

KfK 4795
Oktober 1990

**Theileria parva
(Apicomplexa, Theileriidae):
Isolierung, Klonierung,
Charakterisierung und
Expression von Transkripten
des intralymphozytären
Stadiums**

J. Gerhards
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4795

Theileria parva (Apicomplexa, Theileriidae):
Isolierung, Klonierung,
Charakterisierung und Expression von Transkripten
des intralymphozytären Stadiums

Joachim Gerhards

Dissertation
genehmigt von der Fakultät II (Biologie)
der Universität Hohenheim

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

***Theileria parva* (Apicomplexa, Theileriidae): Isolierung, Klonierung, Charakterisierung und Expression von Transkripten des intralymphozytären Stadiums**

Zusammenfassung

Theileria parva ist ein intrazellulär in Rinder-Lymphozyten lebender, einzelliger Parasit. Durch die Anwesenheit des Parasiten im Zytoplasma verändert sich der Phänotyp des Lymphozyten. Auf seiner Zelloberfläche erscheinen Antigene, die von zytotoxischen T-Zellen immuner Rinder als spezifisch für infizierte Lymphozyten erkannt werden. Die infizierte Zelle wird zu einem Lymphoblasten transformiert, der sich unkontrolliert teilt und typische Eigenschaften von Tumorzellen besitzt.

Da Genprodukte des Parasiten direkt oder indirekt an diesen Veränderungen beteiligt sein müssen, wurde eine Methode zu Isolierung der Parasiten-RNA aus infizierten Lymphozyten entwickelt. Die Analyse der gewonnenen mRNA zeigte, daß sie:

- in intaktem Zustand isoliert wurde,
- keine Aktin-Transkripte der Wirtszelle in nachweisbaren Mengen enthielt,
- zu maximal 10% mit Transkripten nicht-infizierter Lymphozyten kreuzhybridisierte,
- eine geschätzte Nukleotidsequenz-Komplexität von 8.000 kb besaß und damit ca. 4.000 verschiedene Transkripte enthielt.

Der Parasit trägt nur zu etwa 10% an der Gesamt-mRNA der infizierten Lymphozyten bei. Dieser geringe Wert erklärt, warum bei Vergleich der Proteinmuster infizierter und nicht-infizierter Lymphozyten bisher nur wenige Parasiten-Proteine identifiziert werden konnten.

Von der Parasiten-mRNA wurde eine repräsentative cDNA-Genbank in dem Phagen λ gt10 erstellt. Durch diese Genbank sind die im intralymphozytären Stadium exprimierten Gene des Parasiten in Form funktioneller Einheiten erstmals direkt zugänglich.

Anhand von vier ausgewählten cDNA-Klonen wurden Wege zur Identifizierung von Parasiten-Proteinen aufgezeigt, die an der Parasit-Wirt-Beziehung beteiligt sind.

- Lokalisierung der von den cDNA-Klonen kodierten Genprodukte
Die als C-terminale Fusionsproteine in Bakterien exprimierten cDNA-Inserts wurden zur Gewinnung von cDNA-spezifischen Maus-Antisera eingesetzt. In der Immunofluoreszenz-Analyse mit infizierten Lymphozyten trat bei drei der vier Antisera eine gleichmäßige, auf den Parasiten beschränkte Fluoreszenz auf. Zwischen Oberfläche und Zytoplasma des

Parasiten konnte jedoch nicht differenziert werden. In der *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse verhielten sich die von den vier cDNA-Klonen kodierten Polypeptide wie zytosolische Proteine.

- Expression der cDNA-Klone in Säugerzellen

In klonierten Transfektanten der L4-Maus-Fibroblasten-Zelllinie, die mit den in den Expressionsvektor pSG5 umklonierten cDNA-Inserts transfiziert wurden, und die das cDNA-Konstrukt in ihrem Genom integriert hatten, konnte erstmals die Expression von Sequenzen des Parasiten in Säugerzellen auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Auch die anhand der sequenzierten Bereiche der cDNA-Klone ermittelte Kodon-Verwendung bei *T. parva* zeigte keine erheblichen Abweichungen von der Kodon-Verwendung bei Säugerzellen, so daß Parasiten-Sequenzen in Säugerzellen effizient exprimiert werden sollten.

- Phänotypische Analyse der Transfektanten

Zytotoxischen Rinder-T-Zellen, die autologe infizierte Lymphozyten spezifisch lysierten, erkannten keine der Transfektanten. In Klonierungsexperimenten konnten keine cDNA-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Klone gewonnen werden, was dafür spricht, daß auf den untersuchten cDNA-Klonen keine CTL-Epitope kodiert sind.

Im Rahmen der molekularen Charakterisierung des Parasiten wurden dessen ribosomale RNA-Transkripte identifiziert und ihre Größe für die große ribosomale RNA-Untereinheit mit 3,3 kb und für die kleine ribosomale RNA-Untereinheit mit 1,8 kb bestimmt.

Durch Sequenzierung wurde für eine der vier für den Parasiten spezifischen cDNA-Klone eine Homologie von 60% zu dem Hitzeschockprotein hsp90 anderer Organismen gefunden. Die drei anderen Klone stellen neue, bei anderen Organismen bislang nicht gefundene Gene dar. Das Genprodukt des hsp90-homologen Gens war als Antigen im Schizonten- und Sporozoiten-Stadium vorhanden. Im erythrozytären Stadium konnte die mRNA, nicht aber das Protein nachgewiesen werden. Dies spricht für eine stadienspezifische Regulation des hsp90-homologen Gens in *T. parva* auf Translationsebene.

Theileria parva (Apicomplexa, Theileriidae): Isolation, Cloning, Characterization, and Expression of Transcripts from the intralymphocytic stage

Summary

Theileria parva is an intracellular protozoan parasite of bovine lymphocytes. The phenotype of the infected lymphocyte is affected by the parasite present in the cytoplasm. The infected lymphocyte carries antigens on its surface that are recognized by specific cytotoxic T-cells (CTL). The infected cell is transformed into a lymphoblast dividing in an uncontrolled manner and exhibiting properties characteristic of tumor cells.

As parasite gene products must be involved in these changes directly or indirectly, a method has been developed to isolate parasite RNA from *T. parva* infected lymphocytes. Analyses of the isolated RNA demonstrated that:

- the isolated RNA was predominantly full length,
- the RNA did not contain detectable amounts of bovine actin transcripts
- no more than 10% of the isolated RNA cross hybridized with transcripts from non-infected bovine lymphocytes,
- the parasite RNA was composed of approx. 4,000 different transcripts representing an estimated nucleotide sequence complexity of 8,000 kb.

Only 10% of the total mRNA content of infected lymphocytes are of parasite origin. This would explain why only a few parasite proteins have been identified so far by comparing protein patterns of infected and non-infected lymphocytes.

A representative cDNA-library has been made from the isolated parasite mRNA. For the first time parasite genes expressed during the intralymphocytic stage are directly accessible as functional units through this library.

Four cDNA clones were selected to demonstrate how to identify parasite proteins that are involved in the parasite-host relationship.

- Localizing the parasite gene products encoded by the cDNAs
The cDNA inserts were expressed as C-terminal fusion proteins in bacteria and used to obtain cDNA specific mouse antisera. In immunofluorescence assays with infected

lymphocytes, three of the four antisera caused an immunofluorescence restricted to the parasite. It was not possible to differentiate between the surface and the cytoplasm of the parasite. Using the *in vitro* translation/translocation analysis all four cDNA encoded polypeptides were shown to be cytosolic proteins.

- Expressing the cDNAs in mammalian cells

The cDNA inserts subcloned into the expression vector pSG5 were transfected into L4 mouse fibroblasts. For the first time expression of *T. parva* specific sequences was demonstrated in mammalian cells on both the RNA and the protein level with cloned transfectants carrying the cDNA constructs in their genome. The codon usage of *T. parva* as determined by the cDNA sequence data did not differ significantly from the codon usage in mammalian cells indicating that parasite sequences should be expressed efficiently in mammalian cells.

- Phenotype analysis of the transfectants

Bovine cytotoxic T-cells which lysed autologous infected lymphocytes did not recognize any of the L4-transfectants. It was not possible to obtain cDNA-specific CTL clones indicating that the cDNA inserts under study did not code for CTL epitopes.

As part of characterizing the parasite on a molecular level the parasite rRNA species were identified. The large subunit rRNA is encoded by a 3.3 kb, the small subunit rRNA by a 1.8 kb transcript.

One of the four parasite specific cDNA sequences was more than 60% homologous to the heat shock protein hsp90 of other organisms. The three other clones represent new genes not isolated so far from other organisms. The gene product of the hsp90 homologue was present as a protein in the schizont and the sporozoite stage. The piroplasm contained the mRNA while the protein was not detectable indicating a translationally regulated stage specific expression of the hsp90-homologous gene of *T. parva*.

ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

INHALTSVERZEICHNIS.....	i
ABKÜRZUNGEN	iv
1. EINLEITUNG	1
1.1. Wirtszell-Spezifität des Parasiten.....	2
1.2. Veränderungen an der Zelloberfläche der Lymphozyten als Folge der Infektion durch den Parasiten.....	3
1.3. Transformation der Lymphozyten durch den Parasiten.....	5
1.4. Untersuchungen über das Schizonten-Stadium von <i>T. parva</i>	7
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	7
2. MATERIAL und METHODEN	11
2.1. Zellen und Klonierungsvektoren.....	11
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	13
2.2.1. Isolierung, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	13
2.2.1.1. Plasmid-DNA in kleinem Maßstab.....	13
2.2.1.2. Plasmid-DNA in großem Maßstab	13
2.2.1.3. λ -Phagen-DNA.....	14
2.2.1.4. Genomische DNA von eukaryontischen Zellen.....	14
2.2.1.5. Gesamt-RNA aus Säugerzellen	15
2.2.1.6. Parasiten-RNA aus infizierten Lymphozyten.....	15
2.2.1.7. Fraktionierung in membrangebundene und membranfreie RNA.....	15
2.2.1.8. Polyadenylierte RNA	16
2.2.1.9. Konzentrationsbestimmung	17
2.2.1.10. Gelelektrophorese.....	17
2.2.2. Klonierung	17
2.2.2.1. Restriktionsspaltung, Ligation und Transformation von DNA.....	17
2.2.2.2. cDNA-Klonierung	19
2.2.3. Herstellung radioaktiver Sonden.....	20
2.2.4. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranfilter.....	21
2.2.4.1. DNA-Blot.....	21
2.2.4.2. RNA-Blot.....	22
2.2.4.3. Filterabzug von λ -Genbanken	22
2.2.5. Filterhybridisierung und Autoradiographie.....	22
2.2.6. Hybridisierung in Flüssigkeit (R ₀ t).....	22
2.2.7. DNA-Sequenzierung	24

2.2.8.	<i>In vitro</i> Transkription.....	25
2.3.	Proteinchemische Methoden.....	25
2.3.1.	Expression und Isolierung von bakteriellen Fusionsproteinen.....	25
2.3.2.	Herstellung von Antisera.....	26
2.3.3.	<i>In vitro</i> Translation und <i>in vitro</i> Translokation.....	27
2.3.4.	Immunopräzipitation.....	28
2.3.5.	Eindimensionale und zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese.....	28
2.3.6.	Immunoblot.....	29
2.3.7.	Immunofluoreszenz.....	30
2.4.	Zellkultur-Techniken.....	30
2.4.1.	Kultivierung von mit <i>T. parva</i> infizierten Lymphozyten, L4-Zellen und ConA-stimulierten Lymphozyten.....	30
2.4.2.	Transfektionsmethoden.....	31
2.4.2.1.	Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation.....	31
2.4.2.2.	DEAE-Dextran-Sulfat-Methode.....	32
2.4.2.3.	Lipofektion.....	32
2.4.2.4.	Elektroporation.....	32
2.4.3.	Enzymatischer Farbttest für β -Galaktosidase auf Einzelzell-Niveau.....	33
2.4.4.	Klonierung stabil transfizierter L4-Zellen durch "limiting dilution".....	33
2.4.5.	Zytotoxischer T-Zell-Assay.....	33
2.4.6.	Klonierung von zytotoxischen Rinder-T-Zellen.....	34
2.5.	Lösungen und Medien.....	35
3.	ERGEBNISSE.....	37
3.1.	Isolierung der Parasiten-RNA aus infizierten Lymphozyten.....	37
3.1.1.	Analyse der isolierten RNA.....	39
3.1.2.	Steigerung der Ausbeute an Parasiten-RNA durch Cycloheximid-Behandlung der infizierten Lymphozyten.....	42
3.2.	Charakterisierung der Parasiten-RNA.....	44
3.2.1.	<i>In vitro</i> Translation und zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese.....	44
3.2.2.	Homologe R ₀ t-Analyse.....	47
3.2.3.	Heterologe R ₀ t-Analyse.....	51
3.3.	Klonierung von Parasiten-Transkripten.....	52
3.4.	Versuche zur Isolierung membrangebundener Translationskomplexe.....	56
3.5.	Funktionelle Analyse von <i>T. parva</i> -cDNA-Klonen.....	60
3.5.1.	Sequenzanalyse ausgewählter cDNA-Klone.....	60
3.5.2.	Lokalisierung der von den cDNA-Inserts kodierten Proteine im	

infizierten Lymphozyten.....	64
3.5.2.1. Expression der cDNA-Inserts als bakterielle Fusionsproteine.....	65
3.5.2.2. Herstellung cDNA-spezifischer Maus-Antiseren.....	66
3.5.2.3. Lokalisierung der von cDNA-Inserts kodierten Parasiten-Proteine durch Immunofluoreszenz.....	68
3.5.3. Expression der cDNA-Klone des Parasiten in Säugerzellen.....	69
3.5.3.1. Transfektion von Rinder-Lymphozyten.....	70
3.5.3.2. Transfektion von L4-Maus-Fibroblasten.....	71
3.5.3.3. Integration und Expression der cDNA-Konstrukte in den L4-Zellen.....	72
3.5.4. Analyse der L4-Transfektanten auf CTL-Epitope.....	78
3.5.4.1. Klonierung zytotoxischer T-Zellen auf L4-Transfektanten als Stimulatorzellen.....	80
3.5.5. Analyse der cDNA-Klone durch <i>in vitro</i> Translation/Translokation.....	82
3.6. Identifizierung einzelner Transkripte des Parasiten.....	88
3.6.1. Die ribosomalen RNA-Untereinheiten von <i>T. parva</i>	88
3.6.2. Der cDNA-Klon #T9 kodiert für den Translationselongationsfaktor TEF-1 α von <i>T. parva</i>	89
3.6.3. Der cDNA-Klon #T7 kodiert für ein zu den Hitzeschockproteinen der hsp83/90-Familie homologes Parasiten-Protein.....	92
3.6.4. Kodon-Verwendung bei <i>T. parva</i>	100
3.6.5. Stadienspezifische Expression der cDNA-Klone.....	102
4. DISKUSSION.....	105
4.1. Isolierung, Charakterisierung und Klonierung der Parasiten-mRNA.....	105
4.2. Wege zur Identifizierung von Parasiten-Genen, die an der Parasit- Wirt-Beziehung beteiligt sind.....	107
4.3. Identifizierte Transkripte von <i>T. parva</i> im Vergleich zu homologen Sequenzen anderer Parasiten.....	111
5. LITERATUR.....	115

Abkürzungen

(d)ATP	(Desoxy-) Adenosin-tri-phosphat
(d)CTP	(Desoxy-) Cytidin-tri-phosphat
(d)GTP	(Desoxy-) Guanosin-tri-phosphat
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bla	β-Lactamase-Gen
BoT4	Oberflächenmolekül auf Rinder-T-Zellen, entspricht dem CD4-Molekül bei menschlichen T-Zellen
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine)
BUdR	5-Brom-Deoxy-Uridin
cDNA	komplementäre DNA
ConA	Concanavalin A
cpm	Zählungen pro Minute (counts per minute)
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DEAE	Di-ethylaminethyl
DNA	Desoxyribo-Nuklein-Säure (acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-tri-phosphat
EDTA	Ethylen-di-amin-tetra-acetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetra-acetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxy-ethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hsp	Hitze-Schock-Protein
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galaktopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
OD	optische Dichte
PBL	Periphere Blut Leukozyten
PEG	Polyethylenglykol

PFU	Plaques-bildende Einheit (plaque forming unit)
PMSF	Phenyl-methylsulfonyl-fluorid
$R_{0t_{1/2}}$	R_{0t} -Wert, bei dem die Hälfte der cDNA als cDNA-RNA-Hybrid vorliegt
R_{0t}	Produkt aus RNA-Ausgangskonzentration (in M Nukleotide) und Zeit
RNA	Ribo-Nuklein-Säure (acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Na-Dodecyl-Sulfat
SRP	Signal-Erkennungs-Partikel (signal recognition particle)
TCGF	T-Zell-Wachstumsfaktor (T-cell growth factor)
TEF-1 α	Translations-Elongations-Faktor 1 α
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UTP	Uridin-tri-phosphat
UV	ultra-violett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. EINLEITUNG

Theileria parva ist ein intrazellulär lebender Parasit aus der Ordnung der Piroplasmida. Er wurde erstmals 1897 von Koch in den Erythrozyten erkrankter Rinder in Tansania beschrieben, von ihm jedoch als Jugendstadium des verwandten Parasiten *Babesia bigemina* gehalten. In den darauffolgenden Jahren wurde der Parasit als der Erreger einer eigenständigen, in weiten Teilen Zentral- und Ostafrikas verbreiteten Rinder-Krankheit, des Ostküstenfiebers oder East Coast fever (ECF) erkannt, und erhielt den heute gültigen Namen *Theileria parva* (Gonder 1910). Aufgrund einer Morbiditätsrate unter infizierten Rindern von nahezu 100% und einer Mortalitätsrate von 95% (Brocklesby *et al.* 1961) stellt das Ostküstenfieber nach der Trypanosomiasis die ökonomisch wichtigste Rinderkrankheit in dieser Region dar (Morrison *et al.* 1986). Neben der wirtschaftlichen Bedeutung liegt das wissenschaftliche Interesse an dem Parasiten in seiner Fähigkeit begründet, die von ihm infizierten Wirtszellen in einen Tumorzellen ähnlichen Phänotyp zu transformieren.

Der Lebenszyklus von *T. parva* verläuft zwischen der dreiwirtigen ixodiden Zecke *Rhipicephalus appendiculatus*, in der Gamogonie und Sporogonie stattfinden, und dem Rind, in dem der Parasit die Schizogoniestadien durchläuft. Der als Sporozoit über die Zecke in den Säugerwirt gelangte Parasit differenziert sich in Lymphozyten zu einem frei im Zytoplasma der Wirtszelle liegenden, mehrkernigen Synzytium, dem Schizonten. Dieser teilt sich synchron mit der Wirtszelle, so daß es zu einer klonalen Expansion der infizierten Lymphozyten kommt. Nach Lyse der Lymphozyten dringen die Merozoiten in Erythrozyten ein, in denen sie sich in das für die Zecke infektiöse, im englischen Sprachgebrauch als Piroplasmen bezeichnete, erythrozytäre Stadium differenzieren.

Die von *T. parva* infizierten Lymphozyten sind für die pathologischen Veränderungen im Rind verantwortlich. Die Zellen teilen sich unkontrolliert, infiltrieren zahlreiche lymphatische und nicht-lymphatische Organe und ersetzen dort normales lymphatisches Gewebe (De Martini und Moulton 1973). Rinder, die die Krankheit überleben, sind gegen die Infektion mit demselben *T. parva*-Stamm immun (Neitz 1957, Radley *et al.* 1975). Durch Übertragung von Immunseren auf nicht-infizierte Rinder konnten diese nicht gegen nachfolgende Parasiten-Infektionen geschützt werden (Muhammed *et al.*

1975). Dagegen war es möglich, Immunität zwischen chimären Zwillingsskindern durch Transfer von Lymphozyten des immunen Tieres auf das nicht-immune zu übertragen (Emery 1981). Als verantwortlich für die Immunität wurden zytotoxische T-Zellen identifiziert, die die infizierten Lymphozyten abtöten (Pearson *et al.* 1979, Emery *et al.* 1981a).

Die infizierten Wirtszellen sind daher aus mehreren Gründen von herausragendem Interesse:

- dieses Stadium ist verantwortlich für die Pathogenität;
- die Immunantwort immuner Rinder ist gegen dieses Stadium gerichtet;
- die Wirtszelle wird durch den Parasiten transformiert und verhält sich *in vivo* und *in vitro* wie eine Tumorzelle.

Die letzte Eigenschaft ermöglicht, aus Rindern isolierte infizierte Wirtszellen in Zell-Kultur zu nehmen und in Abwesenheit von Nährzellen zu vermehren (Hulliger *et al.* 1964, Malmquist *et al.* 1970).

1.1. Wirtszell-Spezifität des Parasiten

In der *in vivo* Situation im Rind werden vor allem T-Lymphozyten von *T. parva* infiziert und transformiert. Aus infizierten Rindern isolierte Zelllinien und Zellklone werden von T-Zell-spezifischen Lektinen und Antikörpern erkannt (Pinder *et al.* 1981, Baldwin *et al.* 1988). Anhand von *in vitro* Infektionsexperimenten, bei denen periphere Rinder-Leukozyten mit Sporozoiten aus Speicheldrüsen infizierter Zecken kokultiviert wurden, konnte gezeigt werden, daß T-, B- und Null-Zellen, nicht aber neutrophile Granulozyten und Monozyten als Wirtszellen dienen können (Baldwin *et al.* 1988).

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, das Wirtszell-Spektrum von *T. parva* auf andere Zell-Typen und auf Zellen anderer Tierarten künstlich zu erweitern. Brown und Gray (1981) konnten zeigen, daß *in vitro* Parasiten von infizierten Lymphozyten auf Fibroblasten als Nährzellen übertragen wurden. Die von *T. parva* infizierten Fibroblasten konnten jedoch nicht als transformierte Zelllinien erhalten werden. Versuche, ruhende oder proliferierende Milzzellen der Maus oder periphere Blut-Leukozyten des Menschen mit *T. parva in vitro* zu infizieren und zu transformieren, waren nicht erfolgreich

(Lalor und Black, in Morrison *et al.* 1986). Durch Fusion von infizierten Rinder-Lymphozyten mit Maus- und Hamster-Zellen gelang es ebenfalls nicht, den Parasiten stabil in die Nagerzellen einzuschleusen (Irvin *et al.* 1974, 1975, 1976).

1.2. Veränderungen an der Zelloberfläche der Lymphozyten als Folge der Infektion durch den Parasiten

Unabhängig von ihrer Herkunft als B-Zellen oder T-Zellen exprimieren von *T. parva* infizierte Wirtszellen T-Zell-spezifische Oberflächenantigene, die auch bei nicht-infizierten, aber proliferierenden T-Zellen vorhanden sind (Naessens *et al.* 1985). B-Zellen exprimieren nach Infektion keine Immunglobuline mehr auf ihrer Zelloberfläche (Baldwin *et al.* 1988). T-Zellen behalten die Expression ihrer T-Zell-Differenzierungsantigene auch nach Infektion bei. Manche vor der Infektion entweder CD4- oder CD8-positive T-Zellen exprimieren nach der Infektion beide Antigene. Wie aktivierte nicht-infizierte B- und T-Zellen, so exprimieren auch infizierte Lymphozyten MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Antigene (Baldwin *et al.* 1988).

Zusätzlich zu diesen Veränderungen sind Antigene auf der Zelloberfläche vorhanden, die nur für die von *T. parva* infizierten Zellen spezifisch sind. In peripheren Blut-Leukozyten (PBL) von immunen Rindern konnten zytotoxische T-Zellen (CTL) nachgewiesen werden, die infizierte Lymphozyten mit gleichen MHC-Klasse I Antigenen (autolog) *in vitro* abtöten. Autologe nicht-infizierte Lymphozyten werden ebensowenig erkannt wie infizierte Lymphozyten, die andere MHC-Klasse I Antigene tragen (allogen) (Eugui und Emery 1981, Emery *et al.* 1981b). Morrison *et al.* (1987) konnten zeigen, daß die zytotoxischen T-Zellen in den PBL immuner Rinder auch spezifisch für den *T. parva*-Stamm waren, mit dem die Rinder immunisiert worden waren. In Kultur gehaltene CTL-Klone, die von *T. parva* infizierte Lymphozyten erkannten und lysierten, waren ebenfalls sowohl für die MHC-Klasse I-Antigene auf den infizierten Lymphozyten als auch für den Parasiten-Stamm spezifisch (Goddeeris *et al.* 1986).

Zytotoxische T-Zellen sind offensichtlich in der Lage, in Zusammenhang mit MHC-Molekülen vom Parasiten induzierte Antigene auf der Zelloberfläche infizierter Lymphozyten zu erkennen. Die Spezifität der CTL für jeweils einen

Parasiten-Stamm läßt vermuten, daß der Parasit die von den CTL erkannten Antigene synthetisiert.

Versuche, diese Antigene mit Hilfe von Antikörpern auf von *T. parva* infizierten Lymphozyten nachzuweisen, blieben erfolglos. Seren immuner Rinder enthalten keine Antikörper, die spezifisch mit der Oberfläche infizierter Zellen reagieren (Creemers 1982). Auch nach Immunisierung von Mäusen mit von *T. parva* infizierten Lymphozyten konnten weder Antiseren noch monoklonale Antikörper gewonnen werden, die die Oberfläche dieser Zellen spezifisch erkennen (Pinder und Hewett 1980, Lalor 1983). Für Rinder-Lymphozyten, die mit *T. annulata* infiziert worden waren, konnten monoklonale Antikörper hergestellt werden, die spezifisch mit der Zelloberfläche der mit dieser *Theileria*-Art infizierten Lymphozyten reagierten (Shiels *et al.* 1986). Die Herkunft dieses Antigens blieb jedoch ebenso ungeklärt wie die Frage, ob das Antigen auch von zytotoxischen T-Zellen erkannt wird.

Bei allen bisher bekannten Antigenen, die als CTL-Epitope in Zusammenhang mit MHC-Klasse I-Antigenen präsentiert werden, handelt es sich um Oligopeptide, die durch Degradation von Proteinen stammen, welche endogen in der Zelle synthetisiert oder in deren Zytoplasma eingeschleust worden sind (Townsend und Bodmer 1989). Es ist daher zu vermuten, daß die CTL-Epitope auf den infizierten Lymphozyten von Parasiten-Proteinen stammen, die in das Zytoplasma der Lymphozyten gelangen. Ein Weg, die von den CTL erkannten Antigene zu identifizieren, könnte darin bestehen, Gene des Parasiten zu isolieren, die, wenn sie in Säugerzellen eingeschleust und exprimiert werden, dazu führen, daß diese Zellen von den CTL lysiert werden. Zu diesem Zweck wurde am ILRAD eine Maus-Fibroblasten-Zelllinie hergestellt, die auf ihrer Oberfläche ein als KN104 bezeichnetes Rinder-MHC-Klasse I-Molekül konstitutiv exprimiert. Diese als L4 bezeichneten Mauszellen werden von für KN104 spezifischen alloreaktiven Rinder-CTL erkannt (Toye, ILRAD, Nairobi, mündl. Mittl.). Dies bedeutet, daß die für die Erkennung und Lyse durch Rinder-CTL erforderlichen Oberflächenmoleküle auf den L4-Zellen vorhanden sind. Der für die Antigen-Präsentation endogen synthetisierter Proteine erforderliche Degradationsmechanismus scheint bei allen Zellen derselbe zu sein (Townsend und Bodmer 1989). So konnte für menschliche Fibroblasten gezeigt werden, daß sie ein endogen synthetisiertes Virusprotein in gleicher Weise prozessieren und Virus-spezifischen CTL präsentieren wie Lymphozyten (Sekaly *et al.* 1988). L4-Zellen scheinen daher als Zielzellen geeignet, um

nach Transfektion von Parasiten-Genen die resultierenden Transfektanten mit Hilfe von für infizierte Lymphozyten spezifischen und durch KN104 restringierten Rinder-CTL auf den Erwerb von CTL-Epitope hin zu untersuchen. Da jedoch Gene des Parasiten, die während des Schizonten-Stadiums exprimiert werden, nicht kloniert vorlagen, konnten diese Experimente bislang nicht durchgeführt werden.

1.3. Transformation der Lymphozyten durch den Parasiten

Von *T. parva* infizierte Lymphozyten zeigen Eigenschaften, die typisch für Tumorzellen sind. *In vitro* besitzen sie ein anscheinend unbegrenztes Wachstumspotential. Der in dieser Arbeit verwendete Zell-Klon wurde bereits über zehn Jahre in Zellkultur gehalten. Die Zellen wachsen in definierten Nährmedien, die mit Transferrin und Insulin komplementiert werden, auch in Abwesenheit von Serum (Coquerelle, mündl. Mittl.). Sie können mit hoher Effizienz durch "limiting dilution" oder Wachstum auf Weichagar kloniert werden (Nelson und Hirumi 1981, Lalor 1983).

In vivo infiltrieren infizierte Lymphozyten verschiedene Rinder-Organen und verdrängen und ersetzen dort das normale lymphoide Gewebe (De Martini und Moulton 1973). Nach Injektion in immunsupprimierte Mäuse wuchsen infizierte Rinder-Lymphozyten zu tumorartigen Zellmassen heran und bildeten Metastasen (Irvin *et al.* 1977).

Der transformierte Zustand der infizierten Lymphozyten hängt von der Gegenwart des Parasiten ab. Lymphozyten, die den Parasiten aufgrund ungleicher Verteilung während der Zellteilung verlieren, stellen nach wenigen Tagen die Zellteilung ein (Morrison *et al.* 1986). Seit einigen Jahren stehen Medikamente zur Verfügung, die Theilerien spezifisch abtöten, ohne die Wirtszelle zu schädigen (McHardy *et al.* 1984). Bei den als 993c (Parvaquone) und BW720c (Buparvaquone) bezeichneten Substanzen handelt es sich um Hydroxy-Naphthoquinon-Derivate, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Ubiquinonen in den Mitochondrien des Parasiten spezifisch dessen Elektronentransportkette blockieren (Hudson *et al.* 1985). Die Behandlung in Zellkultur gehaltener infizierter Lymphozyten mit der Substanz BW720c führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der Proliferation der Lymphozyten. Nach vier Tagen nehmen die Zellen den Phänotyp ruhender teilungsinaktiver Lymphozyten an.

Durch permanente Zugabe des Lymphokins Interleukin-2 zusammen mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) können BW720c-behandelte und dadurch von Parasiten befreite Lymphozyten erneut zu mehrere Monate anhaltender Proliferation stimuliert werden (Dobbelaere *et al.* 1988). Durch die Behandlung mit der Substanz BW720c verlieren die Lymphozyten nicht die Fähigkeit zur Proliferation. Die Umkehrung der Zellen vom proliferierenden zum ruhenden Phänotyp beruht vielmehr darauf, daß als Folge der Behandlung kein metabolisch aktiver Parasit mehr im Zytoplasma der Lymphozyten vorhanden ist. Dies bedeutet zugleich, daß die Transformation der Lymphozyten nicht das Resultat einer irreversiblen Veränderung in der Wirtszelle, z.B. in ihrem Genom, ist.

Auf welchem Weg der Parasit die Transformation aufrecht erhält, ist unbekannt. Ein experimenteller Ansatz, diese Frage zu lösen, besteht darin, Moleküle und Prozesse in den infizierten Lymphozyten zu identifizieren, von denen bereits bekannt ist, daß sie in anderen Tumorzellen an der Transformation beteiligt sind. Auf diesem Weg konnten Brown und Logan (1986) zeigen, daß infizierte Lymphozyten einen Faktor mit Interleukin-2-ähnlichen Eigenschaften sezernieren. Darüber hinaus fanden Dobbelaere *et al.* (1988) und Coquerelle *et al.* (1989) auf der Oberfläche infizierter Lymphozyten funktionell exprimierte Interleukin-2-Rezeptoren. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß sich die Lymphozyten durch autokrine Stimulation selbst zur Proliferation anregen. Ivanov *et al.* (1989) konnten zeigen, daß in infizierten Lymphozyten der Transkriptionsfaktor NF- κ B in großen Mengen exprimiert wird und konstitutiv aktiv ist. Von diesem Faktor ist bekannt, daß er an der transkriptionellen Aktivierung der Gene des Interleukin-2 und des Interleukin-2-Rezeptors beteiligt ist. Die Expression des Interleukin-2-Rezeptors und die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B waren mit der Anwesenheit des Parasiten ebenso korreliert wie mit der Teilungsaktivität der Lymphozyten. Durch Behandlung der infizierten Lymphozyten mit der Substanz BW720c ging innerhalb von drei Tagen die Proliferation der Zellen zurück, und in gleicher Weise nahm die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B und die Transkription des Interleukin-2-Rezeptor-Gens ab.

Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Abnahme der NF- κ B-Aktivität und der Expression des Interleukin-2-Rezeptors die Ursache oder die Folge der Rückkehr der Zellen zum ruhenden Zustand ist.

1.4. Untersuchungen über das Schizonten-Stadium von *T. parva*

Von Nyormoi *et al.* (1981) wurde eine Methode zur Isolierung von Schizonten aus infizierten Lymphozyten entwickelt. Durch Auftrennung von Lysaten isolierter Parasiten durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese konnten insgesamt nur 22 Proteine identifiziert werden (Creemers 1983). Erst 1989 wiesen Sugimoto *et al.* durch Verwendung eines sensitiveren Verfahrens ca. 100 Parasiten-Proteine nach. Antiseren, die durch Immunisierung mit isolierten Parasiten gewonnen worden waren, erkannten ebenfalls nur wenige Parasiten-Proteine im isolierten Parasiten (Creemers 1983). Keines dieser Proteine wurde jedoch isoliert und in seiner Funktion analysiert.

Um Gene des Parasiten zu klonieren, die während der Schizontenphase exprimiert werden, wurde eine cDNA-Genbank aus mRNA von durch *T. parva* infizierten Lymphozyten hergestellt. Um für den Parasiten spezifische cDNA-Klone zu isolieren, wurde die Genbank mit mRNA der infizierten Lymphozyten und mit mRNA der mit der Substanz BW720c behandelten Lymphozyten hybridisiert und nach solchen Klonen gesucht, die mit der ersten, nicht aber der zweiten mRNA reagierten. Über diesen Weg konnte jedoch nicht ein einziger für den Parasiten spezifischer cDNA-Klon isoliert werden (Gill, mündl. Mittl.). Das einzige Gen von *T. parva*, das als cDNA kloniert vorlag und im Schizonten-Stadium exprimiert wird, war das Aktin-Gen (Ehrfeld 1989).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Der Parasit ist sowohl an der Transformation als auch an der Expression von CTL-Epitopen auf der Oberfläche infizierter Lymphozyten direkt beteiligt. Für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustands steuert der Parasit offensichtlich ein oder mehrere Produkte bei, die in den Zellzyklus des Lymphozyten eingreifen. Zwar kann von vorne herein nicht entschieden werden, ob es sich dabei um niedermolekulare Substanzen oder um Makromoleküle handelt. In jedem Fall sind jedoch die aktiven Lebensprozesse des Parasiten und damit direkt oder indirekt seine Genprodukte beteiligt. Die CTL-Epitope stammen sehr wahrscheinlich direkt von Parasiten-Proteinen ab. Dafür spricht die Spezifität der CTL für jeweils einen Parasiten-Stamm sowie der Befund, daß die in Zusammenhang mit MHC-Klasse I-Antigenen präsentierten CTL-

Epitope in anderen Systemen als Oligopeptide identifiziert wurden, die von endogen synthetisierten oder in das Zytoplasma eingeschleusten Proteinen stammen. Für eine Aufklärung der Mechanismen, durch die der Parasit seine Wirtszelle verändert, ist daher die Untersuchung der innerhalb des Lymphozyten vom Parasiten synthetisierten Proteine sinnvoll.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, Gene des Parasiten zu klonieren, die im Schizonten-Stadium exprimiert sind, über die klonierten Gene unabhängig von der Parasitenzelle einzelne Proteine des Parasiten zu synthetisieren, und diese daraufhin zu analysieren, ob sie an den phänotypischen Veränderungen der infizierten Lymphozyten beteiligt sind.

Zu diesem Zweck soll eine Methode entwickelt werden, die mRNA des Parasiten aus den an RNA reichen Lymphozyten zu isolieren. Zur Klonierung der im Schizonten-Stadium exprimierten Gene kann die mRNA des Parasiten entweder als Sonde eingesetzt werden, um in der cDNA-Genbank aus mRNA infizierter Lymphozyten nach cDNA-Klonen zu suchen, die für den Parasiten spezifisch sind. Oder die mRNA des Parasiten wird dazu verwendet, eine für den Parasiten spezifische cDNA-Genbank herzustellen.

Darüber hinaus soll die mRNA des Parasiten eingesetzt werden um abzuschätzen, wieviele Gene der Parasit im Schizonten-Stadium exprimiert. Wenn nur die durch Proteinstudien an isolierten Parasiten gefundene geringe Anzahl an Genen aktiv ist, sollen diese Gene einzeln in Säugerzellen eingeschleust werden, um anhand des Phänotyps transfizierter Säugerzellen diejenigen Gene des Parasiten zu identifizieren, die an den Parasit-Wirt-Beziehung beteiligt sind.

Sind jedoch erheblich mehr Gene in dem Schizonten-Stadium aktiv, soll nach Genen für solche Proteine gesucht werden, die vom Parasiten entweder auf seiner Oberfläche exprimiert oder von ihm sezerniert werden. Diese Proteine stehen aufgrund ihrer Lokalisation in direktem Kontakt mit dem Zytoplasma der Lymphozyten. Es ist daher wahrscheinlich, daß sie mit Komponenten der Lymphozyten interagieren und damit in der Parasit-Wirt-Beziehung von Bedeutung sind.

Isolierte cDNA-Klone sollen charakterisiert werden: es soll nachgewiesen werden, daß die Klone vom Parasiten stammen, ihre Nukleinsäure-Sequenz

soll mit Sequenzen bereits bekannter Gene anderer Organismen verglichen werden, um anhand vorhandener Homologien Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der von den Genen kodierten Proteine ziehen zu können, und die von den Genen kodierten Proteine sollen in den von *T. parva* infizierten Lymphozyten lokalisiert werden.

Isolierte cDNA-Klone sollen in Säugerzellen exprimiert werden um zu untersuchen, ob die von den isolierten cDNA-Klonen kodierten Proteine an der Transformation oder an der Expression von CTL-Epitopen in den infizierten Lymphozyten beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollen die cDNA-Klone in einen für Säugerzellen funktionsfähigen Expressionsvektor kloniert, die resultierenden Konstrukte in Säugerzellen stabil transfiziert, und in den Transfektanten zunächst untersucht werden, ob Gene von *T. parva* in Säugerzellen überhaupt exprimiert werden können. Wenn dies der Fall ist, sollen die Transfektanten auf die Transformation und die Expression von CTL-Epitopen analysiert werden.

Die ideale Zielzelle für diese Transfektionsexperimente ist der von *T. parva* infizierte Lymphozyt selbst. Da der Parasit nur Rinder-Lymphozyten transformiert, ist für die Suche nach den für die Transformation verantwortlichen Genen des Parasiten anscheinend nur der genetische Hintergrund dieser Zellen geeignet. Infizierte Lymphozyten bieten darüber hinaus den Vorteil, daß sie durch Behandlung mit der Substanz BW720c vom Parasiten befreit werden können. So kann nach Einschleusen von Parasiten-Genen analysiert werden, ob dieselbe Zelle nach Entfernen des Parasiten noch die gleiche(n) Eigenschaft(en) besitzt wie während des infizierten Zustands. Um diese Analyse durchführen zu können, müssen die in die Lymphozyten eingeschleusten Gene über mehrere Zellteilungen hinweg stabil weitergegeben werden. Eine Methode zur stabilen Transfektion von Rinder-Lymphozyten ist daher erforderlich.

Für die Transfektionsexperimente stehen als Alternative zu Rinder-Lymphozyten die am ILRAD hergestellte und leicht zu transfizierende Maus-Fibroblasten-Zelllinie L4 zur Verfügung. Diese permanent wachsende Zelllinie kann nicht dazu eingesetzt werden, isolierte cDNA-Klone durch Transfektion daraufhin zu untersuchen, ob sie an der Transformation beteiligt sind. Durch die Expression des Rinder-MHC-Klasse I-Moleküls KN104 auf ihrer Oberfläche scheinen die L4-Zellen jedoch dazu geeignet zu sein, auf isolierten cDNA-

Klonen kodierte CTL-Epitope nachzuweisen. Zu diesem Zweck sollen L4-Zellen mit entsprechenden cDNA-Konstrukten stabil transfiziert, die Expression der eingeschleusten cDNA in den Transfektanten nachgewiesen, und diese als Zielzellen in CTL-Assays mit Rinder-CTL, die durch KN104 restringiert und für von *T. parva* infizierte Lymphozyten spezifisch sind, eingesetzt werden.

2. MATERIAL und METHODEN

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien von den Firmen Fluka, Merck, Serva oder Sigma bezogen.

2.1. Zellen und Klonierungsvektoren

a) Eukaryontische Zellen

- TpM 803 (Emery *et al.* 1981), von *T. parva* Muguga infizierter Rinder-Lymphozyten-Klon
- E98-Tp (Goddeeris *et al.* 1990), von *T. parva* Muguga infizierter Rinder-Lymphozyten-Klon
- E98-ConA (ILRAD), nicht-infizierte ConA-Rinder-Lymphoblasten-Zelllinie
- ConA-stimulierte Rinder-Leukozyten, aus Lymphknoten isoliert*
- periphere Rinder-Leukozyten, aus Blut isoliert
- L4-Mausfibroblasten-Zelllinie (ILRAD), exprimiert auf ihrer Oberfläche das Rinder-MHC-Klasse I-Antigen KN104 (Toye, mündl. Mittl.)

b) *Escherichia coli*-Stämme

- TG1, supE, hsd Δ 5, thi Δ (lac-proAB), F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15] (Gibson 1984), Wirt für die Klonierung mit pUC19- und pSG5-Vektoren
- C600, supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21 (Huynh *et al.* 1985), Wirt für die Präparation von λ -Phagen-DNA
- C600hflA, wie C600, hflA [chr::Tn10(tet^R)] (Huynh *et al.* 1985), Wirt für die Klonierung von rekombinierten λ gt10-Phagen
- 537, wie C600, pI857 (kan^R, hitzelabiler λ cI-Repressor) (Klinkert *et al.* 1988), Wirt für die induzierbare Expression von pEX34-kodierten Fusionsproteinen

c) Plasmide

- pSV2-neo (Southern und Berg 1982), vermittelt nach Transfektion in Säugierzellen Resistenz gegen das Antibiotikum G418
- pCH110 (Pharmacia, Kat.Nr. 27-4508-01)

* Diese Zellen wurden von Frau Dr. Baumann, KFK Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

d) Klonierungsvektoren

- λ gt10 (Huynh *et al.* 1985),
Insertion von DNA-Fragmenten in die *EcoRI*-Schnittstelle im Genlokus *imm434* führt nach Infektion von *E. coli* C600hflA zur Lyse der Bakterien.
- pUC19 (Norrander *et al.* 1983)
Insertion von DNA-Fragmenten in die Multiklonierungsstelle im *lacZ'* Gen verhindert die α -Komplementation nach Transfektion in *E. coli* TG1. In Gegenwart von X-Gal sind Bakterienkolonien mit Vektor blau, mit rekombiniertem Vektor weiß.
- pEX34 a/b/c (Klinkert *et al.* 1988, Abb. 1),
Dieses Vektorsystem dient zur Expression von in die Multiklonierungsstelle subklonierten Inserts in Form C-terminaler MS2-Polymerase-Fusionsproteine. Die Sequenz für den MS2-Polymerase-Teil kodiert für 100 Aminosäuren. Nach Transfektion in *E. coli* 537 wird das Fusionsprotein nur dann exprimiert, wenn durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von 28⁰ C auf 42⁰ C die Repression des P_L-Promotors durch den hitzelablen cI-Repressor aufgehoben wird.
- pSG5 (Green *et al.* 1988, Abb. 2)
Vektor zur *in vitro* Transkription von Inserts und zur Expression von Inserts in Säugerzellen

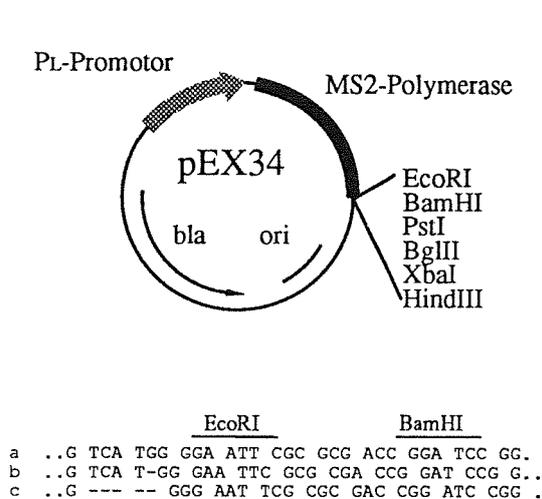


Abb.1 Karte des Plasmids pEX34a/b/c
(nach Strebel *et al.* 1986, Klinkert *et al.* 1988)

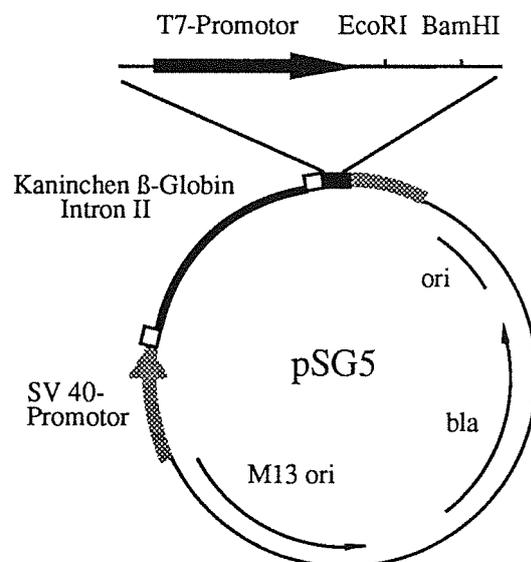


Abb. 2 Karte des Plasmids pSG5
(nach Green *et al.* 1988)

2.2. Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Methoden nach Maniatis *et al.* (1982) und Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.2.1. Isolierung, Reinigung und Nachweis von Nukleinsäuren

2.2.1.1. Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Eine Bakterien-Kolonie mit dem entsprechenden Plasmid wurde in 2 ml YT-Medium in Gegenwart von $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Ampicillin bei 37°C für 16 h geschüttelt, die Bakterien sedimentiert, in 0,2 ml Lösung 1 resuspendiert, 0,4 ml Lösung 2 zugegeben, 5 min auf Eis inkubiert, 0,3 ml Lösung 3 zugegeben, weitere 5 min auf Eis inkubiert und nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 g die Plasmid-DNA aus der wässrigen Phase durch Extraktion mit 0,6 ml Phenol/Chloroform gereinigt und durch Zugabe von 0,6 ml Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das DNA-Präzipitat in $50 \mu\text{l}$ TE in Gegenwart von $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DNase-freier RNase gelöst.

2.2.1.2. Plasmid-DNA in großem Maßstab

200 ml YT-Medium mit $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Ampicillin wurden mit 5 ml einer 6 - 10 h alten Vorkultur des entsprechenden Bakterienstamms 16 h bei 37°C geschüttelt, die Bakterien durch Zentrifugation bei 5.000 g und 4°C sedimentiert, in 10 ml Lösung 1 in Gegenwart von 100 mg Lysozym resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert, 20 ml Lösung 2 zugegeben, wieder 10 min auf Eis inkubiert, 15 ml Lösung 3 zugegeben und nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis die Lösung bei 20.000 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert. Die durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol zu dem Überstand gefällte DNA wurde nach Sedimentieren in 4 ml TE gelöst, 4 g CsCl und $50 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid (10 mg ml^{-1}) zugegeben und die Lösung in VTI 65 Beckman Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen eingeschweißt. Nach 16 h Zentrifugation bei 55.000 rpm im Beckman VTI 65-Rotor wurde die untere der beiden distinkten DNA-Banden isoliert, CsCl durch Dialyse gegen ein 1.000-faches Volumen NTE bei 4°C entfernt, die DNA durch Extraktion mit demselben Volumen Phenol/Chloroform gereinigt, durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt und nach Waschen des sedimentierten DNA-Präzipitats mit 70% Ethanol in 0,5 ml TE gelöst.

2.2.1.3. λ -Phagen-DNA

Eine Kolonie des Bakterienstamms C600 wurde in 10 ml NZCYM/0,4% Maltose für 16 h bei 37⁰ C geschüttelt, die bei 5.000 g sedimentierten Bakterien in 5 ml SM resuspendiert und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurde mit Verdünnungen der Phagensuspension (abhängig vom Phagentiter) 30 min bei 37⁰ C inkubiert und nach Zugabe von 15 ml NZCYM bei 37⁰ C 8 - 10 h geschüttelt, bis die Kultur lysierte. Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform und Zentrifugation bei 5.000 rpm wurde der Überstand mit DNase und RNase (jeweils 10 μ g ml⁻¹) 1 h bei 37⁰ C inkubiert, und die Phagen nach Zugabe eines gleichen Volumens 2,5 M NaCl/20% PEG 6000 und 1 h Inkubation auf Eis durch Zentrifugation bei 3.000 rpm sedimentiert. Von den in 0,5 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0/10 mM EDTA resuspendierten Phagen wurde die DNA durch Extraktion mit gleichem Volumen Phenol und Phenol/Chloroform gereinigt, nach Zugabe von 50 μ l 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 0,3 ml Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 μ l TE gelöst.

2.2.1.4. Genomische DNA von eukaryontischen Zellen

Durch Inkubation in PBS/0,6 M EDTA wurden die adhärent wachsenden L4-Zellen bei 37⁰ C suspendiert. 5 x 10⁵ Lymphozyten bzw. suspendierte L4-Zellen wurden nach Zentrifugation bei 1.200 rpm in 10 ml kaltem Homogenisationspuffer (0,3 M Saccharose/10 mM Tris-HCl, pH 8,0/10 mM NaCl/1,5 mM Mg-Acetat/0,1% Nonidet-P40/1 mM DTT) suspendiert, durch einen Dounce-Homogenisator aufgebrochen, die Zellkerne bei 4⁰ C für 5 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert, in 10 ml NTE aufgenommen und nach Zugabe von 1 mg Proteinase K und 0,5 ml 10% SDS für 3 - 4 h bei 37⁰ C inkubiert. Nach Extraktion mit demselben Volumen Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform wurde die DNA mit 20 ml Ethanol gefällt, in 70% Ethanol gewaschen und in 0,2 ml TE gelöst.

Genomische DNA von Rinder-Zellen und genomische DNA des Parasiten aus den erythrozytären Stadien infizierter Rinder-Erythrozyten war von anderer Seite verfügbar*.

* Die DNA wurde von Dr. Williams, KFK Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

2.2.1.5. Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Es wurde die Methode nach Carrington *et al.* (1985) verwendet. Nach Waschen von $0,5 - 2 \times 10^8$ suspendierten Zellen in NTE wurden diese in 1 ml NTE aufgenommen und in 40 ml 80°C heißer RNA-Extraktionslösung lysiert. Nach Phasentrennung wurde die RNA in der wässrigen Phase durch Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion gereinigt, mit 3 Volumen Ethanol 16 h bei -20°C präzipitiert und in 40 - 100 μl Aqua dest. gelöst.

2.2.1.6. Parasiten-RNA aus infizierten Lymphozyten

Die Methode wurde im Rahmen dieser Untersuchungen neu entwickelt (Gerhards *et al.* 1989). Infizierte Lymphozyten einer auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen ml^{-1} hochgewachsenen Kultur wurden 24 h in Gegenwart von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cycloheximid kultiviert, nach Waschen in NTE bei einer Zelldichte von $3 - 4 \times 10^7$ Zellen ml^{-1} in kaltem NTE resuspendiert und 20 ml der Zellsuspension mit einem eng angepassten, vorgekühltem Dounce-Zellhomogenisator durch 10 Stöße innerhalb von 2 min aufgebrochen. 10 ml der Suspension wurden auf einen Dichtestufen-Gradienten aus 10 ml 5% isotonem Percoll und 5 ml 25%igem isotonem Percoll (isotones Percoll: 9 Volumen Percoll (Pharmacia) und 1 Volumen $10 \times \text{NTE}$) aufgetragen, 20 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert, das Interphasenmaterial zwischen der 5% und der 25%-Stufe gesammelt, in NTE gewaschen, in 1 ml NTE resuspendiert und zu 14 ml 80°C heißem RNA-Extraktionspuffer gegeben. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform und Chloroform wurde die RNA nach Zugabe von 3 Volumen Ethanol 16 h bei -20°C gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 μl Aqua dest. gelöst. Vorhandene DNA wurde durch RNase-freie DNase (RQ1, Promega) entfernt.

2.2.1.7. Fraktionierung in membrangebundene und membranfreie RNA

Es wurde die Methode nach Mechler und Rabbits (1981) angewendet. Auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen ml^{-1} hochgewachsene infizierte Lymphozyten wurden auf 2×10^6 Zellen ml^{-1} in frischem Medium konzentriert, 45 min bei 37°C inkubiert, nach zweimaligem Waschen in $0,1 \text{ M KCl}/1,5 \text{ mM MgCl}_2/10 \text{ mM Tris-HCl}$, pH 7,4 bei einer Dichte von 5×10^8 Zellen ml^{-1} in $10 \text{ mM KCl}/1,5 \text{ mM MgCl}_2/10 \text{ mM Tris-HCl}$, pH 7,4 5 min auf Eis inkubiert und mit einem Dounce-Zellhomogenisator aufgebrochen. Nach Zentrifugation bei 1.000 g für 2 min wurde der Überstand mit 5 Volumen $2,5 \text{ M Saccharose}/0,15 \text{ M KCl}/5 \text{ mM MgCl}_2/50 \text{ mM Tris-HCl}$, pH 7,4 gemischt und 3 ml der Lösung auf 1,5 ml

2,5 M Saccharose/0,15 M KCl/5 mM MgCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7,4 in ein 13 ml Beckman Polystyren-SW40-Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Überschichten mit 6 ml 2,05M Saccharose/0,15 M KCl/5 mM MgCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7,4 und 1,5 ml 1,3M Saccharose/0,15 M KCl/5 mM MgCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7,4 wurde der Gradient in einem SW40-Rotor für 5 h bei 25.000 rpm und 4⁰ C zentrifugiert. Das Interphasenmaterial zwischen der 1,3 M Saccharose- und 2,05 M Saccharose-Dichtestufe wurde als Membranfraktion, das zwischen der 2,05 M Saccharose und 2,5 M Saccharose-Dichtestufe liegende Material als membranfreie Fraktion isoliert, mit 2 Volumen Aqua dest. verdünnt und die RNA mit 80⁰ C heißem RNA-Extraktionspuffer wie beschrieben isoliert.

Zur Fraktionierung der Parasiten-RNA wurde das Interphasen-Material des Percoll-Dichtestufen-Gradienten (Abschnitt 2.2.1.6.) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4/ 10 mM KCl/1,5 mM MgCl₂ gewaschen und in 1 ml dieser Lösung resuspendiert. Nach Durchtritt der Suspension durch eine French-Pressure-Cell-Press (American Instruments Company, freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie der Universität Karlsruhe zur Verfügung gestellt) bei Austrittsdruckwerten von 500 - 9.000 PSI (3,5 - 63 x 10⁵ Pa) zum Aufbrechen der Parasiten wurde die Lösung mit 5 Volumen 2,5M Saccharose/0,15 M KCl/5 mM MgCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7,4 gemischt und durch Zentrifugation in Saccharose-Dichtestufen-Gradienten wie beschrieben fraktioniert. Als mittlere Stufe wurde 2,05 M, 2,0 M, 1,9 M oder 1,87 M Saccharose, als oberste Stufe 1,3 M oder 1,1 M Saccharose in 0,15 M KCl/5 mM MgCl₂/50 mM Tris-HCl, pH 7,4 verwendet.

2.2.1.8. Polyadenylierte RNA

Gesamt-RNA wurde in RNA-Bindungspuffer (0,5 M NaCl/10 mM Tris-HCl, pH 7,4/1 mM EDTA/0,1% SDS) aufgenommen, 5 min bei 65⁰ C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit in RNA-Bindungspuffer äquilibrierter oligo-dT-Zellulose-Suspension (Collaborative Research) (0,1 ml pro mg RNA) bei Raumtemperatur 1 h gemischt. Nach Waschen der oligo-dT-Zellulose-Suspension mit zweimal 5 Volumen RNA-Bindungspuffer und mit zweimal 5 Volumen 0,1 M NaCl/10 mM Tris-HCl, pH 7,4/1 mM EDTA/0,1% SDS wurde die polyadenylierte RNA mit dreimal 3 Volumen Aqua dest. eluiert und nach Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,3 mit 3 Volumen Ethanol bei -20⁰ C für 16 h präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in Aqua dest. gelöst.

2.2.1.9. Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäure-Konzentration c wurde photometrisch aus der Extinktion E der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm nach $E = \epsilon \times c \times d$ in 1 cm dicken Quarzküvetten bestimmt, wobei der Extinktionskoeffizient ϵ für DNA $50 \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$ und für RNA $40 \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$ beträgt.

2.2.1.10. Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proben wurden $8 \mu\text{l}$ RNA-Lösungen ($0,3 - 10 \mu\text{g}$ RNA) mit $14 \mu\text{l}$ RNA-Denaturierungslösung gemischt, bei 55°C 10 min inkubiert und $2 \mu\text{l}$ 0,4% Bromphenolblau zugegeben. DNA-Lösungen ($10 - 1.000 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) wurden mit 0,2 Volumen 0,25% Bromphenolblau/0,25% Xylencyanol/25% Ficoll Typ 400 gemischt. 8 - 14 g Agarose (Sigma Typ 2) wurden durch Kochen in 1 l TBE (DNA) bzw. 1 l 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6,8 (RNA) gelöst, 70 ml nach Abkühlen auf 50°C in Horizontal-Gelkammern mit Gelkammern gegossen, nach Erstarren des Gels die Kämme entfernt, das Gel in TBE/ $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid bzw. 10 mM Na-Phosphat-Puffer in der Elektrophoresekammer untergetaucht, die Proben in die Geltaschen aufgetragen, und die Elektrophorese bei 100 V (DNA) bzw. 75 V (RNA) 1 - 4 h durchgeführt. Als Größenstandard für die DNA diente *Hind*III- oder *Bst*EII-geschnittene λ -DNA (BRL) bzw. ribosomale RNA von *E. coli* und Rind. Nach der Elektrophorese wurden RNA-Gele durch 10 min Inkubation in 33 mg l^{-1} Acridinorange in 10 mM Na-Phosphat-Puffer und dreimaligem Waschen in demselben Puffer gefärbt. DNA und RNA wurden durch UV-Bestrahlung (302 nm) im Gel sichtbar gemacht und photographiert.

2.2.2. Klonierung

2.2.2.1. Restriktionsspaltung, Ligation und Transformation von DNA

a) Restriktionsspaltung

Plasmid-DNA ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden mit 2 - 10 units Restriktionsenzym (Boehringer Mannheim, BRL, New England Biolabs, Pharmacia, Promega) pro μg DNA in Gegenwart des vom Enzymhersteller angegebenen Puffers bei 37°C 2 h inkubiert, und durch Zugabe von $1 \mu\text{l}$ 0,25 M EDTA, pH 8.0 pro $10 \mu\text{l}$ Restriktionsansatz die enzymatische Reaktion abgebrochen. Bei genomischer DNA wurden Enzymmenge und Inkubationszeit verdoppelt.

b) Elution von DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Auftrennung und Lokalisierung in Agarose-Gelen (Sigma Typ 7) wurden die gewünschten Fragmente als Agarose-Block ausgeschnitten, 3 Volumen Aqua dest. zugegeben, 10 min bei 65⁰ C inkubiert, und nach Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform die eluierte DNA nach Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 0,6 Volumen Isopropanol gefällt.

c) Ligation

Vektorplasmide wurden mit dem gewünschten Restriktionsenzym geschnitten, zur Dephosphorylierung mit 1 unit alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim) pro µg DNA 30 min bei 37⁰ C inkubiert, und die DNA wie beschrieben aufgereinigt und präzipitiert. In einem Volumen von 10 µl wurden 50 ng des so vorbereiteten Vektorplasmids zusammen mit 10 - 100 ng des eluierten Restriktionsfragments in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6/ 10 mM MgCl₂/10 mM DTT/1mM ATP in Gegenwart von 0,5 - 1 units T4-DNA-Ligase (Amersham oder BRL) bei 15⁰ C 2 - 16 h inkubiert, und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 10 mM EDTA, pH 8,0 beendet.

d) Transformation in kompetente *E. coli*-Bakterien

Es wurde die Methode nach Hanahan (1983) verwendet. 100 ml SOB wurden mit dem für das Vektorplasmid geeigneten Bakterienstamm angeimpft, die Kultur bei 37⁰ C (*E. coli* 537 bei 28⁰ C) bis zu einer OD₅₆₀ von 0,3 - 0,35 geschüttelt, 10 min auf Eis inkubiert, die Bakterien bei 3.000 rpm für 10 min bei 4⁰ C sedimentiert, in 20 ml STB resuspendiert, nach 20 min Inkubation auf Eis erneut sedimentiert, in 4 ml STB resuspendiert, in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80⁰ C gelagert. 0,2 ml bei 4⁰ C aufgetaute Zellen wurden mit 2 - 10 µl Ligationsansatz (nach Zugabe von EDTA) gemischt, 1 h auf Eis, 5 min bei 37⁰ C und 2 min erneut auf Eis inkubiert, durch Zentrifugation bei 3.000 rpm sedimentiert, in 1 ml SOB/20 mM Glukose für 30 min bei 37⁰ C inkubiert, 10 - 500 µl der Bakteriensuspension in Petrischalen auf H-Agar mit 0,1 mg ml⁻¹ Ampicillin ausplattiert und bei 37⁰ C (*E. coli* 537 bei 28⁰ C) für 16 h inkubiert. Bei Verwendung des Vektors pUC19 wurde vor Ausplattieren der Bakterien 40 µl 2% X-Gal und 10 µl 2% IPTG auf dem Agar ausgestrichen. Bakterien mit rekombinierter DNA wurden durch Restriktionsanalyse der in kleinem Maßstab isolierten Plasmid-DNA identifiziert.

2.2.2.2. cDNA-Klonierung

Zur Herstellung doppelsträngiger, glattendiger cDNA nach der Methode von Gubler und Hoffman (1983) wurde der cDNA-Synthese-Kit von Amersham (RPN.1256) mit Enzymen und Puffern eingesetzt. 5 µg polyadenylierte Parasiten-RNA wurden in Gegenwart von 20 kBq [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (Amersham) in doppelsträngige cDNA umgesetzt, und die cDNA-Ausbeute nach der Synthese des 1. Strangs und des 2. Strangs anhand des Anteils präzipitierbarer Radioaktivität bestimmt. Nach Sephadex G50-Chromatographie (2.2.3.) und Extraktion mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform und Chloroform wurde die cDNA durch Zugabe eines gleichen Volumens 4 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol bei -20°C für 16 h gefällt.

Zur Methylierung interner *EcoRI*-Schnittstellen wurden 2 µg cDNA in 0,1 ml 0,1 M NaCl/0,1 M Tris-HCl, pH 8,0/1 mM EDTA/0,3 mM S-Adenosyl-Methionin/0,1 mg ml⁻¹ BSA in Gegenwart von 400 units *EcoRI*-Methylase (New England Biolabs) 1 h bei 37°C inkubiert und nach Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion durch Zugabe von 100 µl 4 M Ammoniumacetat und 400 µl Ethanol bei -20°C für 16 h gefällt.

Um die cDNA mit überhängenden *EcoRI*-Schnittstellen zu versehen, wurde die präzipitierte cDNA mit 2 µg phosphorylierten *EcoRI*-Linkern (New England Biolabs, Sequenz: CCGGAATTCCGG) in 30 µl 10 mM MgCl₂/10 mM DTT/50 mM Tris-HCl, pH 8,0/1 mM ATP in Gegenwart von 10 units T4-DNA-Ligase (Amersham) 30 min bei Raumtemperatur und dann 16 h bei 4°C inkubiert. Nach Denaturierung der Ligase durch 10 min Inkubation bei 65°C wurde die DNA in Gegenwart von 340 units *EcoRI* nach Einstellen der Lösung auf 0,1 M NaCl/50 mM Tris-HCl, pH 7,5/5 mM MgCl₂ in 0,2 ml Gesamtvolumen 6 h bei 37°C inkubiert, 10 µl 0,25 M EDTA, pH 8,0 zugegeben, mit 0,21 ml Phenol/Chloroform zweimal extrahiert, und nach Sephadex G50-Chromatographie in 2 M Ammoniumacetat die DNA mit 2 Volumen Ethanol bei -20°C für 16 h gefällt.

Die in 10 µl Aqua dest. gelöste cDNA wurde durch Elektrophorese in einem 1% Agarosegel nach der Größe aufgetrennt, in zwei Größenfraktionen von 0,8 - 0,3 kb und größer 0,8 kb durch Elektrophorese auf DEAE-Zellulose-Filterstreifen (Schleicher und Schüll NA 45) gebracht und von diesen in 0,5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0/1 M NaCl/10 mM EDTA bei 65°C für 2 h eluiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit 2 Volumen Ethanol präzipitiert und in 10 µl Aqua dest. gelöst.

5 µl der cDNA-Lösung wurden mit 1 µg *EcoRI*-geschnittener und dephosphorylierter λgt10-DNA (Stratagene) in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6/10 mM MgCl₂/10 mM DTT/1 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 5 units T4-DNA-Ligase 1 h bei Raumtemperatur und 16 h bei 15⁰ C inkubiert und 5 µl des Ligationsansatzes nach Angaben des Herstellers *in vitro* in λ-Phagen-Partikel verpackt (Stratagene, Gigapack Gold). Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 0,1 ml einer in 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellten, in NZCYM/0,4% Maltose über Nacht gewachsenen Kultur von *E. coli* C600hflA mit 10 µl eines zu 10⁻¹ - 10⁻⁵ in SM verdünnten Aliquots von jedem Verpackungsmix 30 min bei 37⁰ C inkubiert, in 3 ml flüssigem Top-H-Agar in Petrischalen mit H-Agar ausplattiert und nach 8 - 16 h Inkubation bei 37⁰ C die Phagenplaques auf dem Bakterienrasen gezählt.

2.2.3. Herstellung radioaktiver Sonden

10 - 25 ng Plasmid-DNA oder isolierte DNA-Fragmente wurden mit dem Multiprime-DNA-labelling-System von Amersham (RPN.1601) in Gegenwart von 1 MBq [α³²P]-dCTP in 25 µl Reaktionsvolumen radioaktiv markiert. Zur Herstellung von DNA-Sonden standen eine Rinder-Aktin-cDNA und eine *T. parva*-Aktin-cDNA^{*1}, eine cDNA für den Interleukin-2 Rezeptor des Rinds^{*2}, eine für die große ribosomale RNA von *Trypanosoma brucei* spezifische cDNA^{*3} und ein für die kleine ribosomale RNA spezifisches genomisches Fragment von *Plasmodium berghei* (Dame *et al.* 1983)^{*4} zur Verfügung.

RNA wurde durch reverse Transkription in radioaktiv markierte einzelsträngige cDNA umgesetzt. In 10 µl Reaktionsvolumen wurden 0,5 µg polyadenylierte RNA in 50 mM Tris-HCl, pH 8,3 (bei 42⁰ C)/10 mM MgCl₂/70 mM KCl/10 mM DTT/0,25 mM dATP, dGTP, dTTP in Gegenwart von 1 µg oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎, 10 units RNasin (Promega) und 2 MBq [α³²P]-dCTP mit 35 units AMV-Reverse Transkriptase (Life Sciences) 1 h bei 42⁰ C inkubiert, nach Zugabe von 1 µl 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP eine weitere Stunde bei 42⁰ C inkubiert, das Volumen mit TE auf 50 µl erhöht, durch Zugabe von 1 µl 1 M NaOH und In-

*1 Die Aktin-cDNA-Klone wurden von Frau Dr. Ehrfeld, KFK Karlsruhe,

*2 der Interleukin-2 Rezeptor-cDNA-Klon von Dr. Dobbelaere, KFK Karlsruhe

*3 der rRNA cDNA-Klon von Frau Dr. Roditi, KFK Karlsruhe, und

*4 der genomische rRNA-Klon von Dr. McCutchan, NIH Bethesda, zur Verfügung gestellt.

kubation bei 70⁰ C für 30 min die RNA degradiert, und nach Zugabe von 1 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 und 1 µl 1 M HCl die Lösung neutralisiert.

Die radioaktiven Sonden wurden nach Erhöhen des Volumens auf 100 µl mit TE durch Extraktion mit Phenol/Chloroform und Zentrifugationsentsalzung bei 1.200 rpm für 2 min durch Sephadex G50-Säulen (0,9 ml Sephadex G50-Suspension (Pharmacia) in TE in 1 ml Spritzen) gereinigt. Die spezifische Radioaktivität der Sonden wurde durch Präzipitation von 1 µl der aufgereinigten Lösung mit 99 µl 0,5 mg ml⁻¹ Kalbsthymus-DNA/20 mM EDTA und 1 ml 10% Trichloressigsäure für 10 min bei 4⁰ C, Abtrennen des Präzipitats durch Filtration auf Whatman GF/C-Filter und Messen der präzipitierten Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

2.2.4. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranfilter

2.2.4.1. DNA-Blot

Durch Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente (2.2.1.9.) wurden durch Inkubation des Gels für 10 min in 0,25 M HCl partiell hydrolysiert, durch Inkubation in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl für dreimal 15 min denaturiert, und in 1 M Tris-HCl, pH 7,5/1,5 M NaCl für zweimal 30 min neutralisiert, das Gel auf einen mit Whatman 3MM Papier bedeckten, in 20 x SSC getränkten Schwamm gelegt, mit einem Nylonmembran-Filter (Hybond-N, Amersham) in Gelgröße bedeckt, mit drei Lagen Whatman 3MM-Papier und mehreren Lagen Papierhandtüchern überschichtet und nach Auflegen eines ca. 500 g schweren Gewichts über Nacht stehen gelassen.

Für DNA-Dot Blots wurden 2 µl einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von 10 µg ml⁻¹ auf ein Nylonmembran-Filter getropft, trocknen gelassen, die DNA durch Auflegen des Filters auf Whatman 3MM-Papier, getränkt in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl, für 5 min denaturiert und durch Auflegen des Filters auf Whatman 3MM-Papier, getränkt in 1 M Tris-HCl, pH 7,5/1,5 M NaCl für zweimal 7 min neutralisiert.

Nach Waschen der Filter in 2 x SSC wurde die DNA auf dem getrockneten Filter durch UV-Bestrahlung bei 302 nm für 5 min kovalent gebunden.

2.2.4.2. RNA-Blot

Durch Gelelektrophorese aufgetrennte RNA (2.2.1.9.) wurde ohne vorherige Inkubation des Gels direkt durch die für den DNA-Blot beschriebene Transfer-Methode aus dem Gel auf Nylonmembran-Filter gebracht und durch 5 min UV-Bestrahlung bei 302 nm kovalent gebunden. Für RNA-Dot Blots wurden 10 - 50 ng RNA in 2 μ l Aqua dest. auf Nylonmembran-Filter aufgetropft, trocknen gelassen und durch UV-Bestrahlung fixiert.

2.2.4.3. Filterabzug von λ -Genbanken

Zur Ausplattierung der Genbank wurden 0,9 ml einer in 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellten *E. coli* C600hflA-Übernachtskultur mit 0,1 ml 0,5 - 1 \times 10⁶ PFU ml⁻¹ in SM bei 37⁰ C 20 min inkubiert, 25 ml flüssiger Top-H-Agar zugegeben, nach Mischen in 24 x 24 cm² großen Petrischalen auf H-Agar ausplattiert und bei 37⁰ C 6 - 10 h solange inkubiert, bis kleine Plaques in dem Bakterienrasen zu erkennen waren. Ein 22 x 22 cm² großes Nitrozellulose-Filter (Schleicher und Schüll, BA85) wurde luftblasenfrei auf die Agaroberfläche gelegt, Markierungen zur Orientierung angebracht, abgezogen und mit der Oberseite nach oben 5 min auf Whatman 3MM-Papier, in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl getränkt, und anschließend zweimal 7 min auf Whatman 3MM-Papier, getränkt in 1 M Tris-HCl, pH 7,5/1,5 M NaCl, inkubiert, in 2 \times SSC gewaschen, getrocknet und die DNA bei 80⁰ C auf dem Filter fixiert.

2.2.5. Filterhybridisierung und Autoradiographie

Alle unter 2.2.4. beschriebenen Filter wurden in Filter-Hybridisierungslösung für 2 h bei 65⁰ C inkubiert, die durch Kochen für 5 min und Abkühlen auf Eis denaturierte, radioaktiv markierte Sonde (2.2.3.) mit 0,5 - 1 \times 10⁶ cpm pro ml Filter-Hybridisierungslösung zugegeben und 16 h bei 65⁰ C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Filter in 1 \times SSC/0,1% SDS bei 65⁰ C (homologe Sonden) oder 3 \times SSC bei 60⁰ C (heterologe rRNA-Sonden) wurden diese gegen Röntgenfilm (Kodak und Amersham) bei -80⁰ C in Kassetten mit Verstärkerfolie exponiert.

2.2.6. Hybridisierung in Flüssigkeit (R₀t)

Die R₀t-Analyse wurde wie bei Young und Anderson (1985) beschrieben durchgeführt. Die eingesetzte radioaktiv markierte, einzelsträngige cDNA (2.2.3.) besaß eine spezifische Radioaktivität von 3,5 - 7 \times 10⁹ cpm μ g⁻¹. Die Hybridi-

sierungsreaktion wurde in 0,6 M NaCl/40 mM Tris-HCl, pH 7,4/10 mM EDTA mit 2×10^7 cpm ml⁻¹ cDNA (entspricht 3 - 6 ng ml⁻¹ cDNA) und 10 - 500 µg ml⁻¹ mRNA (R₀) angesetzt. 1 µl-Aliquots dieser Hybridisierungslösung wurde in 5 µl Glaskapillaren versiegelt, 10 min bei 100⁰ C und anschließend bei 70⁰ C solange inkubiert, bis das Produkt aus mRNA-Ausgangskonzentration (R₀, in mol Nukleotide l⁻¹, errechnet aus der mRNA-Konzentration in µg ml⁻¹ und dem Molekulargewicht eines Nukleotids mit 330 g mol⁻¹) und Inkubationszeit (t, in sec) den gewünschten R₀t-Wert erreicht hatte. Der Inhalt der Kapillare wurde dann in 0,41 ml eiskaltem S1-Puffer (30 mM Na-Acetat, pH 4,6/0,3 M NaCl/3 mM ZnSO₄/10 µg ml⁻¹ denaturierte Kalbsthymus-DNA) geblasen, in 2 Aliquots à 0,2 ml aufgeteilt, zu einem Aliquot 58 units S1-Nuklease (Pharmacia) zugegeben, beide Aliquots 1 h bei 37⁰ C inkubiert und die DNA durch Zugabe von 0,2 ml gescherter Kalbsthymus-DNA (1 mg ml⁻¹) und 4 ml 10% Trichloressigsäure auf Eis 15 min gefällt. Das DNA-Präzipitat wurde durch Filtration auf Whatman GF/C-Filter gebracht, getrocknet, die präzipitierte Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen und der Quotient der gemessenen Radioaktivitätswerte von Nuklease S1-behandeltem und nicht-behandeltem Aliquot als Prozent Hybridisierung über den dekadischen Logarithmus des korrespondierenden R₀t-Werts aufgetragen.

Zur Ermittlung der Häufigkeitsgruppen, ihrem Anteil an der Gesamtkinetik und ihrem R₀t_{1/2}-Wert wurden durch ein Computerprogramm die Parameter der theoretischen Kurvengleichung solange angepaßt, bis die Summe S der quadrierten Differenzen zwischen experimentell ermitteltem (h(R₀t_j)) und berechnetem (H(R₀t_j)) Hybridisierungswert ein Minimum erreichte*.

Im Folgenden sind die theoretische Kurvengleichung, die Summengleichung und die Gleichungen zur Berechnung des R₀t_{1/2}-Werts und des korrigierten R₀t_{1/2}-Werts der Häufigkeitsgruppen angegeben.

$$H(R_0t) = H(0) + \sum_{i=1}^m A_i \times [1 - \exp(-k_i \times R_0t)]$$

mit m	die Anzahl der Häufigkeitsgruppen
A _i	der Anteil der i-ten Häufigkeitsgruppe an der Gesamtkinetik
k _i	die Geschwindigkeitskonstante der Hybridisierungsreaktion der i-ten Häufigkeitsgruppe
H(0)	der Prozentsatz der zum Zeitpunkt t = 0 bereits als Hybrid vorliegenden cDNA

* Die Computerkalkulation wurde von Dr. Wilson, MPI für Chemie Mainz durchgeführt.

$$S = \sum_{j=1}^n [h(R_{0t_j}) - H(R_{0t_j})]^2$$

mit $h(R_{0t_j})$ der experimentell ermittelte Prozentsatz hybridisierter cDNA bei dem j-ten R_{0t} -Wert

n die Anzahl der R_{0t} -Meßpunkte

Der $R_{0t_{1/2}}$ -Wert der i-ten Häufigkeitsgruppe berechnet sich aus:

$$R_{0t_{1/2} i} = \frac{1}{k_i} \times \ln \left(\frac{H(0)}{A_i} - 0,5 \right)$$

und der korrigierte $R_{0t_{1/2}}$ -Wert, der gemessen würde, wenn die betreffende Häufigkeitsgruppe allein vorliegen würde, aus:

$$R_{0t_{1/2} i} (\text{korrigiert}) = R_{0t_{1/2} i} \times \frac{A_i}{H_{\max}}$$

mit H_{\max} die hybridisierbare cDNA in %.

2.2.7. DNA-Sequenzierung

DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) bei Benutzung doppelsträngiger DNA als Matrize nach Kraft *et al.* (1988) sequenziert. pUC19-Plasmide mit dem zu sequenzierenden Insert wurden in kleinem Maßstab isoliert (2.2.1.1.), das DNA-Präzipitat in 16,8 µl Aqua dest. gelöst, nach Zugabe von 3,2 µl 5 M NaCl und 20 µl 13% PEG 8.000 1 h auf Eis gefällt, das Präzipitat nach Waschen mit 70% Ethanol in 20 µl Aqua dest. gelöst, nach Zugabe von 2 µl 2 M NaOH/2 mM EDTA 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, auf Eis 8 µl 1 M Tris-HCl, pH 4,5, 3 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 75 µl Ethanol zugegeben, das DNA-Präzipitat nach 20 min Inkubation bei -80°C sedimentiert und in 4 µl Aqua dest. gelöst.

Als Primer für die Sequenzierung wurden entweder 10 ng universeller Primer oder 10 ng reverser Primer (New England Biolabs, #1212 bzw. #1201) in 4 µl Aqua dest. und 2 µl Sequenase-Puffer zugegeben, die Lösung 2 min auf 65°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Sequenase-Puffer zusammen mit dem Sequenase-Enzym, Markierungs-, Terminations- und Ladungspuffer wurden als Sequenzier-Kit (United States Biochemical, Nr. 70700) bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet. Pro Markierungsreaktion wurde 1 µl [$\alpha^{35}\text{S}$]-dATP (296 MBq ml^{-1} , Amersham) zugegeben. Von jeder 2 min bei

80⁰ C inkubierten Terminationsreaktion wurden ca. 2 µl in die Tasche eines Sequenziergels geladen, und die Elektrophorese in TBE bei 1.100 V für 1,5 - 6 h durchgeführt, das Gel anschließend in 10% Methanol/ 10% Eisessig für 5 min fixiert, auf Whatman 3MM-Papier unter Vakuum getrocknet und gegen Roentgenfilme bei Raumtemperatur exponiert.

Zur Herstellung des Sequenzgels wurden 50 ml 7 M Harnstoff/57 g l⁻¹ Acrylamid/3 g l⁻¹ Methylenbisacrylamid in TBE mit 80 µl 25% Ammoniumpersulfat und 80 µl TEMED versetzt, in eine 200 x 400 x 0,4 mm³ Gelkammer gegossen, nach Polymerisieren des Acrylamids die Gelkammer in eine Vertikal-Elektrophorese-Kammer eingespannt und diese mit TBE als Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

Die Nukleotid-Sequenz-Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms MicroGenie (Beckman) aufgearbeitet und mit den gespeicherten Sequenz-Daten der NIH-GenBank verglichen.

2.2.8. *In vitro* Transkription

Für die Transkription wurde die Methode nach Contreras *et al.* (1982) für die Verwendung der T7-RNA-Polymerase modifiziert. pSG5-Konstrukte mit den zu transkribierenden Inserts wurden in kleinem Maßstab isoliert (2.2.1.1.), durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Extraktion mit Ethanol gefällt. 0,4 µg linearisiertes pSG5-Konstrukt wurden in 10 µl 40 mM HEPES-KOH, pH 7,9/ 6 mM Mg-Acetat/ 2 mM Spermidin/0,1 M DTT/0,5 mM ATP, CTP, GTP, UTP in Gegenwart von 0,25 mM m⁷G(5')pppG(5') (CAP-Analogen, Pharmacia), 2 units RNasin (Promega) und 4 units T7-RNA-Polymerase (Pharmacia) 1 h bei 37⁰ C inkubiert, die Reaktion auf Eis abgebrochen und bei -80⁰ C gelagert.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Expression und Isolierung von bakteriellen Fusionsproteinen

Die Methode wurde nach Klinkert *et al.* (1988) modifiziert. Eine *E. coli* 537-Kolonie mit dem gewünschten pEX34-Konstrukt wurde in 2 ml YT-Medium und 0,1 mg ml⁻¹ Ampicillin 18 h bei 28⁰ C geschüttelt, mit 1 ml dieser Kultur 4 ml 45⁰ C warmes YT-Medium inokuliert, 2 h bei 42⁰ C geschüttelt und die Bakterien durch Zentrifugation bei 5.000 g sedimentiert. Das Bakteriensedi-

ment wurde in 0,1 ml Aqua dest. resuspendiert, durch Zugabe von 0,1 ml 6% SDS und 0,2 ml Protein-Ladungspuffer und 10 min Kochen lysiert, und die DNA durch Ultraschall-Behandlung geschert. 10 - 15 μ l des Lysats wurden durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese (2.3.5.) zu analytischen Zwecken aufgetrennt.

Zur Isolierung von Fusionsproteinen wurden 200 ml YT-Medium mit 20 ml einer 28⁰ C Übernachtskultur inokuliert, 2 h bei 42⁰ C geschüttelt, die sedimentierten Bakterien in 2 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0/10% Saccharose resuspendiert, nach Zugabe von 0,5 ml Lysozym (5 mg ml⁻¹) und 50 μ l 0,5 M EDTA 30 min bei 37⁰ C inkubiert, 5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0/0,1% Triton X-100/62,5 mM EDTA zugegeben, 15 min auf Eis und 30 min bei 37⁰ C inkubiert, das Lysat mit Ultraschall behandelt, und bei 12.000 g und 4⁰ C für 30 min zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in 3 ml 1 M Harnstoff resuspendiert, beschallt, bei 12.000 g zentrifugiert, das Sediment in 3 ml 7 M Harnstoff resuspendiert und nach Zentrifugation der resultierende Überstand bei 4⁰ C gelagert. 0,5 ml des Überstands wurden mit 0,5 ml Protein-Ladungspuffer gemischt, 10 min gekocht, auf 5 mm dicken präparativen Proteingelen aufgetragen, und nach eindimensionaler Gelelektrophorese das Fusionsprotein als Gelbande nach Lokalisierung durch Coomassie-Blau-Färbung des Gels (2.3.5.) ausgeschnitten. Das Fusionsprotein wurde aus der Gelbande mit Hilfe der Biotrap (Schleicher und Schüll, BT 1000) in 288 g l⁻¹ Glycin/60 g l⁻¹ Tris-Base/10% SDS elektroeluiert. Das eluierte Fusionsprotein wurde durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese eines Aliquots auf Reinheit analysiert, und seine Konzentration durch Vergleich mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration nach Coomassie-Blau-Färbung des Gels bestimmt.

2.3.2. Herstellung von Antiseren

Es wurde die bei Johnstone und Thorpe (1982) beschriebene Methode in modifizierter Form angewendet. 20 -30 μ l Fusionsprotein-Eluat (0,5 - 1 μ g μ l⁻¹) wurden mit gleichem Volumen komplettem Freund'schem Adjuvans (Gibco) emulgiert und einer Balb/c-Maus (6 - 8 Wochen alte Weibchen) intraperitoneal injiziert. Nach 2 - 3 Wochen und 4 - 6 Wochen wurde dieselbe Maus mit Proteinemulgat in inkomplettem Freund'schem Adjuvans (Gibco) erneut immunisiert, und 4 Tage nach der letzten Immunisierung 0,2 - 0,5 ml Blut über den Suborbital-Plexus entnommen. Nach Inkubation des Bluts für 1 h bei Raumtemperatur und 16 h bei 4⁰ C wurde das Serum gewonnen und bei -80⁰ C gelagert.

2.3.3. *In vitro* Translation und *in vitro* Translokation

In vitro Translationen mit käuflich erworbenen Nuklease-behandelten Retikulozyten-Lysaten des Kaninchens (Promega) wurden durch Mischen von 35 μl Lysat, 1 μl 1 mM Aminosäure-Mischung ohne Methionin, 5 μl [^{35}S]-Methionin (370 MBq ml^{-1} , Amersham), 1 μl RNasin (1 unit μl^{-1} , Promega) und 1 μg polyadenylierte RNA oder 10 μg Gesamt-RNA in 8 μl Aqua dest. und Inkubation für 1 h bei 30⁰ C durchgeführt. Zur Bestimmung der Inkorporation radioaktiven Methionins in synthetisierte Polypeptide wurden 1 μl des Ansatzes in 1 ml 1 M NaOH/1,5% H₂O₂ 10 min bei 37⁰ C inkubiert, Protein nach Zugabe von 4 ml 25% Trichloressigsäure/2% Casamino-säuren durch Inkubation auf Eis für 30 min präzipitiert, das Präzipitat durch Filtration auf Whatman GF/C-Filter gebracht, getrocknet, und die Radioaktivität im Präzipitat durch Szintillationszählung gemessen.

Bei Verwendung von RNA aus *in vitro* Transkriptionsansätzen (2.2.8.) und für Translokationsexperimente wurde die Methode nach Bujard *et al.* (1987) verwendet. Die dabei verwendeten Weizenkeimlysate sowie isolierte Mikrosomen aus Hundepankreas und aufgereinigte SRP-Partikel waren von anderer Seite verfügbar*. Die Translation wurde in 20 mM HEPES-KOH, pH 7,6/90 mM K-Acetat/2,8 mM Mg-Acetat/20 mM KCl/1 mM DTT/10 mM Kreatinphosphat/40 μM Spermidin/3 mM EGTA/0,4 mg ml^{-1} Kreatinphosphokinase/1 mM ATP/20 μM Aminosäuren ohne Methionin bei 25⁰ C für 1 h durchgeführt. Ein 25 μl Translationsansatz enthielt 10 μl Weizenkeimlysate, 2,5 μl [^{35}S]-Methionin (370 MBq ml^{-1} , Amersham) und 0,5 - 2 μg mRNA bzw. 3 μl des *in vitro* Transkriptionsansatzes.

Für die *in vitro* Translokation enthielt ein 25 μl Translationsansatz 0,5 μl Mikrosomen (20 - 60 A₂₈₀ ml^{-1}) und 2 μl SRP (0,5 - 1 A₂₈₀ ml^{-1}). Zum Nachweis der Translokation wurden nach Ablauf der Translation in Gegenwart von Mikrosomen und SRP zu jeweils 10 μl Ansatz 1 μl Proteinase K (3 mg ml^{-1}) bzw. 1 μl Proteinase K und 1 μl 5% Nonidet-P40 zugegeben, 10 min bei 25⁰ C inkubiert, und die Reaktion durch Zugabe von PMSF (20 ng ml^{-1} in Isopropanol) abgebrochen. Zur Vorbereitung für die Proteingel-Elektrophorese wurden die Ansätze mit demselben Volumen Protein-Ladungspuffer versetzt und bei 100⁰ C für 10 min inkubiert.

* Die Materialien wurden von Dr. Lipp, KFK Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

2.3.4. Immunopräzipitation

Für Immunopräzipitationen nach Garoff *et al.* (1978) aus *in vitro* Translationsansätzen wurden nach Abschluß der Translation zu 25 µl Ansatz 2,5 µl 5% Nonidet-P40 und 1 µl Antiserum zugegeben, 1 h auf Eis inkubiert, 30 µl ProteinA-Sepharose-Suspension (Pharmacia) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5/ 0,15 M NaCl/0,2% Nonidet-P40/ 5 mM EDTA zugegeben, 1 h bei 4⁰ C gemischt, die ProteinA-Sepharose mit den gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen zweimal in dem genannten Puffer und einmal in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen, und das Sediment in 20 µl Protein-Ladungspuffer 10 min bei 100⁰ C inkubiert.

2.3.5. Eindimensionale und zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese

Die eindimensionale Proteingel-Elektrophorese wurde nach einem modifizierten Protokoll von Laemmli (1970) durchgeführt. Eindimensionale Gele bestanden aus 15 ml 10%, 15% oder 20% Polyacrylamid-Trenngelen, die nach Polymerisation mit 5 ml 5% Sammelgel in 130 x 160 x 0,75 mm³ Gelkammern überschichtet wurden. Zusammensetzung der Gel-Lösungen (in ml):

Lösung	Trenngele			Sammelgel
	10%	15%	20%	5%
Acrylamid (300g l ⁻¹)	167	250	333	25
Methylenbisacrylamid (10 g l ⁻¹)	65	43	33	20
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	125	125	125	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	-	18,75
Aqua dest.	140	79	6	86,25

Vor Gießen des Gels wurden zu 10 ml Trenngel-Lösung bzw. 5 ml Sammelgel-Lösung 50 µl 10% Ammoniumpersulfat und 5 µl TEMED gemischt. Nach Polymerisation wurde das Proteingel in eine Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt, die Kammer mit Elektrophoresepuffer (288 g l⁻¹ Glycin/60 g l⁻¹ Tris-Base/10 g l⁻¹ SDS) aufgefüllt, und die Elektrophorese für 1 - 3 h bei 30 - 40 mA durchgeführt.

Nicht radioaktiv-markierte Proteine wurden durch 20 min Färben des Proteingels in 5 g l⁻¹ Coomassie-Blau R250/45% Methanol/10% Eisessig und Entfärbung in 25% Methanol/10% Eisessig als blau gefärbte Banden nachgewiesen. Zum Nachweis radioaktiv-markierter Proteine wurde das Proteingel in 25% Isopropanol/10% Eisessig für 30 min fixiert, in Amplify (Amersham)

weitere 30 min inkubiert, auf Whatman 3MM-Papier unter Vakuum bei 60°C getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Die zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese wurde nach der Methode von O'Farrell *et al.* (1977) durchgeführt*. Als erste Dimension diente eine Non-Äquilibrium-pH-Gradienten-Elektrophorese in 3 mm x 11,4 mm Säulengelen aus einer 1 : 4-Mischung von pH 3,5 - 10 und pH 7 - 9 Ampholinen, als zweite Dimension ein 15% Polyacrylamid-Trenngel.

Als Molekulargewichtsmarker diente eine Mischung aus [¹⁴C]-methylierten Proteinen (Amersham, CFA.645) bzw. nicht markierte Proteine (Sigma, MW-SDS-200 und MW-SDS-70L)

2.3.6. Immunoblot

Die Methode von Towbin *et al.* (1979) wurde modifiziert. Zur Herstellung von Protein-Lysaten wurden 4×10^7 Rinder-Lymphozyten bzw. L4-Zellen in 0,25 ml Aqua dest. resuspendiert, nach Zugabe von 0,25 ml 6% SDS und 0,5 ml Protein-Ladungspuffer durch 10 min Kochen lysiert, und die DNA durch Ultraschall geschert. Lysate von isolierten erythrozytären Stadien, von isolierten Sporozoiten und von Speicheldrüsen nicht-infizierter Zecken waren von anderer Seite verfügbar*.

Nach elektrophoretischer Auftrennung in eindimensionalen Proteingelen wurden die Proteine durch Elektrophorese in 25 mM Tris-Base/192 mM Glycin/20% Methanol/0,01% SDS bei 0,5 A in einer Transphor-Elektrophorese-Einheit (Hoefler Scientific Instruments, TE Series) für 6 - 16 h auf Nitrozellulose-Filter (Schleicher und Schuell, BA85) transferiert, die Proteine durch Färben des Filters mit 0,05% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure sichtbar gemacht, und das Filter in Milchpuffer (50 g l^{-1} fettfreiem Milchpulver/0,02% NaN_3 in PBS) 2 - 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Auswechseln des Milchpuffers und Zugabe von 1- 20 μl Antiserum pro ml wurde 2 - 16 h bei Raumtemperatur inkubiert, das Filter dreimal in Milchpuffer gewaschen und mit dem zweiten Antiserum bei einer Verdünnung von 1 : 1.000 in Milchpuffer 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als zweites Antiserum diente bei Verwendung von Mausantiserum als erstem Antiserum [¹²⁵I]-Schaf-Anti-Maus-Immunglobulin-Serum ($3,7 \text{ MBq ml}^{-1}$, Amersham) bzw. Kaninchen-Anti-Maus-IgG

* Diese Gelelektrophorese wurde von Frau Dr. Gill, KFK Karlsruhe durchgeführt.

* Die Lysate wurden von Dr. Morzaria und Dr. Musoke, ILRAD Nairobi zur Verfügung gestellt.

(H+L)-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Dianova), bei Verwendung von Rinderserum als erstem Antiserum Ziegen-Anti-Rind-IgG (H+L)-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Dianova).

Nach dreimaligem Waschen in Milchpuffer wurden mit radioaktiv-markiertem Antiserum inkubierte Filter getrocknet und gegen Röntgenfilme exponiert. Bei Verwendung von Phosphatase-gekoppelten Antikörpern wurden die Filter dreimal in Milchpuffer, zweimal in PBS, zweimal in 0,1 M NaCl/5 mM MgCl₂/0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 gewaschen und in Substratlösung bei 37⁰ C 10 - 60 min inkubiert, bis eine Farbreaktion sichtbar wurde.

Substratlösung:

33 µl BCIP und 66 µl NBT in 0,1 M NaCl/5 mM MgCl₂/0,1 M Tris-HCl, pH 9,5
 BCIP: 50 mg ml⁻¹ 5-Bom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat in Dimethylformamid
 NBT: 50 mg ml⁻¹ Nitro-Blau-Tetrazolium in 70% Dimethylformamid

2.3.7. Immunofluoreszenz

Die bei Johnstone und Thorpe (1982) beschriebene Methode wurde modifiziert. 10⁵ in PBS suspendierte Zellen wurden durch Zytospin (Shandon) auf Objektträger gebracht, 10 min mit 2% Formaldehyd/0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert, dreimal mit GTPBS (20 g l⁻¹ Gelatine/0,5% Tween-20 in PBS) gewaschen, mit 1 : 500 in GTPBS verdünntem Maus-Antiserum 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit GTPBS gewaschen, mit 1 : 20 in GTPBS verdünntem FITC-markiertem Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulin-Serum (Becton und Dickinson) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal mit GTPBS gewaschen, in 90% Glycerin/10% PBS/30 g l⁻¹ N-Propyl-Gallat, pH 7,4 eingebettet und mit Hilfe eines Fluoreszenz-Lichtmikroskops (Leitz, Diaplan) mit geeignetem Filtersatz (Leitz I2/3: Anregung: 450 - 490 nm, Sperren: 520 nm) bei einer Vergrößerung von 63 x 10 photographiert.

2.4. Zellkultur-Techniken

2.4.1. Kultivierung von mit *T. parva* infizierten Lymphozyten, L4-Zellen und ConA-stimulierten Lymphozyten

Der von *T. parva* infizierte Klon TPM 803 wurde als Suspensionskultur in 175 cm² Zellkulturflaschen in cL15-Medium bei 37⁰ C ohne CO₂-Begasung kultiviert, und alle 3 - 4 Tage frisches Medium mit 1 x 10⁵ Zellen ml⁻¹

inokkuliert. Der von *T. parvum* infizierte Klon E98-Tp wurde in Kulturmedium mit HEPES bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung in ansonsten gleicher Weise kultiviert.

Infizierte Lymphozyten wurden durch dreitägige Kultivierung in Gegenwart von 50 ng ml⁻¹ BW720c (Coopers Animal Health Ltd.) vom Parasiten befreit.

Die Rinder-Lymphozyten-Zelllinie E98-ConA wurde in Kulturmedium ohne HEPES in Gegenwart von 10% TCGF-Überstand bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung in 75 cm² und 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, und alle 3 - 4 Tage 75% der Zellsuspension durch frisches Kulturmedium mit 10% TCGF-Überstand ausgetauscht*.

L4-Mausfibroblasten wurden in L4-Medium, L4-Transfektanten in L4-Medium mit 0,5 g l⁻¹ G418 (Gibco) in 25 cm² und 75 cm² Zellkulturflaschen unter CO₂-Begasung bei 37⁰ C kultiviert. Zum Umsetzen der Zellen wurden konfluente L4-Kulturen in PBS/0,6 mM EDTA 30 min bei 37⁰ C inkubiert, die Zellen durch Schütteln suspendiert, in L4-Medium gewaschen und bei einer Dichte von 1 × 10⁵ Zellen cm⁻² ausgesät.

Die Zelldichte wurde durch Zählen der Zellen in Gegenwart von Trypan-Blau in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zur mikroskopischen Analyse der Zellen (und von Fraktionen bei der Schizonten-Isolierung) wurden in PBS suspendierte Zellen durch Zytospin (Shandon) auf Objektträger gebracht, luftgetrocknet, 2 min in Methanol fixiert, 1 h bei 37⁰ C in 6% Giemsa-Lösung gefärbt, mit Aqua dest gespült, luftgetrocknet und mit Immersionsöl bei 1250facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Leitz) betrachtet.

2.4.2. Transfektionsmethoden

2.4.2.1. Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation

Mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Graham und van der Eb (1973) wurden L4-Zellen mit pSG5-Konstrukten stabil transfiziert. Zwei Tage vor der Transfektion wurden 7 × 10⁵ L4-Zellen in 9 cm Petrischalen mit 10 ml L4-Medium ausgesät. Zu 20 µg pSG5-Konstrukt und 2 µg pSV2-neo (beide nach 2.2.1.2. isoliert) in 1 ml TE wurden 90 µl 2,5 M CaCl₂ und unter ständigem Mischen 1 ml 0,28 M NaCl/10 mM KCl/1,5 mM Na₂HPO₄/12 mM Dextrose/50 mM HEPES/pH 7,05 zupipettiert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert,

* TCGF-Überstand wurde von Dr. Goddeeris, ILRAD Nairobi zur Verfügung gestellt.

und 1 ml der Lösung zu den L4-Zellen in das Medium gegeben, 16-24 h bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung inkubiert, nach Mediumwechsel weitere 24 h inkubiert, und die Zellen von da an in L4-Medium mit 0,5 g l⁻¹ G418 kultiviert.

2.4.2.2. DEAE-Dextran-Sulfat-Methode

Entsprechend der bei Ivanov *et al.* (1989) beschriebenen Methode wurden 5 x 10⁶ infizierte Lymphozyten (TPM 803) wurden in 1,2 ml DNA-Lösung mit 10 µg ml⁻¹ Plasmid-DNA (pSG5-β-gal) und 0,25 mg ml⁻¹ DEAE-Dextran in TBS (137 mM NaCl/5 mM KCl/0,5 mM MgCl₂/0,7 mM CaCl₂/0,6 mM Na₂HPO₄/25 mM Tris-HCl, pH 7,4) resuspendiert, 30 min bei 37⁰ C inkubiert, mit 10% Dimethylsulfoxid für 3 min behandelt, zweimal mit 37⁰ C warmem TBS gewaschen und in 20 ml cL15 bei 37⁰ C für 36 h inkubiert.

2.4.2.3. Lipofektion

Lipofektionsversuche mit den Zellen E98-Tp und E98-ConA wurden nach Angaben des Herstellers (Gibco) durchgeführt. 10 µg Plasmid-DNA (pSG5-β-gal) in 1,5 ml Optimem-Medium (Gibco) wurden mit 30 µg, 60 µg oder 100 µg Lipofektin in 1,5 ml Optimem-Medium gemischt und zu 10⁷ in Optimem gewaschenen und sedimentierten Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen gegeben. Jeweils 0,3 ml der Zellsuspension wurden in 48 Well-Mikrotiterplatten gegeben, bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung inkubiert, nach 3 h, 5 h, 7 h, 9 h, 11 h, 13 h, 17 h, 19 h, 21 h und 24 h 0,3 ml Kulturmedium mit 20% fötalem Rinderserum zugegeben, und die Zellen weitere 24 h oder 48 h bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung inkubiert.

2.4.2.4. Elektroporation

Nach der Methode von Cann *et al.* (1988) wurden 2 x 10⁷ Zellen aus logarithmisch wachsenden oder stationären E98-Tp- und E98-ConA-Kulturen in 1 ml kaltem Kulturmedium mit oder ohne HEPES und mit 10% oder 20% fötalem Rinderserum resuspendiert, 0,25 ml der Zellsuspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben, 10 µg, 20 µg oder 40 µg Plasmid-DNA (pSG5-β-gal) in 10 µl TE zugegeben, gemischt, 10 min auf Eis inkubiert, die Elektroporation durchgeführt, weitere 10 min auf Eis inkubiert, 8 ml Kulturmedium zugegeben, und die Zellen bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung für 24 h oder 48 h inkubiert. Die Elektroporation wurde mit einer Gene-Pulser Apparatur (Biorad) bei 960 µF Kapazität und 100 V, 150 V, 200 V, 250 V oder

300 V durchgeführt. Bei 250 V betrug die Zeitkonstante RC in Kulturmedium mit 20% fötalem Rinderserum 50 msec.

2.4.3. Enzymatischer Farbttest für β -Galaktosidase auf Einzelzell-Niveau

Die Transfektionseffizienz mit dem Konstrukt pSG5- β -gal wurde mit Hilfe dieses Tests nach Chang und Brenner (1988) bestimmt. Die adhärent wachsenden L4-Zellen wurden mit PBS gewaschen, 5 min in 2% Formaldehyd/0,2% Glutaraldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert, erneut mit PBS gewaschen und in 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ /5 mM $K_4Fe(CN)_6$ /2 mM $MgCl_2$ /1 mg ml⁻¹ X-Gal für 2 - 24 h bei 37⁰ C inkubiert. Zellen mit β -Galaktosidase-Aktivität werden blau, Zellen ohne dieses Enzym bleiben farblos. Die in Suspension wachsenden Rinder-Lymphozyten wurden in PBS gewaschen, durch Zytospin auf Objektträger gebracht und dann wie für die L4-Zellen beschrieben weiter behandelt.

2.4.4. Klonierung stabil transfizierter L4-Zellen durch "limiting dilution"

Die 3 - 4 Wochen nach Transfektion (2.4.2.1.) als Foci in L4-Medium mit 0,5 mg l⁻¹ G418 wachsenden L4-Zellen wurden mit PBS/0.6 mM EDTA suspendiert, gewaschen, auf eine Zelldichte von 0,5, 1,5 oder 5 Zellen ml⁻¹ in L4-Medium mit 0,5 mg l⁻¹ G418 eingestellt und à 0,2 ml Aliquots in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 2 - 3 Wochen wurden die Platten auf wachsende Kolonien untersucht, und von den Platten, bei denen in weniger als 33% der Wells Kolonien wuchsen, die Kolonien durch Kultivieren expandiert.

2.4.5. Zytotoxischer T-Zell-Assay

Dieser Assay wurde wie bei Goddeeris *et al.* (1988) beschrieben durchgeführt. L4-spezifische Rinder-Effektorzellen wurden durch 5-Brom-Deoxy-Uridin (BUdR)- und Licht-Behandlung nach Zoschke und Bach (1971) entfernt. Aus Blut des gegen *T. parva* immunen Rindes E98 wurden periphere Lymphozyten (E98-PBL) über Ficoll-Paque (Pharmacia) isoliert und 4 x 10⁶ E98-PBL zusammen mit 2 x 10⁵ mit 50 Gy γ -bestrahlten L4-Zellen in 2 ml Kulturmedium ohne HEPES 3 Tage bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung kultiviert, BUdR zu einer Endkonzentration von 2,5 μ M zugegeben, und nach 24 h Inkubation für 90 min direkter Bestrahlung durch Licht einer TL-Lampe ausgesetzt. Die behandelten E98-PBL wurden mit Kulturmedium gewaschen, und 4 x 10⁶ Zellen mit 2 x 10⁵ mit 50 Gy γ -bestrahlten E98-Tp für 7 Tage bei 37⁰ C unter CO₂-Begasung kultiviert. Die Kokultivierung mit γ -bestrahlten E98-Tp wurde 1 - 3 mal wiederholt, und

die über Ficoll-Paque gereinigten E98-PBL als Effektorzellen bei einer Dichte von 10^7 Zellen ml^{-1} in Zytotox-Medium suspendiert.

2×10^7 Zielzellen (E98-Tp, E98-ConA, suspendierte L4-Zellen) aus logarithmisch wachsenden Kulturen wurden in 1 ml Zytotox-Medium suspendiert, 0,1 ml der Zellsuspension mit 3,7 MBq ^{51}Cr -Na-Chromat (Amersham) in 0,1 ml Zytotox-Medium gemischt, 1 h bei 37°C inkubiert, die Zellen sechs mal mit Zytotox-Medium gewaschen und bei einer Dichte von 10^6 Zellen ml^{-1} resuspendiert. 5×10^4 Zielzellen wurden zusammen mit 10 , 5 , $2,5$, $1,25$ und $0,625 \times 10^5$ E98-PBL-Effektorzellen in 0,2 ml Zytotox-Medium in 96-Well-Mikrotiterplatten bei 37°C für 4 h inkubiert, resuspendiert, sedimentiert, 0,1 ml Medium in Teströhrchen gegeben, und die Radioaktivität in einem γ -Zähler bestimmt. 5×10^4 Zielzellen in 0,2 ml Zytotox-Medium ohne Effektorzellen wurden als Kontrolle für die spontane ^{51}Cr -Freisetzung in gleicher Weise behandelt. Zur Bestimmung der maximal möglichen ^{51}Cr -Freisetzung wurden 5×10^4 Zielzellen mit 0,15 ml 10% Tween-20 für 30 min inkubiert, zentrifugiert, und die Radioaktivität in 0,1 ml Überstand gemessen. Alle Ansätze wurden dreifach durchgeführt. Die spezifische Zytotoxizität wurde als Prozent Zytotoxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = 100 \times \frac{\text{Test } ^{51}\text{Cr}\text{-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr}\text{-Freisetzung}}{\text{maximale } ^{51}\text{Cr}\text{-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr}\text{-Freisetzung}}$$

2.4.6. Klonierung von zytotoxischen Rinder-T-Zellen

Die durch Kokultivierung mit E98-Tp aktivierten E98-PBL (10^7 Zellen in 1 ml Kulturmedium) wurden 40 min auf Eis mit 0,5 ml Anti-BoT4-Antikörper-Lösung (MAb IL-A11, ILRAD) inkubiert, 0,5 ml Kaninchen-Komplement zugegeben, 40 min bei 37°C inkubiert, 10 ml Kulturmedium zugegeben, die Zellen sedimentiert und in 2 ml Kulturmedium mit 10% TCGF-Überstand 16 h bei 37°C unter CO_2 -Begasung inkubiert. 100 lebende Effektorzellen (BoT4 $^-$) wurden zusammen mit 2×10^4 mit 50 Gy γ -bestrahlten L4-Transfektanten als Stimulatorzellen und 2×10^4 mit 50 Gy γ -bestrahlten E98-PBL als Nährzellen in 0,2 ml Kulturmedium mit 0,6% TCGF-Überstand in 96-Well-Mikrotiterplatten 2 Wochen bei 37°C unter CO_2 -Begasung inkubiert. Wachsende Zellen wurden durch Kultivieren mit 10% TCGF-Überstand zusammen mit 5×10^4 mit 50 Gy γ -bestrahlten Stimulatorzellen expandiert.

2.5. Lösungen und Medien

Chloroform:	24 Volumen Chloroform/1 Volumen Isoamylalkohol
Phenol:	geschmolzenes Phenol/0,1 % 8-Hydroxyquinolin/ gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
Phenol/Chloroform:	1 Volumen Phenol/1 Volumen Chloroform
Lösung 1 (Plasmid-Isolation):	50 mM Glukose/25 mM Tris-HCl, pH 8,0/10 mM EDTA
Lösung 2 (Plasmid-Isolation):	0,2 M NaOH/ 1% SDS
Lösung 3 (Plasmid-Isolation):	3 M K-Acetat/2 M Essigsäure
NTE:	0,1 M NaCl/10 mM Tris-HCl, pH 7,4/1 mM EDTA
PBS:	0,14 M NaCl/2,7 mM KCl/0,7 mM CaCl ₂ /0,6 mM MgCl ₂ / 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ /1,5 mM KH ₂ PO ₄ /pH 7,3
20 x SSC:	3 M NaCl/0,3 M Na-Citrat, pH 6,5
TBE:	135 mM Tris-Base/7,5 mM Borsäure/2,5 mM EDTA/pH 8,9
TE:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0/1 mM EDTA, pH 8,0
Protein-Ladungspuffer:	0,1 M Tris-HCl, pH 6,8/3% SDS/20% Glycerin/ 3% 2-Mercaptoethanol/0,2% Bromphenolblau
RNA-Denaturierungslösung:	105 µl Dimethylsulfoxid/30 µl 30% deionisiertes Glyoxal/ 4,2 µl 0,5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 6,8
RNA-Extraktionslösung:	Phenol/NTE/10% SDS (50 : 47,5 : 2,5, v/v)
Filter-Hybridisierungslösung:	5 g l ⁻¹ Heparin/5 x SSC/0,1 % SDS/1 mM NaH ₂ PO ₄ / 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ /75 mg l ⁻¹ Na ₄ P ₂ O ₇ /1 g l ⁻¹ Ficoll/ 1 g l ⁻¹ Polyvinylpyrrolidon/1 g l ⁻¹ BSA
H-Agar:	10 g l ⁻¹ Bacto-Trypton (Difco)/8 g l ⁻¹ NaCl/ 15 g l ⁻¹ Agar (für Top-H-Agar: 7,5 g l ⁻¹ Agar)
NZCYM:	10 g l ⁻¹ NZ-Amin/5 g l ⁻¹ Bacto-Hefeextrakt (Difco)/ 5 g l ⁻¹ NaCl/1 g l ⁻¹ Casaminosäuren/2 g l ⁻¹ MgSO ₄ ·7H ₂ O
SM:	58 g l ⁻¹ NaCl/2 g l ⁻¹ MgSO ₄ ·7H ₂ O/50 mM Tris-HCl, pH 7,5/ 0,1 g l ⁻¹ Gelatine
SOB:	20 g l ⁻¹ Bacto-Trypton (Difco)/5 g l ⁻¹ Bacto-Hefeextrakt (Difco)/ 10 mM NaCl/10 mM MgSO ₄ /10 mM MgCl ₂ /2,5 mM KCl

STB:	0,1 M KCl/45 mM MnCl/10 mM CaCl ₂ /3 mM [Co(NH ₃) ₆]Cl ₃ / 15% Glycerin/10 mM 2-Morpholino-ethanolsulfonsäure, pH 6,3
YT-Medium:	8 g l ⁻¹ Bacto-Trypton/5 g l ⁻¹ Bacto-Hefeextrakt/5 g l ⁻¹ NaCl
cL15-Medium:	L15-Medium (Gibco)/10% Tryptose-Phosphat-Broth (Gibco) 10% Fötales Rinderserum (Gibco), 1 h bei 56 ⁰ C inaktiviert/ 10 mM HEPES, pH 7,1/20 mM L-Glutamin/ 10 ⁵ units l ⁻¹ Penicillin und 100 mg l ⁻¹ Streptomycin (Gibco)
Kulturmedium:	RPMI 1640 mit oder ohne HEPES (Gibco)/2 mM L-Glutamin/ 10% Fötales Rinderserum (Gibco), 1 h bei 56 ⁰ C inaktiviert/ 50 µM 2-Mercaptoethanol/50 mg l ⁻¹ Gentamycin (Gibco)/
L4-Medium:	Dulbecco´s MEM (Gibco)/2 mM L-Glutamin 10% Fötales Rinderserum (Gibco), 1 h bei 56 ⁰ C inaktiviert/ 50 mg l ⁻¹ Gentamycin (Gibco)
Zytotox-Medium:	RPMI 1640 ohne HEPES (Gibco)/ 5% Fötales Rinderserum (Gibco), 1 h bei 56 ⁰ C inaktiviert

3. ERGEBNISSE

Nach den in der Einleitung geschilderten Ergebnissen sind Genprodukte des Parasiten *Theileria parva* direkt oder indirekt an den phänotypischen Veränderungen der infizierten Lymphozyten beteiligt. Zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ist es daher sinnvoll, die vom Parasiten innerhalb der Lymphozyten exprimierten Gene zu untersuchen. Über die vom Parasiten synthetisierte mRNA können diese Gene isoliert werden.

3.1. Isolierung der Parasiten-RNA aus infizierten Lymphozyten

Eine Methode zur Isolierung der Parasiten-RNA aus den infizierten Wirtszellen muß folgende Gesichtspunkte berücksichtigen:

- Sie muß schnell sein, um die Degradation der RNA durch endogene RNAsen so gering wie möglich zu halten;
- Sie muß möglichst quantitativ die RNA der Wirtszellen abtrennen;
- Sie muß die Isolierung von Parasiten-mRNA in Mengen ermöglichen, die es gestatten, die RNA in anschließenden Experimenten als Substrat einzusetzen zu können.

Die entwickelte Methode setzt sich aus drei Schritten zusammen, der Lyse der Wirtszellen, der Abtrennung der intakten Parasiten von den lysierten Bestandteilen der Lymphozyten und der Isolierung der RNA aus den aufgereinigten Parasiten.

a) Lyse der Wirtszellen

Die infizierten Lymphozyten wurden in isotonen oder hypotonen Salzlösungen verschiedenen Detergentien wie Saponin, Tween-20 oder Triton X-100 in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt oder mit Ultraschall behandelt. Mit keiner dieser Behandlungsarten war es möglich, die Lymphozyten auf reproduzierbare Weise zu lysieren, ohne die Parasiten zu zerstören. Dagegen war die Verwendung eines Dounce-Zell-Homogenisators mit eng angepaßtem

Stößel erfolgreich. Die lichtmikroskopische Analyse homogenisierter Zellen mit Hilfe des Trypan-Blau-Ausschlußverfahrens ergab, daß bei einer Zelldichte von $3 - 4 \times 10^7$ Zellen ml^{-1} nahezu alle Zellen aufgebrochen wurden.

b) Aufreinigung der freigesetzten Parasiten

Die freigesetzten Parasiten wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation von den Zelltrümmern der Wirtszellen abgetrennt. Als Gradientenmaterial wurde isotones Percoll eingesetzt. Lösungen verschiedener Dichte wurden durch Verdünnen des isotonen Percolls hergestellt und als Dichtestufen in Corex-Zentrifugenröhrchen übereinandergeschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 400 g und 4°C wurde das jeweilige Interphasen-Material gesammelt und nach Entfernen des Percoll durch Zytospin auf Objektträger gebracht, mit Giemsa angefärbt und lichtmikroskopisch analysiert.

Die Verwendung eines Zweistufen-Dichtegradienten aus 5% und 25% isotonem Percoll erbrachte die besten Resultate. Das Interphasen-Material dieses Gradienten bestand aus freigesetzten Parasiten sowie einigen Zellkernen der Lymphozyten, während die wenigen intakt gebliebenen Lymphozyten am Boden des Gradienten sedimentierten. Der Zell-Detritus der lysierten Lymphozyten drang etwa bis zur Hälfte der 5% Dichtestufe ein, so daß ein sicheres Abtrennen des Interphasen-Materials von dem Wirtszell-Detritus gewährleistet war.

Da das Sediment nur aus wenigen intakten Lymphozyten bestand, wurde versuchsweise der Zweistufen-Dichtegradient durch ein Kissen aus 5% isotonem Percoll ersetzt, um so die Aufreinigung der freigesetzten Parasiten zu vereinfachen. Statt des Interphasen-Materials wurde in diesem Fall das Sediment für die RNA-Isolation eingesetzt.

Ein weiteres Abtrennen der Lymphozyten-Zellkerne von den Parasiten erwies sich für die Isolierung von Parasiten-RNA als nicht erforderlich.

c) Isolation der RNA

Nach Entfernen des Percoll wurde das Interphasen-Material des zweistufigen Gradienten bzw. das resuspendierte Sediment des Einstufengradienten direkt in eine 80°C heiße RNA-Extraktionslösung getropft. Die aus den lysierenden

Parasitenzellen freiwerdende RNA wurde nach Standardmethoden aufgereinigt. Die Gesamtdauer der Präparation von der Lyse der Lymphozyten durch den Dounce-Homogenisator bis zur Lyse der Parasiten durch die heiße RNA-Extraktionslösung betrug ca. 30 Minuten.

3.1.1. Analyse der isolierten RNA

Nach elektrophoretischer Größenauftrennung der RNA zeigte sich bereits im mit Acridinorange gefärbten Gel, daß die Präparationen nicht mit großen Mengen von Lymphozyten-RNA kontaminiert waren (Abb. 3A). Die ribosomale 28 S RNA Untereinheit der Rinderzelle trat deutlich als eine Hauptbande sowohl in der Gesamt-RNA infizierter Lymphozyten (Abb. 3A, Spur 1) als auch in der Gesamt-RNA aus Lymphozyten auf, die durch dreitägige Behandlung mit der theileriziden Substanz BW720c vom Parasiten befreit worden waren (kurierte Lymphozyten) (Abb. 3A, Spur 2). Dagegen war diese rRNA-Bande in der aus dem Sediment des Einstufengradienten isolierten RNA nur schwach (Abb. 3A, Spur 3) und in der aus dem Interphase-Material des Zweistufengradienten isolierten RNA nicht erkennbar (Abb. 3A, Spuren 4 bis 6).

In den RNA-Präparationen der aufgereinigten Parasiten (Abb. 3A, Spuren 3 bis 6) war stattdessen eine RNA-Spezies in der Größe zwischen 23 S und 28 S deutlich vorhanden, die in der RNA infizierter Lymphozyten nur schwach und in der RNA kurierter Lymphozyten fast gar nicht in Erscheinung trat. Diese RNA-Spezies konnte als die große ribosomale RNA-Untereinheit von *T. parva* identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.6.1.)

Um die Sensitivität der Analyse zu steigern, wurde die RNA nach Transfer auf ein Nylonmembran-Filter mit zwei radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die für die Wirtszelle spezifische Rinder-Aktin-cDNA hybridisierte in der RNA aus infizierten (Abb. 3B, Spur 1) und kurierten Lymphozyten (Abb. 3B, Spur 2) mit einem 2,2 kb großen Transkript. In der RNA aus dem sedimentierten Material des Einstufengradienten (Abb. 3B, Spur 3) war das Transkript des Rinder-Aktins nur schwach erkennbar. In der RNA aus dem Interphase-Material des zweistufigen Gradienten (Abb. 3B, Spuren 4 bis 6) war das 2,2 kb große Aktin-Transkript nicht mehr nachweisbar.

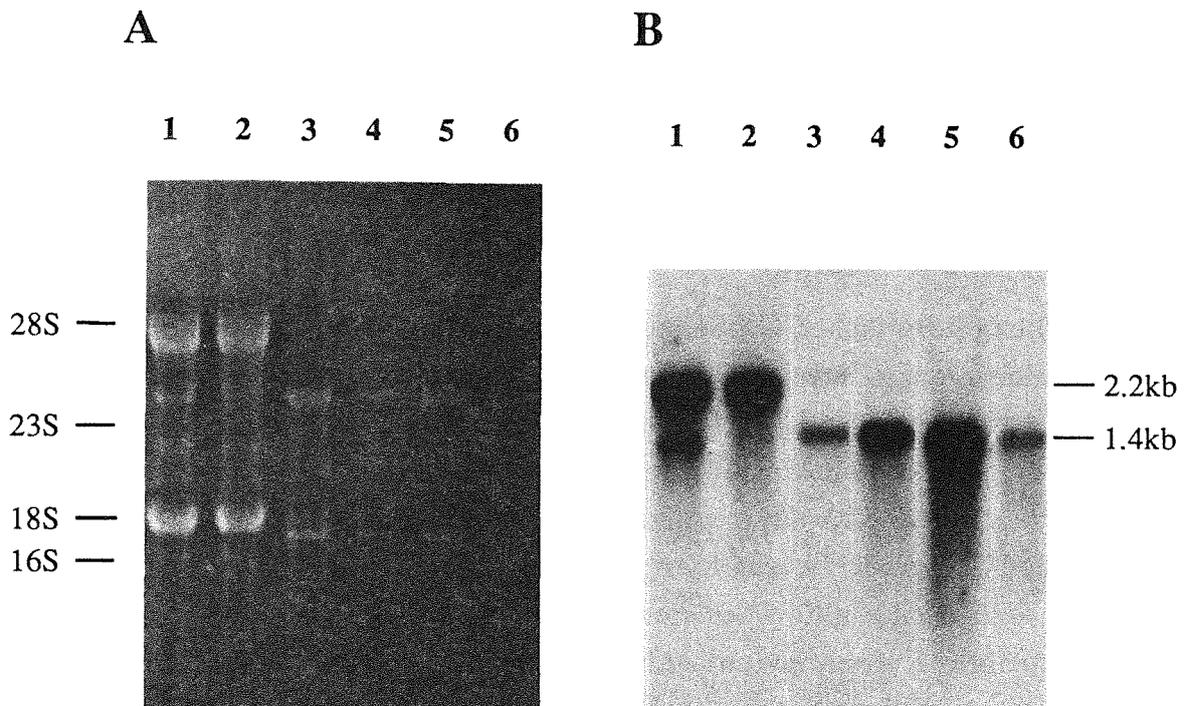


Abb. 3 Analyse der verschiedenen RNA-Präparationen. (A) Mit Acridinorange gefärbtes RNA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung von 10 µg Gesamt-RNA aus infizierten (Spur 1) und kurierten (Spur 2) Lymphozyten sowie von jeweils ca. 5 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Parasiten-Präparationen (Spuren 3 bis 6, siehe Text). (B) Autoradiogramm eines Abbildung A entsprechenden RNA-Gels nach Transfer der RNA auf Nylonmembran-Filter und Hybridisierung mit einer radioaktiven Rinder-Aktin- und *T. parva*-Aktin-cDNA-Sonde. Das Hybridisierungssignal bei 2,2 kb ist spezifisch für das Rinder-Aktin, das Signal bei 1,4 kb spezifisch für das Parasiten-Aktin.

Durch Hybridisierung mit der für *T. parva* spezifischen Aktin-cDNA war in der RNA der verschiedenen Parasiten-Präparationen das 1,4 kb große Aktin-Transkript des Parasiten deutlich nachweisbar (Abb. 3B, Spuren 4 bis 6). Das gleiche galt für die RNA von infizierten Lymphozyten, während erwartungsgemäß das für das Parasiten-Aktin spezifische Hybridisierungssignal in der RNA von kurierten Lymphozyten fehlte.

Die Majorität des für das Parasiten-Aktin spezifischen Hybridisierungssignals trat über einer definierten RNA-Größe auf, ein Indiz dafür, daß die RNA nahezu intakt isoliert wurde.

Sowohl die nicht nachweisbare 28 S rRNA der Rinder-Lymphozyten im mit Acridinorange gefärbten RNA-Gel als auch das Fehlen des Rinder-Aktin-Transkripts bei der wesentlich sensitiveren Northern-Blot-Hybridisierung beweisen, daß die aus dem Interphasen-Material des Zweistufen-Dichtegradienten präparierte RNA zu einem sehr hohen Prozentsatz aus Parasiten-RNA bestand. Bei Verwendung des Einstufengradienten für die Parasiten-Aufreinigung führten die wenigen, intakt gebliebenen Wirtszellen im Sediment zu einer nachweisbaren, wenn auch geringen Verunreinigung mit Lymphozyten-RNA.

In den weiteren Versuchen wurde daher zur Aufreinigung der Parasiten ausschließlich der Zweistufen-Dichtegradient benutzt, wie in Abbildung 4 dargestellt. Die aus dem Interphasen-Material isolierte RNA wird im folgenden als Parasiten-RNA bezeichnet.

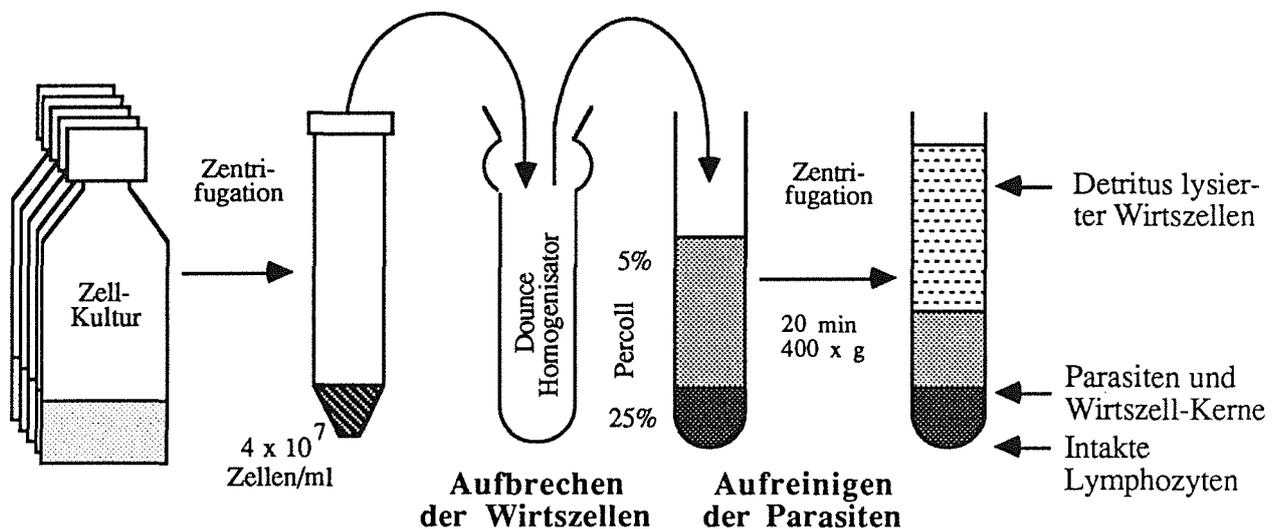


Abb. 4 Schematische Darstellung der entwickelten Methode zur schnellen Aufreinigung von Parasiten aus *T. parva*-infizierten Lymphozyten. Aus dem aus Parasiten und Wirtszell-Kernen bestehenden Interphasen-Material wurde direkt die Parasiten-RNA präpariert.

3.1.2. Steigerung der Ausbeute an Parasiten-RNA durch Cycloheximid-Behandlung der infizierten Lymphozyten

Die Ausbeute an Parasiten-RNA aus 10^8 Lymphozyten lag bei durchschnittlich $4 \mu\text{g}$. Aus der gleichen Anzahl Lymphozyten konnten ca. $500 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA isoliert werden, d.h., daß etwa 0,8% der Gesamt-RNA infizierter Lymphozyten als Parasiten-RNA isoliert wurden.

In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von Cycloheximid zum Kulturmedium die Anzahl der Parasitenkerne im Schizontensynzytium zunimmt, während die Wirtszellen ihre Zellteilung einstellen (Irvin, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Vermutung lag daher nahe, daß sich durch Cycloheximid-Behandlung in den infizierten Lymphozyten das Verhältnis zwischen Parasiten-RNA und Wirtszell-RNA zugunsten der Parasiten-RNA verschieben läßt.

Zu den infizierten Lymphozyten wurden 24 Stunden vor Aufreinigung der Parasiten $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cycloheximid zugegeben. In der Northern-Blot-Analyse zeigte die isolierte Parasiten-RNA aus Cycloheximid-behandelten, infizierten Lymphozyten genau wie die aus unbehandelten Zellen isolierte Parasiten-RNA keine nachweisbaren Verunreinigungen mit Wirtszell-RNA (Abb. 3; Spuren 5 und 6).

Während nach Cycloheximid-Behandlung nur noch $310 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA aus 10^8 infizierten Lymphozyten isoliert werden konnte, stieg die Ausbeute an Parasiten-RNA aus der gleichen Anzahl Zellen auf durchschnittlich $18 \mu\text{g}$. Dies entspricht ca. 6% der Gesamt-RNA. Durch Behandlung der infizierten Lymphozyten mit Cycloheximid konnte die Ausbeute an Parasiten-RNA um den Faktor 4,5 gesteigert werden.

Um den Einfluß der Cycloheximid-Behandlung auf die Zusammensetzung der Parasiten-RNA zu untersuchen, wurde Parasiten-RNA aus behandelten und nicht-behandelten Zellen *in vitro* translatiert und die Translationsprodukte nach eindimensionaler Proteingel-Elektrophorese verglichen. Alle nach Translation der Parasiten-RNA aus unbehandelten Wirtszellen (Abb. 5, Spur Tn) identifizierbaren Polypeptide waren in gleicher Relation in den Translationsprodukten der Parasiten-RNA aus Cycloheximid-behandelten Lymphozyten (Abb. 5, Spur Tc) nachweisbar. Daß durch diese Methode Unterschiede in

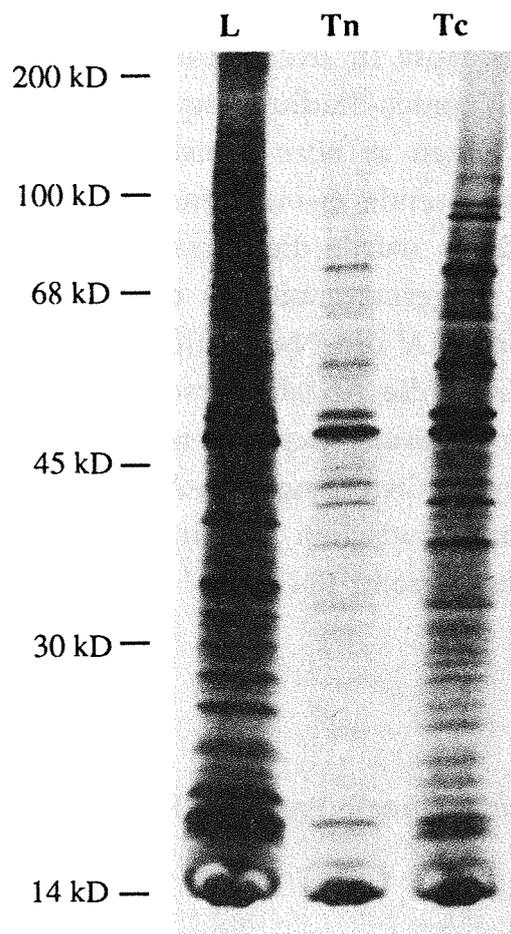


Abb. 5 Vergleich der *in vitro* Translationsprodukte von Parasiten-RNA aus unbehandelten (Tn) und Cycloheximid-behandelten (Tc) Lymphozyten sowie von RNA kurrerter Lymphozyten (L). Jeweils ca. 10 μ g Gesamt-RNA wurden in Gegenwart von [35 S]-Methionin in Polypeptide translatiert und die Translationsprodukte nach eindimensionaler Proteingel-Elektrophorese fluorographisch sichtbar gemacht.

der Zusammensetzung *in vitro* translatierter RNA nachzuweisen waren, zeigen die völlig verschiedenen Polypeptid-Muster, die nach Translation von Parasiten-RNA und RNA von kurrerten Lymphozyten (Abb. 5, Spur L) erhalten wurden.

Da die Cycloheximid-Behandlung die Ausbeute an Parasiten-RNA erhöhte, ohne ihre Zusammensetzung nachweisbar zu verändern, wurde die in allen folgenden Versuchen verwendete Parasiten-RNA aus Cycloheximid-behandelten Lymphozyten gewonnen.

3.2. Charakterisierung der Parasiten-RNA

Um die Anzahl unterschiedlicher Transkripte in der isolierten Parasiten-mRNA und damit die Anzahl der im Schizonten-Stadium exprimierten Gene abzuschätzen, wurde die mRNA zum einen *in vitro* translatiert und die Translationsprodukte durch die besser auflösende zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese aufgetrennt. Zum anderen wurde die Parasiten-mRNA als cDNA in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt, um aus der Hybridisierungskinetik mit homologer Parasiten-mRNA die Nukleotidsequenz-Komplexität (homologe R₀t-Analyse) und daraus die Anzahl verschiedener Parasiten-Transkripte zu bestimmen. In Hybridisierungsexperimenten mit mRNA nicht-infizierter und infizierter Lymphozyten (heterologe R₀t-Analyse) wurde der Anteil kreuzhybridisierender Sequenzen zwischen Parasit und Wirtszelle und der Anteil der Parasiten-mRNA am Gesamt-RNA-Pool der infizierten Lymphozyten bestimmt.

3.2.1. *In vitro* Translation und zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese

Für die *in vitro* Translation wurde die polyadenylierte RNA-Fraktion aus Gesamt-RNA durch oligo-dT-Zellulose-Chromatographie isoliert. Für Parasiten- und Lymphozyten-RNA betrug die Ausbeute jeweils 10%.

In Gegenwart von [³⁵S]-Methionin wurde polyadenylierte Parasiten-RNA (Ansatz A) und zu Vergleichszwecken polyadenylierte RNA infizierter Lymphozyten (Ansatz B) und kurierter Lymphozyten (Ansatz C) *in vitro* translatiert, und die Translationsprodukte durch zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese nach ihrer Ladung (1. Dimension) und nach ihrem Molekulargewicht (2. Dimension) aufgetrennt. Die Translationseffizienz, gemessen als Einbau radioaktiven Methionins pro µg eingesetzter polyadenylierter RNA, war bei allen drei Ansätzen gleich.

In dem Translationsansatz der Parasiten-RNA (Abb. 6A) konnten etwa 200 Polypeptide in einem Größenbereich von 10 kD bis 100 kD und einem Ladungsbereich von pH 3,5 bis pH 10 identifiziert werden.

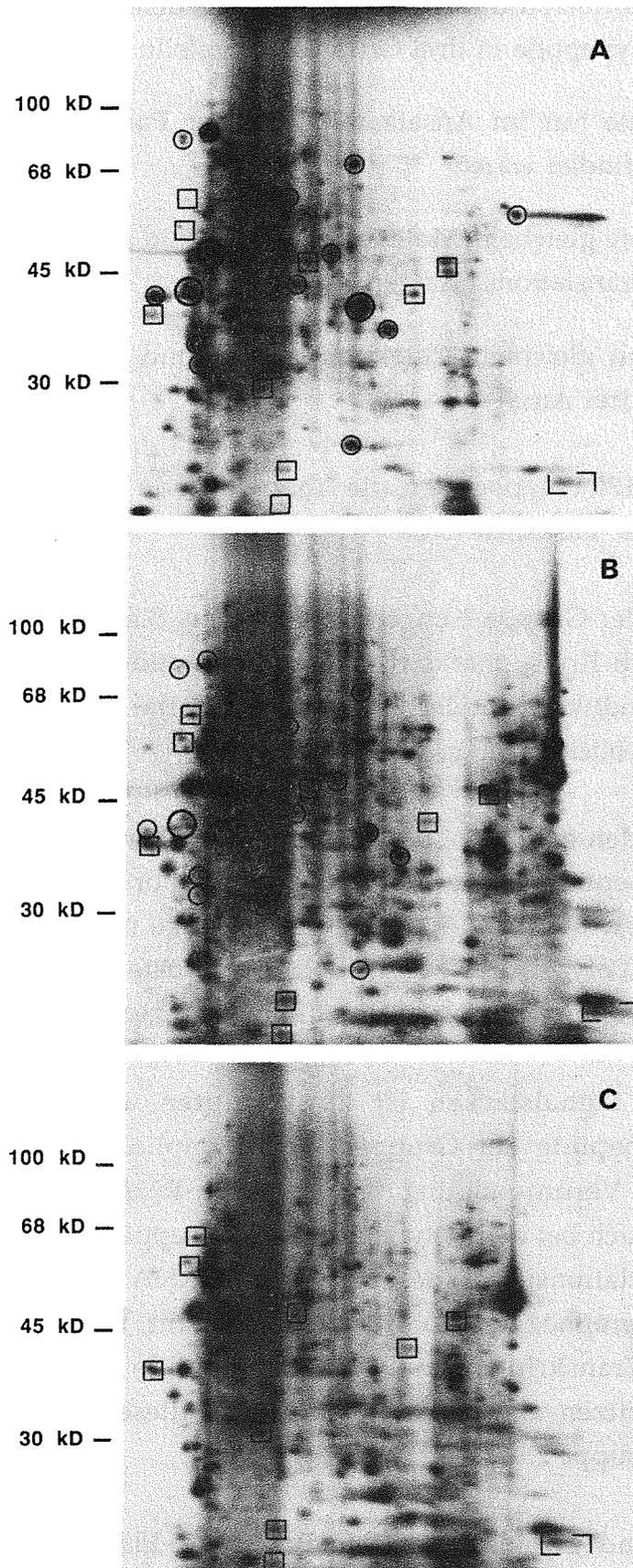


Abb. 6 Fluorogramm der *in vitro*-Translationsprodukte von 1 µg Parasiten-mRNA (A) sowie 1 µg mRNA aus infizierten (B) und kurierten (C) Lymphozyten nach Auftrennung durch zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese. Translationsprodukte gleicher Ladung und Größe in allen drei Translationsansätzen sind durch Rechtecke, solche in Ansatz A und B durch Kreise markiert.

Um den Vergleich der Translationsprodukte aus den verschiedenen Ansätzen zu erleichtern, wurden die Polypeptide in drei Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: Polypeptide, die nur im Ansatz mit isolierter Parasiten-RNA (Ansatz A) zu finden waren.
- Gruppe 2: Polypeptide mit gleichem Molekulargewicht und gleicher Ladung in den Translationsansätzen A und B.
- Gruppe 3: Polypeptide mit gleichem Molekulargewicht und gleicher Ladung in allen drei Ansätzen.

Die Gruppe 1 stellte mit ca. 170 Polypeptiden die überwiegende Mehrheit in den Translationsprodukten der Parasiten-RNA.

Nur 18 Polypeptide konnten der Gruppe 2 zugeordnet werden. Sie sind in den Abbildungen 6A und 6B durch Kreise markiert. Diese Polypeptide stellten im Ansatz A die Translationsprodukte mit der höchsten Intensität dar, hatten dagegen in Ansatz B eine erheblich geringere Intensität.

Lediglich 13 Polypeptide wurden gefunden, die aufgrund der übereinstimmenden Lage in allen drei Polypeptidmustern der Gruppe 3 zuzuordnen waren. Diese sind in den Abbildungen 6A, 6B und 6C durch Rechtecke markiert. Die Intensität der Signale dieser Polypeptide war in den drei Mustern entweder nahezu identisch oder im Ansatz A schwächer als in den Ansätzen B und C.

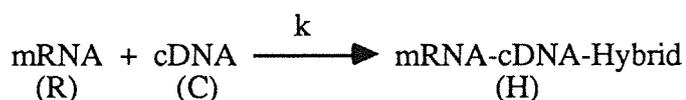
Aufgrund der gefundenen Signalstärken ist zu vermuten, daß die im Ansatz A auftretenden Polypeptide der Gruppe 3 von Lymphozyten-Transkripten herrührten, die als Verunreinigung der Parasiten-RNA mitisoliert wurden. Dagegen handelt es sich bei den Polypeptiden der Gruppe 2 mit hoher Wahrscheinlichkeit um Translationsprodukte der Parasiten-RNA. Da nur ein Teil der RNA in infizierten Lymphozyten vom Parasiten stammt, ist zu erwarten, daß die von Parasiten-Transkripten kodierte Polypeptide in Ansatz B eine geringere Intensität besitzen als in Ansatz A. Genau dieses Verhalten zeigten die Polypeptide der Gruppe 2.

Durch *in vitro* Translation und zweidimensionale Proteingel-Elektrophorese konnten ca. 190 verschiedene Parasiten-Transkripte in Form von Polypeptiden nachgewiesen werden. Diese Zahl ist jedoch nur eine sehr grobe Abschätzung

der Anzahl exprimierter Parasiten-Gene, da mit dieser Methode Transkripte geringer Häufigkeit nicht identifiziert werden können.

3.2.2. Homologe R_0t -Analyse

Mit Hilfe der R_0t -Analyse läßt sich die Nukleotidsequenz-Komplexität (X) der untersuchten mRNA (= die Anzahl aller in mRNA-Moleküle transkribierten Nukleotide der DNA) und daraus die Anzahl der exprimierten Gene bestimmen. Die Analyse beruht auf der Hybridisierung einzelsträngiger cDNA, die als radioaktive Sonde von der zu untersuchenden mRNA hergestellt wurde, mit eben dieser mRNA im Überschuß.



Bei gleicher Häufigkeit aller mRNA-Moleküle ist das Produkt aus mRNA-Ausgangskonzentration (R_0 , in mol Nukleotide l^{-1}) und der Reaktionszeit $t_{1/2}$, bei der 50% aller cDNA-Moleküle als mRNA-cDNA-Hybride vorliegen, direkt proportional zur Nukleotidsequenz-Komplexität (X) der mRNA (Galau *et al.* 1974).

Da die mRNA eukaryontischer Zellen aus Gruppen von Transkripten mit unterschiedlicher Häufigkeit zusammengesetzt ist (Bishop *et al.* 1974), muß für jede dieser Gruppen der $R_0t_{1/2}$ -Wert getrennt bestimmt werden. Die Anzahl der Häufigkeitsgruppen, ihr Anteil an der Gesamt-Hybridisierungskinetik und ihr $R_0t_{1/2}$ -Wert wurden mit Hilfe eines Computer-Programms aus den experimentell gewonnenen Hybridisierungswerten errechnet. Der prozentuale Anteil der mRNA-cDNA-Hybride wurde durch Nuclease S1-Verdau von jeweils einem Aliquot der Hybridisierungslösung für die einzelnen R_0t -Werte ermittelt.

Zur Bestimmung des Proportionalitätsfaktors P zwischen $R_0t_{1/2}$ und X wurde für die Maus-Globin-mRNA mit einer bekannten Komplexität von 1,2 kb eine Hybridisierungskinetik aufgenommen (Abb. 7A und B, ■). Der Anteil hybridisierbarer cDNA betrug 82% der eingesetzten Radioaktivität. Aus dem ermittelten $R_0t_{1/2}$ -Wert von $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}$ ergab sich für den Proportionalitätsfaktor P ein Wert von $9,23 \times 10^2 \text{ kb mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$.

Die Hybridisierungskinetik der Lymphozyten-mRNA begann bei einem R_{0t} -Wert von $10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}$ und endete bei einem R_{0t} -Wert von $10^2 \text{ mol l}^{-1} \text{ s}$ (Abb. 7A, \diamond , \blacktriangle). Der Anteil hybridisierbarer cDNA betrug 89% der eingesetzten Radioaktivität. Die $R_{0t_{1/2}}$ -Werte der ermittelten Häufigkeitsgruppen und die daraus errechneten Werte der Nukleotidsequenz-Komplexität sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Aus diesen Werten ergibt sich eine Gesamtkomplexität der mRNA infizierter Lymphozyten von $8,3 \times 10^3 \text{ kb}$. Bei einer angenommenen mittleren Transskriptlänge von 2 kb (Bishop *et al.* 1974) entspricht dies 4.200 Transkripten.

Häufigkeitsgruppe	1	2	3
gemessene $R_{0t_{1/2}}$ ($\text{mol l}^{-1} \text{ s}$)	0,02	0,22	14,7
Anteil der Gruppe an der hybridisierbaren cDNA (%)	8,4	31,2	60,4
korrigierte $R_{0t_{1/2}}$ ($\text{mol l}^{-1} \text{ s}$)	$1,7 \times 10^{-3}$	7×10^{-3}	8,9
Nukleotidsequenz-Komplexität (kb)	1,6	65	8215

Tabelle 1 Analyse der Hybridisierungskinetik von cDNA und mRNA infizierter Lymphozyten. Der korrigierte $R_{0t_{1/2}}$ -Wert ist das Produkt aus gemessenem $R_{0t_{1/2}}$ -Wert und dem Anteil jeder Häufigkeitsgruppe an der hybridisierbaren cDNA. Die Nukleotidsequenz-Komplexität ist das Produkt aus korrigiertem $R_{0t_{1/2}}$ -Wert und dem aus der Globin-Hybridisierungskinetik ermittelten Proportionalitätsfaktor P.

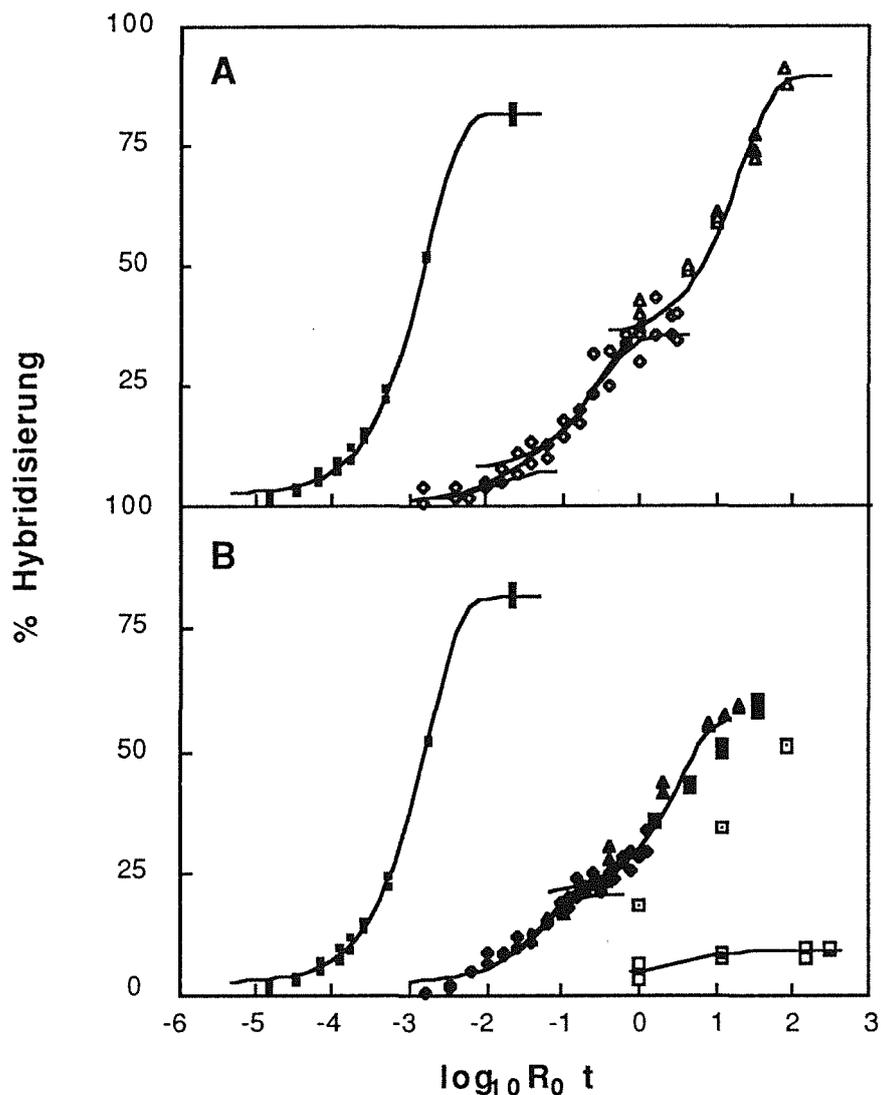


Abb. 7 Charakterisierung der mRNA durch homologe und heterologe R_0t -Analyse. (A) Hybridisierung von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (◆) und $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ (▲) mRNA aus infizierten Lymphozyten mit der homologen cDNA. (B) Hybridisierung von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (◆), $195 \mu\text{g ml}^{-1}$ (▲) und $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ (■) Parasiten-mRNA mit der homologen cDNA. Die gleiche von Parasiten-mRNA synthetisierte cDNA wurde in der heterologen Hybridisierung mit $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ mRNA aus infizierten Rinder-Lymphozyten (□) und mit $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ mRNA aus nicht-infizierten ConA-stimulierten Rinder-Lymphoblasten (□) eingesetzt. Die Hybridisierung von $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Maus-Globin-mRNA mit der homologen cDNA (■) diente als kinetischer Standard für die Berechnung des Proportionalitätsfaktors P (A und B).

Häufigkeitsgruppe	1	2
gemessene $R_{0t_{1/2}}$ (mol l ⁻¹ s)	0,06	2,82
Anteil der Gruppe an der hybridisierbaren cDNA (%)	23	40,7
korrigierte $R_{0t_{1/2}}$ (mol l ⁻¹ s)	$1,4 \times 10^{-2}$	1,15
Nukleotidsequenz-Komplexität (kb)	12,9	1062

Tabelle 2 Analyse der Hybridisierungskinetik von cDNA und mRNA des Parasiten. Die Tabellenwerte wurden in gleicher Weise ermittelt wie in der Legende zu Tabelle 1 beschrieben. Die hybridisierbare cDNA wurde in Analogie zu den Ergebnissen für die Lymphozyten mit 89% der eingesetzten Radioaktivität angenommen.

Dieselbe Analyse wurde für die isolierte Parasiten-mRNA durchgeführt. Eine Analyse bei hohen R_{0t} -Werten erfordert sehr große Mengen mRNA. Die notwendigen Mengen an Parasiten-mRNA konnten jedoch nicht präpariert werden, so daß bei einem R_{0t} -Wert von 40 mol l⁻¹ s die Kinetik abgebrochen werden mußte. Bei diesem R_{0t} -Wert betrug der Hybridisierungsgrad 60%. Auch bei der Parasiten-mRNA begann die Hybridisierungskinetik bei einem R_{0t} -Wert von 10⁻³ mol l⁻¹ s (Abb. 7B, ◆, ▲, ■).

Die errechneten Werte für die Nukleotidsequenz-Komplexität der ermittelten Häufigkeitsgruppen sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Gesamtkomplexität der Parasiten-mRNA betrug 1.075 kb. Dies entspricht ca. 530 Parasiten-Transkripten. Da die Häufigkeitsgruppe 3 der Transkripte mit geringer Häufigkeit nicht erfaßt wurde, stellt dieser Wert nur eine untere Grenze für die Anzahl exprimierter Parasiten-Gene dar.

Aufgrund des ähnlichen Kurvenverlaufs für die Hybridisierungskinetiken der Parasiten-mRNA und der Lymphozyten-mRNA innerhalb desselben R_{0t} -Bereichs wurde die Gesamt-Komplexität der Parasiten-mRNA auf einen Wert von 8×10^3 kb geschätzt. Dies entspricht ca. 4.000 exprimierten Parasiten-Genen.

3.2.3. Heterologe R_{0t} -Analyse

Der Anteil von für den Parasiten spezifischen cDNA-Klonen in der cDNA-Genbank von mRNA infizierter Lymphozyten war nicht bekannt. Da dieser Anteil in der cDNA-Genbank dem Anteil der Parasiten-mRNA in der Gesamt-mRNA der infizierten Lymphozyten entsprechen sollte, wurde der Parasitenanteil an der Gesamt-mRNA in den infizierten Lymphozyten durch heterologe R_{0t} -Analyse ermittelt.

Von der Parasiten-mRNA wurde radioaktiv markierte cDNA präpariert und mit mRNA aus infizierten Lymphozyten hybridisiert. Als Kontrolle für den Anteil kreuzhybridisierender Sequenzen zwischen Parasiten-mRNA und Lymphozyten-mRNA wurde die radioaktiv markierte cDNA mit mRNA aus nicht-infizierten, mit Concanavalin (ConA) stimulierten Rinder-Lymphoblasten hybridisiert.

Bei der Kontroll-Hybridisierung blieb der Hybridisierungsgrad konstant bei ca. 10% zwischen den R_{0t} -Werten von $10 \text{ mol l}^{-1} \text{ s}$ und $300 \text{ mol l}^{-1} \text{ s}$ (Abb. 7B, ▣). Dies bedeutet erstens, daß die Hybridisierungsreaktion vollständig abgelaufen war, und zweitens, daß nicht mehr als 10% der isolierten Parasiten-mRNA mit Transkripten von proliferierenden Rinder-Lymphozyten kreuzhybridisierte.

Für dieselben R_{0t} -Werte wurde die Hybridbildung zwischen Parasiten-cDNA und der mRNA infizierter Lymphozyten bestimmt und anschließend um die bei der Hybridisierungsreaktion mit der mRNA aus ConA-Lymphoblasten ermittelten Werte korrigiert (Abb. 7B, ▣).

In der heterologen Hybridisierung von Parasiten-cDNA mit mRNA infizierter Lymphozyten lagen bei gleichem Hybridisierungsgrad die R_{0t} -Werte um eine Zehnerpotenz höher als in der homologen Hybridisierung von Parasiten-cDNA mit Parasiten-mRNA. Dies bedeutet, daß zehnmal mehr mRNA infizierter Lymphozyten eingesetzt werden mußte, um bei der heterologen Hybridisierung in derselben Reaktionszeit denselben Hybridisierungsgrad zu erzielen wie bei der homologen Hybridisierung.

Mit anderen Worten, der Anteil der von dem Parasiten beigesteuerten mRNA an der mRNA infizierter Lymphozyten betrug 10%.

3.3. Klonierung von Parasiten-Transkripten

Zunächst wurde die isolierte Parasiten-mRNA als Sonde eingesetzt, um aus der cDNA-Genbank von mRNA infizierter Lymphozyten für den Parasiten spezifische cDNA-Klone zu isolieren.

Von 10^4 ausplattierten Phagen-Klonen dieser Genbank hybridisierten neun Klone spezifisch mit der Sonde. Durch DNA-Dot-Blot-Hybridisierung wurden Klone mit identischen cDNA-Sequenzen ausgeschlossen. Die Analyse der verbleibenden, als #T7, #T8, #T9 und #T13 bezeichneten cDNA-Klone in den anschließend beschriebenen Southern-Blot- und Northern-Blot-Hybridisierungsexperimenten zeigte, daß die isolierten cDNA-Klone für den Parasiten spezifisch waren (Abb. 8).

Jedes cDNA-Insert hybridisierte mit jeweils nur einem Transkript definierter Größe in der polyadenylierten RNA (A⁺-RNA) aus infizierten Lymphozyten (Abb. 8, Spuren I). Das Hybridisierungssignal war um ein Vielfaches stärker als in der polyadenylierten RNA aus kurierten Lymphozyten (Abb. 8, Spuren C). Um auszuschließen, daß die cDNA-Klone zu Rinder-Genen homolog sind, die in infizierten Lymphozyten stärker transkribiert werden als in kurierten Lymphozyten, wurden die cDNA-Inserts in Southern-Blot-Hybridisierungen mit genomischer DNA von Parasit und Rind eingesetzt.

Da das Parasiten-Genom eine 100fach kleinere Nukleotidsequenz-Komplexität als das Säuger-Genom besitzt (Allsopp und Allsopp 1988), wurde in den Southern-Blot-Hybridisierungen eine 100fach geringere Menge an Parasiten-DNA eingesetzt. Dadurch wird die Anzahl der Genkopien für die Rinder- und Parasiten-DNA konstant gehalten, so daß die Intensitäten der Hybridisierungssignale direkt miteinander verglichen werden können. In der genomischen DNA des Parasiten (Abb. 8, Spuren T) hybridisierte jedes cDNA-Insert mit jeweils einem *Eco*RI-Fragment unterschiedlicher Größe. Alle vier cDNA-Inserts hybridisierten mit Rinder-DNA-Fragmenten von 2,2 kb und 1,5 kb Größe (Abb. 8, Spuren B). Diese Fragmente waren bereits im mit Ethidiumbromid gefärbten Gel als distinkte Banden zu erkennen. Es handelt sich daher wahrscheinlich um repetitive Sequenzen in der DNA des Rindes, an die die cDNA-Inserts in unspezifischer Weise hybridisierten.

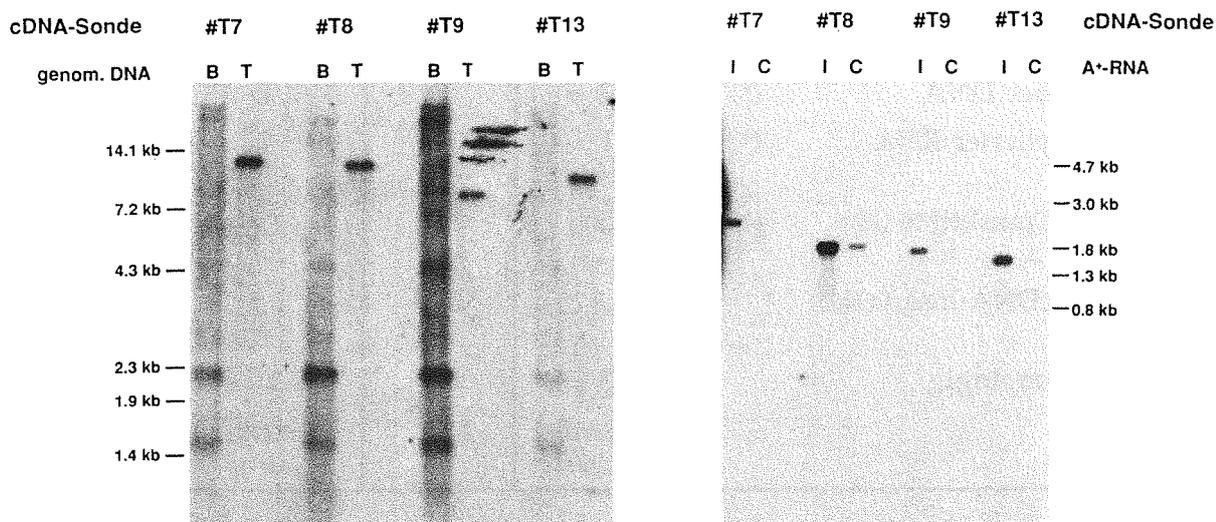


Abb. 8 Die isolierten cDNA-Klone sind für *T. parva* spezifisch. 10 µg genomische Rinder-DNA (B) und 100 ng genomische Parasiten-DNA (T) wurden nach *Eco*RI-Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembran-Filter mit den angegebenen radioaktiv markierten cDNA-Inserts hybridisiert. 1 µg mRNA aus infizierten (I) und kurierten (C) Lymphozyten wurde nach Gelelektrophorese auf Nylonmembran-Filter transferiert und mit den gleichen Sonden hybridisiert.

Die 5' und 3' Enden der cDNA-Inserts wurden ansequenziert und mit bereits publizierten Sequenzen in der Sequenz-Datenbank "NIH-GenBank" verglichen. Der Klon #T9 besaß über 65% Sequenzhomologie zu dem Translationselongationsfaktor TEF-1 α (siehe Abschnitt 3.6.2.). Der Klon #T7 war zu über 60% homolog zu dem Hitzeschockprotein hsp90 (siehe Abschnitt 3.6.3.). Für den Klon #T8 wurden keine Sequenzhomologien gefunden. Die Hybridisierung der cDNAs mit der bereits klonierten Aktin-cDNA des Parasiten ergab, daß der cDNA-Klon #T13 für Aktin kodierte.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der vier für den Parasiten spezifischen cDNA-Klone sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

cDNA-Klon	#T7	#T8	#T9	#T13
Hybridisierung mit:				
- genomischer DNA (*1)	T	T	T	T
- polyadenylierter RNA (*2)	I	I	I	I
Länge des Transkripts (kb) (*3)	2,3	1,8	1,7	1,4
Länge des cDNA-Inserts (kb)	2,3	0,5	0,8	1,4
Sequenzhomologie	hsp83 (*4) <i>Drosophila melanogaster</i>	- -	TEF-1 α (*5) <i>Artemia salina</i>	Aktin (*6) <i>Theileria parva</i>

Tabelle 3 Analyse der vier isolierten cDNA-Klone aus der cDNA-Genbank von infizierten Lymphozyten. *1 T: genomische DNA von *T. parva*; *2 I: RNA aus infizierten Lymphozyten; *3 die Transkriptlänge wurde aus Abb. 8 bestimmt; *4 durch Sequenzvergleich mit der NIH-GenBank ermittelt, siehe Abschnitt 3.6.3.; *5 durch Sequenzvergleich mit der NIH-GenBank ermittelt, siehe Abschnitt 3.6.2.; *6 aufgrund der Kreuzhybridisierung mit der *T. parva* Aktin-cDNA.

Nur wenige für den Parasiten spezifische cDNA-Klone konnten mit der isolierten Parasiten-mRNA aus der cDNA-Genbank von infizierten Lymphozyten isoliert werden. Die von diesen Klonen kodierten Proteine zählen zu den häufigsten intrazellulären Proteinen in Eukaryonten. Aus der isolierten Parasiten-mRNA wurde daher eine spezifische cDNA-Genbank hergestellt, um einen direkteren und damit einfacheren Zugang zu zahlreichen, auch weniger häufigen Parasiten-Transkripten zu erhalten.

Aus 5 μ g Parasiten-mRNA konnten 4,3 μ g doppelsträngige cDNA synthetisiert werden. Die cDNA wurde in zwei Größenfraktionen von 0,3 - 0,8 kb (Fraktion 2) und größer 0,8 kb (Fraktion 1) aufgetrennt und in den Phagen λ gt10 kloniert. Dieser Phage wurde als Klonierungsvektor gewählt, weil Phagen, im Vergleich zu Plasmid-Vektoren eine 10 bis 100 fach höhere Transfektionsrate in *Escherichia coli* besitzen und darüberhinaus bei Verwendung eines *E. coli* hflA-Wirts auf rekombinierte λ gt10 Phagen (= Phagen mit cDNA-Insert)

Ligationsansatz	1	2	3	4	5	6
λ gt10-DNA (μ g)	0,5	0,5	1	1	1	1
Insert-DNA (μ g):						
- Test-Fragment	-	0,2	-	-	-	-
- cDNA-Fraktion 1	-	-	0,5	0,5	-	-
- cDNA-Fraktion 2	-	-	-	-	0,27	0,27
10^6 PFU/ μ g λ gt10-DNA	0,03	12	4,75	1,9	1,1	1,2

Tabelle 4 Zusammensetzung und Klonierungseffizienz der Ligationsansätze.

biologisch selektioniert werden kann. Die Klonierungseffizienz der cDNA-Fraktionen ist zusammen mit den Kontrollen in Tabelle 4 dargestellt.

Die Klonierungseffizienz, gemessen als Plaque-bildende Einheiten (PFU) pro μ g Vektor-DNA, lag für die cDNA der Fraktion 2 um den Faktor 40 (Ligationsansatz 5 und 6) und für die cDNA der Fraktion 1 um den Faktor 158 (Ligationsansatz 3) bzw. 63 (Ligationsansatz 4) über der im Kontrollansatz ohne Testinsert (Ligationsansatz 1) und zeigte damit an, daß als Folge der Ligation mit cDNA-Fragmenten rekombinante Phagen gebildet worden waren. Die maximal mögliche Klonierungseffizienz wurde in dem Kontrollansatz mit einem *EcoRI*-Testinsert (Ligationsansatz 2) ermittelt und lag um den Faktor 400 über der im Kontrollansatz ohne Testinsert (Ligationsansatz 1).

Zur Abschätzung der Größe der klonierten cDNA-Inserts wurde von zufällig ausgewählten Einzel-Plaques aus dem Ligationsansatz 3 die Phagen-DNA isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten. In 60% der Klone waren Inserts größer als 0,8 kb vorhanden. Die Herkunft der Inserts wurde in Hybridisierungsexperimenten mit genomischer DNA von Rind und Parasit sowie mit mRNA von infizierten und kurierten Lymphozyten verifiziert.

Die Komplexität der aus der cDNA-Fraktion 1 erstellten cDNA-Genbank mit insgesamt $6,65 \times 10^6$ PFU (Tabelle 4, Ligationsansatz 3 und 4) wurde aus der unteren Insertgröße, dem Anteil Insert-tragender Phagen-Klone und der An-

zahl erhaltener Phagen mit $0,8 \text{ kb} \times 60\% \times 6,65 \times 10^6$ zu $3,2 \times 10^6 \text{ kb}$ berechnet. Durch Vergleich mit der aus der R₀t-Analyse geschätzten Nukleotidsequenz-Komplexität der Parasiten-mRNA von $8 \times 10^3 \text{ kb}$ (siehe dazu Abschnitt 3.2.2.) wurde geschlossen, daß in der erstellten cDNA-Genbank mit einer 400fach höheren Komplexität alle Transkripte des Parasiten repräsentiert sind.

3.4. Versuche zur Isolierung membrangebundener Translationskomplexe

Die Komplexität der Parasiten-mRNA und die daraus resultierende Komplexität der cDNA-Genbank macht ein Verfahren erforderlich, um zwischen Proteinen mit "Haushaltsfunktion" und solchen, die an der Parasit-Wirt-Beziehung beteiligt sind, unterscheiden zu können. Genprodukte, die vom Parasiten sezerniert oder auf seiner Oberfläche exprimiert werden, sind von ihrer Lokalisation her in der Lage, mit Komponenten der Wirtszelle zu interagieren. Sowohl sekretorische als auch membrandurchspannende Oberflächen-Proteine besitzen die gemeinsame Eigenschaft, daß die sie kodierenden Transkripte an membrangebundenen Ribosomen translatiert werden. Gelingt es, die membrangebundenen Translationskomplexe des Parasiten zu isolieren, kann die daraus präparierte mRNA als Sonde eingesetzt werden, um in der für den Parasiten spezifischen cDNA-Genbank nach cDNA-Klonen für sekretorische und membrandurchspannende Proteine zu suchen.

Die von Mechler und Rabbits (1981) für Maus-Myeloma-Zellen beschriebene Methode zur Trennung membrangebundener und freier Translationskomplexe durch Fraktionierung der Zell-Lysate mittels Zentrifugation durch einen dreistufigen Saccharose-Dichtegradienten konnte für die von *T. parva* infizierten Rinder-Lymphozyten reproduziert werden. Das Material der oberen Interphase wurde als Fraktion MB, das Material der unteren Interphase als Fraktion F gesammelt, die RNA daraus isoliert und durch Northern-Blot-Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden analysiert (Abb. 9). Als Marker für Transkripte zytosolischer Proteine diente die cDNA des Rinder-Aktins, als Marker für membranständig translatierte Transskripte die cDNA des Interleukin-2-Rezeptors des Rindes.

Ein für Aktin spezifisches starkes Hybridisierungssignal trat in der Fraktion F, ein wesentlich schwächeres in der Fraktion MB auf. Dagegen war das im Vergleich zu Aktin in erheblich geringeren Mengen vorliegende Transkript des

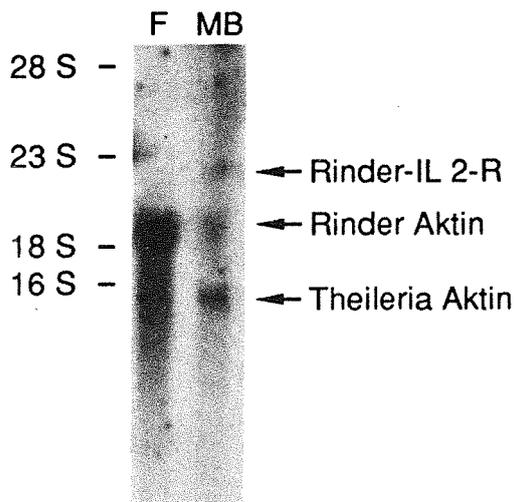


Abb. 9 Anreicherung membranständig translaterter RNA von infizierten Lymphozyten. Von der aus der Fraktion (MB) und der Fraktion (F) isolierten Gesamt-RNA wurden jeweils 2 μ g gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembran-Filter mit radioaktiv markierter cDNA des Interleukin-2-Rezeptors (IL 2-R) des Rindes, des Rinder-Aktins und des Aktins von *T. parva* gleichzeitig hybridisiert.

Interleukin-2-Rezeptors (IL-2-R) als Hybridisierungssignal nur in der Fraktion MB nachweisbar. Die Fraktionierungsmethode ermöglichte somit eine Anreicherung membranständig translaterter RNA des Lymphozyten in der Fraktion MB.

Die Hybridisierung mit der für *T. parva* spezifischen Aktin-cDNA-Sonde zeigte, daß die Parasiten-RNA zum überwiegenden Teil in der Fraktion MB zu finden war. In der der Fraktionierung der RNA vorausgehenden Lyse der Lymphozyten mit dem Dounce-Zellhomogenisator wurden die Parasiten nicht lysiert, so daß sie als intakte Zellen diese Fraktion kontaminierten.

Um die RNA-Fraktionierungsmethode auf isolierte Parasiten anzuwenden, war eine Methode zum mechanischen Aufbrechen der Parasiten erforderlich. Mit dem Dounce-Zellhomogenisator war dies nicht möglich. Durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen der Parasiten-Präparation lysierten die in der Parasiten-Präparation vorhandenen Zellkerne der Wirtszelle, so daß die Lösung hochviskos wurde und die Parasiten ebenfalls nicht lysierten.

Daher wurde versucht, die Parasiten mit Hilfe der Frenchpress aufzubrechen. Bei einem Austrittsdruck von 5.000 PSI waren lichtmikroskopisch keine intakten Parasiten mehr zu erkennen. Die Ribosomen schienen bei diesem Druck nicht zerstört zu werden, da sie im RNA-Gel weiterhin als distinkte Banden

zu erkennen waren (Abb. 10A). Von unterschiedlichen Saccharose-Dichtegradienten wurden jeweils die Fraktion MB und die Fraktion F gesammelt und die daraus isolierte RNA im RNA-Gel und durch Northern-Blot-Hybridisierung analysiert. Die aus den Fraktionen MB isolierten RNA-Mengen waren mit maximal 10 μg zu gering, um daraus Polysomen aufzureinigen zu können.

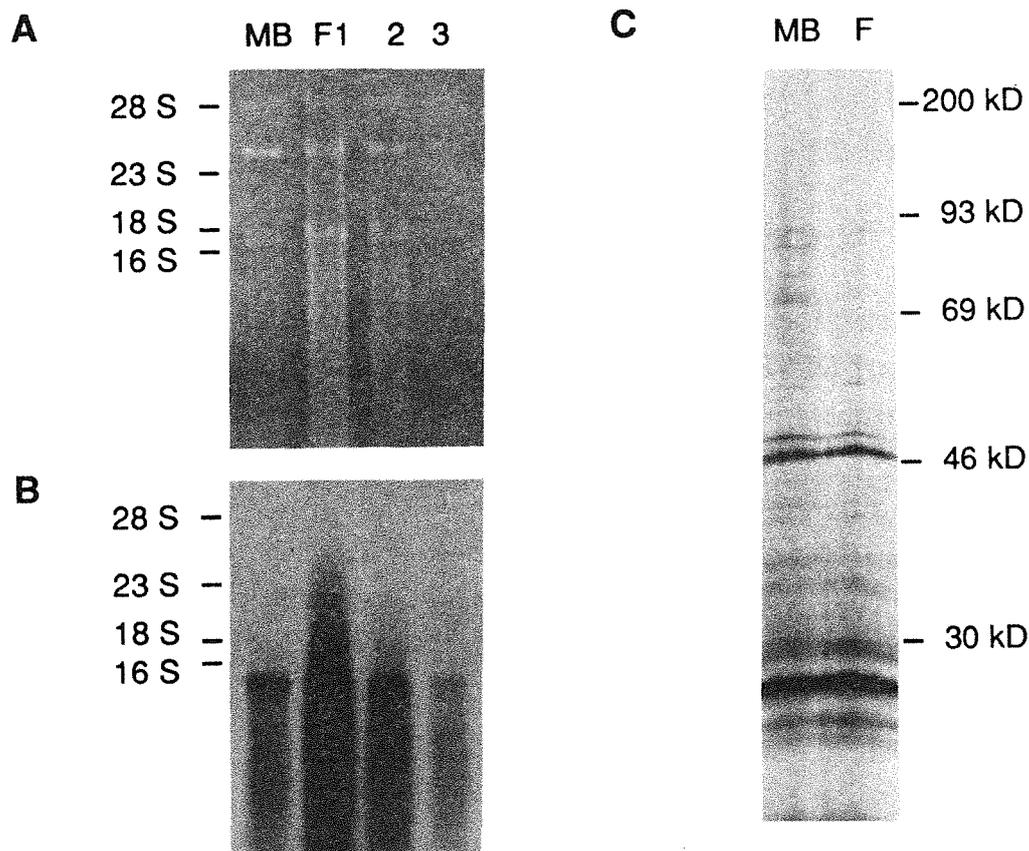


Abb. 10 Analyse der aus der Fraktion MB und der Fraktion F isolierten Parasiten-RNA. (A) Die Hälfte der aus der Fraktion MB isolierten Gesamt-RNA sowie 10 μg (F1), 5 μg (F2) und 1 μg (F3) Gesamt-RNA aus der Fraktion F wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die ribosomale RNA durch Färbung mit Acridinorange sichtbar gemacht. (B) Autoradiogramm des RNA-Gels von (A) nach Hybridisierung mit radioaktiv markierter *T. parva*-Aktin-cDNA. (C) Fluorogramm der *in vitro* Translationsprodukte von 5 μg Gesamt-RNA der Fraktion MB und der Fraktion F nach Auftrennung durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese.

Da für *T. parva* keine im Schizonten-Stadium exprimierte Gene kloniert vorliegen, die für sekretorische oder membrandurchspannende Proteine kodieren, konnten die von den Dichtegradienten gesammelten Fraktionen nur indirekt auf eine Anreicherung von membranständig translatierter RNA des Parasiten überprüft werden. Bei gleichen Mengen an untersuchter RNA, gemessen an der Intensität der rRNA-Banden, sollten bei Anreicherung membranständig translatierter RNA deutlich weniger Aktin-Transkripte in der Fraktion MB enthalten sein als in der Fraktion F, und die von der RNA der Fraktion MB *in vitro* synthetisierten Polypeptide sollten verschieden sein von den Translationsprodukten der Fraktion F.

Repräsentativ für zahlreiche Versuche ist das Ergebnis der Analyse in Abbildung 10 dargestellt. Um RNA-Mengen mit gleicher Anzahl ribosomaler RNA vergleichen zu können, wurde die aus der Fraktion F isolierte RNA in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen. In der Spur MB und der Spur F2 lagen etwa dieselben Mengen an rRNA vor (Abb. 10A). Die Hybridisierung mit der Aktin-Sonde zeigte nur eine minimale Reduzierung der Aktin-Transkripte in der Fraktion MB (Abb. 10B). Auch nach *in vitro*-Translation der beiden RNA-Fraktionen ergab sich ein fast identisches Protein-Bandenmuster (Abb. 10C).

Die Anreicherung membranständig translatierter Parasiten-Transkripte war nicht ausreichend, um diese RNA als Sonde zum Screenen der cDNA-Bank verwenden zu können.

3.5. Funktionelle Analyse von *T. parva*-cDNA-Klonen

Parallel zu den Versuchen, durch Isolierung membrangebundener Translationskomplexe des Parasiten eine Sonde zum Screenen der cDNA-Genbank zu erhalten, wurden bereits isolierte cDNA-Klone des Parasiten daraufhin untersucht, ob sie an der Parasit-Wirt-Beziehung beteiligt sind.

3.5.1. Sequenzanalyse ausgewählter cDNA-Klone

Durch Ansequenzieren beider Enden der cDNA-Inserts können Informationen darüber gewonnen werden, ob Homologien zu bereits bekannten Genen existieren, in welchem Leseraster der Protein-kodierende Bereich vorliegt, und ob der originäre Translationsstart auf dem Insert vorhanden ist. Existierende Homologien können bereits einen Hinweis auf die Funktion des cDNA-kodierten Parasiten-Proteins geben. Die Kenntnis des korrekten Leserasters ist für die Expression der cDNA als bakterielles Fusionsprotein wichtig (siehe Abschnitt 3.5.2.1.). Das Vorhandensein oder Fehlen des originären Translationsstarts und damit der für den N-Terminus des Proteins kodierenden Sequenz ist ausschlaggebend für die Interpretation der *in vitro* Transkriptions-/Translations-/Translokationsanalyse (siehe Abschnitt 3.5.5.).

Der aus dem Screening der cDNA-Genbank von infizierten Lymphozyten isolierte cDNA-Klon #T7 und die aus der für den Parasiten spezifischen cDNA-Genbank isolierten cDNA-Klone #101, #133 und #152 wurden für die Charakterisierung ausgewählt. Der cDNA-Klon #T7 enthielt die vollständige Protein-kodierende Sequenz und besaß Sequenz-Homologien zu dem Hitzeschockprotein hsp90 (siehe Abschnitt 3.6.3.), einem Protein, für das bei anderen Parasiten eine Bedeutung in der Parasit-Wirt-Beziehung nachgewiesen wurde (Newport *et al.* 1988). Die cDNA-Klone #101, #133 und #152 wurden ausgewählt, weil ihre Insert-Größe annähernd den in der Northern-Blot-Hybridisierung gefundenen Transkriptlängen entsprach (siehe Tabelle 5), so daß es wahrscheinlich war, daß diese Klone den Protein-kodierenden Bereich zu einem großen Teil, wenn nicht vollständig enthielten.

Die Spezifität der Klone #101, #133 und #152 wurde durch Southern-Blot- und Northern-Blot-Hybridisierung in gleicher Weise wie für den Klon #T7 (Abschnitt 3.3.) nachgewiesen (Abb. 11).

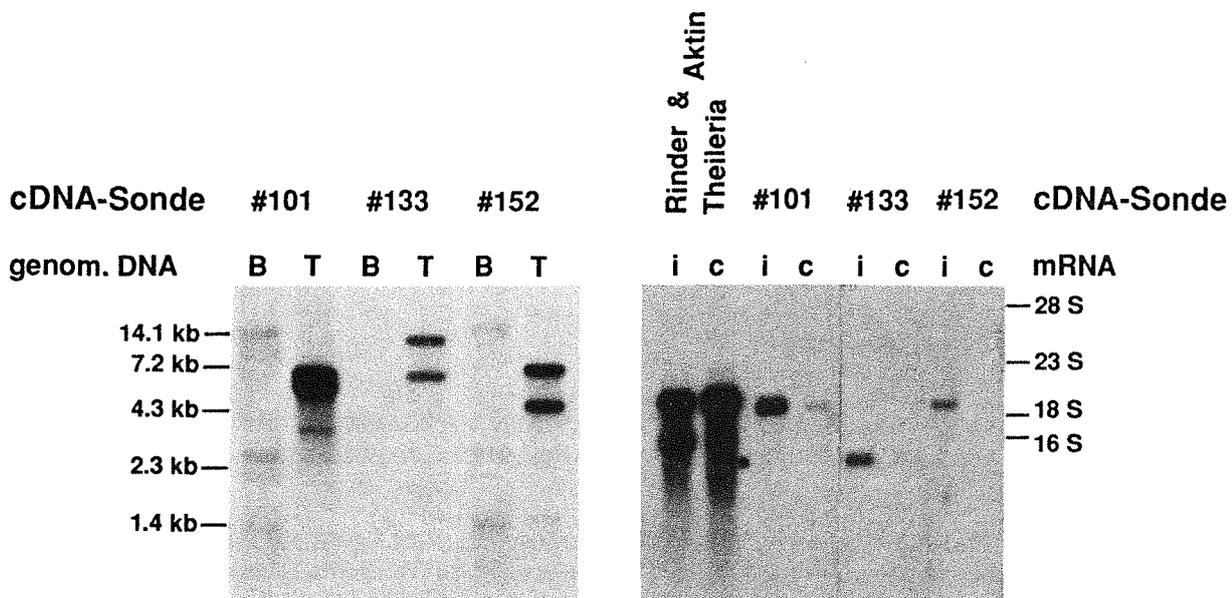


Abb. 11 Die cDNA-Klone #101, #133 und #152 sind für den Parasiten spezifisch. 10 µg genomische Rinder-DNA (B) und 100 ng genomische Parasiten-DNA (T) wurden nach *Eco*RI-Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembran-Filter transferiert und mit den angegebenen radioaktiv markierten cDNA-Inserts hybridisiert. 1 µg mRNA aus infizierten (i) und kurierten (c) Lymphozyten wurde nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembran-Filter mit den gleichen Sonden hybridisiert. Als Kontrolle für die Northern-Blot-Hybridisierung wurde 1 µg mRNA aus infizierten und kurierten Lymphozyten parallel mit radioaktiv markierter Rinder- und *T. parva*-Aktin-cDNA hybridisiert.

Bei einem Vergleich der Sequenzen der 5' und 3' Enden der cDNA-Inserts #101, #133 und #152 mit den in der Datenbank "NIH-GenBank" gespeicherten Sequenzen wurden keine Homologien zu bereits bekannten Genen gefunden. In dem ansequenzierten 5' Bereich besaßen alle drei Inserts nur ein offenes Leseraster, in dem 3' unterhalb eines ATG-Kodons kein Stop-Kodon auftrat. Die Nukleotidsequenz der 5' Bereiche sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind für die cDNA-Klone #101, #133 und #152 in Abbildung 12 dargestellt.

A: 5' Ende des cDNA-Inserts #101

10 20 30 40 50 60 70
GAATTCCGGTTTTTTTTTTAATTTATTCAGGATTTTATCAATTACAAATTTCTCAATATTTTTAAGAATGGCT
MetAla
 80 90 100 110 120 130 140
 ACTATTCCTTGATGTCAACGTTAACTCGGATCTCTGTCCACAGGATTCAATTGACACCTTTTACTCAGATACC
 ThrIleLeuAspValAsnValAsnSerAspLeuCysProGlnAspSerIleAspThrPheTyrSerAspThr
 150 160 170 180 190 200 210
 AAGAACGTTGAATCTTCTGAATCAGACTACGAAAGTGTAGAGTCTGATCGATCTATTTGTATCTCCAATGAT
 LysAsnValGluSerSerGluSerAspTyrGluSerValGluSerAspArgSerIleCysIleSerAsnAsp
 220
 CCGATACAATT
 ProIleGln

B: 5' Ende des cDNA-Inserts #133

10 20 30 40 50 60 70
GAATTCCGGATGAATCTTAAAGTTAAGACTCTTAAGAACGTCCAAGTTGATGTGCGACNTTCCCGATACTGCA
MetAsnLeuLysValLysThrLeuLysAsnValGlnValAspValAspXxxProAspThrAla
 80 90 100 110 120 130 140
 TCAGTNGAGGATTTAATGAACAAAGTGGCCGAATCGTTCCTAATATGCAAGCGGAATCTCTAAAGCTAATT
 SerValGluAspLeuMetAsnLysValAlaGluSerPheProAsnMetGlnAlaGluSerLeuLysLeuIle
 150 160 170 180 190 200 210
 CACGCTGGGAAAATACTAAAAAAGAACTCCTTCTTAAGGATTATTCCGACATTAAGGATGGAGATAAAGTA
 HisAlaGlyLysIleLeuLysLysGluLeuLeuLysAspTyrSerAspIleLysAspGlyAspLysVal
 220 230
 ATTGTCATATCGTCCAAGA
 IleValIleSerSerLys

C: 5' Ende des cDNA-Inserts #152

10 20 30 40 50 60 70
GAATTCCAAAAATGGACAAGGGAATGATTTGGTGTTTAAGCCGAGTTTGAAGAAGGAGTCTGACCGTAAA
MetAspLysGlyMetTyrLeuValPheLysProSerLeuLysLysGluSerAspArgLys
 80 90 100 110 120 130 140
 GCTCAGTTGGCGACAATTCAGGCTTCTAAGGCCTTATCTGACATTGTACGCACTACTCTAGGCCCTCGGTCA
 AlaGlnLeuAlaThrIleGlnAlaSerLysAlaLeuSerAspIleValArgThrThrLeuGlyProArgSer
 150 160 170 180 190 200 209
 ATGCTCAAAAATGCTCCTCGATCCCATGGGCGGGATCGTTATCACCAATGACNCAATTCCATACTAC
MetLeuLysMetLeuLeuAspProMetGlyGlyIleValIleThrAsnAspXxxIleProTyrTyr

Abb. 12 Nukleotidsequenz der sequenzierten 5' Bereiche der cDNA-Inserts #101, #133 und #152. Die zur Klonierung verwendeten *EcoRI*-Linker sind in den Sequenzen unterstrichen. Die am 5' Ende des cDNA-Inserts #152 liegende *EcoRI*-Sequenz ist mRNA-kodiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist für das offene, von Stop-Kodons freie Leseraster nach jeweils dem ersten ATG-Kodon aufgeführt. In demselben Leseraster liegende ATG-Kodons sind durch doppelte Unterstreichung hervorgehoben.

In dem cDNA-Klon #101 lag der AT-Gehalt des Sequenzbereichs zwischen Nukleotid-Position 10 und dem ATG-Kodon bei Position 67-69 mit 86% deutlich höher als im Bereich 3' unterhalb des ATG-Kodons mit 61,5%. Der AT-Gehalt in dem Protein-kodierenden Bereich der Klone #T9 und #T7 betrug 53,4% bzw. 51%, während in den nicht-translatierten Bereichen des cDNA-Klons #T7 der AT-Gehalt bei 75% und 82% lag (siehe Abschnitte 3.6.2. und 3.6.3.). Aufgrund der ähnlichen Verhältnisse im AT-Gehalt bei Klon #101 stellt die Sequenz bis Nukleotidposition 66 daher wahrscheinlich den 5' nicht-translatierten Bereich und das ATG-Kodon bei Position 67 den Translationsstart dar.

cDNA-Klon		#101	#133	#152
Hybridisierung mit:				
genomischer DNA	(*1)	T	T	T
poly A-RNA	(*2)	i	i	i
Länge des Transkripts (kb)	(*3)	1,9	1,1	1,9
Länge des cDNA-Inserts (kb)		1,7	0,9	1,6
AT-Gehalt im 5'-Bereich				
- oberhalb des ersten ATG		86%	-	-
- unterhalb des ersten ATG		61,5%	62%	52,5%
Polypeptidgröße (kD)				
- cDNA-kodiert	(*4)	67	45	60
- mRNA-kodiert	(*5)	67	43	59

Tabelle 5 Zusammenfassende Darstellung der Analyse der cDNA-Klone #101, #133 und #152
 Anmerkungen: *1 T: genomische DNA von *T. parva*; *2 i: RNA aus infizierten Lymphozyten;
 *3 ermittelt aus Abb. 11; *4 nach *in vitro* Transkription/Translation des cDNA-Inserts, siehe
 Abschnitt 3.5.2.2.; *5 nach *in vitro* Translation der isolierten Parasiten-mRNA und Immuno-
 präzipitation mit cDNA-spezifischen Antiseren, siehe Abschnitt 3.5.5. und Tabelle 7, Abschnitt
 3.6.3.3..

In den cDNA-Klonen #133 und #152 lag ein ATG-Kodon jeweils direkt hinter der *EcoRI*-Sequenz am 5' Ende, gefolgt von zwei bzw. vier weiteren ATG-Kodons in demselben Leseraster. Der AT-Gehalt betrug 60% für den cDNA-Klon #133 bzw. 52% für den cDNA-Klon #152. Anhand der Sequenz und des AT-Gehalts konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob eines der ATG-Kodons den originären Translationsstart darstellte.

Die Ergebnisse aus den Hybridisierungsexperimenten und der Sequenzanalyse sind für die cDNA-Klone #101, #133 und #152 in Tabelle 5 zusammengefaßt. In der Tabelle sind auch die Molekulargewichte der für die cDNA-Klone spezifischen Polypeptide mit aufgeführt, die zum einen durch *in vitro* Translation der Parasiten-mRNA und zum anderen durch *in vitro* Transkription/Translation der cDNA-Inserts erhalten wurden (siehe Abschnitt 3.5.2.2. und 3.5.5.). Die korrespondierenden Polypeptide waren nahezu gleich groß, was dafür spricht, daß die cDNA-Inserts den größten Teil der Protein-kodierenden Sequenz enthielten.

3.5.2. Lokalisierung der von den cDNA-Inserts kodierten Proteine im infizierten Lymphozyten

Die Lokalisation eines Parasiten-Proteins in infizierten Lymphozyten kann bereits einen Hinweis darauf geben, ob das Protein an der Parasit-Wirt-Beziehung beteiligt ist. Eine solche Beteiligung ist wahrscheinlich, wenn das Parasiten-Protein im Zytoplasma, dem Zellkern oder auf der Zelloberfläche des Lymphozyten auftritt, oder wenn es auf der Oberfläche des Parasiten exprimiert wird und dadurch in direktem Kontakt mit dem Wirtszell-Zytoplasma steht. Die Lokalisation eines Proteins kann durch Immunofluoreszenz mit Hilfe von Antiseren ermittelt werden. Zur Herstellung von Antiseren, die spezifisch für die von den cDNA kodierten Parasiten-Proteine sind, wurden die cDNA-Inserts als C-terminale Fusionsproteine in Bakterien exprimiert, und die isolierten Fusionsproteine als Antigen Mäusen injiziert.

3.5.2.1. Expression der cDNA-Inserts als bakterielle Fusionsproteine

Zur Herstellung C-terminaler Fusionsproteine wurde das durch Temperatur induzierbare, bakterielle Expressionsvektorsystem pEX34 benutzt (Abb. 1). Aus der Sequenzanalyse war das Leseraster bei den vier ausgewählten cDNA-Inserts bekannt. Da bei den cDNA-Inserts #101, #133 und #152 im Leseraster oberhalb des ersten ATG-Kodons keine Stop-Kodons vorlagen (Abb. 12), konnten sie als *Eco*RI-Fragmente in die Vektorvariante mit dem jeweils richtigen Leseraster umklontiert werden. Da in dem cDNA-Klon #T7 oberhalb des Translationsstarts in demselben Leseraster Stop-Kodons auftraten (Abb. 29, Abschnitt 3.6.3.), wurde das Insert als *Bam*HI-Fragment umklontiert. Diesem fehlten die ersten 300 Nukleotide des 5' Endes und damit auch die kodierende Sequenz für die ersten 58 N-terminalen Aminosäuren.

Die transformierten *E. coli* 537-Klone exprimierten nach Temperaturinduktion Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 80 kD für das Fusionsprotein fp101, von 54 kD für fp133, von 69 kD für fp152 und von 93 kD für fpT7 (Abb. 13). In den Lysaten aus nicht-induzierten (K1) und induzierten (K2) *E. coli* 537-Klonen, die den Vektor ohne Insert enthielten, traten keine Fusionsproteine auf.

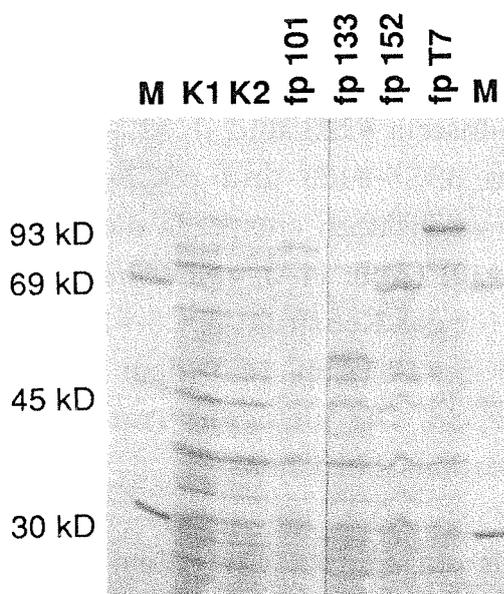


Abb. 13 Expression der Fusionsproteine in Temperatur-induzierten *E. coli*-537 Kulturen. Die das Konstrukt pEX34b-#101, pEX34b-#133, pEX34a-#152 bzw. das Konstrukt pEX34b-#T7 enthaltenden *E. coli* 537-Klone exprimierten jeweils ein als Bande im Proteingel deutlich erkennbares Fusionsprotein der erwarteten Größe (fp101, fp133, fp152 und fpT7). Als Kontrolle wurden Lysate von nicht-induzierten (K1) und induzierten (K2) Kulturen eines nur den Vektor pEX34b enthaltenden *E. coli* 537 Klons aufgetragen.

M = Molekulargewichtsmarker.

Unter Berücksichtigung des 11 kD großen N-terminalen MS2-Polymerase-Teils in den Fusionsproteinen entsprach die Größe der Fusionsproteine der Größe der durch *in vitro* Transkription/Translation der cDNA-Inserts erhaltenen Polypeptide (siehe Tabelle 5).

3.5.2.2. Herstellung cDNA-spezifischer Maus-Antiseren

Zur Gewinnung von Antiseren wurden die Fusionsproteine fp101, fp133, fp152 und fpT7 als Emulgat mit Freund'schem Adjuvans Mäusen injiziert. Das Kontrollserum (NMS) wurde von Mäusen gewonnen, die mit dem gleichen Emulgat, jedoch ohne Fusionsproteine, immunisiert wurden.

Um sicherzustellen, daß die gewonnenen Antiseren spezifische Antikörper gegen den von den cDNA-Inserts kodierten Teil der Fusionsproteine enthielten, wurden Immunopräzipitationen mit für die cDNA-Klone spezifischen *in vitro* Transkriptions-/Translationsprodukten durchgeführt. Die cDNA-Inserts #101, #133, #152 und #T7 wurden als *EcoRI*-Fragmente in den Vektor pSG5 (Abb. 2) umklontiert, Klone mit korrekter Orientierung der cDNA-Inserts isoliert, mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase für die cDNA-Inserts spezifische RNA synthetisiert, und diese *in vitro* in Polypeptide translatiert (Abb. 14, Spuren i).

In den Konstrukten pSG5-#101 und pSG5-#T7 war der originäre Translationsstart des jeweiligen Parasiten-Transkripts auf den cDNA-Inserts enthalten, so daß aus der *in vitro* Translation das vollständige Parasiten-Protein resultierte. Die an dem äußersten 5' Ende der cDNA-Inserts #133 und #152 liegenden ATG-Kodons konnten in den Konstrukten pSG5-#133 und pSG5-#152 als Translationsstart fungieren. In den Translationsansätzen entsprach das Hauptprodukt von 67 kD für das Konstrukt pSG5-#101 (Abb. 14A), von 45 kD für das Konstrukt pSG5-#133 (Abb. 14B), von 60 kD für das Konstrukt pSG5-#152 (Abb. 14C) und von 84 kD für das Konstrukt pSG5-#T7 (Abb. 14D) dem vollständigen, vom cDNA-Insert kodierten Polypeptid. Die kleineren Translationsprodukte resultierten aus vorzeitigen Translationsabbrüchen.

Für die Immunopräzipitation wurde jeweils ein Aliquot von jedem Translationsansatz mit dem korrespondierenden Antiserum bzw. dem Kontrollserum (NMS) inkubiert. Die durch Protein A-Sepharose präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexe (Abb. 14, Spuren p) wurden parallel mit einer Probe

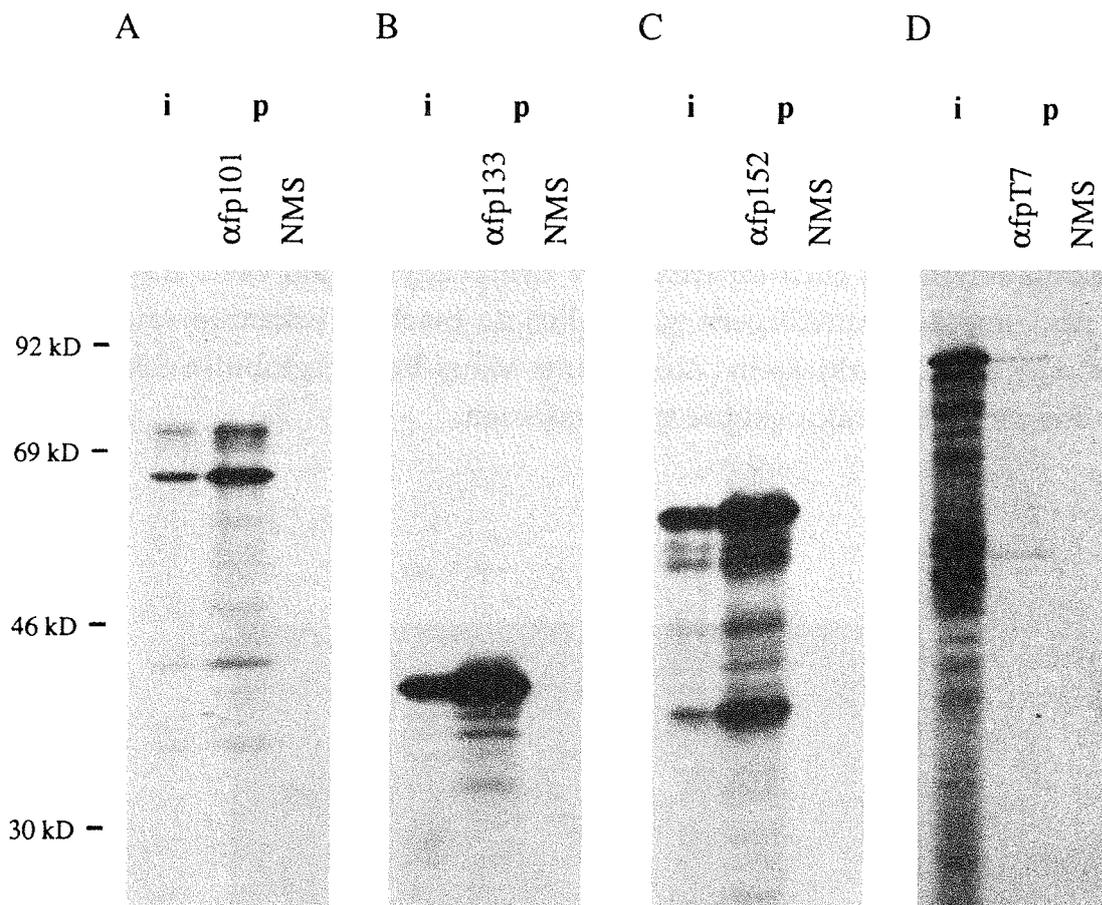


Abb. 14 Die gegen die Fusionsproteine gerichteten Antiseren erkennen die korrespondierenden für die cDNA-Klone spezifischen *in vitro* Translationsprodukte. Durch *in vitro* Transkription/Translation wurden von den pSG5-cDNA Konstrukten radioaktiv markierte Polypeptide für die cDNA #101 (A), #133 (B), #152 (C) und #T7 (D) synthetisiert. Von jedem Translationsansatz wurden jeweils 24 μ l mit 1 μ l des korrespondierenden Antiserums bzw. 1 μ l des Kontrollserums (NMS) inkubiert, immunopräzipitiert und die Präzipitate (p) zusammen mit 1 μ l des Translationsansatzes (i) durch Proteingel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht.

des Translationsansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Alle Antiseren erkannten die korrespondierenden Translationsprodukte. Von den vier Seren war die Affinität des Serums α fpT7 am geringsten (Abb. 14D). Das Kontrollserum erkannte keine der Translationsprodukte. Die hergestellten Seren waren folglich für die von den cDNA-Inserts kodierten Polypeptide spezifisch.

3.5.2.3. Lokalisierung der von cDNA-Inserts kodierten Parasiten-Proteine durch Immunofluoreszenz

Zur Lokalisierung der von den cDNA-Inserts kodierten Proteine in infizierten Lymphozyten wurden die cDNA-spezifischen Antiseren in der Immunofluoreszenz-Analyse eingesetzt. Die auf Objektträgern fixierten infizierten Lymphozyten wurden mit den gewonnenen Antiseren in Gegenwart von Detergenz inkubiert, um auch innerhalb der Lymphozyten und des Parasiten liegende Antigene den Antikörpern zugänglich zu machen. Erkannte Antigene wurden mit FITC-markiertem Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin-Serum durch Fluoreszenz-Lichtmikroskopie nachgewiesen.

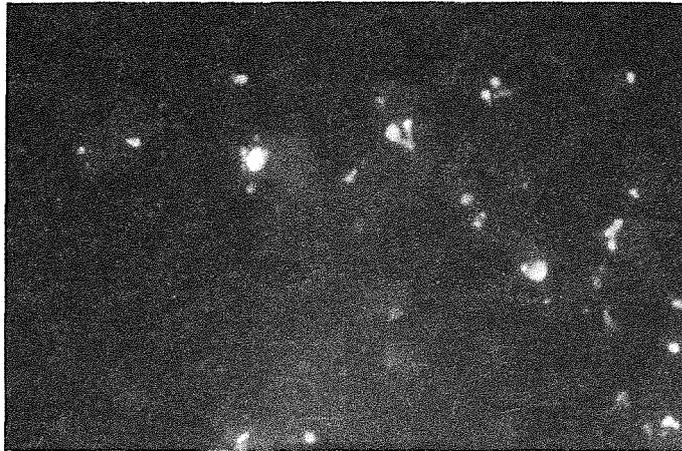


Abb. 15 Immunfluoreszenz-mikroskopischer Nachweis der Verteilung des von dem cDNA-Klon #133 kodierten Genprodukts in infizierten Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden auf Objektträgern fixiert, mit dem 1:500 verdünnten Antiserum α fp133 inkubiert und mit FITC-markiertem Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin-Serum angefärbt.

Bei Verwendung der Antiseren α fp101, α fp133 und α fp152 trat in allen infizierten Lymphozyten im Zytoplasma eine intensive und scharf umgrenzte Fluoreszenz auf, die vom Parasiten herrührte, da sie in den in gleicher Weise untersuchten kurierten Lymphozyten in nur wenigen Zellen zu beobachten war. Das übrige Wirtszellplasma, der Zellkern und die Zelloberfläche der Lymphozyten zeigten gegenüber dem Kontrollserum keine erhöhte Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz war innerhalb der Parasiten gleichmäßig verteilt (Abb. 15). Anhand der Fluoreszenz konnte nicht zwischen der Zelloberfläche und dem Zytoplasma des Parasiten unterschieden werden. Mit dem Antiserum α fpT7 war keine Fluoreszenz zu beobachten.

3.5.3. Expression der cDNA-Klone des Parasiten in Säugerzellen

Ein Weg, die von cDNA-Inserts kodierte Parasiten-Proteine daraufhin zu untersuchen, ob sie an der Transformation oder an der Expression von CTL-Epitopen in den infizierten Lymphozyten beteiligt sind, besteht darin, die cDNA-Klone durch stabile Transfektion in Säugerzellen zu exprimieren und die Transfektanten daraufhin zu analysieren, ob sie die erwähnten Eigenschaften angenommen haben. Dieser Ansatz setzt voraus, daß:

- die Säugerzelle stabil zu transfizieren ist,
- eingeschleuste cDNA-Klone des Parasiten in der Säugerzelle exprimiert werden,
- die Transfektante auf Eigenschaften infizierter Lymphozyten untersucht werden kann.

Um den Besitz von CTL-Epitopen oder die Aufrechterhaltung des transformierten Zustands als Folge einer Transfektion nachweisen zu können, müssen die Transfektanten über mehrere Tage bis Wochen in Zellkultur gehalten und vermehrt werden. Stabile Transfektionen sind daher notwendig.

Die für die Expression erforderliche Transkription eingeschleuster cDNA-Klone kann dadurch gewährleistet werden, daß die cDNA-Inserts als Konstrukte in einem Expressionsvektor vorliegen, der in Säugerzellen funktionsfähige regulatorischen Sequenzen enthält. Ob die für Sequenzen von *T. parva* spezifischen Transkripte in der Säugerzelle dann auch in Proteine translatiert werden, ist jedoch nicht à priori sicher.

Als Zielzellen für die Transfektion müssen Säugerzellen gewählt werden, die die Eigenschaften von mit *T. parva* infizierten Lymphozyten annehmen können, d.h., sie müssen entweder vom Parasiten transformiert werden können und/oder in der Lage sein, CTL-Epitope so zu präsentieren, daß sie von Rinder-CTL erkannt werden.

3.5.3.1. Transfektion von Rinder-Lymphozyten

Rinder-Lymphozyten als die natürlichen Wirtszellen des Parasiten sind als Zielzellen für diese Untersuchungen am besten geeignet. Es wurden daher Versuche durchgeführt, um eine Methode zur stabilen Transfektion dieser Zellen zu entwickeln.

Aufgrund der niedrigen Integrationsfrequenz aufgenommener DNA in das zelluläre Genom ist eine hohe Transfektionsrate für die Bildung stabiler Transfektanten erforderlich. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurde ein pSG5-Konstrukt hergestellt, bei dem in die *EcoRI*-Schnittstelle hinter dem SV40-Promotor (Abb. 2) das lacZ-Gen von *E. coli* als 3,8 kb großes Fragment aus dem Plasmid pCH110 (Pharmacia) inseriert wurde. Durch die Transfektion dieses als pSG5- β -gal bezeichneten Konstrukts in Säugerzellen wird die bakterielle β -Galaktosidase über den SV40-Promotor konstitutiv in den Transfektanten exprimiert. Die Anzahl der Transfektanten kann durch einen β -Galaktosidase-Test auf dem Einzelzell-Niveau einfach nachgewiesen werden.

Das Konstrukt pSG5- β -gal war in Rinder-Lymphozyten funktionsfähig, wie durch Transfektion in infizierte Lymphozyten und durch ConA stimulierte Lymphoblasten nach der für die transiente Expression beschriebenen Methode (Ivanov *et al.* 1989) nachgewiesen werden konnte. Für beide Zellarten traten die β -Galaktosidase exprimierende Transfektanten mit einer Transfektionsrate von $0,1 - 5 \times 10^{-5}$ pro $10 \mu\text{g}$ DNA auf.

Die Lipofektion und die Elektroporation sind als Methoden zur stabilen Transfektion von Lymphozyten des Menschen und der Maus beschrieben worden (Potter *et al.* 1984, Cann *et al.* 1988, Focus 1989). Mit diesen Methoden wurde unter Variierung der Versuchssparameter (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.4.2.3. und 2.4.2.4.) versucht, das Konstrukt pSG5- β -gal in infizierte Lymphozyten und ConA-stimulierte Lymphoblasten einzuschleusen. Die Transfektionsrate blieb jedoch bei allen Versuchen unter 1×10^{-6} pro $10 \mu\text{g}$ DNA und war damit für die Gewinnung stabiler Transfektanten zu niedrig.

3.5.3.2. Transfektion von L4-Maus-Fibroblasten

Da Rinder-Lymphozyten nicht stabil zu transfizieren waren, wurde die am ILRAD entwickelte L4-Maus-Fibroblasten-Linie als Zielzelle für die Transfektion benutzt. Mit Hilfe dieser Zellen, die das MHC-Klasse I-Antigen KN104 des Rindes exprimieren, sollen Gene des Parasiten isoliert werden, auf denen die für die infizierten Lymphozyten spezifischen CTL-Epitope kodiert sind. Da in immunen Rindern die protektive Immunantwort nicht auf Antikörpern sondern auf zytotoxischen T-Zellen beruht (siehe Abschnitt 1.2.), besteht für die Herstellung rekombinanter Impfstoffe ein großes Interesse an der Isolierung der für die CTL-Epitope kodierenden Sequenz(en).

Die cDNA-Klone #101, #133, #152 und #T7 waren die ersten im Schizonten-Stadium exprimierten Gene des Parasiten, die in die L4-Zellen eingeschleust wurden. In der Immunofluoreszenz-Analyse konnten die von den cDNA-Inserts kodierten Proteine außerhalb des Parasiten nicht festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.5.2.3.). Aufgrund dieses Befundes kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Genprodukte als Oligopeptide, die durch die Antiseren nicht nachweisbar waren, im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegen und damit auf der Oberfläche des Lymphozyten präsentiert werden können.

In den pSG5-Konstrukten lagen die cDNA-Inserts in der korrekten Orientierung in Bezug auf den SV40-Promotor (siehe Abschnitt 3.5.2.2.) und in einer für die Expression in den L4-Zellen geeigneten Form vor. Letzteres konnte durch Transfektion des Konstrukts pSG5- β -gal und daraus resultierenden, für die β -Galaktosidase positiven L4-Transfektanten nachgewiesen werden.

In getrennten Ansätzen wurden die pSG5-Konstrukte durch Kotransfektion mit dem Plasmid pSV2-neo in die L4-Zellen eingeschleust. Nach drei Wochen traten in allen Transfektionsansätzen mit dem Plasmid pSV2-neo gegen das Antibiotikum G418 resistente Foci auf, während in Ansätzen ohne das Plasmid pSV2-neo keine resistenten Kolonien erschienen. Die aus den Transfektionsansätzen mit jeweils demselben pSG5-Konstrukt stammenden Kolonien wurden vereint und als L4-101, L4-133, L4-152, L4-T7 und L4- β -gal bezeichnete Massenkulturen vermehrt.

3.5.3.3. Integration und Expression der cDNA-Konstrukte in den L4-Zellen

Um nachzuweisen, daß die gegen G418 resistenten L4-Transfektanten die pSG5-cDNA-Konstrukte aufgenommen und in ihr Genom integriert hatten, wurde die aus den in Massenkultur gehaltenen Zellen isolierte genomische DNA nach *Eco*RI-Restriktionsspaltung mit den pSG5-cDNA-Konstrukten als radioaktiv markierten Sonden in Southern-Blot-Hybridisierungen untersucht.

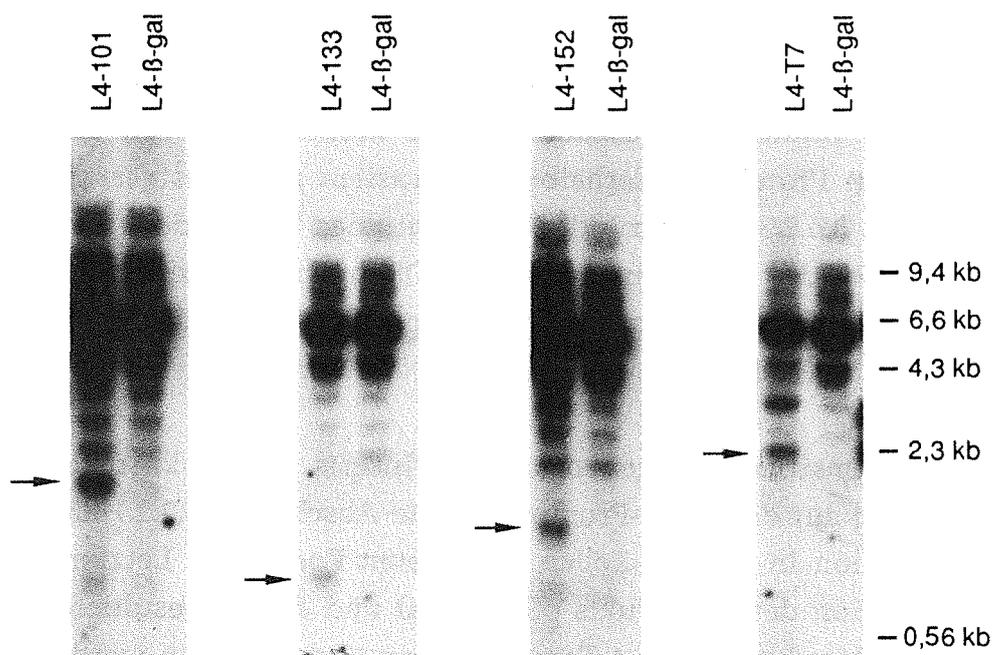


Abb. 16 Analyse der in Massenkultur gehaltenen L4-Transfektanten auf die Integration der pSG5-Konstrukte. Jeweils 20 µg genomische DNA wurde mit *Eco*RI geschnitten und nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembran-Filter mit den korrespondierenden pSG5-cDNA Konstrukten als Sonden hybridisiert. Als Kontrolle wurde 20 µg genomische DNA der L4-β-gal-Massenkultur eingesetzt. Die für die cDNA-Inserts spezifischen Hybridisierungssignale sind durch Pfeile markiert.

Die Sonden reagierten mit mehreren genomischen *Eco*RI-Fragmenten der korrespondierenden Transfektanten. Bis auf jeweils ein Fragment traten diese ebenso in der als Kontrolle verwendeten genomischen DNA von L4- β -gal auf (Abb. 16), so daß sie auf für den Vektor spezifische Sequenzen zurückzuführen sind.

Die für die verschiedenen Transfektanten spezifischen, in Abbildung 16 durch Pfeile markierten, Fragmente besaßen exakt die Größe der jeweiligen cDNA-Inserts, mit denen die L4-Zellen transfiziert worden waren. Folglich waren die pSG5-Konstrukte in das Genom der L4-Transfektanten integriert worden.

Um die Expression der integrierten cDNA-Inserts nachzuweisen, wurden die Proteinlysate von L4-101, L4-133, L4-152 und L4-T7 im Immunoblot mit den in Abschnitt 3.5.2.2. beschriebenen cDNA-spezifischen Antiseren untersucht.

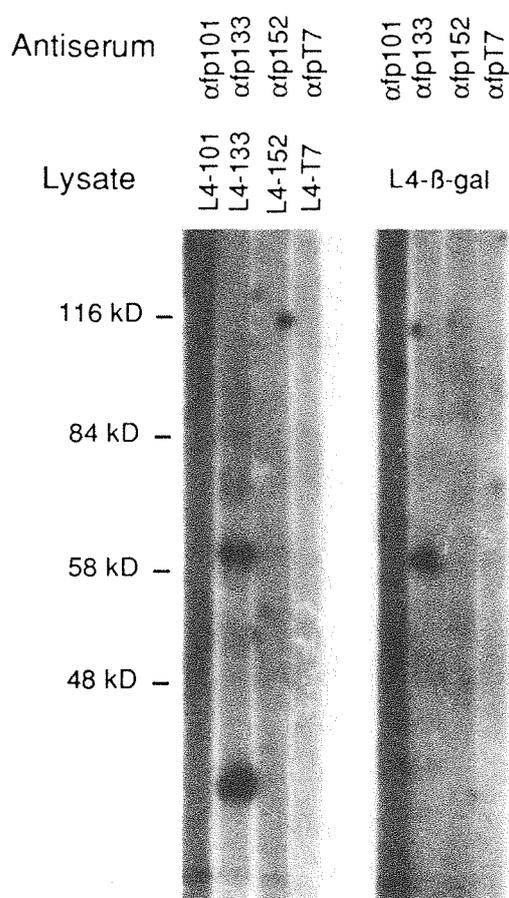


Abb. 17 Analyse der in Massenkultur gehaltenen L4-Transfektanten auf Expression der transfizierten cDNA-Konstrukte. Lysate der L4-cDNA-Transfektanten und das Lysat der L4- β -gal-Massenkultur als Kontrolle wurden durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose-Filter mit den korrespondierenden cDNA-spezifischen Antiseren inkubiert. Erkannte Antigene wurden durch [125]-markiertes Schaf-Anti-Maus-Immunglobulin-Antiserum autoradiographisch sichtbar gemacht.

In dem Lysat der Massenkultur L4-133 wurden von dem Antiserum α fp133 zwei Antigene von 60 kD und 44 kD Größe erkannt (Abb. 17). Letzteres besaß das erwartete Molekulargewicht für das von dem cDNA-Insert #133 kodierte Polypeptid (siehe Tabelle 5, Abschnitt 3.5.1.). In dem Kontroll-Lysat von L4- β -gal war das größere Antigen, nicht jedoch das kleinere Antigen vorhanden.

In den drei anderen Lysaten waren die von den cDNA-Inserts kodierten Proteine mit den Antiseren nicht nachweisbar. Aus den Massenkulturen isolierte mRNA enthielt keine durch Northern-Blot-Hybridisierung nachweisbaren Mengen an Transkripten, die für die cDNA- bzw. β -gal-Konstrukte spezifisch waren. Zellen in der L4- β -gal-Massenkultur waren jedoch für die β -Galaktosidase positiv, wie mit Hilfe des enzymatischen Farbtests auf Einzelzell-Niveau nachgewiesen werden konnte. Allerdings besaßen nur ca. 15% der Zellen die Enzym-Aktivität. Offensichtlich exprimierten nicht alle gegen G418 resistente Transfektanten auch die pSG5-Konstrukte. Dies würde erklären, warum in der Northern-Blot-Hybridisierung für alle fünf Massenkulturen keine für die pSG5-Konstrukte spezifischen Transkripte nachzuweisen waren.

Um eine einheitlich exprimierende Zellpopulation als Zielzellen für den zytotoxischen T-Zell-Assay (CTL-Assay) einsetzen zu können, wurden aus den Massenkulturen Zellklone isoliert. Die Expression der cDNA-Inserts wurde getestet, indem die aus den Klonen isolierte RNA im Dot-Blot-Verfahren mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert wurde. Von den Kulturen L4-133, L4-T7 und L4- β -gal konnten Klone, die die eingeschleusten Konstrukte exprimierten isoliert und in ausreichender Zellzahl für den CTL-Assay vermehrt werden.

Die Integration der pSG5-Konstrukte im Genom der positiven L4-Klone wurde durch Southern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 18). Da das lacZ-Gen von *E. coli* eine interne *Eco*RI-Schnittstelle besitzt, hybridisierten zwei, durch Pfeile in Abbildung 18A markierte, genomische *Eco*RI-Fragmente des Klons L4- β -gal/B8 mit der pSG5- β -gal-Sonde. In der DNA des Klons L4-133/G6 hybridisierte ein 0,9 kb großes Fragment spezifisch mit dem pSG5-#133-Konstrukt, in der DNA des Klons L4-T7/B5 ein 2,5 kb großes Fragment mit dem cDNA-Insert #T7. In dem Genom der Klone L4- β -gal/E3, L4-133/E6, L4-T7/C3 und L4-T7/G3, die in der RNA-Dot-Blot-Analyse negativ waren, traten die entsprechenden cDNA-Fragmente nicht auf.

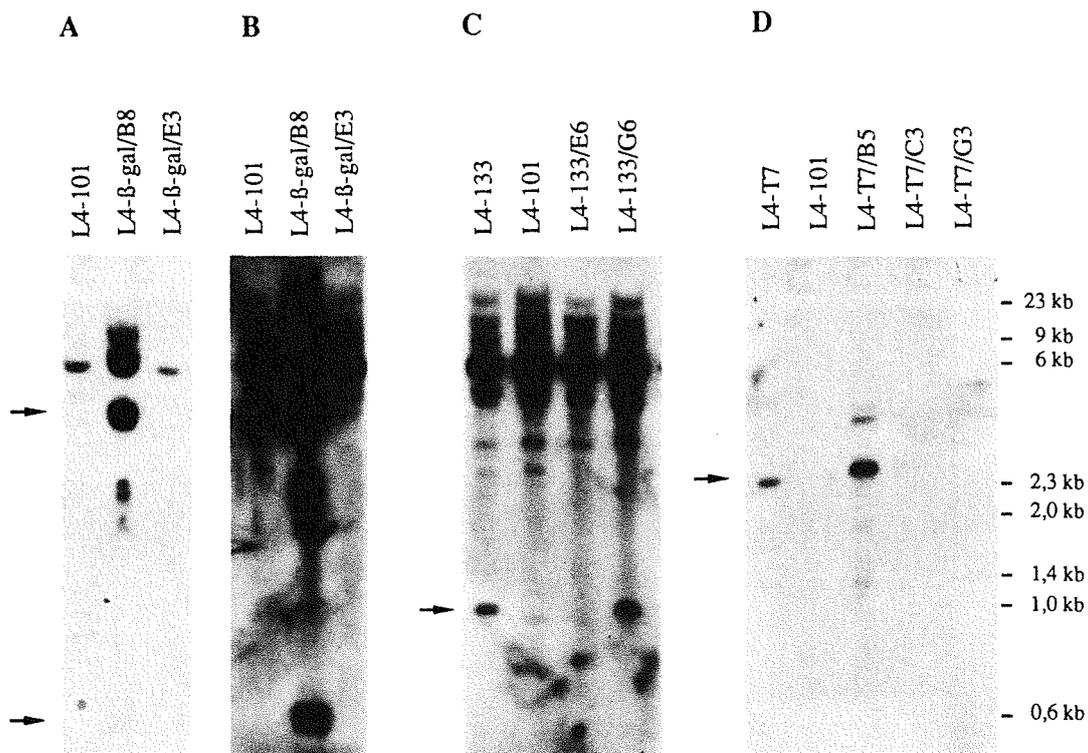


Abb. 18 Genom-Analyse der L4-Klone. Jeweils 4 μ g genomische DNA der L4-Klone wurde mit *Eco*RI geschnitten und nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembran-Filter mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Als Negativ-Kontrolle wurde genomische DNA der Massenkultur L4-101 eingesetzt. (A) Analyse der L4- β -gal Klone. Nach Hybridisierung mit dem Konstrukt pSG5- β -gal als Sonde war in dem Klon L4- β -gal/B8 das durch *Eco*RI in zwei Fragmente von 3,2 kb und 0,6 kb Größe gespaltene lacZ-Gen nachweisbar. (B) Überexposition von (A), um das 0,6 kb Fragment nachzuweisen. (C) Analyse der L4-133 Klone. Nach Hybridisierung mit dem Konstrukt pSG5-#133 als Sonde war das 0,9 kb große Insert der cDNA #133 in dem Klon L4-133/G6 und in der als Positiv-Kontrolle dienenden Massenkultur L4-133 nachweisbar. (D) Analyse der L4-T7 Klone. Nach Hybridisierung mit dem isolierten cDNA-Insert #T7 als Sonde war das 2,3 kb große Insert der cDNA #T7 in dem Klon L4-T7/B5 und in der als Positiv-Kontrolle dienenden Massenkultur L4-T7 nachweisbar. Die für die Inserts spezifischen Hybridisierungssignale sind durch Pfeile markiert.

Durch die Kotransfektion der pSG5-Konstrukte mit dem Plasmid pSV2-neo war trotz des zehnfachen Mengenüberschusses an pSG5-Konstrukt folglich nicht gewährleistet, daß die gegen G418 resistenten Klone neben dem Plasmid pSV2-neo auch die pSG5-Konstrukte in ihr Genom integriert hatten.

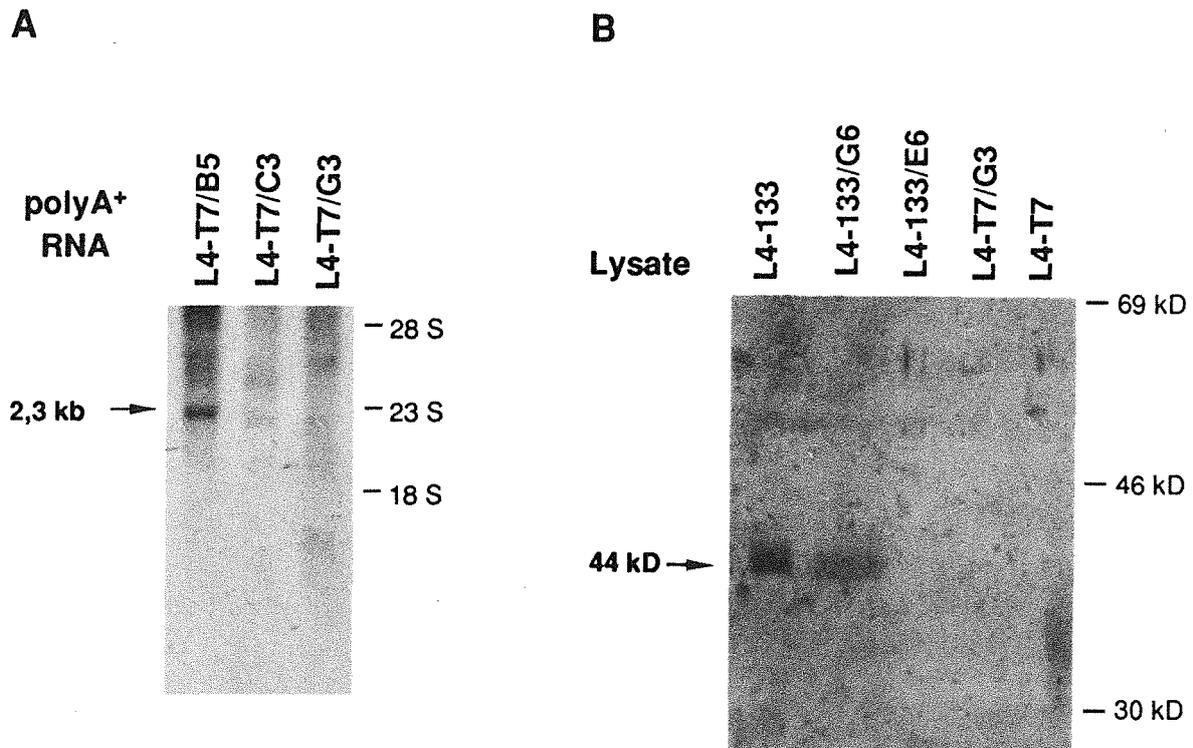


Abb. 19 (A) Der Klon L4-T7/B5 exprimiert die Parasiten-cDNA #T7. 3 µg polyadenylierte RNA aus den drei L4-T7 Klonen wurde nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembran-Filter mit dem isolierten cDNA-Insert #T7 als radioaktiv markierter Sonde hybridisiert. (B) Der Klon L4-133/G6 exprimiert die Parasiten-cDNA #133. Lysate der Klone L4-133/G6, L4-133/E6 sowie Lysate der Massenkultur L4-133 (als Positiv-Kontrolle), L4-T7 und des Klons L4-T7/G3 (als Negativ-Kontrollen) wurden durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose-Filter mit dem cDNA-spezifischen Antiserum α fp133 inkubiert. Von den L4-Massenkulturen wurde ca. zehnmals mehr Protein eingesetzt als von den L4-Klonen. Erkannte Antigene wurden nach Inkubation mit Phosphatase-gekoppeltem Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin-Antiserum in der anschließenden enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht.

Die Expression des cDNA-Inserts #T7 konnte für den Klon L4-T7/B5 durch Northern-Blot-Hybridisierung mit dem cDNA-Insert #T7 (Abb. 19A), für den Klon L4-133/G6 im Immunoblot mit dem Antiserum α fp133 nachgewiesen werden (Abb. 19B).

Das Antiserum α fp133 reagierte spezifisch mit einem 44 kD und 42 kD großen Antigen in den Lysaten von L4-133 und L4-133/G6 (Abb. 19B). Das 44 kD große Antigen besaß die von der cDNA #133 erwartete Größe. In der cDNA #133 liegt

80 Nukleotide unterhalb des ersten ATG-Kodons ein zweites ATG-Kodon in demselben Leseraster. Wird dieses als Translationsstart benutzt, hat das resultierende Polypeptid eine um 26 Aminosäuren und 2,5 kD kleinere Größe. Dies entspricht der Größe des kleineren Antigens in den L4-133/G6-Lysaten. Proteine der gleichen Größe wurden in den als Positiv-Kontrolle eingesetzten Lysaten der Massenkultur L4-133 erkannt, während diese Antigene nicht in den als Negativ-Kontrollen eingesetzten Lysaten der Massenkultur L4-T7 und des Klons L4-T7/G3 auftraten.

Zellen des im RNA-Dot-Blot positiven Klons L4- β -gal/B8 und des negativen Klons L4- β -gal/E3 wurden im enzymatischen Farbttest auf Einzelzell-Niveau auf die Expression des lacZ-Gens untersucht. Nahezu 100% der L4- β -gal/B8-Zellen waren blau gefärbt, wobei jedoch die Intensität der Blaufärbung von Zelle zu Zelle variierte. Die L4- β -gal/E3-Zellen waren alle negativ (Abb. 20).

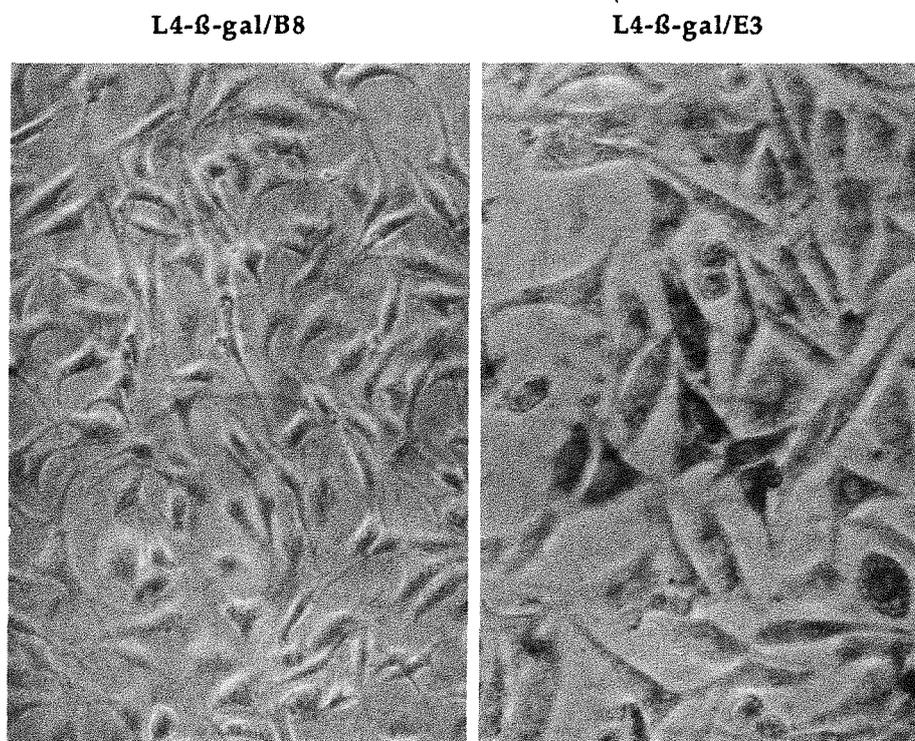


Abb. 20 Der Klon L4- β -gal/B8 exprimiert das im Genom integrierte lacZ-Gen. Mit Hilfe des enzymatischen Farbttests wurden Zellen der Klone L4- β -gal/B8 und L4- β -gal/E3 auf dem Einzelzell-Niveau auf die Expression des pSG5- β -gal-Konstrukts analysiert. Zellen mit dunklem Zytoplasma besitzen die β -Galaktosidase.

3.5.4. Analyse der L4-Transfektanten auf CTL-Epitope

Die Transfektionsexperimente mit den L4-Zellen wurden durchgeführt, um die Transfektanten daraufhin zu analysieren, ob sie als Folge der eingeschleusten und exprimierten Parasiten-cDNA Epitope auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, die von Rinder-CTL erkannt werden, welche für von *T. parva* infizierten Lymphozyten spezifisch sind. Vorhandene CTL-Epitope können mit Hilfe eines CTL-Assays nachgewiesen werden, bei dem die zu untersuchenden Zellen als radioaktiv markierte Zielzellen mit einer unterschiedlichen Anzahl von zytotoxischen Effektorzellen inkubiert werden. Die als Folge der Lyse der Zielzellen freiwerdende Radioaktivität wird gemessen und als Prozent Zytotoxizität in Beziehung zu der maximal und der spontan freiwerdenden Radioaktivität gesetzt.

Da die CTL-Antwort im Rind gegen infizierte Lymphozyten durch den MHC-Klasse I restringiert ist (siehe Abschnitt 1.2.), müssen die Effektorzellen die gleichen MHC-Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche tragen wie die Zielzellen. Das Rind E98 ist homozygot für das auf den L4-Zellen exprimierte MHC-Klasse I-Antigen KN104 (Goddeeris *et al.* 1990). Von diesem gegen *T. parva* immunisierten Rind wurden zur Gewinnung von Effektorzellen periphere Blut-Leukozyten isoliert (E98-PBL).

Neben dem Rinder-MHC-Klasse I-Antigen exprimierten die L4-Mauszellen auch ihre eigenen MHC-Moleküle. Diese können von Rinder-CTL als fremd erkannt werden mit der Folge, daß die L4-Zellen im Rahmen einer xenoreaktiven CTL-Antwort lysiert werden. Um im CTL-Assay eine auf Xenoreaktivität beruhende Lyse der Transfektanten zu verhindern, wurden die als Effektorzellen eingesetzten E98-PBL zunächst mit der L4-Ausgangszelllinie vorkultiiviert, die xenoreaktiven Zellen dadurch aktiviert und mit 5-Brom-Deoxy-Uridin (BUdR)- und Licht-Behandlung nach Zoschke und Bach (1971) selektiv abgetötet.

Um die für die infizierten Lymphozyten spezifischen Effektorzellen zur Proliferation zu stimulieren und in ihrer zytotoxischen Potenz zu aktivieren, wurden die E98-PBL anschließend mit γ -bestrahlten, von *T. parva* Muguga infizierten Lymphozyten des Rindes E98 (E98-Tp) kokultiviert. Als Zielzellen für die Effektorzellen wurden Zellen aus den Massenkulturen L4-101, L4-133, L4-152 und L4-T7 sowie von den Klonen L4-133/G6 und L4-T7/B5 radioaktiv

markiert. Das Ergebnis des CTL-Assays ist für die L4-Massenkulturen in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

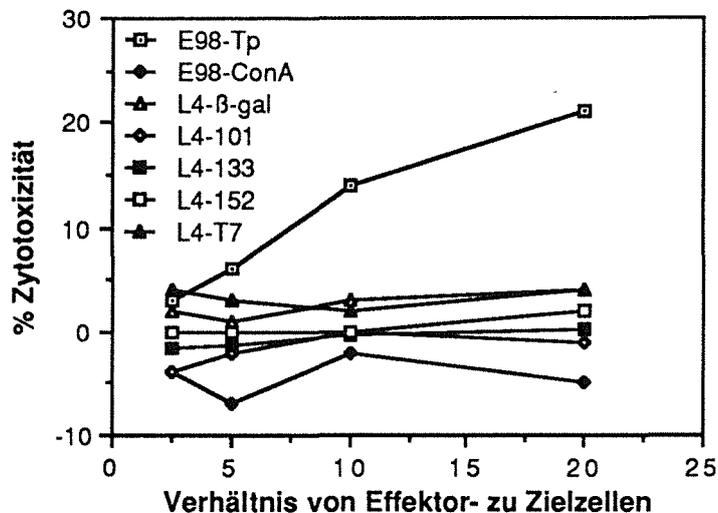


Abb. 21 Die L4-Transfektanten werden von Rinder-CTL, die für von *T. parva* Muguga infizierte Lymphozyten spezifisch sind, nicht erkannt. Als Zielzellen wurden autologe mit *T. parva* Muguga infizierte Lymphozyten (E98-Tp), autologe nicht-infizierte ConA-Lymphoblasten (E98-ConA) sowie die in Massenkultur gehaltenen L4-Transfektanten L4-β-gal, L4-101, L4-133, L4-152 und L4-T7 eingesetzt.

Die für infizierte Lymphozyten spezifischen CTL erkannten weder die in Massenkultur gehaltenen noch die klonierten L4-Transfektanten. Die eingesetzten Effektorzellen waren aktiv, wie das Kontrollexperiment mit den autologen infizierten Lymphozyten (E98-Tp) als Zielzellen zeigt. Die Lyse dieser Zellen war abhängig von dem Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen. Entsprechend der Erwartung lysierten die Effektorzellen nicht die als Negativ-Kontrolle für die Spezifität der Effektorzellen dienenden autologen, nicht-infizierten ConA-Lymphoblasten (E98-ConA). Dasselbe galt für die Zellen der Massenkultur L4-β-gal und des Klon L4-β-gal/B8, die als Negativ-Kontrolle für die mit den Parasiten-cDNA-Konstrukten transfizierten L4-Zellen dienten.

Dieses Ergebnis kann zum einen bedeuten, daß auf den getesteten Parasiten-cDNA-Klonen keine CTL-Epitope kodiert sind. Es kann aber auch bedeuten, daß unter den für die infizierten Lymphozyten spezifischen CTL nicht genügend cDNA-spezifische CTL waren, um in dem CTL-Assay ein detektierbares Signal zu geben.

3.5.4.1. Klonierung zytotoxischer T-Zellen auf L4-Transfektanten als Stimulatorzellen

Es ist nicht bekannt, ob alle CTL-Klone, die dieselbe MHC-Restriktion und dieselbe Parasitenstamm-Spezifität besitzen, auf den infizierten Lymphozyten dasselbe Antigen oder verschiedene Antigene erkennen, und damit, ob die infizierten Lymphozyten ein oder mehrere Parasiten-spezifische CTL-Antigene präsentieren. Sind mehrere Antigene vorhanden, ist anzunehmen, daß die für die infizierten Lymphozyten spezifischen CTL aus Subpopulationen mit unterschiedlicher Antigen-Spezifität zusammengesetzt sind. Infizierte Lymphozyten würden, da sie alle Antigene präsentieren, von allen CTL-Subpopulationen erkannt und lysiert werden. Die L4-Transfektanten präsentieren jedoch nur ein Parasiten-Protein, das, wenn es CTL-Epitope besitzt, nur von einer CTL-Subpopulation erkannt würde. Um die Anzahl cDNA-spezifischer CTL-Effektorzellen in dem CTL-Assay zu erhöhen, wurden CTL-Klonierungsexperimente mit den L4-Transfektanten als Stimulatorzellen durchgeführt.

Zur Anreicherung der zytotoxischen T-Zell-Population in den E98-PBL wurde die CD4-positive Subpopulation durch Antikörper- und Komplement-vermittelte Lyse entfernt. In Abweichung von der bei Goddeeris *et al.* (1988) beschriebenen Klonierungsmethode wurde die Anzahl der Effektorzellen von einer Zelle auf einhundert Zellen pro Klonierungsansatz erhöht. Dies geschah aus der Erwartung heraus, daß in den Effektorzellen die Häufigkeit cDNA-spezifischer CTL viel geringer ist als die Häufigkeit der für infizierte Lymphozyten spezifischen CTL. Um zu verhindern, daß CD8-positive Zellen wachsen, die ausschließlich auf die Gegenwart von Wachstumsfaktoren reagieren (Morrison, mündl. Mittl.), wurde die Konzentration der in Form von Kulturüberstand ConA-stimulierter Lymphozyten zur Verfügung stehenden Wachstumsfaktoren von 30% auf 0,6% reduziert.

Von 900 Ansätzen mit insgesamt 90.000 Effektorzellen traten proliferierende Effektorzellen in lediglich einem Ansatz auf, in dem L4-152-Zellen als Stimulatorzellen fungierten. Nach Vermehrung des Klons E98-CTL/152 in Anwesenheit von γ -bestrahlten L4-152-Stimulatorzellen und 10% Wachstumsfaktor-Überstand wurde seine Spezifität im CTL-Assay untersucht. Als Zielzellen dienten radioaktiv markierte L4-152-Zellen, nicht-transfizierte Zellen der L4-Ausgangslinie und autologe infizierte Lymphozyten (E98-Tp). Das Ergebnis ist in Abbildung 22 graphisch dargestellt.

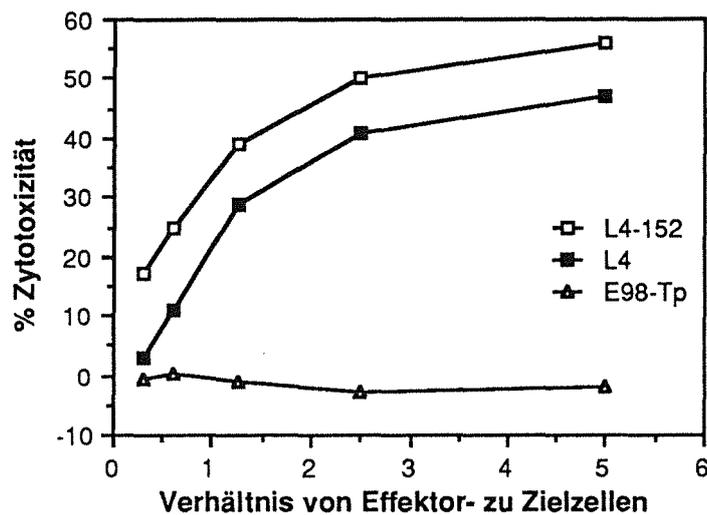


Abb. 22 Der CTL-Klon E98-CTL/152 ist xenoreaktiv. Der Klon lysierte in einer von dem Verhältnis von Effektor- zu Ziel-Zellzahl abhängigen Weise die L4-Transfektante L4-152 und die L4-Ausgangszelllinie, nicht jedoch die autologen infizierten Lymphozyten (E98-Tp).

Der Klon E98-CTL/152 lysierte sowohl die L4-152-Transfektanten als auch die L4-Ausgangszelllinie in einer von Effektor- zu Ziel-Zellzahl abhängigen Weise. Dagegen erkannte der CTL-Klon nicht die autologen infizierten Lymphozyten. Folglich handelte es sich bei dem CTL-Klon E98-CTL/152 um einen xenoreaktiven Klon, der in Abschnitt 3.5.4. beschriebenen Selektion entgangen war, und nicht um einen Parasiten-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Klon.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß:

- die Klonierungsbedingungen das Wachstum vom CTL-Klonen ermöglichen,
- xenoreaktive CTL der gegen sie gerichteten Selektion entgangen waren,
- die Häufigkeit von CTL-Klonen, die spezifisch für die von den hier untersuchten cDNA-Klonen kodierten Parasiten-Proteine sind, kleiner als 1:90.000 war.

Entweder sind auf den hier untersuchten Parasiten-cDNA-Klonen keine CTL-Epitope kodiert, oder aber die cDNA-spezifischen CTL sind so selten, daß sie bei der Erkennung infizierter Lymphozyten keine Rolle spielen.

Eine dritte Möglichkeit besteht darin, daß die Maus-L4-Zellen nicht in der Lage sind, bei Transfektion und Expression des korrekten Antigens dieses in der für die CTL richtigen Weise zu präsentieren. Diese Möglichkeit kann solange nicht ausgeschlossen werden, bis ein auf einem anderen Weg identifiziertes CTL-Epitop in den L4-Zellen exprimiert und dann im CTL-Assay analysiert wird.

3.5.5. Analyse der cDNA-Klone durch *in vitro* Translation/Translokation

Die zur Charakterisierung von cDNA-Klonen des Parasiten eingesetzten Verfahren der Lokalisation der Genprodukte (Abschnitt 3.5.2.) und der Analyse auf CTL-Epitope (Abschnitte 3.5.3. und 3.5.4.) sind zu aufwendig, um zahlreiche Klone gleichzeitig untersuchen zu können. Mit Hilfe der *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse können zahlreiche cDNA-Klone gleichzeitig danach unterschieden werden, ob sie für luminaire, membrandurchspannende oder zytosolische Polypeptide kodieren. Dadurch können cDNA-Klone vorselektioniert werden, für die die Wahrscheinlichkeit groß ist, daß die von ihnen kodierten Proteine vom Parasiten - im Fall eines luminalen Polypeptids - sezerniert oder - im Fall eines membrandurchspannenden Polypeptids - auf seiner Oberfläche exprimiert werden.

Die Unterscheidung beruht auf der Ab- oder Anwesenheit einer meist am N-Terminus des Polypeptids liegenden Signalsequenz, die während des Translationsvorganges von einem RNA-Protein-Komplex, dem "signal recognition particle" (SRP), erkannt und gebunden wird. Durch dieses Partikel wird der gesamte Translationskomplex aus Ribosomen und mRNA zu dem endoplasmatischen Retikulum (ER) geleitet (von Heijne 1985), und das Translationsprodukt bei luminalen Proteinen vollständig, bei membrandurchspannenden Proteinen teilweise in das ER-Lumen transportiert (transloziert). Dieser Prozeß ist mit Hilfe von Weizenkeimlysaten als Translationsmaschinerie, Mikrosomen aus Hundepankreas als ER und isolierten SRP-Partikeln aus Hundemikrosomen *in vitro* nachvollziehbar (Bujard *et al.* 1987).

Das Prinzip der Translations-/Translokationsanalyse ist in Abbildung 23 dargestellt. Als RNA kann entweder durch *in vitro* Transkription von cDNA-Inserts synthetisierte RNA oder direkt aus Zellen isolierte mRNA eingesetzt

werden. In letzterem Fall müssen die für die cDNA-Klone spezifischen Translationsprodukte durch cDNA-spezifische Antiseren isoliert werden.

Das aus den Ansätzen 1 bis 4 (siehe Abb. 23) resultierende Bandenmuster erlaubt eine Aussage über die Art des Polypeptids, das von dem cDNA-Klon kodiert wird:

- Ein zytosolisches Polypeptid wird an freien und nicht an mikrosomengebundenen Ribosomen synthetisiert, somit nicht in das Lumen der Mikrosomen transportiert und folglich auch nicht von Enzymen in der Membran der Mikrosomen prozessiert. Ein solches Polypeptid besitzt daher das gleiche Molekulargewicht in Ansatz 1 und 2 und wird, da es außerhalb der Mikrosomen verbleibt, in den Ansätzen 3 und 4 durch Proteinase K enzymatisch in Oligopeptide gespalten.
- Luminale und membrandurchspannende Proteine werden dagegen an mikrosomengebundenen Ribosomen synthetisiert und an den Mikrosomen durch Abspalten von Signalpeptiden und Glykosylierung prozessiert. Das prozessierte Translationsprodukt in Ansatz 2 besitzt daher ein anderes Molekulargewicht als das nichtprozessierte Produkt in Ansatz 1. Liegt ein luminales Protein vor, befindet sich das gesamte Polypeptid innerhalb des Mikrosomen-Lumens und ist dadurch in Ansatz 3 vor Proteinase K-Verdau geschützt.
- Bei einem membrandurchspannenden Protein befindet sich nur ein Teil innerhalb der Mikrosomenvesikel. Das außerhalb der Mikrosomen liegende zytoplasmatische Ende wird durch Proteinase K gespalten, so daß im Gegensatz zum luminalen Protein das Molekulargewicht eines Membranproteins in Ansatz 3 kleiner ist als in Ansatz 2. Werden die Mikrosomen durch Detergentien aufgelöst, sind auch die luminalen und membrandurchspannenden Polypeptide nicht mehr vor der Proteinase K geschützt und werden gespalten (Ansatz 4).

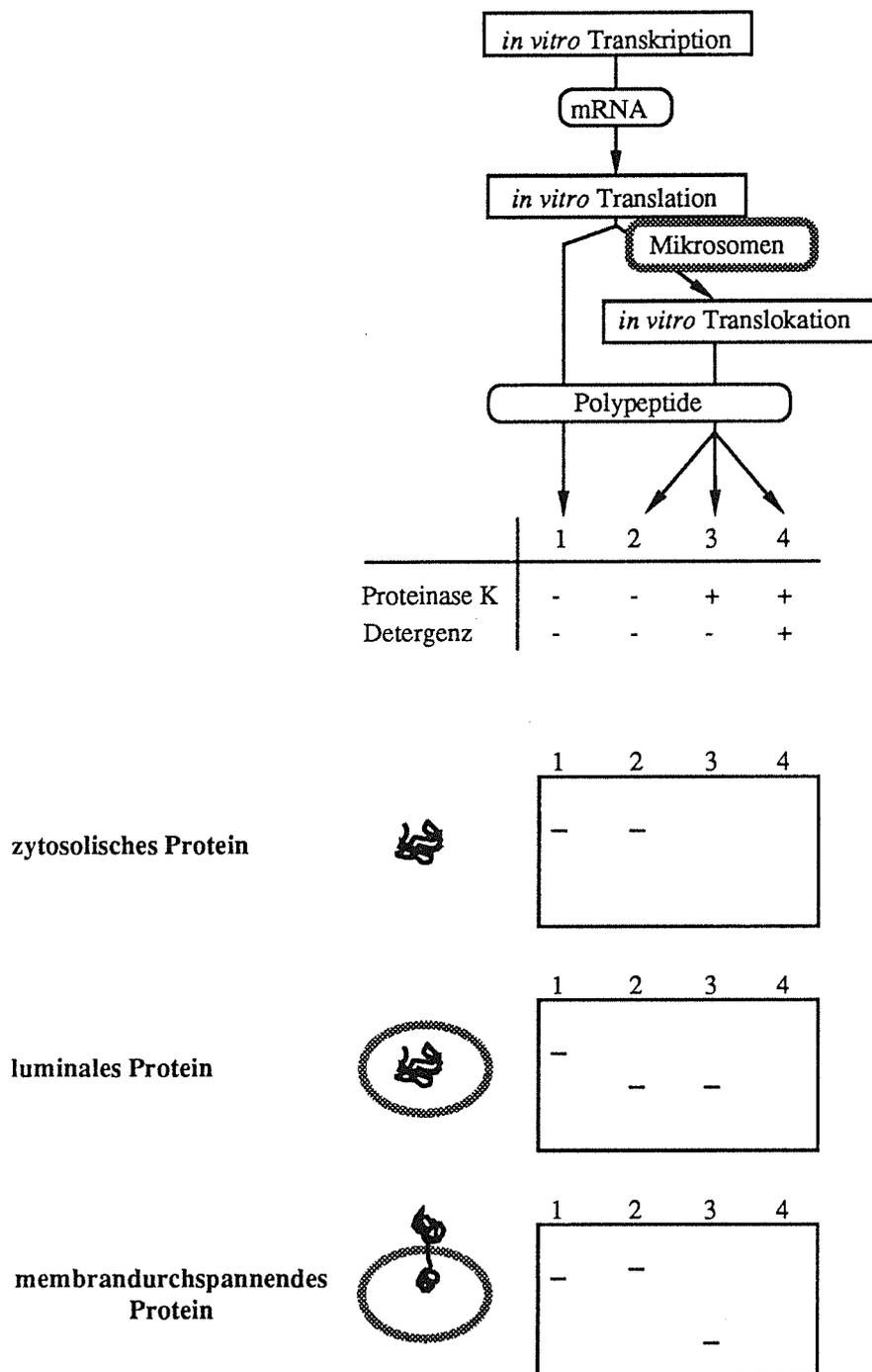


Abb. 23 Schematische Darstellung der *in vitro* Transkriptions-/Translations-/Translokations-Analyse mit den zu erwartenden Ergebnissen für ein zytosolisches, ein luminales und ein membrandurchspannendes Protein im Autoradiogramm nach Proteingel-elektrophoretischer Auftrennung der Translationsprodukte (siehe Text).

Die cDNA-Klone #101, #133, #152 und #T7 wurden, nachdem funktionsfähige Mikrosomen und isolierte SRP-Partikel verfügbar waren, daraufhin untersucht, ob sie für luminale, membrandurchspannende oder zytosolische Proteine des Parasiten kodieren. Die Immunofluoreszenzanalyse zeigte, daß diese Proteine auf den Parasiten beschränkt waren, eine Lokalisierung innerhalb des Parasiten, z.B. im Zytoplasma oder in Zellorganellen oder auf seiner Oberfläche war jedoch nicht möglich.

Von den in Abschnitt 3.5.2.2. beschriebenen pSG5-cDNA Konstrukten wurde für die cDNA-Inserts spezifische RNA synthetisiert und direkt in der *in vitro* Translation in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin mit oder ohne Mikrosomen und SRP-Partikeln eingesetzt.

Die Translationsprodukte der cDNA-Klone #101, #133, #152 und #T7 besaßen in den Translationsansätzen ohne Mikrosomen (Abb. 24, Spur 1) jeweils das gleiche Molekulargewicht wie in den Translationsansätzen mit Mikrosomen (Abb. 24, Spur 2) und wurden durch Proteinase K auch in Abwesenheit von Detergenz vollständig gespalten (Abb. 24, Spur 3). Die von den cDNA-Klonen kodierten Polypeptide verhielten sich somit wie zytosolische Proteine.

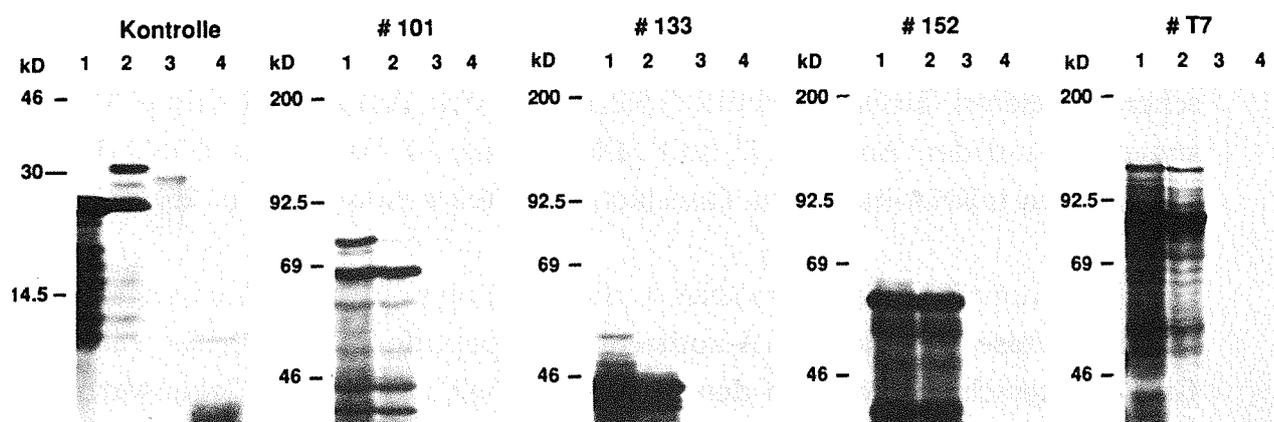


Abb. 24 Autoradiogramm der *in vitro* Transkriptions-/Translations-/Translokations-Analyse für die cDNA-Klone #101, #133, #152 und #T7 und die invariante Kette des Menschen als Kontrolle. Die in den Spuren 1 - 4 aufgetragenen Translationsprodukte wurden entsprechend der Abb. 23 behandelt.

Als Kontrolle wurde das Konstrukt pI- γ -gem eingesetzt, in dem die cDNA-Sequenz für ein als "invariante Kette" bezeichnetes Membranprotein des Menschen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht (Lipp, mündl. Mittl.). Dieses Protein besitzt eine für die Translokation erforderliche Signalpeptid-Sequenz sowie eine Glykosilierungsstelle (Lipp und Dobberstein 1986). Das 26 kD große Translationsprodukt der invarianten Kette (Abb. 24, Spur 1) erhielt durch die Glykosilierung in den Mikrosomen ein Molekulargewicht von 32 kD (Abb. 24, Spur 2), das nach Proteinase K-Abspaltung des zytoplasmatischen Teils auf 30 kD abnahm (Abb. 24, Spur 3). Die verwendeten Mikrosomen und SRP-Partikel waren folglich aktiv, so daß das Ergebnis für die Parasiten-cDNA-Klone auf das Fehlen entsprechender Signalpeptid-Sequenzen zurückzuführen ist.

Da die Signalpeptid-Sequenz meist im N-terminalen Bereich des Proteins liegt, ist die *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse bei Verwendung von RNA aus *in vitro* Transkriptionsansätzen von cDNA-Inserts nur dann aussagekräftig, wenn die cDNA-Inserts die vollständige Protein-kodierende Sequenz enthalten. Für die cDNA-Klone #133 und #152 konnte anhand der Sequenz (siehe Abschnitt 3.5.1.) nicht entschieden werden, ob sie den originären Translationsstart und damit die den N-Terminus kodierende Sequenz enthielten.

Aus diesem Grund wurde die mRNA des Parasiten in der *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse eingesetzt, und mit Hilfe der cDNA-spezifischen Antiseren (siehe Abschnitt 3.5.2.2.) aus den Ansätzen 1 (ohne Mikrosomen: -) und den Ansätzen 2 (mit Mikrosomen: +) die für die cDNA-Klone spezifischen mRNA-kodierten Translationsprodukte isoliert (Abb. 25).

Die immunpräzipitierten mRNA-kodierten Polypeptide verhielten sich in gleicher Weise wie die cDNA-kodierten Polypeptide (Abb. 24). Es war kein Größenunterschied zwischen den in Abwesenheit und den in Gegenwart von Mikrosomen synthetisierten Polypeptiden feststellbar (Abb. 25). Aufgrund der geringen Affinität des Antiserums α fpT7 konnten keine Translationsprodukte mit diesem Serum präzipitiert werden. Nach der Sequenzanalyse enthielt das cDNA-Insert #T7 den gesamten Protein-kodierenden Bereich einschließlich des N-terminalen Startkodons (siehe Abschnitt 3.6.3.), so daß für diesen cDNA-Klon das Ergebnis der *in vitro* Transkriptions-/Translations-/Translokationsanalyse aussagekräftig war.

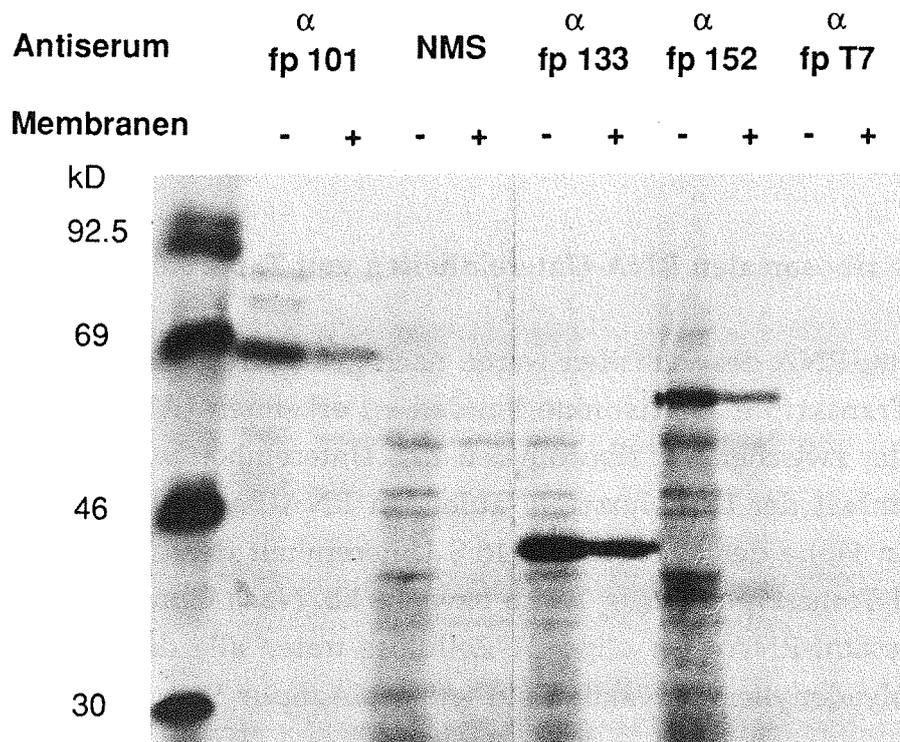


Abb. 25 Fluorogramm der mit den cDNA-spezifischen Antiseren immunpräzipitierten Translationsprodukte der Parasiten-mRNA nach eindimensionaler Proteingel-Elektrophorese. Die Translationen wurden in Abwesenheit (Membranen -) und Anwesenheit (Membranen +) von Mikrosomen durchgeführt. Den Ansätzen wurde nach Abschluß der Translation Detergenz zugesetzt, um die Translationsprodukte in beiden Ansätzen den Antikörpern zugänglich zu machen. Es wurden die gleichen Mikrosomen eingesetzt wie in dem Experiment in Abb. 24. Der radioaktiv markierte Molekulargewichtsmarker wurde am linken Rand aufgetragen. NMS = Kontrollserum.

Aus den Daten der *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse mit RNA *in vitro* transkribierter cDNA und mit Parasiten-mRNA ist zu schließen, daß die von den cDNA-Inserts #101, #133, #152 und #T7 kodierten Polypeptide zytosolische Proteine des Parasiten sind. Die mRNA-kodierten Polypeptide besaßen dieselben Molekulargewichte wie die cDNA-kodierten Polypeptide (siehe Tabelle 5). Die cDNA-Inserts enthielten folglich die gesamte Protein-kodierende Sequenz.

3.6. Identifizierung einzelner Transkripte des Parasiten

Bei der Analyse der für den Parasiten spezifischen cDNA-Klone lag der Schwerpunkt auf dem Aspekt ihrer Funktion in der Parasit-Wirt-Beziehung (Abschnitt 3.5.). Da diese Klone neu isolierte Gene des Parasiten darstellten, wurden sie auch auf die Funktion für den Parasiten selbst untersucht.

3.6.1. Die ribosomalen RNA-Untereinheiten von *T. parva*

In der Gesamt-RNA des Parasiten waren nach gelelektrophoretischer Auftrennung drei Transkripte als distinkte Banden zu erkennen (Abb. 3A, Spur 3-6). Die Größe der zwischen der ribosomalen 23 S Untereinheit von *E. coli* und der 28 S Untereinheit der Lymphozyten laufenden RNA-Bande betrug 3,3 kb, die Größe der in Höhe der ribosomalen 18 S Untereinheit der Lymphozyten laufenden zwei Transkripte betrug 1,9 kb bzw. 1,8 kb. Nach Chromatographie der Parasiten-Gesamt-RNA über oligo-dT-Zellulose traten alle drei Transkripte in der nicht-polyadenylierten Fraktion auf (Abb. 26A, Spur 3).

Zur Identifizierung dieser Transkripte wurde die nicht-polyadenylierte RNA-Fraktion mit verschiedenen rRNA-spezifischen Sonden hybridisiert. Die für die große rRNA-Untereinheit von *Trypanosoma brucei* spezifische cDNA hybridisierte mit der 28 S rRNA der Lymphozyten (Abb. 26B, Spur 1+2) und mit dem 3,3 kb großen Transkript in der Parasiten-RNA (Abb. 26B, Spur 3). Das für die Haupt-RNA der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Plasmodium berghei* spezifische genomische DNA Fragment hybridisierte mit der 18 S rRNA der Wirtszellen (Abb. 26C, Spur 1+2) und mit dem 1,8 kb großen Transkript in der Parasiten-RNA (Abb. 26C, Spur 3).

Da die 3,3 kb und 1,8 kb großen Transkripte in der Parasiten-RNA sehr häufig vorhanden waren - und damit als distinkte Banden im RNA-Gel erschienen -, keinen polyA-Schwanz besaßen und mit spezifischen ribosomalen Sonden kreuzhybridisierten, ist anzunehmen, daß es sich bei diesen Transkripten um die große bzw. kleine ribosomale RNA-Untereinheit des Parasiten handelt. Die Identität des 1,9 kb großen Transkripts in der Parasiten-RNA, das mit keiner der beiden rRNA-spezifischen Sonden hybridisierte, konnte nicht geklärt werden.

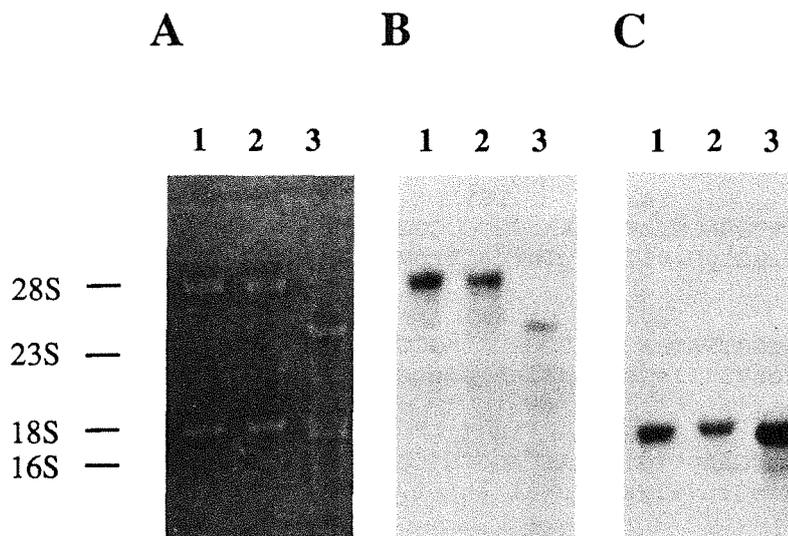


Abb. 26 Identifizierung der ribosomalen RNA-Untereinheiten von *T. parva*. (A) Mit Acridinorange gefärbtes RNA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung von jeweils 1 µg nicht-polyadenylierter RNA aus infizierten (Spur 1) und kurierten (Spur 2) Lymphozyten sowie von 1 µg nicht-polyadenylierter Parasiten-RNA (Spur 3). (B) Autoradiogramm des RNA-Gels von (A) nach Transfer der RNA auf Nylonmembran-Filter und Hybridisierung mit einer radioaktiven cDNA-Sonde, die für die große rRNA-Untereinheit von *Trypanosoma brucei* spezifisch ist. (C) Autoradiogramm wie bei (B), als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes genomisches DNA-Fragment von dem 18 S rRNA-Gen von *Plasmodium berghei* verwendet.

3.6.2. Der cDNA-Klon #T9 kodiert für den Translationselongationsfaktor TEF-1α von *T. parva*

Der cDNA-Klon #T9 wurde durch Screenen der cDNA-Genbank infizierter Lymphozyten mit isolierter Parasiten-mRNA isoliert (Abschnitt 3.3.). Der 350 bp umfassende sequenzierte Bereich des cDNA-Klons #T9 ist zusammen mit der sich aus dem offenen Leseraster ergebenden Proteinsequenz von 98 Aminosäuren in Abb. 27 dargestellt.

```

1      11      21      31      41      51      61
GAAATCCGGCAAGTCAGACAAAATGCCATGGTACAAGGGGAAAATCCTAGTCGAGGCACTT
      LysSerAspLysMetProTrpTyrLysGlyLysIleLeuValGluAlaLeu

      71      81      91      101     111     121
GACCTTATGGAACCACCAAAGAGACCAGTAGATAAGCCTCTGCGTCTTCCAATTCAAGCC
AspLeuMetGluProProLysArgProValAspLysProLeuArgLeuProIleGlnAla

      131     141     151     161     171     181
GTCTACAAGATTGGAGGTATTGGAAGTGTCCCGGTAGGAAGGGTTGAGACTGGTCAACTT
ValTyrLysIleGlyGlyIleGlyThrValProValGlyArgValGluThrGlyGlnLeu

      191     201     211     221     231     241
AAAGCAGGAATGGTTATAACCTTTGCACCAAGCCAAATCACAACCTGAGTGCAAGTCCGTC
LysAlaGlyMetValIleThrPheAlaProSerGlnIleThrThrGluCysLysSerVal

      251     261     271     281     291     301
GAAATCGATCACGAAGTTGTTGAAGTGGCTCTCCCCGGTGATAATGTCGGTTTCAACGTC
GluIleAspHisGluValValGluValAlaLeuProGlyAspAsnValGlyPheAsnVal

```

```

AAAA
Lys

```

Abb. 27 Nukleotid-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz für den sequenzierten 5' Bereich des cDNA-Inserts #T9. Die Sequenz des zur Klonierung der cDNA benutzten *EcoRI*-Linkers ist unterstrichen.

Der AT-Gehalt des sequenzierten Bereichs betrug 53,4%. Bei Vergleich der um die *EcoRI*-Linker verkürzten cDNA-Nukleotidsequenz mit den in der Datenbank "NIH-GenBank" gespeicherten Sequenzen zeigte der gesamte Sequenzbereich Homologien zu dem Translationselongationsfaktor TEF-1 α von Mensch (65,1% Homologie) (Brands *et al.* 1986), *Mucor racemosus* (64,9% Homologie) (Linz *et al.* 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (65,8% Homologie) (Nagata *et al.* 1984, Schirmaier und Philippsen 1984) und *Artemia salina* (67,5% Homologie) (Van Hemert *et al.* 1984). Die Homologie zwischen den aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen betrug 70% (Abb. 28). In der in Abbildung 28 durch einen Strich markierten Region betrug die Homologie 90%. Diese Region ist in den TEF-1 α Proteinen von Hefe, *M. racemosus* und *A. salina* aufgrund ihrer Homologie zu dem Elongationsfaktor EF-Tu von *E. coli* als eine der beiden tRNA-Bindungsdomänen identifiziert worden (Linz *et al.* 1986).

Die Position des sequenzierten 5' Bereichs der cDNA innerhalb des mRNA-Transkripts stimmt mit der Position der homologen TEF-1 α Sequenz in den korrelierten mRNA-Transkripten von Mensch, Hefe, *M. racemosus* und *A. salina* überein. Das Kodon 214 vom TEF-1 α der Hefe ist 0,8 kb, das Kodon

		Kodon																													
#T9		K	S	D	K	M	P	W	Y	K	G	K	I	L	V	E	A	L	D	L	M	E	P	P	K	R	P	V	D	K	P
S.c.	214	•	E	T	•	A	G	V	V	•	•	•	T	•	L	•	•	I	•	A	I	•	Q	•	S	•	•	T	•	•	•
M.r.	214	•	E	T	•	A	G	S	K	T	•	•	T	•	L	•	•	I	•	A	I	•	•	•	V	•	•	S	•	•	•
A.s.	215	I	E	R	•	E	G	K	A	D	•	•	T	•	L	•	•	•	•	A	I	L	•	•	S	•	•	T	•	•	•
H.s.	216	V	T	R	•	D	G	N	A	S	•	T	T	•	L	•	•	•	•	C	I	L	•	•	T	•	•	T	•	•	•
		<hr/>						<hr/>						<hr/>																	
#T9		L	R	L	P	I	Q	A	V	Y	K	I	G	G	I	G	T	V	P	V	G	R	V	E	T	G	Q	L	K	A	G
S.c.	244	•	•	•	•	L	•	D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	V	I	•	P	•
M.r.	244	•	•	•	•	L	•	D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	I	•	•	•
A.s.	245	•	•	•	•	L	•	D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	I	I	•	P	•
H.s.	246	•	•	•	•	L	•	D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	V	•	•	P	•
		<hr/>						<hr/>						<hr/>																	
#T9		M	V	I	T	F	A	P	S	Q	I	T	T	E	C	K	S	V	E	I	D	H	E	V	V	E	V	A	L	P	G
S.c.	274	•	•	V	•	•	•	•	A	G	V	•	•	•	•	•	•	•	•	M	H	•	•	Q	L	•	Q	G	V	•	•
M.r.	274	•	•	V	N	•	•	•	A	A	V	•	•	•	V	•	•	•	•	M	H	•	•	T	L	T	Q	G	•	•	•
A.s.	275	•	I	V	•	•	•	•	A	N	•	•	•	•	•	•	•	•	•	M	H	•	•	S	L	•	E	•	S	•	•
H.s.	276	•	•	V	•	•	•	•	V	N	V	•	•	•	•	•	•	•	•	M	H	•	•	A	L	•	E	•	•	•	•
		<hr/>						<hr/>						<hr/>																	
#T9		D	N	V	G	F	N	V	K																						
S.c.	304	•	•	•	•	•	•	•	•																						
M.r.	304	•	•	•	•	•	•	•	•																						
A.s.	305	•	•	•	•	•	•	•	•																						
H.s.	306	•	•	•	•	•	•	•	•																						

Abb. 28 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Inserts #T9 mit homologen Regionen in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Translationelongationsfaktors TEF-1 α von *Saccharomyces cerevisiae* (S.c., nach Nagata *et al.* 1984, Schirmaier und Philippsen 1984), von *Mucor racemosus* (M.r., nach Linz *et al.* 1986), von *Artemia salina* (A.s., nach Van Hemert *et al.* 1984) und vom Menschen (H.s., nach Brands *et al.* 1986). Die unter "Kodon" aufgeführten Ziffern beziehen sich auf die Position des für die darauffolgende Aminosäure kodierenden Kodons innerhalb der jeweiligen TEF-1 α -mRNA. Positionen mit identischen Aminosäuren zwischen der Sequenz des cDNA-Klons #T9 und den anderen vier Sequenzen sind durch Punkte dargestellt. Die durchgezogene Linie markiert einen Sequenzbereich, der von Linz *et al.* (1986) als eine der beiden tRNA-Bindungsdomänen beschrieben wurde.

214 des TEF-1 α von *M. racemosus* 0,81 kb, das Kodon 215 des TEF-1 α von *A. salina* 0,76 kb und das Kodon 216 vom TEF-1 α des Menschen 0,7 kb von dem 3' Ende der jeweiligen mRNA entfernt. Das erste Kodon der 0,8 kb großen cDNA #T9 bildete das 5' Ende des Inserts und ist folglich 0,8 kb von dem 3' Ende der korrespondierenden mRNA des Parasiten entfernt.

Aufgrund dieser Übereinstimmungen kodiert der cDNA Klon #T9 mit hoher Wahrscheinlichkeit für den Translationelongationsfaktor TEF-1 α von *T. parva*.

3.6.3. Der cDNA-Klon #T7 kodiert für ein zu den Hitzeschockproteinen der hsp83/90-Familie homologes Parasiten-Protein

Die Analyse der ansequenzierten 5' und 3' Enden des cDNA-Inserts #T7 ergab, daß der gesamte Protein-kodierende Bereich auf dem Insert vorlag, und daß die Sequenz Homologien zu Hitzeschockproteinen aufwies. Aufgrund dieser Befunde wurde der Klon vollständig in beiden Richtungen sequenziert und näher charakterisiert.

Die Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 29, die Nukleotidsequenz mit daraus abgeleiteter Aminosäuresequenz in Abbildung 30 dargestellt.

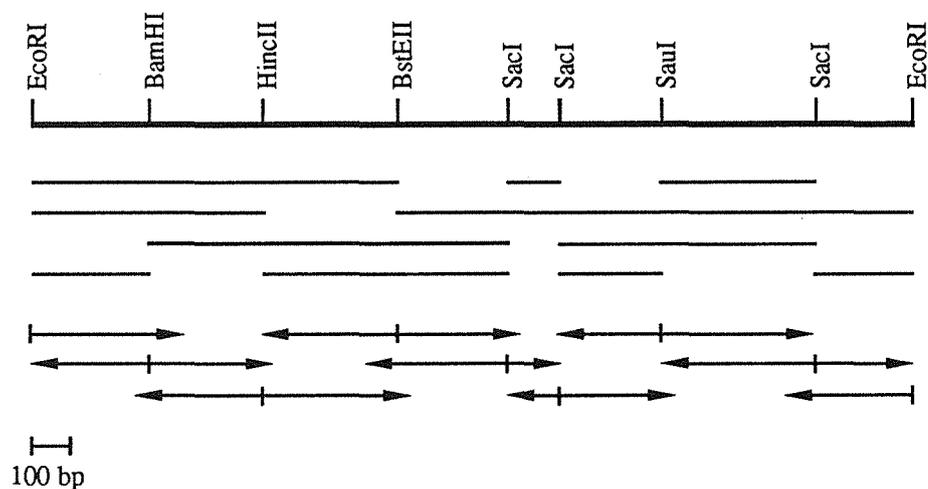


Abb. 29 Sequenzierungsstrategie für das cDNA-Insert #T7. Das Insert ist als *EcoRI*-Fragment in 5'-3'-Richtung dargestellt. Für die Doppelstrang-Sequenzierung wurden insgesamt elf Subfragmente - als Striche dargestellt - über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in den Vektor pUC19 subkloniert und - wie durch die Pfeile dargestellt - in beiden Richtungen sequenziert. Über alle für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen wurde zumindest in einer Richtung hinübersequenziert.

10 20 30 40 50 60
AATTCGGCTTTAAATACAGTCGAATAACAAATAATATTTTGTATTTCGACTGTATTTAA
 70 80 90 100 110 120
 AGTATACTATTGCCACTGCATCTAATTTTAAATTCTCTAGTATTGTTTCAGTACTTTATC
 130 140 150 160 170 180
 TAATTAACGATGACATCAAAGGACGAGACACCTGATCAGGAGGTCTACGCTTTTAATGCT
 MetThrSerLysAspGluThrProAspGlnGluValTyrAlaPheAsnAla
 190 200 210 220 230 240
 GATATCTCCCAGCTTTTAAGCTTGATCATCAACGCATTTTATAGTAACAAGGAGATTTTC
 AspIleSerGlnLeuLeuSerLeuIleIleAsnAlaPheTyrSerAsnLysGluIlePhe
 250 260 270 280 290 300
 CTTCGTGAACTCATTAGCAACGCTAGCGACGCACTGGAAAAAATTAGGTATGAGGCAATC
 LeuArgGluLeuIleSerAsnAlaSerAspAlaLeuGluLysIleArgTyrGluAlaIle
 310 320 330 340 350 360
 AAGGATCCAAAGCAAATCGAGGATCAACCCGATTACTATATCAGGCTGTATGCCGACAAG
 LysAspProLysGlnIleGluAspGlnProAspTyrTyrIleArgLeuTyrAlaAspLys
 370 380 390 400 410 420
 AACACAACACCCTCACAATCGAAGATTCCGGTATTGGCATGACCAAAGCCGACCTCGTG
 AsnAsnAsnThrLeuThrIleGluAspSerGlyIleGlyMetThrLysAlaAspLeuVal
 430 440 450 460 470 480
 AACAACTCGGTACAATTGCCAAATCCGGCACAAGAGCATTCATGGAGGCACTGCAAGCA
 AsnAsnLeuGlyThrIleAlaLysSerGlyThrArgAlaPheMetGluAlaLeuGlnAla
 490 500 510 520 530 540
 GGCTCGGACATGTCAATGATCGGACAGTTTGGTGTGGTCTTCTACTCAGCATACTGGTC
 GlySerAspMetSerMetIleGlyGlnPheGlyValGlyPheTyrSerAlaTyrLeuVal
 550 560 570 580 590 600
 GCAGATAAGGTGACAGTAGTGTCCAAGAACAACGCAGACGACCAGTACGTCTGGGAGTCA
 AlaAspLysValThrValValSerLysAsnAsnAlaAspAspGlnTyrValTrpGluSer
 610 620 630 640 650 660
 ACAGCCTCAGGCCACTTTACAGTGAAGAAGGACGACTCGCACGAGCCGCTCAAAGAGGA
 ThrAlaSerGlyHisPheThrValLysLysAspAspSerHisGluProLeuLysArgGly
 670 680 690 700 710 720
 ACTAGACTAATACTGCACTTGAAGGAGGACCAAACTGAGTACCTTGAGGAGAGAAGGCTG
 ThrArgLeuIleLeuHisLeuLysGluAspGlnThrGluTyrLeuGluGluArgArgLeu
 730 740 750 760 770 780
 AAAGAGCTTGTTAAGAAGCACAGCGAGTTCATTTTCATTCCCAATCTCGCTCTCAGTAGAG
 LysGluLeuValLysLysHisSerGluPheIleSerPheProIleSerLeuSerValGlu
 790 800 810 820 830 840
 AAGACCCAGGAGACCGAGGTCCTGACGACGAGGCAGAGCTAGACGAGGACAAGAAGCCC
 LysThrGlnGluThrGluValThrAspAspGluAlaGluLeuAspGluAspLysLysPro
 850 860 870 880 890 900
 GAGGAGGAGAAGCCCAAGGACGATAAGGTGGAGGACGTTACTGACGAGAAAGTGACCGAC
 GluGluGluLysProLysAspAspLysValGluAspValThrAspGluLysValThrAsp

910 920 930 940 950 960
GTCACTGACGAGGAGGAGAAAAAGGAGGAAAAAGAAAAAGAAGAAGAGGAAGGTCACCAAC
ValThrAspGluGluGluLysLysGluGluLysLysLysLysLysArgLysValThrAsn

970 980 990 1000 1010 1020
GTAACGCGTGAGTGGGAAATGCTTAACAAGCAGAAGCCAATTTGGATGAGACTCCCGTCT
ValThrArgGluTrpGluMetLeuAsnLysGlnLysProIleTrpMetArgLeuProSer

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAAGTCACCAACGAAGAATATGCAGCGTTCTACAAGAACTTAACCAACGATTGGGAAGAC
GluValThrAsnGluGluTyrAlaAlaPheTyrLysAsnLeuThrAsnAspTrpGluAsp

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CACTTGGCCGTGAAACACTTCAGCGTTGAGGGTCAGCTTGAGTTCAAAGCTCTACTGTTC
HisLeuAlaValLysHisPheSerValGluGlyGlnLeuGluPheLysAlaLeuLeuPhe

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCCCAAGAAGAGCGCCGTTTGACATGTTGAGTCCCGCAAAAAGAAAAACAACATCAAG
ValProArgArgAlaProPheAspMetPheGluSerArgLysLysLysAsnAsnIleLys

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TTGTACGTCAGACGCGTATTTATCATGGACGACTGTGAGGAGCTCATCCCGGAGTGGCTT
LeuTyrValArgArgValPheIleMetAspAspCysGluGluLeuIleProGluTrpLeu

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TCCTTTGTGAAGGGTGTGGTAGACTCAGAGGACCTGCCCTTGAATATTTCTAGGGAAACT
SerPheValLysGlyValValAspSerGluAspLeuProLeuAsnIleSerArgGluThr

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CTCCAGCAGAACAAGATCCTCAAGGTCATCAGGAAGAAGTTGGTGAAAAAGTGCCTCGAG
LeuGlnGlnAsnLysIleLeuLysValIleArgLysAsnLeuValLysLysCysLeuGlu

1390 1400 1410 1420 1430 1440
CTCTTCAATGAACTCACTGAGAAGAAGGAGGACTTCAAGAAGTTCTACGAGCAGTTCAGC
LeuPheAsnGluLeuThrGluLysLysGluAspPheLysLysPheTyrGluGlnPheSer

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AAGAACCTGAAGCTGGGAATCCACGAGGACAACGCTAATCGCTCAAAGATCGCCGAAGT
LysAsnLeuLysLeuGlyIleHisGluAspAsnAlaAsnArgSerLysIleAlaGluLeu

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TTGAGGTTGAGACAACCAAGAGCGGAGACGAACTCGTGTCCTCAAGGAGTACGTTGAC
LeuArgPheGluThrThrLysSerGlyAspGluLeuValSerLeuLysGluTyrValAsp

1570 1580 1590 1600 1610 1620
AGGATGAAGAGTGACCAGAAGTATGTGTACTACATCACGGGAGAGTCGAAGCAGAGCGTA
ArgMetLysSerAspGlnLysTyrValTyrTyrIleThrGlyGluSerLysGlnSerVal

1630 1640 1650 1660 1670 1680
GCCTCAAGTCCTTTCCTTGAGACCCTGAGGTCTCGCGACTACGAAGTCCTGTACATGACT
AlaSerSerProPheLeuGluThrLeuArgSerArgAspTyrGluValLeuTyrMetThr

1690 1700 1710 1720 1730 1740
GACCCAATTGATGAGTACGCAGTTCAGCAGATCAAGGAGTTTGAAGGCAAGAACTCAAG
AspProIleAspGluTyrAlaValGlnGlnIleLysGluPheGluGlyLysLysLeuLys

```

1750      1760      1770      1780      1790      1800
TGCTGTACCAAGGAGGGCCTGGACCTTGATGAGGGCGAGGATGAAAAGAAGTCCTTTGAA
CysCysThrLysGluGlyLeuAspLeuAspGluGlyGluAspGluLysLysSerPheGlu

1810      1820      1830      1840      1850      1860
GCGCTCAAGGAAGAAATGGAACCTCTTTGCAAGCACATCAAGGAAGTGCTCCACGACAAG
AlaLeuLysGluGluMetGluProLeuCysLysHisIleLysGluValLeuHisAspLys

1870      1880      1890      1900      1910      1920
GTGAAAAGGTCGTGTGTGGAACAAGGTTTACCGACTCTCCATGCGCACTTGTCACCAGC
ValGluLysValValCysGlyThrArgPheThrAspSerProCysAlaLeuValThrSer

1930      1940      1950      1960      1970      1980
GAGTTCGGCTGGAGCGGAACATGGAGCGTATCATGAAAGCACAAGCTCTCAGAGACTCG
GluPheGlyTrpSerAlaAsnMetGluArgIleMetLysAlaGlnAlaLeuArgAspSer

1990      2000      2010      2020      2030      2040
TCCATAACAAGCTACATGCTGAGCAAGAAGATCATGGAGATTAACCCGAGACATAGCATC
SerIleThrSerTyrMetLeuSerLysLysIleMetGluIleAsnProArgHisSerIle

2050      2060      2070      2080      2090      2100
ATGAAGGAGCTCAAAACTAGAGCTGCAAACGACAAAACAGATAAAACCGTCAAGGACCTA
MetLysGluLeuLysThrArgAlaAlaAsnAspLysThrAspLysThrValLysAspLeu

2110      2120      2130      2140      2150      2160
GTCTGGCTTCTCTACGACACAGCGCTCTTAACCTCAGGGTTTAAACCTCGATGAGCCCACC
ValTrpLeuLeuTyrAspThrAlaLeuLeuThrSerGlyPheAsnLeuAspGluProThr

2170      2180      2190      2200      2210      2220
CAGTTTGGAAACAGGATCTACAGGATGATCAAGCTCGGACTCTCATTGGACGACGAGGAA
GlnPheGlyAsnArgIleTyrArgMetIleLysLeuGlyLeuSerLeuAspAspGluGlu

2230      2240      2250      2260      2270      2280
CACGTAGAAGAGGACTCATCAATGCCGCCGCTGGATGAGCCCGTTGTGCGACTCCAAAATG
HisValGluGluAspSerSerMetProProLeuAspGluProValValAspSerLysMet

2290      2300      2310      2320      2330      2340
GAGGAAGTTGACTAAAGTAATATATTCTCTGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGGAATTC
GluGluValAspEnd

```

Abb. 30 Nukleotid-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Inserts #T7. Die für die cDNA-Klonierung benutzten *Eco*RI-Linker sind in der Sequenz unterstrichen, die Konsensus-Sequenz für die Polyadenylierung durch einen Doppelstrich markiert.

Die nach Abzug der *Eco*RI-Linker und des 19 bp langen polyA-Schwanzes 2.306 kb große cDNA besaß ein offenes Leseraster für ein 721 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 83.692 kD. Die 5' nicht-translatierte Region umfaßte 121 Nukleotide, der 3' nicht-translatierte Bereich lediglich 22 Nukleotide. Eine Konsensus-Signalsequenz für die Polyadenylierung, in Abbildung 30 durch einen Doppelstrich markiert, lag 10 bp oberhalb

des polyA-Schwanzes. Der AT-Gehalt war in dem 5' nicht-translatierten und 3' nicht-translatierten Bereich mit 75% bzw. 82% deutlich höher als in der kodierenden Region mit 51%.

Bei einem Vergleich der Sequenz des cDNA-Klons #T7 mit den in der Datenbank "NIH-GenBank" gespeicherten Sequenzen wurden in dem Proteinkodierenden Bereich signifikante Homologien zu Hitzeschockproteinen der hsp83/hsp90-Gruppe gefunden. Die Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz betrug für den gesamten Sequenzbereich 63% zu dem hsp90 des Menschen (Rebbe *et al.* 1987), 62% zu dem hsp83 von *Drosophila melanogaster* (Blackman und Meselson 1986), 60% zu dem hsp90 von *S. cerevisiae* (Farrelly und Finkelstein 1984) und 64% zu dem 85 kD-Antigen von *Trypanosoma cruzi* (Dragon *et al.* 1987) (Abb. 31).

In einigen, bis zu 30 Aminosäuren langen Proteinabschnitten war die Homologie größer als 90%. Dem standen Bereiche mit geringer Sequenzhomologie gegenüber: der N-Terminus, die zwischen Aminosäure-Position 695 und 714 am C-Terminus oberhalb des zu fast 100% konservierten Motivs "MEEVD" liegende Sequenz (in Abbildung 31 durch einen Strich markiert), sowie die zwischen den Aminosäure-Positionen 224 bis 284 und 535 bis 577 liegenden 60 bzw. 42 Aminosäuren langen Sequenzbereiche (in Abbildung 31 ebenfalls durch einen Strich markiert). In den drei letztgenannten Bereichen war für alle fünf Proteine ein nahezu identischer und auffällig hoher Gehalt an positiv- und negativ-geladenen Aminosäuren feststellbar (Tabelle 6). Die Funktion dieser in Bezug auf die Ladung, nicht aber die Aminosäure-Sequenz konservierten Regionen ist nicht bekannt.

Abb. 30 Vergleich der Aminosäuresequenzen des cDNA-Klons #T7 mit dem Hitzeschock-Protein hsp90 des Menschen (nach Rebbe *et al.* 1987), dem hsp83 von *Drosophila melanogaster* (nach Blackman und Meselson 1986), dem hsp90 von *Saccharomyces cerevisiae* (nach Farrelly und Finkelstein 1984) und dem 85 kD-Antigen von *Trypanosoma cruzi* (nach Dragon *et al.* 1987). Positionen mit identischen Aminosäuren zwischen der #T7-Sequenz und den anderen vier Sequenzen sind durch einen Punkt dargestellt. Zur besseren Ausrichtung homologer Bereiche wurden durch Striche markierte Lücken in die Sequenzen eingefügt. Auf die mit einem durchgezogenen Strich markierten Bereiche wird im Text Bezug genommen.


```

#T7 389  L P L N I S R E T L  Q Q N K I L K V I R  K N L V K K C L E L  F N E L T E K K E D  F K K F Y E Q F S K  N L K L G I H E D N  A N R S K
H 386    . . . . . M . . . S . . . . . . . . I . . . . . . . . S . . . A . D . . N  Y . . . . . A . . . . . . . . . . . S T . . R R
D 379    . . . . . M . . . . . V . . . . . . . . . . . T M . . . I E . . . . . D . . N  Y . . . . . D . . . . . . . . . . . V . . . S N . . A .
S 374    . . . . L . . . M . . . . . M . . . . . . . . I . . . L I . A . . . I A . D S . Q . E . . . S A . . . . . I . . . V . . . T Q . . A A
T 369    . . . . . N . . . . . . . . . . . . . . I . . . A . . . . . E . I A . N . . . . . Y . . . . . . . . G . . V . . . . . S . . . K .

#T7 454  I A E L L R F E T T  K S G D E L V S L K  E Y V D R M K S D Q  K Y V Y Y I T G E S  K Q S V A S S P F L  E T L R S R D Y E V  L Y M T D
H 451    L S . . . . . H . S  Q . . . . M T . . S . . . S . . . E T . . S I . . . . . . . . E Q . . N . A . V . R V . K . G F . . V . . . E
D 444    L . D F . . F H . S  A . . . . D F C . . A  D . . S . . . . D N . . H . . F . . . . . . D Q . S N . A . V . R V K A . G F . . V . . . E
S 439    L . K . . . . Y N S . . . V . . . T . . T  D . . T . . P E H . . N I . . . . . . . . L K A . E K . . . . . D A . K A K N F . . . F L . .
T 434    L M . . . . . H S S  E . . E D M T T . . . D . . T . . . E G . . C I . . V . . D . . K K L E T . . . I . Q A . R . G F . . . F . . E

#T7 519  P I D E Y A V Q Q I  K E F E G K K L K C  C T K E G L D L D E  G E D E K K S F E A  L K E E M E P L C K  H I K E V L H D - K  V E K V V
H 516    . . . . . C . . . L . . . . . S . V S  V . . . . . E . P . D . E . . . K M . E  S . A K F . N . . . . L M . . I . - . N . . . . T
D 509    . . . . . V I . H L . . Y K . . Q . V S  V . . . . . E . P . D . S . . . K R . E  D . A K F . S . . . . L M . S I . - . N . . . . .
S 504    . . . . . F T . L . . . . . T . V D  I . . D - - F E L . E T . . E . A E R E  K E I K E Y E P . . . A L . . I . G . - Q . . . . .
T 499    . . . . . V M . . V . D . . D . . F A . L . . . . V H F E . T . E . . . Q R . E  E . T A Y . R . . . . A M . D . G . - . . . . .

#T7 583  C G T R F T D S P C  A L V T S E F G W S  A N M E R I M K A Q  A L R D S S I T S Y  M L S K K I M E I N  P R H S I M K E L K  T R - A A
H 580    I S N . L V S . . . . C I . . . T Y . . T . . . . . . . . . . . . . . N S T M G . . M A . . H L . . . . . D . P . V - . T L R Q K . E
D 573    V S N . L V . . . . . C I . . . Q . . . . . . . . . . . . . . . . . . T A T M G . . A G . . Q L . . . . . D . P . V - . T L R Q K . D
S 566    V S Y . L L . A . A . I R . G Q . . . . . . . . . . . . . . . . . . M S . . . S . . . T F . . . S . K S P . I . . . . K . V D E
T 563    V S E . L A T . . . . I . . . . . . . . . . . H . . Q . . R N . . . . . . M S A . . M . . . T . . . . . A . P . V . . . . R . V - E

#T7 647  N D K T D K T V K D  L V W L L Y D T A L  L T S G F N L D E P  T Q F G N R I Y R M  I K L G L S L D - D  E E H V E E D S S M  P P L D E
H 644    A . . N . . A . . . . . . V . . F E . . . . . S . . . S . E D . Q T H S . . . . . . . . . . G I . E . . V A A . . P - N A  A V P . .
D 637    A . . N . . A . . . . . . I . . F E . S . . S . . . S . S . Q V H A S . . . . . . . . . . G I . E D . - - P M T T D A Q  S A G . A
S 631    G G A Q . . . . . . . T K . . Y E . . . . . . . . . S . . . . . S F A S . . N . L . S . . . N I . E D . - - - . T . E T A . E A S T
T 627    A . E N . . A . . . . . . Y . . F . . . . . . . . . T . . D . . S Y A E . . H . . . . . . . . . - . . D N G N . E A E P  A A A V P

#T7 711  - - P V - - V D -  S K M E E V D
H 708    I P . L E G D E . A . R . . . . .
D 700    P S L . E . T E . A . H . . . . .
S 693    A A . . E E V P A D  T E . . . . .
T 691    A E . . A G T - - - . S . . Q . .

```

Sequenzbereich	Sequenz	Sequenzhomologie zu #T7 (in %)	Gehalt an	
			D/E (%)	K/R (%)
Gesamtsequenz	#T7	100	20	15
	H	63	19	14
	D	62	20	15
	S	60	20	15
	T	64	19	15
Aminosäure- Position 224 - 284 in der #T7-Sequenz	#T7	100	42	26
	H	38	50	23
	D	33	48	25
	S	33	48	29
	T	48	37	20
Aminosäure- Position 535 - 577 in der #T7-Sequenz	#T7	100	30	21
	H	52	26	21
	D	52	26	21
	S	32	37	15
	T	52	28	19
Aminosäure- Position 695 - 714 in der #T7-Sequenz	#T7	100	45	0
	H	26	42	0
	D	22	32	0
	S	22	42	0
	T	33	30	0

Tabelle 6 Vergleich der Homologie-Grade in der Aminosäuresequenz und in dem Gehalt negativ (D/E, Abkürzung für Asparagin- und Glutaminsäure) und positiv (K/R, Abkürzung für Lysin und Arginin) geladener Aminosäuren für ausgewählte Sequenzbereiche zwischen dem *T. parva*-cDNA-Klon #T7 (#T7) und den Hitzeschockproteinen hsp90 des Menschen (H), hsp83 von *D. melanogaster* (D), hsp90 von *S. cerevisiae* (S) und dem 85 kD-Antigen von *T. cruzi* (T) (siehe auch Abb. 31).

Hitzeschockproteine zählen in verschiedenen parasitären Infektionen trotz bestehender Sequenzhomologien zu Wirtsproteinen zu den immunodominanten Parasiten-Antigenen (Newport *et al.* 1989). Daher wurde untersucht, ob Rinder-Immunsereen das #T7-Genprodukt in Form des bakteriellen Fusionsproteins fpT7 (siehe Abschnitt 3.5.2.1.) als Antigen erkennen. Dies war nicht der Fall.

3.6.4. Kodon-Verwendung bei *T. parva*

Erhebliche Abweichungen in der Kodon-Verwendung zwischen Parasit und Säugerzelle könnten zu Schwierigkeiten bei der Expression von Parasiten-Sequenzen in Rinder-Lymphozyten oder Maus-L4-Zellen führen. Zur Bestimmung der Kodon-Verwendung bei *T. parva* wurden die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten Protein-kodierenden Bereiche der Parasiten-spezifischen cDNA-Klone #T9, #T7, #101, #133 und #152 und des Aktins (Ehrfeld 1989) in ihrer Kodon-Zusammensetzung analysiert und mit den für Rind und Maus veröffentlichten Werten (Maruyama *et al.* 1986) verglichen (Abb. 32).

Es fällt auf, daß für alle Aminosäuren mit zwei möglichen Kodons und für Isoleucin die Kodonpräferenzen nahezu identisch sind. Geringe Unterschiede bestehen in der Kodon-Verwendung für Serin, Arginin und Prolin. Eine deutlich unterschiedliche Kodon-Verwendung ist für die Aminosäuren Leucin, Valin, Alanin und Glycin festzustellen. Das bei Rind und Maus mit fast 50% häufigste Leucin-Kodon CUG tritt in den sechs untersuchten Sequenzen von *T. parva* erst an dritter Stelle auf. Das mit 50% bei Rind und Maus häufigste Valin-Kodon GUG wird von *T. parva* nur halb so oft verwendet. Ähnliches gilt für die Kodons von Alanin und Glycin.

Die für die Kodon-Verwendung herangezogene Anzahl von sechs Genen mit insgesamt 1.387 Kodons zeigt, daß die angegebenen Werte für den Parasiten nur Tendenzen aufzeigen können, die durch Untersuchung einer größeren Anzahl von *T. parva*-Sequenzen zu verifizieren sind.

Abb. 32 Kodon-Verwendung in sechs untersuchten *T. parva*-Sequenzen im Vergleich zu Rind und Maus. Die Kodon-Verwendung des *T. parva*-Aktins wurde aus der Sequenz von Ehrfeld (1989) ermittelt. Die *T. parva*-Sequenzen umfaßten 1.387 Kodons. Der Analyse beim Rind lagen 26 Gene mit insgesamt 7.105 Kodons, der Analyse bei der Maus 66 Gene mit insgesamt 19.193 Kodons zugrunde (nach Maruyama *et al.* 1986).

3.6.5. Stadienspezifische Expression der cDNA-Klone

Für Hitzeschockproteine wurde in anderen Parasiten eine stadienspezifische Expression nachgewiesen (van der Ploeg 1985). Daher sollte die Expression der zu hsp90 homologen cDNA #T7 in verschiedenen Stadien von *T. parva* untersucht werden. Zum Nachweis des von dem cDNA-Klon #T7 kodierten Proteins wurden Lysate von isolierten Sporozoiten, isolierten erythrozytären Stadien und von infizierten Lymphozyten für das Schizonten-Stadium im Immunoblot mit dem cDNA-spezifischen Antiserum α fpT7 (siehe Abschnitt 3.5.2.2.) analysiert. Parallel dazu wurde die Analyse mit den cDNA-spezifischen Antiseren α fp101, α fp133 und α fp152 durchgeführt.

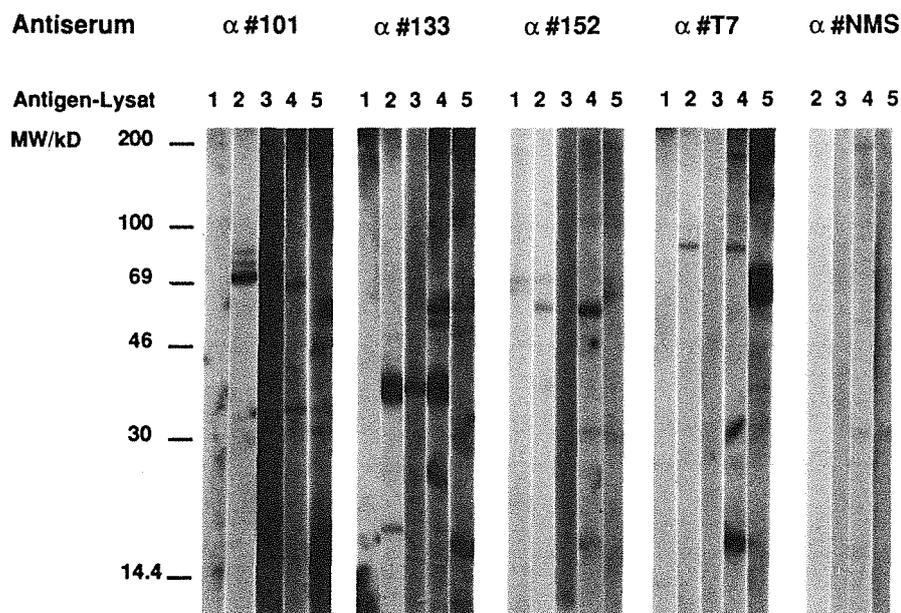


Abb. 33 Immunoblot von Lysaten verschiedener Stadien von *T. parva* mit den cDNA-spezifischen Maus-Antiseren (siehe Abschnitt 3.5.2.2.). Lysate von isolierten Sporozoiten (Spur 2), isolierten erythrozytären Stadien (Spur 3), infizierten Lymphozyten (Spur 4), nicht-infizierten ConA-stimulierten Rinder-Lymphoblasten (Spur 5) und nicht-infizierten Zecken-Speicheldrüsen (Spur 1) wurden durch eindimensionale Proteingel-Elektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Filter transferiert. Filterstreifen wurden mit den verschiedenen 1:200 verdünnten Antiseren inkubiert. Erkannte Antigene wurden nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Ziegen-anti-Maus IgG/IgM-Antiserum autoradiographisch sichtbar gemacht.

Erwartungsgemäß erkannte das Antiserum α pT7 ein Antigen von 84 kD in den infizierten Lymphozyten (Abb. 33, α #T7 Spur 4), das in nicht-infizierten ConA-Lymphoblasten nicht vorhanden war (Spur 5). Ein Antigen desselben Molekulargewichts trat in isolierten Sporozoiten (Spur 2), nicht aber in den als Kontrolle dienenden Speicheldrüsen nicht-infizierter Zecken auf (Spur 1). In dem Lysat von erythrozytären Stadien (Spur 3) wurde kein Antigen erkannt.

Die cDNA-spezifischen Antiseren α p101, α p133 und α p152 erkannten Antigene gleichen Molekulargewichts in infizierten Lymphozyten und in isolierten Sporozoiten. Das Molekulargewicht dieser Antigene (Tabelle 7) entsprach den durch *in vitro* Translation ermittelten Werten (siehe Abschnitt 3.5.1., Tabelle 5). Die Antiseren α p101 und α p133 erkannten zusätzliche Antigene in den Sporozoiten (Tabelle 7), deren Herkunft ungeklärt blieb. In dem Lysat der erythrozytären Stadien reagierte nur das Antiserum α p133 mit einem Antigen. Dieses besaß dasselbe Molekulargewicht wie die in dem Sporozoiten- und Schizontenstadium erkannten Antigen.

Parasitenstadium	(Spur)	cDNA-spezifische Antiseren			
		#T7	#101	#133	#152
Sporozoit	(2)	84 kD	69 kD 78 kD 84 kD	40 kD 18,4 kD	60 kD
Schizont	(4)	84 kD	69 kD	40 kD	60 kD
erythrozytäres Stadium	(3)	-	-	40 kD	-

Tabelle 7 Auflistung der Molekulargewichte der Antigene, die von den vier verschiedenen cDNA-spezifischen Antiseren in den drei Parasiten-Stadien spezifisch erkannt werden. Die Molekulargewichte wurden aus Abb. 33 bestimmt. "Spur" bezieht sich auf die Spuren in Abb. 33.

Da in den erythrozytären Stadien die Expression des hsp90-homologen #T7-Gens auf Protein-Ebene nicht nachgewiesen werden konnte, wurde für dieses Stadium die Expression auf der RNA-Ebene untersucht.

Aus dem nahezu teilungsinaktiven erythrozytären Stadium können nur sehr geringe Mengen an RNA isoliert werden. Aus diesem Grund wurde statt polyadenylierter RNA die Gesamt-RNA des erythrozytären Stadiums in der Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt. Um einen direkten Vergleich mit polyadenylierter RNA aus aufgereinigten Schizonten zu ermöglichen, wurde ca. 20 mal mehr RNA aus dem erythrozytären Stadium auf das RNA-Gel aufgetragen.

Die Hybridisierung mit dem cDNA-Klon #T7 zeigte, daß in den erythrozytären Stadien #T7-spezifische RNA vorhanden war (Abb. 34). Das in Höhe der 18 S Markierung auftretende Hybridisierungssignal ist ein Artefakt aufgrund der unspezifischen Hybridisierung mit der dort liegenden 18 S rRNA von *T. parva*. Das Ergebnis spricht für eine Regulation des #T7-Gens auf der Translationsebene in den erythrozytären Stadien.

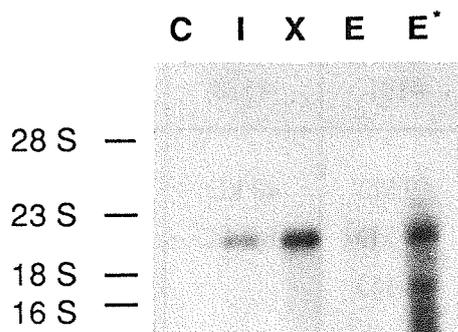


Abb. 34 Nachweis von Transkripten in der RNA des Schizonten- und des erythrozytären Stadiums von *T. parva*, die für den cDNA-Klon #T7 spezifisch sind. In Spur X wurden 0,5 µg aufgereinigte Schizonten-mRNA, in der Spur E 2,6 µg und in der Spur E* 10 µg Gesamt-RNA aus aufgereinigten erythrozytären Stadien elektrophoretisch aufgetrennt. Zu Kontroll-Zwecken wurden 2,5 µg mRNA aus infizierten (Spur I) und

kurierten (Spur C) Lymphozyten eingesetzt. Die RNA wurde nach Transfer auf Nylonmembran-Filter mit der radioaktiv markierten cDNA #T7 hybridisiert.

4. DISKUSSION

4.1. Isolierung, Charakterisierung und Klonierung der Parasiten-mRNA

Durch die in der vorliegenden Arbeit neu entwickelte Methode kann die RNA des Schizonten-Stadiums von *T. parva* innerhalb von 30 Minuten aus den infizierten Lymphozyten isoliert werden. Die Untersuchung der isolierten RNA durch Northern-Blot-Hybridisierung, *in vitro* Translation und R₀t-Analyse zeigte, daß sie:

- intakt vorliegt,
- zu maximal 10% mit RNA von nicht-infizierten Rinder-Lymphozyten kreuzhybridisiert,
- in Mengen isoliert werden kann, die es gestatten, sie als Substrat in *in vitro*-Analysen einsetzen zu können.

Bei den in der isolierten Parasiten-RNA auftretenden Sequenzen, die mit RNA aus nicht-infizierten Lymphozyten kreuzhybridisierten, kann es sich um kontaminierende Transkripte der Wirtszelle handeln. Darunter können aber auch zwischen Parasit und Rinder-Lymphozyt konservierte Sequenzen sein, so daß die tatsächliche Kontamination der isolierten RNA mit RNA der Wirtszelle unter 10% liegt. Dafür spricht, daß sehr häufige zelluläre Transkripte der Wirtszelle wie die ribosomale RNA oder das Aktin-Transkript in der isolierten Parasiten-RNA nicht nachweisbar waren.

Die hier für die RNA-Isolation entwickelte Methode ersetzt nicht das von Nyormoi *et al.* (1981) beschriebene Verfahren zur Isolierung von Schizonten aus von *T. parva* infizierten Lymphozyten. Nach diesem Verfahren ist die Parasiten-Präparation frei von Zellkernen der Lymphozyten und damit zur Gewinnung von Parasiten-Proteinen geeignet. Die Isolierung der Parasiten ist jedoch zu langwierig, um aus ihnen die labile RNA intakt isolieren zu können.

Methoden zur Isolierung von RNA aus anderen intrazellulär lebenden Parasiten beschränken sich auf erythrozytäre Stadien von Plasmodien und Babesien (Jensen und Trager 1977, Cowman *et al.* 1984). Im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen besitzen Erythrozyten keine eigene RNA und sind gegenüber Detergentien viel sensitiver. Die hier entwickelte Methode sollte es ermög-

lichen, die RNA auch solcher Parasiten-Stadien zu isolieren, die in kernhaltigen Wirtszellen auftreten, wie z.B. die Leberstadien von Plasmodien.

Mit Hilfe der R₀t-Analyse wurden ca. 530 verschiedene Transkripte in der isolierten RNA des Parasiten nachgewiesen, wobei Transkripte mit geringer Häufigkeit nicht miterfaßt werden konnten. Aufgrund der ähnlichen R₀t-Kinetiken für die mRNA des Parasiten und des Lymphozyten wurde die Anzahl aller im Schizonten-Stadium transkribierten Gene von *T. parva* auf 4.000 geschätzt. Dies bedeutet, daß etwa 60% des Genoms von *T. parva* mit einer Komplexität von $1,2 \times 10^4$ kb (Allsopp und Allsopp 1988) während des Schizonten-Stadiums transkribiert werden. Die geschätzte Anzahl transkribierter Gene entspricht damit den in anderen "niederen" Eukaryonten gefundenen Werten. So werden in der Hefe 4.000 Gene transkribiert, die insgesamt 40% des Genoms mit einer Komplexität von $1,5 \times 10^4$ kb stellen (Hereford und Rosbash 1977).

Nach *in vitro* Translation der Parasiten-mRNA konnten durch zweidimensionale Gelelektrophorese nur etwa 200 Polypeptide identifiziert werden. Durch die wesentlich geringere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur R₀t-Analyse sind nur die häufigsten Parasiten-Transkripte nachweisbar. Aus demselben Grund stellen die ca. 100 Proteine, die durch Proteingel-Elektrophorese von Lysaten isolierter Parasiten gefunden wurden (Sugimoto *et al.* 1989), nur die häufigsten Parasiten-Proteine dar und geben nicht die tatsächliche Anzahl exprimierter Parasiten-Gene wieder.

Zur Klonierung der Parasiten-mRNA wurde in der cDNA-Genbank von infizierten Lymphozyten nach für *T. parva* spezifischen cDNA-Klonen mit der Parasiten-RNA als Sonde gesucht. Der Parasit trägt zu ca. 10% an der Gesamt-RNA in den infizierten Lymphozyten bei, wie durch heterologe R₀t-Analyse von Parasiten-mRNA mit mRNA der infizierten Lymphozyten ermittelt wurde. Nur 1% der Klone in der cDNA-Genbank besaßen jedoch Inserts, die mit der mRNA des Parasiten hybridisierten. Diese cDNA-Inserts kodierten für Proteine, die zu den häufigsten in eukaryontischen Zellen zählen. So stellt der Translationselongationsfaktor TEF-1 α in der Hefe 5 - 6% des Gesamt-Proteins (Thiele *et al.* 1985) und in verschiedenen Geweben von Säugerzellen 1-11% des zytoplasmatischen Proteins (Slobin 1980). Das Hitzeschockprotein hsp90 liegt auch unter normalen Bedingungen ohne äußere Streßfaktoren in großen

Mengen in der Zelle vor (Yonezawa *et al.* 1988, Pelham 1986). Dasselbe gilt für Aktin als dem zentralen Bestandteil des Zytoskeletts.

Da in der cDNA-Genbank von infizierten Lymphozyten offensichtlich die Transkripte des Parasiten unterrepräsentiert waren, wurde aus der isolierten Parasiten-mRNA eine neue, repräsentative cDNA-Genbank erstellt. Diese gestattet erstmals den direkten Zugang zu den im Schizonten-Stadium exprimierten Parasitengenen in Form funktioneller Einheiten. Sie steht als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Parasitengenen zur Verfügung, die an den phänotypischen Veränderungen der Lymphozyten als Folge der Infektion durch den Parasiten beteiligt sind.

4.2. Wege zur Identifizierung von Parasiten-Genen, die an der Parasit-Wirt-Beziehung beteiligt sind

Die ermittelte Komplexität der Parasiten-mRNA macht die Isolierung derartiger Gene durch Transfektion einer Expressionsgenbank in Säugerzellen mit anschließender Selektion der Transfektanten auf einen transformierten Phänotyp oder auf die Expression von CTL-Epitopen unmöglich. Ein Selektionsverfahren ist erforderlich, um die Anzahl zu untersuchender Gene des Parasiten zu verringern. Ein Weg zur Eingrenzung der exprimierten Parasitengene besteht in der Identifizierung solcher Gene, deren Genprodukte mit Kompartimenten der Wirtszelle in direktem Kontakt stehen. Die Funktion dieser Gene kann dann durch Transfektionsexperimente analysiert werden.

Membranständig translatierte mRNA kodiert für membrandurchspannende und luminale Proteine. Diese können auf der Oberfläche des Parasiten lokalisiert sein oder vom Parasiten in das Zytoplasma der Wirtszelle sezerniert werden und damit mit der Wirtszelle kommunizieren.

Versuche, membranständig translatierte mRNA aus aufgereinigten Parasiten zu isolieren, scheiterten aus technischen Gründen. Obwohl membranständig translatierte RNA von infizierten Lymphozyten angereichert werden konnte, gelang eine substantielle Anreicherung derartiger RNA aus dem Parasiten nicht. Die Ursachen lagen zum einen an den in der Parasiten-Präparation vorhandenen Zellkernen der Lymphozyten, die eine schonende Lyse der Parasiten durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen verhinderten, zum anderen

an der Anzahl von isolierten Parasiten, die zu gering war, um in ausreichender Menge Material zur Präparation von Polysomen zur Verfügung zu haben.

Eine Alternative zur Isolierung membrangebundener RNA aus dem Parasiten stellt die *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse, gekoppelt an die *in vitro* Transkription dar. Sie ist eine schnell durchführbare Methode, um mit cDNA-Klonen als Ausgangsmaterial eine Aussage darüber zu gewinnen, ob es sich bei den von den cDNA-Klonen kodierten Polypeptiden um zytosolische, membrandurchspannende oder luminale Proteine handelt. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß bereits als cDNA kloniert vorliegende Transkripte zunächst durch *in vitro* Transkription amplifiziert und dann einzeln analysiert werden können. Da in den meisten Fällen die Signalsequenz am N-Terminus der Proteine liegt (von Heijne 1985), müssen die cDNA-Inserts die vollständige Protein-kodierende Sequenz enthalten, damit die Polypeptide in der *in vitro* Translokation erkannt werden können. Da nicht zu erwarten ist, daß in einer cDNA-Genbank alle cDNA-Klone die Protein-kodierende Sequenz vollständig besitzen, müssen zahlreiche Klone analysiert werden, um solche zu finden, deren Genprodukte von Mikrosomen prozessiert werden.

Ob membrandurchspannende oder luminale Proteine von *T. parva* durch die *in vitro* Translations-/Translokationsanalyse in der richtigen Weise erkannt werden, kann zur Zeit nicht beantwortet werden, da entsprechende Gene von *T. parva* noch nicht kloniert wurden. Dies ist jedoch aus folgenden Gründen wahrscheinlich:

- sekretorische und Oberflächen-Proteine der verwandten Gattung *Plasmodium* besitzen Signalpeptidsequenzen an ihrem N-Terminus, wie sie für die Translokation von entsprechenden Proteinen bei Säugerzellen als erforderlich nachgewiesen worden sind (Kemp *et al.* 1987);
- bei *in vitro* Translation der Parasiten-mRNA werden für den Parasiten spezifische Transkripte durch Zugabe von isolierten Signalpeptid-Erkennungs-Partikeln (SRP) in ihrer Translation arretiert (Lipp, mündl. Mittl.). SRP-Partikel erkennen Translationskomplexe, an denen membrandurchspannende oder luminale Proteine synthetisiert werden, und arretieren die weitere Translation solange, bis der Translationskomplex an Mikrosomen gebunden ist (Walter und Blobel 1981).

Nicht alle luminalen und membrandurchspannenden Proteine stellen sekretorische oder Oberflächen-Proteine dar und kommen deswegen mit Kompartimenten der Wirtszelle in Kontakt. Proteine, die innerhalb des ER-Lumens und innerhalb von Lysosomen lokalisiert sind, oder bei denen es sich um Membranbestandteile dieser Zellorganellen handelt, werden auf die gleiche Weise membranständig translatiert bzw. im *in vitro* System transloziert. Nach Identifikation von cDNA-Klonen, die für luminale oder membrandurchspannende Proteine kodieren, muß daher das Genprodukt in den infizierten Lymphozyten z.B. durch Immunofluoreszenz lokalisiert werden.

Wie für die cDNA-Klone #101, #133 und #152 gezeigt, können für den Parasiten spezifische cDNA-Inserts als Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, durch Immunisierung mit den isolierten Fusionsproteinen cDNA-spezifische Antisera gewonnen, und diese zur Lokalisierung der cDNA-kodierten Proteine in der Immunofluoreszenz eingesetzt werden. Mit der Immunofluoreszenz ist es möglich, die Zelloberfläche des Lymphozyten, sein Zytoplasma, seinen Zellkern und den Parasiten selbst als mögliche Lokalisation von Parasiten-Proteinen zu unterscheiden. Für eine Differenzierung zwischen Parasiten-Zytoplasma und Parasiten-Oberfläche ist die Methode jedoch nicht sensitiv genug.

Durch Transfektion isolierter cDNA-Klone in Säugerzellen kann anhand der Transfektanten der Nachweis erbracht werden, daß die von den cDNA-Klonen kodierten Proteine an den durch den Parasiten verursachten phänotypischen Veränderungen der Rinder-Lymphozyten beteiligt sind. Die Expression von Sequenzen des Parasiten in Säugerzellen stellt kein prinzipielles Problem dar. Wie für die Transfektante L4-133/G6 gezeigt, wurde das eingeschleuste cDNA-Konstrukt pSG5-#133 in der Säugerzelle als Protein exprimiert. Das cDNA-spezifische Antiserum erkannte das in den Säugerzellen exprimierte Protein ebenso wie das von den Parasiten synthetisierte Protein. Der Befund spricht dafür, daß zumindest manche Epitope auf dem in der Säugerzelle synthetisierten Protein in gleicher Weise vorhanden sind wie auf dem Parasiten-Protein. Ob das in der Säugerzelle synthetisierte Parasiten-Protein auch funktionell aktiv war, läßt sich daraus nicht ableiten. Auch die anhand von sechs Sequenzen ermittelte Kodon-Verwendung bei *T. parva* weicht von der Kodon-Verwendung in Säugerzellen nicht derart ab, daß eine ineffiziente Expression von Parasiten-Sequenzen in Säugerzellen zu erwarten wäre.

Um cDNA-Klone von sekretorischen oder Oberflächen-Proteinen des Parasiten in Transfektionsexperimenten auf ihre Funktion hin zu analysieren, wird es erforderlich sein, die Signalpeptid-kodierende Sequenz gentechnisch zu entfernen. Andernfalls ist zu erwarten, daß das Genprodukt an membran-gebundenen Ribosomen der transfizierten Zelle synthetisiert und damit statt im Zytoplasma der Zelle im Kulturmedium oder auf der Zelloberfläche erscheinen würde.

Maus-L4-Zellen sind zur Zeit die einzigen Zellen, in denen für den Parasiten spezifische cDNA-Klone auf eine Funktion, die Vermittlung von CTL-Epitopen, analysiert werden können. Mauszellen als Testsystem bergen jedoch Probleme in sich. Wie das Ergebnis der Klonierungsversuche von cDNA-spezifische Rinder-CTL zeigte, werden die Mauszellen von xenoreaktiven Rinder-CTL als fremd erkannt. Die Vorinkubation der Rinder-Effektorzellen mit L4-Zellen und die anschließende BUdR- und Licht-Behandlung zur Entfernung der xenoreaktiven Population erwies sich als notwendig. Die Population konnte durch diese Behandlung jedoch nicht vollständig entfernt werden.

Neben dem eingeschleusten Gen für das MHC-Klasse I-Antigen des Rindes exprimieren die L4-Zellen weiterhin die Maus-eigenen MHC-Moleküle (Morrison, mündl. Mittl.). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß beide MHC-Moleküle um prozessierte Antigene kompetieren, mit der möglichen Folge, daß das richtige Antigen mit dem Maus- und damit dem falschen MHC präsentiert und somit von Rinder-CTL nicht erkannt wird.

Goddeeris *et al.* (1990) konnten zeigen, daß Lymphozyten abhängig von dem exprimierten MHC-Klasse I-Antigen trotz Infektion mit demselben Parasiten-Stamm verschiedene CTL-Epitope präsentierten. Es ist nicht bekannt, ob die verschiedenen Epitope auf demselben oder auf unterschiedlichen Antigenen lokalisiert sind. Trifft letzteres zu, müßten cDNA-Klone des Parasiten in Zellen mit unterschiedlichen Rinder-MHC-Klasse I-Antigenen transfiziert werden, um sie auf die Anwesenheit von CTL-Epitopen zu analysieren. Bei Verwendung der Mausfibroblasten müßte daher eine ganze Serie von Klonen hergestellt werden, die die verschiedenen Rinder-MHC-Antigene exprimieren.

Um zukünftig Funktionen von cDNA-Klonen des Parasiten testen zu können, sollte der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen auf der Suche nach einer

effizienten Transfektionsmethode für Rinder-Lymphozyten liegen. Dadurch werden die mit Mauszellen auftretenden Schwierigkeiten vermieden. Zudem könnten beide Funktionen, die Transformation und die Induktion von CTL-Epitopen, in den Transfektanten untersucht werden.

4.3. Identifizierte Transkripte von *T. parva* im Vergleich zu homologen Sequenzen anderer Parasiten

Im Rahmen der Charakterisierung der isolierten Parasiten-RNA wurden die ribosomalen Haupttranskripte von *T. parva* identifiziert. Die RNA der großen ribosomalen Untereinheit besaß mit 3,3 kb ein deutlich kleineres Molekulargewicht als die entsprechende 28 S Untereinheit in Säugerzellen mit 4,7 kb. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei anderen Protozoen und der Hefe vor. So beträgt das Molekulargewicht der rRNA der großen ribosomalen Untereinheit 4 kb bei *T. cruzi* (Castro *et al.* 1981) und *T. brucei* (Hasan *et al.* 1982), 4,1 kb bei *P. berghei* (Dame *et al.* 1983), 2,9 kb bei *Giardia lamblia* und bei *Trichomonas vaginalis* (Boothroyd *et al.* 1987) und 3,4 kb bei *S. cerevisiae* (Georgiev *et al.* 1981).

Einer der vier charakterisierten cDNA-Klone, der cDNA-Klon #T7, wies Sequenzhomologien von über 60% zu dem Hitzeschockprotein hsp90 von Hefe, *Drosophila* und Mensch und zu einem bei *T. cruzi* gefundenen 85 kD-Antigen auf. Die Aminosäuresequenz enthielt Bereiche von bis zu 30 Aminosäuren Länge, die zu mehr als 90% zwischen allen fünf Sequenzen konserviert waren. Auf der anderen Seite fielen Regionen von 20 bis 60 Aminosäuren mit einer Homologie von weniger als 40% auf, in denen jedoch der Anteil positiv und negativ geladener Aminosäuren nahezu identisch war. Bei Vergleich der Sequenzen des hsp83-Gens verschiedener *Drosophila*-Arten mit der Sequenz des hsp90-Gens der Hefe vermuteten bereits Blackman und Meselson (1986) eine Funktion für die in ihrer Ladung, nicht aber in ihrer Sequenz konservierten Regionen. Für diese Region ist die Funktion bis jetzt ebenso unbekannt wie für die in ihrer Sequenz hoch konservierten Abschnitte.

Auch die physiologische Funktion des Gesamtproteins konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Ursprünglich wurde das hsp90 als eines der Proteine beschrieben, deren Expression durch Erhöhung der Temperatur (daher der Name) oder Einwirkung anderer Streßfaktoren in Zellen induziert wird

(Lindquist 1986). Das Hitzeschockprotein hsp90, oder ein ihm sehr ähnliches Protein, tritt jedoch auch unter normalen Kulturbedingungen als ein häufiger Bestandteil des Zytoplasmas auf (Yonezawa *et al.* 1988, Pelham 1986).

Die Mehrheit der hsp90-Moleküle liegt ungebunden in der Zelle vor. Ein Teil dieses Proteins wurde in Assoziation mit verschiedenen anderen Zellproteinen gefunden, u.a. dem Glukokortikoid-Rezeptor in L-Zellen (Catelli *et al.* 1985, Sanchez *et al.* 1985) und dem Virus-kodierten Protein pp60^{v-src} in mit Rous Sarcoma Virus infizierten Zellen (Schuh *et al.* 1985). In Maus-Lymphoma-Zellen wurde das hsp90 als Aktin-bindendes Protein beschrieben (Koyasu *et al.* 1986). Aufgrund dieser Daten wird für das hsp90 eine Transportfunktion in der Zelle angenommen.

In parasitischen Protozoen wird dem Hitzeschockprotein eine doppelte Bedeutung zugeschrieben: bei der Differenzierung des Parasiten und als Antigen in der Parasit-Wirt-Beziehung (Newport *et al.* 1988).

Verschiedene Parasiten synthetisieren Hitzeschockproteine, wenn sie - als freilebende Stadien oder als Stadien in Arthropoden-Vektoren - von der poikilothermen Umgebung in die 10⁰ C wärmere homeotherme Umgebung des Säugerwirtes gelangen. Dieser Übergang ist fast immer mit der Differenzierung des Parasiten in ein neues Stadium in seinem Lebenszyklus verbunden.

Die Expression des cDNA-Klons #T7 war mit Hilfe des Antiserums α fpT7 in Schizonten und in Sporozoiten von *T. parva* nachzuweisen. Da sich die Sporozoiten in den infizierten Zecken erst während der Blutaufnahme bilden, hat der Parasit im Sporozoiten-Stadium bereits den Übergang zu einer höheren Temperatur durchlaufen. Es überrascht daher nicht, daß in den Sporozoiten das hsp90-homologe #T7-Gen exprimiert wurde. Ein quantitativer Vergleich der Expression dieses Gens in den beiden Parasiten-Stadien war nicht möglich, da weder der Anteil kontaminierender Zeckendrüsen-Proteine in der Sporozoiten-Präparation noch der Anteil der Schizonten-Proteinen am Gesamt-Protein infizierter Lymphozyten bestimmt werden konnte.

In dem erythrozytären Stadium war das für den cDNA-Klon #T7 spezifische Antigen nicht nachweisbar. In der Gesamt-RNA des erythrozytären Stadiums konnte jedoch das korrespondierende Transkript nachgewiesen werden. Die-

ser Befund läßt vermuten, daß im erythrozytären Stadium die Expression des hsp90-homologen Gens auf Translationsebene reguliert wird.

Die zweite Bedeutung der Hitzeschockproteine bei Parasiten liegt in ihrem antigenen Charakter. Das am besten untersuchte Hitzeschockprotein ist hier das hsp70. Bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum* und Schistosomen werden Antikörper gebildet, die für das vom Parasiten kodierte hsp70 spezifisch sind und mit körpereigenen Proteinen nicht kreuzreagieren (Newport *et al.* 1988). Genau entgegengesetzt ist die Situation bei *Mycobacterium*-Infektionen. Gegen Hitzeschockproteine von Mycobakterien werden Antikörper gebildet, die mit wirtseigenen Proteinen kreuzreagieren und als Teil der Autoimmunantwort für die pathologischen Erscheinungen verantwortlich gemacht werden (van Eden *et al.* 1988, Mehlert und Young 1989).

In den Seren von mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Personen werden Antikörper gefunden, die gegen ein zytoplasmatisches 85 kD-Antigen des Parasiten gerichtet sind. Aufgrund der Homologie dieses Antigens mit dem Hitzeschockprotein hsp90 wird vermutet, daß das 85 kD-Antigen an der Autoimmunantwort in den infizierten Personen beteiligt ist (Dragon *et al.* 1987).

Seren von Rindern, die gegen *T. parva* immun waren, besaßen keine Antikörper, die das von dem cDNA-Klon #T7 kodierte Parasiten-Protein - als Fusionsprotein exprimiert - im Immunoblot erkannten. Ob die zytoplasmatische Lokalisation dieses Proteins innerhalb des Parasiten für das Fehlen von Antikörpern im immunen Rind verantwortlich ist, läßt sich nicht beantworten. Das hsp70 von *P. falciparum* wird ebenso wie das 85 kD-Antigen von *T. cruzi* von Antikörpern infizierter Personen erkannt, obwohl diese Proteine im Zytoplasma der intrazellulären Parasiten lokalisiert sind (Peterson *et al.* 1988, Dragon *et al.* 1987).

Als protektives Antigen wurden mit hsp90 verwandte Proteine in Maus-Tumorzellen, die durch chemische Karzinogene induziert worden waren, identifiziert. Das aus den Tumorzellen isolierte hsp90 schützte nach Immunisierung Mäuse gegen die autologen Tumorzellen. Diese Immunität basierte auf T-Zellen (Ullrich *et al.* 1986).

Dieser Befund ließ das von dem cDNA-Klon #T7 kodierte Protein als einen interessanten Kandidaten für die gegen infizierte Lymphozyten gerichtete

CTL-Antwort in immunen Rindern erscheinen. Im CTL-Assay wurden die den cDNA-Klon #T7 exprimierenden L4-Transfektanten von diesen CTL jedoch nicht erkannt. Die Klonierung #T7-spezifischer CTL gelang ebenfalls nicht. Diese Ergebnisse sprechen gegen die Beteiligung des zum hsp90 homologen Parasiten-Proteins bei der CTL-Antwort im immunen Rind. Wie in Abschnitt 4.2. diskutiert, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die L4-Zellen als Zielzellen nicht geeignet sind, das Parasiten-Protein in der erforderlichen Weise den Rinder-CTL zu präsentieren.

Weitere cDNA-Klone müssen untersucht werden, um diejenigen Gene des Parasiten zu identifizieren, die an der Transformation und an der Expression der CTL-Epitope in den infizierten Lymphozyten beteiligt sind. Dabei erscheint es sinnvoll, die von den cDNA-Klonen kodierten Polypeptide zunächst in der *in vitro* Transkriptions-/Translations-/Translokationsanalyse daraufhin zu untersuchen, ob sie für luminale, membrandurchspannende oder zytosolische Proteine kodieren. Solche Polypeptide, die von Mikrosomen prozessiert werden, müssen mit Hilfe hergestellter Antiseren in den infizierten Lymphozyten lokalisiert werden. Durch Transfektion und Expression derjenigen cDNA-Klone, deren Genprodukte auch außerhalb des Parasiten gefunden werden, kann schließlich untersucht werden, ob sie an den vom Parasiten verursachten Veränderungen in den infizierten Lymphozyten beteiligt sind. Aufgrund der dargestellten Problematik mit den L4-Maus-Fibroblasten muß für den letzten Schritt eine effiziente Transfektionsmethode für Rinder-Lymphozyten zur Verfügung stehen.

Aufgrund der Komplexität der Parasiten-mRNA erscheint der hier beschriebene Weg zur Zeit der einzig gangbare, um zumindest die für die CTL-Epitope kodierenden Sequenzen des Parasiten zu identifizieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß der Parasit über andere, nicht an die Translation gekoppelte Mechanismen verfügt, Proteine in das Zytoplasma seiner Wirtszelle einzuschleusen. Wenn dies zutrifft, müssen sämtliche cDNA-Klone des Parasiten einzeln transfiziert und die klonierten Transfektanten im CTL-Assay untersucht werden, eine Aufgabe, die mit den heute verfügbaren Techniken nicht zu lösen ist.

5. LITERATUR

- Allsopp, B.A., and Allsopp, M.T.E.P. (1988) *Theileria parva*: Genomic studies reveal intra-specific sequence diversity.
Mol. Biochem. Parasitol. 28, 77-84
- Baldwin, C.L., Black, S.J., Brown, W.C., Conrad, P.A., Goddeeris, B.M., Kinuthia, S.W., Lalor, P.A., MacHugh, N.D., Morrison, W.I., Morzaria, S.P., Naessens, J., and Newsoms, J. (1988) Bovine T cells, B cells, and Null cells are transformed by the protozoan parasite *Theileria parva*.
Infect. Immun. 56, 462-467
- Bishop, J.O., Morton, J.C., Rosbash, M., and Richardson, M. (1974) Three abundant classes in HeLa cell mRNA.
Nature 250, 199-203
- Blackman, R.K., and Meselson, M. (1986) Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila* hsp82 gene.
J. Mol. Biol. 188, 499-515
- Boothroyd, J.C., Wang, A., Campbell, D.A., and Wang, C.C. (1987) An unusual compact ribosomal DNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*.
Nucleic Acids Res. 15, 4065-4084
- Brands, M.H.G.M., Maassen, J.A., Van Hemert, F.J., Amons, R., and Möller, W. (1986) The primary structure of the α subunit of human elongation factor 1, structural aspects of guanine-nucleotide-binding sites.
Eur. J. Biochem. 155, 167-171
- 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., and Gray, M.A. (1981) Infection of bovine fibroblastic cell lines with *Theileria parva* and *Theileria annulata*.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 323-324

- Brown, W.C., and Logan, K.S. (1986) Bovine T-cell clones infected with *Theileria parva* produce a factor with IL 2-like activity. *Parasite Immunol.* **8**, 189-192
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M.-T., and Dobberstein, B. (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Meth. Enzymol.* **155**, 416-433
- Cann, A.J., Koyanagi, Y., and Chen, I.S.Y. (1988) High efficiency transfection of primary human lymphocytes and studies of gene expression. *Oncogene* **3**, 123-128
- Carrington, D.M., Auffert, A.D., and Hanke, D.E. (1985) Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. *Nature* **313**, 64-67
- Castro, C., Hernandez, R., and Castaneda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: Internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biolchem. Parasitol.* **2**, 219-233
- Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.-E., Feramisco, J.R., and Welch, W.J. (1985) The common 90-kD protein component of non-transformed "8S" steroid receptors is a heat shock protein. *EMBO J.* **4**, 3131-3135
- Chang, A.C.Y., and Brenner, D.G. (1988) Cationic liposome mediated transfection: a new method for the introduction of DNA into mammalian cells. *Focus* **10**, 66-69
- Contreras, R., Cheroutre, H., Degrave, W., and Fiers, W. (1982) Simple, efficient *in vitro* synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes. *Nucl. Acid Res.* **10**, 6353-6362

- Coquerelle, T.M., Eichhorn, M., Magnunson, 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 bovine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. **9**, 655-659
- Cowman, A.F., Timms, P., and Kemp, D.J. (1984) DNA polymorphisms and subpopulations in *Babesia bovis*.
Mol. Biochem. Parasitol. **11**, 91-103
- Creemers, P. (1982) Lack of reactivity of sera from *Theileria parva*-infected and recovered cattle against membrane antigens of *Theileria parva* transformed cell lines.
Vet. Immunol. Immunopathol. **3**, 427-438
- Creemers, P. (1983) Protein antigens of *Theileria parva* macroschizonts and immune precipitation studies.
J. Parasitol. **69**, 54-59
- Dame, J.B., and McCutchan, T.F. (1983) Cloning and characterization of a ribosomal RNA gene from *Plasmodium berghei*.
Mol. Biochem. Parasitol. **8**, 263-279
- De Martini, J.C., and Moulton, J.E. (1973) Responses of the bovine lymphatic system to infection by *Theileria parva*. I. Histology and ultrastructure of lymph nodes in experimentally-infected calves.
J. Comp. Path. **83**, 281-298
- 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. USA **85**, 4730-4734
- Dragon, E.A., Sias, S.R., Kato, E.A., and Gabe, J.D. (1987) The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein.
Mol. Cell. Biol. **7**, 1271-1275

- Ehrfeld, A.Y.B. (1989) Isolierung und Charakterisierung des Aktin Gens des intrazellulären Parasiten *Theileria parva*. Doktorarbeit, Universität Karlsruhe, KfK-Bericht Nr. 4699
- Emery, D.L. (1981) Adoptive transfer of immunity to infection with *Theileria parva* (East Coast fever) between cattle twins.
Res. Vet. Sci. 30, 364-367
- Emery, D.L., Eugui, E.M., Nelson, R.T., and Tenywa, T. (1981a) Cell-mediated responses to *Theileria parva* (East Coast fever) during immunization and lethal infections in cattle.
Immunology 43, 323-336
- Emery, D.L., Tenywa, T., and Jack, R.M. (1981b) Characterization of the effector cell that mediates cytotoxicity against *Theileria parva* (East Coast fever) in immune cattle.
Infect. Immun. 32, 1301-1304
- Emery, D.L., Morrison, W.I., Nelson, R.T., and Murray, M. (1981c) The induction of cell-mediated immunity in cattle inoculated with cell lines parasitized with *Theileria parva*. In: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., and Young, A.S. (eds.) Advances in the Control of Theileriosis. Den Haag 1981, S. 295-310
- Eugui, E.M., and Emery, D.L. (1981) Genetically restricted cell-mediated cytotoxicity in cattle immune to *Theileria parva*.
Nature 290, 251-254
- Farrelly, F.W., and Finkelstein, D.B. (1984) Complete sequence of the heat shock-inducible HSP90 gene of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. 259, 5745-5751
- Focus (1989) Cell lines transfected with Lipofectin reagent.
Focus 11, 13
- Galau, G.A., Britten, R.J., and Davidson, E.H. (1974) Measurement of the sequence complexity of polysomal messenger RNA in sea urchin embryos.
Cell 4, 217-238

- Garoff, H., Simons, K., and Dobberstein, B. (1978) Assembly of the Semiliki Forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmatic reticulum *in vitro*.
J. Mol. Biol. **124**, 587-600
- Georgiev, O.I., Nikolaev, N., Hadjiolov, A.A., Skryabin, K.G., Zakhareyev, V.M., and Bayev, A.A. (1981) The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleic Acids Res. **9**, 6953-6958
- 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, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Doktorarbeit, Cambridge Universität, England
- Goddeeris, B.M., Morrison, W.I., Teale, A.J., Bensaid, A., and Baldwin, C.L. (1986) Bovine cytotoxic T-cell clones specific for cells infected with the protozoan parasite *Theileria parva*: parasite strain specificity and class I major histocompatibility complex restriction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 5238-5242
- Goddeeris, B.M., Morrison, W.I., Toyne, P.G., and Bishop, R. (1990) Strain specificity of bovine *Theileria parva*-specific cytotoxic T cells is determined by the phenotype of the restricting class I MHC.
Immunology **69**, 38-44
- Goddeeris, B.M., and Morrison, W.I. (1988) Techniques for the generation, cloning, and characterization of bovine cytotoxic T cells specific for the protozoan *Theileria parva*.
J. Tissue Cult. Meth. **11**, 101-110
- Gonder, R. (1910) The life cycle of *Theileria parva*: The cause of East Coast fever in cattle in South Africa.
J. Comp. Pathol. Therap. **23**, 328-335

- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology 52, 456-467
- Green, S., Issemann, I., and Sheer, E. (1988) A versatile *in vivo* and *in vitro* eukaryotic expression vector for protein engineering.
Nucl. Acid Res. 16, 369
- Gubler, U., and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries.
Gene 25, 263-269
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. 166, 557-580
- Hasan, G., Turner, M.J., and Cordingley, J.S. (1982) Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*. Cloning of a RNA gene containing a mobile element.
Nucleic Acids Res. 10, 6747-6761
- Hereford, L.M., and Rosbash, M. (1977) Number and distribution of polyadenylated sequences in yeast.
Cell 10, 453-462
- Hudson, A.T., Randall, A.W., Fry, M., Ginger, C.D., Hill, B., Latter, V.S., McHardy, N., and Williams, R.B. (1985) Novel antimalarial naphthoquinones with potent broad spectrum antiprotozoal activity.
Parasitology 90, 45-55
- Hulliger, L., Wilde, J.K.H., Brown, C.G.D., and Turner, L. (1964) Mode of multiplication of *Theileria* in cultures of bovine lymphocytic cells.
Nature 203, 728-730
- Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In: Glover, D.M. (ed.) DNA Cloning, A Practical Approach. IRL Press, Oxford 1985, S. 49-78

- Irvin, A.D., Brown, C.G.D., Kanhai, G.K., Stagg, D.A., and Rowe, L.W. (1974) Cell fusion, using Sendai virus, to effect inter-species transfer of a cell-associated parasite (*Theileria parva*).
Int. J. Parasitol. 4, 519-521
- 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.
Vet. Parasitol. 3, 141-160
- Irvin, A.D., Brown, C.G.D., Stagg, D.A., Kanhai, G.K., and Rowe, L.W. (1975) Hybrid cells with *Theileria parva*, formed by fusion of hamster and mouse cells with parasitised bovine lymphoid cells.
Res. Vet. Sci. 19, 142-151
- Irvin, A.D., Stagg, D.A., and Kanhai, G.K. (1976) Attempts to produce *Theileria parva*-infected mouse cells using cell fusion techniques.
Res. Vet. Sci. 21, 197-204
- Ivanov, V., Stein, B., Baumann, I., Dobbelaere, D.A.E., Herrlich, P., and Williams, R.O. (1989) Infection with the intracellular protozoan parasite *Theileria parva* induces constitutively high levels of NF- κ B in bovine T lymphocytes.
Mol. Cell. Biol. 9, 4677-4686
- Jensen, J.B., and Trager, W. (1977) *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle-jar method.
J. Parasitol. 63, 883-886
- Johnstone, A., and Thorpe, R. (1982) Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford 1982
- Kemp, D.J., Coppel, R.L., and Anders, R.F. (1987) Repetitive proteins and genes of malaria.
Ann. Rev. Microbiol. 41, 181-208
- Klinkert, M.-Q., Ruppel, A., Felleisen, R., Link, G., and Beck, E. (1988) Expression of diagnostic 31/31 kilodalton proteins of *Schistosoma mansoni* as fusions with bacteriophage MS2 polymerase.
Mol. Biochem. Parasitol. 27, 233-240

- Koch, R. (1898) Reiseberichte über Rinderpest, Bubonenpest in Indien, and Afrika. Tsetse, and Surrah-Krankheit, Texasfieber, unsw.
J. Springer, Berlin
- Koyazu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., and Yahara, I. (1986) Two mammalian heat shock proteins, hsp90 and hsp100, are actin-binding proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8054-8058
- Kraft, R., Tardiff, J., Krauter, K.S., and Leinwand, L.A. (1988) Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with Sequenase.
BioTechniques **6**, 544-547
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685
- Lalor, P.A. (1983) Monoclonal antibodies to bovine leucocyte membrane antigens define heterogeneity in target cells for *Theileria parva* parasitosis. Doktorarbeit, Brunel Universität, England
- Lindquist, S. (1986) The heat-shock response
Ann. Rev. Biochem. **55**, 1151-1191
- Linz, J.E., Lira, L.M., and Sypherd, P.S. (1986) The primary structure and the functional domains of an elongation factor-1 α from *Mucor racemosus*.
J. Biol. Chem. **261**, 15022-15029
- Lipp, J., and Dobberstein, B. (1986) The membrane-spanning segment of invariant chain (I γ) contains a potentially cleavable signal sequence.
Cell **46**, 1103-1112
- Malmquist, W.A., Nyindo, M.B.A., and Brown, C.G.D. (1970) East Coast fever: cultivation *in vitro* of bovine spleen cell lines infected and transformed by *Theileria parva*.
Trop. Anim. Hlth. Prod. **2**, 139-145

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (eds.) (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982
- Maruyama, T., Gojobori, T., Aota, S., and Ikemura, T. (1986) Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucl. Acid Res.* 14 (Suppl.), r151-r197
- McHardy, N. (1984) Recent advances in the chemotherapy of theileriosis. *Prev. Vet. Med.* 2, 179-192
- Mechler, B., and Rabbits, T.H. (1981) Membrane-bound ribosomes of myeloma cells IV. mRNA complexity of free and membrane-bound polysomes. *J. Cell Biol.* 88, 29-36
- Mehlert, A., and Young, D.B. (1989) Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71 kD antigen, a member of the 70 kD heat-shock protein family. *Mol. Microbiol.* 3, 125-130
- Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Teals, A.J., Grocock, C.M., Kemp, 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, 563-578
- Morrison, W.I., Lalor, P.A., Goddeeris, B.M., and Teale, A.J. (1986) Theileriosis: antigens and host-parasite interactions. In: Pearson, T.W. (ed.) *Parasite Antigens. Towards New Strategies for Vaccines*. Marcel Dekker, Inc., New York, and Basel 1986, S. 167-213
- Muhammed, S.I., Lauermann, L.H., and Johnson, L.W. (1975) Effect of humoral antibodies on the course of *Theileria parva* infection (East Coast fever) in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 36, 399-402

- Naessens, J., Newson, J., Bensaid, A., Teale, A.J., Magondu, J.G., and Black, S.J. (1985) *De novo* expression of T cell markers on *Theileria parva*-transformed lymphoblasts in cattle. *J. Immunol.* **135**, 4183-4188
- Nagata, S., Nagashima, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujimura, K., Miyazaki, M., and Kaziro, Y. (1984) Polypeptide chain elongation factor 1 α (EF-1 α) from yeast: Nucleotide sequence of one of two genes for EF-1 α from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **3**, 1825-1830
- Neitz, W.O. (1957) Theileriosis, gonderiosis and cytauxzoonoses: a review. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **27**, 275-430
- Nelson, R.T., and Hirumi, H. (1981) *In vitro* cloning of *Theileria*-infected bovine lymphoblastoid cells: standardization and characterization. In: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., and Young, A.S. (eds.) *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 14: Advances in the Control of Theileriosis*. Den Haag 1981, S. 120-121
- Newport, G., Culpepper, J., and Agabian, N. (1988) Parasite heat-shock proteins. *Parasitol. Today* **4**, 306-312
- Norlander, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101-106
- Nyormoi, O. Bwaayo, J.J., and Hirumi, H. (1981) *Theileria parva*: isolation of macroschizonts from *in vitro* propagated lymphoblastoid cells of cattle. *Exp. Parasitol.* **52**, 303-311
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., and O'Farrell, P.H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1142
- Pearson, T.W., Lundin, L.B., Dolan, T.T., and Stagg, D.A. (1979) Cell-mediated immunity to *Theileria*-transformed cell lines. *Nature* **281**, 678-680

- Pelham, H.R.B. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins.
Cell, **40**, 959-961
- Peterson, M.G., Crewther, P.E., Thompson, J.K., Corcoran, L.M., Coppel, R.L., Brown, G.V., Anders, R.F., and Kemp, D.J. (1988) A second antigenic heat shock protein of *Plasmodium falciparum*.
DNA **7**, 71-78
- Pinder, M., and Hewett, R.S. (1980) Monoclonal antibodies detect antigenic diversity in *Theileria parva* parasites.
J. Immunol. **124**, 1000-1001
- Pinder, M., Withey, K.S., and Roelants, G.E. (1981) *Theileria parva* parasites transform a subpopulation of T lymphocytes.
J. Immunol. **40**, 359-365
- Potter, H., Weir, L., and Leder, P. (1984) Enhancer-dependent expression of human κ immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7161-7165
- Radley, D.E., Young, A.S., Brown, C.G.D., Burridge, M.J., Cunningham, M.P., Musisi, F.L., and Purnell, R.E. (1975) East Coast fever: 2. Crossimmunity trials with a Kenya strain of *Theileria lawrencei*.
Vet. Parasitol. **1**, 51-60
- Rebbe, N.F., Ware, J., Bertina, R.M., Modrich, P., and Stafford, D.W. (1987) Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDA heat-shock protein family.
Gene **53**, 235-245
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989

- Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J., and Pratt, W.B. (1985) The 90 kD non-steroid-binding phosphoprotein that binds to the untransformed glucocorticoid receptor in molybdate-stabilized L-cell cytosol is the murine 90 kD heat shock protein.
J. Biol. Chem. **260**, 12398-12401
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 314-319
- Schirmaier, F., and Philippsen, P. (1984) Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 α of *S. cerevisiae*.
EMBO J. **3**, 3311-3315
- Schuh, S., Yonemoto, W., Brugge, J., Bauer, V.J., Riehl, R.M., Sullivan, W.P., and Toft, D.O. (1985) A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming pp60^{v-src}.
J. Biol. Chem. **260**, 14292-14296
- Sekaly, R.P., Jacobson, S., Richert, J.R., Tonnelie, C., McFarland, H.F., and Long, E.O. (1988) Antigen presentation to HLA class II-restricted measles virus-specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 1209-1212
- 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
- Slobin, L.I. (1980) The role of eukaryotic elongation factor Tu in protein synthesis.
Eur. J. Biochem. **110**, 555-563
- Southern, P.J., and Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene, under control of the SV40 early region promoter.
J. Mol. Appl. Genet. **1**, 327-341

- Strebel, K., Beck, E., Strohmeier, K., and Schaller, H. (1986) Characterisation of foot and mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesised fusion proteins.
J. Virol. 57, 983-991
- Sugimoto, C., Mutharia, L.M., Conrad, P.A., Dolan, T.T., Brown, W.C., Goddeeris, B.M., and Pearson, T.W. (1989) Protein changes in bovine lymphoblastoid cells induced by infection with the intracellular parasite *Theileria parva*.
Mol. Biolchem. Parasitol. 37, 159-170
- Thiele, D., Cottrelle, P., Iborra, F., Buhler, J.-M., Sentenac, H., and Fromageot, P. (1985) Elongation factor 1 α from *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. 260, 3084-3089
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354
- Townsend, A., and Bodmer, H. (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes.
Ann. Rev. Immunol. 7, 601-624
- Ullrich, S.J., Robinson, E.A., Law, L.W., Willingham, M., and Appella, E. (1986) A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3121-3125
- van der Ploeg, L.H.T., Giannini, S.H., and Cantor, C.R. (1985) Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa.
Science 228, 1443-1446
- van Eden, W., Thole, J.E.R., van der Zee, R., Noordzij, A., van Embden, J.D.A., Hensen, E.J., and Cohen, I.R. (1988) Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis.
Nature 331, 171-173

- van Hemert, F.J., Amons, R., Pluijms, W.J.M., Van Ormondt, H., and Möller, W. (1984) The primary structure of elongation factor EF-1 α from the brine shrimp *Artemia*.
EMBO J. 3, 1109-1113
- von Heijne, G. (1985) Structural and thermodynamic aspects of the transfer of proteins into and across membranes. In: Bronner, F. (ed.) Current Topics in Membranes and Transport. 24 Academic Press 1985, S. 151-179
- Walter, P., and Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmatic reticulum III. Signal recognition particle (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes.
J. Cell Biol. 91, 557-561
- Yonezawa, N., Nishida, E., Sakai, H., Koyasu, S., Matsuzaki, F., Iida, K., and Yahara, I. (1988) Purification and characterization of the 90-kDa heat-shock protein from mammalian tissue.
Eur. J. Biochem. 177, 1-7
- Young, B.D., and Anderson, M.L.M. (1985) Quantitative analysis of solution hybridization. In: Hames, B.D., and Higgins, S.J. (eds.) Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach. IRL Press Oxford 1985, S. 47-71
- Zoschke, D.C., and Bach, F.H. (1971) *In vitro* elimination of specific immunoreactive cells with 5-bromodeoxyuridine.
J. Immunol. Meth. 1, 55-65