequenzen der gewünschten mRNA, wenn möglich im 5'-Bereich, besitzt. Von diesem Primer synthetisiert die AMV Reverse Transkriptase einen cDNA-Strang zum Anfang der mRNA.

Abbildung 26 zeigt die Primer Extension-Analyse. Es wurden 2 Oligonukleotide unabhängig voneinander als Primer eingesetzt. Die eingesetzten Primer sind unter Angabe ihrer Längen und Positionen im Gen im Schema verdeutlicht. Für die Analyse wurde RNA Theileria parva-infizierter Lymphozyten (Spur 1,2 u. 5,6), aufgereinigte Schizonten-RNA (Spur 3 u. 7) und RNA, isoliert aus ConA-stimulierten Rinderlymphozyten (Spur 4 u. 8), die als Kontrolle diente, eingesetzt.

Durch 'Extension' des Primers, der in der Region des Translationsstarts hybridisiert, wird eine cDNA-Länge von 187 Basen erhalten. Mit dem anderen Primer, welcher weiter 3' des Translationsstarts hybridisiert, resultiert eine cDNA-Länge von 346 Basen. Die Kontrolle der Rinder-RNA zeigt diese Banden nicht. Es zeigen sich zusätzliche Banden, von welchen aber die meisten der Rinder-RNA zuzuordnen sind. Daß die mit einem Pfeil gekennzeichneten Banden die richtige, vom jeweiligen Primer synthetisierte cDNA-Länge für Theileria-Aktin zeigen, wird durch die starke Bande der aufgereinigten Schizonten-RNA bekräftigt. In der aufgereinigten Schizonten-RNA ist der Anteil an Rinder-RNA im Vergleich zu RNA, die aus infizierten Lymphozyten isoliert wurde, nämlich wesentlich



M 1 2 3 4 5 6 7 8

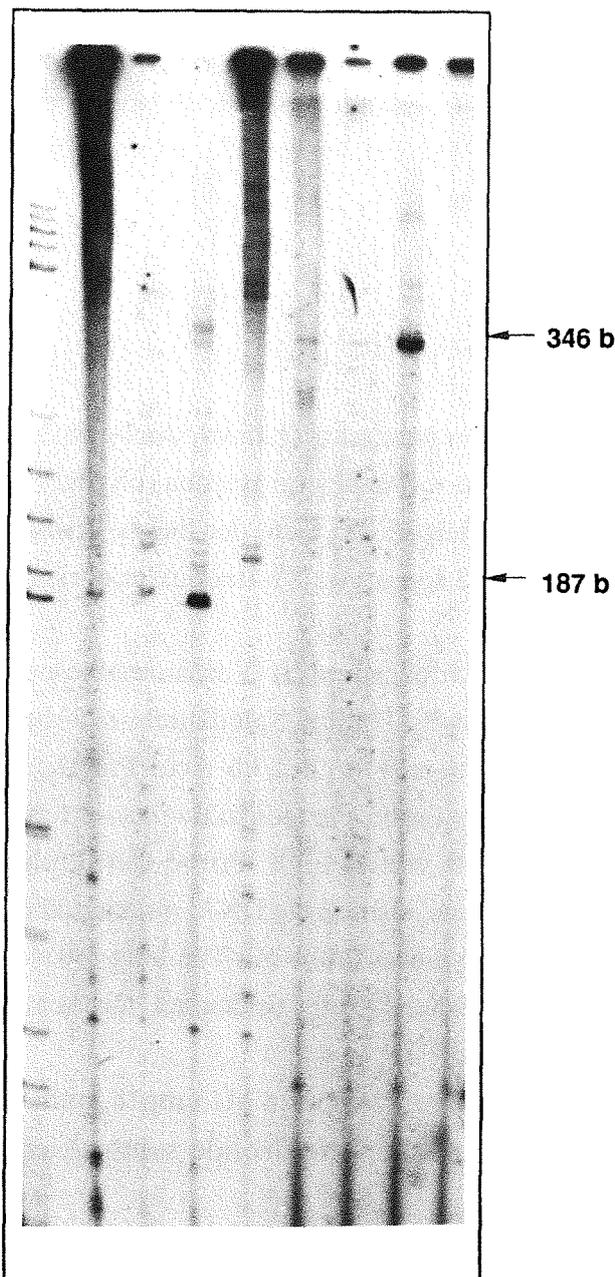


Abb. 26: Oben rechts ist das Prinzip der Primer Extension-Analyse verdeutlicht. Es wurden 2 verschiedene Primer eingesetzt, die Sequenzen des Aktin Gens besitzen und mit der mRNA hybridisieren konnten. Durch AMV Reverse Transkriptase wurde unter Einbau radioaktiver Nukleotide somit eine cDNA zum Anfang der Aktin-mRNA synthetisiert.

In Spur 1 bis 4 wurde Primer (1) und in Spur 5 bis 8 Primer (2) eingesetzt.

Spur 1 u. 5: 10 µg Gesamt-RNA aus T.P.-infizierten Lymphozyten.

Spur 2 u. 5: 1 µg PolyA-RNA aus T.p.-infizierten Lymphozyten.

Spur 3 u. 7: 1 µg Gesamt-RNA aus angereicherten Schizonten.

Spur 4 u. 8: 10 µg Gesamt-RNA aus ConA-stimulierten Rinderlymphozyten.

niedriger und somit ist im Verhältnis mehr Theileria-RNA vorhanden (Gerhards et al., 1989).

Kalkuliert man von der jeweiligen Position im Gen, so resultiert eine identische Transkriptlänge. Subtrahiert man das durch Sequenzierung ermittelte Intron im 5'-Nichttranslatierten Bereich, so müßte der Transkriptionsstart bei Position [-278] liegen. Addiert man hierzu die Anzahl der Nukleotide, die von der Primer-Position bis zum PolyA-Schwanz sequenziert wurde, ergibt sich für die Theileria-Aktin mRNA (ohne PolyA-Sequenzen) eine Länge von 1355 Basen. Dies bedeutet, daß der sequenzierten cDNA 50 Basen fehlen.

Als nächstes war nun zu prüfen, ob der errechnete Transkriptionsstart, der durch die Primer-Extension-Analyse ermittelt wurde, auch tatsächlich bei der kalkulierten Position [-278] liegt. Dazu wurde eine S1-Analyse durchgeführt.

4.10.2 S1-Analyse

Mit einer S1-Analyse sollte der durch Primer Extension ermittelte Transkriptionsstart der Theileria-Aktin mRNA überprüft werden. Außerdem sollte gezeigt werden, ob das 5'-Ende der Theileria-mRNA zum entsprechenden 5'-Bereich im Gen, der durch 'Primer Extension'-Analyse ermittelt wurde, homolog ist und somit von S1-Exonuklease nicht verdaut werden kann.

Nach Endmarkierung des 1,2 kb-Fragment und anschließendem S1-Verdau müßte nur das 118 Basen-Fragment von der AccI-Stelle bis zur 3'-Intron-Spleißstelle sichtbar werden. Da sich keine geeignete Restriktionsschnittstelle im 1,2 kb AccI-Fragment befindet, die sich endmarkieren ließ, mußte eine andere Probe, die radioaktiv markiert mit der RNA hybridisiert, gefunden werden. Deshalb wurde eine 'Prime-Cut'-Probe synthetisiert. Mit dieser Methode war es möglich eine einzelsträngige DNA, markiert über die gesamte Länge, zu erhalten. Durch Hybridisierung dieser Probe mit Theileria-mRNA und anschließendem S1-Verdau hätte somit auch der Bereich 5' des bekannten Introns auf dem Röntgenfilm sichtbar werden müssen.

Die 'Prime-Cut'-Probe wurde vom 1,2 kb AccI-Fragment, kloniert in M13 mp18, mittels Polymerase I (Klenow) unter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide synthetisiert,

anschließend mit EcoRI verdaut, in einem denaturierenden Acrylamid Gel aufgetrennt und ausgeschnitten. Dadurch war sichergestellt, daß nur einzelsträngige DNA mit der Länge von 1,2 kb isoliert wurde (s. auch 3.7.3).

Abbildung 27 zeigt im Schema das Prinzip der Methode und das Autoradiogramm der aufgetrennten markierten DNA.

Die gereinigte, markierte 1,2 kb AccI 'Prime-Cut'-Probe wurde mit Gesamt-RNA und PolyA-RNA, isoliert aus *Theileria parva*-infizierten Lymphozyten hybridisiert und S1-verdaut. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA, isoliert aus ConA-stimulierten Rinderlymphozyten.

Abbildung 28 zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten S1-Verdaus. In Spur 1 und 2 sind für *Theileria* zwei Banden mit einer Länge von 118 und 127 Basen zu erkennen. Spur 4 zeigt für Rinder-RNA keine Signale. Die Bande mit 118 Basen besitzt die Länge des Fragmentes von der AccI-Stelle bis zur 3' Intron-Spleißstelle im Aktin-Gen (s. Abb 23).

Die zweite Bande zeigt ein Fragment mit der Länge von 127 Basen. Überträgt man diese Größe auf den Genbereich, so endet das Fragment bei Position [-226]. Der in 4.10.1 rechnerisch ermittelte Transkriptionsstart würde aber 51 Basen 5' weiter entfernt bei Position [-278] liegen. Falls dieser Start richtig wäre, hätte das zweite S1-Signal eine Größe von 175 Basen ergeben müssen, was heißt, daß der Transkriptionsstart nicht bei Position [-278] liegen kann. Ein drittes Fragment mit einer Größe von etwa 50 Basen konnte auch in anderen S1-Analysen nicht entdeckt werden, da unterhalb von 60 Basen nur ein Schmier und keine Bande zu sehen war.

Analysiert man den 5'-flankierenden Bereich von Position [-226] ab, so finden sich anhand der GT-AG-Regel noch weitere Sequenzen, die auf weitere Introns schließen lassen und in Abbildung 21 umrahmt gezeigt sind. Eine 3' Intron-Spleißstelle befindet sich 8 Basen 5' entfernt in unmittelbarer Nachbarschaft der durch S1-Analyse ermittelten Position [-226].

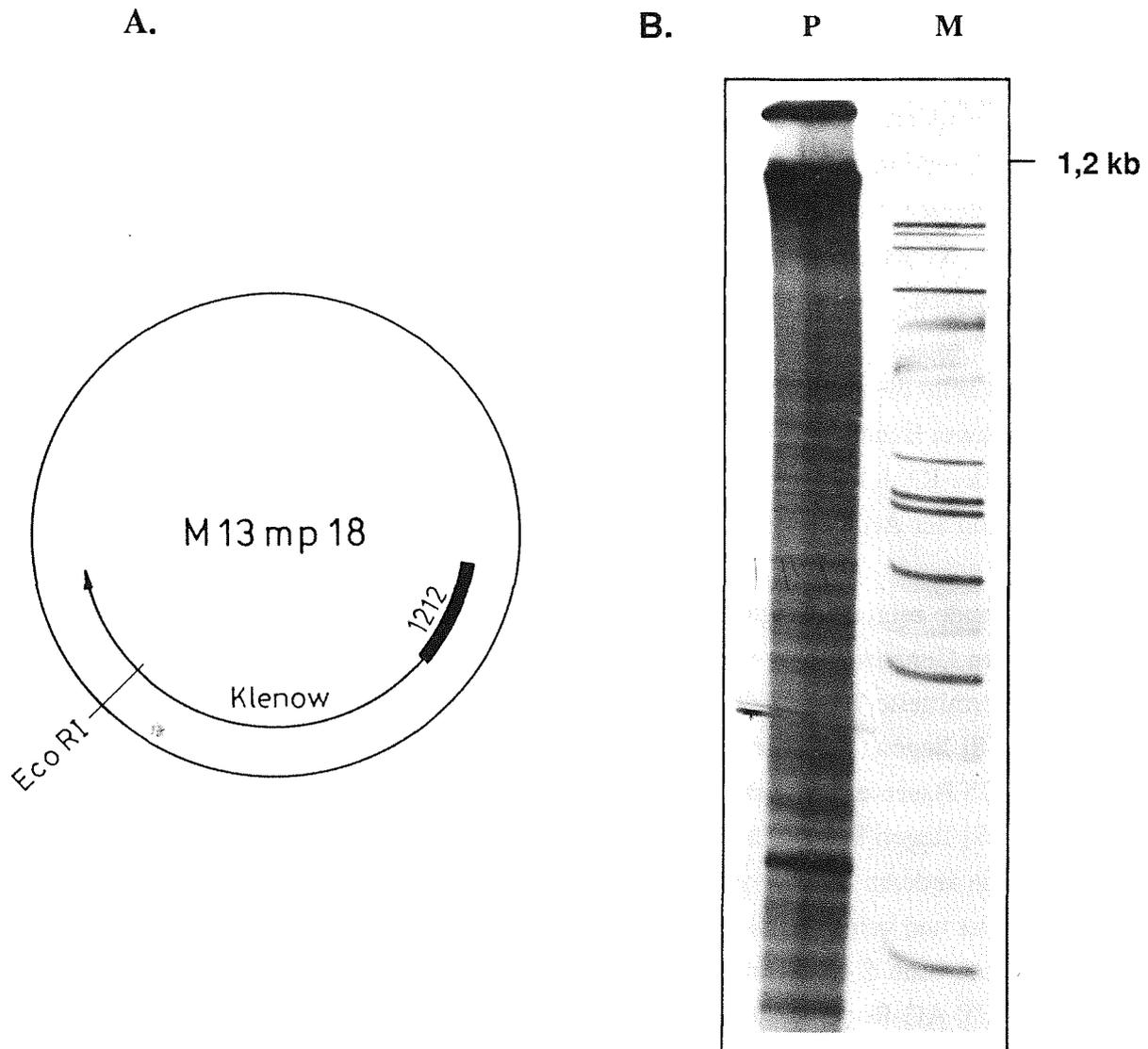


Abb. 27: A. Gezeigt ist das Prinzip der 'Prime Cut'-Probe. Mittels eines synthetischen Primers, der vor der multiplen Klonierungsstelle des M13-Vektors hybridisiert, wurde unter Einbau von radioaktiven Nukleotiden eine komplementäre DNA durch Polymerase I (Klenow) synthetisiert, die antisense zur mRNA war. Danach wurde die (teilweise) doppelsträngige DNA mit einem Restriktionsenzym (hier: EcoRI) verdaut, das nur eine Schnittstelle nach dem Insert besitzt. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf 100 °C erhitzt und über ein 6% Polyacrylamid/Harnstoff Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach kurzer Autoradiographie wurde die 1,2 kb-Bande lokalisiert und ausgeschnitten. M=Marker DNA pBR322, HaeIII-verdaut und endmarkiert. Markergrößen: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 219, 192, 189, 124, 104, 89, 80, 64, 57 Basen.

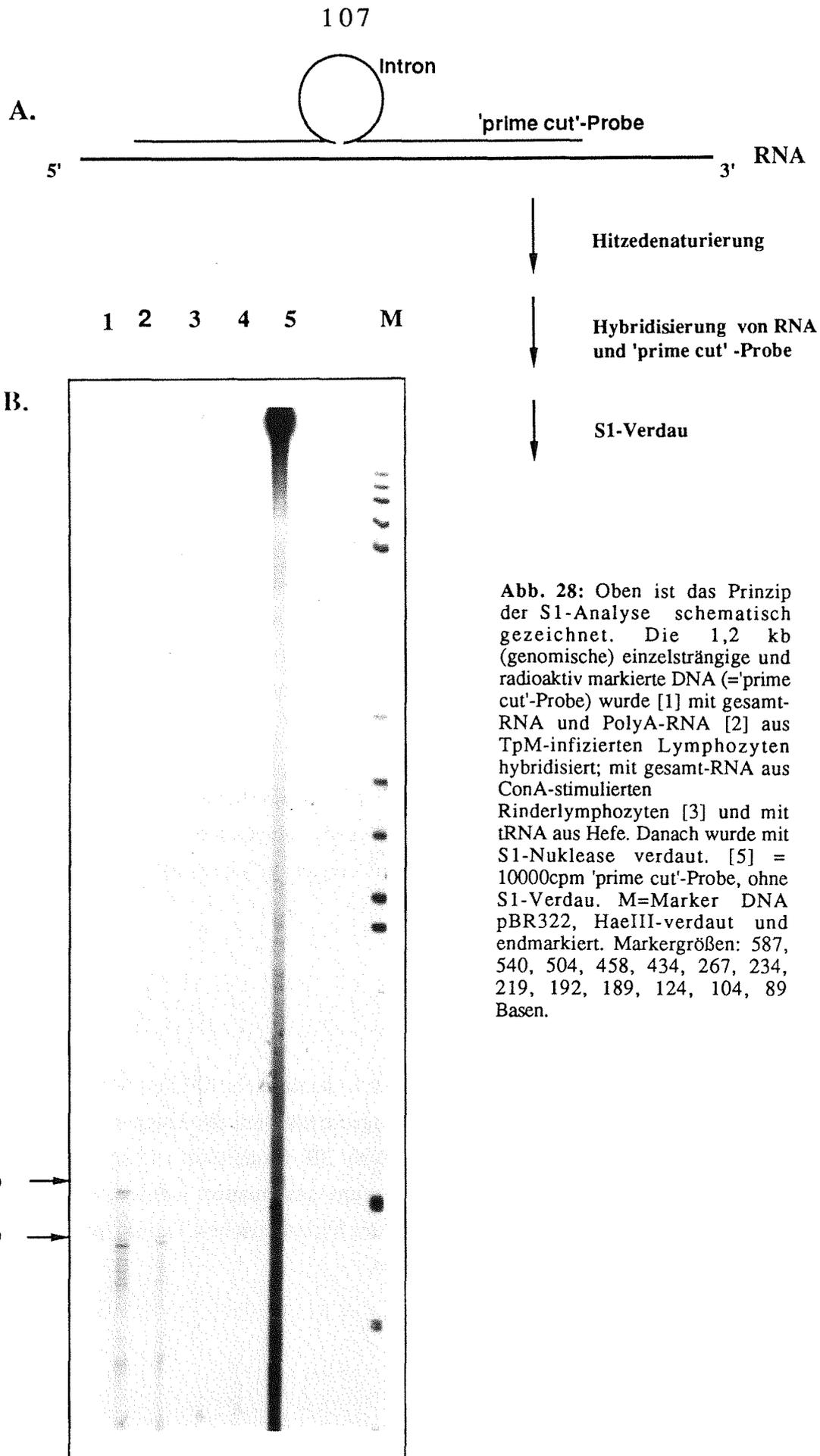


Abb. 28: Oben ist das Prinzip der S1-Analyse schematisch gezeichnet. Die 1,2 kb (genomische) einzelsträngige und radioaktiv markierte DNA (= 'prime cut'-Probe) wurde [1] mit gesamt-RNA und PolyA-RNA [2] aus TpM-infizierten Lymphozyten hybridisiert; mit gesamt-RNA aus ConA-stimulierten Rinderlymphozyten [3] und mit tRNA aus Hefe. Danach wurde mit S1-Nuklease verdaut. [5] = 10000cpm 'prime cut'-Probe, ohne S1-Verdau. M=Marker DNA pBR322, HaeIII-verdaut und endmarkiert. Markergrößen: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 219, 192, 189, 124, 104, 89 Basen.

4.10.3 Isolierung weiterer Theileria-Aktin-cDNA-Klone

Um die bisherigen Ergebnisse über das 5'-Ende der Theileria-Aktin-mRNA zu überprüfen, wurden weitere Aktin cDNA-Klone isoliert. Diesesmal konnte eine cDNA-Bank abgesucht werden, die aus mRNA aufgereinigter Schizonten von Theileria parva-infizierten Lymphozyten von J. Gerhards (IGT) hergestellt wurde.

Um möglichst vollständige Aktin cDNA-Klone zu erhalten, wurde hier mit einem Oligonukleotid hybridisiert, welches im Translationsstart des Aktins hybridisiert. Von 9×10^5 Phagen hybridisierten 6 Klone. Diese wurden in M13 umklont und von beiden Enden sequenziert. Die Sequenzen der 3'-Enden stimmten mit der bereits sequenzierten cDNA überein. Es konnten zwar längere cDNA-Klone isoliert werden, jedoch erreichte keine cDNA die durch 'Primer Extension'-Analyse errechnete Länge. Dem längsten cDNA-Isolat fehlten demnach noch immer 50 Basen (Abb. 29).

In Tabelle 2 sind die Sequenzen der 5'-Enden der isolierten Aktin cDNA's gezeigt. Bis auf eine cDNA {6} (Abb. 29) stimmen diese mit der Gen-Sequenz überein (Abb. 21 u. 23). Bemerkenswert ist, daß die längste cDNA {1} bei der Position im entsprechenden Genbereich endet, dem auch das 127 Basen-Fragment der S1-Analyse entspricht (Position [-226]).

Zuletzt bleibt noch die Frage, ob das mit cDNA {6} isolierte unterschiedliche 5'-Ende in der Theileria-Aktin-mRNA vorhanden ist. Ist es eine sogenannte 'Leader'-Sequenz, wie man sie bei Trypanosomen und Caenorhabditis elegans gefunden hat? Dies sollte mit der folgenden Analyse getestet werden.

4.10.4 'Polymerase Chain Reaction'

Mit dieser Methode (PCR) ist es möglich selbst 1 Genkopie in 10^6 Zellen zu amplifizieren (Nakamaye, et al., 1988). Die PCR wurde angewendet, um die Frage zu klären, ob das unterschiedliche 5'-Ende von cDNA {6} (Abb. 29) tatsächlich auf der Aktin mRNA existiert. Ferner sollte das S1-Ergebnis insofern untermauert werden, indem gezeigt werden sollte, daß Sequenzen in der Region des hypothetischen Transkriptionsstarts vor Position [-278] nicht auf der mRNA existieren.

In Abbildung 30A ist das Prinzip der PCR-Methode schematisch dargestellt. In Abbildung 30B sind die synthetischen Oligonukleotide aufgelistet, die für die Reaktion verwendet wurden. Als Reaktionskontrolle diente Lambda-DNA, die mit geeigneten Primern amplifiziert wurde (30B-4 und 30C-4a,b). Als Kontrolle für Theileria-Aktinsequenzen diente ein bereits sequenzierter und bestätigter Sequenzbereich der kodierenden Region zwischen Position [+345] und [+791] (Abb. 30B-3 und C-3a,b). In beiden Spuren, 3a und 3b, erkennt man deutlich den amplifizierten Bereich der kodierenden Region mit einer Länge von etwa 450 Basen. Somit war sichergestellt, daß sowohl die Reaktionsbedingungen, als auch die eingesetzte Theileria-Gesamt-RNA-Menge richtig gewählt war, um spezifische Bereiche amplifizieren zu können.

Bei Verwendung der in cDNA {6} (Abb. 29) unterschiedlichen Sequenz (hier komplementär zur mRNA, Abb. 30 B-1 und C-1) und der durch 'Primer Extension'-Analyse kalkulierte 5'-Sequenz des entsprechenden genomischen Bereichs (Abb. 30 B-2 und C-2) als Primer wurde keine Amplifikation erhalten. Wären diese Sequenzen auf der mRNA vorhanden, so hätten diese Bereiche, ebenso wie die der kodierenden Region, amplifiziert werden müssen. Aufgrund dieses Ergebnisses kann angenommen werden, daß diese beiden Sequenzen nicht auf der mRNA existieren.

Die Sequenzierung des 5'-Endes von cDNA {6} (Abb. 29) zeigte eine 27 Basen lange Sequenz, die nicht auf der genomischen Region als Sequenzfolge zu finden war. Durch eine Computeranalyse des 1,2 kb AccI-Fragmentes und der cDNA konnten diese 27 Basen als Teil einer inversen Sequenz von Position [-151] und [-179] identifiziert werden. Solche sogenannten 'rearrangements' wurden bisher in einigen Fällen berichtet und sind Artefakte der AMV Reversen Transkriptase bei der Synthese des 1. Stranges der cDNA. (Fields & Winter 1981; Volkaert et al., 1981; Vodjani et al., 1985; Reddy & Rao 1985). Zusammen mit dem Ergebnis der PCR-Analyse, kann daher angenommen werden, daß es sich bei diesen 27 Basen am 5'-Ende der cDNA {6} um ein 'rearrangement' handelt.

Hier sollen noch einmal kurz die Ergebnisse dieses Kapitels (4.10) zusammengefaßt werden:

Die *Theileria*-Aktin-mRNA hat eine Länge von 1355 Basen, was durch 'Primer Extension'-Analyse ermittelt wurde. Die S1-Analyse zeigte ein um ca. 50 Basen kürzeres Fragment, was darauf hindeutet, daß es ein zweites Intron geben könnte. Der längsten cDNA, die isoliert werden konnte, fehlen diese 50 Basen ebenfalls. Der durch 'Primer Extension'-Analyse errechnete Transkriptionsstart und das unterschiedliche 5'-Ende der cDNA {6} existieren mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf der Aktin-mRNA (s. Diskussion 6.5). Eine Analyse der Gen-Sequenzen des 5'-flankierenden Bereichs zeigte unmittelbar 5' der Position, bei welcher das Fragment des S1-Verdaus endet, die nächste 3'-Spleißstelle für ein Intron (umrahmt gezeigt in Abb. 21).

-184

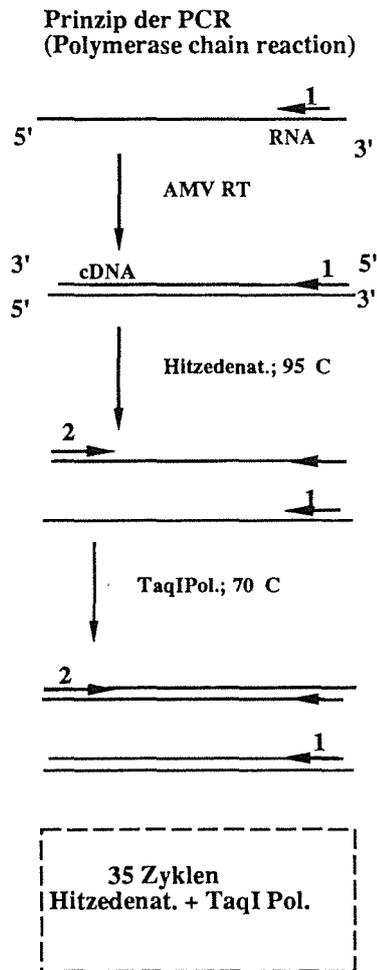
```

5'   ACTAATTATATTTTTCTTCACTGACAGATAAGCTAAAAGCAA.....3' [1]
5'           CTTCACTGACAGATAAGCTAAAAGCAA.....3' [2]
5'           ACTGACAGATAAGCTAAAAGCAA.....3' [3]
5'           ACTGACAGATAAGCTAAAAGCAA.....3' [4]
5'           AGATAAGCTAAAAGCAA.....3' [5]
5'   AACATAATTTACAGAGTTTAACTTTTTAGATAAGCTAAAAGCAA.....3' [6]
*****

```

Abb. 29: Es wurden 6 unabhängige Tp-Aktin cDNA-Klone isoliert, in M13-Vektoren umklontiert und deren 5' Enden sequenziert. Gezeigt sind die Sequenzen der 5'-Enden der isolierten cDNA-Klone. Sequenzen, die nicht homolog zur entsprechenden Sequenz im Aktin Gen sind, wurden mit * gekennzeichnet. (-184) kennzeichnet die Position im Aktin Gen.

A.



B.

- 1) Primer 1 (15mer), 5' CAGACTGCTTCTCTG 3' antisense, Position im Gen: [+3 / +17]
Primer 2 (20mer), 5' CATAATTTACAGAGTTTAAC 3' sense zum 5'-Ende von cDNA No.6
- 2) Primer 1
Primer 3 (17mer), 5' TGTGTATGGCGTTTTTA 3' sense, Position im Gen: [-273 / -257]
- 3) Primer 4 (17mer), 5' GAGCACTTCAGGACACC 3' antisense, Pos. im Gen: [+791 / +806]
Primer 5 (18mer), 5' CCCATGAACCCCAAGGCC 3' sense, Position im Gen: [+328 / +345]
- 4) Lambda Primer als Kontrolle für TaqI Polymerase (Perkin Elmer Cetus)

C.

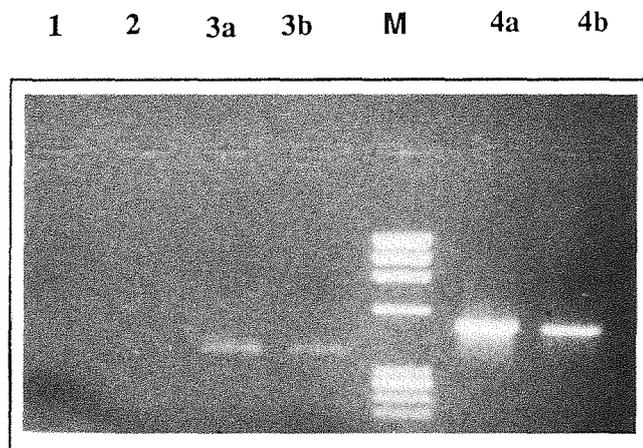


Abb.: 30.A. Gezeigt ist im Schema das Prinzip der PCR. Der erste cDNA-Strang wird von RNA mittels AMV-Reverse Transkriptase synthetisiert. Die Stränge werden durch Hitzedenaturierung getrennt und das Reaktionsgemisch auf 70 °C abgekühlt. Die Primer hybridisieren zu den komplementären Sequenzen und TaqI Polymerase synthetisiert in 5'-Richtung den neuen DNA-Strang. Danach werden die DNA-Stränge wieder bei 95 °C getrennt und wieder auf 70 °C abgekühlt usw..Um eine optimale Amplifikation der gewünschten Sequenzen zu erhalten, müssen 30-35 Zyklen wiederholt werden. B. Als Primer wurden synthetisierte Oligonukleotide eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, daß sie die zu amplifizierende Sequenz im 3'- und 5'-Bereich eingrenzen und jeweils komplementär zur begrenzenden DNA- bzw. RNA-Sequenz sind. Die zu amplifizierenden Bereiche sind unter 1) - 4) angegeben. C. Ein fünftel des Volumens der PCR wurde auf ein 1,4% Agarose Minigel geladen und bei 80 V aufgetrennt. 1 - 4 zeigen die amplifizierten Sequenzbereiche, beschrieben in B. [1)-4)]. Von 2 µg gesamt TpM RNA wurde mittels AMV-Reverse Transkriptase der 1. cDNA-Strang synthetisiert. In 1, 2, 3a wurden davon 500 ng, in 3b 100 ng für die PCR eingesetzt. In 4a wurden 100 pg und in 4b 10 pg Lambda DNA als Kontrolle für die PCR verwendet. M=Marker-DNA ØX174, geschnitten mit HaeIII. Markergrößen: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 bp.

4.11 Das Theileria-Aktin-Protein

Abbildung 31 A/B zeigt die Aminosäuresequenz des Theileria-Aktins. Das Protein hat eine Länge von 376 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 42 kD. Die Aminosäuresequenz wurde über das offene Leseraster der Nukleotidsequenz des Aktin-Gens ermittelt. Das Aktin-Protein von Theileria stimmt mit einer Länge von 376 Aminosäuren gut mit Aktinen anderer Organismen überein. In Tabelle 2 sind die Aktin-Aminosäurehomologien aufgeführt. Im Vergleich zu den Nukleinsäurehomologien liegen diese im Schnitt 10% höher.

| | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Mensch: α -Muskel-Aktin | 82% (Hanauer et al., 1983) |
| Maus: α -Muskel-Aktin | 82% (Hu et al., 1983) |
| Hühnchen: α -Muskel-Aktin | 82% (Chang et al., 1985) |
| Hühnchen: β -Aktin | 82% (Kost et al., 1983) |
| Seeigel | 81% (Cooper & Crain, 1982) |
| Drosophila | 79% (Fyrberg et al., 1981) |
| Dictyostelium | 82% (Romans & Firtel 1982) |
| Tetrahymena | 80% (Cupples & Pearlman 1986) |
| Hefe: | 77% (Ng & Abelson 1980) |
| Plasmodium falciparum | 85% (Wesseling et al., 1988) |

Tab.2: Gezeigt sind Homologien der Aminosäuresequenzen von Theileria parva-Aktin im Vergleich zu anderen Organismen.

Die extrem niedrige Nukleinsäurehomologie und die hohe Aminosäurehomologie von Theileria- zu Plasmodium-Aktin erklärt sich durch die verwendeten Codons bei Plasmodium. Dieser Parasit benutzt nur 35-40 der 64 Codons für sein Aktin-Protein. Darüberhinaus besitzt dieser Malaria-Erreger einen AT-Gehalt von 85% in der 3. Base der verwendeten Codons, während Theileria eine leichte GC-Präferenz von 58% in den 'Wobbles' zeigt.

Die zytoklelettalen Aktine der Vertebraten unterscheiden sich von den muskelspezifischen Isoformen in 22-25 Aminosäure-Positionen (Vandkerckhove & Weber 1979). Diese

spezifischen Aminosäuren wurden bisher für alle Vertebraten Aktine, sowohl für den α -Muskeltyp als auch für den β -zytoplasmatischen Typ bestätigt.

Um herauszufinden, ob Theileria-Aktin dem zytoplasmatischen oder dem muskulären Aktintyp zuzuordnen ist, wurden diese diagnostischen Aminosäuren der Vertebraten mit den entsprechenden Aminosäuren im Theileria Aktin-Protein verglichen.

In Tabelle 3 sind die diagnostischen Aminosäurepositionen einiger Organismen, einschließlich Theileria, im Vergleich zu den Vertebraten-Aktinen der α -muskulären und β -zytoplasmatischen Isoform gezeigt. An Position 11 besitzt Theileria-Aktin Valin, eine Aminosäure, die für den zytoplasmatischen Typ charakteristisch ist, während Position 18 z.B. mit Valin für das Muskel-Aktin spezifisch ist.

Acht von 20 diagnostischen Aminosäuren zeigen für Theileria die zytoplasmatische Isoform und 7 den β -Muskeltyp. Theileria-Aktin steht daher dem zytoplasmatischen Typ etwas näher als dem Muskel-Aktin. An 5 Positionen entspricht das Protein weder der zytoplasmatischen noch der muskulären Isoform. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich jedoch meist um konservative Aminosäure-Austausche, wie z.B. Thr \rightarrow Val, welche funktionell nicht signifikant sind und keine Konformationsänderung des Proteins bewirken.

Andere niedere Organismen, wie Hefe und Dictyostelium entsprechen weitaus mehr der zytoplasmatischen Isoform der Vertebraten als es für Plasmodium, Tetrahymena und Theileria der Fall ist. Auffallend ist, daß für Plasmodium und Theileria 14 dieser diagnostischen Aminosäuren identisch sind.

Tabelle 4 zeigt einen Vergleich von hochkonservierten Aminosäuren im Aktin-Protein. In allen untersuchten und hier nicht aufgeführten Aktin-Proteinen sind diese in der Tabelle gezeigten kurzen Proteinregionen sowohl im zytoplasmatischen als auch im muskulären Typ unverändert vorhanden. Abweichungen hierzu sind in Tabelle 4 gezeigt.

Bei Theileria ist keine Aminosäure dieser hochkonservierten Regionen erhalten geblieben. Ähnlich, wenn auch nicht ganz so abweichend, zeigen sich die Aminosäuren von Plasmodium entsprechender Regionen. Bemerkenswert ist, daß selbst ein Einzeller wie Hefe nur einen Aminosäure-Austausch bei Position 44 zeigt. Dictyostelium und sogar die parasitisch lebende Amöbe *Entamoeba histolytica* (Huber et al., 1987) besitzen keine Veränderungen.

| Aminosäure | Muskel Aktin | Cytopl. Aktin | Hefe | Tetra- hymena | Dictyo- stelium | Soja- bohne | Droso- phila | See- igel | Plas- modium | T. parva |
|------------|--------------|---------------|------|------------------|--------------------|----------------|-----------------|--------------|-----------------|----------|
| 11 | Cys | Val | c | c | c | m | c | c | c | c |
| 17 | Leu | Met | c | c | c | c | c | c | Asn | Asn |
| 18 | Val | Cys | c | c | c | m | c | m | m | m |
| 77 | Ile | Val | c | c | c | c | m | c | c | c |
| 104 | Thr | Val | c | Cys | c | nd | c | c | c | c |
| 130 | Val | Thr | m | m | c | m | Ser | Ser | m | m |
| 154 | Leu | Met | m | Val | c | m | m | Phe | m | m |
| 163 | Asn | Thr | Val | c | c | c | c | c | c | c |
| 177 | Met | Leu | c | c | c | c | c | c | m | m |
| 202 | Val | Thr | Ser | Ser | c | c | c | c | Ser | c |
| 226 | Asn | Gln | c | Ala | Ala | c | c | c | GIU | GIU |
| 261 | Thr | Ala | c | Leu | c | Ile | c | c | c | Val |
| 268 | Ile | Leu | c | m | c | m | c | c | c | m |
| 273 | Ala | Cys | m | Pro | m | m | c | m | m | Phe |
| 280 | Tyr | Phe | m | c | m | m | m | m | c | m |
| 288 | Ile | Val | c | c | c | c | c | c | c | c |
| 298 | Asn | Thr | Ile | Ile | Val | Ile | m | c | Ile | Val |
| 300 | Met | Leu | m | c | c | c | c | c | c | c |
| 359 | Thr | Ser | c | m | c | c | c | c | m | m |
| 366 | Ala | Ser | c | c | c | c | c | c | c | c |

Tab. 3: Vergleich von Aminosäurepositionen von einigen AktinProteinen. Diese Aminosäuren sind spezifisch für α -Muskel Aktin (m) bzw. β -zytoskelettales Aktin (c) aller Vertebraten. (c) oder (m) bedeutet, daß diese Aminosäure entweder dem muskulären oder dem Zytoskelettalen Isotyp entspricht. Abweichungen sind als Aminosäuren im 3-Bustaben-Code eingetragen. Für Literatur siehe Tab. 2. Nach Vandekerckhove & Weber 1984).

Die Ergebnisse aus Tabelle 3 und 4 zeigen, daß Theileria einen sehr abweichenden Aktintyp besitzt und dem Malariaerreger Plasmodium in der Konservierung der Aminosäuren seines Aktin Proteins sehr nahe steht. Dies läßt vermuten, daß diese Parasiten sich vor der Entwicklung der höheren Organismen in der Evolution abgezweigt haben.

| | | | | | | |
|-----------------------------|------|------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----|
| 40 | Arg | = | Lys | = | Lys | Lys |
| 41 | His | = | Met | = | Asn | Asn |
| 42 | Gln | = | Pro | Thr | Pro | Pro |
| 43 | Gly | = | = | = | = | Ala |
| 44 | Val | Ile | Ile | = | Ile | Ile |
| 188 | Asp | = | Glu | = | Glu | Glu |
| 189 | Tyr | = | = | His | = | Phe |
| 190 | Leu | = | Cyt | = | = | Met |
| 191 | Met | = | = | = | = | Gln |
| 231 | Ala | = | Tyr | = | Ser | Ser |
| 232 | Ala | = | Lys | Lys | Glu | Ser |
| Konservierte Aminosäuren | Hefe | Tetra- hymena | Soja- bohne | Plas- modium | Theileria parva | |

Tab. 4: Gezeigt sind Aminosäureregionen, die in allen hier nicht aufgeführten Aktin Proteinen anderer Organismen hochkonserviert sind. (=) bedeutet, daß diese Aminosäure für den betreffenden Organismus einer konservierten Aminosäure entspricht. Abweichungen sind durch die entsprechende Aminosäure im 3-Buchstaben-Code aufgeführt. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf das Theileria parva Aktin Protein. Für Referenzangaben siehe Abbildungstext Tabelle 3.

Abb. 31(B): Aminosäuresequenz und Nukeoditsequenz von
Theileria parva Aktin

ATGTCTGACGAAGAGACTACTGCTTTAGTTGTGGACAATGGTTCGGAAACGTTAAGGCA
 MetSerAspGluGluThrThrAlaLeuValValAspAsnGlySerGlyAsnValLysAla

 GGTTTCGCCGGTGATGACGCCCCAGGTGCGTTTTCCCGAGCATTGTCGGTAGACCGAAA
 GlyPheAlaGlyAspAspAlaProArgCysValPheProSerIleValGlyArgProLys

 AATCCAGCACTCATGGTTGGAATGGACGAAAAGGATACCTATGTAGGTGACGAGGCGCAA
 AsnProAlaLeuMetValGlyMetAspGluLysAspThrTyrValGlyAspGluAlaGln

 TCCAAAAGGGGTATCTTGACCCTCAAATATCCTATTGAACACGGTATCGTTACGAATTGG
 SerLysArgGlyIleLeuThrLeuLysTyrProIleGluHisGlyIleValThrAsnTrp

 GAAGATATGGAGAAAATCTGGCATCATACCTTCTACAATGAAC TAAGGATTGCACCTGAG
 GluAspMetGluLysIleTrpHisHisThrPheTyrAsnGluLeuArgIleAlaProGlu

 GAACACCCGGTTCTCTTGACAGAAGCTCCCATGAACCCCAAGGCCAATCGTGAGAAGATG
 GluHisProValLeuLeuThrGluAlaProMetAsnProLysAlaAsnArgGluLysMet

 ACCACTATCATGTTGAGACCCACAATGTGCCAGCCATGTATGTTGCAATCCAGGCCGTA
 ThrThrIleMetPheGluThrHisAsnValProAlaMetTyrValAlaIleGlnAlaVal

 CTATCACTTTACTCCTCGGGAAGAACTACCGGTATTGTGCTCGACTCTGGAGATGGTGTC
 LeuSerLeuTyrSerSerGlyArgThrThrGlyIleValLeuAspSerGlyAspGlyVal

 ACCCACA CTGTGCCATCTACGAAGGTTACGCGCTTCCTCATGCGATCATGAGACTCGAT
 ThrHisThrValProIleTyrGluGlyTyrAlaLeuProHisAlaIleMetArgLeuAsp

 TTGGCCGGAAGAGACTTGACTGAGTTCATGCAGAAGATTCTGGTTGAACGTGGATTCTCT
 LeuAlaGlyArgAspLeuThrGluPheMetGlnLysIleLeuValGluArgGlyPheSer

 TTCACCACCACCGCTGAGAAGGAGATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGTTGTGCTACATT
 PheThrThrThrAlaGluLysGluIleValArgAspIleLysGluLysLeuCysTyrIle

 GCCCTCGACTTCGACGAGGAAATGACCACCTCATCATCATCCGAAGTTGAGAAGTCA
 AlaLeuAspPheAspGluGluMetThrThrSerSerSerSerSerGluValGluLysSer

 TACGAGTTGCCAGACGGTAACATCATAACAGTTGGAAACGAAAGGTT CAGGTGTCCTGAA
 TyrGluLeuProAspGlyAsnIleIleThrValGlyAsnGluArgPheArgCysProGlu

 GTGCTCTTCCAGCCACCTTCATCGGTATGGAGGCCCTGGAATCCACACCACCACCTAC
 ValLeuPheGlnProThrPheIleGlyMetGluAlaProGlyIleHisThrThrThrTyr

 AACTCAATTGTTAGATGTGACGTGGACATTAGGAAGGATCTTTATGCCAACGTGGTGCTG
 AsnSerIleValArgCysAspValAspIleArgLysAspLeuTyrAlaAsnValValLeu

 TCAGGAGGCACGACCATGTTTCGAGGGTATTGGTCAGAGGATGACTAAGGAGCTCAACGCG
 SerGlyGlyThrThrMetPheGluGlyIleGlyGlnArgMetThrLysGluLeuAsnAla

 CTCGTACCTTCCACTATGAAGATCAAGGTTGTAGCCCCACCAGAACGCAAGTACTCTGTC
 LeuValProSerThrMetLysIleLysValValAlaProProGluArgLysTyrSerVal

 TGGATTGGTGGTTCGATCCTGTCTTCACTCTCCACATTCAGCAAATGTGGATCACCAAG
 TrpIleGlyGlySerIleLeuSerSerLeuSerThrPheGlnGlnMetTrpIleThrLys

 GAAGAGTTCGACGAAAGTGGGCCCAATATTGTGCACCGTAAATGCTTTTAA
 GluGluPheAspGluSerGlyProAsnIleValHisArgLysCysPheEnd

5. DISKUSSION

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, repräsentieren die Aktin Gene eine eukaryontische Genfamilie (Firtel, 1981), deren Mitglieder sowohl räumlich als auch zeitlich in einem Organismus unterschiedlich während dessen Entwicklung exprimiert werden können (Cox et al., 1986; Hickey et al., 1987). Aktin ist bisher in allen eukaryontischen Organismen, soweit untersucht, nachgewiesen worden.

Aufgrund dieser Charakteristika und der hohen Konservierung der Proteinsequenz, ist Aktin bzw. die Aktin-Genfamilie sehr gut für Analysen bezüglich der Genstruktur und -expression als auch für Studien des Evolutionsprozesses, welche zu dieser Genmannigfaltigkeit geführt haben, geeignet.

5.1 Aktin ist durch eine Einzelkopie im Genom von Theileria parva repräsentiert

Ähnlich wie bei den Invertebraten und den Säugern ist Aktin auch bei niederen Eukaryonten bis auf zwei Ausnahmen, Tetrahymena (Cupples & Pearlsman, 1986; Hirono et al., 1987) und Saccharomyces (Ng & Abelson, 1980; Mertin & Gallwitz, 1987), durch eine Multigenfamilie repräsentiert. Die Anzahl der Aktin Gene variiert, wie eben genannt, zwischen einem Aktin-Gen und beispielsweise 17-20 Aktin Genen in Dictyostelium (Kindle & Firtel, 1978). Die Aktin-Genfamilie in Drosophila weist z.B. 6 Gene auf, welche 3 Hauptklassen in der Größe der mRNA bilden und sich durch 3 verschiedene isoelektrische Punkte in den Aktin Proteinen unterscheiden (Tobin et al., 1980).

Andere Organismen zeigen die Präsenz von 6-15 Aktin Genen in Seeigel (Cox et al., 1986) und 4-7 Genen im Hühnchen (Cleveland et al., 1980). Drei mutmaßliche Gene wurden in dem Ciliaten Oxytricha fallax entdeckt (Kaine & Spear, 1982; Greselin et al., 1988).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Aktin im Genom des Parasiten Theileria parva als Einzelkopie vorliegt und innerhalb eines 10 kb EcoRI-Fragments lokalisiert ist.

Durch Kartierung dieses Fragmentes mittels Einzel-, Doppel- und Partialverdau (s. 4.4 u. 4.5) konnten weitere Kopien innerhalb des 10 kb EcoRI-Fragments, die etwa als

Gencluster oder als Tandem organisiert sind, ausgeschlossen werden, da weder 3' noch 5' des sequenzierten Aktin Gens weitere Aktinsequenzen nachgewiesen wurden. Durch Vergleich des 10 kb EcoRI-Klones mit genomischer *Theileria*-DNA und DNA aus *Theileria parva*-infizierten Zellen mittels Southern-Blot konnte dies bestätigt werden, da mit verschiedenen Enzymen identische Restriktionsmuster erhalten wurden.

Es war jedoch möglich, daß dieses 10 kb EcoRI-Fragment weiter entfernt an einem anderen chromosomalen Ort nocheinmal identisch vorhanden ist.

Die Aktin -Genfamilie bei *Drosophila* besteht z.B aus 6 Aktin Genen (Tobin et al., 1980). Eine zytoplasmatische Kartierung durch in situ Hybridisierung zeigte, daß diese Gene alle an weit voneinander entfernten chromosomalen Orten lokalisiert sind.

Die FIGE-Analyse zeigte, daß *Theileria*-Aktin auf einem 130-150 kb MluI-Fragment lokalisiert ist. Aufgrund dieser Analyse kann ein eventuell vorhandenes Gen an einem weiter entfernten Genort der chromosomalen *Theileria*-DNA ausgeschlossen werden. Letztendlich bleibt nur noch die Möglichkeit, daß das 10 kb EcoRI-Fragment innerhalb des 150 kb MluI-Fragments als identische Verdopplung vorkommt. Dies kann aber wegen der Größe von 10 kb als unwahrscheinlich angenommen werden (Ng & Abelson, 1980).

Studien von Ponte und Mitarbeitern (1983) zeigten, daß in der Aktin-Multigenfamilie des Menschen die 4 Muskel-Aktine als Einzelkopien vorliegen, während die zytoskelettalen Isoformen multigen vertreten sind. Wenn nur Einzelkopien für die jeweiligen Muskeltypen wie Herz-, Skelett-, Darm- und Gefäßmuskel vorhanden sind, warum existieren dann Multikopien für die zytoskelettalen Aktine? Eine einleuchtende Erklärung bietet z.B. die Arbeit von McKeown und Firtel (1981) über die differenzielle Expression der Aktin-Multigenfamilie in *Dictyostelium discoideum* (Ordnung Amöbina). In deren Arbeit konnte gezeigt werden, daß einige der 17-20 Aktin Gene desselben Isotyps sowohl zeitlich während der Entwicklung als auch räumlich unterschiedlich exprimiert werden. Bei diesem Organismus konnte eine Aktin-Synthese innerhalb der ersten Stunde nach Aktivierung in den Sporen nachgewiesen werden. Danach stieg der Aktin-Proteingehalt auf ca 1% des neusynthetisierten Proteins und die Expression der Aktin-mRNA stieg 300-fach während der Entstehung der vegetativen Amöbe an. Während der morphologischen Differenzierung stieg der Aktin-mRNA-Gehalt zunächst an und nahm in der späteren Entwicklung wieder ab.

Ein drittes Aktin-Gen, deren mRNA ebenfalls eine Länge von 1,35 kb besitzt, wurde durch die ganze Entwicklung hindurch gleichmäßig niedrig transkribiert. Ein viertes Gen, dessen Protein sich in 2 Aminosäuren zu den ersten drei genannten unterscheidet, wurde mit <5% während der ganzen Entwicklung nachgewiesen. Ein fünftes Gen, welches im Vergleich zu den untersuchten 4 Aktin-Genen viele Aminosäureaustausche besitzt, konnte nicht als mRNA nachgewiesen werden und wird von den Autoren als Pseudogen angenommen.

Ähnliche Beobachtungen über multigene zytoskelettale Aktine fand man auch für andere Organismen, wie z.B. Seeigel (Merlino et al., 1980), *Xenopus laevis* (Mohun & Garret, 1987; Mohun et al., 1986; Mohun et al., 1984; Steinbeisser et al., 1988), der Maus (Tokunaga et al., 1988) und für den Menschen (Ponte et al., 1983).

Eine andere mögliche Erklärung der multigenen zytoplasmatischen Aktine wäre, daß viele dieser β - oder γ -Aktine Pseudogene sind und nicht exprimiert werden (Ponte et al., 1983). Es ist bekannt, daß von den multigenen zytoplasmatischen Aktinen beim Menschen viele Pseudogene darstellen, welche aufgrund von Mutationen in der kodierenden Region zu Stopkodons führen und daher nicht exprimiert werden können (Engel et al., 1982).

Umgekehrt ergibt sich die Frage, warum nur Einzelkopien für die jeweiligen α -Muskel-Aktine existieren? Ein wichtiger Aspekt mag sein, daß die Muskel-Aktine nur in differenzierten Muskelzellen, wie Herzmuskel, Skelettmuskel, Darmmuskel und Gefäßmuskel exprimiert werden, während die sarkomeren Aktine in allen somatischen Zellen und in Keimzellen aktiv sind. Man kennt jedoch noch keinen physiologischen Grund für das Vorhandensein von verschiedenen Muskel Aktinen in den jeweiligen Muskeltypen. Vielleicht duplizierte ein ursprüngliches α -Aktin und verzweigte sich parallel mit der Evolution dieser Muskeltypen. Ferner erscheint es vorteilhafter und vielleicht auch einfacher zu sein, ein Muskel Aktin selektiv für einen spezifischen Muskeltyp zu aktivieren (Firtel et al., 1981).

Aktin ist in dem intrazellulären Parasiten *Theileria parva* nur durch ein Gen im Genom vertreten. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da in anderen niederen Organismen, die einen Generationszyklus aufweisen, mehrere Aktin-Gene vorhanden sind und auch unterschiedlich während der Entwicklung exprimiert werden. *Plasmodium falciparum*

besitzt 2 Aktine, von welchen aber noch nicht bekannt ist, ob diese unterschiedlich exprimiert werden (Wesseling et al., 1988).

Der Ascomycet *Saccharomyces pombe* besitzt, wie einleitend erwähnt, ein einzelnes Aktin-Gen (Mertins & Gallwitz, 1987). Die Untersuchung dieses Gens ergab ein überraschendes Ergebnis. In einer Northernanalyse wurden 3 Transkripte mit deutlich unterscheidbaren Größen von 1240, 1650 und 1850 Basen nachgewiesen. Durch S1-Analyse fanden die Autoren heraus, daß nicht das 5'-Ende, sondern das 3'-Ende mit 3 verschiedenen Längen transkribiert wird. Diese Möglichkeit kann für *Theileria* ausgeschlossen werden, da der Northern-Blot (Abb.16 u. 17) nur eine Transkriptgröße mit 1,4 kb zeigt. Darüberhinaus zeigte die Primer-Extension-Analyse, daß nur ein Transkriptionsstart vorhanden ist (4.10.1).

Andererseits konnte bei *Acanthamoeba castellanii* ebenfalls nur eine Transkriptlänge von 1300 Basen beobachtet werden. Bei diesem Organismus existieren allerdings 3 Aktin Gene, wobei nicht sichergestellt wurde, ob alle oder nur 1 Aktin-Gen transkribiert wird (Nellen & Gallwitz 1982).

Es wäre interessant zu erfahren, ob das singuläre Aktin-Gen in *Theileria parva* in allen Generationen des Lebenszyklus exprimiert wird und ob vielleicht, ebenso wie bei *S. pombe*, eine andere Transkriptlänge der *Theileria*-Aktin-mRNA existiert. Bisher ist es allerdings nicht gelungen andere Parasitenstadien *in vitro* zu kultivieren.

5.2 Theileria-Aktin besitzt ein Intron im 5'-Nichttranslatierten Bereich

Es ist bekannt, daß die meisten proteinkodierenden Gene eukaryontischer Organismen keine kontinuierliche kodierende Region aufweisen, sondern vielmehr durch intervenierende Sequenzen (Introns) unterbrochen sind.

In dieser Arbeit wurde durch Vergleich des *Theileria*-Aktin Gens mit der cDNA gezeigt, daß ein Intron im 5'-Nichttranslatierten Bereich vorhanden ist.

Das Aktin-Gen I in *Acanthamoeba* (Nellen & Gallwitz, 1982) ist z.B. von einem 129 bp langen Intron, nach Kodon 105, unterbrochen. Bis jetzt wurde kein anderes Aktin-Gen in einem anderen Organismus gefunden, welches ein Intron an gleicher Stelle, wie *Theileria* oder z.B. *Acanthamoeba* besitzt (Nellen & Gallwitz 1982). Von den 17

Dictyostelium Aktin-Genen ist keines durch ein Intron unterbrochen, obwohl andere Gene in diesem Organismus Introns besitzen. Andererseits besitzt das singuläre Aktin-Gen in *Saccharomyces cerevisiae* ein Intron (Ng & Abelson 1980). Das gleiche gilt für den Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der aber ein Intron im 5'-Nichttranslatierten Bereich hat. In allen drei untersuchten Aktin-Genen dieser Spezies liegen die Introns an gleicher Position. Sechs Introns wurden im Ratten α -Aktin und 5 im Mensch β -Aktin identifiziert.

Bis heute wurden Introns an mehr als 20 verschiedenen Positionen des Aktin-Gens gefunden und es ist bemerkenswert, daß die meisten Aktin-Gene unterschiedlicher Organismen keine gemeinsamen Intronpositionen teilen.

Im Gegensatz zu den Globin Genen, welche Introns an den gleichen Stellen über einen Zeitraum von mehr als 350 Millionen Jahren konserviert haben, variieren die Intronpositionen der Aktin-Gene beträchtlich (Leder et al., 1980). Es mag sein, wie schon von Fyrberg (1981) diskutiert wurde, daß ein primordiales Aktin-Gen mit vielen Introns existiert haben könnte und daß Introns, die in "heutigen" Spezies gefunden wurden, sozusagen Überreste dieses primordialen Aktin-Gens darstellen. Falls diese Annahme richtig sein sollte, müßte es einen Mechanismus in eukaryontischen Organismen geben, welcher das Entfernen solcher Introns erlaubt. Das Ratten Insulin-Gen, welches eines der zwei Introns durch Duplikation verloren hat, stellt ein aufschlußreiches Beispiel für die Existenz eines solchen Mechanismus dar. Andererseits ist durch die vorhandenen Daten nicht auszuschließen, daß Introns in vorzeitig vorhandenen Genen eingefügt worden sind.

Der Vergleich aller bisher sequenzierten Aktin-Gene erlaubt immerhin die Aussage, daß die Anzahl der Introns mit der Gengröße in Relation steht. Beispielsweise haben Organismen mit kleinen Genomen wie Hefe, *Dictyostelium*, *Acanthamoeba* und *Theileria parva* keine oder nur ein Intron, wobei Organismen mit größeren Genomen, wie Seeigel und Ratte, multiple Introns in ihren Aktin-Genen besitzen. Ferner kann über Introns, die sich im 5'-Nichttranslatierten Bereich eines Gens befinden, gesagt werden, daß es sich immer um ein einzelnes Intron handelt. Ein Aktin-Gen mit mehr als einem Intron in diesem Bereich wurde bisher nicht beschrieben. Falls sich dieses durch weitere Analysen für *Theileria*-Aktin bestätigen würde, wäre das bemerkenswert (s. 4.10.2 u. 4.10.4).

Für das durch Vergleich von cDNA und Gen ermittelte Intron im *Theileria*-Aktin-Gen, konnten aufgrund der GT-AG-Regel (Seif et al., 1979) die 3'- und 5'-Spleißstellen

ermittelt werden. Dies läßt vermuten, daß Theileria einen ähnlichen Spleißapparat, wie er in höheren Eukaryonten charakterisiert wurde, besitzt. Wenn dies der Fall wäre, könnte man ein hypothetisches zweites Intron im Theileria-Aktin-Gen nachweisen.

Eine Möglichkeit dies zu testen, wäre, daß man von der 1,2 b AccI-Region mittels eines davorgeschalteten SP6-Promotors eine pre-mRNA synthetisiert und sie mit einem Kernextrakt, z.B. aus Hefe, inkubiert. Trennt man anschließend die Nukleinsäuren über ein Polyacrylamid/Harnstoff Gel, so müßten die entsprechenden Fragmente auf einem Röntgenfilm sichtbar werden.

Eine positive Kontrolle in diesem Versuch bietet das bereits betätigte Intron im Aktin-Gen. Würde dieses bekannte Intron in einem solchen System gespleißt, so könnte man annehmen, daß dies mit einem eventuell zweiten vorhandenen Intron auch geschehen müßte.

5.3 Theileria-Aktin besitzt kein bekanntes Polyadenylierungssignal

Die Sequenzierung der 3'-Nichttranslatierten Region ergab eine Länge von 37 Basen. Diese 37 Basen wurden in 6 unabhängigen cDNA-Klonen bestätigt. Dies erscheint ungewöhnlich kurz, im Vergleich zu 3'-Nichttranslatierten Regionen anderer Organismen, wie z.B. Plasmodium falciparum-Aktin (Wesseling et al., 1988) mit 331 Basen und 700 Basen bei Maus-Aktin (Tokunaga et al., 1988). Leider ist über 3'-Regionen des Aktin Gens in vielen Organismen nichts berichtet, da in vielen dieser Arbeiten lediglich genomische Klone und nicht cDNA Klone sequenziert wurden. Der 3'-Nichttranslatierte Bereich von Theileria-Aktin zeigt ferner weder eine Homologie zu den bekannten 3'-Aktinregionen anderer Organismen, noch zu irgend einer anderen Sequenz.

Innerhalb der 37 Basen der 3'-Nichttranslatierten Region gibt es kein bekanntes Terminationssignal [AATAAA] (Birnstiel et al., 1985), wie es in den meisten mRNA's von Eukaryonten und auch bei den bisher analysierten Aktinen gefunden wurde.

Ein anderes Terminationssignal für die Transkription, die Sequenz (TATGT) bei Hefe, ist ebenfalls nicht in der Theileria-Aktin-cDNA vorhanden (Zaret & Sherman 1982).

In den VSG-Genen bei Trypanosomen (Boothroyd & Cross 1982) und den Tubulin-Genen von *Leishmania* (Landfear et al., 1986) fand man ebenfalls kein bekanntes Terminationssignal der mRNA. Hier wurden andere mutmaßliche Sequenzen erwähnt, die jedoch bis heute nicht überprüft worden sind.

Bei *Theileria parva* könnte die Sequenz [AATAT], die 15 Basen vor der PolyA-Sequenz auftritt, ein Signal für den Transkriptionsstop und das Anhängen eines PolyA-Schwanzes darstellen. Dies müßte aber erst durch die Isolierung weiterer *Theileria parva*-Gene bestätigt werden.

In unserem Labor wurde mittlerweile eine weitere *Theileria*-cDNA isoliert, deren Nukleinsäuresequenz für ein 'Heat Shock'-Protein kodiert (J. Gerhards IGT, persönliche Mitteilung). Diese cDNA besitzt, ebenso wie die Aktin-cDNA, die Sequenz (AATAT) 10 Basen vor dem PolyA-Schwanz.

Die Sequenzierung der 3'-flankierenden Aktinregion zeigt jedoch an Position [+1157, +1188, +1273] eine dem eukaryontischen PolyA-Signal ähnliche Sequenz [AATAA]. Ob diese Sequenzen ein Signal für den Transkriptionsstop und das Anhängen eines PolyA-Schwanzes darstellen, bleibt vorerst ungeklärt.

5.4 Der Transkriptionsstart von *Theileria*-Aktin ist ungeklärt

Durch 'Primer-Extension'-Analyse konnte die Länge des *Theileria*-Aktin Transkriptes mit 1355 Basenpaare bestimmt werden. Diese Größe stimmt gut mit der Northern-Blot-Analyse überein. Von den 6 isolierten Aktin cDNA-Klonen fehlen dem längsten Isolat aber noch etwa 50 Basen.

Durch die 'Primer-Extension'-Analyse errechnete sich ein theoretischer Transkriptionsstart bei Position [-278] (Abb. 23). Daß der Transkriptionsstart wahrscheinlich nicht an dieser Position lokalisiert ist, wurde mit 2 Experimenten belegt. Die S1-Analyse zeigte ein um 50 Basen kürzeres Fragment. Innerhalb der Region von [-226] und [-278] existiert jedoch eine Region mit einem hohen AT-Gehalt. Es könnte deshalb sein, daß diese Region der Aktin-mRNA unter den verwendeten Bedingungen nicht vollständig mit der homologen genomischen Region hybridisierte und somit von S1-Nuklease verdaut werden konnte. Demzufolge könnte diese Region dennoch auf der mRNA vorhanden sein. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde mittels eines synthetisierten Oligonukleotids, das die Sequenzen der Region in der Nähe von

Position [-278], und zwar von [-273] bis [-257] besitzt, eine PCR (Polymerase Chain Reaction) durchgeführt. Das Ergebnis zeigte keine Amplifikation des Bereiches. Wären diese Sequenzen auf der Aktin-mRNA, so hätte diese Region genauso amplifiziert werden müssen wie die der kodierenden Region, die als Kontrolle in diesem Experiment diente. Somit kann angenommen werden, daß die Sequenzen im Bereich von [-273] bis [-257] nicht auf der mRNA liegen.

Die 127 Basen lange S1-Bande zeigte ein Fragment, das sich von der 5'-Intronspleißstelle (Position [-100]) bis Position [-226] (s. Abb 21)) erstreckt. Die längste isolierte cDNA (Abb. 24) endet bei derselben Position im Gen. Der Bereich bis Position [-226] existiert also mit Sicherheit auf der mRNA. Analysiert man den Bereich 5' der Position [-226], so findet sich in unmittelbarer Nachbarschaft, 8 Basen weiter entfernt, eine Sequenz, die aufgrund der GT-AG-Regel (Seif et al., 1978) auf eine weitere 3'-Spleißstelle [-236/-234] und weiter 5' bei Position [-352/-349] auf eine 5'-Spleißsequenz und damit eventuell auf ein weiteres Intron schließen läßt. Betrachtet man aber weiter den 5'-flankierenden Bereich, so finden sich noch 5 weitere solcher Spleißsequenzen innerhalb des 1,2 kb AccI-Fragmentes, die in Abbildung 21 umrahmt gezeigt sind.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich 2 Interpretationen:

1) Das Theileria-Aktin-Gen besitzt im 5'-Nichttranslatierten Bereich noch ein weiteres Intron. Dies wurde zwar noch für kein anderes Aktin-Gen gezeigt, ist aber deswegen nicht auszuschließen. Der Nachweis eines solchen zweiten Introns könnte vielleicht mit einem Experiment gelingen, wie es unter 5.2 vorgeschlagen wurde.

2) Die fehlenden 50 Nukleotide sind nicht auf dem isolierten genomischen 5'-Fragment (1,2 kb AccI) vorhanden. Dies ließe auf eine sogenannte 'Trans-spliced leader-sequence' schließen.

Unter dem Ausdruck 'Trans-Splicing' versteht man eine intermolekulare Ligation zwischen einer 5'-Donorstelle der mRNA und einer 3'-Akzeptorstelle einer anderen mRNA. Ein solcher Mechanismus wurde erstmals bei Trypanosomen, dem Erreger der Schlafkrankheit, entdeckt (Boothroyd & Cross 1982; De Lange et al., 1983; Nelson et al., 1983; Guyaux et al., 1985). Jede mRNA trägt an ihrem 5' Ende dieselbe Sequenz

von 39 Basen (=Mini-Exon). Diese Sequenz ist Teil eines 1,4 kb-Fragments, das mehrfach (ca. 200mal) wie ein Tandem hintereinander an einer anderen Stelle im Genom lokalisiert ist (Campbell et al., 1984; Kooter et al., 1984; Milhausen et al., 1984). Das Mini-Exon wird an jede mRNA geheftet. Da die beiden RNA-Fragmente von zwei verschiedenen Transkriptionseinheiten stammen, handelt es sich hier um 'Trans-Splicing'.

Vor kurzem wurde ein solcher Mechanismus ebenfalls für das Aktin-Gen bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Krause & Hirsh, 1987). Die Autoren entdeckten, daß eine Differenz zwischen der durch Primer Extension -Analyse ermittelten Aktin-mRNA-Länge und einer S1-Analyse, welche ein um 22 Basen kürzeres Fragment zeigte, bestand. Es gelang ihnen mittels RNA-Sequenzierung diese 'Leader-Sequence' zu ermitteln. Die 22 Basen sind dabei an einem anderen genomischen Ort, und zwar innerhalb der für die 5S rRNA kodierenden Genregion, als Tandem mehrfach kodiert.

Eine solche Differenz zwischen Primer-Extension- und S1-Analyse wurde auch für das Aktin-Gen bei *Theileria parva* entdeckt. Leider gelang eine Sequenzierung der Aktin-mRNA von *Theileria* nicht. Erfolgreiche RNA-Sequenzierungen gelangen bisher nur, wenn deren Anteil mindestens 5% der gesamten mRNA betrug. Dies könnte bedeuten, daß der Anteil von *Theileria*-Aktin in der gesamten mRNA kleiner als 5% ist.

Eine andere Möglichkeit, das 5'-Ende der Aktin-mRNA zu sequenzieren, wäre, daß man mittels eines Primers im Translationsstart und 'Reverser Transkriptase' eine cDNA bis zum Transkriptionsstart synthetisiert, genauso wie es bei einer 'Primer-Extension'-Analyse (Abb. 26) durchgeführt wurde. Zerstört man die RNA anschließend durch alkalische Hydrolyse und entfernt die übrigen Nukleotide über eine Säule, so könnte man mit dem Enzym 'Terminale Transferase' eine PolyG-Sequenz an das synthetisierte Ende der cDNA anheften. Man hätte somit den ersten Strang einer cDNA, die an ihrem Ende den Transkriptionsstart und zusätzlich eine PolyG-Sequenz trägt. Mit dieser einzelsträngigen cDNA ließe sich dann eine 'Polymerase Chain Reaction' durchführen, sodaß man mittels eines PolyC-Oligonukleotids und den anfangs für den ersten cDNA-Strang verwendeten Primer diese Sequenz mit TaqI Polymerase amplifizieren und anschließend sequenzieren könnte.

5.5 Das 1,2 kb AccI-Fragment zeigt keine Promotoraktivität in Säugerzellen

Analysiert man den 5'-flankierenden Bereich des Aktin-Gens innerhalb des 1,2 kb AccI-Fragmentes von Position [-278] und [-1107], so ergibt sich ein extrem hoher AT-Gehalt von 88%. Diese Region zeigt allein 11 TATA-ähnliche Sequenzen, die in Abb. 21 unterstrichen gezeigt sind. Ein ähnlich hoher AT-Gehalt ist z. B. auch bei dem Aktin-Gen von *Plasmodium falciparum* entdeckt worden. Allerdings wurden hier nur ca. 100 Basen der 5'-Region sequenziert (Wesseling et al., 1988).

CAT-Fusionsgenkonstrukte dieses 1,2 kb AccI 5'-Fragmentes und Transfektion dieser Konstrukte in HeLa-Zellen und *Theileria parva*-infiziert-infizierte Lymphozyten zeigten keine eindeutige Promotoraktivität. Eine erforderliche Positivkontrolle, bei der dieses Konstrukt in Schizonten nachweisbar transfiziert wird, ist für einen intrazellulären Parasiten schwierig.

Hieraus ergeben sich 2 mögliche Interpretationen:

1) Innerhalb des 1,2 kb AccI-Fragmentes ist kein Promotor vorhanden.

Über die Genexpression bei Protozoen ist bisher sehr wenig bekannt. Man konnte aber bereits einige Hinweise auf höchst ungewöhnliche Eigenschaften bei Trypanosomen erhalten.

So werden die VSG-Gene dieses Schlafkrankheitserregers als polycistronische RNA-Einheiten mit einer Länge von mehr als 50 kb abgelesen, was bedeutet, daß ein Promotor mindestens 50 kb entfernt sein müßte. Durch ein sogenanntes 'Chromosome Walking' konnte man einen mutmaßlichen Promotor 50 kb weiter in 5'-Richtung identifizieren.

Aufgrund der Ergebnisse über *Theileria*-Aktin kann man eine polycistronische RNA nicht ausschließen. Hierzu müßten allerdings Experimente wie 'Nuclear Run On'-Experimente durchgeführt werden. Dies ist bis heute leider nicht möglich, da eine Isolierung von Schizontenkernen noch nicht gelungen ist.

2) Die andere Möglichkeit wäre, daß eine Promotorsequenz innerhalb des 1,2 kb AccI-Fragmentes vorhanden ist, aber von Polymerasen der höheren Eukaryonten nicht erkannt werden kann, da der Promotor vielleicht eine unterschiedliche Sequenz besitzt. Eine möglich Erklärung bietet sich durch folgendes Beispiel an. Bei Trypanosomen fand man, daß die VSG-Gene der Blutformen und auch das Procyclin

Gen der prozyklischen Insektenformen von einer Polymerase transkribiert werden, die eine hohe Resistenz gegenüber α -Amanitin zeigte. α -Amanitin hemmt spezifisch die PolymeraseII. Dies mag ein Hinweis darauf sein, daß diese Gene von einer modifizierten PolymeraseII transkribiert werden, die die übliche eukaryontische Promotorsequenz nicht erkennt (Evers et al., 1989).

Zusammen mit dem Ergebnis, daß auch kein bekanntes PolyA-Signal im Theileria-Aktin zu finden ist, gibt dies einen Hinweis darauf, daß sich genomische Theileria-DNA, transfiziert in höheren Eukaryonten, nicht so einfach exprimieren läßt.

5.6 Das Theileria-Aktin-Protein

Alle Vergleiche der Primärstrukturen zeigen, daß das Aktin Molekül während der Evolution hochgradig konserviert ist. Mit Ausnahme einer ganzen Anzahl an Säureresten am N-terminalen Ende, gibt es nur minimale (<5%) Unterschiede in den Sequenzen zwischen muskulären und zytoplasmatischen Aktinen bei tierischen Organismen. Pflanzen besitzen multiple Aktine, die sich einerseits untereinander und andererseits im Vergleich zu tierischen Aktinen mit mehr als 10 % unterscheiden (Pollard & Cooper 1986).

Ausgehend von den Studien, daß Aktin in bisher allen eukaryontischen Organismen identifiziert wurde, erwartet man, daß das Aktin-Protein während der Evolution hochkonserviert sein muß. Z.B. sind die Aminosäure Sequenzen von Hefe, Dictyostelium, Acanthamoeba mit einer Homologie von 88%, 95% und 95% identisch zu den β -zytoplasmatischen Aktinen der Vertebraten (Ng & Abelson 1980; Nellen & Gallwitz 1982; Romans & Firtel 1985; Kost et al., 1983).

Wie einleitend schon erwähnt, zeigten neuere Daten jedoch, daß gerade die Ciliaten- und Sporozoen-Aktine einen sehr abweichenden Aktintyp besitzen. Dies konnte in dieser Arbeit für das Aktin des Sporozoen *Theileria parva* bestätigt werden. Das *Theileria parva* Aktin-Protein besitzt eine Homologie von nur 82% zu den Vertebraten Aktinen (vgl. Tab.2). Dies ist relativ niedrig, wenn man die oben angeführten Organismen betrachtet, die eine Homologie von durchschnittlich mehr als 90% zu den Vertebraten-Aktinen zeigen. Die gleiche Homologie von nur 82% zum Vertebraten- β Aktin wurde auch für *Plasmodium falciparum* gefunden (Wesseling et al., 1988). Die bisher niedrigste Homologie zu den Vertebraten-Aktinen zeigte der Ciliat *Tetrahymena thermophila* mit nur 77% (Cupples & Pearlman 1986).

Vergleicht man die Aktine von *Plasmodium* und *Theileria* so besteht mit einer Homologie von nur 85% zwischen beiden Organismen eine wesentlich geringere Ähnlichkeit als zwischen den Amöben- und Vertebraten-Aktinen. Ähnliches gilt auch für den Vergleich zwischen Aktin von *Tetrahymena thermophila* und *Theileria parva* mit 80%. Aufgrund dieser Daten könnte man vermuten, daß der evolutionäre Abstand innerhalb der Sporozoen und Ciliaten in derselben Größenordnung liegt wie zwischen Protozoen und anderen eukaryontischen Organismen.

Ein gezielter Vergleich der spezifischen und hochkonservierten Aminosäuren zeigte jedoch deutlich, daß das Gegenteil der Fall ist. Die Aktin-Proteine, besonders die von *Theileria* und *Plasmodium* und auch die von *Tetrahymena* gehören wesentlich näher zusammen als es die Gesamthomologie ihrer Aktin-Proteinsequenzen auf den ersten Blick vermuten läßt.

Ein Vergleich spezifischer Aminosäuren im Aktin-Protein (Tab. 3) zeigt deutlich, daß *Plasmodium* und *Theileria* einen engen Verwandtschaftsgrad besitzen. Ferner läßt sich erkennen, daß *Theileria*-Aktin im Grunde weder der muskulären noch der zytoplasmatischen Isoform zuzuordnen ist.

Ein weiterer Vergleich von Proteinregionen, die in fast allen anderen Organismen hochkonserviert sind, bestätigt die bereits von Wesseling und Mitarbeitern analysierte Ausnahme für Ciliaten und Sporozoen (*Tetrahymena* und *Plasmodium*). Tabelle 4 zeigt, daß dies für *Theileria* ebenso der Fall ist. *Theileria* stellt hier dennoch den abweichendsten Aktintyp dar. Bei diesem Parasiten ist keine der hochkonservierten Aminosäuren vorhanden.

Aufgrund dieser Vergleichsanalysen können folgende Aussagen gemacht werden: *Theileria parva* besitzt aufgrund seiner Gesamthomologie zu den Vertebraten-Aktinen und besonders durch die vollständige Abweichung seiner Aminosäuren in Regionen, die während der Evolution der Aktine streng erhalten geblieben sind, ein sehr abweichendes Aktin-Protein (Tab.4). Darüberhinaus ist *Theileria*-Aktin aufgrund der in Tabelle 3 aufgeführten spezifischen Aminosäuren das muskelähnlichste Aktin, das bisher in Protozoen gefunden wurde.

Im Gegensatz zu der geringen Gesamt-Homologie von nur 85% zwischen den Aktin-Proteinen von *Theileria parva* und *Plasmodium falciparum*, zeigt der Vergleich der spezifischen und konservierten Aminosäuren die enge Verwandtschaft beider Organismen an.

Bisher war die genaue systematische Zugehörigkeit der Piroplasmida innerhalb der Sporozoen nicht ganz sichergestellt. Aufgrund elektronenmikroskopischer Daten vermutet man sie systematisch in die Nähe von *Plasmodium* (Remane et al., 1980).

Mit Hilfe dieser Arbeit kann diese Vermutung durch die molekularbiologischen Daten der Aktin-Proteine von *Theileria parva* und *Plasmodium falciparum* unterstützt werden. Interessant wäre es zu erfahren, ob auch andere Mitglieder der Ordnung Piroplasmida, wie z.B. *Babesia*, ähnliche Resultate liefern.

Wie ist das Aktin-Molekül entstanden ?

Basierend auf der Homologie der Aminosäuresequenz, scheinen alle zytoplasmatischen Aktine der Metazoen und die Muskel-Aktine der Invertebraten direkte Abkömmlinge der zytoplasmatischen Aktine von Protozoen und Pilzen zu sein, während die Muskel-Aktine der Vertebraten von einer einfach zu unterscheidenden Familie abstammen, welche sich mehr als zweimal unterteilte, um die verschiedenen Aktine in den vier verschiedenen Muskeltypen zu bilden: Skelettmuskel, glatter Darmmuskel, Herzmuskel und Gefäßmuskel.

Die Pflanzen zweigten sich von den Tieren vor etwa einer Milliarde Jahren ab und ihre Aktin-Gene entwickelten sich somit separat .

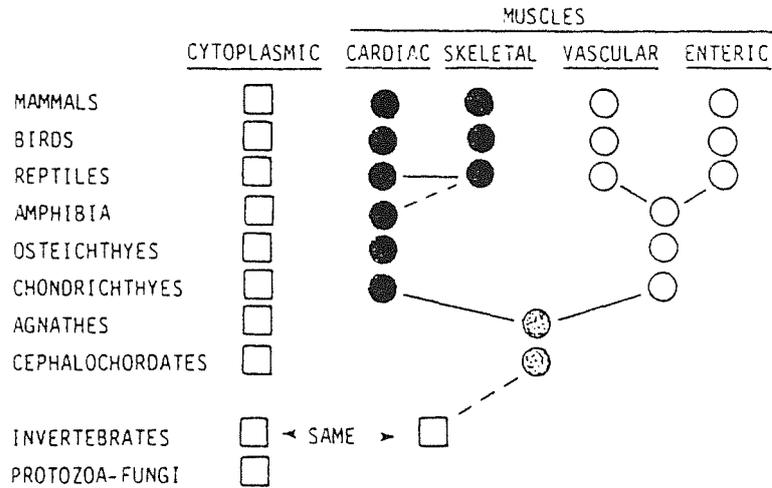


Abb. 32: Evolution der Aktin-Moleküle in Tieren. Die Quadrate zeigen die zytoplasmatischen Aktine. In Vertebraten gibt es hauptsächlich zwei verschiedene zytoplasmatische Isoformen: β und γ -Aktin. Von diesen wird wenigstens eine Isoform exprimiert. Man beachte, daß die Invertebraten ein zytoplasmatisches Aktin in ihren Muskeln exprimieren. Kreise beziehen sich auf die Muskel-Aktine. Aus Pollard and Cooper (1986,) p 990; modifiziert nach Vandekerckhove and Weber (1984).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Theileria-Aktin-Proteins und der Vergleich der Aktin-Proteine von Theileria und Plasmodium lassen die Vermutung zu, daß sich die Sporozoen und vielleicht auch die Ciliaten (Wesseling et al., 1988) unabhängig von den anderen Eukaryonten von einem gemeinsamen primitiven Vorfahren entwickelt haben müssen.

Es wäre interessant zu erfahren, ob Vergleiche der Aktin-Proteine anderer intrazellulärer Sporozoen, wie z.B. Babesia und extrazellulär lebende Sporozoen, wie z.B. Gregarina und Monocystis, diese Ergebnisse bestätigen würden.

6. L I T E R A T U R

- Ahmed, J.S., Diesing, L., Oechtering, H., Ouhelli, H., and Schein, E. (1988): The role of antibodies in immunity against *Theileria annulata* infection in cattle. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 267, 425-431.
- Allsopp, B.A. and Allsopp, M.T.E.P.(1988): *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal intra-specific sequence diversity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 28, 77-84.
- Armaleo, D. (1987): Structure and evolution of prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases: a model. *J. Theor. Biol.*, 127, 301-314.
- Baldwin, C.L., Goddeeris, B.M., and Morrison, W.I. (1987): Bovine helper T-cell clones specific for lymphocytes infected with *Theileria parva* (Muguga). *Parasite Immunol.*, 9, 499-513.
- Baldwin, C.L., Malu, M.N., and Grootenhuis, J.G. (1988): Evaluation of cytotoxic lymphocytes and their strain specificity from African buffalo infected with *Theileria parva*. *Parasite Immunol.*, 10, 393-403.
- Baldwin, C.L., Malu, M.N., Kinuthia, S.W., Conrad, P.A., and Grothenuis, J.G. (1986): Comparative Analysis of infection and transformation of lymphocytes from African buffalo and Boran cattle with *Theileria parva* subsp. *parva* and *T. parva* subsp. *lawrencei*. *Infection and Immunity*. 53, no.1, 186-191.
- Barnett, S.F. and Brocklesby (1966): The susceptibilty of the African buffalo (*Syncerus caffer*) to infection with *Theileria parva* (Theiler, 1904). *Br. Vet. J.*, 122, 379-386.
- Beham, A., Denk, H., and Desove, G. (1988): The distribution of intermediate filament proteins, actins and desmoplakins in human placental tissue as revealed by polyclonal and monoclonal antibodies. *Placenta*, 9, 479-492.
- Bergsma, D.J., Chang, K.S., and Schwartz, R.J. (1985): Novel chicken actin gene: third cytoplasmic isoform. *Mol. Cell. Biol.*, 5, no.5, 1151-62.
- Birnstiel, M.L., Busslinger, M., and Strub, K. (1985): Transcription termination and 3' processing: The end is in sight. *Cell* 41, 349-359.
- Boothroyd, J.C. and Cross, G.A.M.(1982): Transcript coding for the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short identical exon at the 5'end. *Gene* 20, 281-289.
- Bourns, B., Franklin, S., Cassimeris, L., and Salmon, E.D. (1988): High hydrostatic pressure effects in vivo: changes in cell morphology, microtubule assembly, and actin organization. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 10, 380-390.

- Brocklesby, D.W., Barnett, S.F., and Scott, G.R. (1961): Morbidity and mortality rates in East Coast fever. *Theileria parva* infection and their application to drug screening procedures. *Br. Vet. J.* 117, 529-531.
- Brown, C.G.D., Stagg, D.A., Purnell, R.E., Kanhai, G.K., and Payne, R.C. (1973): Infection and transformation of lymphoid cells *in vitro* by infective particles of *Theileria parva*. *Nature*, 245, 101.
- Brown, W.C. and Logan, K. (1986): Bovine T-cell clones infected with *Theileria parva* produce a factor with IL 2-like activity. *Parasite Immunol.*, 8, 189-192.
- Burgess, D.R., Broschat, K.O., and Hayden, J.M. (1987): Propomyosin distinguishes between the two actin binding sites of villin and affects actin-binding properties of other brush border proteins. *J. Cell Biol.*, 104, 29-40.
- Büscher, G. and Tangus, J. (1986): Quantitative studies on *Theileria parva* in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* adults: search for conditions for high infections. *Int. J. Parasitol.*, 16, no.2, 121-130.
- Campbell, D.A., Thornton, D.A., and Boothroyd, J.C. (1984): Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen genes. *Nature* 311, 350-355.
- Carle, G.F., Frank, M., and Olson, M.V. (1986): Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, 232, 65-68.
- Chang, K.S., Rothblum, K.N., and Schwartz, R.J. (1985): The complete nucleotide sequence of the chicken α cardiac actin gene: a highly conserved vertebrate gene. *Nucleic Acid. Res.* 13, 1223-1237.
- Chema, S., Waghela, S., James, A.D., Dolan, T.T., Young, A.S., Masiga, W.N., Irvin, A.D., Mulela, G.H.M. and Wekesa, L.S. (1986): Clinical trial of paraquone for the treatment of East Coast fever in Kenya. *The Veterinary Record*, May 24, p 588.
- Chou, C.-C., Davis, R.C., Fuller, M.L., Slovin, J.P., Wong, A., Wright, J., Kania, S., Shaked, R., Gatti, R.A., and Salser W.A. (1987): γ -Actin: unusual mRNA 3'-untranslated sequence conservation and amino acid substitutions that may be cancer related. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 2575-79.
- Cleveland, D.W., Lopata, M.A., MacDonald, R.J., Cowan, N.J., Rutter, W.J., and Kirshner, M.W. (1980): Number and evolutionary conservation of α - and β -tubulin and cytoplasmic β - and γ -actin genes using specific cloned cDNA probes. *Cell*, 20, 95-105.
- Cooper, A.D., and Crain, W.R. (1982): Complete nucleotide sequence of a sea urchin actin gene. *Nucleic Acid Res.* 10, 4081-4092.

- Coquerelle, T.M., Eichhorn, M., Magnuson, N.S., Reeves, R., Williams, R.O., and Dobbelaere, D.A.E. (1989) Expression and characterization of the interleukin 2 receptor in *Theileria parva* infected lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* in press.
- Cox, K.H., Angerer, L.M., Lee, James.J., Davidson, E.H., and Angerer, R.C. (1986): Cell lineage-specific programs of expression of multiple actin genes during sea urchin embryogenesis. *J. Mol. Biol.*, 188, 159-172.
- Cross, G.S., Wilson, C., Erba, H.P. and Woodland H.R. (1988): Cytoskeletal actin gene families of *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis*. *J. Mol. Evol.*, 27, 17-28.
- Cupples, C.G. and Pearlman, R.E. (1986): Isolation and characterization of the actin gene from *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 5160-5164.
- Degen, J.L., Neubauer, M.G., Friezner, Degen, S., Seyfried, C.E., and Morris, D.R. (1983): Regulation of protein synthesis mitogen-activated bovine lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 12153-12162.
- De Lange, T., Liu, A.Y.C., Van der Ploeg, L.H.T., Borst, P., Tromp, M.C., and Van Boom, J.H. (1983): Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription. *Cell*, 34, 891-900.
- Dobbelaere, D.A.E. and Spooner, P.R. (1985): Production in ascites fluid of biosynthetically labelled monoclonal antibody to *Theileria parva* sporozoites. *J. Immunol. Methods*, 82, 209-214.
- Dobbelaere, D.A.E., Coquerelle, T.M., Roditi, I.J., Eichhorn, M., and Williams, R.O. (1988): *Theileria parva* infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 4730-4734.
- Dobbelaere, D.A.E., Webster, P., Leitch, B., Voigt, W.P., and Irvin, A.D. (1985): *Theileria parva*: expression of a sporozoite surface coat antigen. *Exper. Parasitol.*, 60, 90-100.
- Dolan, T.T. (1986): Chemotherapy of East Coast fever. *Acta Tropica*, 43, no.2, 165-174.
- Dolan, T.T. and Young, A.S. (1981): In: *Advances in the control of Theileriosis*. A.D. Irvin and M.P. Cunningham (eds.), pp 412, M. Nijhoff, The Hague.
- Duchene, M., Löw, A., Schweizer, and A. Domdey, H. (1988): Molecular consequences of truncations of the first exon for in vitro splicing of yeast actin mRNA. *Nucl. Acids Res.*, 7233-39.
- Egly, J.M., Myamoto, N.G., Moncollin, V. and Chambon, P. (1984): Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? *EMBO J.* 3, no.10, 2363-71.

- Elder, P.K., Schmidt, L.J., Ono, T., and Getz, M.J. (1984): Specific stimulation of actin gene transcription by epidermal growth factor and cycloheximide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 7476-80.
- Emery, D.L. (1981): Adoptive transfer of immunity to infection with *Theileria parva* (East Coast fever) between cattle twins. *Veterinary Science* 30, 364.
- Emery, D.L., Morrison, W.I., Nelson, R.T., and Muray, M. (1981): In: *Advances in the Control of Theileriosis*. A.D. Irvin, M.P. Cunningham & A.S. Young (eds.), Nijhof, The Hague, The Netherlands, pp 295-310.
- Emery, D.L., Machugh, N.D., and Morrison, W.I. (1988): *Theileria parva* (Muguga) infects bovine T-lymphocytes in vivo and induces coexpression of BoT4 and BoT8. *Parasite Immunol.* 10, 379-391.
- Engel, J., Gunning, P., and Kedes, L. (1982): The human genome contains multiple cytoplasmic actin genes. *Mol. Cell. Biol.* 2, 674-684.
- Eperon, I.C., Janssen, J.W., Hoeijmakers, J.H.J., and Borst, P. (1988): The major transcripts of the kinetoplast DNA of *Trypanosoma brucei* are very small ribosomal RNAs. *Nucl. Acids Res.* 11, no.1, 105-125.
- Erba, H.P., Gunning, P., and Kedes, L. (1986): Nucleotide sequence of the human γ -cytoskeletal actin mRNA: anomalous evolution of vertebrate non-muscle actin genes. *Nucl. Acids Res.* 14, no.13,
- Evers, R., Hammer, A., Köck, J., Jess, W., Borst, P., Memet, S., and Cornelissen, A.W.C.A. (1989): *Trypanosoma brucei* contains two RNA Polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. *Cell*, 56, 585-597.
- Fawcett, D., Musoke, A., and Voigt, W. (1984): Interaction of sporozoites of *Theileria parva* with bovine lymphocytes in vitro. I. Early events after invasion. *Tissue and Cell* 6, 873-884.
- Fawcett, D.W., Doxsey, S., Stagg, D.A., and Young, A.S. (1982): The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Electron microscopic observations. *Eur. J. Cell Biol.* 27, 10-21.
- Feinberg, A.B. and Vogelstein (1984): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Add. Anal. Biochem.* 137, 266-267.
- Fields, S. and Winter, G. (1981): Nucleotide-sequence heterogeneity and sequence rearrangements in influenza virus cDNA. *Gene* 15, 207-214.
- Files J.G., Carr, S., and Hirsh D. (1983): Actin gene family of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*, 164, 355-375.
- Firtel, R.A., Timm, R., Kimmel, A.R., and McKeown, M. (1979): Unusual nucleotide sequence at the 5'-end of actin genes in *Dictyostelium discoideum*. *PNAS* 76, 6206-6210.

- Firtel, R.A. (1981): Multigene families encoding actin and tubulin. *Cell* 24, 6-7.
- Füchtbauer, A., Jockusch, B.M., Leberer, E., and Pette, D. (1986): Actin-serving activity copurifies with phosphofructokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 9502-06.
- Fujisaki, K., Irvin, A.D., Voigt, W.P., Leitch, B.L., and Morzaria, S.P. (1988): The establishment of infection and the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks by translation of kinetics of *Theileria parva* and the potential use of the method for parasite cloning. *Int. J. Parasitol.*, 18, no.1, 75-78
- Fyrberg, E.A., Bond, B.J., Hershey, N.D., Mixter, K.S., and Davidson, N. (1981): The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. *Cell* 24, 107-116.
- Gerhards, J., Gill, A.C., Ehrfeld, A.Y.B., Dobbelaere, D.A.E., and Williams, R.O. (1989): Isolation and characterization of RNA from the intracellular parasite *Theileria parva*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 15-24.
- Gibson, Tobi (1984): Doktorarbeit, Universität Cambridge, England.
- Goddeeris, B.M. and Morrison, W.I. (1987): The bovine autologous *Theileria* mixed leucocyte reaction: influence of monocytes and phenotype of the parasitized stimulator cell on proliferation and parasite specificity. *Immunology* 60, 63-69.
- Goddeeris, B.M., Morrison, W.I., Teale, A.J., Besaid, A., and Baldwin, C.J. (1986): Bovine cytotoxic T-cell clones specific for cells infected with the protozoan parasite *Theileria parva*: parasite strain specificity in class I major histocompatibility complex restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 5238.
- Gorman, C., Moffat, L.F., and Howard, B.H. (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051.
- Greenberg, M.E., Hermanowski, A.L., and Ziff, E.B. (1986): Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1050-56.
- Greselin, F.A., Loukin, S.H., Oka, Y., and Prescott, D.M. (1988): An analysis of the macronuclear actin genes of *Oxytricha*. *DNA* 7, no.8, 529-536.
- Grichnik, J.M., French, B.A., and Schwartz, R.J. (1988): The chicken skeletal α -actin gene promoter region exhibits partial dyad symmetry and a capacity to drive bidirectional transcription. *Mol. Cell. Biol.* 8, no.10, 4587-97.
- Gulcher, J.R. and Steffansson, K. (1988): Determination of contiguity of subclones using the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* 16, no.22, 10931.
- Guyaux, M., Cornelissen, A.W.C.A., Pays, E., Steinert, M., and Borst, P. (1985): *Trypanosoma brucei*: a surface antigen mRNA is discontinuously transcribed from two distinct chromosomes. *EMBO J.* 4, 995-998.

- Hall, B.G. (1988): Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence. *Genetic*, 120, 887-897.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hanauer, A., Levin, M., Heilig, R., Daegelen, D., Kahn, A., and Mandel, J.L. (1983): Isolation and characterization of cDNA clones for human skeletal muscle actin. *Nucleic Acid Res.* 11, 3503-3516.
- Hardeman, E.C., Chiu, C.-P., Minty, A., and Blau, H. (1986): The pattern of actin expression in human fibroblasts x mouse heterokaryons suggests that human muscle regulatory factors are produced. *Cell*, 47, 123-130.
- Hasek, J., Rupes, I., Svobodova, J., and Streiblova, E. (1987): Tubulin and actin topology during zygote formation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. General Microbiol.*, 133, 3355-63.
- Hashemi-Fesharki, R. (1988): Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol. Today* 4, no.2, 36-40.
- Hazen-Karr, C.G., Kocan, A., Kocan, K.M., and Hair, J.A. (1987): The ultrastructure of sporogony in *Theileria cervi* (Bettencourt et al., 1907) in salivary glands of female *Amblyomma americanum* (L.) ticks. *J. Parasitol.* 73, no.6, 1182-88.
- Henson, J.B. and Campbell, M. (1977): In: *Theileriosis* Int. Dev. Res. Centre (IDRC) o86c, pp1-112.
- Hickey, R.J., Boshar, M.F., and Crain Jr., W.R. (1987): Transcription of three actin genes and a repeated sequence in isolated nuclei of sea urchin embryos. *Devel. Biol.* 124, 215-227.
- Hiroimi, Y. and Hotta, Y. (1985): Actin gene mutations in *Drosophila*; heat shock activation in the indirect flight muscle. *EMBO J.* 4, no. 7, 1681-87.
- Hirono, M., Nakamura, M., Tsunemoto, M., Yasuda, T., Ohba, H., Numata, O., and Watanabe, Y. (1987): Tetrahymena actin: localization and possible biological roles of actin in Tetrahymena cells. *J. Biochem.* 102, 537-545.
- Hu, M. C.-T., Sharp, S.B., and Davidson, N. (1986): The complete sequence of the mouse skeletal α actin gene reveals several conserved and inverted repeat sequences outside of the protein coding region. *Mol. Cell. Bio.* 6, no.1, 15-25.
- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S. (1987); *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24, 227-235.
- Hue, H.K., Labbé, J.-P., Harricane, M.-C., Cavadore, J.-C., Benyamin, Y., and Roustan, C. (1988): Structural and functional variations in skeletal-muscle and scallop muscle actins. *Biochem. J.* 256, 853-859.

- Irvin, A.D., Brown, C.G.D., Kanhai, G.K., and Stagg, D.A. (1977): Establishment of *Theileria parva*-infected bovine tissue culture in swiss and athymic (nude) mice. *Veterinary, Parasitol.* 3, 141-160.
- Irvin, A.D. (1977): Tumour induction in nude mice by bovine lymphoid cells transformed by a protozoan parasite (*Theileria parva*). Proc. of the second International Workshop on Nude Mice, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977 /Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1977.
- Irvin, A.D. (1987): Control of tick borne diseases. *Int. J. Parasitol.* 17, 649-657.
- Irvin, A.D. and Cunningham, M.P. (1981): In: Diseases of cattle in the tropics. M. Ristic and W.I. McIntyre (eds.), Martinus Nijhoff, The Hague, p 393.
- Irvin, A.D., Orama, J.G.R., and Spooner, P.R. (1982): Cycle of bovine lymphoblastoid cells parasitised by *Theileria parva*. *Res. Veterinary Science* 33, 298-304.
- Jarret, W.F.H., Crichton, G.W., and Pirie, H.M. (1969): *Theileria parva*: Kinetics of replication. *Experimental Parasitology* 24, 9.
- Kabsch, W. Mannherz, A.G., and Suck, D. (1985): Three dimensional structure of the complex of actin and DNaseI at 4,5 Å resolution. *EMBO* 4, 2113-18.
- Kaine, B.P. and Spear, B.B. (1982): Nucleotide sequence of a macronuclear gene for actin in *Oxytricha fallax*. *Nature* 295, 430-432.
- Kakunaga, T., Leavitt, J. and Hamada, H. (1984): A mutation in actin associated with neoplastic transformation. *Federation Proceedings* 43, no. 8, 2275-79.
- Kawai, S. and Nishizaku, M. (1984): New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1172-1174.
- Kawamoto, T., Makino, K. Orita, S., Nakata, A., and Kakunaga, T. (1989): DNA bending and binding factors of the human β -actin promoter. *Nucl. Acids Res.* 17,no.2, 523-537.
- Kay, R. (1987): Gene targeting in *Dictyostelium*: what do cells need myosin for? *TIG* 3, no.7, 174-175.
- Khrestchatisky, M. and Fontes, M. (1987): There is an α -actin skeletal muscle-specific gene in a Salamander (*Pleurodeles waltii*). *J. Mol. Biol.* 193,409-412.
- Kindle, K.L. and Firtel, R.A. (1978): Identification and analysis of *Dictyostelium* actin genes, a family of moderately repeated genes. *Cell* 15, 763-778.
- Kocher, O. and Gabbiani, G. (1987): Analysis of α -smooth-muscle actin mRNA expression in rat aortic smooth-muscle cells using a specific cDNA probe. *Differentiation*, 34, 201-209.

- Kohama, K., Oosawa, M., Ito, T. and Maruyama, K. (1988): Physarum myosin light chain interacts with actin in a Ca^{2+} -dependent manner. *J. Biochem.* 104, 995-998.
- Kooter, J.M., De Lange, T., and Borst, P. (1984): Discontinuous synthesis of mRNA in Trypanosomes. *EMBO J.* 3, 2387-2392.
- Korn, E.D. (1978): Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, no. 2, 588-599.
- Korn, E.D., Carlier M.-F., and Pantaloni, D. (1987): Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238, 638-644.
- Kost, T.A., Theodorakis, N., and Hughes, S.H. (1983): The nucleotide sequence of the cick cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acid Res.* 11, 8287-8301.
- Krause, M. and Hirsh D. (1987): A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C.elegans*. *Cell* 49, 753-761.
- Krause, M. and Hirsh,D. (1986): The actin genes in *Caenorhabditis elegans*. In: *Cell and molecular biology of the cytoskeleton*. Jerry W. Shay (ed.). pp151. New York.
- Landfear, S.M., Miller, S.I., and Dyann, F.W. (1986): Transcriptional mapping of *Leishmania enriettii* tubulin mRNAs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 235-245.
- Langlotz, G. (1989): Entwurf einer computergesteuerten Pulsfeldelektrophorese (FIGE - 'Field Inversion Gel Electrophoresis') zur Trennung langkettiger DNA-Moleküle. Diplomarbeit. Fakultät f. Informatik und Institut f. Genetik, Universität Karlsruhe.
- Lawrence, J.B. and Singer, R.H. (1986): Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* 45, 407-415.
- Leavitt, J. and Bushar, G. (1982): Variations in expression of mutant b-actin accompanying incremental increases in human fibroblast tumorigenicity. *Cell* 28, 259-268.
- Leavitt, J., Goldman, D., Merril, C., and Kakunaga, T. (1982): Changes in gene expression accompanying chemically-induced malignant transformation of human fibroblasts. *Carcinogenesis* 3, no.1, 61-70.
- Leavitt, J., Gunning, P., Porreca, P., Ng, S.-Y., Lin, C.-S., and Kedes, L. (1984): Molecular cloning an characterization of mutant and wild-type human b-actin genes. *Mol. Cell. Biol.* 4, no. 10, 1961-69.
- Leavitt, J., Leavitt, A., and Attalah, A.M. (1980): Dissimilar modes of expression of β - and γ -actin in normal and leukemic human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 255, no.11, 4984-87.

- Leder, P., Hansen, J.N., Konkel, D., Leder, A., Nishioka, Y., and Talkington, C. (1980): Mouse globin system: A functional and evolutionary analysis. *Science* 209, 1336-1342.
- Lin, C.-S., Ng, S.-Y., Gunning, P., Kedes, L., and Leavitt, J. (1985): Identification and order of sequential mutations in β -actin genes isolated from increasingly tumorigenic human fibroblast strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6995-99.
- Lowry, O., Rosenbroughm N., Farr, A., and Randall, R. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrock, J. (eds.) (1982): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Mastro, A.M. and Pepin, K.G. (1980): Suppression of lectin-stimulated DNA synthesis in bovine lymphocytes by the tumor promotor 12-O-Tetradodecanoylphorbol-13-acetat. *Cancer Res.* 3307-12.
- Matsumoto, Y, Perry, G., Levine R.J.C., Blanton, R., Mahmoud, A.A.F., and Aikawa, M. (1988): Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature* 333, 76-78.
- Mbwambo, H.A., Mkonyi, P.A., Sondi, J., and Lekaki, K.A. (1987): Chemotherapy of field cases of East Coast fever using holofuginone lactate. *Acta Tropica* 43, no.4, 401-406.
- McKeown, M. and Firtel, R.A. (1981): Differential expression and 5'end mapping of actin genes in *Dityostelium*. *Cell* 24, 799-807.
- McKnight, S. and Kingbury, R. (1982): Transcriptional control signals of a eucaryotic protein coding gene. *Science* 217, 316-324.
- Mehlhorn, H. and Walldorf, V. (1989): *Parasitology in Focus*. H. Mehlhorn (ed), Springer Verlag, Heidelberg NY.
- Mehlhorn, H., and Schein, E. (1984): Life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23, 38-103.
- Mely-Goubert, B., Bellgrau, D., and Gerson, D.F. (1988): Cell surface energy and membrane associated actin in lymphocytes. *Cell Biophysics*, 13, no.1, 65-73.
- Merlino, G.T., Water, R.D., Chamberlain, J.P., Jackson, D.A., El-Gewely, M.R., and Kleinsmith, L.J. (1980): Cloning of sea urchin actin gene sequences for use in studying the regulation of actin gene transcription. *PNAS USA* 77, 765-769.
- Mertins, P. and Gallwitz, D.:(1987) A single intronless actin gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: nucleotide sequence and transcripts formed in homologous and heterologous yeast. *Nucl. Acids Res.* 15, no 18, 7369-79.

- Messing, J. (1983): New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 101, 20-78.
- Meyer, W.H. and Howard, T.H. (1987): Actin polymerization and its relationship to locomotion and chemokinetic response in maturing human promyelocytic leukemia cells. *Blood* 70, no.2, 363-367
- Milhausen, M., Nelson, R.G., Sather, S., Selkirk, M., and Agabian, N. (1984): Identification of a small RNA containing the Trypanosome spliced leader: a donor of the shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell* 38, 721-729.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid Res.* 16, no.3, 1215.
- Minty, A., Carvatti, J.M., Robert, B., Cohen, A., Daubas, P., Weydert, A., Gros, F., and Buckingham M.E. (1981): Mouse actin mRNAs. Construction and characterization of a recombinant plasmid molecule containing a complementary DNA transcript of mouse Iactin mRNA. *J. Biol. Chem.* 256, 1008-1017.
- Minty, A.J., Alonso, S., Caravatti, M., and Buckingham, M.E. (1982): A fetal skeletal muscle actin mRNA in the mouse and its identity with cardiac actin mRNA. *Cell* 30, 185-192.
- Minty A.J., Caravatti, M., Robert, B., Cohen, A., Daubas, P., Weydert, A., Gros, F. Buckingham, M.E. (1981): Mouse actin mRNAs. *J. Biol. Chem.* 230, no.2, 1008-1014.
- Mohun, T.J. and Garrett, N. (1987): Amphibian cytoskeletal-type actin gene is expressed exclusively in muscle tissue. *Development* 101, 393-402.
- Mohun, T.J., Brennen, S., Dathan, N., Fairman, S., and Gurdon, J.B. (1984): Cell type-specific activation of actin genes in the early amphibian embryo. *Nature* 716-721.
- Mohun, T.J., Garret, N., and Gurdon, J.B. (1986): Upstream sequences required for tissue-specific activation of the cardiac actin gene in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* 5, no.12, 3185-93.
- Mohun, T., Garrett, N., and Treisman, R. (1987): *Xenopus* cytoskeletal actin and human c-fos promoters share a conserved protein-binding site. *EMBO J.* 6, no.3, 667-673.
- Moll, G., Lohding, A., and Young, A.S. (1981): In: *Advances in the control of Theileriosis* (A.D. Irvin, M.P. Cunningham, and A.S. Young, eds.), Martinus Nijhoff, The Hague, p 56.
- Morrison, W.I. and Goddeeris, B.M. (1985): New approaches to immunization of cattle against *Theileria parva*. Joint IABS, WHO Symposium on Diagnostics and vaccines for Parasitic Diseases, Stockholm, Sweden, 1985.

- Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Teale, A.J., Baldwin, C.L., Bensaid, A., and Ellis, J. (1986b): Cell-mediated immune responses of cattle to *Theileria parva*. *Immunol. Today* 7, no. 7&8, 211-216.
- Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Teale, A.J., Grocock, S.J., and Stagg, D.A. (1987): Cytotoxic T-cells elicited in cattle challenged with *Theileria parva* (Muguga): evidence for restriction by class I MHC determinants and parasite strain specificity. *Parasite Immunol.* 9, 536-578.
- Morrison, W.I., Lalor, P.A., Goddeeris, B.M., and Teale, A.J. (1986a): Theileriosis: Antigens and host-parasite interactions. In: *Parasite Antigens*, pp167-213. T.W. Pearson (ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y & Basel.
- Mortelmans, J. and Kageruga, P. (1986): L'histoire de 80 d'observations et de recherches sur les Theileriosis au Zaire, Rwanda et Burundi. *Ann., Soc. Belge Méd. Trop.*, 66, 199-212.
- Mostow, W.R., Ferguson, A.G., Lesch, M., Decker, R.S. and Samarel, A.M. (1988): Nonrandom turnover of actin and tubulin in cultured rabbit cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 255, no.2, C202-C213.
- Mozaria, S.P., Irvin, A.D., Voigt, A.D., Voigt, W.P., and Taracha, E.L.N. (1987): Effect of timing and intensity of challenge following immunization against East Coast Fever. *Veterinary Parasitol.* 26, 29-41.
- Naccache, P.H. (1987): Signals for actin polymerization in neutrophils. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 41, 297-304.
- Nakamaye, K.L., Gish, G., Eckstein, F. and Vosberg, H.-P. (1988): Direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA fragments through the incorporation of deoxynucleoside α -thiotriphosphates. *Nucl. Acids Res.* 16, no. 21, 9947-59.
- Neitz, W.O. (1955): Corridor disease: a fatal form of bovine Theileriosis encountered in Zululand. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* 3, 121-123.
- Nellen, W. and Gallwitz, D. (1982): Actin genes and actin mRNA in *Acanthamoeba castelani*: nucleotide sequence of the split gene. *J. Mol. Biol.* 159, 1-18.
- Nellen, W., Silan, C., Saur, U., and Firtel, R.A. (1986): Regulatory sequences in the promoter of the *Dictyostelium* actin 6. *EMBO J.* 5, no.12, 3367-72.
- Nelson, D.W. and Honda, B.M. (1986): Genetic mapping of the 5S rRNA gene cluster of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Can. J. Genet. Cytol.* 28, 545-553.
- Nelson, R.G., Parsons, M., Barr, P.J., Stuart, K., Selkirk, M., and Agabia, N. (1983): Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 34, 901-909.

- Newson, J., Naessens, J., Stagg, D.A., and Black, S.J. (1986): A cell surface antigen associated with *Theileria parva lawrencei*-infected bovine lymphoid cells. *Parasite Immunol.* 8, 149-158.
- Ng, R. and Abelson, J. (1980): Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, no.7. 3912-16.
- Ng, S., Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T., and Kedes L. (1985): Evolution of the functional human β -actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol. Cell. Biol.* 5, no.10, 2720-32.
- Nyindo, M.B.A., Kaminjolo, J.S., Wagner, G.G., and Lule, M. (1978): East Coast Fever: cultivation in vitro of cell-free schizonts and merozoites of *Theileria parva* and their immunogenicity in cattle. *American J. Veterinary Res.* 39, 37-43.
- Owens, G.K., Loeb, A., Gordon, D., and Thompson M.M. (1986): Expression of smooth muscle-specific α -isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J. Cell Biol.* 102, 343-352.
- Pearson, T.W., Lundin, L.B., Dolan, T.T., and Stagg, D.A. (1979): Cell-mediated immunity to *Theileria*-transformed cell lines. *Nature*, 290, 251-254.
- Peterson, M.G. (1988): DNA sequencing using Taq polymerase. *Nucl. acids Res.* 16, no.22, 10915.
- Petrucci, T.C., Mooseker, M.S., and Morrow, J.S. (1988): A domain of synapsin I involved with actin bundling shares immunologic cross-reactivity with villin. *J. Cell. Biol.* 36, 25-35.
- Phatak, P.D., Packman, C.H., and Lichtman, M.A. (1988): Protein kinase C modulates actin conformation in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 141, 2929-34.
- Philip, P.J.M. and Mely-Goubert, B. (1988): Polymerized actin in lymphoid cells: functional interpretation. *Blood cells* 13, 467-472.
- Pinder, M., Musoke, A.J., Morison, W.I. and Roelants, G.E. (1980): The bovine lymphoid system. III. A monoclonal antibody specific for cell surface and serum IgM. *Immunology* 40, 359.
- Pollard, T.D. (1984): Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Bio.* 99, 769-777.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 987-1035.

- Ponte, P., Gunning, P., Blau, H., and Kedes, L. (1983): Human actin genes are copy for I-skeletal and I-cardiac actin but multicopy for β - and γ -cytoskeletal genes: 3'-untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. *Mol. Cell. Biol.* 3, no.10, 1783-91.
- Ponte, P., Ng, S.-Y., Engel, J., Gunning, P., and Kedes L. (1984): Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucl. Acids Res.* 12, no.3, 1687-97.
- Probst, F., Rosenberg, M.P., Oskarsson, M.K., Russel, L.B., Nguyen-Huu, A.C., Nadau, J., Jenkins, A.A., Copeland, N.G., and Vande Woude, G.F.(1988): Genetic analysis and developmental regulation of testis-specific RNA expression of *mos*, *abl*, actin and *Hox-1.4*. *Oncogene* 2, 227-233.
- Pryme, I.F. and Hesketh, J.E. (1987): Cytochalasin B binding and actin content of endoplasmic reticulum subfractions isolated from L-929 cells. *Cell Biology International Reports* 11, no.8, 615-623.
- Quader, H., Hofmann, A., and Schnepf, E. (1987) Shape and movement of the endoplasmic reticulum in onion bulb epidermis cells: possible involvement of actin. *Eur. J. Cell Biol.* 44, 17-26.
- Rackwitz, H.-R., Zehetner, G., Frischauf, A.-M., and Lehrach, H. (1984): Rapid restriction mapping of DNA cloned in lambda vectors. *Gene* 30, 195-200.
- Reddy, E.S.P. and Rao, V.N. (1985): A simple method for the detection of PolyA-containing cDNA's and a possible mechanism for the generation of rearrangements in cDNA's. *Gene Anal. Techn.* 2, 46-49.
- Romans, P. and Firtel, R. (1985): Organization of actin multigene family of *Dictyostelium discoideum* and analysis of variability in the protein coding region. *J. Mol. Biol.* 186, 321-335.
- Romans, P., Firtel, R.A., and Saxe, C.L. (1985): Gene-specific expression of the actin multigene family of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 186, 337-355.
- Rybak, S.M., Lobb, R.R., and Fett, J.W. (1988): Comparison of the effects of class 1 and class 2 heparin binding growth factors on protein synthesis and actin mRNA expression in *balb/c.3T3* cells. *J. Cell. Physiol.* 136, 312-318.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS USA* 74, 5463-5467.
- Sasonne-Corsi, P., Sisson, J.C., and Verma, I.M. (1988): Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*. *Nature* 334, 314-319.

- Schedl, T. and Dove, W.F. (1982): Mendelian analysis of the organization of actin sequences in *Physarum polycephalum*. *J. mol. Biol.* 160, 41-57.
- Seif, J., Koury, G., and Dhar, R. (1979): BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *Nucl. Acid Res.* 6, 3387-98.
- Sheldon, J.M. and Hawes, C. (1988): The actin cytoskeleton during male meiosis in *Lilium*. *Cell Biology International Reports* 12, no.6, 471-476.
- Shiels, B.R., McDougall, C., Tait, A., and Brown, C.G.D. (1986): Identification of infection-associated antigens in *Theileria annulata* transformed cells. *Parasite Immunol.* 8, 69-77.
- Shimizu, T. (1988): Localization of actin network during early development of tubifex embryos. *Development. Biol.* 125, 321-331.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stagg, D.A., Young, A.S., Leitch, B.L., Grootenhius, J.G., and Dolan, T.T. (1983): Infection of mammalian cells with *Theileria* species. *Parasitology* 86, 243-254.
- Staiger, C.J. and Schliwa M. (1987): Actin localization and function in higher plants. *Protoplasma* 141, 1-12.
- Steinbeisser, H., Hofmann, A., Stutz, F., and Trendelenburg, M.F. (1988): Different regulatory elements are required for cell-type and stage specific expression of the *Xenopus laevis* skeletal muscle actin gene upon injection in *X. laevis* oocytes and embryos. *Nucl. Acids. Res.* 16, no.8, 3233-38.
- Stoflet, E.S., Koeberl, D.D., Sarkar, G. and Sommer, S.S. (1988): Genomic amplifikation with transcript sequencing. *Science* 239, 491-494.
- Suresh, S.T. and Polito, V.S. (1988): Spatial and temporal organization of actin during hydration, activation, and germination of pollen in *Pyrus communis* L.: a population study. *Protoplasma* 147, 5-15.
- Szentkiralyi, E.M. (1987): An actin heavy chain at the actin-subfragment 1 interface is required for ATPase activity of scallop myosin. *J. Muscle Research and Cell Motility* 8, 349-357.
- Takahashi, K., Yamanoue, M., Murakami, T., Nishimura, T., and Yoshikawa, R. (1987): Paratropomyosin, a new myofibrillar protein, weakens rigor linkages formed between actin and myosin. *J. Biochem.* 102, 1187-92.
- Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F., and Hynes, R.O. (1986): Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271-282.
- Taneja, K. and Singer R.H. (1987): Use of oligodeoxynucleotide probes for quantitative in situ hybridization to actin mRNA. *Anal. Biochem.* 166, 389-398.

- Teale, A.J. and Kemp, S.J. (1987): A study of BoLA class II antigens with BoT⁴⁺ T lymphocyte clones. *Animal Genetics* 18, 17-28.
- Tobin, S.L., Zulauf, E., Sánchez, F., Craig, A., and McCarthy, B.J. (1980): Multiple actin-related sequences in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* 19, 121-131.
- Tokunaga, K., Takeda, K., Kamiyama, K., Kageyama, H., Takenaga, K., and Sakiyama, S. (1988): Isolation of cDNA clones for Mouse cytoskeletal g-actin and differential expression of cytoskeletal actin mRNAs in mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, no.9, 3929-33.
- Tokunaga, K., Taniguchi, H., Yoda, K., Shimizu, M. and Sakiyama. *Nucl. Acids Res.* 14, no.6, 2829.
- Uilenberg, G.(1981): Theileria species of domestic livestock. In: *Advances in the control of theileriosis*. D. Irvin and M.P. Cunningham (eds.), M. Nijhoff, The Hague.
- Vandekerckhove, J. and Weber K. (1979): The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation* 14, 123-133.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978): At least six different actins are expressed in a higher mammal: and analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783-802.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978): Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure an at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, no.3., 1106-1110.
- Vandekerckhove, J., Leavitt, J., Kakunaga, T., and Weber, K. (1980): Coexpression of a mutant β - and γ -cytoplasmic actins in a stably transformed human cell line. *Cell* 22, 893-899.
- Vanderkerckhove, J. and Weber, K. (1984): Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. *J. Mol. Bio.* 179, 391-413.
- Vandkerckhove J. and Weber K. (1979): The amino acid sequence of actin from chicken skeletal muscle actin and chicken gizzard smooth muscle actin. *FEBS Letters* 102, no.2, 219-222.
- Vasiliev, J.M. (1987): Actin cortex and microtubular system in morphogenesis: Cooperation and competition. *J. Cell. Sci. Suppl.* 8, 1-18.
- Vodjadani, G., Le Roscouet, D., Horth, M., Perucca-Lostanlen, D., Gallien, C., and Doly, J. (1985): Structure of mouse interferon- β cDNA clones: Sequence rearrangements in a cloned cDNA. *Biochemistry International* 10, no.3, 495-505.

- Volckaert, G., Tavernier, J., Derynk, R., Devos, R. and Fiers, W. (1981): Molecular mechanisms of nucleotide-sequence rearrangements in cDNA clones of human fibroblast interferon mRNA. *Gene* 15, 215-223.
- Wallace, P.J., Packman, C.H., Wersto, and Lichtman M.A. (1987): The effects of sulfhydryl inhibitors and cytochalasin on the cytoplasmic and cytoskeletal actin of human neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 132, 325-330.
- Waweru-Kinuthia, S. (1987): Expression of parasite specific receptors on bovine leukocyte target cells for *Theileria* sporozoite binding. Ph.D. Thesis, Faculte des Sciences Laboratoire de Chimie Biologique, Universite Libre de Bruxelles.
- Webster, P., Dobbelaere, D.A.E., and Fawcett, D.W. (1985) The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Immunoelectron microscopic observations. *Eur. J. Cell Biol.* 36, 157-162.
- Weeds, A. (1982): Actin-binding proteins - regulators of cell architecture and motility. *Nature* 296, 811-815.
- Wesseling, J.G., de Ree, J.M., Ponnudurai, T., Smits, M.A., and Schoenmakers, J.J.G. (1988): Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* actin gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 313-320.
- Wesseling, J.G., Smits, M.A., and Schoenmakers, J.G.G. (1988): Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 143-154.
- Wesseling, J.G., de Ree, J.M., Smits, M.A., and Schoenmakers J.G.G. (1988): The *Plasmodium falciparum* genome contains two different actin genes. In: 3e conférence internationale sur le paludisme et les babésiosis, Paris.
- Williamson, R.E., McCurdy, D.W., Hurley, U.A. and Perkin, J.L. (1987): Actin of *Chara* giant internodal cells. *Plant Physiol.* 85, 268-272.
- Witke, W., Schleicher, M., Lottspich, F., and Noegel, A. (1986): Studies on the transcription, translation, and structure of α -actinin in dictyostelium. *J. Cell Biol.* 103, 969-975.
- Witkowski, J.A. (1988): The discovery of "split" genes: a scientific revolution. *TIBS* 13, 110-113.
- Yin, H.L. and Hartwig, J.H. (1988): The structure of the macrophage actin skeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* 9, 169-184.
- Young, A.S., Leitch, B.L., and Omwoyo, P.L. (1979): *Vet. Rec.* 105,531.
- Young, A.S., and Leitch, B.L. (1980): A possible relationship between the development of *Theileria* species and the ecdysis of their tick hosts. *J. Parasitol.* 66, 356-359.

Yourdan; P. (1988): Promotor strength: more is less. TIG 4, no.12, 327-328.

Zaret, K.S. and Sherman, F. (1982): DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell 28, 563-573.

Zehetner, G. and Lehrach, H. (1986): A computerprogramm for restriction map analysis and manipulation. Nucl. Acid Res. 14, 335.