

**Alternative Strategien für die Bekämpfung von *Eimeria*-
Infektionen: spezifische rekombinante Antikörperfragmente
sowie Beeinflussung der Kalzium-vermittelten Signaltransduktion**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl.-Biochem. Ulrike Schubert
geb. am 30. Januar 1978 in Meißen

Gutachter:

1. PD Dr. Udo Conrad
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Prof. Dr. Arwid Daugschies

Halle (Saale), den 23.05.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008413

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008413>]

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------------------|--|
| A | Adenin; Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| AG | anti-MZP-scFv |
| AH | anti-Etmic2-scFv |
| Amp ^r | Ampizillinresistenz |
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenylborat |
| AP | alkalische Phosphatase |
| BAPTA | Bis(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| BAPTA-AM | Azetoxymethylester von BAPTA |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BODIPY- | 4,4-Difluoro-4-bor-3a,4a-diaza-s-indazen-3-propionsäure-glyzyl- |
| BSA | Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin) |
| C | Cytosin |
| Ca ²⁺ | Kalzium |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CAT | Zellanheftungstest („cell adherence test“) |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CDRs | “complementarity determining regions” |
| C _L bzw. C _H | konstante Region der leichten bzw. der schweren Kette eines Immunglobulins |
| <i>c-myc</i> -Tag | Proteinmarkerstruktur bestehend aus der Aminosäurefolge EQKLISEEDL |
| CFDA, SE | Karboxyfluoreszeindiazetat, Succinimidylester |
| Da / kDa | Dalton / Kilodalton |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | “Dulbecco’s modified Eagle medium” |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleotide |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDC | N-Ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl)-karbodiimid Hydrochlorid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraessigsäure |
| ELISA | Enzymimmuntest („enzyme-linked immunosorbent assay“) |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| Etmic2 | ein Mikronemenprotein von <i>E.tenella</i> -Sporozoiten und -Merozoiten |
| evtl. | eventuell |
| FITC | Fluoreszeinisothiozyanat |
| G | Guanin |
| HBSS | “Hanks' balanced salt solution” |

| | |
|------------------------------------|--|
| His | Histidin |
| His-Tag | Proteinmarkerstruktur bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen |
| Ig | Immunglobulin |
| IMAC | immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie |
| IFAT | indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| M | Molarität in mol/l |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| MZP | ein Oberflächenantigen von <i>E. tenella</i> -Merozoiten |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 4-Nitrotetrazoliumblau |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | „phosphate buffered saline“ |
| pBSK | pBluescript [®] SK+ |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| POD | Peroxidase |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Umschreiben von RNA in cDNA durch PCR mit reverser Transkriptase |
| scFv | „single-chain Fv“, monomeres Antikörperfragment bestehend aus den mit einem Linkerpeptid verbundenen variablen Teilen der schweren bzw. leichten Antikörperkette |
| SDS | Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“) |
| SPR | Oberflächenplasmonresonanz |
| T | Thymidin |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-Puffer |
| TBS | „Tris buffered saline“ |
| TMB | 5,5'-Tetramethylbenzidin |
| U | Enzymaktivität in Unit (1 U entspricht 1 μmol Substratumsatz pro min) |
| u.a. | und andere, unter anderem |
| vgl. | vergleiche |
| V _L bzw. V _H | variable Region der leichten bzw. der schweren Kette eines Immunglobulins |
| x g | relative Zentrifugalbeschleunigung |
| z.B. | zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Kokzidiose | 1 |
| 1.1.1 | Charakteristik, phylogenetische Einordnung und wirtschaftliche Bedeutung | 1 |
| 1.1.2 | Kokzidiose beim Haushuhn – relevante <i>Eimeria</i> -Arten | 3 |
| 1.1.3 | Lebenszyklus von Eimerien | 3 |
| 1.1.4 | Wichtige Proteine und Strukturen von <i>Eimeria</i> -Sporozoit | 5 |
| 1.1.5 | Bestehende Methoden zur Bekämpfung von Kokzidiose beim Haushuhn | 7 |
| 1.1.6 | Neue Strategien zur Bekämpfung von <i>Eimeria</i> -Infektionen – Ansätze und Herausforderungen | 8 |
| 1.2 | Rekombinante Antikörper | 10 |
| 1.2.1 | Struktur und Funktion von Antikörpern | 10 |
| 1.2.2 | Rekombinante Antikörperfragmente | 12 |
| 1.2.3 | Antikörperfragment-Banken | 14 |
| 1.2.4 | Verwendung von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten | 18 |
| 1.3 | Kalzium als Botenstoff in eukaryotischen Zellen | 19 |
| 1.3.1 | Kurzer Überblick | 19 |
| 1.3.2 | Wirkstoffe, die Kalzium-Signalvorgänge beeinflussen | 20 |
| 1.3.3 | Bedeutung von Kalzium für die Wirtszellinvasion durch Zoiten der Apikomplexa | 22 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 25 |
| 2 | Material | 27 |
| 2.1 | Geräte | 27 |
| 2.2 | Speziallabormaterial | 28 |
| 2.3 | Chemikalien, Reagenzien | 28 |
| 2.4 | Kits | 29 |
| 2.5 | Marker | 29 |
| 2.6 | Enzyme | 29 |
| 2.7 | Antikörper | 30 |
| 2.7.1 | Primäre Antikörper | 30 |
| 2.7.2 | Sekundäre Antikörper | 30 |
| 2.8 | Lösungen und Puffer | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9 Medien..... | 32 |
| 2.10 Oligonukleotide..... | 33 |
| 2.11 Vektoren..... | 33 |
| 2.12 Phagen..... | 33 |
| 2.13 <i>Escherichia coli</i> -Stämme..... | 33 |
| | |
| 3 Methoden..... | 34 |
| 3.1 Klonierung und Sequenzierung..... | 34 |
| 3.2 Darstellung und Reinigung von Etmic2 und scFv..... | 35 |
| 3.2.1 Expression in <i>E.coli</i> und Zellaufschluß..... | 35 |
| 3.2.2 Proteinreinigung durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie..... | 37 |
| 3.2.3 Proteinreinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Anionen- austauscher-Chromatographie..... | 37 |
| 3.3 Proteinanalyse..... | 38 |
| 3.3.1 Quantifizierung..... | 38 |
| 3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 38 |
| 3.3.3 Proteinnachweis im SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassie-Brilliantblau- Färbung..... | 39 |
| 3.3.4 Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen (Immunoblot)..... | 39 |
| 3.4 Phage Display“ – Isolierung von anti-Etmic2-scFv..... | 40 |
| 3.4.1 Herstellung der „Phage Display“-Bank..... | 40 |
| 3.4.2 Amplifikation von Helferphagen..... | 41 |
| 3.4.3 Anreicherung und Isolierung von anti-Etmic2-scFv durch „Panning“..... | 42 |
| 3.4.4 Herstellung monoklonaler Phagen..... | 44 |
| 3.5 Enzymimmuntest (ELISA)..... | 45 |
| 3.5.1 Indirekter Phagen-ELISA..... | 45 |
| 3.5.2 Indirekter scFv-ELISA..... | 45 |
| 3.5.3 Kompetitiver ELISA..... | 46 |
| 3.6 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an fragmentiertes Etmic2..... | 46 |
| 3.7 Untersuchung der spezifischen Antigenbindung von anti-Etmic2-scFv durch Oberflächen- plasmonresonanz (SPR)..... | 47 |
| 3.7.1 Kopplung des Liganden in der Flußzelle..... | 48 |
| 3.7.2 Funktionelle Analyse von scFv..... | 49 |
| 3.8 Präparation der Parasiten..... | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 Zellanheftungstest (CAT)..... | 49 |
| 3.10 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT) | 50 |
| 3.11 Untersuchung der Sporozoiten-Invasion <i>in vitro</i> | 51 |
| 3.11.1 Anzucht der Wirtszellen..... | 51 |
| 3.11.2 Zytotoxizitäts- und Proliferationstest | 51 |
| 3.11.3 Sporozoiten-Invasionshemmtest | 52 |
| 3.12 Viabilitätstests | 53 |
| 3.13 Fluoreszenzmarkierung von Sporozoiten mit Bodipy [®] FL-X Ryanodin | 54 |
| 3.14 Versuch der Beladung von Sporozoiten mit Calcium Green-1 AM | 54 |
| | |
| 4 Ergebnisse | 55 |
| 4.1 Isolierung Etmic2 bindender rekombinanter scFv | 55 |
| 4.1.1 Klonierung des rekombinanten <i>Eimeria tenella</i> -Antigens Etmic2 | 56 |
| 4.1.2 Bakterielle Expression und Reinigung von Etmic2 | 58 |
| 4.1.3 Anreicherung von anti-Etmic2-scFv durch „Panning“ | 63 |
| 4.1.4 Sequenzierung der anti-Etmic2-scFv und Sequenzvergleich..... | 65 |
| 4.2 Charakterisierung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an rekombinantes Etmic2..... | 65 |
| 4.2.1 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an fragmentiertes rekombinantes Etmic2 durch Immunoblot | 66 |
| 4.2.2 Nachweis der spezifischen Antigenbindung von anti-Etmic2-scFv durch Oberflächenplasmonresonanz-Analyse..... | 67 |
| 4.2.3 Bestimmung der Affinität von anti-Etmic2-scFv..... | 74 |
| 4.3 Binden anti-Etmic2-scFv an natives Etmic2? | 75 |
| 4.3.1 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Sporozoiten- bzw. Oozystenextrakte..... | 76 |
| 4.3.2 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Sporozoiten durch einen Zellanheftungstest | 78 |
| 4.3.3 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Sporozoiten durch einen indirekten Immunfluoreszenztest | 80 |
| 4.3.4 Vergleich der Epitopspezifitäten von anti-Etmic2-scFv und Serumantikörpern gegen natives Etmic2 durch einen kompetitiven ELISA..... | 82 |
| 4.4 Untersuchungen zur Kalziumabhängigkeit der Sporozoiten-Invasion..... | 84 |
| 4.4.1 Lebensfähigkeit und Infektiosität von <i>E.tenella</i> -Sporozoiten bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen | 85 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.4.2 | Test verschiedener Kalziumeffektoren auf ihre Wirksamkeit im Sporozoiten-Invasionshemmtest | 90 |
| 4.4.3 | Besitzen <i>Eimeria tenella</i> -Sporozoiten Ryanodin-Bindungsstellen? | 93 |
| 4.4.4 | Hängt der Effekt von Ryanodin mit Ca ²⁺ -Signalvorgängen zusammen?..... | 94 |
| 5 | Diskussion und Ausblick..... | 96 |
| 5.1 | Versuch der Isolierung von <i>Eimeria</i> -spezifischen scFv durch die „Phage Display“-Technologie – Probleme und Diskussion alternativer Strategien | 97 |
| 5.2 | Hemmung der Invasion von <i>Eimeria tenella</i> -Sporozoiten durch Ca ²⁺ -Mangel und Ryanodin | 108 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 115 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 118 |
| 8 | Anhang | 132 |

1 Einleitung

Die Anfänge der Züchtung domestizierter Tiere und der Kultivierung von Nutzpflanzen liegen mindestens 10.000 Jahre zurück. Durch die Bedeutung von Nutztieren als Ernährungsquelle bedrohen Tierkrankheiten, wie z.B. Milzbrand, Maul- und Klauenseuche, BSE, Tuberkulose oder Schweinepest, seit jeher die Existenzgrundlage des Menschen. Darüber hinaus können einige Tierkrankheiten auch die Gesundheit des Menschen gefährden (Zoonosen). Begünstigt durch bestimmte Fütterungsbedingungen und die ortsgebundene Haltung vieler Tiere auf relativ kleinem Raum können infektiöse Erkrankungen häufig zu großen Verlusten im Tierbestand und dementsprechend großem wirtschaftlichen Schaden führen. Neben bakteriellen und viralen Krankheitserregern spielen auch Parasiten eine bedeutende Rolle bei der Auslösung von Infektionskrankheiten.

Viele human- und veterinärmedizinisch bedeutsame Endoparasiten gehören zum Stamm der Protozoa (Urtiere, Vortiere). Diese eukaryotischen Organismen vereinigen alle Lebensfunktionen in einer Zelle – Nahrungsaufnahme, Stoffwechsel, Exkretion, Reproduktion, Reizbarkeit, Motilität u.s.w.. Sie können je nach Art und Entwicklungsstadium mehr als einen Zellkern enthalten und besitzen oft zahlreiche verschiedene Organellen. Ihre meist sehr hohe Zellteilungsrate führt speziell bei parasitischen Protozoen zu einer Überschwemmung des Wirtsorganismus und entsprechend ernsthaften Erkrankungen.

1.1 Kokzidiose

1.1.1 Charakteristik, phylogenetische Einordnung und wirtschaftliche Bedeutung

Kokzidiose wird durch intrazellulär parasitierende Protozoen verursacht. Die wichtigste und artenreichste Gruppe ist hierbei die Gattung *Eimeria*. Eimerien parasitieren im Verdauungstrakt, aber auch in anderen Organen und Organsystemen von Vertretern aller Vertebratenklassen und unterliegen einem fäkal-oralem Lebenszyklus. Unter natürlichen Bedingungen sind *Eimeria*-Arten in der Regel streng wirts- und organspezifisch [Haberkorn, 1970].

Die nach dem Zoologen Theodor Eimer (1843-1898) benannten Kokzidioseerreger gehören zur Familie der Eimeriidae (Levine, 1982). Diese wird dem Stamm der Sporozoa zugeordnet, dessen Mitglieder durch die Bildung von infektiösen Sporen (Oozysten) sowie dem Vorhandensein eines „Apikalkomplexes“ aus an der Wirtszellinvasion beteiligten Organellen charakterisiert sind und deshalb auch als Apikomplexa bezeichnet werden. Der Stamm Sporozoa umfaßt viele parasitierende Protozoen von medizinischer und/oder veterinär-

medizinischer Bedeutung, z.B. die Malaria-Erreger (*Plasmodium*) und die Erreger verschiedener Zoonosen (*Toxoplasma*, *Cryptosporidium*) sowie die zahlreichen *Eimeria*-Arten.

Systematische Einordnung wichtiger Vertreter der Apikomplexa:

System: Protozoa (Einzeller)

Stamm: Sporozoa (Apikomplexa)

2. Klasse: Sporozoa

2. Unterklasse: Coccidia

2. Ordnung: Eucoccidia

1. Unterordnung: Eimeriina 2. Unterordnung: Haemosporina

Gattung: *Eimeria*

Gattung: *Plasmodium*

Gattung: *Toxoplasma*

Gattung: *Babesia*

Gattung: *Cryptosporidium*

Gattung: *Theileria*

Kokzidiose gehört zu den ökonomisch bedeutendsten Erkrankungen der modernen Tierproduktion. Zu den befallenen Nutztieren zählen Rinder, Pferde, Schweine, Schafe, Kaninchen und Geflügel. Besonders in Betrieben mit hohen Bestandsdichten und vor allem bei der Bodenhaltung von Küken und Hühnern sind *Eimeria*-Infektionen zum Hauptproblem geworden. Die Haltung von bis zu 25.000 Tieren in einem Stall, in dem sie ständig Kontakt mit dem Kot der anderen haben, Temperaturen zwischen 28°C und 30°C sowie eine relativ hohe Feuchtigkeit herrschen, bietet optimale Bedingungen für die schnelle Verbreitung der Krankheitserreger. Durch die hohe Vermehrungsrate der Parasiten besitzt die Kokzidiose eine große Morbidität und Pathogenität. Die oral aufgenommenen Erreger vermehren sich in der Darmwand und verursachen dort Läsionen und Nekrosen in den resorptiven Epithelien. Die Folge sind blutige Durchfälle, welche mit einer verminderten Nahrungsaufnahme und -verwertung einhergehen und vor allem bei Jungtieren zum Tod führen können. Der Blutverlust kann z.B. bei *E.tenella*-Infektionen bis zu 10 % der Körpermasse des Wirtstieres betragen. Dies wird durch eine vom Parasiten verursachte Gerinnungshemmung noch verstärkt. Außerdem fördern die opportunistischen Eigenschaften der Eimerien auch virale und bakterielle Sekundärinfektionen, u.a. mit *Clostridium perfringens* [Balauca, 1976; Balauca et al., 1976].

Durch Eimerien verursachte Kokzidiosen gehören zu den bedeutendsten Infektionen beim Haushuhn. Sie können zu einem schwerwiegenden wirtschaftlichen Störfaktor werden. Vor

allem durch die hohen Kosten für Antikozidien sowie die Einbußen durch Gewichtsverlust, schlechte Futtermittelverwertung und eine erhöhte Mortalität verursacht die Kokzidiose immense wirtschaftliche Schäden [Williams, 1999]. Die Gesamtkosten für die Kokzidiosebekämpfung in der Geflügelwirtschaft weltweit werden auf 800 Millionen US\$ geschätzt [Williams, 1994].

1.1.2 Kokzidiose beim Haushuhn – relevante *Eimeria*-Arten

Beim Huhn konnten bisher sieben unterschiedliche pathogene *Eimeria*-Arten zuverlässig identifiziert werden [Shirley, 1986]. Sie befallen ausschließlich den Intestinaltrakt von Hühnern und zeigen eine artspezifische Schädigung ganz bestimmter Darmabschnitte. Dabei besiedelt *E.tenella* den Blinddarm, *E.brunetti* den Enddarm und die fünf anderen Arten bestimmte Teile des Dünndarmes. In Tab. 1 sind die sieben Arten in der Reihenfolge abnehmender Pathogenität aufgeführt. Die ersten fünf Spezies sind gut beschrieben und relativ einfach zu identifizieren, weil sie im Darmepithel große Läsionen verursachen, welche für die Kokzidiose beim Haushuhn charakteristisch sind. Ihre Pathogenität reicht von sehr schwer bis moderat. Die beiden anderen Arten werden oft als gutartig angesehen. [Williams, 1998]. Sie führen nicht zum Tod der Hühner und bilden auch keine der typischen Läsionen.

Tab. 1: *Eimeria*-Arten des Haushuhnes

| Artname | beschrieben durch |
|---------------------|--|
| <i>E.necatrix</i> | Johnson, 1930 |
| <i>E.tenella</i> | Raillet und Lucet, 1881; Fantham, 1909 |
| <i>E.maxima</i> | Tyzzar, 1929 |
| <i>E.brunetti</i> | Levine, 1942 |
| <i>E.mitis</i> | Tyzzar, 1929 |
| <i>E.acervulina</i> | Tyzzar, 1929 |
| <i>E.praecox</i> | Johnson, 1930 |

1.1.3 Lebenszyklus von Eimerien

Hühnerkokzidiose ist eine orale Schmutzinfektion, deren Inkubations- bzw. Präpatenzzeit in der Regel vier bis fünf Tage dauert. Eimerien durchlaufen einen typischen dreiphasigen Entwicklungsgang, der in Abb. 1 am Beispiel von *E.tenella* dargestellt ist und teilweise endogen (Schizogonie und Gamogonie), teilweise exogen (Sporogonie) abläuft.

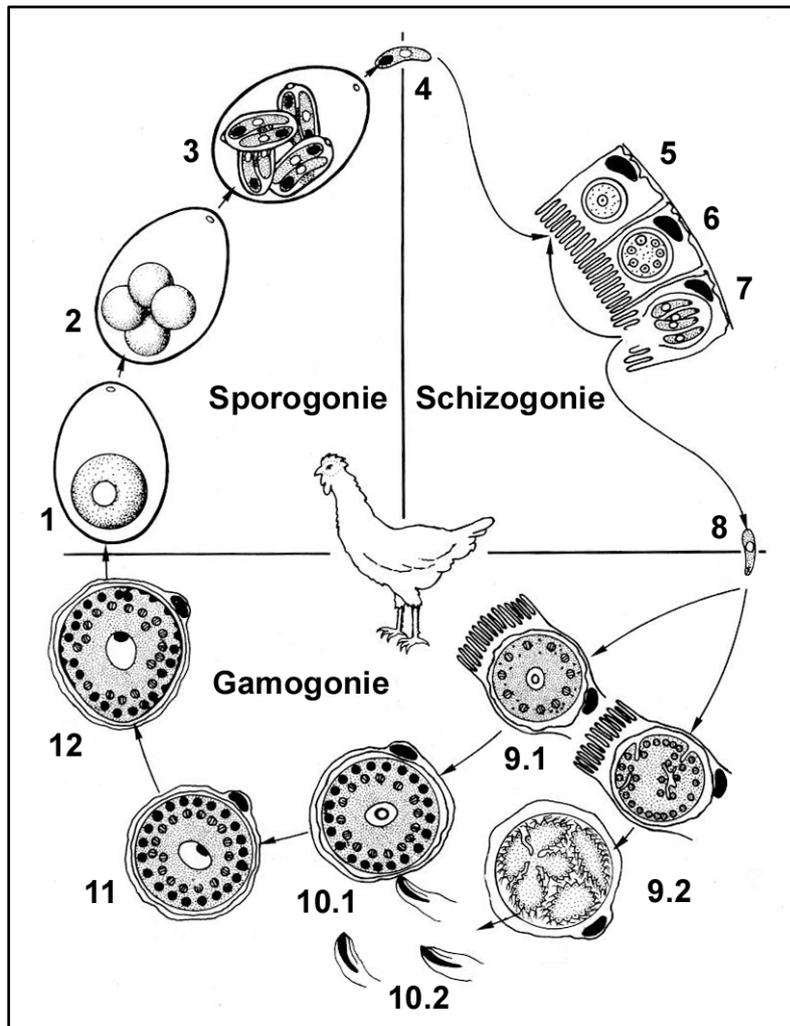


Abb. 1: Lebenszyklus von *Eimeria*-Arten des Haushuhnes [nach Mehlhorn und Piekarski, 1989]. 1 mit dem Kot ausgeschiedene unsporulierte Oozyste, 2-3 Sporulation im Freien: Bildung von vier Sporozysten, die jeweils zwei Sporozoiten enthalten, 4 Sporozoiten (im Dünndarm freigesetzt), 5-7 intrazelluläre Schizonten bilden invasive Merozoiten (Anzahl der Wiederholungen des Vorgangs artspezifisch), 8 Merozoiten bildet Gamonten, 9.1 weiblicher (Makro-)Gamet, 9.2 männlicher (Mikro-)Gamet, 10.1 befruchtungsfähiger Makrogamet, 10.2 fertiler begeißelter Mikrogamet, 11 Zygote, 12 Wandbildung der Zygote (Oozyste)

Mit dem Kot infizierter Tiere ausgeschiedene versportete Dauerformen, die sogenannten Oozysten, durchlaufen einen sauerstoffabhängigen, meiotischen Teilungsprozeß, der etwa 24 Stunden dauert. Eine sporulierte Oozyste enthält dann vier Sporozysten, in welchen sich jeweils zwei Sporozoiten befinden. Die Hühner nehmen die infektiösen Oozysten durch ihr normales Verhalten, Scharren und Picken, sowie über mit Kot verschmutztes Futter oder Trinkwasser auf. Im Muskelmagen, der Steinchen und andere harte Materialien enthält, wird die Hülle der Oozyste mechanisch und enzymatisch zerstört. Die Freisetzung der Sporozoiten aus den Sporozysten findet im Dünndarm statt. An diesem Prozeß (Exzystation) sind Trypsin, proteolytische Enzyme der Gallenflüssigkeit und Kohlendioxid beteiligt. Die Sporozoiten dringen in die Epithelzellen des Darmes ein (Invasion). Sie entwickeln sich entweder direkt in

den penetrierten Zellen (*E.brunetti*, *E.praecox*) oder werden zuvor in andere Regionen, wie das Epithel der Darmkrypten, transportiert (*E.acervulina*, *E.maxima*, *E.necatrix*, *E.tenella*) [Lawn und Rose, 1982; Al-Attar und Fernando, 1987; Trout und Lillehoi, 1993; 1995]. Innerhalb der Wirtszelle unterliegen die Sporozoiten einem asexuellen Teilungsprozeß (Schizogonie oder Merogonie). Die nach vielfältigen Kernteilungen und der Differenzierung des Zytoplasmas entstandenen Merozoiten werden durch eine Ruptur der Wirtszelle freigesetzt und dringen in weitere Zellen ein. Nach mehreren Merozoitengenerationen und damit der massenhaften Vermehrung des Parasiten folgt eine Phase sexueller Reproduktion. Dafür entwickeln sich aus den Merozoiten Gamonten, welche zu weiblichen Makrogameten und männlichen Mikrogameten heranreifen. Nach der Befruchtung der Makrogameten entwickeln die Zygoten eine dauerhafte, feste Hülle und werden als sogenannte Oozysten mit dem Kot ausgeschieden. Nach der Sporulation können sie abhängig von den herrschenden Bedingungen (speziell von Temperatur und Feuchtigkeit) mehrere Monate lang infektiös bleiben. Eine maximale Anzahl ausgeschiedener Oozysten wird bereits am sechsten bis neunten Tag nach der Infektion des Huhnes erreicht.

1.1.4 Wichtige Proteine und Strukturen von *Eimeria*-Sporozoiten

Das nach der Infektion zuerst in eine Wirtszelle eindringende Stadium von *Eimeria* ist der Sporozoit (siehe Abb. 2). Er ist von einer dreischichtigen, als Pellikula bezeichneten Membran umgeben und enthält eine Vielzahl verschiedener Organellen. Besonders hervorzuheben ist dabei der Apikalkomplex, welcher für die invasiven Stadien (Sporozoiten, Merozoiten) von Apikomplexa typisch ist und das Vorderende des Parasiten markiert [Chobotar und Scholtyssek, 1982]. Zu ihm gehören das Konoid, die Mikronemen und die Rhoptrien.

Beim Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoiten findet die Exozytose von drei verschiedenen sekretorischen Organellen statt. Nacheinander werden Proteine aus den Mikronemen, den Rhoptrien und der dichten Granula sekretiert.

Die aus den Mikronemen sekretierten Proteine spielen dabei sehr wahrscheinlich für die Beweglichkeit des Parasiten, die Wirtszellerkennung und -anheftung eine Rolle [Dubremetz et al., 1998]. Das Proteinrepertoire der Mikronemen von *E.tenella*-Sporozoiten wurde anhand gereinigter oder angereicherter Organellenfraktionen untersucht [Kawazoe et al., 1992]. Aus Expressions-cDNA-Banken konnten bereits einige dieser Mikronemenproteine isoliert werden, darunter Etmic1-7 [Tomley et al., 1991; 1996; Brown et al., 2000]. Manche von

ihnen sind in der Membran verankert, andere, wie Etmic2 und Etmic5, werden bei der Invasion in das Medium abgegeben [Bumstead und Tomley, 2000]. Bei *T.gondii*, einer relativ nahe verwandten Parasitenart, wurde beschrieben, daß die Mikronemenproteine nicht einzeln agieren, sondern als Multi-Proteinkomplexe funktional sind [Soldati et al., 2001].

Von den Rhoptrien sezernierte Proteine sind wahrscheinlich für die Penetration der Wirtszelle und die Bildung der parasitophoren Vakuole von Bedeutung. Die Membran um dieses den intrazellulären Parasiten umschließende Kompartiment ist ein Hybrid aus Wirts- und Parasitenbestandteilen und besitzt andere biochemische Eigenschaften als die Lysosomenmembranen der Wirtszelle. Auf diese Weise wird eine Fusion der parasitophoren Vakuole mit den Wirtszellysomen verhindert [Lingelbach, 2001].

Die Proteine der dichten Granula werden nach der Invasion durch Exozytose in die parasitophore Vakuole abgegeben und in deren Membran und tubo-retikuläres Netzwerk integriert [Sibley et al., 1986; Dubremetz et al., 1998]. Sie spielen wahrscheinlich eine Rolle beim Umbau der Vakuole zu einem metabolisch aktiven Kompartiment [Dubremetz et al., 1998].

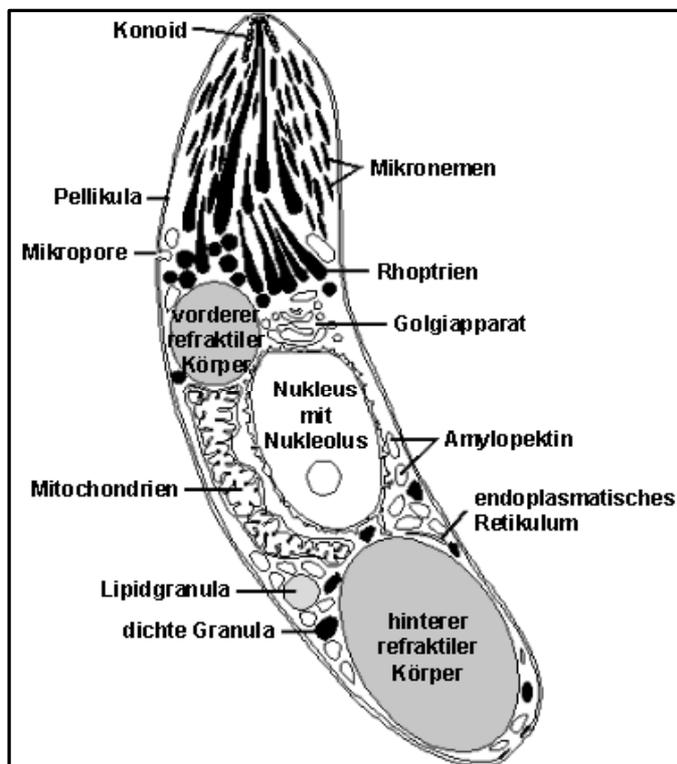


Abb. 2: Schematische Darstellung eines *E.tenella*-Sporozoiten.

1.1.5 Bestehende Methoden zur Bekämpfung von Kokzidiose beim Haushuhn

Die Oozysten von *Eimeria* sind überall verbreitet und haben ein sehr großes Reproduktionspotential. Es ist daher kaum möglich, Hühner unter *Eimeria*-freien Bedingungen zu halten, besonders unter den Gegebenheiten der Geflügelwirtschaft. Neben Hygienemaßnahmen wurden bisher vor allem Chemotherapeutika und die aktive Immunisierung zur Bekämpfung von Kokzidiose eingesetzt [Dauguschies et al., 2002].

a) Chemotherapeutika

Seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts spielen Chemotherapeutika als Futterzusatzstoffe eine sehr große Rolle bei der Kokzidiosetherapie und -prophylaxe. Diese Wirkstoffe werden in zwei Gruppen eingeteilt: Chemikalien mit Wirkung auf den Metabolismus der Parasiten (Amprolium, Clopidol, Decoquinat, Halofuginon) und Polyether-Ionophore, die einen generellen Einfluß auf den Ionentransport und das osmotische Gleichgewicht von Zellen ausüben (Monensin, Lasalozid, Salinomycin, Narasin, Maduramycin). Neben der medikamentösen Belastung des Huhnes gilt die Entwicklung von Resistenzen als größtes Problem bei der Entwicklung von Antikozidien, welche deshalb größtenteils nicht länger als über einen Zeitraum von fünf Jahren angewendet werden können [Dowling, 1992; Chapman und Hacker, 1994; Stephen et al., 1997; Chapman, 1998]. Um verschiedene *Eimeria*-Stadien zu erreichen und der Entwicklung von Resistenzen entgegenzuwirken, wird die Chemotherapie häufig in Form von Rotationsprogrammen durchgeführt, welche einen regelmäßigen Wechsel des eingesetzten Wirkstoffes vorschreiben.

b) Immunprophylaxe durch aktive Immunisierung

Eimeria-Infektionen haben eine stark immunogene Wirkung. Durch die weite Verbreitung der Erreger wird praktisch jedes Huhn im Laufe seines Lebens infiziert und entwickelt eine entsprechende Immunantwort. Der wiederholte Kontakt mit geringen Mengen an infektiösem Material sorgt für eine ständige Auffrischung der Immunität und damit für die Aufrechterhaltung der Gesundheit.

Unter den potentiell immunstimulierenden Antigenen sind viele Oberflächenproteine sowie Proteine von Organellen, wie den Mikronemen, den Rhoptrien und den refraktilen Körpern [Tomley et al., 1991; Vermeulen et al., 1993; Tomley, 1994; Vermeulen et al., 1994; Tomley et al., 1996; Binger et al., 2003]. Der Mangel an geeigneten monoklonalen Antikörpern sowie an Hühnerlinien mit genetisch verändertem Immuneffektorsystem erschweren allerdings eine

genauere Untersuchung der avianen Immunantwort auf *Eimeria*-Infektionen sehr. Folgendes ist jedoch klar: Es gibt einerseits genetische Komponenten, die eine Resistenz für Primärinfektionen vermitteln können [Lillehoj, 1986; Woods et al., 2000]. Andererseits entwickeln Hühner eine Immunität gegen homologe Sekundärinfektionen, welche jedoch nicht vor der Sporoziteninvasion der Epithelzellen schützt, sondern nur die Entwicklung der intrazellulären Sporoziten verhindert [Augustine und Danforth, 1986; Rose, 1987]. Besonders interessant erscheinen Beobachtungen verschiedener *E.tenella*-Stadien in Zellen des Immunsystems. So wurden beispielsweise in pseudoeosinophilen Granulozyten parasitierende Sporoziten und Merozoiten in Mastzellen beschrieben [Rose und Lee, 1977; Daszak et al., 1993]. Es gibt auch Hinweise darauf, daß Makrophagen eine Funktion im Transport beim Sporoziten zukommt [Van Doorninck und Becker, 1957]. Inwieweit diesen Beobachtungen Relevanz für die Bekämpfung von Kokzidiose durch das Immunsystem zukommt, ist jedoch nicht geklärt.

Die aktive Immunisierung wird in geringerem Umfang bereits seit etwa 50 Jahren zur Kokzidioseprophylaxe in der Geflügelwirtschaft eingesetzt. Es wurden dazu verschiedene Typen von Vakzinen entwickelt, bei denen es sich um attenuierte oder virulente *Eimeria*-Stämme, wie z.B. Paracox und Livacox, handelt [Lillehoj und Trout, 1993; Lillehoj et al., 2000; Lillehoj und Lillehoj, 2000]. Ein genauer Vergleich der einzelnen Vakzine findet sich bei Bedrnik et al. [1995].

Um Alternativen zu diesen Lebendvakzinen zu entwickeln, wurden intensive Forschungen auf dem Gebiet rekombinanter Vakzine betrieben, die bisher jedoch noch nicht zu kommerziell nutzbaren Produkten geführt haben. Es gibt dabei etliche Hürden, zu welchen vor allem die Identifizierung protektiver Antigene gehört.

1.1.6 Neue Strategien zur Bekämpfung von *Eimeria*-Infektionen – Ansätze und Herausforderungen

Die Anwendbarkeit der bestehenden Methoden zur Kokzidiosebekämpfung wird durch verschiedene Faktoren eingeschränkt. Wesentliche Nachteile der Chemotherapie sind die Entwicklung resistenter *Eimeria*-Stämme und die medikamentöse Belastung der Tiere. Die aktive Immunisierung ist ebenfalls keine optimale Lösung, weil für viele Indikationen keine Impfstoffe vorhanden sind oder kein vollständiger Immunschutz erreicht wird. Gerade bei Jungtieren setzt zudem der Effekt einer aktiven Immunisierung oft erst zeitverzögert ein.

Dadurch kann in der kritischen Phase, den ersten Tagen nach dem Schlüpfen der Küken, häufig kein ausreichender Schutz gewährleistet werden.

Es besteht deshalb großes Interesse an neuen Strategien zur Bekämpfung von *Eimeria*-Infektionen. Der Invasionsvorgang von Sporozoiten spielt als erste Auseinandersetzung des Huhnes mit dem Parasiten eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von durch Eimerien verursachten Durchfallerkrankungen. Die Aufklärung der daran beteiligten molekularen Prozesse und der Funktionalität involvierter Proteine ist daher von entscheidender Bedeutung für die gezielte Entwicklung neuer Ansätze bei der Kokzidioseforschung. Trotz des *Eimeria*-Genomprojektes und den umfangreichen Daten zum Genom von *E.tenella*, gibt es nur wenige physiologische Daten zu diesen DNA-Sequenzen. Doch nicht allein die Proteine von Eimerien sind selten funktionell charakterisiert, sogar die Funktion ganzer Organellen ist teilweise noch ungeklärt. Über die Rolle vieler Proteine beim Invasionsvorgang ist deshalb nur wenig oder auch gar nichts bekannt. Forschungsbemühungen, um diese Informationen zu erhalten, werden durch verschiedene Faktoren erschwert: Ausreichende Mengen an Untersuchungsmaterial können nur durch die Isolation von Oozysten aus infizierten Küken gewonnen werden. Dies ist mit einem hohen Arbeitsaufwand und großen Aufarbeitungsverlusten verbunden. Es wäre deshalb ein geeignetes System zur *in vitro*-Vermehrung von *E.tenella* wünschenswert. Die Kultivierung von Eimerien unter Verwendung von Zelllinien wurde jedoch bisher relativ selten beschrieben und ist für die Gewinnung nennenswerter Mengen von *Eimeria*-Material nicht praktikabel. Des Weiteren sind bei *Eimeria*-Arten, im Gegensatz zu beispielsweise *Toxoplasma gondii*, Mutagenesestudien, die Herstellung von knockout-Linien oder transgene Ansätze bisher nicht gelungen [Sibley et al., 1993; Kim und Weiss, 2004].

Die Penetration der Wirtszellen durch *Eimeria*-Sporozoiten zu hemmen, ist sehr wahrscheinlich ein lohnenswertes Ziel für alternative Antikozidioseansätze. Zwei Aspekte scheinen für die Invasion entscheidend zu sein: zum einen die Motilität der Parasiten und zum anderen die Exozytose bestimmter Organellen, deren Proteine u.a. die Anheftung an die Wirtszelle ermöglichen (vgl. 1.1.4).

Wie könnte man auf diese Vorgänge einwirken, um letztlich eine Hemmung der Wirtszellinfektion durch *Eimeria*-Sporozoiten zu erreichen? - Eine Möglichkeit wäre, gezielt die Signaltransduktionswege des Parasiten zu beeinflussen, welche die Sekretion von invasionsvermittelnden Proteinen oder Bewegungsvorgänge der Sporozoiten regulieren.

Dabei könnten auf Kalzium beruhende Signalsysteme mögliche Angriffspunkte sein, wobei eine Schädigung des Wirtes vermieden werden muß.

Als Alternative zu diesem direkten Eingriff in den Stoffwechsel des Parasiten ist eine indirekte Hemmung der Infektion durch die Neutralisierung invasionsrelevanter Oberflächenproteine der Sporozysten denkbar. Dafür wären rekombinante Antikörper geeignet, welche oral verabreicht in den Darm gelangen und dort die Eimerien im Sinne einer passiven Immunisierung an der Invasion hemmen.

Einige Antikörper mit inhibitorischer Wirkung auf verschiedene *Eimeria*-Stadien wurden bereits in Fachartikeln und Patenten beschrieben [Augustine und Danforth, 1985; Schenkel, 1987a; b; Lillehoj, 2002]. Durch die Produktion dieser Antikörper in Futterpflanzen, welche direkt zur Tierernährung einsetzbar sind, könnten weitere Aufbereitungsschritte gespart und die Lagerung, z.B. in getrockneten Samen, vereinfacht werden [Fiedler und Conrad, 1995]. Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts und ihrer monomeren Struktur eignen sich besonders Antikörperfragmente, wie die unter 1.2.2 genauer beschriebenen Einkettenantikörper, für die Expression in Pflanzen [Fiedler und Conrad, 1995; Conrad et al., 1996; 1997; Fiedler et al., 1997; Artsaenko et al., 1998; Conrad et al., 1998]. Dabei können Expressionsraten von bis zu 8 % erzielt werden [Fiedler et al., 1997; Conrad et al., 1998].

1.2 Rekombinante Antikörper

1.2.1 Struktur und Funktion von Antikörpern

Das Immunsystem von Vertebraten ist ein vielseitiges und anpassungsfähiges Abwehrsystem. Es schützt den Körper vor Eindringlingen und stellt so eine Barriere für Infektionen durch Viren, Bakterien oder eukaryotische Parasiten dar. Neben der T-Zell-vermittelten Immunität ist die humorale Immunantwort von wesentlicher Bedeutung. Eine zentrale Rolle dabei spielen die Antikörper – eine Familie strukturell ähnlicher Glykoproteine, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet und von spezialisierten Zellen des Immunsystems (B-Zellen) gebildet werden. Der biologische Effekt von Antikörpern besteht in der Bindung von Antigenen. Diese Bindung beruht auf der Wechselwirkung entsprechender Bereiche des Antikörpers (Paratop) und des Antigens (Epitop) nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip und ist durch die Parameter Spezifität und Affinität gekennzeichnet.

Um die riesige Anzahl potentiell gefährlicher Antigene zu erkennen, braucht der Organismus ein ebenso riesiges Arsenal von Antikörpern mit unterschiedlichsten Bindungsspezifitäten. Bei Säugetieren entsteht diese große Variabilität u.a. durch die Umordnung und kombinatorische Assemblierung verschiedener Gensegmente während der B-Zellentwicklung

im Knochenmark sowie durch die somatische Hypermutation. Bei Vögeln gibt kaum Vielfalt unter den Immunglobulinen. Die Variabilität wird bei ihnen durch den Prozeß der Genkonversion in der Bursa Fabricii erreicht, bei dem ein Austausch kurzer Sequenzen homologer Genabschnitte stattfindet. [Überblick bei Janeway und Travers, 1995].

Antikörper bestehen im Allgemeinen aus einem konstanten Teil, der für den Effektormechanismus des Immunsystems verantwortlich ist, und einem variablen Teil, welcher die Antigen-bindende Region enthält. Abb. 3 zeigt am Beispiel eines IgG schematisch den Aufbau eines typischen Antikörpermoleküls, um dessen grundlegende Merkmale zu verdeutlichen. Der Antikörper ist symmetrisch aufgebaut und besteht aus zwei identischen glykosylierten, schweren H-Ketten und zwei identischen leichten L-Ketten, die kovalent über Disulfidbrücken und über andere, nichtkovalente, Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Die L- bzw. H-Ketten bestehen aus einer bzw. mehreren konstanten Regionen (C_L bzw. C_H) und einer variablen Region (V_L bzw. V_H). Entscheidend für die Antigenbindung sind die in den variablen Domänen enthaltenen CDRs (complementarity determining regions). Jede Kette enthält drei dieser hypervariablen Schleifen, welche die eigentliche Kontaktstelle zum Epitop auf dem Antigen bilden.

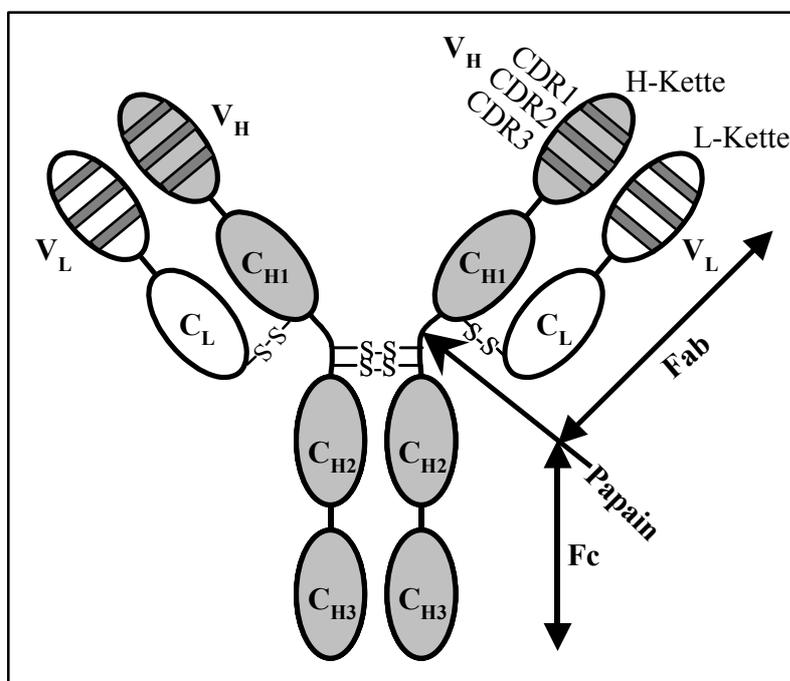


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Antikörpers am Beispiel eines IgG. Das Molekül besteht aus zwei leichten (L) und zwei schweren (H) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken (-S-S-) und nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Die N-terminalen Bereiche der Ketten bilden die variablen Regionen (V) des Antikörpers, welche die CDRs enthalten und die Antigenbindungsdomänen darstellen.

1.2.2 Rekombinante Antikörperfragmente

Antikörper sind durch ihre Fähigkeit, spezifisch an ein bestimmtes Antigen zu binden, besonders interessant für Anwendungen in der Forschung sowie für diagnostische oder therapeutische Zwecke. Die Hybridomtechnologie, welche 1975 von Köhler und Milstein entwickelt wurde, ermöglicht die Herstellung von monoklonalen Antikörpern einer definierten Spezifität [Kohler und Milstein, 1975]. Hybridomzellen waren auch das Ausgangsmaterial für die Herstellung der ersten rekombinanten Antikörpermoleküle, deren Expression nicht nur in lymphoiden Zellen gelang [Neuberger et al., 1985; Feys et al., 1988]. Rekombinante Antikörper bieten eine Vielzahl von Möglichkeiten: Durch die Verwendung molekularbiologischer Techniken können Fragmente hergestellt werden, denen der für die Effektorfunktion verantwortliche konstante Teil des Immunglobulinmoleküls fehlt. Dies war vorher nur durch die Spaltung mit proteolytischen Enzymen möglich. So entstehen z.B. durch den Verdau mit Papain Fab-Fragmente, die aus der variablen und der ersten konstanten Region der L- und H-Kette bestehen (siehe Abb. 3).

Die für die antigenbindenden variablen (V-) und konstanten (C-) Domänen kodierenden DNA-Abschnitte (V- bzw. C-Gene) können mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Ausgehend von der cDNA eines Organismus oder einer Zelllinie erhält man dabei die entsprechenden Sequenzen für das Repertoire an exprimierten Antikörpern. Außerdem ergeben sich durch Mutationen randomisierter bzw. gerichteter Art oder auch durch den Austausch ganzer Teilsequenzen enorme Variationsmöglichkeiten [Winter et al., 1994].

Häufig verwendete Typen von rekombinanten Antikörperfragmenten sind in Abb. 4 schematisch dargestellt [Conrad und Scheller, 2005]. Sie besitzen teilweise eine niedrigere Antigenbindungskonstante als vollständige Antikörper. Ein Grund dafür ist ihre geringere Avidität, wenn sie nicht zwei sondern nur eine Antigenbindungsstelle enthalten. Abgesehen von einzelnen V_H -Domänen, welche ebenfalls eine Bindungsaktivität zeigen können, ist das Fv-Fragment die kleinste Antigen-bindende Einheit eines Antikörpermoleküls.

Ein Problem bei der prokaryotischen Expression von Fab- und Fv-Fragmenten sind Fehlfaltungen und Aggregation. Gründe dafür können das Fehlen geeigneter Chaperone und die mangelhafte Ausbildung von Disulfidbrücken unter den reduzierenden Bedingungen des Zytoplasmas sein [Boss et al., 1984; Cabilly et al., 1984]. Im periplasmatischen Raum von gram-negativen Bakterien herrscht ein oxidierendes Milieu, das die Bildung von Disulfidbrücken begünstigt. Durch Anfügen eines entsprechenden Signalpeptids können die Antikörperfragmente dorthin exportiert werden [Cabilly et al., 1984; Better et al., 1988;

Skerra und Plückthun, 1988]. Eine zusätzliche Möglichkeit Fv-Fragmente zu stabilisieren, wurde 1988 von Bird et al. beschrieben. Durch die Verknüpfung der einzelnen V_L - und V_H -Regionen mit einem flexiblen Linkerpeptid von 15 bis 20 Aminosäuren entsteht ein Einkettenantikörper (oder „single chain Fv“ = scFv), welcher als zusammenhängendes Polypeptid exprimiert wird. Dabei bilden sowohl V_L -Linkerpeptid- V_H - als auch V_H -Linkerpeptid- V_L -Verknüpfungen funktionelle rekombinante Antikörperfragmente. Eine andere Strategie zur Stabilisierung von Fv-Fragmenten besteht darin, durch Einführen zusätzlicher Cysteine Disulfid-stabilisierte Fv (dsFv) zu erhalten [Überblick dazu bei Reiter et al., 1996].

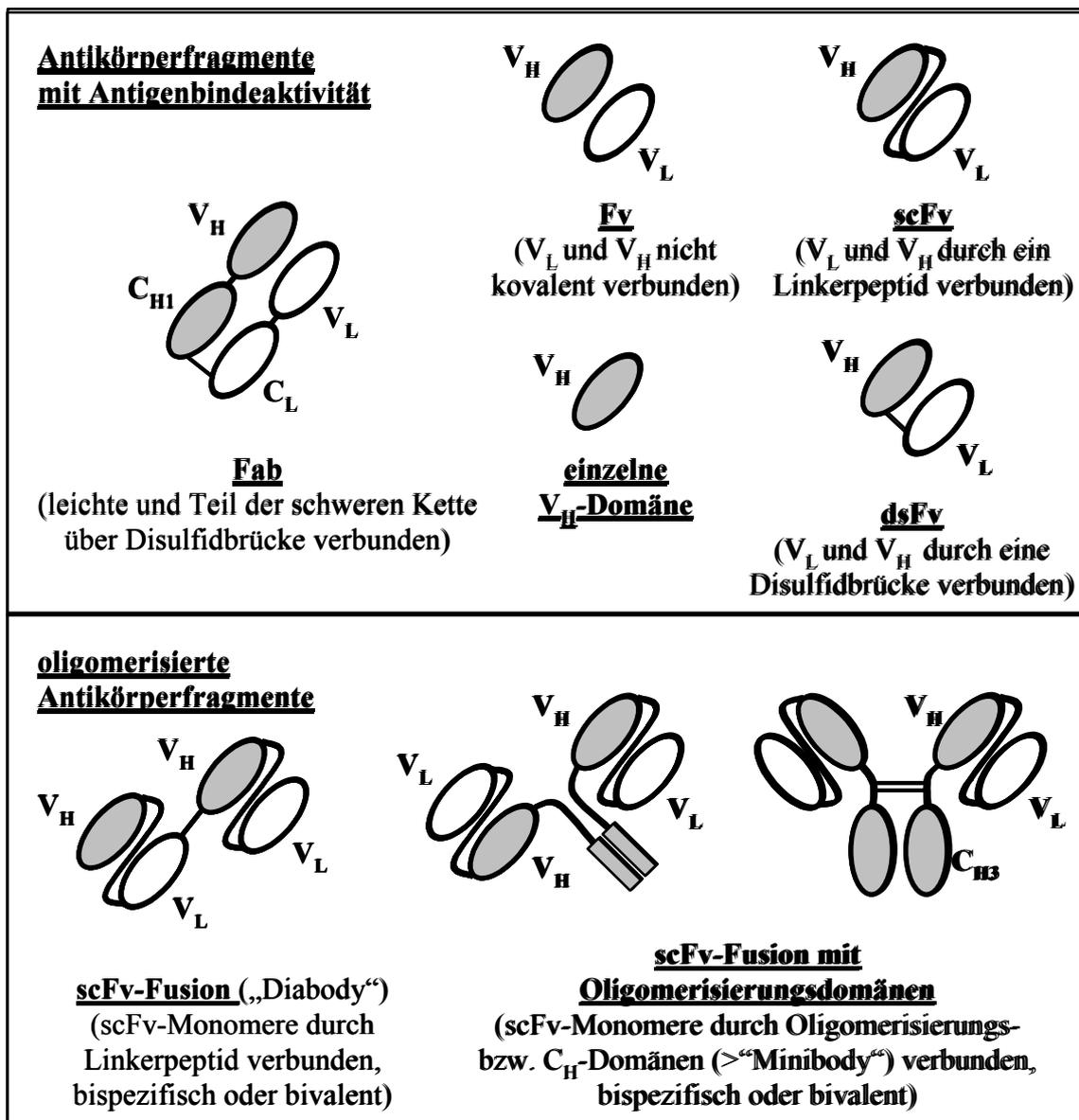


Abb. 4: Schematische Darstellung häufig verwendeter Antikörperfragmente und deren Oligomerisierungen. C_{H1-3} : konstante Domänen der schweren Ketten, C_L : konstante Domänen der leichten Ketten, V_H : variable Domänen der schweren Ketten, V_L : variable Domänen der leichten Ketten, dünnere Linien: Disulfidbrücken, dickere Linien: Polypeptidstränge bzw. Linkerpeptide

Die Bindungsstärke eines Antikörpers hängt nicht nur von seiner Affinitätskonstante ab, sondern auch von der Anzahl der Antigenbindungsstellen, also der Valenz der Interaktion [Le Gall et al., 1999]. Es wurden deshalb verschiedene Strategien entwickelt, um bivalente oder multivalente Antikörperfragmente zu erhalten [Überblick bei Plückthun und Pack, 1997]. Dazu gehört die kovalente und nichtkovalente Zusammenlagerung von mehreren Fv- bzw. scFv-Fragmenten und die Nutzung von Dimerisierungs- bzw. Multimerisierungsdomänen. Auf diese Weise entstandene Antikörper können nicht nur multivalent, sondern auch multispezifisch sein, d.h. mehrere verschiedene Antigene binden und so unterschiedliche Zellen oder Moleküle selektiv miteinander verbinden [Dübel und Schmiedl, 2000; Schmiedl et al., 2000].

1.2.3 Antikörperfragment-Banken

Wie bereits erwähnt, können Hybridomzelllinien Grundlage für die Herstellung rekombinanter Antikörper sein [Winter und Milstein, 1991]. Ausgangspunkt ist hierbei die mRNA der Hybridomzellen, welche in cDNA umgeschrieben wird. Durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) können dann die für V_L und V_H kodierenden DNA-Bereiche amplifiziert und mit z.B. Linkerpeptidsequenzen in einen Expressionsvektor eingefügt werden.

Eine weitere und vielfältig anwendbare Möglichkeit spezifisch bindende Moleküle zu erhalten, ist die Selektion von bindenden Antikörpern und Antikörperfragmenten aus entsprechenden cDNA-Banken. Diese enthalten eine Vielzahl verschiedener Antikörpervariationen, welche das B-Zell-Repertoire immunisierter bzw. nicht immunisierter („naiver“) Spender repräsentieren. Alternativ dazu können auch direkt die Keimbahngene der Antikörper oder durch die Kombination verschiedener DNA-Abschnitte zusammengesetzte, artifizielle Gene eingesetzt werden [Winter et al., 1994; Pini et al., 1998].

Neben der Präsentation von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von Bakterien, Hefen und Ribosomen [Hanes und Plückthun, 1997; Feldhaus et al., 2003; Lee et al., 2003] hat sich ganz besonders die „Phage Display“-Technologie als sehr wertvoll dabei erwiesen, Peptide oder Proteine mit spezifischen Bindungseigenschaften aus einer großen Vielfalt verschiedener Varianten zu isolieren [Smith, 1985; McCafferty et al., 1990; Hoogenboom et al., 1991; Cramer et al., 1994; Nissim et al., 1994]. Die Basis dafür wurde gelegt, als es gelang, eine Genfusion mit einem Hüllprotein von M13-Phagen herzustellen und Phagenpartikel, welche die Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentierten, mit immobilisierten Antikörpern mehr als 1000fach anzureichern [Smith, 1985].

Die „Phage Display“-Technologie (Prinzip siehe Seite 17 Abb. 5) orientiert sich am Vorbild des natürlichen Immunsystems [Clackson et al., 1991; Winter et al., 1994]:

- Die Selektion von Antikörpern im Körper basiert auf unaktivierten B-Lymphozyten, welche den entsprechenden Antikörper (in Form eines monomeren IgM-Rezeptors) auf ihrer Oberfläche tragen. - Diese direkte Kopplung von funktionalem Protein (Phänotyp) und genetischer Information (Genotyp) findet sich ebenso bei den Phagenpartikeln einer „Phage Display“-Bank. Das Antikörperfragment wird als Fusion mit einem Hüllprotein (pIII, pVI, pVII, pVIII oder pIX) exprimiert und in die Phagenhülle eingebaut [Smothers et al., 2002]. Das Gen dieses Fusionsproteins befindet sich neben einem Antibiotika-Resistenz-Gen und den beiden Replikationssignalen für Wirtsbakterium und Bakteriophagen auf einem Plasmidvektor (Phagemid) im Inneren des Phagenpartikels.
- Während der Differenzierung von B-Lymphozyten findet eine Rekombination der Keimbahnsegmente statt. - Die zufällige Kombination verschiedener V-Gene bei der Klonierung von Antikörperfragment-Banken imitiert diesen Vorgang [Marks et al., 1992].
- Stimuliert durch den Kontakt mit einem passenden Antigen werden unreife B-Zellen aktiviert, vermehren sich und produzieren die spezifisch bindenden Antikörper. – Die Selektion von Phagen, welche bindende Antikörperfragmente präsentieren, kann durch die Anreicherung an immobilisiertem Antigen erfolgen, dem sogenannten Panning. Waschschritte dienen dabei zur Entfernung nicht oder nur schwach bindender Partikel. Die spezifisch gebundenen Phagen werden danach von der Matrix (z.B. Mikrotiterplatte) eluiert und mit Hilfe von Wirtsbakterien (*Escherichia coli*) und Helferphagen repliziert. Dabei stellen Helferphagen, wie M13KO7, die für Replikation und Verpackung benötigten Gene zur Verfügung. Das Phagemid kann auch als Expressionsvektor für die Produktion des Antikörperfragmentes in Bakterien eingesetzt werden. Häufig besitzt es den *lac*-Promotor, der eine durch Galaktose oder deren Derivate induzierbare Expression vermittelt. Befindet sich zwischen den Genen für das Antikörperfragment und das Phagenhüllprotein ein Amber-Stopkodon (TAG), ist es möglich ohne Umklonierung, sondern nur durch Verwendung eines anderen Bakterienstammes, allein das Antikörperfragment zu exprimieren. Am Amber-Stopkodon wird bei der Translation in Suppressorstämmen, wie z.B. TG1 oder XL1Blue (*supE*), eine Aminosäure eingebaut und so das vollständige Fusionsprotein gebildet. Andere *E.coli*-Stämme, beispielsweise HB2151, besitzen keine entsprechende tRNA. Die Translation wird deshalb am UAG abgebrochen [Hoogenboom et al., 1991]. Eine detaillierte Analyse der selektierten Antikörperfragmente kann durch Methoden wie ELISA (Enzymimmuntest), SPR-

(Oberflächenplasmonresonanz-)Analyse oder die Verwendung von Proteinchips bzw. Protein-, „Mikroarrays“ erfolgen [Willats, 2002].

- Beim Übergang von der primären zur sekundären Immunantwort findet in den B-Zellen des Immunsystems eine Affinitätsreifung der Antikörper statt. Grundlage dafür ist der Prozeß der somatischen Hypermutation, bei dem vor allem im Bereich der CDRs eine sehr stark erhöhte Mutationsrate (bis etwa 10^6 mal höher als bei konstitutiv exprimierten Genen des Grundstoffwechsels) beobachtet wird. – Für die Verbesserung der Affinität rekombinanter Antikörpern *in vitro* wurden verschiedene Techniken entwickelt. Dazu gehören zufällige bzw. gezielte Einführungen von Mutationen in die variablen Teile der für die Antikörper kodierenden DNA-Sequenzen (vor allem im Bereich der CDRs), z.B. durch die Verwendung von *E.coli*-Stämmen mit besonders hohen Mutationsraten, über PCR („error-prone“ PCR, degenerierte Oligonukleotidprimer) oder durch den Austausch von Genabschnitten durch ein Repertoire komplementärer Sequenzen (DNA-"shuffling"). Auf diese Weise entstehen sogenannte sekundäre Antikörper-Banken mit Variationen der Originalsequenz, aus denen sehr häufig bessere oder stärkere Binder isoliert werden können [Adey et al., 1996; Pini und Bracci, 2000].

Die „Phage Display“-Technologie besitzt verschiedene Vorteile:

- Sie ist sehr flexibel. - Es können verschiedene Antikörperformate und Fusionen eingesetzt werden.
- Es werden routinemäßig Banken mit sehr hohen Diversitäten der exprimierten Proteinvarianten verwendet [Hoogenboom et al., 1998].
- Die Selektion der Antikörperfragmente kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgen [McCafferty und Johnson, 1996; Johns et al., 2000]. Dadurch ist auch die Verwendung nicht proteinogener Antigene und nicht physiologischer Bedingungen möglich. Löslichkeit und Bindungseigenschaften der so gewonnen Antikörper können besonders für die Anwendung in Pflanzen vorteilhaft sein, wo ein anderes Milieu als in Tierzellen herrscht.
- Die Selektion durch einen Panningprozeß ist relativ kostengünstig, einfach und schnell durchführbar und benötigt keine Spezialausrüstung. Durch die Wahl bestimmter Selektionsbedingungen und der Stringenz der verwendeten Waschbedingungen kann das Ergebnis modifiziert werden [Hoogenboom et al., 1998].

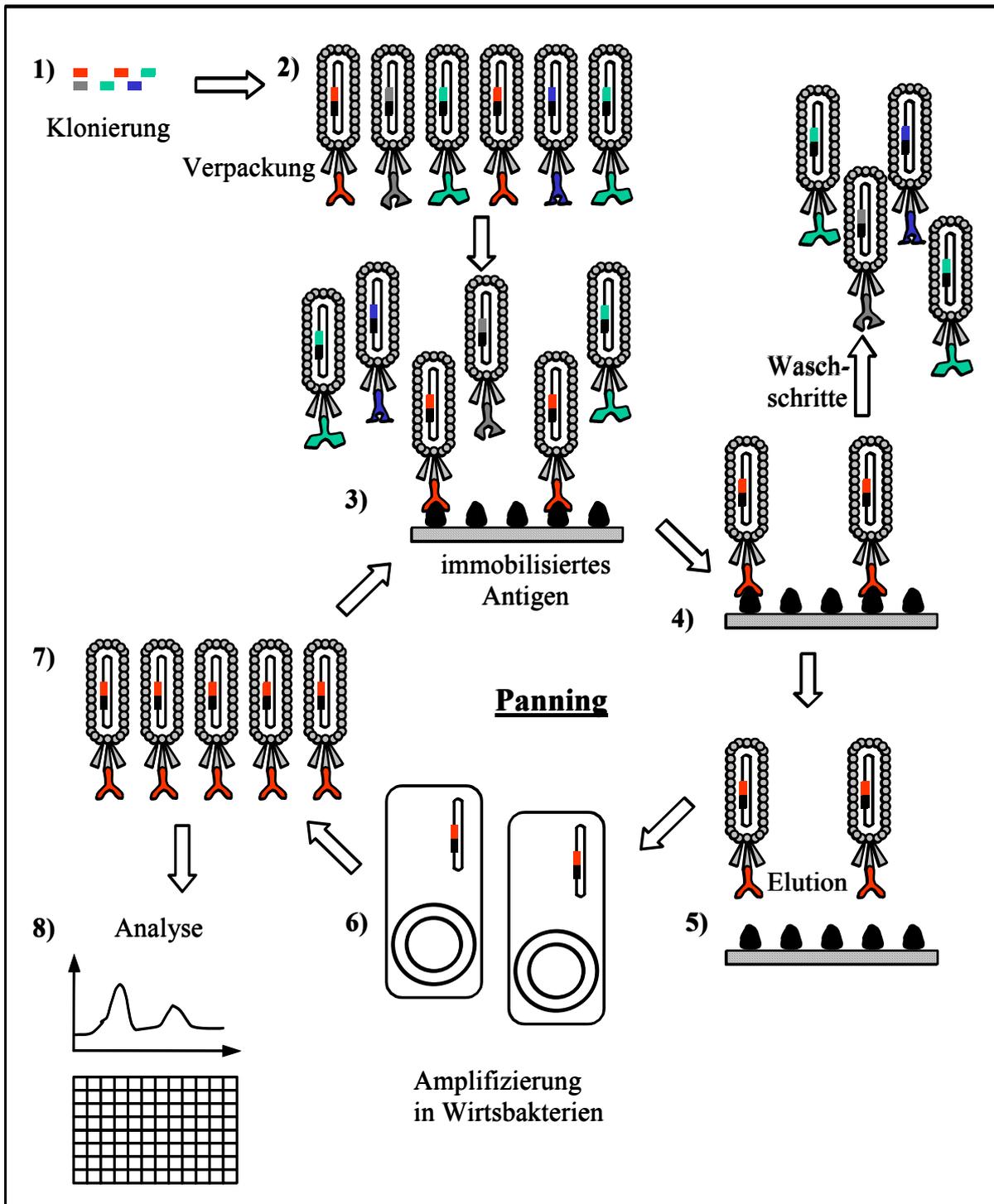


Abb. 5: Schematische Darstellung der Herstellung von einer „Phage Display“-Bank und der Anreicherung von bindenden Molekülen (wie Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten) durch Panning. 1) DNA-Variationen der bindenden Moleküle (z.B. V-Gene von Antikörpern) werden in den Phagemid-Vektor als Fusion mit einem Hüllprotein-Gen eingefügt. 2) Phagemide enthaltende Phagenpartikel präsentieren die Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche. 3) Die rekombinanten Phagen werden mit immobilisiertem Antigen inkubiert. 4) Nicht bindende Partikel werden durch Waschschritte entfernt. 5) Bindende Phagen werden eluiert. 6) Die Replikation der rekombinanten Phagenpartikel erfolgt mit Hilfe von Helferphagen in Wirtsbakterien. 7) Die amplifizierten Phagen werden in einer weiteren Panningrunde erneut mit dem Antigen inkubiert (siehe 3). 8) Die Bindungseigenschaften der einzelnen Klone werden analysiert (beispielsweise durch ELISA oder Oberflächenplasmonresonanz).

1.2.4 Verwendung von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten

Die Anwendungsgebiete monoklonaler Antikörper und rekombinanter Antikörperfragmente sind vielfältig. Sie können z.B. inhibitorische Effekte in dem Organismus hervorrufen, in welchem sie hergestellt werden. So können in Pflanzenzellen exprimierte Antikörper („plantibodies“) Resistenzen gegenüber Pathogenen oder eine Herbizid-Toleranz vermitteln oder auch in der Pflanzenforschung für die Immunmodulation von Phytohormonen und Proteinfunktionen eingesetzt werden [Artsaenko et al., 1995; Überblick bei Conrad und Manteuffel, 2001]. Durch entsprechende targeting-Signale lassen sich die Antikörper theoretisch in fast jedes Kompartiment der pflanzlichen Zelle, beispielsweise das endoplasmatische Retikulum, exportieren [Conrad und Fiedler, 1998].

Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente für Anwendungen *in vitro* können mit Hilfe verschiedenster Expressionssysteme hergestellt werden, welche jeweils ihre eigenen Vor- und Nachteile besitzen. Für die Wahl des jeweiligen Systems spielen die Anforderungen an das Expressionsprodukt und auch die Kosten eine Rolle. Säugerzellkulturen oder transgene Tiere kommen den natürlichen Expressionsbedingungen recht nahe, sind jedoch oft sehr zeit- und kostenintensiv. In der Regel liefern sie richtig gefaltete Antikörper mit geschlossenen Disulfidbrücken und geeigneten posttranslationalen Modifizierungen, z.B. Glykosylierungen [Pollock et al., 1999; Yoo et al., 2002].

Relativ kostengünstige Alternativen sind Expressionssysteme, die auf Bakterien, Hefen oder Pflanzen basieren. Vor allem für Antikörperfragmente mit Disulfidbrücken können die Bedingungen im Zytoplasma dieser Organismen jedoch problematisch sein, weil es zu Fehlfaltungen, Aggregationen und der Bildung von Einschlußkörpern, den sogenannten „inclusion bodies“, kommen kann. Die Rückfaltung der aus den „inclusion bodies“ stammenden, denaturierten Proteine ist möglich, aber teilweise recht schwierig und ineffektiv [Middelberg, 2002]. Durch die Signalpeptid-vermittelte Sekretion in den periplasmatischen Raum können bei *E.coli* häufig funktionale, lösliche Antikörperfragmente erhalten werden. Der Export in andere Zellkompartimente kann nicht nur die Funktionalität verbessern, sondern auch die Menge an Expressionsprodukt erhöhen. Beispiel dafür ist die Akkumulation von scFv im endoplasmatischen Retikulum von Pflanzen [Fiedler und Conrad, 1995; Fiedler et al., 1997; Conrad und Fiedler, 1998].

Rekombinante Antikörperfragmente besitzen verschiedene Vorteile, welche sie für die Anwendung in der Therapie, Diagnostik und Forschung besonders geeignet machen: Durch ihre geringe Größe können sie leicht durch Zellen und Gewebe diffundieren und schnell über

die Niere aus dem Körper ausgeschieden werden [Begent et al., 1996]. Durch Fusionen mit Effektormolekülen, wie Toxinen, Enzymen, Fluoreszenzmarkern oder Radioisotopen, werden deren Funktionen mit den spezifischen Bindungseigenschaften des Antikörpers gekoppelt. Dies findet Anwendung in der Therapie und Diagnostik von Krebs und anderen Erkrankungen oder in der Forschung (ELISA, Western Blots, Durchflußzytometrie, Immunfluoreszenzfärbung) [Mansfield et al., 1997; Huhn et al., 2001].

Aufgrund ihrer spezifischen Antigenbindungseigenschaften können rekombinante Antikörperfragmente auch zur Detektion von Mikroorganismen, Pestiziden, Toxinen u.a. biologischen Spuren mit Proteinchips bzw. Protein-„Mikroarrays“ und für passive Immunisierungen in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden [Crane et al., 1988; Wallach et al., 1990; Larsen et al., 1991; Vukovic et al., 2002; Petrenko und Vodyanoy, 2003]. Rekombinante Antikörper könnten für die Entwicklung von Strategien gegen *Eimeria*-Infektionen hilfreich sein und eine Alternative für Chemotherapeutika und die aktive Immunisierungen mit Lebendvakzinen bieten. Die Penetration von Darmzellen mit *Eimeria*-Sporozoitien ist dabei als erste Konfrontation zwischen dem Huhn und den Parasiten ein wichtiges Ziel für die Unterbindung der Infektion. Antikörper mit der Fähigkeit, invasionsrelevante Oberflächenmoleküle der Sporozoitien zu neutralisieren, wären möglicherweise dazu geeignet, diesen Invasionsvorgang zu hemmen. Einen weiteren Ansatz bei der Entwicklung neuer Antikokzidiostrategien stellt die Hemmung von Signaltransduktionswegen dar, welche die Proteinsekretion und die Motilität des Parasiten reguliert - beides für die Invasion essentielle Prozesse. Bei vielen eukaryotischen Organismen ist bekannt, daß solche Sekretions- und Bewegungsvorgänge durch den Botenstoff Kalzium (Ca^{2+}) vermittelt werden. Es wäre deshalb sinnvoll, die Rolle von Ca^{2+} bei der Invasion von *Eimeria*-Sporozoitien zu untersuchen.

1.3 Kalzium als Botenstoff in eukaryotischen Zellen

1.3.1 Kurzer Überblick

Reaktionen von Zellen auf relevante Signale werden durch vielfältige intrazelluläre Signalübertragungsprozesse reguliert. Eine entscheidende Rolle dabei spielen die sogenannten intrazellulären Mediatoren oder „second messenger“. Zwei der häufigsten intrazellulären Mediatoren sind Ca^{2+} und zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP). Die Veränderung ihrer Konzentration in eukaryotischen Zellen wird über charakteristische Signalwege stimuliert.

Die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma eukaryotischer Zellen ist in der Regel sehr niedrig (etwa 0,1-0,01 μM). Außerdem liegen 50% des Ca^{2+} nicht frei, sondern als Komplex mit Ca^{2+} -

bindenden Proteinen vor. Im extrazellulären Raum (etwa 1mM) und in Ca^{2+} -speichernden Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum, herrscht demgegenüber eine relativ hohe Ca^{2+} -Konzentration. Dieser aktiv aufrecht erhaltene Konzentrationsgradient ist Voraussetzung für eine Signalübertragung durch Ca^{2+} . In der Zytoplasmamembran und den Membranen Ca^{2+} -speichernder Organellen befinden sich Ca^{2+} -spezifische Ionenkanäle. Diese werden durch veränderte Spannungsverhältnisse oder die Bindung von Transmittern bzw. Hormonen an spezielle Rezeptoren kurzzeitig geöffnet. Dadurch kommt es zu einem passiven Einstrom der Ionen und damit zu einem schnellen, vorübergehenden Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma, in Muskelzellen z.B. auf etwa das Hundertfache. Durch die Bindung von Ca^{2+} an bestimmte Proteine, wie das Calmodulin, werden diese aktiviert und regulieren, beispielsweise durch eine reversible Phosphorylierung, wiederum die Funktion anderer Proteine (Troponin C, leichte Ketten des Myosins u.a.), wodurch die Signalübertragung fortgesetzt wird [Alberts et al., 2001]. Zu den durch Ca^{2+} beeinflussten Vorgängen in Säugetieren zählen u.a. Kontraktionen von Muskelzellen, Sekretionsvorgänge von Drüsenzellen, die Aktivierung von Enzymen in Leber, Niere und Pankreas, die Blutgerinnung sowie die Übertragung von Aktionspotentialen über den synaptischen Spalt bei Nervenzellen.

1.3.2 Wirkstoffe, die Kalzium-Signalvorgänge beeinflussen

Die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma eukaryotischer Zellen kann durch verschiedene Wirkstoffe beeinflusst werden, welche deshalb Anwendung bei der Aufklärung von Signalvorgängen finden. Dabei werden direkt oder indirekt Elemente zum Erhalt der zellulären Ca^{2+} -Homöostase bzw. der Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma beeinflusst. Dies kann durch spezielle Farbstoffe mikroskopisch sichtbar gemacht werden [Roos, 2000].

In Abb. 6 sind wesentliche Mechanismen schematisch dargestellt, welche die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen.

Um das für die Signalgebung notwendige Konzentrationsgefälle aufrechtzuerhalten, wird Ca^{2+} durch aktive Transportvorgänge aus dem Zytoplasma entfernt. Dies geschieht durch Ca^{2+} -ATPasen bzw. Ca^{2+} - Na^+ -Austauscher, welche sich in der Zellmembran bzw. den Membranen Ca^{2+} -speichernder Organellen befinden. Die Energie, die für den Ca^{2+} -Transport entgegen dem sehr steilen Konzentrationsgradienten benötigt wird, stammt aus der Hydrolyse von ATP bzw. einem Na^+ -Gradienten.

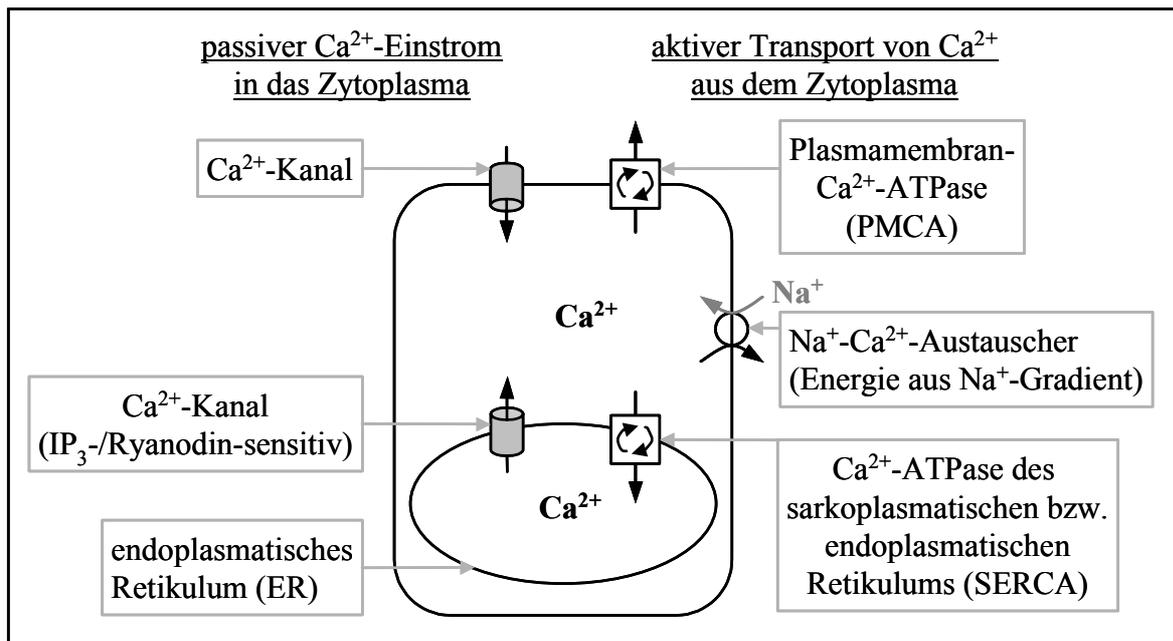


Abb. 6: Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Schematische Darstellung wichtiger Elemente zum Erhalt der Ca^{2+} -Homöostase (rechts) und zum signalvermittelten Ca^{2+} -Einstrom (links).

Thapsigargin, ein zellpermeables Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica*, ist als Inhibitor von Ca^{2+} -ATPasen des sarko- bzw. endoplasmatischen Retikulums (SERCA) bekannt und führt zu einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma [Lyttton et al., 1991]. Der signalvermittelte Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum oder aus Ca^{2+} -speichernden Organellen erfolgt durch spannungs- bzw. rezeptorregulierte Ionenkanäle. Ferner wird davon ausgegangen, daß durch „Lecks“ in den Membranen immer ein gewisser, wenn auch geringer, Ca^{2+} -Fluß entlang des Konzentrationsgradienten stattfindet. Der Einbau von Ca^{2+} -durchlässigen, lipophilen Ionenkanälen (Ca^{2+} -Ionophoren) in die Membranen kann diesen nichtregulierten Ca^{2+} -Einstrom immens verstärken. Beispiele für mehr oder weniger ionenselektive Ca^{2+} -Ionophore sind Kalzimyzin (=A23187) und Ionomycin.

Für den Ca^{2+} -Fluß über die Membran des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums spielen Ionenkanäle eine Rolle, deren Öffnung durch Inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3 -) sensitive Rezeptoren reguliert oder durch die Bindung von Ryanodin beeinflusst werden kann [Zhang et al., 1999]. Ryanodin, ein Alkaloid aus der Pflanze *Ryania speciosa*, stabilisiert in mikromolaren Konzentrationen den offenen Zustand des Ryanodinrezeptors, welcher ein Ca^{2+} -Kanal ist. Dadurch wird z.B. Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulum freigesetzt [Zucchi und Ronca-Testoni, 1997]. Höhere Ryanodinkonzentrationen verursachen jedoch eine dauerhafte Blockierung des Kanals [Buck et al., 1992].

2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) ist eine Verbindung, die lange als nichtkompetitiver Antagonist von IP_3 -Rezeptoren angesehen wurde. Mittlerweile haben jedoch viele Untersuchungen gezeigt, daß die durch 2-APB verursachte Beeinflussung von Ca^{2+} -Kanälen wahrscheinlich unabhängig von IP_3 -Rezeptoren stattfindet [Ma et al., 2001; Prakriya und Lewis, 2001; Bootman et al., 2002].

Der Effekt von Koffein auf eukaryotische Zellen ist sehr komplex. Neben etlichen anderen Vorgängen beeinflusst Koffein als pharmakologischer Antagonist von Ryanodinrezeptorkanälen auch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und hemmt den Abbau eines anderen intrazellulären Mediators, cAMP [Bhat et al., 1997; Holz et al., 1999; Du et al., 2001; Masumiya et al., 2001; Johnson et al., 2002]. Die cAMP- und Ca^{2+} -Wege interagieren miteinander. So beeinflussen durch Ca^{2+} regulierte Proteine die Synthese und den Abbau von cAMP, das wiederum bei der Regulation einiger Ca^{2+} -Kanäle und –Pumpen eine Rolle spielt [Alberts et al., 2001].

Die Konzentrationen an freien Ca^{2+} -Ionen innerhalb der Zelle und im extrazellulären Raum können aber auch direkt durch die Komplexbildung der Ionen mit Chelatbildnern verändert werden. EDTA und EGTA sind mehr oder weniger spezifische Chelatoren für Ca^{2+} , gelangen jedoch nicht ohne weiteres in das Zellinnere. Hydrophobe Ester, wie BAPTA-AM, können durch Membranen diffundieren, werden durch zelleigene Esterasen gespalten und akkumulieren in der Zelle. Sie sind deshalb gut dazu geeignet die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Komplexbildung zu verringern [Mondragon und Frixione, 1996].

1.3.3 Bedeutung von Kalzium für die Wirtszellinvasion durch Zoiten der Apikomplexa

Ein- oder mehrmals im Verlauf ihres Lebenszyklus findet bei den meisten parasitischen Apikomplexa ein Eindringen in die Wirtszellen (Invasion) statt. Dieser besonders auch aus human- und veterinärmedizinischer Sicht entscheidene Schritt ist ein sehr komplexer Prozeß und wird durch Signalvorgänge vermittelt.

Während einige intrazelluläre Parasiten die Ca^{2+} -Signalwege der Wirtszelle nutzen können, benötigen Parasiten, welche aktiv in Wirtszellen eindringen und wieder freigesetzt werden, dafür jedoch ihr eigenes Signalsystem [Gazarini et al., 2003]. Parasitische Protozoen besitzen einige Besonderheiten, was den Erhalt der Ca^{2+} -Homöostase und die Ca^{2+} -Signalwege betrifft: Der Ausstrom von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum kann durch verschiedene Typen Liganden-aktivierter Kanäle erfolgen. Hinweise auf eine IP_3 - oder Ryanodin-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung konnten bisher bei *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica* sowie *Toxoplasma gondii* erhalten werden [Passos und Garcia, 1998].

Es gibt jedoch bisher keine molekulare Evidenz für Homologe von bei Säugetieren bekannten IP₃- o. Ryanodin-Rezeptoren.

Auch der molekulare Nachweis für Na⁺-Ca²⁺- Austauscher fehlt. Ca²⁺-ATPasen wurden jedoch für etliche Protozoen, einschließlich *P.falciparum* und *T.gondii*, beschrieben. Die Ca²⁺-ATPasen von Säugetieren werden durch Ca²⁺-Calmodulin aktiviert. Calmodulin bzw. andere Ca²⁺-bindende Proteine wurden bisher bei allen untersuchten parasitischen Protozoen, darunter *P.falciparum* und *T.gondii*, nachgewiesen [Moreno und Docampo, 2003].

Typische Ca²⁺-Speicherorganellen von Eukaryoten sind das sarkoplasmatische bzw. endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. In einigen Arten des Stammes der Apikomplexa befindet sich die größte intrazelluläre gespeicherte Ca²⁺-Menge in den Azidokalzisomen. Diese Organellen kommen auch in vielen anderen Mikroorganismen, Algen und Schleimpilzen, jedoch nicht in Säugerzellen und auch nicht bei Eimerien vor. Sie haben eine hohe Dichte (in Bezug auf das Gewicht und auch elektronenmikroskopisch), einen sauren pH-Wert und enthalten viel Pyrophosphat, Polyphosphat, Ca²⁺, Mg²⁺ u.a. Elemente [Docampo und Moreno, 2001; Ruiz et al., 2001; Rodrigues et al., 2002]. Des weiteren besitzen Azidokalzisomen eine Ca²⁺-ATPase, und es gibt bei einigen Organismen, wie z.B. *P.falciparum*, auch Hinweise (wenn auch keinen molekularen Nachweis) auf Na⁺-Ca²⁺-Austauscher [Gardner et al., 2002]. Bisher konnte kein Einfluß von intrazellulären Mediatoren auf Azidokalzisomen festgestellt werden. Das an Polyphosphat gebundene Ca²⁺ wird nur bei einer Alkalisierung dieser Organellen, durch beispielsweise NH₄Cl, oder nach der Hydrolyse des Polyphosphates freigesetzt [Docampo und Moreno, 2001; Ruiz et al., 2001]. Die Vakuolen von *P.falciparum* sind weitere als Ca²⁺-Speicher bei Apikomplexa identifizierte Organellen [Bonhomme et al., 1993; Biagini et al., 2003]. Die Rolle von Mitochondrien für die Ca²⁺-Speicherung in parasitischen Protozoen ist unbekannt. In einigen Arten fehlen sie sogar oder sind durch homologe Organellen ersetzt.

Für die Wirtszellinvasion von parasitischen Apikomplexa, wie *T.gondii* oder den verschiedenen *Eimeria*-Arten, spielen aktive Bewegungsvorgänge und die Sekretion invasionsvermittelnder Substanzen aus speziellen Organellen eine entscheidende Rolle [Dubremetz et al., 1998]. Die meisten Apikomplexa dringen als bewegliche Zoiten in die Zelle ein. Zoiten besitzen zwar weder Zilien noch Flagellen und können auch nicht in flüssigen Medien schwimmen, haben jedoch die Fähigkeit, sich durch sogenanntes „Gleiten“ über feste Substrate fortzubewegen. Dabei verändert sich nicht die Form der Zelle, wie es

beispielsweise für die Fortbewegungsweise mancher Tierzellen und amöboider Protozoen typisch ist. Verschiedene Beobachtungen ergaben, daß die Zoiten Moleküle an ihrer Oberfläche binden und an ihren hinteren Zellpol transportieren. Dabei werden die selben Geschwindigkeiten wie beim Vorwärtsgleiten erreicht – bis zu 10µm/s [Menard, 2001]. Während des Invasionsvorgangs am apikalen Ende sekretierte Proteine, wie das Mikronemenprotein Etmic2, werden über diesen Mechanismus in Richtung des hinteren Pols über die Zoitenoberfläche verteilt [Tomley et al., 1996; Bumstead und Tomley, 2000]. An Bewegungs- und Transportvorgängen bei Zoiten ist sehr wahrscheinlich ein Aktomyosin-Komplex beteiligt, bei welchem Aktinfilamente das „Gerüst“ für Myosin-„Motoren“ bilden. Hinweise dafür sind Untersuchungen mit *Eimeria*-Sporozoitin in Gegenwart von Cytochalasin D, einem die Aktin-Polymerisierung störenden Wirkstoff: Hier wurde eine Hemmung der Beweglichkeit und des Proteintransportes über die Zelloberfläche beobachtet [Dubremetz und Ferreira, 1978; Bumstead und Tomley, 2000]. Des weiteren wurden Myosine bei fast allen wichtigen Gattungen der Apikomplexa, einschließlich *Plasmodium*, *Neospora*, *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Babesia*, *Toxoplasma* und *Cryptosporidium* identifiziert [Heintzelman und Schwartzman, 2001]. Die Rolle von Ca^{2+} für durch Myosin vermittelte Kontraktionsvorgänge ist vor allem bei Säugetieren sehr gut erforscht. Es liegt die Vermutung nahe, daß Ca^{2+} auch für die Bewegungsvorgänge während der Invasion von Zoiten der Apikomplexa von Bedeutung ist.

Hinweise dafür geben zahlreiche Untersuchungen vor allem an Tachyzoiten von *T.gondii*, einem den Eimerien nahe verwandten Parasiten. Bei dieser Art wurde eine Ca^{2+} -ATPase-Aktivität, eine wahrscheinlich an der Invasion beteiligte spezifisch durch Ca^{2+} aktivierte Protease, eine Ca^{2+} -abhängige Phospholipase und eine die Anheftung an die Wirtszelle regulierende Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase beschrieben [Saffer und Schwartzman, 1991; Bouchot et al., 2001; Kieschnick et al., 2001; Song und Nam, 2003]. Außerdem haben Versuche mit Ca^{2+} -Ionophoren (Kalzimyzin, Ionomycin), intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Chelatoren (BAPTA-AM, EGTA), Antagonisten und Agonisten für Ca^{2+} -Kanäle bzw. assoziierte Rezeptoren (Ryanodin, Xestospongine C, Koffein, Ethanol) und Inhibitoren für Ca^{2+} -ATPasen (Thapsigargin) gezeigt, daß Ca^{2+} von entscheidender Bedeutung für die Invasion von *T.gondii* und damit verbundenen Prozessen, wie der Sekretion von Mikronemen und der Ausstülpung des Konoids, ist [Mondragon und Frixione, 1996; Carruthers et al., 1999; Carruthers und Sibley, 1999; Lovett et al., 2002]. Eine wesentliche Ca^{2+} -Quelle für das Signalsystem in *T.gondii* sind sehr wahrscheinlich intrazelluläre Speicher [Vieira und Moreno, 2000; Lovett und Sibley, 2003b]. Erkenntnisse über die Signalvorgänge und die

Rolle von Ca^{2+} bei der Wirtszellinvasion und anderen Vorgängen innerhalb des Lebenszyklus von *T.gondii* sind in den Abhandlungen von Arrizabalaga und Boothroyd [2004], Bonhomme et al. [1999] sowie Hoff und Carruthers [2002] ausführlich dargestellt.

Die Rolle von Ca^{2+} bei der Invasion von Eimerien ist weit weniger gut aufgeklärt. Im Gegensatz zu *T.gondii* konnte durch Ethanol, Ca^{2+} -Ionophoren (Ionomyzin, Kalzimyzin) oder BAPTA-AM die Sekretion von Mikronemenproteinen nicht induziert werden [Wiersma et al., 2004]. Es wurden jedoch Proteine, welche Ca^{2+} -bindende Regionen enthalten, beschrieben. Diese besitzen Calmodulin-homologe Ca^{2+} -Bindungsdomänen oder sind Mitglieder der TRAP („thrombospondin-related anonymous protein“-)Proteinfamilie, welche sich durch das Vorhandensein von Ca^{2+} -Bindungsdomänen auszeichnet [Dunn et al., 1996c; Witcombe et al., 2003; Witcombe et al., 2004]. Außerdem wurde für *E.maxima* ein Protein beschrieben, das Homologie zu einer Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase aufweist, die ebenfalls Homologie zu einem bei *P.falciparum* beschriebenen Molekül aufweist [Bumstead et al., 1995].

Bei parasitischen Protozoen steuern Ca^{2+} -Signalvorgänge ebenfalls die Melatonin-Modulation des zirkadianen Rhythmus bei *P.falciparum*, Differenzierungsprozesse sowie die Expression bestimmter Gene [Hotta et al., 2000; Gilchrist et al., 2003]. Die Bedeutung von Ca^{2+} für *P.falciparum* dokumentieren etliche klinisch wirksame Antimalariawirkstoffe (Quinin, Quinakrin, Chloroquin), die als Ca^{2+} - und Calmodulin-Antagonisten wirken [Scheibel, 1992].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Kokzidiose bei Hühnern verursacht bedeutende wirtschaftliche Verluste. Durch die Entwicklung von resistenten *Eimeria*-Stämmen verlieren immer mehr der etablierten Antikokzidien an Wirksamkeit. Des Weiteren ist eine aktive Immunisierung mit Lebendvakzinen speziell für Jungtiere häufig nicht ausreichend. Es besteht deshalb ein großer Bedarf an neuen Strategien für die Bekämpfung von *Eimeria*-Infektionen beim Haushuhn.

Die Penetration von Darmzellen durch *Eimeria*-Sporozoiten ist die erste Auseinandersetzung zwischen Wirt und Parasit. Diesen Invasionsorgang zu hemmen, sollte deshalb ein Ziel bei der Entwicklung neuer Ansätze in der Therapie und Prophylaxe von durch Eimerien verursachter Kokzidiose sein.

Um dies zu erreichen, werden in der vorliegenden Arbeit zwei Wege beschritten: mit einem Ansatz, der sich auf die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion bezieht, sowie mit dem Versuch, Antikörperfragmente zu isolieren, die durch eine Neutralisation relevanter Oberflächenproteine des Parasiten eine indirekte Hemmung der Wirtszellinvasion ermöglichen.

E.tenella ist eine der am stärksten pathogenen *Eimeria*-Arten. Beim Invasionsvorgang von Sporozoiten wird Etmic2, ein Mikronemenprotein, sekretiert und auf der Oberfläche des Parasiten verteilt [Tomley et al., 1996; Bumstead und Tomley, 2000]. Die Exozytose von Mikronemen und anderen Organellen ist essentiell für die Wirtszellinvasion. Man kann deshalb annehmen, daß auch Etmic2 für diesen Vorgang von Bedeutung ist. Gegen Etmic2 gerichtete Antikörper oder Antikörperfragmente könnten demnach eine invasionshemmende Wirkung besitzen. In der vorliegenden Arbeit sollten Einkettenantikörper (scFv) unter Verwendung der „Phage Display“-Technologie isoliert werden, die auch im Bereich der *Eimeria*-Forschung bereits Anwendung gefunden hat [da Silva, 2002]. Ausgangspunkt dafür war eine „Phage Display“-Bank mit einer Vielzahl von scFv, deren Grundlage das Repertoire der exprimierten V-Gene von u.a. mit *E.tenella*-Sporozoiten immunisierten Mäusen darstellt. Die Seren dieser Mäuse waren in einem indirekten Immunfluoreszenz-Antikörper-Test untersucht worden und hatten dabei eine Bindung an *E.tenella*-Sporozoiten gezeigt. Es besteht deshalb eine große Wahrscheinlichkeit, daß die Mäuse auch Antikörper gegen das in Sporozoiten nachgewiesene Etmic2 besitzen [Tomley et al., 1996]. Die Isolierung von Etmic2 aus *E.tenella* ist aufwendig, langwierig und setzt relativ große Mengen an Ausgangsmaterial voraus. Es ist deshalb nicht praktikabel, auf diesem Wege die Antigenmengen herzustellen, welche für die Anreicherung von anti-Etmic2-scFv über mehrere Selektionsrunden erforderlich sind. Etmic2 sollte darum kloniert und in rekombinanter Form exprimiert werden. Nach dem Panning sollten verschiedene Tests zur Charakterisierung der isolierten putativen anti-Etmic2-scFv durchgeführt werden.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß Ca^{2+} eine wichtige Rolle für den Invasionsvorgang von *T.gondii*-Tachyzoiten spielt. Über die Bedeutung von Ca^{2+} für *E.tenella* ist jedoch weit weniger bekannt. Aufgrund von Erkenntnissen bei der nahe verwandten Art *T.gondii* ist zu vermuten, daß der Botenstoff Ca^{2+} auch bei Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt, die invasionsrelevante Sekretions- und Bewegungsvorgänge von *Eimeria*-Sporozoiten regulieren. Es sollte deshalb untersucht werden, ob und inwieweit veränderte Ca^{2+} -Bedingungen die Invasionsfähigkeit von *E.tenella*-Sporozoiten beeinflussen können. Dafür sollten *in vitro* mit Hilfe eines Sporozoiten-Invasionshemmtests die Infektionsraten bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen untersucht und außerdem die Effekte bestimmter Stoffe getestet werden, von denen bekannt ist, daß sie eine Wirkung auf Ca^{2+} -Signalsystem von eukaryotischen Zellen besitzen. Entsprechende Ergebnisse könnten zum besseren Verständnis des Invasionsvorgangs beitragen, das für die Entwicklung alternativer Antikokzidiosestrategien notwendig ist.

2 Material

2.1 Geräte

| | |
|--|---|
| Amersham Pharmacia: _____ (Freiburg) | Stromversorgungsgerät „EPS 301“, vertikale Elektrophoresesysteme und Blotmodule „miniVE“, „SE600“ und „TE 62“, Gelelektrophoreseapparatur „GNA-100“, Photometer „Ultrospec 2100 pro“, Geldokumentationsgerät „ImageMaster VDS-CL“, Äkta™FPLC-System mit Fraktionssammler „Frac950“, 254 nm UV-Detektor und „Unicorn 4.0“-Software |
| Becton&Dickinson: _____ (Franklin Lakes NJ, USA) | Durchflußzytometer „BD FACSAria™“ mit „BD FACSDiva™“-Software |
| Biacore: _____ (Uppsala, Schweden) | Biacore® X mit „BiacoreX Control“-Software |
| Binder: _____ (Tuttlingen) | CO ₂ -Inkubator „CB150“ |
| Brand: _____ (Wertheim) | Zählkammer nach Neubauer |
| Eppendorf: _____ (Hamburg) | Thermomixer „comfort“, Elektroporator 2510, „Mastercycler gradient“ (PCR-Gerät) |
| Hewlett-Packard: _____ (Böblingen) | Flachbettscanner „ScanJet 6300C“ |
| Hund: _____ (Wetzlar) | Umkehrmikroskop „Wilovert S“ mit Digitalkameraaufsatz von JVC und MicroCom-Software Version 22.4.1 |
| GFL: _____ (Burgwedel) | Schüttelwasserbad Typ 1092, Wippschüttler Typ 3013 |
| IKA: _____ (Staufen) | beheizbarer Magnetrührer „RH basic“ |
| Johanna Otto GmbH: _____ (Hechingen) | Universalschüttler „SM-30 Control“ mit Thermohaube „TH 30“ |
| Jouan: _____ (Winchester VA, USA) | Hochgeschwindigkeitszentrifuge „KR25i“ |
| JVC: _____ (Friedberg) | Digitalkameraaufsatz für Umkehrmikroskop |
| Kendro: _____ (Hanau) | Sicherheitswerkbank „HERAsafe“, reine Werkbank „HERAGuard HPH“, Zentrifugen „Heraeus Biofuge pico / fresco“, „Heraeus Megafuge 1.0R“, „Sorvall Evolution RC“, Ultratiefkühlschrank „Heraeus HERAfreeze“, mikrobiologische Brutschränke „Heraeus Funktion Line 7000“ |
| Knick: _____ (Berlin) | pH-Meter „766 Calimatic“ |
| Napco: _____ (Winchester VA, USA) | Kühlzentrifuge „Napco 2019R“ |

| | |
|--|--|
| Peqlab: _____ (Erlangen) | Minigelsystem „PerfectBlue L” |
| Scanalytics: _____ (Fairfax VA, USA) | Bildverarbeitungsprogramm für Fluoreszenzmikroskop „IPLab Spectrum H-SU2“ |
| Shandon: _____ (Dreieich) | Zytozentrifuge “Cytospin 3” |
| Tecan: _____ (Crailsheim) | Mikrotiterplattenwaschgerät „Columbus plus“, Mikrotiterplattenlesegerät „Spectra“ |
| Zeiss: _____ (Jena) | Fluoreszenzmikroskop „Axiophot2“ |

2.2 Speziallabormaterial

| | |
|---|---|
| Amersham Pharmacia: _____ (Freiburg) | Q-Sepharose Fast Flow Material, PD10- Entsalzungssäulen |
| Biacore: _____ (Uppsala, Schweden) | Sensorchip CM5 (Research Grade) |
| Dow: _____ (Midland MI, USA) | Saranfolie (zum Einschließen von Immunoblots während der Inkubation mit kleinen Volumina Antikörperlösung) |
| Greiner: _____ (Solingen) | Polystyrol-96-Loch-Zellkulturplatte mit V-Boden |
| Heinemann: _____ (Göttingen) | GB 33 Blottingpapier B003 |
| K:R. Anderson Inc.: _____ (Morgan Hill, Kanada) | Permacell P-422 1 (Klebeband zum Versiegeln von Mikrotiterplatten) |
| Merck: _____ (Darmstadt) | Ni-NTA-Agarose |
| Nalgene: _____ (Rochester NY, USA) | Sterilfiltervorsätze für Spritzen (0,2 µm, 0,45 µm) |
| Nunc: _____ (Roskilde, Dänemark) | MaxiSorp™-Mikrotiterplatte, Polystyrol-96-Loch-Flach- bodenplatte, Nunclon™ΔSurface 48- und 96-Loch-Zell- kulturplatten, Nunclon™ΔSurface Zellkulturflaschen, Glas- objektträger „Lab-Tek™ CC Chamber Slides“ (16 Kavitäten) |
| Schleicher & Schüll: _____ (Dassel) | Nitrozellulosemembran Protran® BA 85 |

2.3 Chemikalien, Reagenzien

| | |
|--|--|
| Becton&Dickinson: _____ (Franklin Lakes NJ, USA) | Hefeextrakt, Trypton, Bacto®-Agar |
| Biacore: _____ (Uppsala, Schweden) | Kopplungsreagenzien: N-Ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl)- karbodiimid Hydrochlorid (EDC), N-Hydroxysuccinimid (NHS), Ethanolamin |
| BioVectra: _____ | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-(BCIP-)p-Toluidinsalz |

(Charlottetown PE, USA)

Duchefa: _____ Ampizillin-Natrium, Kanamyzin-Monosulfat
(Brüssel, Belgien)

Invitrogen: _____ Penizillin/Streptomycin, fötales Kälberserum (FCS, #10108), Succinimidylester des Karboxyfluoreszeindiazetats (CFDA-SE), Ryanodin, BODIPY[®] FL-X Ryanodin, Calcium Green-1 AM, Bis(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA)
(Karlsruhe)

MBI Fermentas: _____ Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)
(St. Leon-Rot)

Merck: _____ Tetrazyklin, 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)
(Darmstadt)

Roth: _____ Ammoniumchlorid, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Roti[®] Block-Lösung
(Penzberg)

Sigma: _____ Koffein, Thapsigargin, A23187 (Kalzimyzin), Propidiumjodidlösung (1 mg/ml), Eserin, Trypanblaulösung (0,4 %)
(Saint Louis MO, USA)

Alle weiteren Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Sigma (Saint Louis MO, USA) bezogen.

2.4 Kits

Bio-Rad: _____ zur Proteinquantifizierung nach Bradford [1976]
(Hercules CA, USA)

Invitrogen: _____ TA Cloning[®] Kit
(Karlsruhe)

Macherey & Nagel: _____ NucleoSpin[®] Extract Kit
(Düren)

Qiagen: _____ MinElute Gel Extraction Kit, MinElute PCR Purification Kit
(Hilden)

Roche: _____ Cell Proliferation Kit I (MTT), Cytotoxicity Detection Kit (LDH)
(Penzberg)

2.5 Marker

Eurogentec: _____ DNA-Größenstandard „SmartLadder“
(Seraing, Belgien)

New England Biolabs: _____ vorgefärbter Proteinmarker (6-175 kDa)
(Frankfurt a. M.)

2.6 Enzyme

Invitrogen: _____ T4 DNA-Ligase, Trypsin
(Karlsruhe)

New England Biolabs: _____ Shrimp alkalische Phosphatase, Restriktionsendonukleasen
(Frankfurt a. M.)

Peqlab: _____ Taq-DNA-Polymerase
(Erlangen)

Serva: _____ RNase A
(Heidelberg)

Stratagene: _____ PfuTurbo[®] DNA-Polymerase
(La Jolla CA, USA)

2.7 Antikörper

Zur Verdünnung der Antikörper wurden folgende Lösungen verwendet: 2 % BSA / PBS (ELISA), 1 % BSA / TBS / 0,05 % Tween[®]20 (Immunoblot), 1 % BSA / PBS (CAT), 1 % BSA / PBS / 0,1 % Tween[®]20 (IFAT).

2.7.1 Primäre Antikörper

dianova: _____ polyklonales Ziege-anti-Maus-IgG
(Hamburg) Fangantikörper für CAT: 10 µg/ml

Eurogentec: _____ Maus-Serum gegen rekombinantes Etmic2
(Seraing, Belgien) (anti-rEtmic2-Serum)
Western: 1:5.000
Nachweis mit anti-Maus-IgG-AP
IFAT: 1:100
Nachweis mit anti-Maus-IgG-FITC

Sigma: _____ monoklonales Maus-anti-Polyhistidin-IgG Klon HIS-1
(Saint Louis MO, USA) Immunoblot: 1:3.000
Nachweis mit anti-Maus-IgG-AP

PD. Dr. Udo Conrad: _____ Maus-anti-*c-myc*-IgG aus dem Überstand der
(IPK Gatersleben) Hybridomzelllinie 9E10 [Evan et al., 1985]
Das Epitop stammt aus dem humanen Proto-Onkogen p62, *c-myc* [Bernard et al., 1983; Hilpert et al., 2001].
Immunoblot: 1:50
Nachweis mit anti-Maus-IgG-AP

Dr. Fiona Tomley: _____ Kaninchen-Serum gegen natives Etmic2
(IAH, Compton, UK) (anti-nEtmic2-Serum)
Western: 1:5.000
Nachweis mit anti-Kaninchen-IgG-AP
kompetitiver ELISA: 1:900

Dipl.-Troph. Doreen Jahn: _____ monoklonales Maus-IgG (mAK) aus Hybridomüberstand
(Novoplant GmbH) (Zelllinie zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rolf Entzeroth, TU Dresden), hemmende Wirkung auf Invasion von *E.tenella*-Sporoziten bekannt [Zgrzebski, 1994]

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Amersham Pharmacia: _____ monoklonales Maus-anti-M13-IgG-POD-Konjugat
(Freiburg) ELISA: 1:5.000

dianova: _____ polyklonales Ziege-anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat
(Hamburg) IFAT: 1:30

| | |
|--|---|
| Qiagen: _____ (Hilden) | Maus-anti-His-IgG-POD-Konjugat ELISA: 1:1.000 Maus-anti-penta-His-IgG-AlexaFluor® 488-Konjugat IFAT: 1:20 |
| Sigma: _____ (Saint Louis MO, USA) | polyklonales Kaninchen-anti-Maus-IgG-AP-Konjugat Immunoblot: 1:30.000 polyklonales Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat Immunoblot: 1:10.000 ELISA: 1:100 |
| 2.8 Lösungen und Puffer | |
| Antifade-Lösung: _____ | „Vectashield“ (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) |
| Biacore- Kopplungspuffer: _____ | 10 mM Natriumazetat, pH 4,0-5,5 |
| Biacore- Regenerationspuffer: _____ | 10 mM Glyzin-HCl, pH 2,0-3,0 |
| Coomassie-Färbelösung: _____ | 2,5 g/l Coomassie Brilliant Blau R-250, 50 % Methanol, 7 % Essigsäure |
| Coomassie- Entfärbelösung: _____ | 40 % Methanol, 7 % Essigsäure |
| DMEM-light _____ | 813 µM MgSO ₄ , 5,33 mM KCl, 44,05 mM NaHCO ₃ , 110,34 mM NaCl, 916 µM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM Glukose, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES, pH 7,4 |
| DNA-Probenpuffer (10x): _____ | 2,5 g/l Bromphenolblau, 2,5 g/l Xylenzanol, 50 mM Tris-HCl, 60 % Glyzerol, pH 7,6 |
| EB: _____ | 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 |
| HBSS (10x): _____ | Invitrogen (Karlsruhe) |
| HBS-EP: _____ | 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Tween® 20, pH 7,4 |
| 1M HEPES: _____ | steril für Zellkultur (Sigma, Saint Louis MO, USA) |
| IMAC-Bindepuffer: _____ | 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9 |
| IMAC-Elutionspuffer: _____ | 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9 |
| IMAC-Waschpuffer: _____ | 60 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9 |
| 100mM Natrium-Pyruvat: _____ | steril für Zellkultur (Sigma, Saint Louis MO, USA) |
| NBT/BCIP-Substratlösung: _____ | 330 mg/l NBT, 165 mg/l BCIP, 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5 |
| PE-Puffer: _____ | 500 mM Saccharose, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 |
| PBS: _____ | 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na ₂ PO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 |
| PBS/T: _____ | PBS mit 0,05 % Tween® 20 |

| | | |
|---------------------------------------|-------|--|
| Phagen- verdünnungspuffer: | _____ | 10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 |
| Puffer A: | _____ | 20 mM MES, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, pH 6,0 |
| Puffer B: | _____ | Puffer A mit 1 M NaCl |
| SDS- Elektrophoresepuffer: | _____ | 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glyzin, 0,1 % SDS, pH 8,3 |
| SDS-Ladepuffer (2x): | _____ | 150 mM Tris-HCl, 15 % Merkaptoethanol, 1,2 % SDS, 18 mg/l Bromphenolblau, 33 % Glycerol, pH 6,8 |
| SDS-Transferpuffer: | _____ | SDS-Elektrophoresepuffer mit 20 % Methanol |
| TBE: | _____ | 89 mM Tris-Borat, 20 mM EDTA, pH 8,0 |
| TBS: | _____ | 10 mM Tris-HCl, pH 7,9 |
| TBS/T: | _____ | TBS mit 0,5 % Triton X |
| TFB1: | _____ | 30 mM Kaliumazetat, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerol |
| TFB2: | _____ | 10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15 % Glycerol |
| TMB-Substratlösung: | _____ | 100 mg/l TMB, 100mM Natriumazetat, 0,006 % H ₂ O ₂ pH 6,0 |
| TN-Puffer: | _____ | 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 2 mM PMSF, pH 7,9 |
| TP: | _____ | 100 mM KCl, 30 mM CaCl ₂ , 50 mM MgCl ₂ , 1,5 % PEG 6000 |

2.9 Medien

| | | |
|------------------|-------|---|
| DMEM: | _____ | Invitrogen (Karlsruhe), enthält 4,5 g/l Glukose, 580 mg/l Glutamin, vor Gebrauch 1 mM Natrium-Pyruvat, 10 mM HEPES, 2 % Penizillin/Streptomycin und 2,5 % bzw. 10 % hitzeinaktiviertes FCS zugefügt. |
| LB: | _____ | 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 171 mM NaCl, pH 7,0 |
| SOC: | _____ | 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glukose, pH 7,0 |
| TYE: | _____ | 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, pH 7,5 |
| TYM: | _____ | 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO ₄ |
| 2x YT: | _____ | 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5mM NaCl, pH7,0 |
| 2x YT/GA: | _____ | 2x YT mit 50 mM Glukose und 100 µg/ml Ampizillin |
| 2x YT/AK: | _____ | 2x YT mit 100 µg/ml Ampizillin und 70 µg/ml Kanamycin |

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem entsprechenden Medium 15 % Agar und zur Herstellung von Topagar 0,7 % Agarose zugegeben.

2.10 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (Haverhill CB, USA) synthetisiert.

mic2.1 _____ 5'-ATG GCT CGA GCG TTG TCG-3'
 mic2.2 _____ 5'-TCA GGA TGA CTG TTG AGT-3'
 NdeImic2 _____ 5'-CAT TCC ATA TGG CTC GAG CG-3'
 EagImic2 _____ 5'-GTC CCG GCC GAT GAC TGT TGA GTG TCA C-3'
 EM2BamHI_for _____ 5'-AGG AGA GGA TCC TAT GGC TCG AGC G-3'
 EM2BamHImyc_rev _____ 5'-GCA GCG GAT CCT CAT AGG TCT TCT TCT GAG A
 TC AGC TTT TGT TCC GAT GAC TGT TGA GTG TC-3'

2.11 Vektoren

Stratagene: _____ pBluescript® SK+ (pBSK), Amp^r
 (La Jolla CA, USA)

Merck: _____ pET21b, pET22b [Studier und Moffatt, 1986; Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990], Amp^r

Affimed Therapeutics: _____ pEXHAM1, Amp^r
 (Heidelberg)

2.12 Phagen

Für die Herstellung rekombinanter Phagen wurden **M13KO7 Helferphagen** (Stratagene, La Jolla CA, USA) verwendet. M13KO7 ist ein Derivat von M13mp1 und besitzt den Replikationsursprung p15A und das Kanamycinresistenzgen von Tn903.

2.13 *Escherichia coli*-Stämme

XL1-Blue MRF': _____ $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44$
 $thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10$
 (Tet^r)]

HB2151: _____ $K12 ara \Delta(lac-pro) thi/F' proA^+ B^+ lacI^qZ\Delta M15$

BL21(DE3) pLysS: _____ $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^r)$

3 Methoden

3.1 Klonierung und Sequenzierung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Standardmethoden wurden wie bei Sambrook und Russell [2001] beschrieben bzw. wie von den Herstellern der entsprechenden Enzyme und Kits angegeben durchgeführt. Dazu gehören die Anzucht von Bakterien, die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (durch alkalische Lyse), die Fällung von Nukleinsäuren (mit Natriumazetat und Ethanol bzw. Isopropanol), die Quantifizierung von DNA (bei 260 nm bzw. der Vergleich mit Standards nach Ethidiumbromidfärbung), Restriktionsspaltungen, die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen und die Isolation von DNA-Fragmenten aus denselben, die Dephosphorylierung der Enden von Vektor-DNA sowie die Ligation von Vektor- und Insert-DNA. Die Sequenzierung von Klonierungsprodukten wurde bei MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

Für die PCR-Ansätze wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l 2,5U PfuTurbo[®]-DNA-Polymerase, je 200 nM der beiden Oligonukleotide, je 200 μ M der vier Desoxyribonukleotide und 1 μ l Vorlage-DNA verwendet.

Nach einer initialen Denaturierung bei 94°C (2 min) wurden 30 Amplifikationszyklen durchgeführt [Mullis und Faloona, 1987]. Diese bestanden jeweils aus einer Denaturierung bei 94°C (1 min), der Anlagerung der Oligonukleotide bei 50°C (1 min) und ihrer Verlängerung durch die DNA-Polymerase bei 72°C (2 min). Abschließend wurde nochmals 5 min bei 72°C inkubiert, um evtl. noch unvollständige DNA-Stränge zu komplettieren.

Der PCR-Ansatz wurde dann mit DNA-Probenpuffer versetzt und in Ethidiumbromidhaltigem, 1 %igem Agarosegel unter Verwendung von TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die unter UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente wurden mittels NucleoSpin[®] Extract- bzw. MinElute-Kit aus dem Gel isoliert und in Wasser bzw. EB-Puffer aufgenommen.

Die PCR-Fragmente und die Vektor-DNAs wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten. Um einer Rezirkularisierung der linearisierten Vektor-DNA, wie sie besonders bei ungerichteten Ligationen stattfindet, entgegenzuwirken, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA mittels alkalischer Phosphatase entfernt. Die Reaktionsprodukte wurden, wie bereits für PCR-Ansätze beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und die benötigten DNA-Fragmente isoliert.

Für den Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde die DNA mit Ligasepuffer und T4-DNA-Ligase wie vom Hersteller angegeben über Nacht bei 14°C (Ligation mit glatten Enden) bzw. wenigen Stunden bei Raumtemperatur (Inkubation mit überhängenden Enden) inkubiert

(Endvolumen: 10-20 μ l). Linearisierte Vektor-DNA und DNA-Fragment wurden dabei in molaren Verhältnissen von 1:1 bis 1:10 eingesetzt. Kontrollen dienten Ansätze ohne DNA-Fragment bzw. ohne Ligase.

Für die Transformation von *E.coli* mit Ligationsprodukten bzw. für die Überführung der Expressionsvektoren vom für die Klonierung genutzten Stamm XL1-Blue in den Expressionsstamm BL21(DE3) pLysS wurden zum einen die Elektroporation [Sambrook und Russell, 2001] und alternativ die PEG-Methode verwendet:

Für die Herstellung PEG-kompetenter Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 100 μ l dieser Übernachtskultur dienten zum Beimpfen von 10 ml TYM-Medium. Nachdem diese Kultur unter Schütteln bei 37°C eine OD₆₀₀ von 0,2-0,6 erreicht hatte, wurden 40 ml und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,9 nochmals 200 ml TYM zugegeben. Nachdem diese Kultur wiederum eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte, wurde sie 30 min in einem Eiswasserbad abgekühlt und die Zellen 15 min bei 2.000 x g und 4°C in vorgekühlten Zentrifugenbechern pelletiert. Die anschließend vorsichtig in 100 ml eiskaltem TBF1 resuspendierten Zellen wurden nochmals für 8 min bei 2.000 x g und 4°C zentrifugiert und danach in 10 ml eiskaltem TFB2 resuspendiert. Die Lagerung der aliquotierten, kompetenten Zellen erfolgte nach schnellem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C.

Für die Transformation wurden 1 μ l Plasmid-DNA bzw. maximal 20 μ l Ligationsansatz mit TP-Puffer auf 100 μ l aufgefüllt, auf Eis gekühlt, mit 100 μ l kompetenten Zellen (auf Eis aufgetautes Aliquot) gemischt, 15 bis 30 min auf Eis und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu ermöglichen, wurde der Transformationsansatz mit 1 ml SOC gemischt, etwa 1 h bei 37°C geschüttelt, auf LB-Agar / 100 μ g/ml Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2 Darstellung und Reinigung von Etmic2 und scFv

3.2.1 Expression in *E.coli* und Zellaufschluß

Eine schnelle und effiziente Darstellung von Proteinen ist mit Hilfe bakterieller Expressionsysteme möglich. Für die Expression mit dem pET-System (pET21b-Etmic2-His und pET22b-Etmic2-*c-myc*) wurde der Wirtstamm BL21(DE3)pLysS verwendet.

Die Expression der scFv (pEX-HAM-scFv), welche durch eine Selektion an immobilisiertem Etmic2 (vgl. 3.4.3) erhalten wurden, erfolgte in HB2151.

Der „Phage Display“-Vektor pEXHAM (Affimed Therapeutics, Ladenburg) ermöglicht nicht nur die Herstellung rekombinanter scFv-präsentierender Phagen, sondern auch die Expression

des freien scFv. Grund dafür ist das amber-Stopkodon TAG [Brenner und Stretton, 1964], welches sich hinter den Sequenzen für das scFv und für den His-Tag befand (siehe Seite 41 Abb. 7). Bestimmte *E.coli*-Stämme, die sogenannten amber-Suppressor-Stämme, besitzen eine amber-Suppressor-tRNA für das Kodon UAG, wodurch die Synthese des Polypeptids an dieser Stelle nicht abbricht. [Kaplan et al., 1965; Stretton und Brenner, 1965; Smith et al., 1966]. XL1 Blue (*supE*) z.B., kann an dieser Stelle ein Glutamin einfügen. Dadurch bricht die Translation am UAG nicht ab, das scFv wird als Fusion mit pIII exprimiert und so am Vorderende der rekombinanten Phagen präsentiert. HB2151 gehört zu den *E.coli*-Stämmen, welche nicht über amber-Suppressor-tRNA verfügen. Die Translation des scFv bricht nach dem His-Tag am amber-Stopkodon ab. Für die Expression von scFv ohne pIII war also nur ein Wechsel des Expressionsstammes und keine Umklonierung erforderlich [Hoogenboom et al., 1991].

Die Expression von durch einen *lacZ*-Promotor regulierten Genen findet in geringerem Umfang auch ohne den synthetischen Induktors IPTG statt [De Bellis und Schwartz, 1990]. Weil die dabei exprimierten Fremdproteine Wachstum und Entwicklung des Bakteriums hemmen könnten, wurde beim Heranwachsen der Expressionskultur Glukose zugesetzt. Dieses Monosaccharid bewirkt eine verringerte cAMP-Konzentration und führt durch diese sogenannte Katabolit-Repression u.a. zur Inaktivierung des *lacZ*-Promotors [Beckwith und Zipser, 1970]. Zum Zeitpunkt der Expressionsinduktion durch IPTG war die im Medium enthaltene Glukose von den Bakterien metabolisiert worden. Durch das *pelB*-Signalpeptid erfolgte ein Export des Expressionsproduktes in den periplasmatischen Raum [Keen und Tamaki, 1986; Power et al., 1992]. Für die Reinigung der scFv wurde deshalb die äußere Membran der Bakterien durch EDTA-haltigen PE-Puffer aufgebrochen und dadurch nur die im Periplasma enthaltenen Proteine freigesetzt (vgl.3.2.1).

Individuelle Klone wurden in LB-Medium / 100 µg/ml Ampizillin / 5 mM Glukose bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und die Zellen nach 1-4 h für 15 min mit 3.000 x g pelletiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C.

Wurden die exprimierten Proteine vermittelt durch ein entsprechendes Signalpeptid in das Periplasma der Bakterien exportiert, war für die Reinigung die Herstellung eines periplasmatischen Extraktes vorteilhaft. Dieser enthielt nicht alle löslichen, sondern nur die im Periplasma vorhanden Proteine und wurde entweder direkt in Biacore- und ELISA-Untersuchungen verwendet oder weiter gereinigt. Diese Methode wurde speziell bei der Reinigung von scFv eingesetzt, weil deren Expressionsraten relativ niedrig waren.

Zur Herstellung des periplasmatischen Extraktes wurde das Zellpellet mit destilliertem Wasser vorsichtig, um die Zellen nicht zu zerstören, gewaschen, mit einem Glasstab in PE-Puffer (33 ml pro 1 l Kultur) resuspendiert und mittels Rühren homogenisiert. Durch eine 15minütige Zentrifugation bei 5500 x g wurden die Zellen vom Überstand (periplasmatischer Extrakt) abgetrennt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation (30 min bei 50.000 x g), um Zellreste möglichst vollständig zu entfernen. Für die weitere Reinigung des periplasmatischen Extrakts über IMAC (vgl. 3.2.2) wurde über Nacht gegen IMAC-Binde-puffer / 2 mM PMSF dialysiert, um EDTA zu entfernen, das die Ni-Ionen der Ni-NTA-Agarose komplexieren und so von der Säule entfernen würde.

Für die Reinigung von Proteinen aus dem Zytoplasma wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt: Das in Flüssigstickstoff gefrorene Zellpellet wurde in IMAC-Bindepuffer / 2 mM PMSF 10 min bei 37°C aufgetaut und resuspendiert. Der weitere Zellaufschluß erfolgte dann mittels Ultraschall (20 min, 100 %, 0,5 Zyklus, Eiswasserbad). Die Zelltrümmer wurden durch eine 30minütige Zentrifugation bei 55.000 x g und 4°C vom Überstand (Gesamtzellextrakt) abgetrennt.

3.2.2 Proteinreinigung durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Für die Reinigung von Etmic2-His bzw. der scFv unter Nutzung des His-Tags wurde Gesamtzell- bzw. periplasmatischer Extrakt aus 1 l Kultur mindestens 2 h mit 1 ml Ni-NTA-Agarose vorsichtig gerührt und dann in eine Leersäule mit Fritte gegeben, auf der sich die Agarose absetzte. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit je 20 ml Bindepuffer und Waschpuffer. Abschließend konnten die durch ihren His-Tag an die Säule gebundenen Proteine mit 2,5-6 ml Elutionspuffer eluiert werden.

Sehr häufige Probleme bei der Darstellung von scFv waren niedrige Expressionsraten, ein geringerer Reinheitsgrad der Präparationen im Vergleich zu z.B. Etmic2-His und das Ausfallen der gelösten Proteine beim Umpuffern und bei der Lagerung. Letzteres konnte durch den Zusatz von Glycerin beim Einfrieren verbessert werden.

3.2.3 Proteinreinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Reinigung von Etmic2-*c-myc*, welches keinen His-Tag besaß, erfolgte in zwei Schritten. Dabei wurde der Gesamtzellextrakt, nicht wie unter 3.2.1 beschrieben, in IMAC-Bindepuffer, sondern in TN-Puffer hergestellt. Danach erfolgte eine schrittweise Fällung mit 20 %, 40 %, 60 % und 80 % Ammoniumsulfat. Dabei wurde das Salz langsam und unter ständigem

Rühren zugegeben und die Lösung 1 h weitergerührt. Anschließend wurden die ausgefällten Proteine durch eine 30minütige Zentrifugation bei 55.000 x g abgetrennt und im Überstand Ammoniumsulfat bis zum Erreichen der nächsten Konzentrationsstufe gelöst. Proben der so erhaltenen Proteinpellets und Überstände wurden, wie unter 3.3.2 beschrieben, in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt (vgl. 3.3.3) bzw. auf Nitrozellulosemembranen übertragen und ein Nachweis mit anti-*c-myc*-IgG durchgeführt (vgl. 3.3.4). Auf diese Weise konnte der Fällungsschritt, bei welchem die größte Menge an Etmic2-*c-myc* ausgefällt wurde, identifiziert werden.

Das entsprechende Proteinpellet wurde dann in 5 ml Puffer A aufgenommen, mittels PD10-Säulen in Puffer A umgepuffert, um das Ammoniumsulfat zu entfernen, und mit einer Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose, Säulenvolumen: 25 ml) bei einer Flußrate von 2 ml/min weiter aufgetrennt. Der pI von Etmic2 liegt bei pH 5,0. Das Protein ist bei pH 6,0 (Puffer A und B) negativ geladen und bindet deshalb an positiv geladenes Q-Sepharose-Material. Die Elution erfolgt in diesem Fall mit einem NaCl-Gradienten durch die schrittweise Erhöhung des Anteils von Puffer B auf 20 %, 30 % und 100 %, wobei das Eluat in 2 ml-Fractionen gesammelt wurde. Anschließend wurden 5 µl jeder Elutionsfraktion auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, um danach Etmic2-*c-myc* mit anti-*c-myc*-IgG nachzuweisen (vgl. 3.3.4). Die Fraktionen, welche hierbei die stärksten Signale zeigten, wurden durch die Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel, eine Färbung mit Coomassie-Brilliantblau bzw. einem Immunoblot (vgl. 3.3) untersucht. Eine der Fraktionen mit den höchsten Anteilen von Etmic2+*c-myc* am Gesamtprotein wurde anschließend im indirekten scFv-ELISA getestet (vgl. 3.5.2) und für den kompetitiven ELISA (vgl. 3.5.3) eingesetzt.

3.3 Proteinanalyse

3.3.1 Quantifizierung

Die Konzentration von Proteinen wurde nach Bradford [1976] mit Hilfe des Bio-Rad-Reagenz bestimmt. Außerdem konnte die Proteinmenge einer mit Coomassie gefärbten Bande im SDS-Gel durch Vergleich mit den Proteinmarkerbanden abgeschätzt werden, welche bei der Verwendung von 10 µl Marker jeweils etwa 1-2 µg Protein entsprechen.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter reduzierenden Bedingungen im 12 %igen (bzw. partiell verdautes Etmic2 im 15 %igen, vgl. 3.6) SDS-Polyacrylamidgel wurde die Methode nach Laemmli [1970] verwendet.

3.3.3 Proteinnachweis im SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassie-Brilliantblau-Färbung

Die Anfärbung der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine erfolgte mit Coomassie-Brillant Blau R-250 [Wilson, 1983], wie bei Sambrook und Russell [2001] beschrieben.

3.3.4 Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembranen (Immunoblot)

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dieser Proteintransfer wurde nach dem Immersionsverfahren im Transfertank mit vertikalen Elektroden und Transferpuffer durchgeführt [Towbin et al., 1979]. Für einen schnellen Antigennachweis in Elutionsfraktionen von Chromatographieverfahren wurden jeweils 5 µl der Probe auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und getrocknet. Der immunologische Nachweis der auf diese Weise immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die dabei verwendeten Antikörperverdünnungen sind im Materialteil unter 2.7 aufgeführt.

| Protein auf Membran | Nachweis mit | |
|--|-------------------------|-----------------------|
| Etmic2-His scFv MZP-His | anti-Polyhistidin-IgG | |
| partiell trypsinverdautes Etmic2-His | scFv | anti-Polyhistidin-IgG |
| | anti-rEtmic2-Serum | |
| Sporoziten- Oozystenextrakt | scFv | anti-Polyhistidin-IgG |
| | anti-rEtmic2-Serum | |
| | anti-rEtmic2-Serum | |
| Etmic2- <i>c-myc</i> | anti- <i>c-myc</i> -IgG | |

Vor dem Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden unbesetzte Bindungsstellen der Membran zunächst durch eine mindestens zweistündige Inkubation mit 1x Roti® Block-Lösung abgesättigt. Danach wurde die Membran für mindestens 45 min mit dem für den Tag bzw. das Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS/T und einmal mit TBS gewaschen und der erste Nachweisantikörper mit einem wiederum für ihn spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dabei wurde die Membran

jeweils mindestens 45 min mit der entsprechenden Antikörperverdünnung inkubiert und dazwischen mit TBS/T und TBS gewaschen. Durch eine Substratreaktion mit NBT/BCIP-Substratlösung, welche auf der Katalyse durch die an den letzten Nachweisantikörper gekoppelten alkalische Phosphatase (AP) beruht, wurden die Proteine anschließend sichtbar gemacht. Diese Reaktion wurde durch gründliches Spülen mit Wasser bzw. Inkubation in 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 2,9 abgestoppt.

3.4 „Phage Display“ – Isolierung von anti-Etmic2-scFv

3.4.1 Herstellung der „Phage Display“-Bank

Die verschiedenen anti-Etmic2-scFv wurden aus einer „Phage Display“-Bank isoliert. Diese enthält die Sequenzen für die V_H - und V_L -Regionen des exprimierten IgG-Repertoires von drei Balb/c-Mäusen, welche mit komplexen Antigenen (Oozysten/-hüllen, Sporozysten/-hüllen, Sporozoiten) aus *E.tenella*, *E.maxima*, *E.necatrix*, *E.brunetti* und *E.acervulina* immunisiert wurden (durchgeführt von Prof. Dr. Rolf Entzeroth, TU Dresden). Den Tieren wurden dafür im Abstand von etwa vier Wochen dreimal insgesamt 20 Mio Zellen (Oozysten/-hüllen, Sporozysten/-hüllen und Sporozoiten) injiziert. Davon stammten 7 Mio Zellen von *E.tenella* und die übrigen 13 Mio von den anderen Arten. Verschiedene Verdünnungsstufen der Seren wurden durch einen indirekten Immunfluoreszenztest an *E.tenella*-Sporozoiten untersucht, um die Antigen-induzierte Antikörperproduktion zu kontrollieren. Aus den Milzen der immunisierten Mäuse wurde mRNA isoliert und anhand der daraus synthetisierten cDNA die variablen Bereiche der schweren und leichten Immunglobulinketten (V_H und V_L) durch PCR amplifiziert (durchgeführt von Dr. Jana Zimmermann, Novoplant GmbH). Dafür wurden 21 für V_H spezifische Oligonukleotide sowie 10 für die V_L von κ -Ketten und einen für die V_L von λ -Ketten spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die PCR-Produkte umfaßten damit einen Großteil der variablen Bereiche des vorhandenen murinen IgG-Repertoires und bildeten die Grundlage für die Herstellung einer „Phage Display“-Bank, in der gegen *Eimeria* gerichtete Einkettenantikörper (scFv) enthalten sind (Affimed Therapeutics, Ladenburg). Dabei wurden die Immunglobulinsequenzen über eine gerichtete Klonierung mit *NcoI*, *HindIII*, *MluI* und *NotI* so in den Vektor pEXHAM eingefügt, daß der Sequenz für das pelB-Signalpeptid zuerst V_H und dann durch ein Linkerpeptid verbunden V_L folgt (vgl. Abb. 7). Vor dem Amber-Stopkodon (UAG) befindet sich noch der für die Detektion und Reinigung der scFv nutzbare His-Tag aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen. Danach folgen ein *c-myc*-Tag und das Phagenhüllprotein pIII. Um die Diversität und Funktionalität der Bank zu untersuchen, wurden die scFv zufällig

ausgewählter Einzelklone exprimiert und im Immunoblot analysiert. Dabei ließen sich mit anti-Polyhistidin-IgG bei 9 von 10 Klonen hinreichende Mengen eines Proteins in der für scFv typischen Größe von etwa 30 kDa nachweisen. Die unterschiedliche Größe und Menge der nachgewiesenen Proteine war bereits ein Hinweis auf eine verschiedene Primärsequenz der einzelnen Klone. Diese vermutete Diversität wurde von Affimed Therapeutics, Ladenburg, durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt.

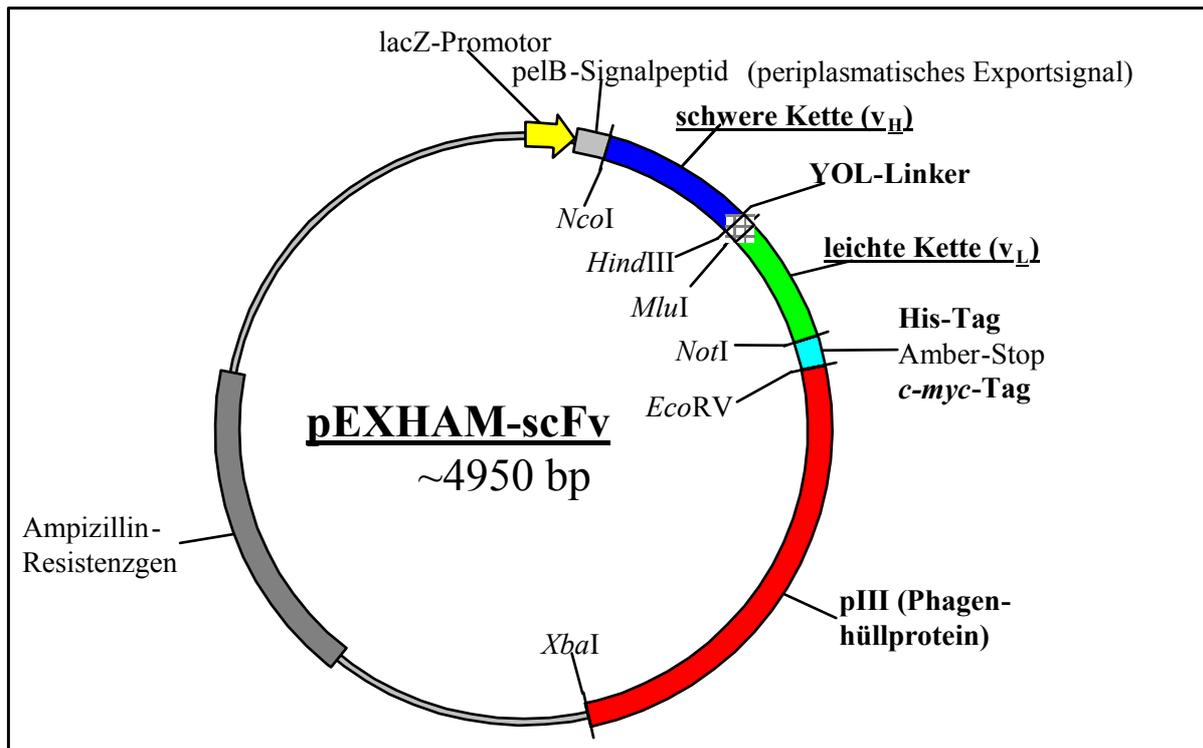


Abb. 7: Schematische Darstellung des „Phage Display“-Vektors pEXHAM-scFv. Die Sequenzen für die variablen Teile der schweren und der leichten Kette des scFv sind durch eine gerichtete Klonierung eingefügt worden. Durch ein pelB-Signalpeptid wird das Translationsprodukt in den periplasmatischen Raum der Wirtsbakterien exportiert. Zur Selektion enthält pEXHAM ein Gen, welches eine Ampizillinresistenz vermittelt.

3.4.2 Amplifikation von Helferphagen

Für die Herstellung von rekombinanten Phagen wurden Helferphagen benötigt, welche zunächst in ausreichender Menge hergestellt werden mußten. Dafür wurde 2x YT mit einer XL1-Blue-Kolonie beimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,2 bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgte die Infektion von je 200 µl Bakterienkultur mit 10 µl einer Helferphagen-Verdünnung (10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8}) durch eine 30minütige Inkubation bei 37°C. Dabei wurde von einer Gefrierkultur von M13KO7 Helferphagen ausgegangen. Anschließend wurden je 3 ml Topagar (42°C) diesen Infektionsansätzen zugegeben, gemischt und auf einer TYE-Agarplatte verteilt. Nach etwa 16stündiger Inkubation bei 37°C hatten die *E.coli*-Zellen einen

Rasen gebildet, in dem mit einem Phagenklon infizierte Bakterien als Stellen mit geringerer Zelldichte zu erkennen waren. Mit Hilfe einer Pipettenspitze konnten 10 ml 2x YT / 70 µg/ml Kanamycin mit phageninfizierten Bakterien beimpft werden. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt und dann 10 min bei 2770 x g zentrifugiert. Dadurch wurden die Bakterien abgetrennt und dann die Phagen mit 2,5 ml 20 % PEG / 2,5 M NaCl 1 h auf Eis aus dem Kulturüberstand gefällt. Anschließend erfolgte eine 30minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C. Das resultierende Phagenpellet wurde dann kurz getrocknet und in 1 ml Phagenverdünnungspuffer resuspendiert.

Der Titer der Phagen (auch amplifizierter Phagen nach einer Selektionsrunde) wurde, ähnlich wie von Koch et al. [2000] beschrieben, ermittelt. – Runde Nitrozellulose-Filter wurden mit einem Bleistift in Felder unterteilt, mit 2x YT-Medium befeuchtet und auf LB-Agarplatten, die entweder 100 µg/ml Ampizillin oder 70 µg/ml Kanamycin enthielten, aufgelegt. 100 µl einer auf eine OD₆₀₀ von 0,6 gewachsenen XL1-Blue-Kultur (in 2x YT-Medium) wurden mit 100 µl einer Phagenverdünnung (10⁻³ bis 10⁻¹¹) gemischt, 20 min bei 37°C ruhend inkubiert und anschließend 10 µl jedes Infektionsansatzes auf je ein Feld der Nitrozellulosefilter pipettiert. Bei 37°C bildeten sich über Nacht Kolonien, aus deren Anzahl sich der Phagentiter berechnen ließ. Das Genom der Helferphagen enthält ein Kanamycin- und kein Ampizillin-resistenzgen. Ausschließlich mit ihnen infizierte Bakterien wachsen also nicht auf Ampizillin-, sondern nur auf Kanamycin-haltigem Medium, während Bakterien, die auch das Phagemid enthalten, zusätzlich eine Ampizillinresistenz besitzen.

3.4.3 Anreicherung und Isolierung von anti-Etmic2-scFv durch „Panning“

Die Anreicherung von Etmic2-bindenden Phagen erfolgte in drei Selektionsrunden. Eine solche Runde bestand aus der Inkubation von phagengebundenen scFv der „Phage Display“-Bank mit dem immobilisiertem Etmic2-His, dem Entfernen nicht bindender Phagen durch Waschschrte und der anschließenden alkalischen Elution gebundener Phagen. Diese wurden danach mit Hilfe von XL1-Blue-Zellen und M13-Helferphagen amplifiziert, um in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt bzw. einzeln im indirekten Phagen-ELISA (vgl. 3.5.1) auf ihre Antigenbindung getestet zu werden.

Für die Selektion wurden zunächst sechs Kavitäten einer MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte über Nacht mit je 2 µg Etmic2-His / 100 µl PBS bei 4°C inkubiert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Um die unspezifische Bindung von Phagen an die Platte zu verringern, wurde 2 h lang mit 2 % BSA / PBS (je 200 µl) inkubiert und danach wieder dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation von insgesamt 5,5x10¹⁰ in 2 % BSA / PBS

aufgenommenen und 30 min vorinkubierten Phagen der „Phage Display“-Bank (bzw. der amplifizierten Phagen der vorhergehenden Selektionsrunde) mit dem auf der Platte immobilisierten Etmic2-His. Dabei wurde bei Raumtemperatur 30 min leicht geschüttelt und dann 60 min ruhend inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden durch 16maliges Waschen mit PBS/T und viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Daran schloß sich die Elution der gebundenen Phagen durch zehnminütiges Schütteln mit 100 mM Triethylamin (je 100 µl) an. Das Phageneluat (600 µl) wurde durch Zugabe von 270 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,4 neutralisiert und kurzzeitig bis zur Infektion der Wirtsbakterien auf Eis gelagert.

Eine XL1-Blue-Kultur wurde in 2x YT-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von nicht mehr als 0,5 kultiviert, um das Vorhandensein der für die Infektion erforderlichen Pili zu gewährleisten. Neun ml dieser Kultur wurden mit 750 µl des neutralisierten Phageneluats gemischt und zusätzlich in jede der sechs Kavitäten 50 µl der Wirtsbakterien gegeben, um sie mit eventuell noch nicht eluierten Phagen sehr hoher Affinität zu infizieren. Beide Ansätze wurden 30 min bei 37°C ruhend inkubiert, danach vereinigt und der Titer der infizierten, phagemidhaltigen Bakterien bestimmt.

Dazu wurden je 50 µl einer Verdünnungsreihe auf 2x YT/GA-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die restlichen Bakterien wurden 10 min bei 2770 x g pelletiert, in 1 ml 2x YT-Medium resuspendiert und auf einer 22 cm x 22 cm großen Platte mit 2x YT/GA-Agar ausplattiert. Die nach Inkubation bei 37°C sichtbaren Bakterienkolonien wurden mit 10 ml 2x YT / 15 % Glycerin abgespatelt. 20 ml 2x YT/GA-Medium wurden mit einem Teil dieser Bakteriensuspension beimpft (Start-OD₆₀₀ 0,1) und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 geschüttelt. Der Rest der abgespatelten Bakterien wurde mit Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert. Zehn ml der Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 (~ 2x 10¹⁰ Zellen) wurden mit einem zehnfachen Überschuß (~ 2x10¹¹ pfu) an Helferphagen 30 min bei 37°C ruhend inkubiert (Infektion durch die Phagen) und anschließend 10 min bei 2770 x g zentrifugiert. Die Kultivierung der in 50 ml 2x YT/AK resuspendierten Bakterien erfolgte über Nacht bei 30°C unter Schütteln. Dabei produzierten sie durch die entsprechenden Gene der Helferphagen u.a. Phagenpartikel, welche aus dem Phagemid und scFv-präsentierende Phagenhüllen bestanden, und gaben sie an das Medium ab. Durch 15minütiges Zentrifugieren bei 2770 x g wurden die Bakterien pelletiert und die im Überstand enthaltenen Phagen durch Zugabe von 12,5 ml 20 % PEG / 2,5 M NaCl sowie einer einstündigen Inkubation auf Eis gefällt. Die 30 min bei 10.000 x g und 4°C pelletierten Phagen wurden nach Trocknung des Pellets in 1 ml Phagenverdünnungspuffer resuspendiert und ihr Titer wie für Helferphagen angegeben (aber auf LB/GA-Agar) bestimmt (vgl. 3.4.2).

In der folgenden Selektionsrunde waren 400 µl dieser Phagensuspension, mit 200 µl 4% BSA / PBS gemischt und 30 min vorinkubiert das Ausgangsmaterial für die weitere Anreicherung von Etmic2-bindenden Phagen.

Die Analyse individueller Klone erfolgte ausgehend von den Einzelkolonien der vor dem Amplifikationsschritt hergestellten Titerplatten (vgl. 3.5.1 Phagen-ELISA).

3.4.4 Herstellung monoklonaler Phagen

Um die Spezifität der bei der Selektion erhaltenen Einzelklone im indirekten Phagen-ELISA zu untersuchen und für den Vergleich der Epitopspezifitäten von scFv mit den Antikörpern des anti-nEtmic2-Serums wurden monoklonale scFv-präsentierende Phagen benötigt.

Für den indirekten Phagen-ELISA wurden nur geringe Mengen phagengebundener scFv benötigt. Dazu wurden die Kavitäten einer sterilen Polystyren-Mikrotiterplatte mit je 200 µl 2x YT/GA gefüllt und mit Einzelkolonien von den vor dem Amplifikationsschritt hergestellten Titerplatten beimpft. Nachdem die Kulturen in den meisten Kavitäten unter Schütteln bei 37°C eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,5 erreicht hatten, wurden je 3x10⁹ Helferphagen (in je 20 µl 2x YT) zugegeben und erst 30 min ruhend und dann 30 min unter Schütteln weiterinkubiert. Die anschließend 10 min bei 2770 x g pelletierten, phageninfizierten Bakterien wurden in je 200 µl 2x YT/AK resuspendiert und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Dabei erfolgte die Bildung der rekombinanten Phagen. Die Bakterien wurden durch eine 30minütige Zentrifugation bei 2770 x g abgetrennt und der phagenhaltige Überstand im indirekten Phagen-ELISA eingesetzt.

Für den kompetitiven ELISA wurde 2x YT/GA mit einer Glycerinkultur der rekombinanten Phagemid-haltigen XL1-Blue beimpft und bei 37°C geschüttelt. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 wurden 2 ml der Kultur mit 4x10¹⁰ Helferphagen 30 min ruhend bei 37°C inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden anschließend 10 min mit 2770 x g pelletiert, in 10 ml 2x YT/AK aufgenommen und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch eine 15minütige Zentrifugation mit 2770 x g vom Überstand abgetrennt. Durch die Zugabe von einem Viertel des Ausgangsvolumens an 20 % PEG / 2,5 M NaCl sowie einer einstündigen Inkubation auf Eis und einer 30minütigen Zentrifugation mit 10.000 x g bei 4°C erfolgte die Fällung der Phagen aus dem Überstand. Das Phagenpellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und Zellreste durch eine zehnminütige Zentrifugation mit 16.060 x g abgetrennt.

3.5 Enzymimmuntest (ELISA)

Beim Enzymimmuntest (ELISA) wird die Bindung von gelösten an immobilisierte Biomoleküle bestimmt. Dabei können die gebundenen Biomoleküle durch enzymgekoppelte Nachweisantikörper detektiert werden, welche an Tags oder andere charakteristische Epitope binden. Anschließend wird die Absorptionsänderung gemessen, welche sich durch die vom Enzym katalysierte Bildung eines Farbstoffes ergibt.

3.5.1 Indirekter Phagen-ELISA

Die bei der Selektion erhaltenen Einzelklone wurden auf ihre Fähigkeit, spezifisch an Etmic2 bindende Phagen zu bilden, untersucht. Dazu wurden zunächst die Kavitäten einer MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte mit je 1 µg Etmic2-His bzw. 2 µg BSA (Negativkontrolle) beschichtet und unbesetzte Bindungsstellen mit 2 % BSA / PBS abgesättigt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der monoklonalen Phagen (vgl. 3.5.2) mit immobilisiertem Etmic2 bzw. BSA 1,5 h inkubiert und die Kavitäten dann je dreimal mit PBS/T und PBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mit je 100 µl Maus-anti-M13-IgG-POD-Konjugat (Inkubation ~1 h). Danach wurde wieder je dreimal mit PBS/T und PBS gewaschen. Der Peroxidasenachweis erfolgte durch eine 30minütige Inkubation mit je 100 µl TMB-Substratlösung, nach welcher je 50 µl 1 M H₂SO₄ zugegeben und die Extinktion bei 450 nm gemessen wurde.

3.5.2 Indirekter scFv-ELISA

Die periplasmatischen Extrakte verschiedener scFv wurden mit einem indirekten ELISA untersucht, um die Bindung des scFv an Oozysten- bzw. Sporozoitenextrakt zu messen. Dafür wurden die Kavitäten einer MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte mit jeweils 53 ng Oozystenextrakt, 4,8 ng Sporozoitenextrakt bzw. 100 ng BSA (Negativkontrolle) beschichtet und unbesetzte Bindungsstellen mit 2 % BSA / PBS abgesättigt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation von je 100 µl scFv, welche zuvor 30 min mit 50 µl 6 % BSA / PBS vorinkubiert worden waren. Die scFv wurden anhand ihres His-Tags mit Maus-anti-His-IgG-POD-Konjugat (Inkubation ~1 h) nachgewiesen. Der Enzymnachweis erfolgte wie für den indirekten Phagen-ELISA beschrieben.

Ob die Reinheit der durch Ammoniumsulfat-Fällung und Anionenaustauscher-Chromatographie hergestellten Etmic2+*c-myc*-Präparation für die spätere Verwendung im kompetitiven ELISA (vgl. 3.5.3) ausreicht, wurde durch einen indirekten scFv-ELISA mit

einem anti-Etmic2-scFv und einem anti-MZP-scFv (Negativkontrolle) überprüft. Dafür wurden die Kavitäten einer MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte mit 0-50 µl einer der erhaltenen Reinigungsfraktionen (auf je 100 µl aufgefüllt mit PBS) beschichtet und unbesetzte Bindungsstellen mit 2 % BSA / PBS abgesättigt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit jeweils 100ng / 100 µl eines der beiden scFv, welches dann anhand ihres His-Tags mit Maus-anti-His-IgG-POD-Konjugat und TMB- Substratlösung nachgewiesen wurde.

3.5.3 Kompetitiver ELISA

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des kompetitiven ELISA einerseits zur Affinitätsbestimmung von scFv und andererseits für einen Vergleich der Epitopspezifitäten von scFv und Antikörpern eines Serums eingesetzt. Um aussagekräftige Daten zu erhalten, wurden Mengen an immobilisiertem Antigen und scFv eingesetzt, welche deutlich unterhalb des Sättigungsbereiches der Bindung lagen. Diese Mengen ließen sich durch Vorversuche bestimmen.

Für die Affinitätsuntersuchungen wurde eine MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte mit 300 ng Etmic2-*c-myc* beschichtet und unbesetzte Bindungsstellen mit 2 % BSA/PBS abgesättigt. Die über IMAC gereinigten scFv wurden 30 min mit 0-6400 ng gelöstem Etmic2-*c-myc* in insgesamt 150 µl 2 % BSA/PBS bei Raumtemperatur vorinkubiert und dieser Ansatz dann eine Stunde mit dem immobilisierten Antigen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte mit Maus-anti-His-IgG-POD-Konjugat und TMB- Substratlösung (vgl. 3.5.1.).

Für den Vergleich der Epitopspezifitäten von scFv und Serumantikörpern wurde eine MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte mit 300 ng Etmic2-His beschichtet und unbesetzte Bindungsstellen mit 2 % Milchpulver / PBS abgesättigt. Die phagengebundenen scFv (vgl. 3.4.4) wurden zunächst 30 min mit bzw. ohne anti-nEtmic2-Serum (1:900) in insgesamt 150 µl 2 % Milchpulver / PBS bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann auf das immobilisierte Etmic2-His gegeben. Nach 1,5 h wurde je dreimal mit PBS/T und PBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben mit anti-M13-IgG-POD-Konjugat und TMB- Substratlösung.

3.6 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an fragmentiertes Etmic2

Um zu zeigen, daß sich die vorliegenden scFv auch hinsichtlich ihrer Epitope auf Etmic2 unterscheiden, wurde das Antigen mittels partiellem Trypsinverdau fragmentiert und die Bindung der scFv durch einen Immunoblot untersucht.

In Vorversuchen wurden verschiedene Pufferbedingungen (8 M Harnstoff / 0,4 M Ammoniumbikarbonat bzw. PBS) und unterschiedliche molare Verhältnisse von Trypsin zu Etmic2-His (2:1 bis 1:20) eingesetzt, um die für den partiellen Verdau optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Proben im 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinfragmente mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Für den Bindungsnachweis der scFv wurden Aliquots von je 3 µg fragmentiertem Etmic2 durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und ein Immunoblot mit 5 µg / 5 ml anti-Etmic-scFv durchgeführt. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte durch Maus-anti-Polyhistidin-IgG und Kaninchen-anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (vgl. 3.3.4).

3.7 Untersuchung der spezifischen Antigenbindung von anti-Etmic2-scFv durch Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Basierend auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) können mit einem Biacore-Gerät die Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern in Echtzeit analysiert werden [Grundlagen der SPR-Technologie bei Turbadar, 1959; Raether, 1977; Überblick zu Anwendungen bei Rich und Myszka, 2000].

Das Meßprinzip ist in Abb. 8 schematisch dargestellt:

Der eine Bindungspartner (Ligand) wird an die Sensoroberfläche gekoppelt und der andere (Analyt) strömt durch die Meßzelle am Liganden vorbei. Jede Veränderung der Massendichte an der Sensoroberfläche, wie sie z.B. durch die Bindung des Analyten an den Liganden erfolgt, bewirkt eine Veränderung des auf der anderen Seite reflektierten polarisierten Lichtes. Diese wird gemessen und vom Gerät als „Response“ ausgegeben, einer zur gebundenen Masse proportionalen Größe, welche in relativen Einheiten (RU) angegeben ist. Weil mit dieser Methode direkt die Massenänderung infolge von Assoziation oder Dissoziation des Analyten erfaßt werden kann, sind keine Molekülmarkierungen, wie z.B. Enzyme oder Fluoreszenzmarker, notwendig. Durch den kontinuierlichen Pufferstrom werden nicht bindende Bestandteile der Analytenpräparation entfernt, deshalb können auch Rohextrakte, Seren oder andere kaum gereinigte Proben verwendet werden, um am immobilisierten Liganden gebundenen Analyten zu messen.

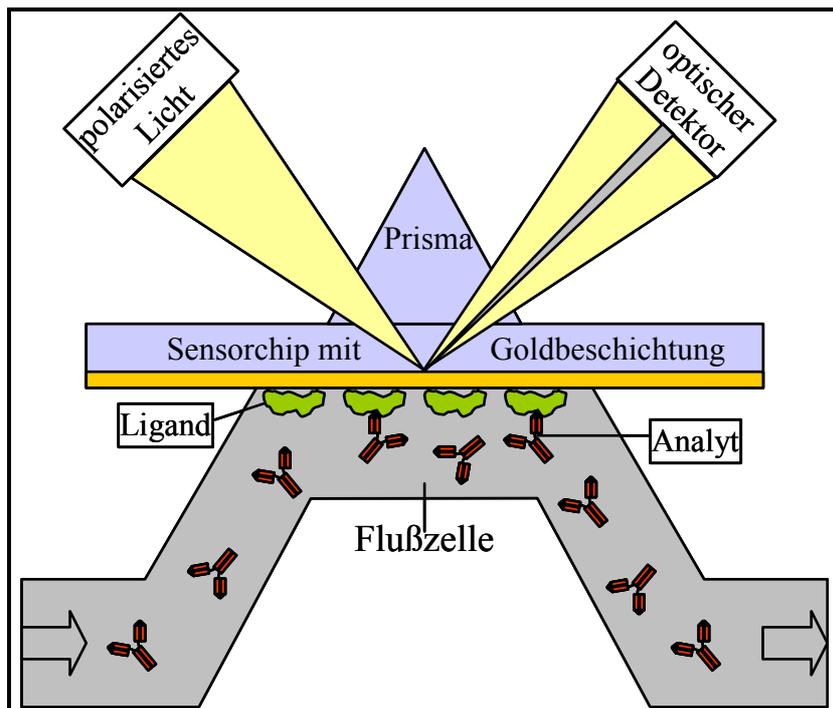


Abb. 8: Schematische Darstellung einer Flußzelle mit SPR-Sensor zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Die Probe mit einem der Bindungspartner strömt durch die Flußzelle. Dabei kann dieser sogenannte Analyt an den anderen Bindungspartner, den Liganden, binden, welcher an der Sensoroberfläche immobilisiert ist. Dadurch nimmt die Massendichte an der Sensoroberfläche zu. Dies bewirkt eine meßbare Veränderung des auf der anderen Seite des Sensorchips reflektierten, polarisierten Lichtes. Auf diese Weise kann eine Wechselwirkung in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche detektiert werden.

3.7.1 Kopplung des Liganden in der Flußzelle

Für eine effektive Immobilisierung der Liganden ist eine möglichst hohe lokale Ligandenkonzentration an der Sensoroberfläche notwendig. Diese wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen karboxymethylierten Dextranbeschichtung des CM5-Sensorchips und dem Liganden erreicht, welcher bei einem unter seinem isoelektrischen Punkt (pI) liegenden pH-Wert eine positive Molekülgesamtladung aufweist. Dieser pH-Wert wurde in einem Vorversuch an der nichtaktivierten Sensorchipoberfläche, der Präkonzentration, bestimmt.

Hierfür wurde der CM5-Sensorchip in das Gerät eingebaut und mit dem Laufpuffer (HBS-EP) ein Fluß von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt. Ausgehend vom theoretischen isoelektrischen Punkt des Liganden wurden verschiedene Kopplungspuffer bis zu einem pH von 4,0 getestet. In diesen wurde die entsprechende Ligandenpräparation (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in IMAC-Elutionspuffer) 1:50 verdünnt, je 10 μl dieser Verdünnungen in den Pufferstrom injiziert und so durch die entsprechende Flußzelle geleitet. Die dabei gemessenen Signalkurven zeigten, bei welchem pH-Wert eine ausreichende Ligandenkonzentration an der Chipoberfläche erreicht werden

konnte. Unter diesen Bedingungen fand anschließend die kovalente Kopplung der Liganden statt.

Die Immobilisierung der Liganden erfolgte durch eine Aminkopplung. Dafür wurde die Dextranbeschichtung der Sensorchipoberfläche bei einer Flußrate von 10 µl/min zunächst mit 50 µl eines Gemisches aus EDC (100 mM) und NHS (25 mM) chemisch aktiviert. Danach erfolgte die Injektion von 70 µl des im entsprechenden Kopplungspuffer verdünnten Liganden, der dabei kovalent gebunden wurde. Abschließend wurden die restlichen noch reaktiven Gruppen der Dextranbeschichtung durch eine Reaktion mit Ethanolamin (50 µl einer 1 M Lösung) inaktiviert.

3.7.2 Funktionelle Analyse von scFv

Die Untersuchungen der scFv erfolgten an der mit Etmic2 und MZP beschichteten Sensorchipoberfläche bei einer Flußrate von 10 µl/min. Dazu wurden 40 µl periplasmatischer Extrakt bzw. 20 µl des über IMAC (vgl. 3.2.2) gereinigten scFv (1:10 in Laufpuffer verdünnt) injiziert und die Signalkurven gemessen. Nach der Messung noch am Liganden gebundene Antikörper wurden vor der nächsten Probe durch intensives Spülen mit HBS-EP (bei niedrig affiner Bindung ausreichend) bzw. durch 10 µl Regenerationspuffer entfernt. Als Positivkontrollen dienten anti-rEtmic2-Serum und anti-Polyhistidin-IgG.

3.8 Präparation der Parasiten

Aus dem Kot von an Kokzidiose erkrankten Hühnern isolierte *E. tenella*-Oozysten vom Stamm M98 wurden von der Firma Biopharm, Prag bezogen. Ausgehend von diesem Material wurde Oozystenextrakt hergestellt und Sporozoitien isoliert (durchgeführt von Dr. Jana Zimmermann und Dr. Karen Zoufal, Novoplant GmbH). Aliquots der isolierten Sporozoitien wurden mit DMSO-haltigem Einfriermedium gemischt und bis zur Verwendung in Flüssigstickstoff gelagert.

3.9 Zellanheftungstest (CAT)

Der Zellanheftungstest kann eingesetzt werden, um die Bindung von Antikörpern an Zellen zu untersuchen. Er beruht darauf, daß an immobilisierten Antikörpern gebundene Zellen, anders als Zellen in Suspension, nicht durch Zentrifugation pelletiert werden.

Zunächst wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit V-Boden mit Ziege-anti-Maus-IgG beschichtet und mit 2 % BSA / PBS abgesättigt. Daran wurde während einer jeweils einstündigen Inkubation 100 µl anti-Polyhistidin-IgG und daran wiederum 1 µg / 100 µl des

zu untersuchenden scFv gebunden. Zwischen den Inkubationen wurde je dreimal mit PBS/T gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Sporozoitensuspension (etwa je 4.000 Zellen in 100 µl DMEM / 2,5 % FCS), welche nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur 8 min mit 2100 x g zentrifugiert wurde. Dabei pelletierten die Sporozoiten, welche nicht an die immobilisierten Antikörper gebunden hatten, in der Spitze des V-Bodens, was lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden konnte. Als Positivkontrolle wurde der die Invasion von *E.tenella* hemmende monoklonale Antikörper (mAK) eingesetzt, dessen Immobilisierung direkt über Ziege-anti-Maus-IgG erfolgte. Hier war kein Pellet aus Sporozoiten in der Spitze des V-Bodens zu erkennen, weil die Sporozoiten durch den immobilisierten mAK an der Wandung der Kavität festgehalten wurden. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, bei dem statt mit scFv nur mit 1 % BSA / PBS inkubiert wurde.

3.10 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT)

Die Bindung von anti-Etmic2-scFv und anti-rEtmic2-Serum an Sporozoiten wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dafür erfolgte die Immobilisierung von je 20.000 in PBS suspendierten Sporozoiten in auf einem Objektträger befindlichen Kavitäten („Lab-Tek™ CC Chamber Slides“) durch Trocknung im Luftstrom der Sicherheitswerkbank. Auf eine Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und eine Permeabilisierung mit Methanol konnte, wie ein Vorversuch zeigte, verzichtet werden, weil sie die Ergebnisse nicht beeinflussten. Die Kavitäten mit den immobilisierten Sporozoiten wurden kurz mit destilliertem Wasser gespült und 2 h mit 5 % BSA / PBS / 0,1 % Tween®20 abgesättigt. Zwischen 5 µg und 10 µg eines scFv bzw. eine 1:50-Verdünnung des anti-rEtmic2-Serums in je 100 µl 1 % BSA / PBS / 0,1 % Tween®20 wurden über Nacht auf die Sporozoiten gegeben und bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und 2 h mit anti-penta-His-IgG-AlexaFluor®488-Konjugat (Nachweis der scFv) bzw. anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat (zum Nachweis von anti-rEtmic2-Serum) im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen, die Kavitäten vom Objektträger abgelöst und die Sporozoiten in Antifade-Lösung eingebettet. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Blauanregung (470-490nm). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, bei dem statt mit scFv bzw. Serum nur mit den Nachweisantikörpern inkubiert wurde.

3.11 Untersuchung der Sporozoiten-Invasion *in vitro*

3.11.1 Anzucht der Wirtszellen

Die Isolierung steriler primärer Hühnerdarmzellen, die eigentlichen Wirtszellen von *E.tenella*, ist nicht praktikabel. Deshalb wurden MDBK (Madin Darby bovine kidney)-Zellen eingesetzt, um die Invasion von Sporozoiten *in vitro* zu untersuchen. Diese permanente Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur, Braunschweig, bezogen und ermöglicht die *E.tenella*-Entwicklung von der initialen Infektion mit Sporozoiten bis zur ersten Schizontengeneration [Speer, 1979; Crane et al., 1984]. Ein vollständiger Lebenszyklus konnte *in vitro* bisher nur in primären Hühnereizellen reproduziert werden [Wölk, 2000].

Die Kultivierung der als Zellrasen an geeigneten Oberflächen wachsenden MDBK-Zellen wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden noch vor Erreichen vollständiger Konfluenz durch Trypsinieren vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Dazu wurde der Zellrasen nach dem Absaugen des Mediums kurz mit DMEM ohne FCS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml 0,25 % Trypsin / 0,02 % EDTA, pH 7,2 bei 37°C bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen inkubiert. Danach wurden sie in 5 ml DMEM / 10 % FCS suspendiert und 5 min bei 200 x g pelletiert. Das FCS inaktiviert dabei das Trypsin. Abschließend wurden die Zellen in 5-10 ml DMEM / 10 % FCS resuspendiert und ihre Anzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Die weitere Kultivierung erfolgte durch erneutes Aussäen eines Teils der Zellen in eine Kulturflasche mit DMEM / 10 % FCS und der Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂, wobei das Medium etwa zweimal in der Woche gewechselt und die Kultur vor Erreichen vollständiger Konfluenz des Zellrasens erneut passagiert wurde.

3.11.2 Zytotoxizitäts- und Proliferationstest

Verschiedene Substanzen sollten auf ihre Wirksamkeit im Sporozoiten-Invasionshemmtest untersucht werden. Dafür wurde zunächst ihr Effekt auf die Proliferation und Lebensfähigkeit der Wirtszellen getestet. In die Kavitäten einer sterilen Mikrotiterplatte wurden jeweils 10.000 MDBK-Zellen in DMEM / 10 % FCS ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Beim Erreichen einer Konfluenz von etwa 40 % wurde das Medium durch neues Medium, welches die entsprechende Substanz enthielt, ersetzt und 2 h inkubiert. Anschließend erfolgten der Zytotoxizitäts- und der Proliferationstest (4 h Inkubation mit MTT). Beide wurden wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

Der Zytotoxizitätstest beruht auf der Messung von Laktatdehydrogenase, die von geschädigten Zellen ins Medium freigesetzt wird. Als Parameter für die Zellproliferation dient die photometrisch bestimmbare Konzentration eines Formazan-Farbstoffs, welcher durch den Umsatz eines Tetrazoliumsalses über den Zellstoffwechsel gebildet wird.

3.11.3 Sporozoiten-Invasionshemmtest

Um zu untersuchen, inwieweit die Infektiosität der Sporozoiten von der Konzentration an Ca^{2+} im Medium abhängt bzw. durch verschiedene Wirkstoffe beeinflusst wird, wurde ein Sporozoiten-Invasionhemmtest durchgeführt. Dabei werden MDBK-Zellrasen mit Sporozoiten infiziert, durch Trypsin abgelöst und die einzelnen Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht. Bei dieser Methode fließen die einzelnen Zellen hintereinander durch eine dünne Meßkammer und werden dabei von der Seite mit einem Laserlicht angestrahlt. Dabei werden drei Parameter gemessen: Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) hängt vor allem von der Zellgröße ab. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) wird neben der Größe auch vom Inhalt einer Zelle bestimmt und ist so Ausdruck ihrer Granularität. Durch die Messung von Fluoreszenzlicht können mit Fluorophoren markierte Zellen identifiziert werden.

Für den hier durchgeführten Test wurden die Sporozoiten zunächst mit Fluoreszein markiert, dann 30 min mit der zu untersuchenden Substanz und anschließend 2 h mit einem Zellrasen aus MDBK-Zellen inkubiert. Die so infizierten Wirtszellen wurden mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und für die Untersuchung im Durchflußzytometer eingesetzt. Die Analyse erfolgte dabei mit einem Laserlicht von 488 nm. Neben FSC und SSC wurde die Fluoreszenz von Fluoreszein bei 530 nm gemessen. Nicht infizierte Wirtszellen waren durch die fehlende Fluoreszenz, extrazelluläre Sporozoiten durch ihre geringere Größe und mit Sporozoiten infizierte Wirtszellen durch die MDBK-Zellen-typische Größe sowie die durch die Fluoreszein-markierten Sporozoiten eingebrachte Fluoreszenz gekennzeichnet.

Zur Markierung der Sporozoiten wurden diese zunächst in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und zweimal mit jeweils 15 ml HBSS gewaschen. Die Trennung von Sporozoiten und Überstand erfolgte durch eine jeweils siebenminütige Zentrifugation bei 2500 x g. Dann wurden die Sporozoiten in 1 ml HBSS / 2 µM CFDA-SE resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert.

Für den Test verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen wurde danach zweimal mit je 15 ml DMEM-light gewaschen und die Sporozoitenanzahl in einer Zählkammer bestimmt. Aliquots von 30.000-40.000 Sporozoiten in je 500 µl DMEM-light wurden durch Zugabe einer CaCl_2 -

Stammlösung (180 μM) auf die verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen eingestellt. Anschließend erfolgte die Infektion der MDBK-Zellen, welche in den Kavitäten einer sterilen Mikrotiterplatte bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % gewachsen waren. Dafür wurde das Medium der Wirtszellen entfernt und diese für 2 h bei 37°C und 5 % CO_2 mit der Sporozoitensuspension inkubiert. Um das Trypsin-hemmende FCS zu entfernen, wurde gründlich mit PBS gewaschen, die MDBK-Zellen mit je 100 μl 0,25 % Trypsin / 0,02 % EDTA abgelöst und in je 400 μl DMEM / 2,5 % FCS aufgenommen. Diese Proben wurden bis zur Vermessung im Durchflußzytometer kurzzeitig auf Eis inkubiert.

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Substanzen auf die Sporozoiten-Invasion wurden die markierten Sporozoiten zweimal mit je 15 ml DMEM / 2,5 % FCS gewaschen. Aliquots von 30.000-40.000 Sporozoiten wurden 30 min mit der Testsubstanz in insgesamt 200 μl DMEM / 2,5 % FCS in den Kavitäten einer sterilen Mikrotiterplatte bei 37°C inkubiert. Zur Infektion der MDBK-Zellen wurden die Zellrasen mit DMEM / 2,5 % FCS gewaschen und die vorinkubierten Sporozoiten darauf gegeben. Um möglichst alle Sporozoiten zur Infektion der Wirtszellen einsetzen zu können, wurden die zur Vorinkubation verwendeten Kavitäten mit je 200 μl DMEM / 2,5 % FCS nachgewaschen. Die MDBK-Zellrasen wurden dann mit den nun je 400 μl Medium 2 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und wie bereits beschrieben mit Trypsin abgelöst und für die durchflußzytometrische Messung eingesetzt.

3.12 Viabilitätstests

Verschiedene Viabilitätstests wurden durchgeführt, um festzustellen ob die Lebensfähigkeit von *E.tenella*-Sporozoiten durch einen Mangel an Ca^{2+} beeinträchtigt wird. Die Sporozoiten wurden dafür mindestens 2 h mit Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 0 mM und 1,8 mM inkubiert und ihre Lebensfähigkeit anschließend mit den im folgenden beschriebenen Methoden untersucht:

Die Trypanblaufärbung [Lindl und Bauer, 1994] ist ein schneller, einfacher Routinetest, welcher darauf beruht, daß der Farbstoff nur durch geschädigte Membranen und nicht in intakte Zellen eindringen kann. Dies ist mikroskopisch durch eine Blaufärbung der intrazellulären Proteine festzustellen. Für den Test wurden Trypanblaulösung und Sporozoitensuspension 1:1 vermischt und vor der Auswertung noch einige Minuten inkubiert.

Die Färbung mit 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumjodid [Fuller und McDougald, 2001] ist eine weitere Möglichkeit die Permeabilisierung von geschädigten Zellen zu bestimmen, in welche dieser

fluoreszierende Nukleinsäurefarbstoff eindringen kann. Um den Anteil Propidiumjodid-gefärbter Zellen zu bestimmen, wurde ein Durchflußzytometer eingesetzt.

Beim Zytotoxizitäts- und beim Proliferationstest, welche bereits unter 3.11.2 beschrieben wurden, werden ebenfalls für die Viabilität relevante Parameter bestimmt.

Die unter 3.11.3 beschriebene Fluoreszenzmarkierung von Sporozoiten mit CFDA-SE ist nur bei lebenden Zellen möglich, bei welchen dieser lipophile Ester durch eine zelleigene Esterase gespalten und das fluoreszierende Reaktionsprodukt im Inneren der Zelle akkumuliert wird. Der Anteil fluoreszenzmarkierter, lebender Zellen wurde hierbei mit Hilfe eines Durchflußzytometers bestimmt [Ostrowska et al., 2000; Kamau et al., 2001].

3.13 Fluoreszenzmarkierung von Sporozoiten mit Bodipy[®] FL-X Ryanodin

Die Fluoreszenzmarkierung von Sporozoiten mit Bodipy[®] FL-X Ryanodin sollte zeigen, ob sie Bindungsstellen von Ryanodin besitzen. Dazu wurden Sporozoiten, wie unter 3.11 beschrieben, auf einem Glasobjektträger immobilisiert, zweimal kurz mit HBSS gewaschen und 2 h mit 0,5 μM BODIPY[®] FL-X Ryanodin / HBSS inkubiert. Als Vergleichsprobe dienten analog behandelte adhärente MDBK-Zellen. Nach viermaligem Waschen für je 5 min mit HBSS wurden die Proben in Antifade-Lösung eingebettet und die Fluoreszenz bei Blauanregung (470-490nm) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.14 Versuch der Beladung von Sporozoiten mit Calcium Green-1 AM

In DMEM light ohne CaCl_2 bzw. in DMEM resuspendierte Sporozoiten ($\sim 1 \times 10^5/\text{ml}$) wurden mit 5 μM bzw. 10 μM Calcium Green-1 AM, 5 μM BAPTA (Komplexierung des Ca^{2+} im Puffer), sowie 100 μM Eserin (blockiert extrazelluläre Esterasen) 1 h im Dunkeln geschüttelt. Die Beladung der Sporozoiten wurde anschließend fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

4 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, alternative Möglichkeiten zur Bekämpfung der Kokzidiose beim Haushuhn zu suchen. Zur Behandlung werden bisher vor allem Polyether-Ionophore eingesetzt. Die Belastung des Tieres durch das Chemotherapeutikum [Novilla, 1992] und die Entstehung von resistenten *Eimeria*-Stämmen sind hierbei die größten Probleme. Eine weitere Möglichkeit, die aktive Immunisierung, kann vor allem bei einer akuten Infektion von Küken nur eine begrenzte Effektivität haben, weil bei diesen bis zur Ausbildung einer Immunität möglicherweise schon erhebliche Schädigungen entstanden sind. Ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antikokzidiosestrategien kann die Beeinflussung der Signaltransduktion des Parasiten sein, um die Regulierung von für die Invasion essentiellen Sekretions- und Bewegungsvorgängen zu stören. Eine andere Möglichkeit ist die Neutralisierung invasionsrelevanter Oberflächenproteine durch Antikörper im Sinne einer passiven Immunisierung. Diese Antikörper können durch kostengünstige pflanzliche Expressionssysteme, wie z.B. Erbse oder Gerste, hergestellt und durch Verfütterung der Pflanzen oral appliziert werden [Artsaenko et al., 1998; Saalbach et al., 2001]. Auf diese Weise gelangen die rekombinanten Antikörper in den Darm des Huhnes, wo sie den Invasionsvorgang, d.h. das Eindringen der infektiösen Stadien des Parasiten (Sporozoiten und Merozoiten) in die Darmzellen des Tieres, im Sinne einer passiven Immunisierung hemmen könnten [Arntzen, 2002].

4.1 Isolierung Etmic2 bindender rekombinanter scFv

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch Verwendung der „Phage Display“-Technologie Antikörper zu erhalten, welche an ein invasionsrelevantes Antigen von Eimerien binden und dadurch neutralisierend wirken können. Von den sieben *Eimeria*-Spezies, deren Wirtstier das Haushuhn ist, verursachen nur *E.necatrix*, *E.tenella*, *E.maxima*, *E.brunetti* und *E.acervulina* die für schwere Kokzidioseerkrankung so typischen, großflächigen Darmläsionen [Williams, 2003]. Die Grundlage der verwendeten „Phage Display“-Bank bildete deshalb das V-Gen-Repertoire von drei Balb/c-Mäusen, die mit einem Gemisch dieser fünf *Eimeria*-Arten immunisiert worden waren (durchgeführt von Prof. Dr. Rolf Entzeroth, TU Dresden). Die amplifizierten VL- und VH-Sequenzen wurden dabei so kloniert, daß sie durch ein Linkerpeptid verbunden, das Antikörperformat scFv ergeben (vgl. 2.14).

Für die Wahl des Antigens, das zur Selektion der scFv aus der „Phage Display“-Bank eingesetzt werden sollte, spielten folgende Überlegungen eine Rolle: Es sollte ein rekombinantes, also proteinogenes, Antigen von *Eimeria tenella* verwendet werden. Diese

Spezies gehört zu den in Hühnern parasitierenden Kokzidien mit der größten Pathogenizität und besitzt das am besten studierte Zellkerngenom von allen vogelspezifischen Eimerien. Über die Funktion der einzelnen Proteine ist noch nicht sehr viel bekannt. Ein Grund dafür ist, daß im Gegensatz zu *Toxoplasma gondii* [Sibley et al., 1993; Kim und Weiss, 2004] bei Eimerien Mutagenesestudien, die Herstellung von knockout-Linien oder transgene Ansätze bisher nicht gelungen sind. Der Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoiten schließt die aufeinanderfolgende Exozytose von drei verschiedenen sekretorischen Organellen ein: den Mikronemen, Rhoptrien und der dichten Granula. Die zuerst sekretierten Mikronemen spielen dabei sehr wahrscheinlich bei der Wirtszellerkennung und –anheftung eine Rolle [Dubremetz et al., 1998]. Ein Mikronemenprotein als Antigen auszuwählen war deshalb naheliegend. Für die vorliegende Arbeit wurde Etmic2 als Antigen für die Selektion von scFv aus der „Phage Display“-Bank verwendet. Dieses Mikronemenprotein war das erste in der Firma Novoplant klonierte rekombinante *E.tenella*-Antigen.

4.1.1 Klonierung des rekombinanten *Eimeria tenella*-Antigens Etmic2

Die Untersuchungen von Etmic2 durch Tomley et al. [1996] lassen sich wie folgt zusammenfassen: Das Gen Etmic2 kommt als einzelne Kopie im Genom von *E.tenella* vor. Die Transkripte von Etmic2 sind in verschiedenen Entwicklungsstadien und zwar in sporulierten Oozysten, Sporozoiten und ganz besonders auch in Merozoiten nachweisbar, wobei die Expression dieses Antigens gegen Ende des Sporulationsprozesses der Oozysten beginnt. In der 2D-Gelelektrophorese von Polypeptiden aus Merozoiten erscheint Etmic2 gut sichtbar bei 48 kDa und mit einem pI von 4,3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit goldmarkierten Antikörpern lokalisieren das Antigen anhand eines Antiserums in den Mikronemen am apikalen Pol des Sporozoiten. Wie IFAT-Untersuchungen zeigen konnten, ändert sich die Verteilung von Etmic2 während der Invasion und der Entwicklung des Parasiten. Das aus den Mikronemen stammende Protein wird dabei über die Oberfläche des Sporozoiten verteilt, während der Penetration der Wirtszelle am Eintrittspunkt des Parasiten konzentriert und in das extrazelluläre Medium sekretiert. Schließlich gelangt es auf die Oberfläche der infizierten Wirtszelle, wo es in Form unregelmäßiger Flecken nachweisbar ist [Tomley et al., 1996; Bumstead und Tomley, 2000]. Diese Verteilungsvorgänge weisen auf eine Rolle dieses Proteins während der Invasion hin.

Die mRNA-Sequenz von Etmic2 ist in der NCBI-Nukleotidsequenz-Datenbank unter der Nummer Z71755 angegeben. Die kodierende Sequenz dieses Antigens ist 1026 bp lang. Das sich daraus ableitende Polypeptid hat einen theoretischen pI von 4,2 und ein

Molekulargewicht von 35 kDa. Wie bei Tomley et al. [1996] beschrieben, zeigt Etmic2 bei der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen jedoch das Laufverhalten eines Proteins von 48 kDa. Dies wurde auch bei der vorliegenden Arbeit beobachtet und ist sehr wahrscheinlich eine strukturelle Eigenschaft des Polypeptids.

Die für Etmic2 kodierende DNA-Sequenz wurde ausgehend von Merozoiten-cDNA unter Verwendung der Oligonukleotide mic2.1 und mic2.2 amplifiziert. Dafür wurde zuvor die mRNA von *E.tenella*-Merozoiten (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rolf Entzeroth, TU Dresden) mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (durchgeführt von Dr. Jana Zimmermann). Das PCR-Produkt wurde in den mit *EcoRV* gespaltenen Vektor pBSK zwischenkloniert und zur Kontrolle sequenziert. Alle sequenzierten Klone enthielten im Vergleich zur Datenbanksequenz die Austausche C28T und A164T. Aber nur der letztere der beiden wirkt sich auf der Aminosäureebene aus (D55V).

Etmic2 sollte zunächst für die Anreicherung spezifisch bindender scFv in ausreichender Menge und Reinheit produziert werden. Um größere Mengen an rekombinantem Protein herzustellen, ist der Einsatz von bakteriellen Expressionssystemen, wie dem pET-System, sinnvoll. Der entsprechende Expressionsvektor enthält den starken T7-Promotor, an welchen die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, nicht aber die RNA-Polymerase von Prokaryoten spezifisch bindet.

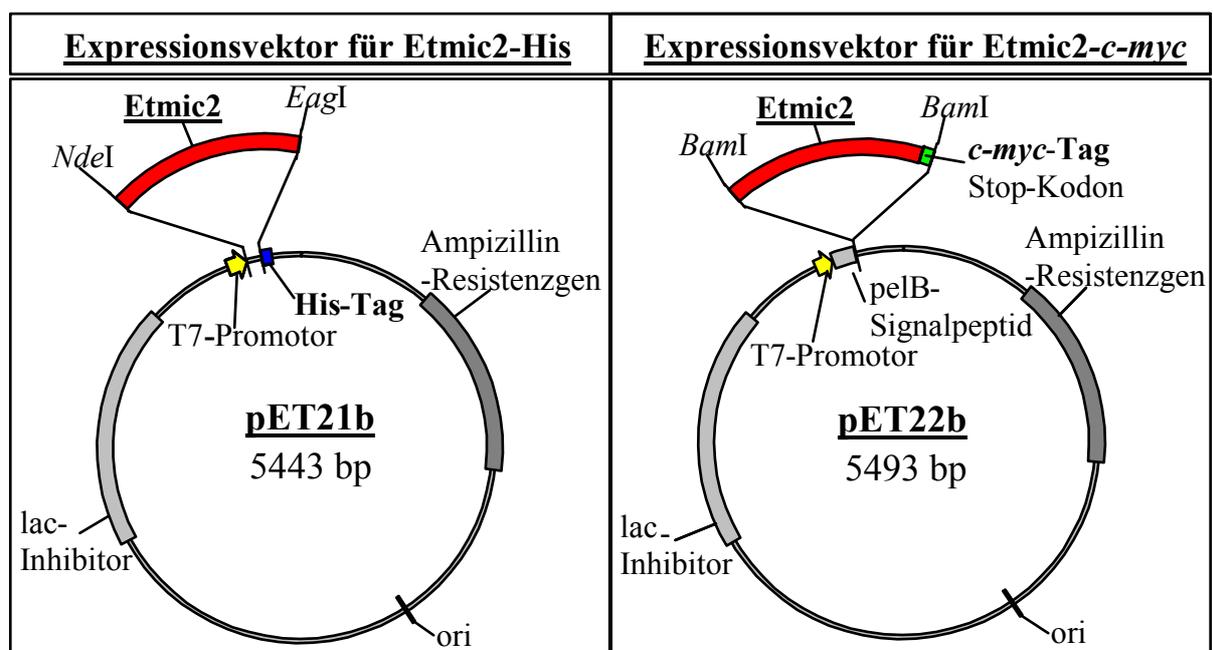


Abb. 9: Schematische Darstellung der Klonierungen von Etmic2 in die Vektoren pET21b und pET22b für die bakterielle Expression mit His-Tag bzw. *c-myc*-Tag.

Für die gerichtete Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pET21b wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden *NdeI*mic2 und *EagI*mic2 die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *NdeI* und *EagI* am 5'- bzw. 3'-Ende von *Etmic2* angefügt (siehe Abb. 9: *Etmic2*-His). Das Konstrukt erlaubt die IPTG-induzierte Expression von *Etmic2* mit einem C-terminalen Markerpeptid aus sechs Histidinen (His-Tag), welches für die schnelle und effektive Reinigung durch IMAC (immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie) und für die Detektion des Antigens im ELISA (Enzymimmuntest) und Immunoblot genutzt werden kann.

Für Bindungsuntersuchungen mit scFv gegen *Etmic2* (anti-*Etmic2*-scFv), welche im kompetitiven ELISA immunologisch nur über ihren His-Tag nachgewiesen werden konnten, wurde *Etmic2* ohne His-Tag benötigt. Versuche, die Erkennungssequenz der Endoprotease Faktor Xa in *Etmic2*-His einzufügen und den His-Tag nach der Reinigung proteolytisch zu entfernen [Pedersen et al., 1999], waren nicht erfolgreich, da eine effektive Abspaltung des His-Tags nicht erreicht werden konnte. Um *Etmic2* ohne His-Tag zu erhalten, waren deshalb eine Umklonierung und eine alternative Reinigungsmethode notwendig. Dafür wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden EM2BamHI_for und EM2BamHImyc_rev Restriktionsschnittstellen für *BamHI* und für einen C-terminalen *c-myc*-Tag kodierende Nukleotidtripletts angefügt. Anschließend erfolgte über *BamHI* eine ungerichtete Klonierung in den Expressionsvektor pET22b (siehe Abb. 9: *Etmic2*-c-myc). Dieses Konstrukt erlaubte die IPTG-induzierte Expression von *Etmic2* mit einem C-terminalen *c-myc*-Tag, welcher zur Detektion des Proteins verwendet werden kann.

4.1.2 Bakterielle Expression und Reinigung von *Etmic2*

Eine schnelle und effiziente Darstellung von Proteinen ist mit Hilfe bakterieller Expressionssysteme möglich. Für die Expression von *Etmic2* mit dem pET-System (pET21b-*Etmic2*-His und pET22b-*Etmic2*-*c-myc*) wurde der *E.coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS eingesetzt. Das Genom dieser Wirtsbakterien enthält ein Gen für die T7-RNA-Polymerase, den *lac*-Promotor und den *lac*-Operator. Die Expression der T7-RNA-Polymerase und damit auch des rekombinanten Proteins findet dadurch nur in Gegenwart von Laktose oder eines Derivates, z.B. IPTG, statt. [Studier und Moffatt, 1986; Studier et al., 1990]

Nach der Expression wurde ein Gesamtzellextrakt (Rohextrakt) hergestellt. Unter Nutzung der Wechselwirkungen des His-Tags mit dem immobilisierten Nickelion der Ni-NTA-Agarose wurde *Etmic2*-His durch IMAC gereinigt. Die Elution erfolgte dabei durch eine

erhöhte Imidazolkonzentration. Zur Überprüfung der Reinigung wurden jeweils 5 μ l Rohextrakt, Durchlauf bzw. Eluat sowie 10 μ l Waschfraktion unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau gefärbt bzw. mit anti-Polyhistidin-IgG im Immunoblot untersucht (siehe Abb. 10).

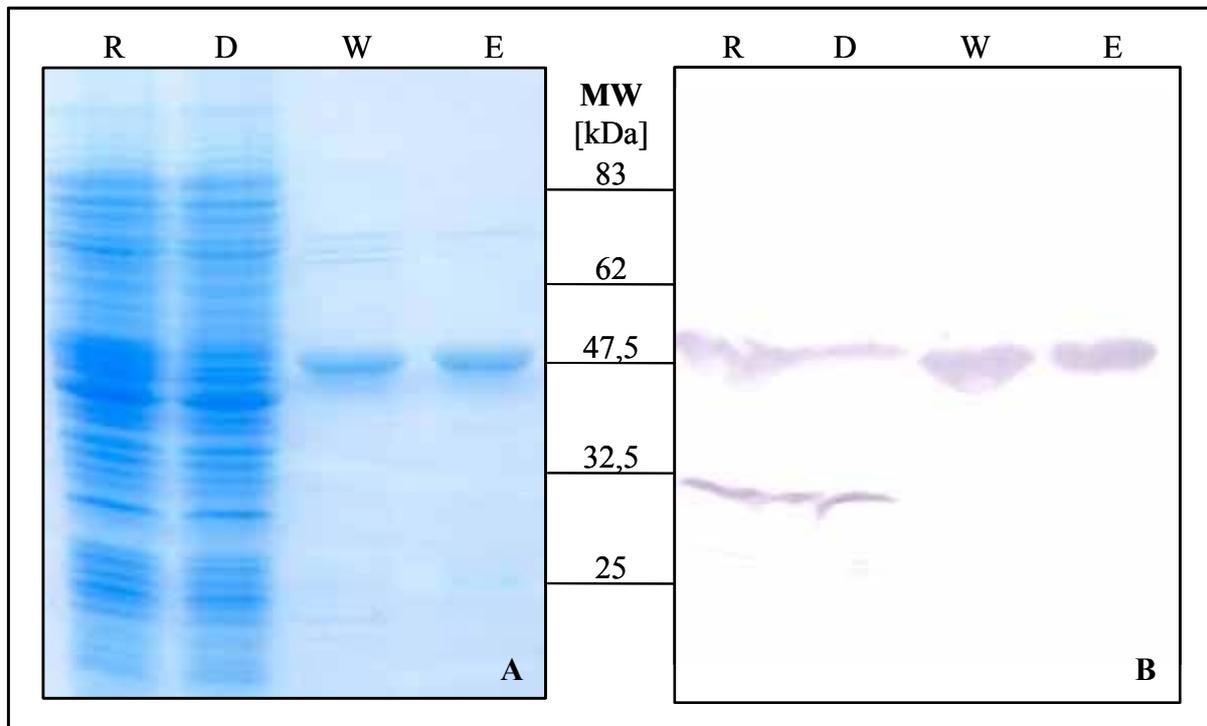


Abb. 10: Analyse der Reinigungsschritte von Etmic2-His. Die Proben wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brillantblau gefärbt (A) bzw. ein Nachweis mit anti-Polyhistidin-IgG im Immunoblot durchgeführt (B). R: 5 μ l Rohextrakt, D: 5 μ l des Säulendurchlaufs mit den nicht an Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteinen, W: 10 μ l der Waschfraktion mit 60 mM Imidazol, E: 5 μ l des Eluats mit 500 mM Imidazol. Etmic2-His ist bei einem Molekulargewicht von etwa 48 kDa nachweisbar. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind in der Mitte angegeben.

Wie die starke Bande bei etwa 48 kDa zeigt, konnte im Elutionsschritt mit 500 mM Imidazol eine große Menge kaum verunreinigten Antigens erhalten werden. Beim Eluat und bei der Waschfraktion sind auch noch recht hohe Mengen an Etmic2-His nachweisbar. Dies zeigt, daß der Rohextrakt wahrscheinlich mehr Expressionsprodukt enthielt, als an das Ni-NTA-Säulenmaterial binden konnte und daß ein Teil des Antigens bereits beim Waschen mit 60 mM Imidazol eluiert wurde.

Für die Reinigung von Etmic2-*c-myc* wurden zwei Methoden kombiniert: Zunächst erfolgte eine fraktionierte Fällung des Gesamtzellextrakts (Rohextrakt) mit steigenden Mengen an Ammoniumsulfat. Die dabei erhaltenen Pellets und Überstände wurden durch einen Immunoblot untersucht, wobei der Nachweis des Antigens mit anti-*c-myc*-IgG erfolgte.

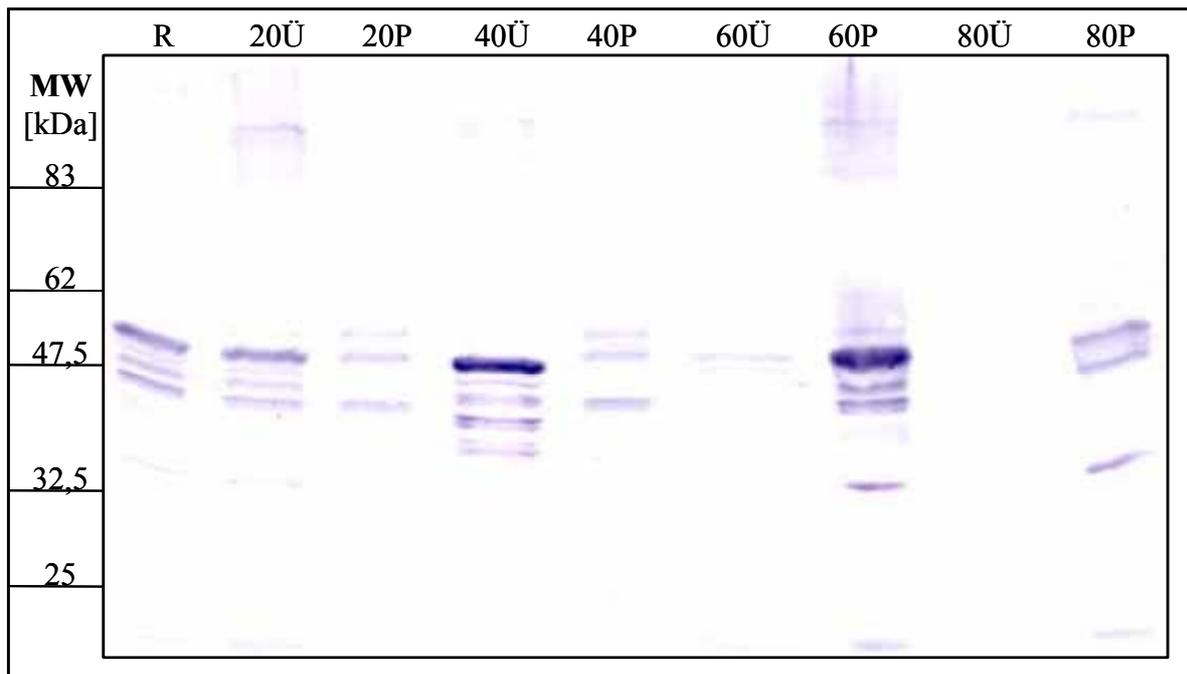


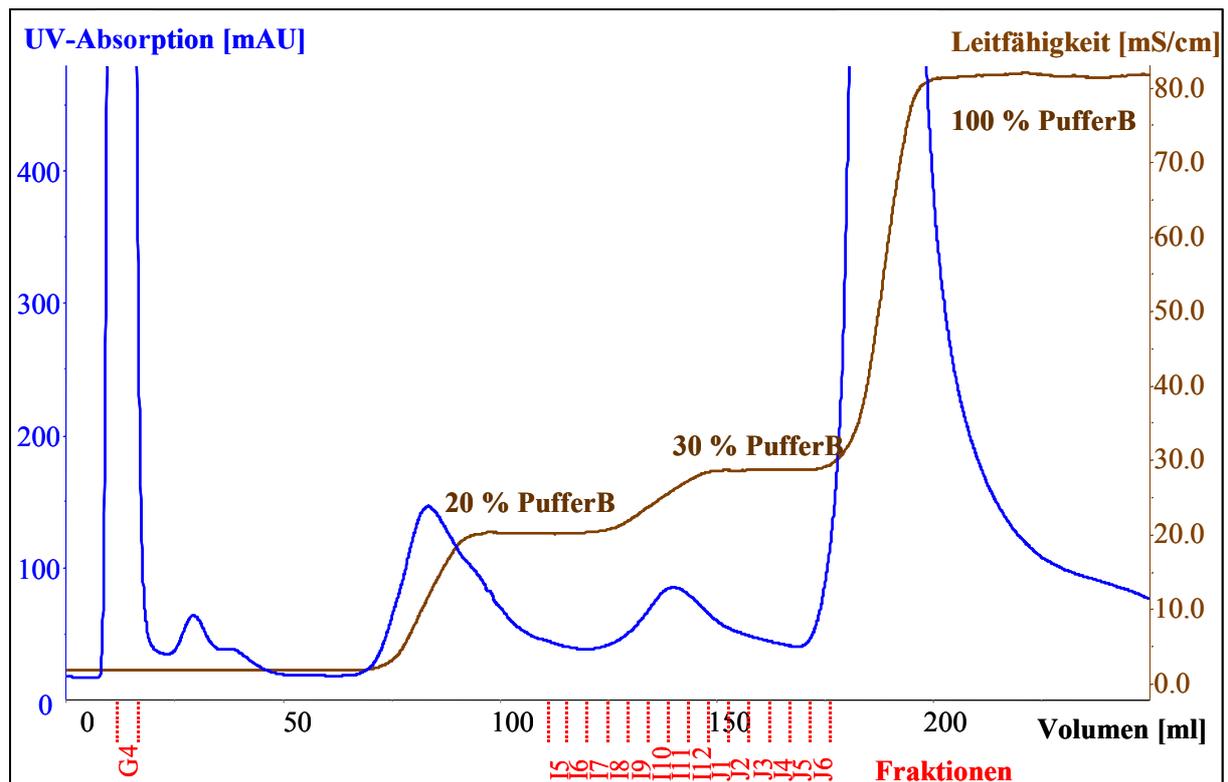
Abb. 11: Vorreinigung von Etmic2-*c-myc* durch eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung. Je 5 μ l der Überstände und der in 5 ml Puffer A resuspendierten Pellets der vier Fällungsschritte wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis von Etmic2-*c-myc* erfolgte mit anti-*c-myc*-IgG. R: Rohextrakt, 20Ü, 40Ü, 60Ü, 80Ü: Überstand des Fällungsschritts mit 20 %, 40 %, 60 % bzw. 80 % Ammoniumsulfat, 20P, 40P, 60P, 80P: Pellet des Fällungsschritts mit 20 %, 40 %, 60 % bzw. 80 % Ammoniumsulfat. Etmic2-*c-myc* ist als Bande von etwa 48 kDa nachweisbar. Die Größen der Proteinmolekulargewichtsstandards sind links dargestellt.

Wie der in Abb. 11 dargestellte Immunoblot zeigt, fiel der Hauptanteil von Etmic2-*c-myc* beim Fällungsschritt mit 60 % Ammoniumsulfat aus. Das entsprechende Pellet wurde resuspendiert, zur Entfernung des Fällungssalzes in Puffer A umgepuffert und für die Reinigung über eine Anionenaustauschersäule eingesetzt.

Vorversuche zeigten, daß die Elution mit einem NaCl-Stufengradienten von 208 mM (20 % Puffer B, 80 % Puffer A), 307 mM (30 % Puffer B, 70 % Puffer A) und 1 M NaCl (100 % PufferB) für eine gute Reinigung des Antigens am besten geeignet war.

In Abb. 12A sind das Reinigungsprofil der entsprechenden Q-Sepharose-Säule und der verwendete NaCl-Stufengradient dargestellt. Die einzelnen Fraktionen des Säulenlaufs wurden durch einen Immunoblot untersucht und Etmic2-*c-myc* dabei mit anti-*c-myc*-IgG nachgewiesen (siehe Abb. 12B).

A:



B:

| G4 | I5 | I6 | I7 | I8 | I9 | I10 | I11 | I12 | J1 | J2 | J3 | J4 | J5 | J6 |
|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|
| | | | | | | | | | | | | | | |

Abb. 12: Profil der Reinigung von Etmic2-*c-myc* durch Anionenaustauscher-Chromatographie (A) und Nachweis von Etmic2-*c-myc* in den Fraktionen des Anionenaustauscherlaufes (B). Das Pellet des Fällungsschritts mit 60 % Ammoniumsulfat wurde in 7 ml Puffer A umgepuffert. 2 ml davon wurden auf eine Q-Sepharose-Säule gegeben und die gebundenen Proteine mit einem NaCl-Stufengradienten von 20 %, 30 % und 100 % Puffer B eluiert. Dargestellt sind die Signale des UV-Detektors und der durch die Leitfähigkeit wiedergegebene NaCl-Stufengradient. Die Elution von Etmic2-*c-myc* erfolgt bei etwa 140 ml. Jeweils 5 μ l einer Fraktion wurden im Immunoblot untersucht. Der Nachweis von Etmic2-*c-myc* erfolgte dabei mit anti-*c-myc*-IgG.

Ein Vergleich des Reinigungsprofils des Anionenaustauschers und des Immunoblots zeigt, daß Etmic2-*c-myc* bei einer NaCl-Konzentration zwischen 20 % und 30 % von der Säule eluiert wurde. Die Fraktionen I11 und I12 enthielten besonders viel Antigen und wurden im mit Coomassie-Brilliantblau gefärbten Polyacrylamidgel und durch Nachweis mit anti-*c-myc*-IgG im Immunoblot genauer untersucht (siehe Abb. 13).

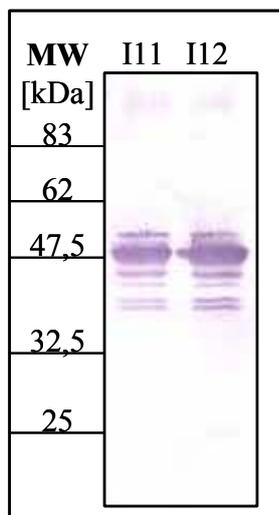


Abb. 13: Untersuchung der Fraktionen I11 und I12 aus der Reinigung von Etmic2-*c-myc* durch Anionenaustauscher-Chromatographie. Jeweils 25 μ l wurden durch SDS-PAGE im 12%igen Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt bzw. Etmic2-*c-myc* im Immunoblot mit anti-*c-myc*-IgG nachgewiesen. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind links angegeben.

Durch diese Kombination aus Ammoniumsulfat-Fällung und Anionenaustauscher-Chromatographie konnte Etmic2-*c-myc* in ausreichender Menge und Reinheit erhalten werden.

Anhand der Fraktion I11 sollte anschließend im ELISA mit dem anti-Etmic2-scFv AH17 und dem anti-MZP-scFv AG9 (Negativkontrolle) exemplarisch gezeigt werden, daß diese Antigenpräparation für den spezifischen Nachweis von anti-Etmic2-scFv im ELISA geeignet war. Das Prinzip dieses Tests ist in Abb. 14 dargestellt.

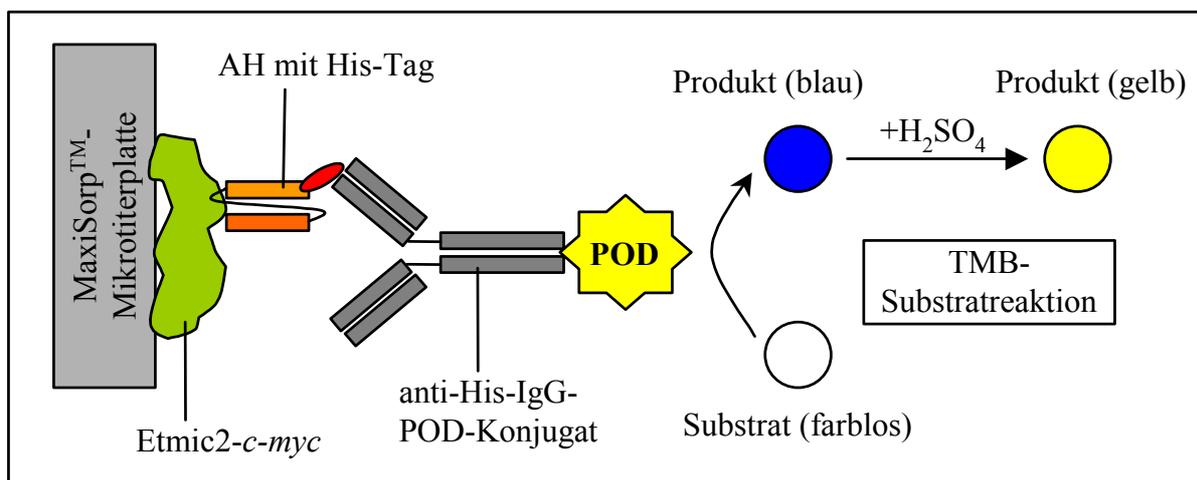


Abb. 14: Prinzip des Nachweises von Etmic2-*c-myc* mit anti-Etmic2-scFv (AH) im ELISA. Der AH bindet an das durch Adsorption immobilisierte Antigen Etmic2-*c-myc* und wird anhand seines His-Tags durch das anti-His-IgG-POD-Konjugat nachgewiesen. Die POD katalysiert den Umsatz von TMB zu einem blauen Reaktionsprodukt. Aus diesem entsteht bei Zusatz von H_2SO_4 eine gelbe Verbindung, deren Absorption bei 450 nm gemessen wird.

In Abb. 15 ist der Test des gereinigten Etmic2-*c-myc* (Fraktion I11) mit verschiedenen scFv dargestellt. Als Negativkontrolle (NK) wurde hierbei mit einer analog „gereinigten“ Probe des untransformierten Expressionsstammes BL21(DE3)pLysS beschichtet.

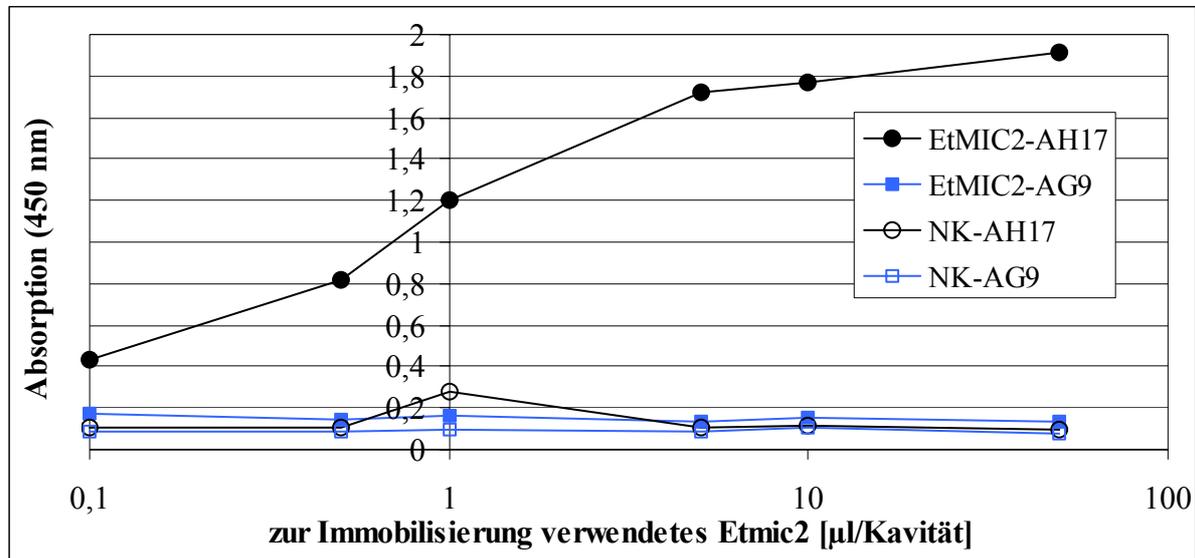


Abb. 15: Test des gereinigten Etmic2-*c-myc* (Fraktion I11) im ELISA mit dem anti-Etmic2-scFv AH17 und dem anti-MZP-scFv AG9. Zwischen 0,1 µl und 50 µl der Antigenpräparation wurden in den Kavitäten einer MaxiSorbTM-Mikrotiterplatte immobilisiert und mit AH17 und anti-His-IgG-POD-Konjugat nachgewiesen. Als Negativkontrolle für Etmic2-*c-myc* diente AG9. Eine Fraktion, welche durch eine analog durchgeführte „Reinigung“ von BL21(DE3)pLysS-Zellen ohne Expressionskonstrukt gewonnen wurde, diente als Negativkontrolle für den Nachweis mit dem scFv.

Wie die in Abb. 15 dargestellten Ergebnisse des indirekten ELISA zeigen, bindet nur anti-Etmic2-scFv AH17, nicht aber anti-MZP-scFv AG9 an das Etmic2-His in der Fraktion I11. Diese Antigenpräparation ist demnach für den Nachweis der spezifischen Bindung von anti-Etmic2-scFv an ihr Antigen im ELISA geeignet.

4.1.3 Anreicherung von anti-Etmic2-scFv durch „Panning“

Die „Phage Display“-Technologie wurde eingesetzt, um Antikörper zu isolieren, welche an Etmic2, ein wahrscheinlich an der Invasion von *E.tenella* beteiligtes Antigen, binden und auf diese Weise die Invasion möglicherweise hemmen können. Grundlage war eine „Phage Display“-Bank von scFv, deren Immunglobulinsequenzen aus dem exprimierten IgG-Repertoire immunisierter Mäuse stammen. Weil zur Immunisierung u.a. komplexe Antigene (Oozysten/-hüllen, Sporozysten/-hüllen, Sporozoiten) aus *E.tenella* verwendet wurden, war zu erwarten, daß die „Phage Display“-Bank auch für *E.tenella*-Antigene spezifische scFv enthält.

Die Selektion von Antikörperfragmenten durch „Panning“ an Antigen-beschichteten Oberflächen ist die am häufigsten genutzte Methode, Antikörper aus „Phage Display“-Banken zu isolieren [Marks et al., 1991; Winter et al., 1994; Harrison et al., 1996]. Bei dieser Arbeit wurde eine modifizierte Polystyren-Oberfläche, durch passive Adsorption mit Etmic2-His beschichtet [Nissim et al., 1994]. An dem auf diese Weise immobilisierten Antigen fand anschließend der Selektionsvorgang mit den phagegebundenen scFv der „Phage Display“-Bank statt. Nach jeder der drei Selektionsrunden wurde der Titer der vom immobilisiertem Antigen eluierten Phagen bestimmt und die Bindungseigenschaften von Einzelklonen im Phagen-ELISA mit Etmic2 und BSA (Negativkontrolle) genauer untersucht.

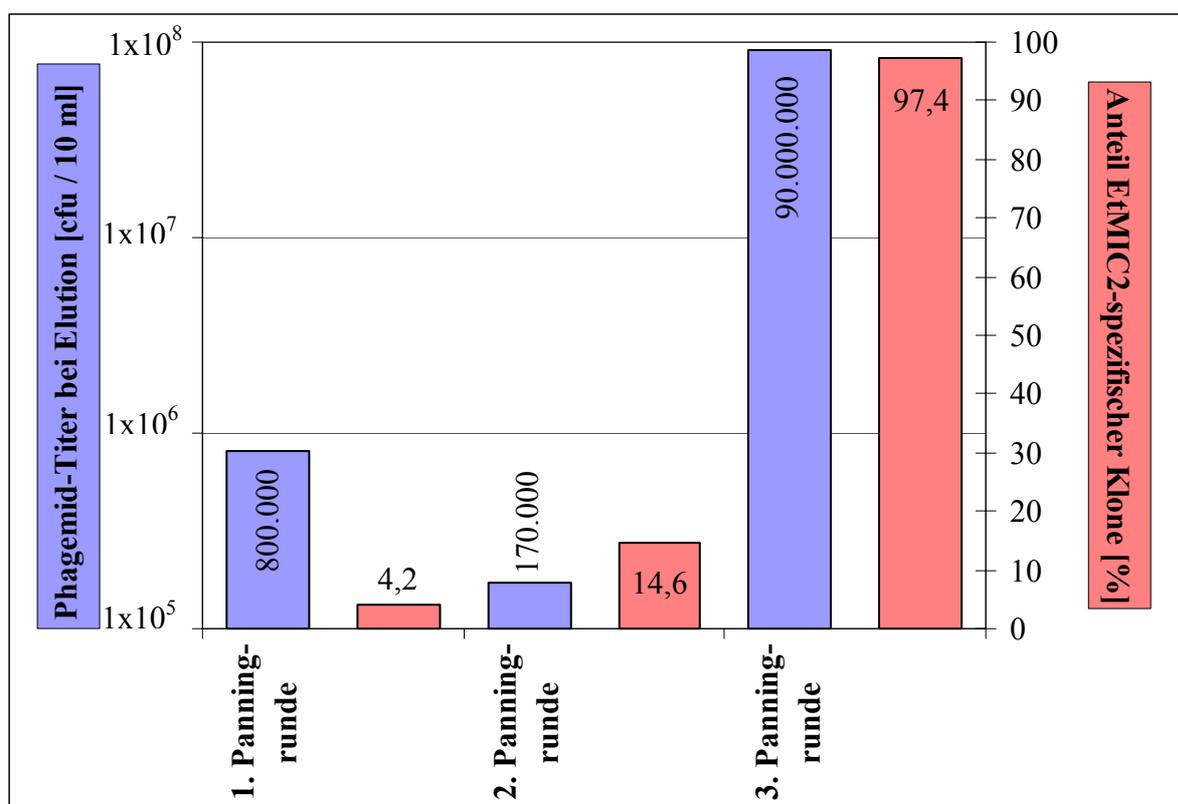


Abb. 16: Ergebnisse der drei Panningrunden mit der anti-*Eimeria*-„Phage Display“-Bank an immobilisiertem Etmic2-His. Dargestellt sind die Titer der eluierten Phagen (blau) und der jeweilige Anteil Etmic2-spezifischer phagegebundener scFv (rot). Die Phagentiter entsprechen der Anzahl Ampizillin-resistenter Wirtsbakterien nach der Infektion mit den eluierten Phagen der entsprechenden Panningrunde. Zur Identifizierung Etmic2-spezifischer phagegebundener scFv wurden von jeder Panningrunde Einzelklone isoliert und zur Herstellung scFv-präsentierender Phagen eingesetzt. Deren Spezifität wurde durch einen Phagen-ELISA an immobilisiertem Etmic2-His und BSA (Negativkontrolle) bestimmt. Der Nachweis spezifisch gebundener Phagen erfolgte über ein anti-M13-IgG-POD-Konjugat und eine TMB-Substratreaktion, deren Reaktionsprodukt bei 450nm im Mikrotiterplattenlesegerät meßbar ist.

Wie Abb. 16 zeigt, wurden durch die drei Selektionsrunden eine Anreicherung von an Etmic2 bindenden Phagen erreicht. Durch Waschschrte wurden dabei nicht oder nur schwach

bindende phagengebundene scFv entfernt, was sich darin ausdrückt, daß der Phagentiter zunächst abnimmt: Von den ursprünglich $5,5 \times 10^{10}$ eingesetzten Phagen der *Eimeria*-Bank wurden in der ersten Runde 8×10^5 vom immobilisierten Antigen eluiert. Nach ihrer Amplifikation und der erneuten Selektion in den beiden folgenden Runden wurden 9×10^7 Phagen eluiert. Eine Untersuchung im monoklonalen Phagen-ELISA ergab, daß der Anteil von spezifisch an Etmic2 bindenden Phagen dabei stark zunahm: Nur 4,2 % der nach der ersten Selektionsrunde eluierten Phagen zeigten eine Bindung an Etmic2. Nach der zweiten Selektionsrunde war dieser Anteil schon auf 14,6 % gestiegen und nach der dritten Selektionsrunde wurden fast nur noch an Etmic2 bindende Phagen eluiert (97,4 %).

4.1.4 Sequenzierung der anti-Etmic2-scFv und Sequenzvergleich

Es ist davon auszugehen, daß im Verlauf der Selektionsrunden bestimmte Klone aufgrund ihrer Bindungseigenschaften und der gewählten Wasch- und Elutionsbedingungen bevorzugt angereichert werden und die Variabilität der eluierten Phagen deshalb abnimmt. Dies konnte bei der Sequenzierung von Einzelklonen, welche im Phagen-ELISA eine Etmic2-spezifische Bindung gezeigt hatten, bestätigt werden. Es wurden insgesamt 36 Klone sequenziert, davon zwei aus der ersten, neun aus der zweiten und 25 aus der dritten Selektionsrunde. Unter den sequenzierten Klonen der dritten Selektionsrunde gab es deutlich mehr mit homologen Sequenzen als unter denen der ersten beiden Runden.

Um aus der Vielzahl positiver Binder für die weiteren Untersuchungen möglichst verschiedene scFv zu verwenden, wurden die aus der DNA-Sequenzierung abgeleiteten Aminosäuresequenzen miteinander verglichen. Klone mit einer Homologie größer als 98 % wurden dabei als identisch angesehen. Auf diese Weise wurden 21 unikale anti-Etmic2-scFv erhalten und als AH1-AH21 bezeichnet, davon zwei aus der ersten, acht aus der zweiten und 11 aus der dritten Selektionsrunde. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen scFv zeigten untereinander eine Ähnlichkeit von 55 % bis 98 % und Homologien zu verschiedenen murinen Immunglobulin-Keimbahngenen.

4.2 Charakterisierung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an rekombinantes Etmic2

Nachdem verschiedene anti-Etmic2-scFv durch ein „Panning“ mit rekombinantem Etmic2 isoliert, der Erfolg dieser Selektion durch einen Phagen-ELISA getestet und 21 unikale Klone durch einen Sequenzvergleich identifiziert werden konnten, sollten die einzelnen scFv exprimiert und funktionell charakterisiert werden. Durch einen einfachen Wechsel der *E.coli*-Stammes war es möglich, die Antikörperfragmente ohne das Phagenhüllprotein pIII zu exprimieren. Ein N-terminales pelB-Signalpeptid vermittelte den Export dieser Proteine in

den periplasmatischen Raum der gram-negativen Wirtsbakterien, aus welchem sie isoliert wurden, ohne die innere Membran aufzubrechen. Im so hergestellten periplasmatischen Extrakt waren deshalb weniger *E.coli*-eigene Proteine enthalten als im Gesamtzellextrakt. Die weitere Reinigung von scFv erfolgte unter Nutzung des His-Tags durch IMAC (3.2.2). Dabei traten verschiedene Probleme auf: Zum einen waren die Expressionsraten bestimmter scFv sehr niedrig und zum anderen fielen etliche von ihnen beim Überführen in ein anderes Puffersystem oder bei der Lagerung in Lösung aus. Es war deshalb nicht möglich von allen 21 anti-Etmic2-scFv ausreichende Mengen an gereinigtem Protein herzustellen und in den entsprechenden Versuchen einzusetzen.

4.2.1 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an fragmentiertes rekombinantes Etmic2 durch Immunoblot

Anhand von sechs anti-Etmic2-scFv sollte untersucht werden, ob sich diese verschiedenen Antikörperfragmente nicht durch ihre Aminosäuresequenz, sondern auch hinsichtlich ihrer Epitopspezifität voneinander unterscheiden.

Um das Epitop eines Antikörpers zu identifizieren, werden die verschiedenen Bereiche des Antigens üblicherweise einzeln kloniert, exprimiert und die Antikörperbindung daran untersucht. Bei diesem Versuch ging es jedoch nur darum zu zeigen, daß die vorliegenden scFv unterschiedliche Epitope auf Etmic2 erkennen. Deshalb konnte eine schnellere und einfachere Vorgehensweise gewählt werden: die Fragmentierung des Antigenproteins durch einen partiellen Verdau mit Trypsin und der Bindungstest durch einen Immunoblot.

Zunächst wurden die dazu geeigneten Pufferbedingungen und das optimale molare Verhältnis von Trypsin zu Etmic2-His bestimmt. Die Ergebnisse dieser Vorversuche wurden durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Dabei zeigte sich, daß bei einem einstündigen Verdau in PBS mit einem molaren Verhältnis von Etmic2-His zu Trypsin von 5:1 die meisten Etmic2-Fragmente und nur noch wenig unverdautes Antigen vorhanden waren. Unter diesen Bedingungen wurde anschließend ein Trypsin-Verdau in größerem Maßstab durchgeführt und davon Aliquots mit jeweils 3 µg fragmentiertem Etmic2 durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Bindung von anti-Etmic-scFv an die verschiedenen Etmic2-Fragmente wurde danach durch einen Immunoblot untersucht.

Beim immunologischen Nachweis mit den sechs anti-Etmic2-scFv (siehe Abb. 17) war bei allen eine Bande bei etwa 35 kDa zu erkennen. Diese stellt das C-terminale Etmic2-Fragment

dar, welches den His-Tag trägt. Weil die scFv über ihren His-Tag mit anti-Polyhistidin-IgG nachgewiesen werden mußten, wurde auch dieses Fragment markiert - unabhängig davon, ob das Antikörperfragment daran gebunden hatte oder nicht. Bei AH5 und in schwächerer Form auch bei anderen der scFv sind jedoch noch zusätzliche Banden bei etwa 15 kDa zu erkennen. Diese scFv binden also wahrscheinlich an andere Epitope als die übrigen anti-Etmic2-scFv.

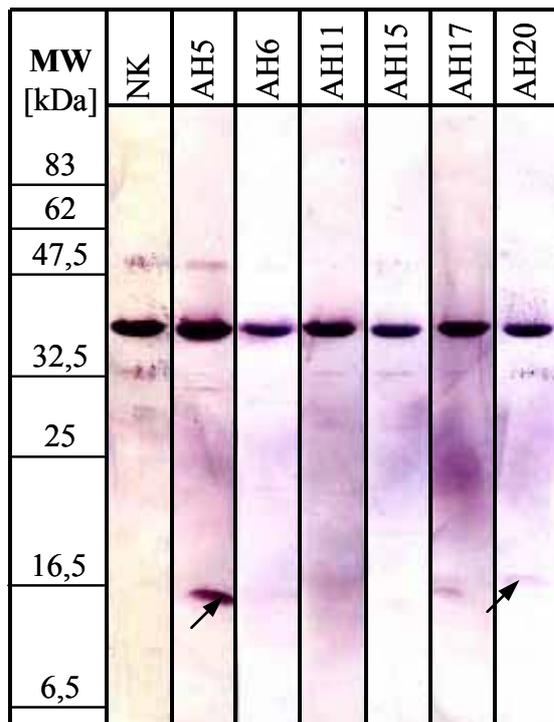


Abb. 17: Bindung von sechs verschiedenen anti-Etmic2-scFv (AH) an durch partiellen Trypsinverdau fragmentiertes Etmic2 im Immunoblot. Jeweils 3 μ g Etmic2 pro Spur wurden im 15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit je 5 μ g eines anti-Etmic2-scFv inkubiert. Der Nachweis der scFv erfolgte durch anti-Polyhistidin-IgG und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat. Als Negativkontrolle wurde eine Spur nur mit den Nachweisantikörpern inkubiert (NK). Die Pfeile weisen auf Banden hin, welche bei den übrigen anti-Etmic2-scFv nicht vorhanden sind. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind links dargestellt.

4.2.2 Nachweis der spezifischen Antigenbindung von anti-Etmic2-scFv durch Oberflächenplasmonresonanz-Analyse

Um nachzuweisen, daß ein scFv spezifisch an ein Antigen bindet, ist ein (Phagen-)ELISA mit phagengebundenem scFv oft nicht ausreichend. Phagenpartikel können unter Umständen unspezifisch an verschiedene Moleküle und Oberflächen binden. Es war deshalb notwendig zu untersuchen, ob die 21 unikalene anti-Etmic2-scFv auch in Form gelöster scFv an Etmic2 binden können. Die Darstellung gereinigter scFv war wie unter 4.2.1 beschrieben nicht unproblematisch. Außerdem konnten die scFv immunologisch nur über den His-Tag nachgewiesen werden. Dies war aber bei der Verwendung des Antigens Etmic2-His, welches ebenfalls einen His-Tag enthielt, nicht möglich. Um zu zeigen, daß die scFv an ihr Antigen binden, wurde deshalb ein Biacore-Gerät eingesetzt, mit dessen SPR-Technologie diese Wechselwirkung ohne Nutzung von Molekülmarkierungen untersucht sowie Analyten aus Präparationen geringer Reinheit, wie z.B. aus Rohextrakten, eingesetzt werden können (vgl.

3.7). Für eine qualitative Untersuchung der Bindung von scFv an ihr Antigen konnte deshalb auf eine Reinigung verzichtet und periplasmatischer Extrakt (vgl. 3.2.1) verwendet werden. Als Parameter für die Bindung wurde Δ_{Resp} eingesetzt - die Differenz zwischen den Werten vor der Injektion (Basislinie) und nach der anschließenden Standardwaschprozedur. Dabei entspricht eine Signaldifferenz von 1.000 RU einer Veränderung der an der Sensoroberfläche gebundenen Molekülmasse von etwa 1 ng pro mm^2 . Die gemessenen Signale werden abhängig von der Zeit in einem Diagramm, dem sogenannten Sensorgramm, dargestellt.

Das Biacore[®]X-Gerät kann mit zwei Flußzellen gleichzeitig arbeiten, welche einzeln oder nacheinander vom Pufferstrom und damit vom Analyten durchlaufen werden. Deshalb war es möglich, auf einem Sensorchip zwei verschiedene Liganden, Etmic2 und MZP getrennt zu binden und parallel die Bindungsfähigkeit der Analyten zu untersuchen. Das Oberflächenantigen MZP kommt auf *E.tenella*-Merozoiten vor und zeigt nur eine sehr geringe Aminosäuresequenzhomologie mit Etmic2 (< 12,9 %). Daher wurde es als Negativkontrolle eingesetzt, um unspezifische Wechselwirkungen der Analytenpräparation mit der Sensoroberfläche bzw. mit Verunreinigungen der Liganden detektieren zu können.

Die für die Immobilisierung verwendeten Ligandenpräparationen sollten möglichst frei von Verunreinigungen sein, welche sonst ebenfalls an die Sensoroberfläche gekoppelt werden könnten. Dies wurde bei Etmic2 bzw. MZP durch eine Reinigung mittels IMAC erreicht, wobei nahezu alle Verunreinigungen entfernt werden konnten (siehe Seite 59 Abb. 10).

Vor der kovalenten Immobilisierung der Liganden wurde bei der sogenannten Präkonzentration untersucht, welcher Kopplungspuffer den optimalen pH-Wert besitzt, d.h. unter welchen Bedingungen sich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen besonders viel Antigen an der Sensoroberfläche anreichert. Dafür wurde der Ligand in verschiedenen Kopplungspuffern verdünnt und die Signalkurven am noch nicht mit dem Kopplungsreagenz aktivierten Sensorchip gemessen. Weil eine geringe Ionenstärke die elektrostatischen Wechselwirkungen ebenfalls positiv beeinflusst, wurde dabei ein Puffersystem mit nur 10 mM Natriumazetat verwendet.

Wie Abb. 18 zeigt, war vor allem bei pH 4,0 eine stark erhöhte Ligandenkonzentration an der Sensoroberfläche meßbar, während bei niedrigeren pH-Werten nur eine schwache bis keine Anreicherung von Etmic2 erkennbar war. Diese Beobachtung erklärt sich durch den pI von Etmic2, der bei pH 4,3 liegt [Tomley et al., 1996]. Bei kleineren pH-Werten besitzt das Protein eine negative Gesamtladung und wird von der positiv geladenen Dextranbeschichtung

der Sensoroberfläche elektrostatisch angezogen. Der steile Abfall des Signals zu Beginn der Injektionen beruht auf den unterschiedlichen Brechungseigenschaften von Lauf- und Kopplungspuffer, die den bei der SPR gemessenen Winkel verändern. Am Ende der Injektion wurde durch den erneuten Pufferwechsel wieder das Signalniveau des Laufpuffers erreicht.

Analog zur Präkonzentration mit Etmic2 wurde auch für MZP der für die Kopplung optimale pH-Wert bestimmt, welcher ebenfalls bei pH 4,0 lag.

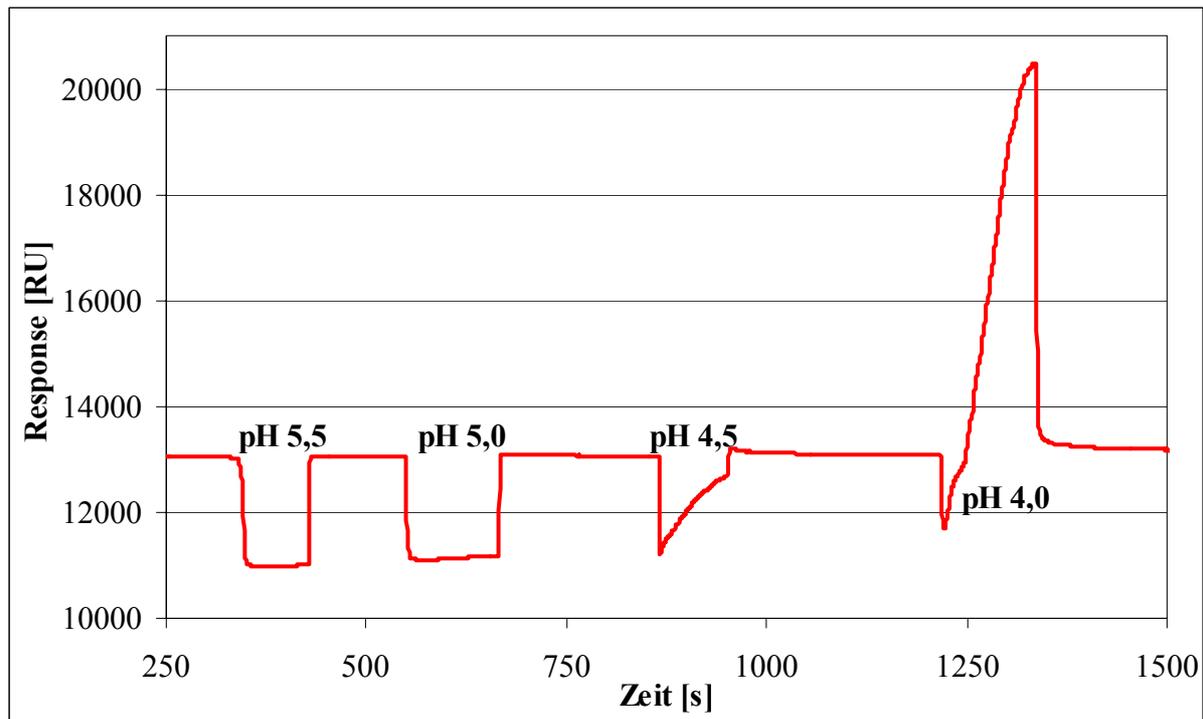


Abb. 18: Präkonzentration als Vorversuch für die Kopplung von Etmic2. Dargestellt sind die Signalkurven bei verschiedenen pH-Werten, die an der nicht aktivierten Sensoroberfläche getestet wurden. Dazu wurden jeweils Etmic2-His in Kopplungspuffern mit pH-Werten zwischen 4,0 und 5,5 verdünnt und jeweils 10 μ l davon zur Injektion eingesetzt. Durch den Wechsel zwischen Lauf- und Kopplungspuffer wird das Signalniveau während der Injektion nach unten verschoben. Der Anstieg des Signals während der Injektion bei pH 4,0 (wesentlich schwächer bei pH 4,5 und andeutungsweise auch bei pH 5,0) zeigt die fortschreitende Anreicherung von Etmic2-His durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der positiv geladenen Dextranbeschichtung der Sensoroberfläche.

Anders als die Anreicherung des Liganden an der Sensoroberfläche ist die Aminkopplung bei höheren pH-Werten begünstigt. Deshalb wurde für die Verdünnung der Liganden ein Kopplungspuffer mit einem minimalen pH-Wert von 4,0 gewählt.

Abb. 19 zeigt das Sensorgramm der Immobilisierung von Etmic-His: Zunächst wurden die Carboxymethylgruppen der Dextranbeschichtung des CM5-Sensorchips durch EDC und NHS chemisch aktiviert. Die Injektion dieses Gemisches stellt sich im Sensorgramm als vorübergehende Verschiebung des Signalniveaus nach oben dar. Die dabei entstandenen N-Hydroxysuccinimidester reagierten mit Amino- und anderen nukleophilen Gruppen des

anschließend injizierten Liganden, wodurch dieser kovalent an die Sensorchipoberfläche gebunden wurde. Dies wird im Sensorgramm dadurch illustriert, daß die Signalkurve nach der Injektion des Antigens nicht wieder auf das vorherige Niveau zurückfällt. Abschließend wurden die nach der Kopplung noch vorhandenen reaktiven N-Hydroxy-succinimidester inaktiviert, wobei durch die hohe Ionenstärke der dazu verwendeten Ethanolaminlösung gleichzeitig eine Elution nicht kovalent gebundener Moleküle von der Sensoroberfläche erfolgte. Die Differenz der Signalniveaus vor und nach der Aminkopplung (Δ RU) gibt die Menge des immobilisierten Liganden wieder. In diesem Fall betrug sie rund 4.300 RU. Es wurden also etwa 4,3 ng Etmic2-His in der Flußzelle gebunden.

Analog dazu erfolgte die Kopplung von MZP in der zweiten Flußzelle, bei welcher etwa 3,3 ng dieses Kontrollproteins immobilisiert wurden.

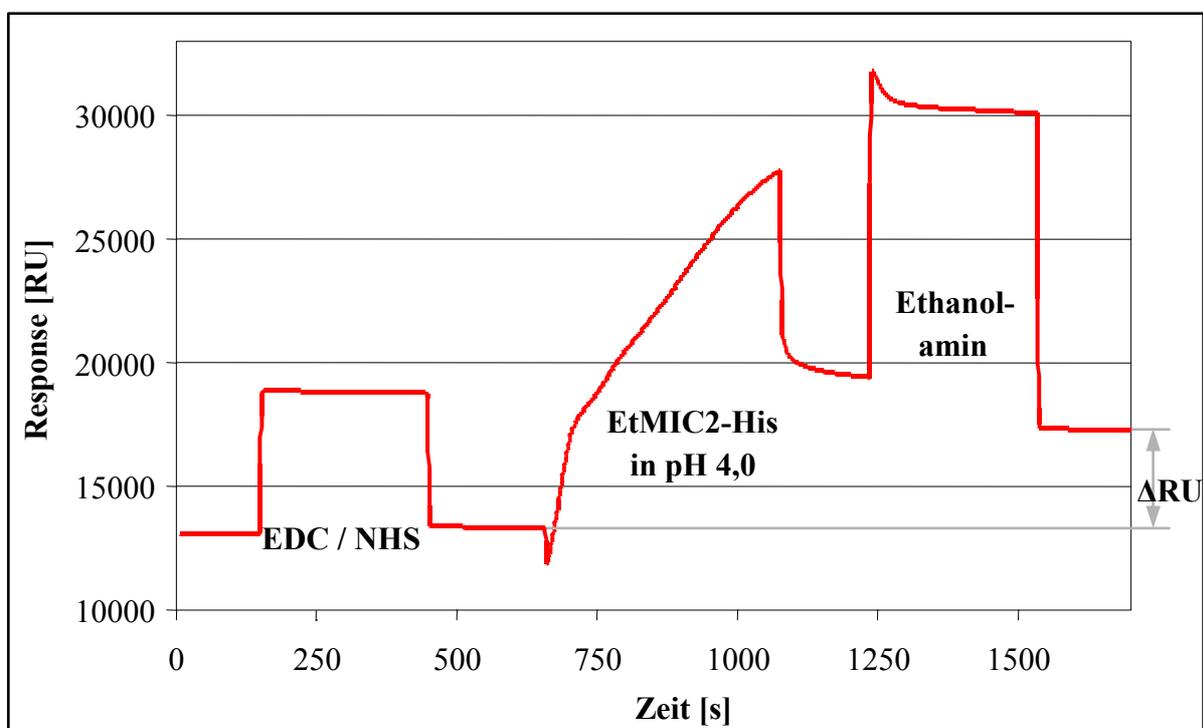


Abb. 19: Immobilisierung von Etmic2-His durch eine kovalente Aminkopplung. Dargestellt ist das Sensorgramm bestehend aus der Aktivierung der Dextranmatrix der Sensoroberfläche mit EDC und NHS, der Bindung des Liganden bei pH 4,0 und der Absättigung noch freier reaktiver N-Hydroxysuccinimidester mit Ethanolamin. Dazu wurden nacheinander 50 μ l eines Gemisches, das 100 mM EDC und 25 mM NHS enthielt, 70 μ l einer Etmic2-His-Präparation verdünnt auf etwa 800 ng/ μ l in einem 10 mM Natriumazetatpuffer, pH 4,0, und 50 μ l einer 1 M Ethanolaminlösung injiziert. Die Differenz der Signalniveaus vor und nach der Kopplung (Δ RU) gibt die Menge an gebundenem Etmic2 wieder.

Die 21 anti-Etmic2-scFv wurden in kleinem Maßstab in *E. coli* exprimiert. Die aus den Expressionskulturen hergestellten periplasmatischen Extrakte wurden anschließend durch den

Nachweis des His-Tags im Immunoblot überprüft (siehe Abb. 20). Außer AH1 und AH3 konnten dabei alle scFv als deutlich sichtbare Bande nachgewiesen werden.

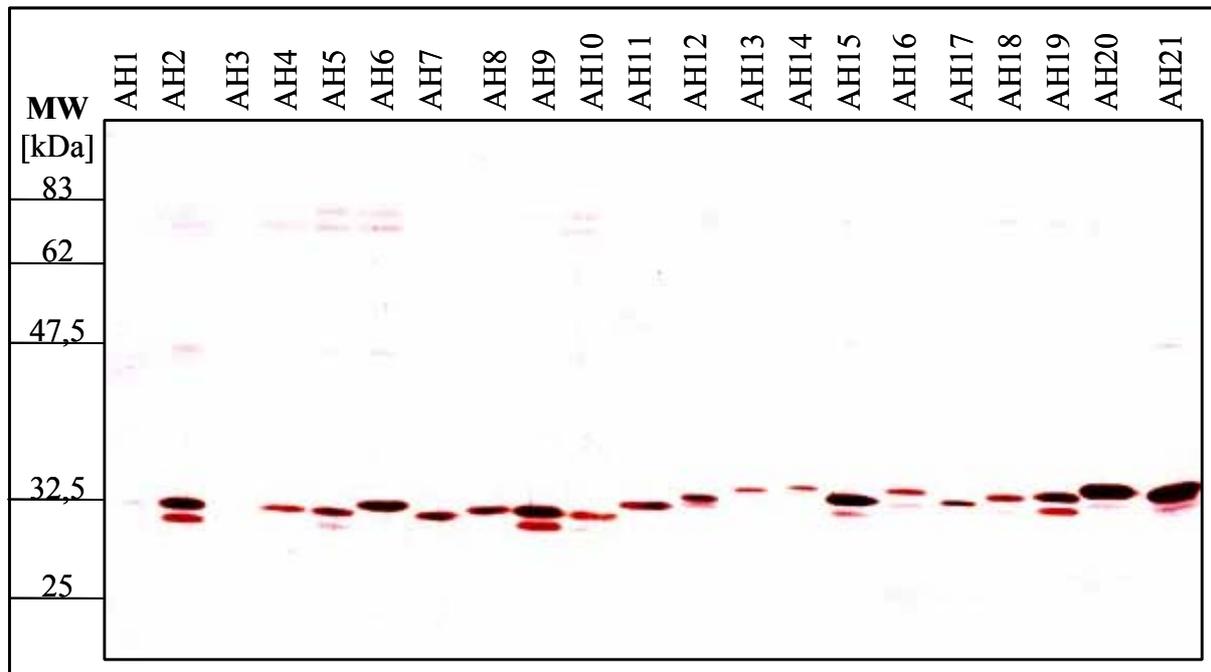


Abb. 20: Nachweis von anti-Etmic2-scFv in periplasmatischen Extrakten durch Immunoblot. Jeweils 16 μ l periplasmatischer Extrakt wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit anti-Polyhistidin-IgG und anti-Maus-IgG-AP-Konjugat. Die scFv haben Größen um die 32 kDa. Die Größen des Proteinmolekulargewichtsstandards sind links dargestellt.

Die periplasmatischen Extrakte wurden dann direkt und unverdünnt zur Untersuchung mit dem Biacore-Gerät eingesetzt. In Abb. 21 ist das Sensorgramm einer Probeninjektion und des nachfolgenden Waschschrittes am Beispiel von AH8 dargestellt. Während die Probe durch die Flußzelle lief, ergab der hohe Proteingehalt ein sehr großes Signal. Unspezifisch bindende Probenbestandteile wurden dann durch eine Standardwaschprozedur entfernt. Die Differenz des Signals vor der Probeninjektion und nach dem Waschen ($\Delta_{\text{Resp.}}$) entsprach der Menge an gebundenem scFv.

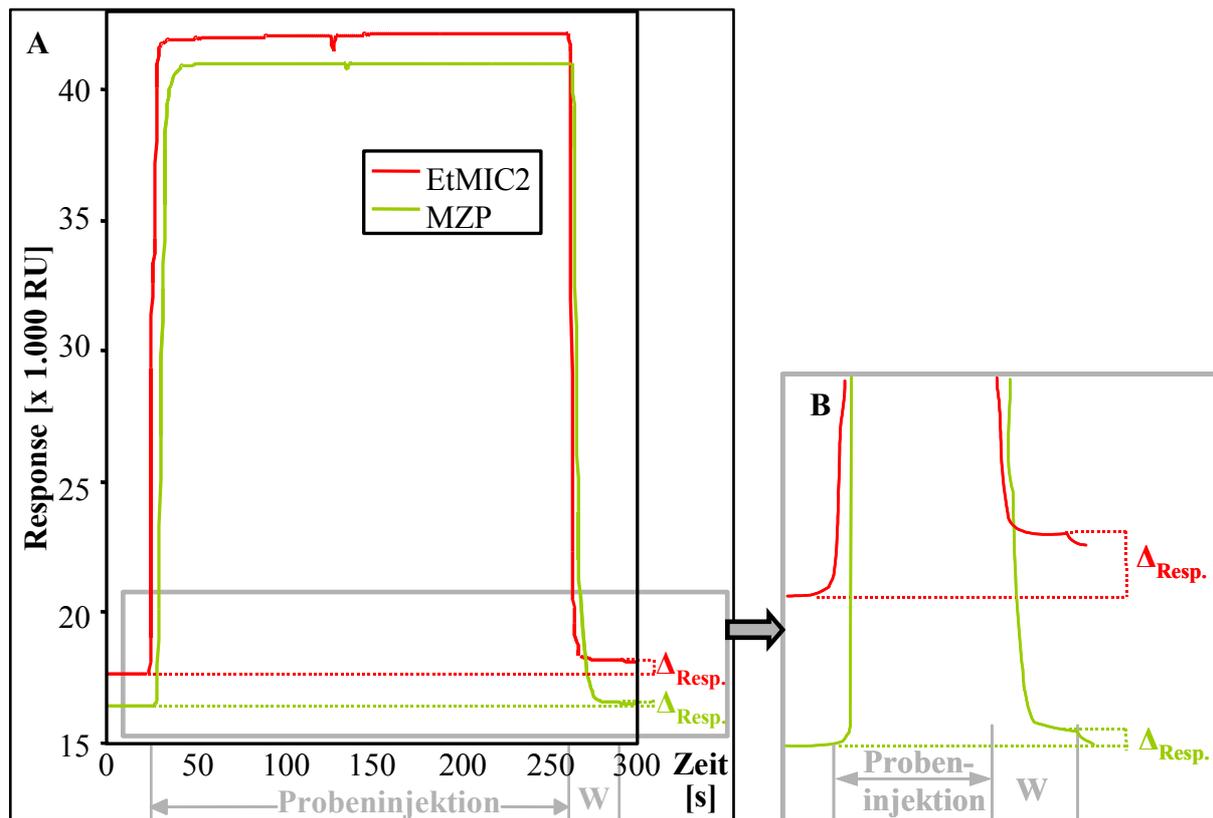


Abb. 21: Sensorgramm der Bindung des anti-EtMIC2-scFv AH8 (A). Zur besseren Veranschaulichung wurde der grau umrahmte Bereich noch einmal vergrößert dargestellt (B). 40 μ l periplasmatischer Extrakt des scFv wurden injiziert (Probeninjektion) und standardmäßig mit Laufpuffer gewaschen (W). Dargestellt sind die Signale (Response) der beiden Flußzellen mit immobilisiertem EtMIC2 und MZP. Die Flußzelle mit MZP wird nach der Flußzelle mit EtMIC2 durchlaufen. Die entsprechende Signalkurve ist deshalb etwas nach rechts versetzt. Die Differenz der Werte vor der Probeninjektion und nach der Waschprozedur entspricht der Menge gebundener Moleküle und wurde als Parameter $\Delta_{\text{Resp.}}$ für die Bindung verwendet (vgl. Abb. 22). $\Delta_{\text{Resp.}}$ ist für die Bindung von AH8 an EtMIC2 deutlich größer als für die Bindung an MZP.

Die Signaldifferenzen $\Delta_{\text{Resp.}}$ der 21 anti-EtMIC2-scFv für die beiden Flußzellen, also die Bindung an EtMIC2 bzw. MZP, sind in Abb. 22 dargestellt. Wenn im Immunoblot auch kaum nachweisbar, so zeigte AH1 doch eine deutliche Bindung an EtMIC2. Demgegenüber ergaben AH12 und AH13 im Immunoblot zwar deutliche Banden, mit SPR war jedoch keine Bindung an EtMIC2 meßbar. Insgesamt konnte in den periplasmatischen Extrakten von 16 der 21 scFv eine EtMIC2-spezifische Bindeaktivität detektiert werden.

Mit elf anti-EtMIC2-scFv, welche sich in ausreichender Menge und Reinheit darstellen ließen, sollten Untersuchungen zur Affinität durchgeführt werden. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt und mit SPR untersucht. Die dabei erhaltenen Signale waren viel zu niedrig, um zuverlässige Berechnungen der Assoziations- (k_A) und Dissoziationskonstanten (k_D) zu erlauben. Die Bindungskurven aller untersuchten anti-EtMIC2-scFv zeigten sowohl

eine schnelle Assoziation als auch eine schnelle Dissoziation vom immobilisierten Etmic2, wie es in Abb. 23 am Beispiel von AH2 und AH20 dargestellt ist. Einzige Ausnahme war AH17, dessen wesentlich langsamerer Dissoziationsverlauf eher dem des anti-rEtmic2-Serums ähnelte. Die demnach ziemlich niedrigen Affinitäten einzelner anti-Etmic2-scFv sollten deshalb durch einen kompetitiven ELISA mit gelöstem Etmic2 untersucht werden (vgl. 4.2.3).

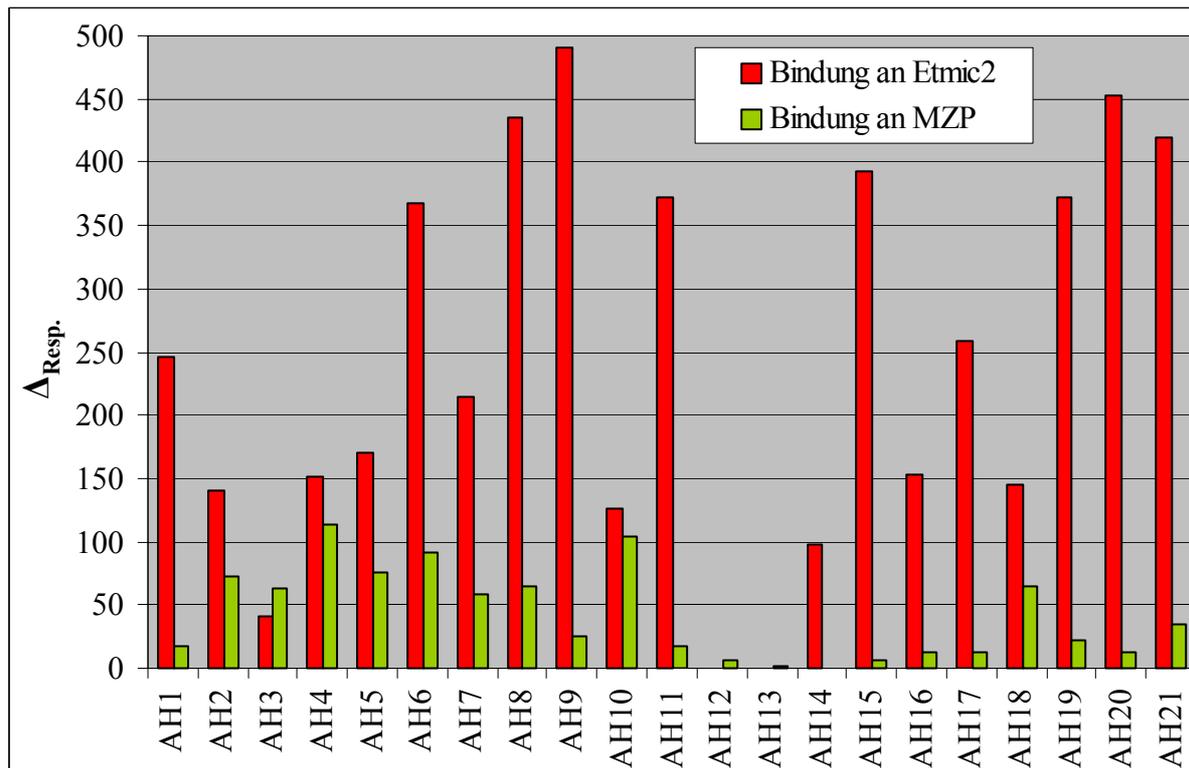


Abb. 22: Funktionelle Untersuchung von anti-Etmic2-scFv (AH, periplasmatische Extrakte) durch Oberflächenplasmonresonanz. Dargestellt ist die Bindung der einzelnen AH an Etmic2 bzw. MZP als Signaldifferenz $\Delta_{\text{Resp.}}$ (vgl. Abb. 21).

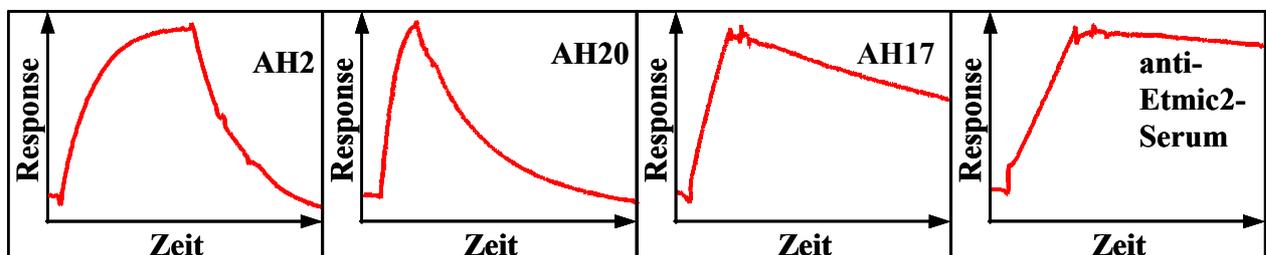


Abb. 23: Veranschaulichung der Bindungsverläufe der anti-Etmic2-scFv AH2, AH20 und AH17 sowie des anti-rEtmic2-Serums. Es wurden jeweils 20 μl einer 1:10-Verdünnung des AH bzw. einer 1:100-Verdünnung des anti-rEtmic2-Serums injiziert. Dargestellt sind die Signale der Flußzelle mit immobilisiertem Etmic2. Die Assoziations- und Dissoziationsphasen der Bindung von AH5, AH6, AH8, AH9, AH11, AH14, AH15, und AH19 hatten ähnliche Anstiege wie die von AH2 und AH20. Aufgrund unterschiedlicher Antikörpermengen sind die Kurven nicht maßstabsgerecht dargestellt.

4.2.3 Bestimmung der Affinität von anti-Etmic2-scFv

Vorversuche hatten gezeigt, daß die zu erwartenden geringen Affinitäten der scFv durch die SPR-Technologie nicht zuverlässig bestimmt werden konnten, weil die Reinheit der scFv-Präparationen für die Aufnahme von Bindungskurven über den benötigten Konzentrationsbereich nicht ausreichte. Aus diesem Grund wurde ein kompetitiver ELISA zur Affinitätsbestimmung eingesetzt, wobei der Antikörper mit einem Überschuß an gelöstem Antigen vorinkubiert und anschließend in eine Kavität mit immobilisiertem Antigen gegeben wird. Besitzen die Antikörperfragmente eine geringe Dissoziationskonstante, werden nur wenige von ihnen frei und können dann an das immobilisierte Antigen binden. Daraus resultiert ein relativ niedriges ELISA-Signal beim Nachweis der gebundenen Antikörper.

Weil der immunologische Nachweis der anti-Etmic2-scFv auf ihrem His-Tag beruht, war Etmic2-His für diese Untersuchungen nicht geeignet. Versuche, den His-Tag des Antigens nach der IMAC durch Faktor Xa proteolytisch zu entfernen [Steinberg und Nemerson, 1982; Nagai und Thogersen, 1987], waren nicht erfolgreich. Deshalb mußte Etmic2 umklontiert und durch eine alternative Methode gereinigt werden (vgl. 4.1.2). Das dabei erhaltene Etmic2-*c-myc* wurde dann für den kompetitiven ELISA verwendet, dessen Prinzip in Abb. 24 dargestellt ist.

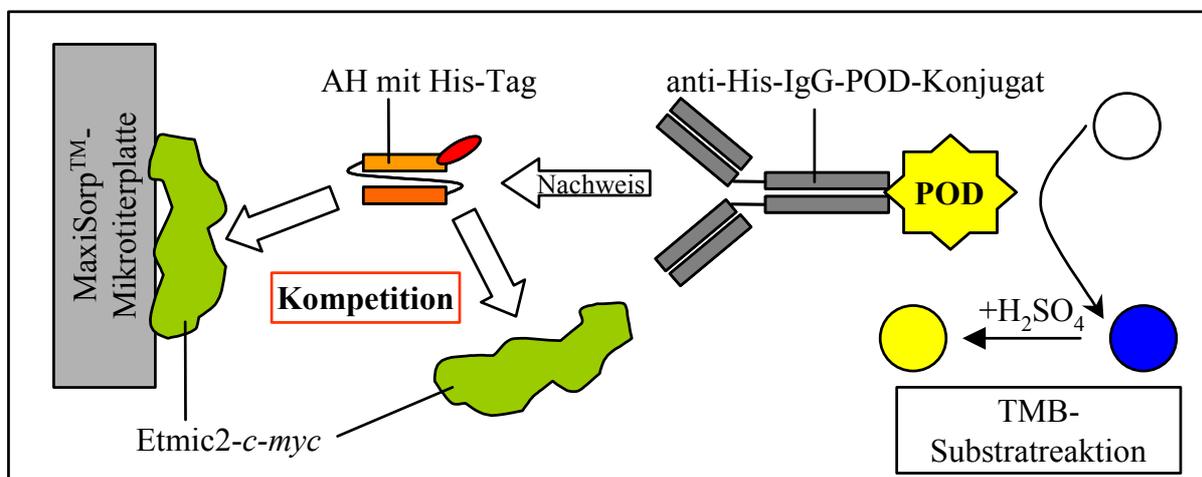


Abb. 24: Prinzip eines kompetitiven ELISA zur Bestimmung der Affinität von anti-Etmic2-scFv (AH) für gelöstes Etmic2. Der AH wird mit gelöstem Etmic2-*c-myc* vorinkubiert und dann in die Kavität einer Mikrotiterplatte gegeben, in welcher Etmic2-*c-myc* vorher durch Adsorption immobilisiert wurde. Der Nachweis des an das immobilisierte Antigen gebundenen AH erfolgt anhand seines His-Tags mit anti-His-IgG-POD-Konjugat und eine TMB-Substratreaktion, deren Reaktionsprodukt mit H_2SO_4 zu einer Verbindung reagiert, deren Absorption bei 450 nm gemessen werden kann.

In Vorversuchen wurden zunächst die geeigneten Mengen an immobilisiertem Etmic2-*c-myc* und scFv bestimmt. Unter diesen Bedingungen wurden anschließend die Konkurrenzkurven

von fünf verschiedenen anti-Etmic2-scFv erstellt. Nur AH6 und AH17 besaßen eine ausreichend starke Affinität, um mit den einsetzbaren Mengen an gelöstem Etmic2-*c-myc* eine nahezu vollständige Konkurrenz zu erreichen (siehe Abb. 25). Dies war bei AH5, AH11 und AH15 nicht möglich. Die sich aus den Konkurrenzkurven ableitenden Affinitäten lagen in etwa bei 3 μM für AH6 bzw. bei 0,3 μM für AH17 und sind damit relativ schwach.

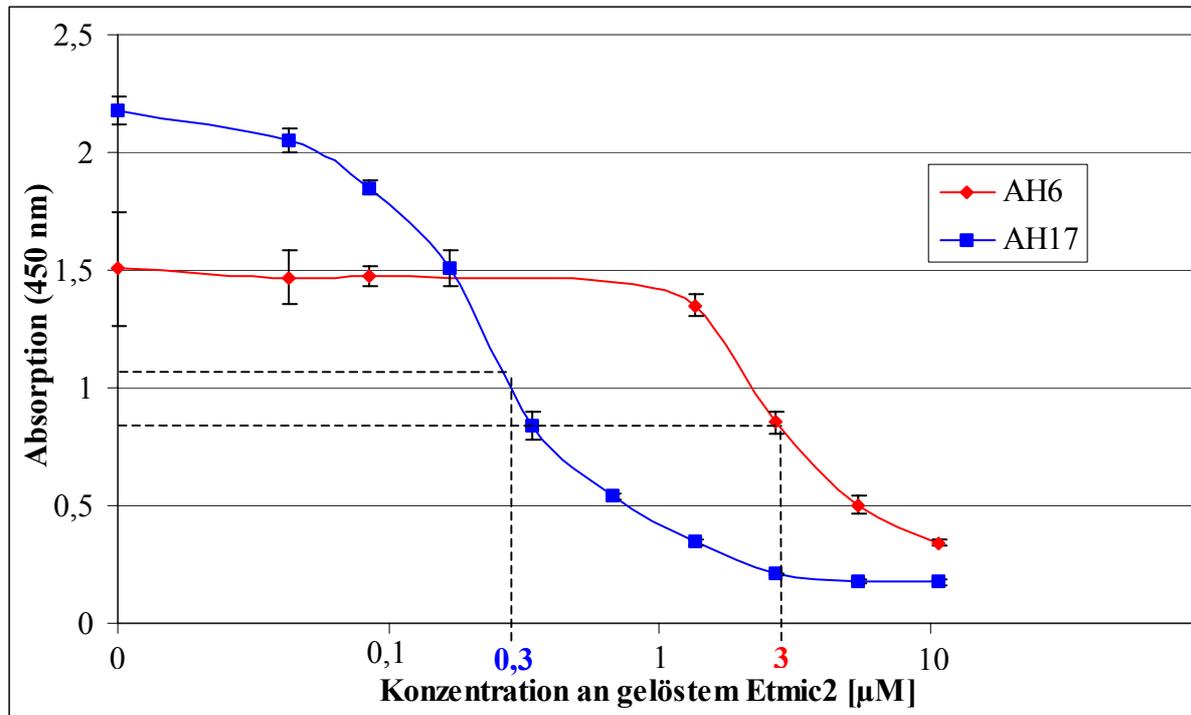


Abb. 25: Konkurrenzkurven der anti-Etmic2-scFv AH6 und AH17. Es wurden 300 ng Etmic2-*c-myc* zur Beschichtung der ELISA-Platte und jeweils 75 ng AH eingesetzt. Die Bindung des AH an die Platte wurde mit anti-His-IgG-POD-Konjugat nachgewiesen. Die durch POD katalysierte TMB-Substratreaktion war bei 450 nm photometrisch meßbar und ist hier in Abhängigkeit von der Konzentration an gelöstem Etmic2-*c-myc* dargestellt. Die halbmaximale Hemmung der Bindung an immobilisiertes Etmic2-*c-myc* wird bei etwa 3 μM (AH6) bzw. rund 0,3 μM (AH17) erreicht.

4.3 Binden anti-Etmic2-scFv an Etmic2 aus *E.tenella*?

Voraussetzung für die Hemmung der Invasion von *E.tenella* durch scFv ist, daß diese zunächst überhaupt an die infektiösen Stadien des Parasiten (Sporozoiten und Merozoiten) binden. Die anti-Etmic2-scFv wurden durch eine Selektion an Etmic2-His erhalten. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten Etmic2 entspricht fast völlig der aus *E.tenella*-isolierten Form dieses Antigens, wie sie durch Tomley et al. [1996] beschrieben wurde. Etmic2-His enthält neben dem His-Tag auch einen N-terminalen Bereich, der wahrscheinlich als Signalpeptid dient und abgespalten wird, weil er bei der Sequenzierung des reifen Polypeptids fehlt. [Tomley et al., 1996]

4.3.1 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Sporozoiten- bzw. Oozystenextrakte

Etmic2 wurde in allen infektiösen Stadien von *E.tenella* nachgewiesen [Tomley et al., 1996]. Um zu untersuchen, ob die durch Selektion mit rekombinantem Etmic2 erhaltenen scFv auch an natives Etmic2 binden, wurden Proteinextrakte von sporulierten Oozysten und von Sporozoiten für Untersuchungen durch ELISA und Immunoblot eingesetzt. Als „nativ“ wird in der vorliegenden Arbeit Etmic2 bezeichnet, welches nicht rekombinant exprimiert, sondern aus *Eimeria*-Material isoliert wurde. Dabei sagt hier die Bezeichnung „nativ“ nichts über den Faltungszustand des Proteins aus.

Die Kavitäten einer MaxiSorp™-Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 53 ng Oozystenextrakt bzw. 4,8 ng Sporozoitenextrakt beschichtet und mit den periplasmatischen Extrakten verschiedener anti-Etmic2-scFv inkubiert. Als Positivkontrolle diente dabei ein Antikörper, welcher bei einem Selektionsvorgang mit Oozystenextrakt isoliert wurde, dessen genaues Antigen jedoch unbekannt ist. Als Negativkontrolle wurde BSA eingesetzt. Die Antikörperfragmente wurden anhand ihres His-Tags mit anti-His-IgG-POD-Konjugat nachgewiesen. Das Kontroll-scFv zeigte eine deutliche Bindung sowohl an Oozysten- als auch Sporozoitenextrakt, während bei den anti-Etmic2-scFv keine eindeutig über dem Hintergrund liegenden Absorptionswerte gemessen werden konnten (siehe Abb. 26).

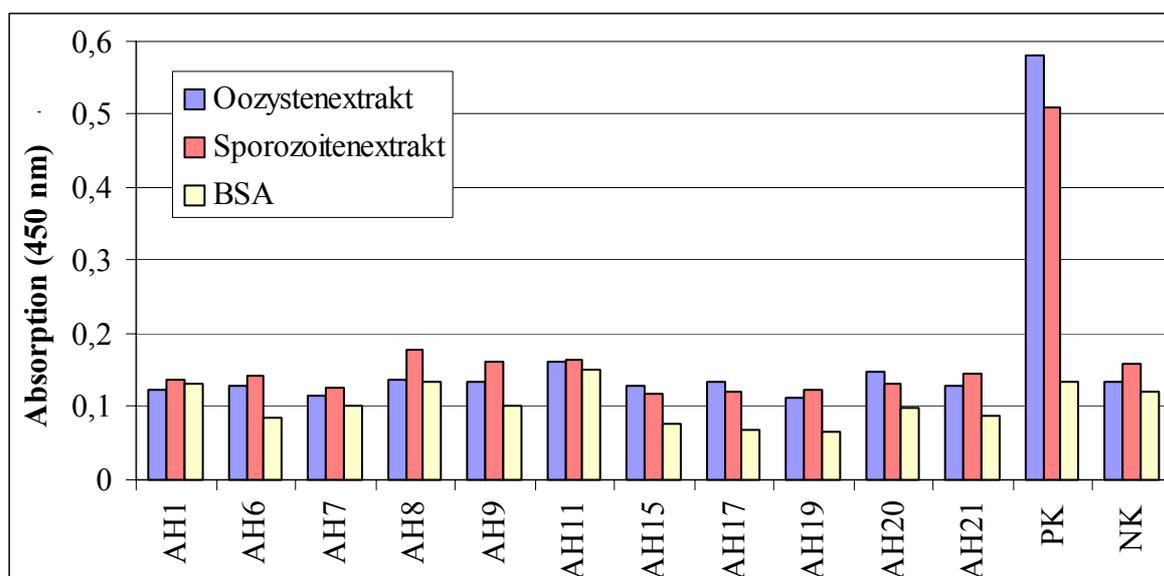


Abb. 26: Untersuchung der Bindung verschiedener anti-Etmic2-scFv (AH) an natives Etmic2 aus Oozysten- bzw. Sporozoitenextrakt durch einen ELISA. Mit den Extrakten bzw. BSA (NK) beschichtete Kavitäten wurden mit den scFv (periplasmatische Extrakte) inkubiert. Als Positivkontrolle (PK) diente ein scFv, welches an immobilisiertem Oozystenextrakt selektiert wurde. Dargestellt ist der bei 450 nm meßbare TMB-Substratumsatz als Maß für die Bindung der mit anti-His-IgG-POD-Konjugat nachgewiesenen scFv an das immobilisierte Antigen.

Möglicherweise läßt sich die Bindung von anti-Etmic2-scFv an natives Etmic2 auf diesem Wege nicht nachweisen, weil sie eine im Vergleich zu den Serumantikörpern viel geringere Affinität besitzen und weil der relative Anteil an Etmic2 in den Extrakten sehr niedrig ist. Aus diesem Grund konnte davon keine für einen Nachweis mit scFv ausreichende Antigenmenge immobilisiert werden, zumal die Bindekapazität einer MaxiSorpTM-Kavität begrenzt ist.

Der Nachweis von nativem Etmic2 im Immunoblot erlaubt es, mehr Antigen einzusetzen als beim ELISA. Die Extrakte von jeweils etwa $2,7 \times 10^5$ Oozysten bzw. $1,2 \times 10^5$ Sporoziten wurden dazu in einem 12 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte dann mit jeweils 5 µg / 5 ml scFv. Als Negativkontrolle wurde eine analog zu den scFv „gereinigte“ HB2151-Kultur verwendet. Als eine weitere Kontrolle wurde das anti-rEtmic2-Serum eingesetzt. Damit ließ sich sowohl im Oozysten- als auch im Sporozitenextrakt eine deutliche Bande bei etwa 48 kDa nachweisen (siehe Abb. 27).

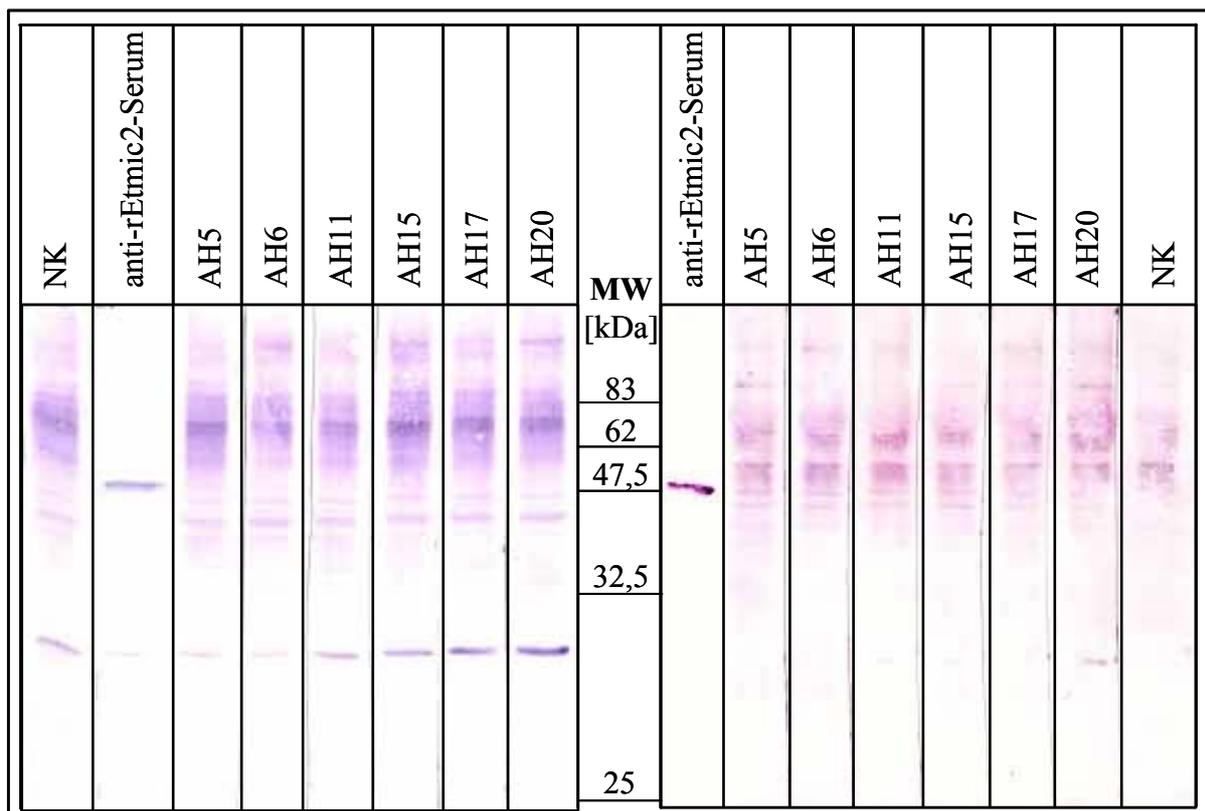


Abb. 27: Untersuchung der Bindung verschiedener AH an natives Etmic2 aus Oozysten- bzw. Sporozitenextrakt durch Immunoblot. Die Extrakte wurden durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit verschiedenen AH (über IMAC gereinigt) bzw. anti-rEtmic2-Serum. Dabei wurde der Immunoblot absichtlich überfärbt, um auch sicherzugehen, daß keine schwachen Signale übersehen wurden. Etmic2 ist bei einem Molekulargewicht von etwa 48 kDa zu erwarten. Die Größen der Molekulargewichtsstandardproteine sind links dargestellt.

Bei der 48 kDa-Bande handelt es sich sehr wahrscheinlich um Etmic2, dessen abweichendes Laufverhalten bei der SDS-PAGE bereits von Tomley et al. [1996] beschrieben wurde. Obwohl die mit anti-Etmic2-scFv inkubierten Immunoblots absichtlich überfärbt wurden, war im Vergleich zur Negativkontrolle keine dem Etmic2 entsprechende Bande festzustellen.

Eine Bindung der untersuchten anti-Etmic2-scFv an Etmic2 aus Oozysten- bzw. Sporozoitenextrakt konnte also weder durch einen ELISA noch durch einen Immunoblot nachgewiesen werden. Beim Nachweis mit dem anti-rEtmic2-Serum zeigte sich jedoch deutlich eine Bande im Größenbereich von Etmic2. Es war demnach eine Menge von Etmic2 in den Extrakten enthalten, welche für einen Nachweis mit Antiserum ausreicht. Geht man davon aus, daß die anti-Etmic2-scFv nicht nur an das rekombinante, sondern auch an das native Etmic2 binden, können nur im Vergleich zu den Serumantikörpern deutlich schwächere Affinitäten, auch zusammenhängend mit der geringen Avidität von scFv, Gründe dafür sein, daß das Antigen bei diesem Versuch mit den anti-Etmic2-scFv nicht nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Sporozoiten durch einen Zellanheftungstest

Mit Hilfe des Zellanheftungstests (CAT) wurde untersucht, ob immobilisierte Antikörper in der Lage waren, Sporozoiten durch Wechselwirkung mit deren Etmic2 zu binden und so zu verhindern, daß die Parasiten bei einer Zentrifugation pelletierten, wie es bei in Suspension befindliche Zellen der Fall wäre. Das Prinzip dieses Tests ist in Abb. 28 dargestellt.

Etmic2 stammt aus den Mikronemen, während der Invasion gelangt es jedoch an die Zelloberfläche und verteilt sich über den gesamten Sporozoiten (und auch über die Wirtszelle). Die Sekretion von Mikronemenproteinen, wie sie während des Invasionsvorgangs stattfindet, kann *in-vivo* auch durch die Inkubation der Sporozoiten mit z.B. FCS oder gereinigtem Albumin ausgelöst werden [Bumstead und Tomley, 2000]. Das Zellkulturmedium, in dem sich die Sporozoiten während der Präparation und Lagerung befanden, enthält fötales Kälberserum (FCS). Es ist deshalb zu erwarten, daß Mikronemenproteine sekretiert wurden und sich mindestens ein Teil des Etmic2 des Sporozoiten an seiner Oberfläche befindet und dort für die Bindung durch Antikörper zugänglich ist.

In den Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit V-Boden wurden die verschiedenen Antikörperfragmente anhand ihres His-Tags über zwei sogenannte Fangantikörper, anti-Maus-IgG und anti-Polyhistidin-IgG, immobilisiert. Als Positivkontrolle bei diesem Versuch diente der über anti-Maus-IgG immobilisierte mAK, welcher an ein bisher nicht genauer

identifiziertes Oberflächenantigen von Sporozoiten bindet [Zgrzebski, 1994]. Für die Negativkontrolle wurde die Kavität nur mit den beiden Fangantikörpern beschichtet. Nach der Inkubation mit einer Sporozoitensuspension wurde 30 min mit 2100 x g zentrifugiert. Dadurch entstand in der Spitze des V-Bodens der Kavität ein kompaktes, unter dem Mikroskop gut sichtbares Pellet aus nicht gebundenen Sporozoiten.

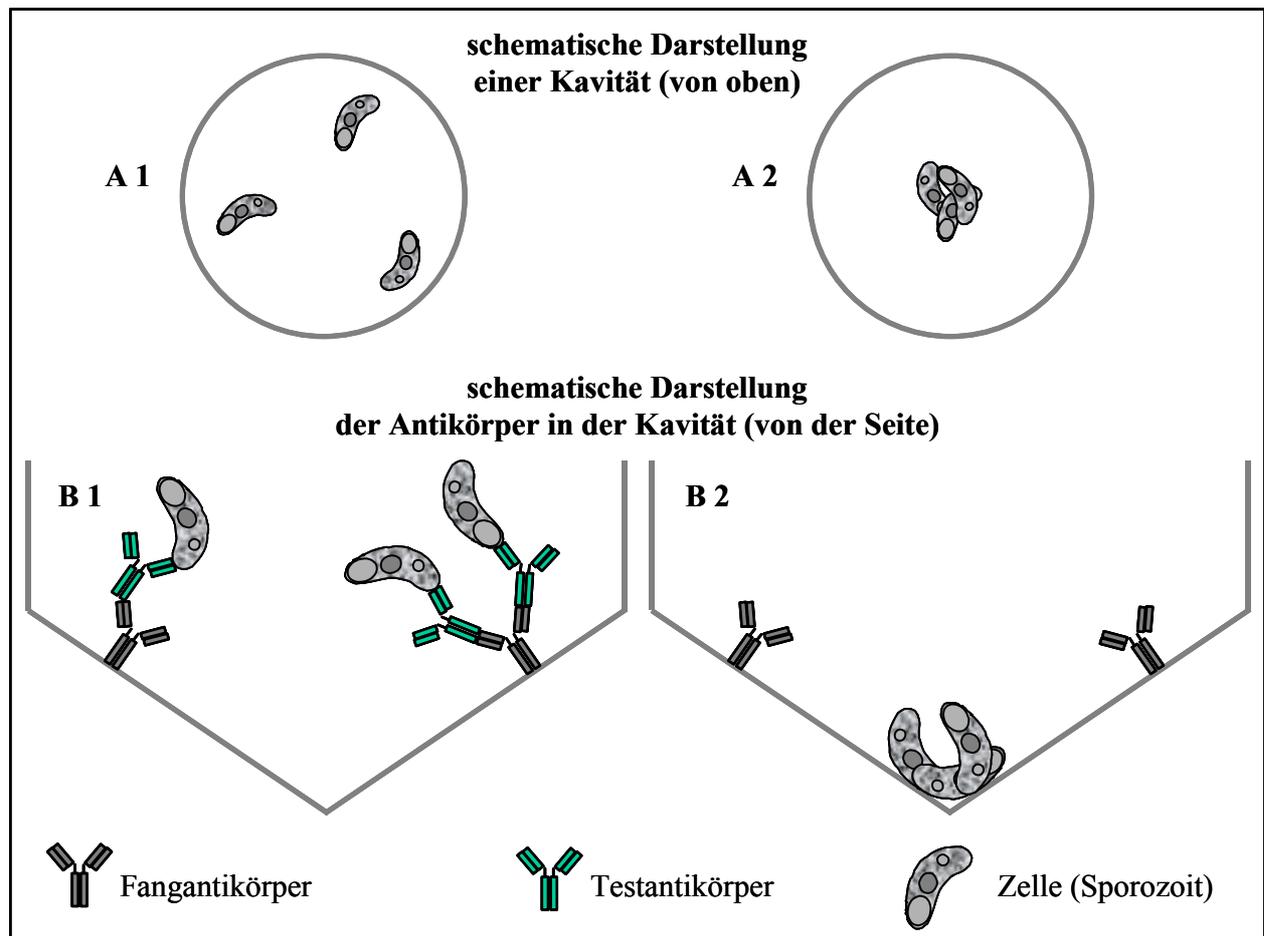


Abb. 28: Prinzip des Zellanheftungstests zur Untersuchung der Bindung immobilisierter Antikörper an Zellen. Der zu untersuchende Testantikörper wird durch einen (oder mehrere) Fangantikörper in der Kavität einer ELISA-Platte mit V-Boden gebunden und mit suspendierten Zellen inkubiert, welche dabei an den Testantikörper gebunden werden (B1). Der Bindungsnachweis erfolgt durch den Vergleich mit einer Negativkontrolle (B2), bei welcher nach der Zentrifugation in der Spitze des V-Bodens ein sichtbares Pellet aus nicht gebundenen Zellen entsteht (A2).

Bei der Positivkontrolle banden die Sporozoiten an den monoklonalen Antikörper (mAK), welcher an der Wand der Kavitäten immobilisiert worden war. Das vorhandene diffuse Pellet in der Spitze des V-Bodens bestand aus den Resten von Oozysten-hüllen und anderen Verunreinigungen der Sporozoitenpräparation. Es unterscheidet sich sichtbar von dem kompakten Pellet aus nicht gebundenen Sporozoiten, wie es in den Kavitäten mit der Negativkontrolle und mit den immobilisierten scFv zu sehen war (siehe Abb. 29). Durch den

CAT ließ sich also keine Bindung von anti-Etmic2-scFv an die Oberfläche von Sporozoiten nachweisen.

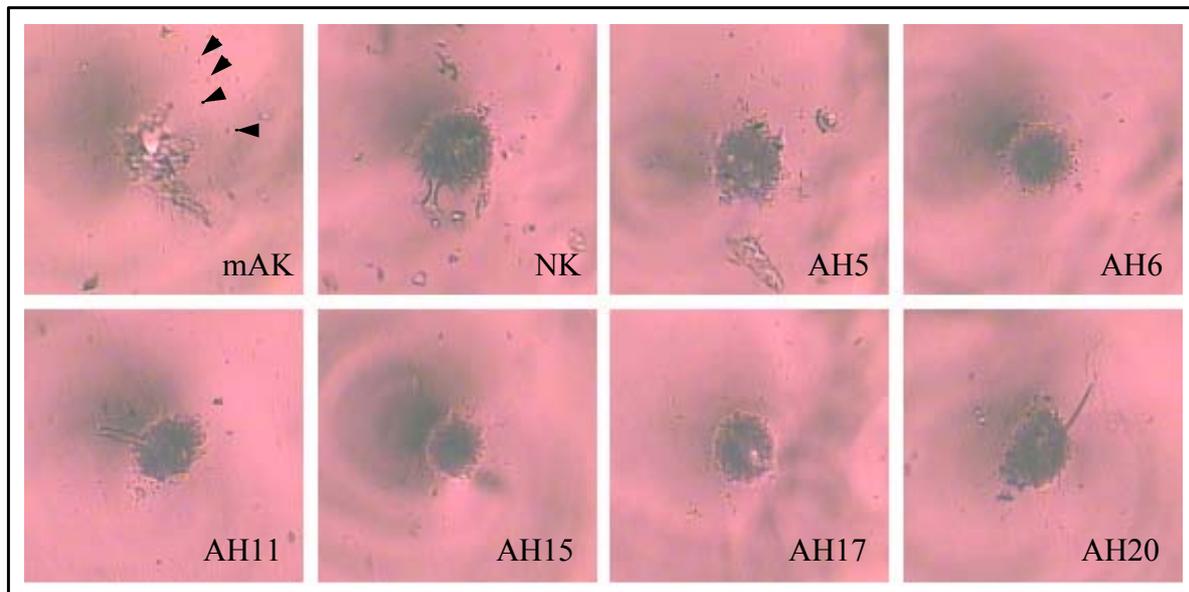


Abb. 29: Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv (AH) an Sporozoiten durch einen Zellanheftungstest. Über Fangantikörper in den Kavitäten einer ELISA-Platte mit V-Boden immobilisierte AH wurden mit einer Sporozoitensuspension inkubiert. Nach einer Zentrifugation pelletierten die nicht gebundenen Sporozoiten als kompaktes Pellet in der Spitze des V-Bodens (vgl. Abb. 28). Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen des V-Bodens von Kavitäten mit immobilisierten Antikörpern. Bei der Positivkontrolle (mAK) ist nur ein diffuses Pellet aus Resten von Oozystenhüllen und anderen Verunreinigungen der Sporozoitenpräparation zu erkennen. Die Sporozoiten (siehe Pfeile) waren hierbei an den mAK gebunden und ließen sich bei 2100 x g nicht pelletieren. Die AH zeigen dasselbe Bild wie die Negativkontrolle (NK), welche nur den Fangantikörper enthält.

4.3.3 Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Sporozoiten durch einen indirekten Immunfluoreszenztest

Mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (IFAT) kann die Bindung von Antikörpern an Zellen untersucht werden. Durch die Verwendung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) gekoppelten Nachweisantikörpers kann die Bindung mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise können nicht nur Informationen über das Vorhandensein eines Antigens, sondern auch über seine Verteilung auf der Zelle gewonnen werden. Wie bei anderen Methoden, z.B. ELISA, war es auch hier wichtig, entsprechende Negativkontrollen mitzuführen, um Effekte, die durch unspezifische Bindungen des Nachweisantikörpers oder durch Eigenfluoreszenz entstehen, abschätzen zu können. Dafür wurde im Testansatz nur mit den Nachweisantikörpern inkubiert.

Für den IFAT wurden durch IMAC gereinigte Präparationen von sechs verschiedenen anti-Etmic2-scFv verwendet. Zunächst erfolgte die Immobilisierung von Sporozoiten durch Antrocknen einer Suspension auf einem Glasobjektträger. Wie Vorversuche zeigten, konnte auf diese Weise ein größerer Anteil der eingesetzten Sporozoiten auf den Objektträger aufgebracht werden als durch Verwendung einer Zytocentrifuge. Die Immobilisierungsmethode, eine 30minütige Fixierung mit Paraformaldehyd oder eine 15minütige Inkubation mit Methanol zur Permeabilisierung der Zellen beeinflussten die Ergebnisse der Immunmarkierung nicht. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % BSA wurden die immobilisierten Sporozoiten über Nacht mit den scFv bzw. mit dem anti-rEtmic2-Serum inkubiert. Dazu wurden mindestens 11 ng/ μ l scFv bzw. eine 1:200-Verdünnung des Serums eingesetzt. Der Nachweis der Antikörperfragmente erfolgte mit einem anti-penta-His-IgG-AlexaFluor[®]488-Konjugat. Das anti-rEtmic2-Serum wurde mit einem anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat nachgewiesen. Bei einer Blauanregung (470-490 nm) wurden die Fluorophore der beiden Nachweisantikörper mit einer grünen Emission im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

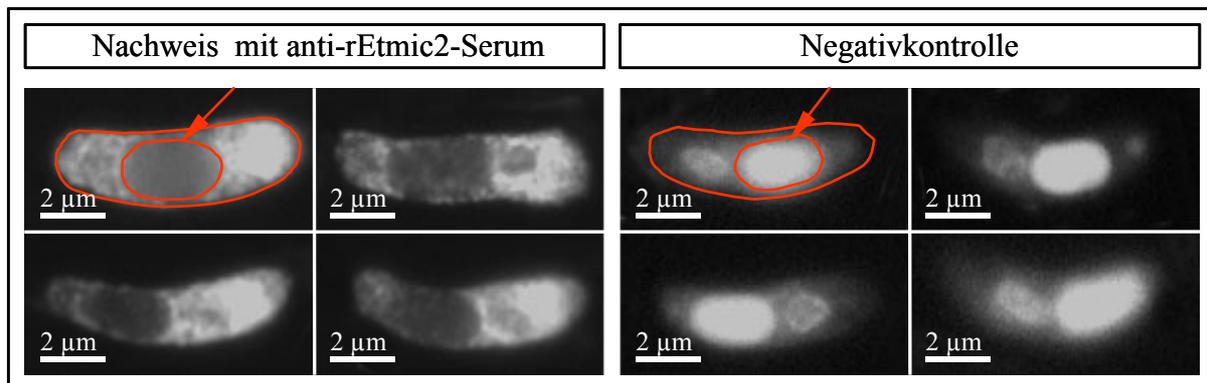


Abb. 30: Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv und anti-rEtmic2-Serum an immobilisierte Sporozoiten durch IFAT. Die Sporozoiten wurden auf einen Glasobjektträger aufgebracht und mit den Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen sekundären Antikörper, welcher mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von jeweils vier mit anti-rEtmic2-Serum bzw. nur dem Nachweisantikörper (Negativkontrolle) inkubierten Sporozoiten. Die anti-Etmic2-scFv zeigten dasselbe Bild wie die Negativkontrolle. Zellbegrenzung und refraktiler Körper sind bei je einem Beispiel zur besseren Verdeutlichung rot hervorgehoben. Die Sporozoiten weisen eine starke Eigenfluoreszenz im Bereich der refraktilen Körper auf (siehe Pfeile). Bei den mit anti-rEtmic2-Serum inkubierten Sporozoiten kommt eine stärkere Fluoreszenzmarkierung dazu, die sich in Flecken über die gesamte Zelle erstreckt. Dadurch erscheint die Eigenfluoreszenz der refraktilen Körper schwächer als bei der Negativkontrolle. Um einen Eindruck von den tatsächlichen Fluoreszenzintensitäten zu bekommen, muß man sich deshalb die Helligkeiten der refraktilen Körper als gleich vorstellen.

Wie Abb. 30 zeigt, weisen die Sporozoitien bei dieser Wellenlänge, v.a. im Bereich der beiden refraktilen Körper, eine deutliche Eigenfluoreszenz auf. Bei den mit dem anti-rEtmic2-Serum markierten Sporozoitien war darüber hinaus eine fleckige Fluoreszenzmarkierung des gesamten Sporozoitien zu erkennen. Diese fehlte jedoch bei den mit den scFv inkubierten Sporozoitien, welche damit dasselbe Bild wie die Negativkontrollen mit anti-penta-His-IgG-AlexaFluor[®]488- bzw. anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat zeigten.

Auch durch den IFAT mit immobilisierten Sporozoitien ließ sich keine Bindung von anti-Etmic2-scFv nachweisen. Durch das anti-rEtmic2-Serum konnte jedoch eine Fluoreszenzmarkierung der Sporozoitien erhalten werden - ein weiterer Hinweis darauf, daß dieses Serum an natives Etmic2 bindet (vgl. 4.3.1).

4.3.4 Vergleich der Epitope von anti-Etmic2-scFv und Serumantikörpern gegen natives Etmic2 durch einen kompetitiven ELISA

Eine Bindung von anti-Etmic2-scFv an natives Etmic2 bzw. an Sporozoitien ließ sich weder durch einen ELISA oder einen Immunoblot mit Proteinextrakten von *E.tenella*, noch durch einen Zellanheftungstest oder einen IFAT nachweisen. Ein Grund hierfür kann eine sehr geringe Affinität der Antikörperfragmente sein. Bereits die Biacore-Untersuchungen wiesen darauf hin, daß die Affinitäten der scFv relativ niedrig sind (vgl. 4.2.2). Dies konnte exemplarisch für AH5, AH6, AH11 und AH17 durch einen kompetitiven ELISA mit gelöstem Etmic2 bestätigt werden (vgl. 4.2.3). Ein anderer Grund dafür, daß sich die Bindung von scFv an natives Etmic2 mit den verwendeten Methoden nicht nachweisen ließ, kann ihre Spezifität sein. Möglicherweise erkennen die anti-Etmic2-scFv Epitope, welche auf dem rekombinanten Etmic2-His, nicht aber auf dem nativen Etmic2 vorhanden sind. Dies sollte durch einen kompetitiven ELISA mit anti-nEtmic2-Serum geklärt werden. Dieses Serum wurde von Dr. Fiona Tomley (IAH, Compton, UK) zur Verfügung gestellt. Es stammt aus Kaninchen, welche mit aus Mikronemen gereinigtem Etmic2 immunisiert wurden [Tomley et al., 1996]. Das anti-nEtmic2-Serum enthält also Antikörper, welche gegen Epitope auf dem nativen Etmic2 gerichtet sind. Epitope, die nur auf dem rekombinanten Etmic2-His, nicht aber auf dem nativen Etmic2 vorhanden sind, sollten von ihnen nicht erkannt werden. Die Bindung der Antikörperfragmente an solche Epitope des Etmic2-His wird demzufolge durch die Zugabe von anti-nEtmic2-Serum nicht beeinflusst. Falls ein scFv jedoch an ein Epitop bindet, das auch auf dem nativen Etmic2 vorhanden ist, kann das anti-nEtmic2-Serum eine kompetitive Hemmung dieser Bindung bewirken, wenn es die entsprechenden Antikörper enthält.

Um dies zu testen, wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt, dessen Prinzip in Abb. 31 dargestellt ist.

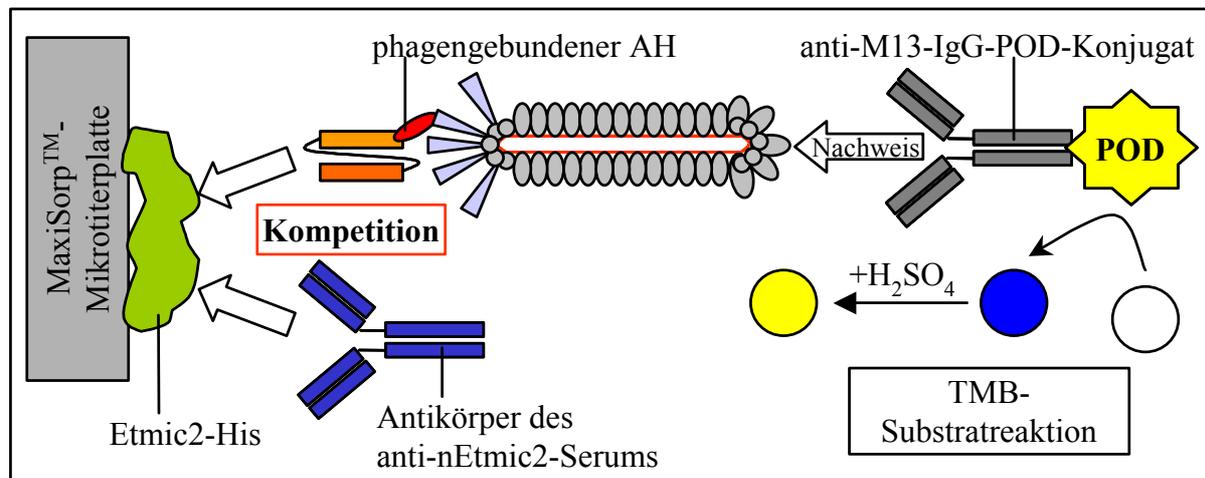


Abb. 31: Prinzip des kompetitiven ELISA zum Vergleich der Epitope verschiedener anti-Etmic2-scFv (AH) und der Antikörper des anti-nEtmic2-Serums. Die phagegebundenen AH binden an das immobilisierte Etmic2-His. Eine kompetitive Hemmung dieser Bindung durch das anti-nEtmic2-Serum findet nur statt, wenn das durch den AH erkannte Epitop auch von Serumantikörpern erkannt wird, also auch auf nativem Etmic2 vorkommt.

In den Kavitäten einer MaxiSorp™-Mikrotiterplatte immobilisiertes Etmic2 wurde dabei mit einem phagegebundenen anti-Etmic2-scFv bzw. dem scFv und anti-nEtmic2-Serum inkubiert. Der Nachweis der Phagen erfolgte durch ein anti-M13-IgG-POD-Konjugat und eine Farbreaktion mit TMB. In Vorversuchen waren die Sättigungsbereiche des immobilisierten Etmic2-His bzw. der phagegebundenen scFv bestimmt worden (Daten nicht gezeigt). Für den eigentlichen Test wurden im linearen Bereich der Sättigungskurve liegende Mengen eingesetzt. Die Bindung von anti-nEtmic2-Serum an immobilisiertes Etmic2-His wurde mit einem ELISA getestet und konnte noch bei einer Verdünnung von 1:15.000 nachgewiesen werden (siehe Abb. 32). Die Untersuchung einer Verdünnung von 1:1.000 lag bereits außerhalb des linearen Bereiches der Nachweismethode.

Für den kompetitiven ELISA wurde das anti-nEtmic2-Serum 1:900 verdünnt, trotzdem konnte keine hemmende Wirkung auf die Bindung von phagegebundenen scFv an rekombinantes Etmic2-His beobachtet werden (siehe Abb. 33).

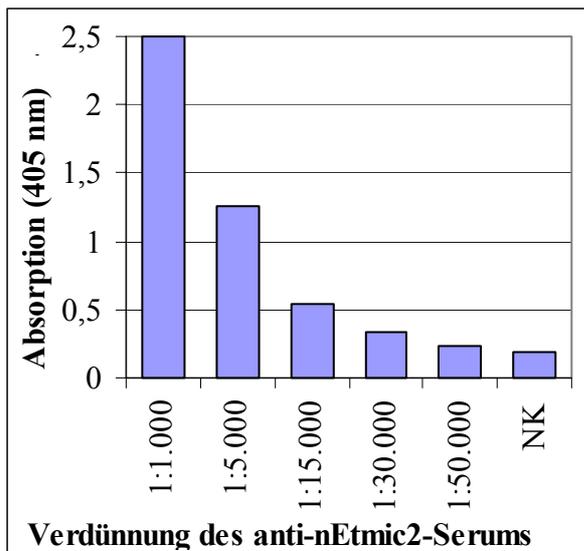


Abb. 32: Nachweis der Bindung von Antikörpern des anti-nEtmic2-Serums an immobilisiertes Etmic2-His im ELISA. Die Kavitäten einer MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte wurden mit Etmic2-His beschichtet und mit verschiedenen Verdünnungen des anti-nEtmic2-Serums inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch ein anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat und den dadurch katalysierten Umsatz von pNPP. Bei der Negativkontrolle (NK) wurde nur mit diesem Nachweisantikörper inkubiert. Dargestellt ist der bei 405 nm meßbare Substratumsatz.

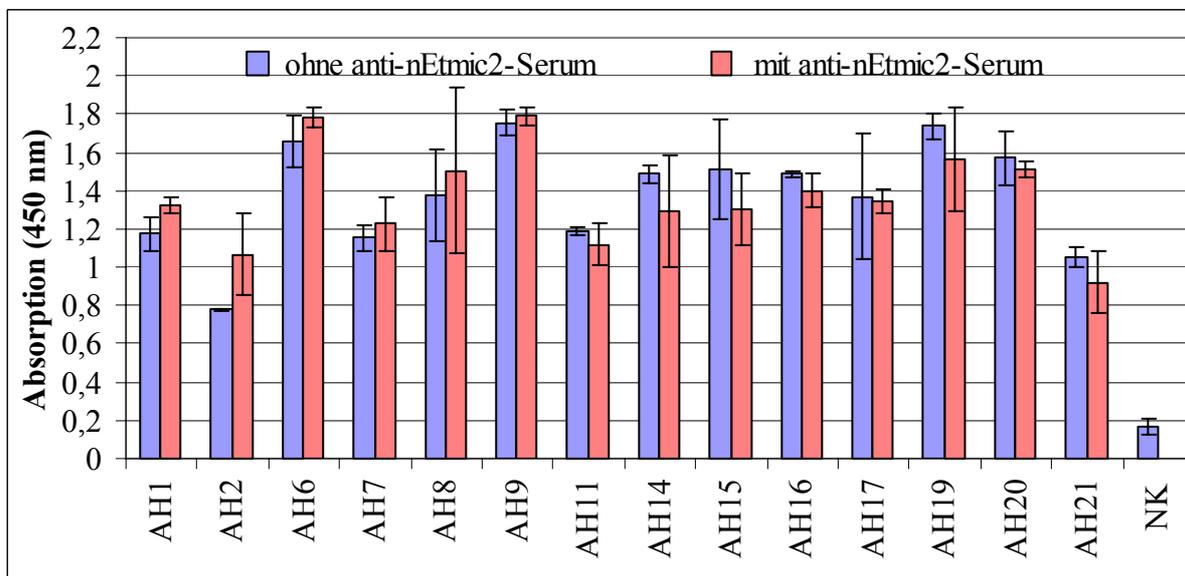


Abb. 33: Kompetitiver ELISA zum Epitopvergleich der verschiedenen AH mit den Antikörpern des anti-nEtmic2-Serums. In den Kavitäten einer MaxiSorpTM-Mikrotiterplatte wurde Etmic2-His immobilisiert und mit dem phagegebundenen AH mit bzw. ohne den Zusatz von anti-nEtmic2-Serum inkubiert. Die gebundenen Phagen wurden durch anti-M13-IgG-POD-Konjugat und einer TMB-Substratreaktion nachgewiesen. Bei der Negativkontrolle (NK) wurde nur mit anti-nEtmic2-Serum inkubiert. Dargestellt ist der Substratumsatz als Absorptionswert bei 450 nm.

4.4 Untersuchungen zur Kalziumabhängigkeit der Sporozysten-Invasion

Intrazelluläres Kalzium (Ca^{2+}) spielt als intrazellulärer Mediator (second messenger) eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Zellfunktionen. Dazu gehören Kontraktion, Sekretion, Zellteilung und Differenzierung sowie die Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen. Die Aufnahme und Freisetzung von Ca^{2+} über die Plasmamembran und die Membranen verschiedener Organellen wird durch ein Ca^{2+} -Transportsystem geregelt und kontrolliert die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration [Moreno und Docampo, 2003]. Diese ist im

Regelfall mit $< 10^{-7}M$ gegenüber den Konzentrationen im extrazellulären Raum ($\sim 10^{-3}M$) und in Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), sehr niedrig. Einige intrazelluläre Parasiten nutzen die Ca^{2+} -Signalwege der Wirtszelle [Gazarini et al., 2003] für ihre Zellfunktionen und damit für ihr Überleben. Parasiten, wie z.B. *Toxoplasma*, welche aktiv in Wirtszellen eindringen und sie wieder verlassen, nutzen sehr wahrscheinlich ihr eigenes Ca^{2+} -Signalsystem während dieser Vorgänge [Arrizabalaga und Boothroyd, 2004]. Über die entscheidende Rolle von Ca^{2+} beim Invasionsvorgang von *Toxoplasma gondii*, einer *E.tenella* verwandten Spezies protozoischer Parasiten, ist auch durch den Einsatz verschiedener Wirkstoffe, welche die intrazelluläre Konzentration dieses Mediators beeinflussen, schon einiges bekannt [Bonhomme et al., 1999; Bouchot et al., 1999; Vieira und Moreno, 2000; Lovett et al., 2002; Lovett und Sibley, 2003a; Arrizabalaga und Boothroyd, 2004]. Die Bedeutung von Ca^{2+} für die Infektionsfähigkeit von *Eimeria* ist weniger gut aufgeklärt. Es wurden einige Proteine, welche Ca^{2+} -bindende Domänen enthalten, beschrieben [Dunn et al., 1996b; del Cacho et al., 1998; Witcombe et al., 2003]. Bei *E.tenella* konnte jedoch im Gegensatz zu *T.gondii* die Sekretion von Mikronemenproteinen, einem für die Invasion wesentlichen Vorgang, nicht durch Ethanol, Ca^{2+} -Ionophore (Ionomyzin, Kalzimylin/A23187) oder BAPTA-AM, einem intrazellulären Ca^{2+} -Chelator, beeinflusst werden [Wiersma et al., 2004].

Einen ersten Hinweis darauf, daß extrazelluläres Ca^{2+} für die Invasion von *E.tenella* wahrscheinlich eine Rolle spielt, ergab sich bei dem Zellanheftungstest. Bei der Inkubation der Sporozoitensuspension mit dem mAK wurde in einem Fall statt DMEM bzw. HBSS der Ca^{2+} -freie Puffer PBS verwendet. Die Sporozoiten pelletierten in diesem Fall in der Spitze des V-Bodens (vgl. 4.3.2). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Bindung des mAK an sein Antigen auf der Sporozoitenoberfläche bei einem Mangel an Ca^{2+} gestört wird. Möglicherweise wird also auch der durch den mAK beeinflusste für die Invasion relevante Prozeß durch einen Mangel an Ca^{2+} beeinflusst.

4.4.1 Lebensfähigkeit und Infektiosität von *E.tenella*-Sporozoiten bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen

Ergebnisse des Zellanheftungstests hatten gezeigt, daß der mAK bei Ca^{2+} -Mangel nicht an Sporozoiten bindet. Es sollte deshalb untersucht werden, ob auch für den Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoiten eine Ca^{2+} -Abhängigkeit vorliegt. Es wurde deshalb ein Sporozoiten-Invasionshemmtest mit adhärennten MDBK-Zellen und Fluoreszein-markierten Sporozoiten bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen in DMEM-light durchgeführt. Abb. 34

zeigt eine infizierte MDBK-Zelle, die mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst wurde. Der Sporozoit in der abgerundeten Wirtszelle fluoresziert durch seine Fluoreszenzmarkierung grün.

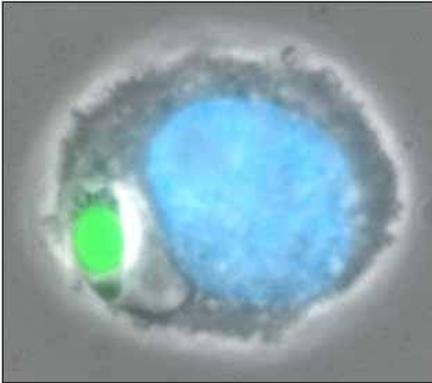


Abb. 34: MDBK-Zelle nach Eindringen eines Sporozoiten. Zur besseren Veranschaulichung wurden die phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Bilder kombiniert. Der mit Fluoreszein markierte Sporozoit links im Bild fluoresziert grün. Die blaue Fluoreszenz in der Wirtszelle ergibt sich durch eine Gegenfärbung mit DAPI.

In DMEM-light fehlt nicht nur das Ca^{2+} , sondern auch die Aminosäuren und Vitamine, welche im Zellkulturmedium DMEM enthalten sind. Es sollte deshalb auch geprüft werden, ob dies einen zusätzlichen Einfluß auf die Infektion der MDBK-Zellen hat. Dafür wurden Ansätze mit DMEM und DMEM-light, welchem 1,8 mM CaCl_2 (entspricht der Ca^{2+} -Konzentration in DMEM) zugesetzt worden war, wie nachfolgend für die verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen beschrieben, miteinander verglichen. Die Aminosäuren und Vitamine des Zellkulturmediums DMEM waren dabei für die Sporozoiten-Invasion nicht limitierend.

Um den Einfluß von Ca^{2+} zu untersuchen, wurden durch Zugabe einer CaCl_2 -Stammlösung die Ca^{2+} -Konzentrationen der zur Infektion eingesetzten Sporozoitenaliquots (in DMEM-light) eingestellt. Anschließend erfolgte die Infektion der MDBK-Zellrasen während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 . Die durch Trypsin vom Boden der Zellkulturplatte abgelösten und resuspendierten Wirtszellen wurden im Durchflußzytometer untersucht. Die Wirtszellen und Sporozoiten ließen sich dabei durch ihre Größe und Granularität voneinander unterscheiden. Als Parameter dafür dienten das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC). Die infizierten Wirtszellen konnten dabei anhand der eingedrungenen fluoreszenzmarkierten Sporozoiten identifiziert werden. Die Fluoreszenz wurde mit einem Laserlicht von 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm gemessen. In Abb. 35 ist exemplarisch ein Diagramm einer solchen Messung dargestellt. FSC als Parameter für die Zellgröße ist gegen die bei 530 nm gemessene Fluoreszenz des Fluoreszeins aufgetragen. Im linken oberen Bereich des Diagramms befindet sich die Population der nicht infizierten MDBK-Zellen (R1). Sie sind größer als die im rechten unteren Bereich befindlichen Sporozoiten (R3) und fluoreszieren wesentlich weniger als diese. Im rechten

oberen Bereich befinden sich die infizierten Wirtszellen (R2). Sie tauchen durch ihre Größe oberhalb der Sporozoiten und durch die Fluoreszenzmarkierung der intrazellulären Sporozoiten rechts der nicht fluoreszierenden, nicht infizierten Wirtszellen auf. Die unterhalb der Wirtszellen befindlichen Signale stellen wahrscheinlich Verunreinigungen, wie z.B. Zelltrümmer, Bakterien oder Reste von Oozystenhüllen, dar. Die Identitäten dieser Populationen wurden mikroskopisch bestätigt. Die Größen der einzelnen Zellpopulationen wurden bestimmt und die Infektionsrate als Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtanzahl der Wirtszellen berechnet. Die Abgrenzung der Populationen erfolgte per Hand. Kleinere Variationen konnten dabei die Infektionsrate nicht merklich verändern.

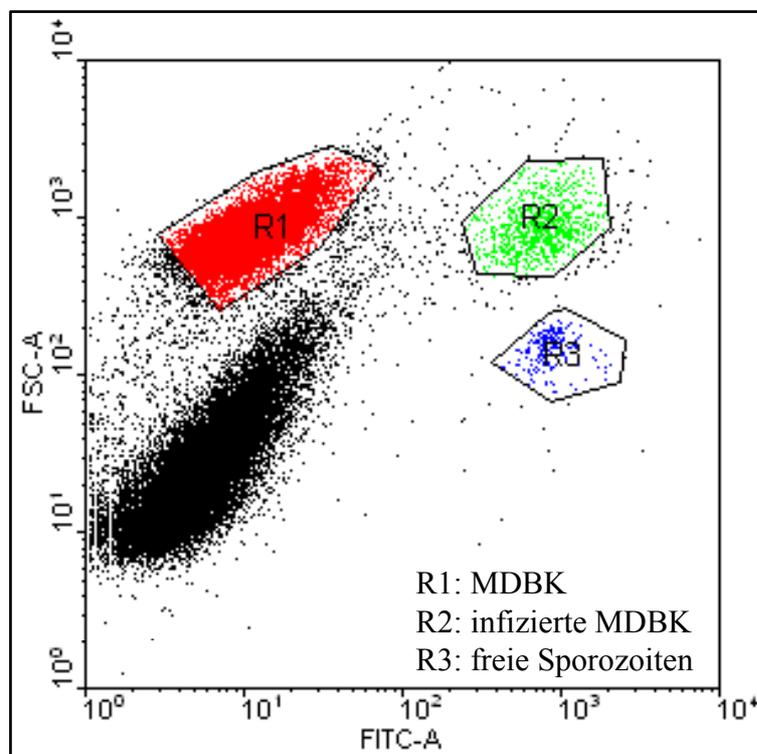


Abb. 35: Diagramm der durchflußzytometrischen Messung eines exemplarischen Sporozoiteninvasionshemmtests. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) als Parameter für die Zellgröße ist hier gegen die Fluoreszenz bei 530 nm (FITC) aufgetragen. Nichtinfizierte Wirtszellen erscheinen bei niedrigen Fluoreszenz- und hohen FSC-Werten (R1). Freie Sporozoiten sind kleiner und finden sich deshalb bei geringeren FSC- und durch ihre FITC-Markierung bei höheren Fluoreszenzwerten (R3). Die Population der Sporozoiten-infizierten MDBK-Zellen zeichnet sich durch Wirtszell-typische FSC- und Sporozoiten-typische Fluoreszenzwerte aus (R2).

In Abb. 36 ist der Einfluß verschiedener Ca²⁺-Konzentrationen auf die Sporozoiten-Invasion dargestellt. Die prozentuale Hemmung wurde dafür anhand der Infektionsraten berechnet und bezieht sich auf den Mittelwert der Infektionsraten bei 1,8 mM Ca²⁺ in DMEM-light. Es wurden jeweils mindestens zwei Parallelansätze gemessen. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde jeweils nur der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

Durch einen Mangel an Ca^{2+} konnte eine maximale Hemmung von etwa 70 % erreicht werden. Bereits bei der noch relativ hohen Ca^{2+} -Konzentration von 180 μM wurde die Invasion in nahezu maximal möglichem Maße gehemmt. Eine halbmaximale Hemmung wurde bei etwa 600 μM Ca^{2+} erreicht. Dies zeigt, daß der Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoitien. *in vitro* stark von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig ist.

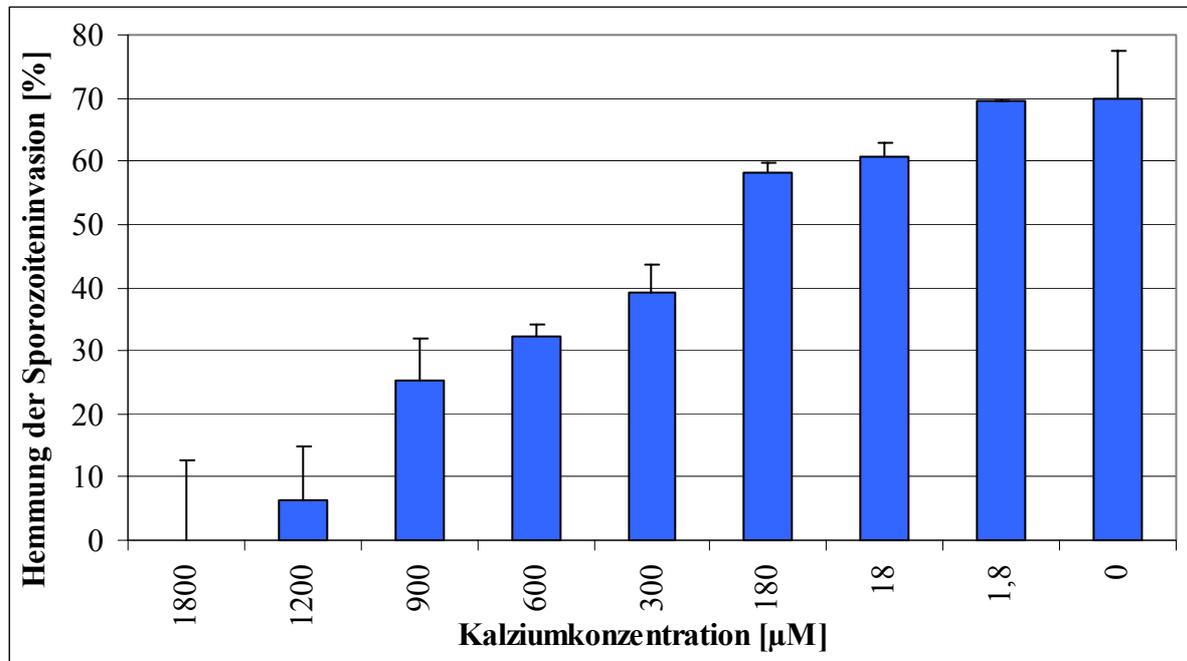


Abb. 36: Hemmung der Invasion von *E.tenella*-Sporozoitien bei verringerter Ca^{2+} -Konzentration. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Sporozoitieninvasion in Bezug auf die Infektionsrate bei 1,8 mM CaCl_2 . Diese Konzentration entspricht der im Zellkulturmedium DMEM. Für die dargestellten Werte wurden die Ergebnisse von mindestens zwei Einzelmessungen gemittelt.

Um unterscheiden zu können, ob der invasionshemmende Effekt des Ca^{2+} -Mangels spezifisch für die Sporozoitien ist oder durch eine Wirkung auf die Wirtszellen zustande kommt, wurden mit CFDA-SE-markierte *E.tenella*-Sporozoitien mindestens 2 h mit 0 mM und 1,8 mM Ca^{2+} inkubiert. Anschließend wurde die Ca^{2+} -Konzentration aller Proben auf 1,8 mM eingestellt, die Sporozoitien 2 h mit Monolayern von MDBK-Zellen inkubiert und die Infektionsraten mit Hilfe eines Durchflußzytometers bestimmt. Dabei zeigten die Proben mit den ohne Ca^{2+} vorinkubierten Sporozoitien im Vergleich zu denen mit 1,8 mM Ca^{2+} eine Abnahme der Infektionsrate von 10 % bis 20 %. Dies sind relativ hohe Abweichungen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß sich auch vorübergehender Ca^{2+} -Mangel negativ auf die Infektiosität der Sporozoitien auswirkt und es sich nicht um einen Effekt auf die Wirtszellen handelt.

Es stellte sich nun die Frage, ob die verminderte Invasionsrate von *E.tenella*-Sporozoitien bei geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen auch Ausdruck einer herabgesetzten Lebensfähigkeit der Parasiten ist. Um dies zu klären, wurden die Sporozoitien mindestens 2 h mit Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 0 mM und 1,8 mM Ca^{2+} inkubiert und anschließend verschiedene Viabilitätstests durchgeführt:

Bei der Färbung mit Trypanblau [Lindl und Bauer, 1994], einem sauren Proteinfarbstoff, der nur in Zellen mit geschädigten Membranen eindringen kann, konnten auch in Ca^{2+} -freiem Puffer keine blaufärbten Sporozoitien beobachtet werden. Bei Ca^{2+} -Mangel kam es also nicht zu einer mit Trypanblau identifizierbaren Permeabilisierung der Membran dieser Parasiten.

Mit dem Zytotoxizitätstest (Roche) war keine katalytische Aktivität von aus geschädigten Sporozoitien freigesetzter Laktatdehydrogenase meßbar. Die Gründe dafür können entweder die fehlende bzw. zu geringe Membranschädigung der *E.tenella*-Sporozoitien oder ein genereller Mangel an LDH in diesem Parasitenstadium sein.

Auch mit dem Zellproliferationstest (Roche) konnte keine Stoffwechselaktivität detektiert werden. Die Sporozoitien setzten MTT nicht zu dem photometrisch meßbaren Tetrazoliumsalz um. Der Grund dafür könnte eine zu geringe oder fehlende Aktivität des entsprechenden Stoffwechselweges sein.

Bei der Färbung mit dem Nukleinsäurefarbstoff Propidiumjodid [Fuller und McDougald, 2001] erlaubten die Daten der durchflußzytometrischen Messungen keine eindeutige Identifizierung einer Population Propidiumjodid-gefärbter, fluoreszierender Sporozoitien. Ein Vergleich des Einflusses verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen auf diesen Parameter war deshalb nicht möglich.

Auch die Fluoreszenzfärbung mit CFDA-SE kann einen Hinweis auf die Viabilität von Zellen geben [Ostrowska et al., 2000; Kamau et al., 2001]. Die Esterase lebender Zellen spaltet diesen Succinimidylester und führt so zur intrazellulären Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs. Mit 0 mM bzw. 1,8 mM Ca^{2+} inkubierte Sporozoitien wurden mit CFDA-SE inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht. Bei der Auftragung von FSC gegen SSC konnte die Sporozoitienpopulation vor dem Hintergrund von Verunreinigungen, wie z.B. Oozystenhüllen, identifiziert werden. Diese Zellpopulation wurde mit der Auftragung von FSC gegen die Fluoreszenz (FITC) genauer analysiert. Es ergaben sich dabei zwei Subpopulationen aus ungefärbten und fluoreszierenden Sporozoitien. Nach der Inkubation mit 1,8 mM Ca^{2+} betrug der Anteil nicht fluoreszierender Sporozoitien etwa 15,4 %. Von dem mit 0 mM Ca^{2+} inkubierten Sporozoitien waren etwa 18,0 % ungefärbt. Zur

Bestimmung dieser Verhältnisse wurden Gesamtpopulationen von mindestens 2.800 Sporozoiten herangezogen. Der Anteil ungefärbter Sporozoiten ist bei Ca^{2+} -Mangel höher als bei 1,8 mM Ca^{2+} , was auf eine geringere Viabilität unter diesen Bedingungen hinweisen kann. Der Unterschied von 2,6 % ist jedoch nicht signifikant.

4.4.2 Test verschiedener Kalziumeffektoren auf ihre Wirksamkeit im Sporozoiten-Invasionshemmtest

Die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen kann durch verschiedene Wirkstoffe beeinflusst werden, was bei *T.gondii*, einem der nächsten Verwandten der Eimerien, gut untersucht ist. Dabei handelt es sich z.B. um Ionenkanäle wie das Kalzimyzin (A-23187), welche in die Plasmalemma eingebaut werden und einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum ermöglichen. Die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration wird auch durch die Beeinflussung der zelleigenen Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmalemma oder in den Membranen von Organellen, wie des endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulums (ER oder SR) oder anderer Ca^{2+} -speichernder Organellen verändert. Dies kann durch die Bindung des Wirkstoffes an einen Ca^{2+} -Kanal bzw. an einen damit gekoppelten Rezeptor erreicht werden. Thapsigargin hemmt die Ca^{2+} -ATPase, welche Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in das ER transportiert. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung von Ca^{2+} im Zytoplasma [Moreno und Zhong, 1996] und zur Ausstülpung des Konoids von *T.gondii*, einem auch während der Invasion stattfindenden Vorgang [Mondragon und Frixione, 1996].

Inositol-1,4,5-triphosphat-(IP_3 -) und Ryanodin-Rezeptoren beeinflussen den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma. Bisher konnte keiner dieser Rezeptoren in einzelligen Organismen, einschließlich Hefen und Protozoen identifiziert werden. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß IP_3 eine Rolle beim Ca^{2+} -Fluß in verschiedenen Einzellern spielt [Passos und Garcia, 1998; Lovett et al., 2002; Marchesini et al., 2002]. 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) wird als ein nichtkompetitiver Antagonist von Inositol-1,4,5-triphosphat-(IP_3 -)Rezeptoren angesehen, über welche Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden kann. Neuere Untersuchungen weisen aber auf eine von IP_3 -Rezeptoren unabhängige Beeinflussung von Ca^{2+} -Kanälen hin. [Ma et al., 2001; Prakriya und Lewis, 2001; Bootman et al., 2002]. Ryanodin bindet an Ryanodinrezeptoren, welche die Funktion eines Ca^{2+} -Kanals besitzen, und stabilisiert in mikromolaren Konzentrationen den offenen Zustand. Dadurch wird z.B. Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskelzellen freigesetzt [Zucchi und Ronca-Testoni, 1997]. Durch höhere Ryanodinkonzentrationen kommt es jedoch zur dauerhaften Blockierung von Ryanodinrezeptor-Kanälen [Buck et al., 1992]. Eine Stimulation

der Mikronemensekretion von *T.gondii*-Tachyzoiten durch Ryanodin konnte von Lovett et al. (2002) gezeigt werden.

Koffein ist ein pharmakologischer Antagonist der von Ryanodinrezeptoren vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung. Es hat vielfältige Wirkungen auf eukaryotische Zellen und hemmt vor allem den Abbau des intrazellulären Mediators cAMP. Durch Koffein wird ebenfalls die Ca^{2+} -abhängige Sekretion von Mikronemenproteinen bei *T.gondii*-Tachyzoiten ausgelöst [Lovett et al., 2002]. Bei einigen Arten des Stammes der Apikomplexa befindet sich die größte intrazellulär gespeicherte Ca^{2+} -Menge in speziellen Organellen. Diese sind durch einen sauren pH-Wert, ihre hohe Dichte sowie einen hohen Gehalt an Pyrophosphat, Polyphosphat, Ca^{2+} , Magnesiumionen und anderen Substanzen gekennzeichnet [Docampo und Moreno, 2001]. Wie Carruthers und Sibley [1999] zeigten, kann NH_4Cl Ca^{2+} aus den sogenannten Azidokalzisomen von *T.gondii* freisetzen und dadurch eine Sekretion von Mikronemenproteinen auslösen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die sechs erwähnten Substanzen, welche direkt oder indirekt die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration von eukaryotischen Zellen verändern können, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Invasion von *E.tenella*-Sporozoitien untersucht. Bevor diese Stoffe im Hemmtest (vgl. 4.4.1) eingesetzt werden konnten, war es notwendig, ihren Effekt auf die Wirtszellen zu testen. Dafür wurde zunächst die Proliferations- und Lebensfähigkeit von MDBK-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen dieser Substanzen untersucht. Die meisten der eingesetzten Stammlösungen enthielten DMSO als Lösungsmittel. Deshalb wurden auch verschiedene DMSO-Konzentrationen getestet. Die Untersuchungen zeigten, daß sich 10 μM Kalzimyzin, 15 μM Thapsigargin, 100 μM 2-APB, 500 μM Ryanodin, 25 mM Koffein, 100 mM NH_4Cl bzw. 5 % DMSO bei einer Inkubationszeit von insgesamt 6 h negativ auf die Proliferationsfähigkeit von MDBK-Zellen auswirkten. Eine eindeutig zytotoxische Wirkung konnte bei einer Inkubationszeit von 2 h nur mit mehr als 100 μM Kalzimyzin nachgewiesen werden.

Bei dem anschließenden Sporozoitien-Invasionshemmtest wurden die Parasiten 30 min mit den Substanzen und dann mit den Wirtszellen inkubiert. Als Kontrollen für eine Hemmung dienten dabei der mAK und das Kokzidiostatikum Salinomyzin, deren hemmende Wirkung auf die Invasion von *E.tenella*-Sporozoitien bereits seit längerem bekannt ist [Smith et al., 1981; Zgrzebski, 1994]. Als Positivkontrolle wurden die Sporozoitien nur mit Medium inkubiert. Die prozentualen Angaben der Hemmung wurden auf die Infektionsrate dieser Positivkontrolle bezogen. Bei einem ersten Versuch zeigte sich, daß 1 μM Thapsigargin, 1 μM Calcimycin bzw. 5 mM NH_4Cl die Monolayer bei einer Inkubation über Nacht sichtbar

schädigen. Dadurch kann ihre Wirkung auf die Infektiosität von Sporozoiten auf diese Weise nicht bestimmt werden. Koffeinkonzentrationen von bis zu 250 μM hatten keinen Effekt auf die Invasionsrate. Mit Salinomycin bzw. dem mAK konnte unter den gewählten Bedingungen eine Hemmung von etwa 20 % erzielt werden.

In einem weiteren Versuch sollte die Wirkung von Ryanodin und 2-APB, speziell auch im Hinblick auf ihren Effekt auf die Wirtszellen, verglichen werden.

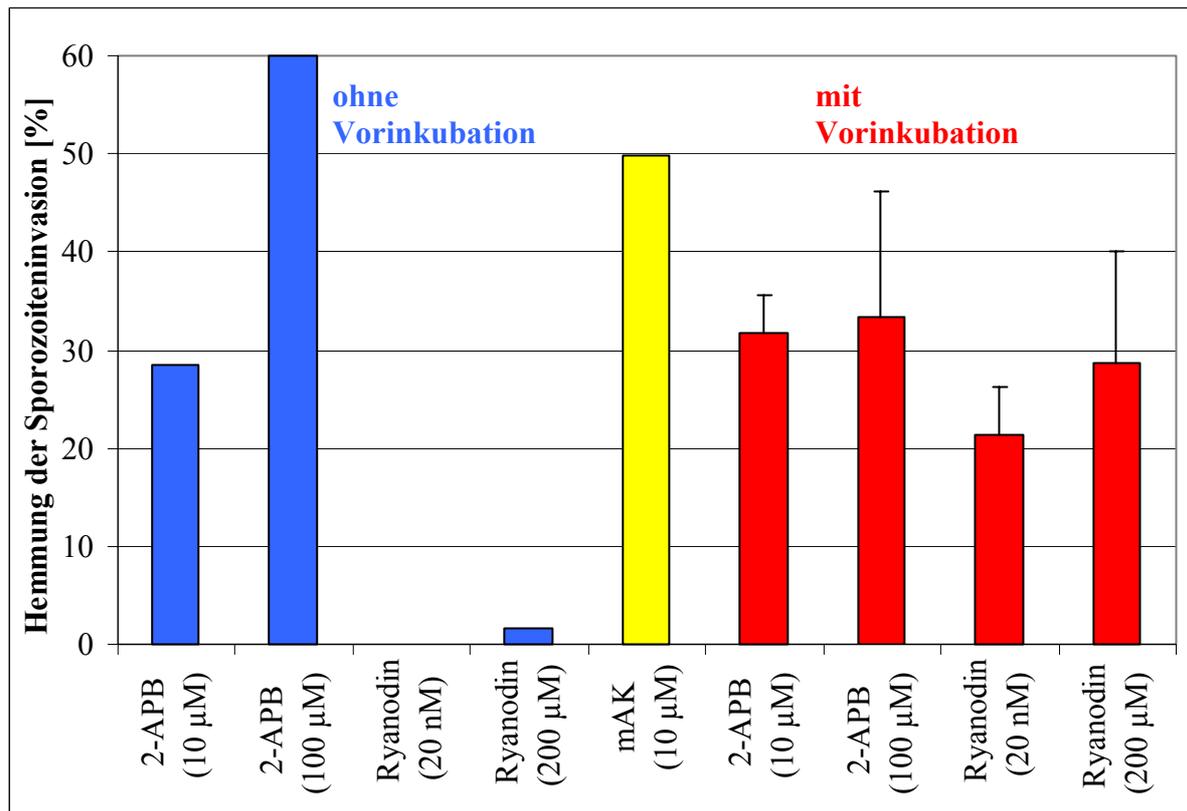


Abb. 37: Vergleich der Wirkung von 2-APB und Ryanodin im Sporozoiten-Invasionshemmtest. Um die Wirkung auf die Wirtszellen von der auf die Sporozoiten abzugrenzen, wurden die Sporozoiten mit bzw. ohne eine 30minütigen Vorinkubation mit der Substanz für die Infektion von MDBK-Zellrasen eingesetzt. Die Differenzierung von infizierten und nicht infizierten Wirtszellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie und dem Einsatz FITC-markierter Sporozoiten. Die prozentuale Hemmwirkung bezieht sich auf die Infektionsrate bei einer Kontrolle mit nur in Zellkulturmedium inkubierten Sporozoiten.

Bei den für die Infektion eingesetzten Sporozoitenaliquots handelt es sich um sehr geringe Mengen. Ein Auswaschen des Wirkstoffes nach der Vorinkubation der Sporozoiten mit ihm ist ohne den Verlust entscheidender Sporozoitenmengen nicht möglich. Um die Wirkung der Substanzen auf die Wirtszellen von der Wirkung auf die Sporozoiten abzugrenzen, wurde ein Teil der Sporozoiten 30 min mit der Substanz vorinkubiert und der andere Teil ohne Vorinkubation zusammen mit der Substanz auf die Wirtszellen gegeben und zwei Stunden (nicht über Nacht) inkubiert. Wie Abb. 37 zeigt, hemmt 2-APB sowohl mit als auch ohne

Vorinkubation der Sporozoiten deren Invasion. Bei Ryanodin ist demgegenüber nur mit vorinkubierten Sporozoiten eine nennenswerte Hemmwirkung zwischen 20 % und 30 % zu verzeichnen. Als Kontrolle wurde hier wieder der mAK eingesetzt, welcher unter diesen Bedingungen eine Invasionshemmung von 50 % bewirkte.

4.4.3 Besitzen *E.tenella*-Sporozoiten Ryanodin-Bindungsstellen?

Nachdem ein hemmender Effekt von Ryanodin auf die Infektion von MDBK-Zellen durch *E.tenella*-Sporozoiten festgestellt werden konnte, sollte gezeigt werden, daß die Sporozoiten Strukturen besitzen, welche Ryanodin spezifisch binden. Rezeptoren der IP₃/Ryanodine-Überfamilie sind für einzellige Organismen, einschließlich Hefen und Protozoen, bisher nicht beschrieben worden. Eine Wirkung von Ryanodin auf Apikomplexa konnte jedoch für *T.gondii* gezeigt werden, wo diese Verbindung die Mikronemensekretion der Tachyzoiten stimuliert [Lovett et al., 2002]. Die Familie der Ryanodinrezeptoren beinhaltet vielfältige nicht nur art-, sondern auch gewebespezifische Isoformen und ist phylogenetisch weit verbreitet. Biochemisch, molekular oder pharmakologisch wurden Ryanodinrezeptoren sowohl in Invertebraten (z.B. Hummer, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*) als auch in Vertebraten (Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Fischen und Amphibien) nachgewiesen [Sutko und Airey, 1996]. Die einzelnen Isoformen sind jedoch teilweise sehr verschieden. Der Ryanodinrezeptor aus dem Gewebe von *Drosophila* z.B. weist weniger als 50 % Homologie mit den in Vertebraten gefundenen Isoformen auf [Sutko et al., 1997].

Bestimmte Domänen sind jedoch typisch für die meisten Ryanodinrezeptoren. Dazu gehören die Ryr-Domäne und die SPRY-Domäne, deren Funktionen unbekannt sind, die RIH-Domäne, welche wahrscheinlich eine IP₃-Bindungsstelle bildet, sowie die MIR-Domäne, welche möglicherweise eine Ligandentransferase-Funktion besitzt [Bateman et al., 2004]. Zur Sequenzierung des Genoms von *Eimeria tenella* bestehen verschiedene Projekte, welche von einem Konsortium koordiniert werden. Über die Homepage des Welcome Trust Sanger-Instituts (Cambridge, Großbritannien, www.sanger.ac.uk) kann auf die entsprechenden Daten zugegriffen werden. Ein Sequenzvergleich mit Ryanodinrezeptor-typischen Bereichen ergab sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene keine Homologien, die auf das Vorhandensein eines verwandten Proteins bei *E. tenella* schließen lassen. Eine Southern-Hybridisierung zur Identifizierung von DNA-Sequenzen, welche für putative Ryanodin-bindende bzw. Ryanodinrezeptor-ähnliche Proteine kodieren, erschien deshalb wenig erfolgversprechend. Es sollte aber eine spezifische Bindung von Ryanodin an *E.tenella*-Sporozoiten nachgewiesen werden. Um diese zu ermöglichen, wurde BODIPY[®] FL-X Ryanodin eingesetzt, ein mit

einem Fluorophor gekoppeltes Derivat von Ryanodin. Dieses zeigt bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm eine grüne Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum zwischen 515 nm und 560 nm. Sporozoiten wurden auf einem Objektträger immobilisiert und mit BODIPY[®] FL-X Ryanodin inkubiert. Nach dem Waschen wurde das gebundene Ryanodinderivat fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienten adhärenente MDBK-Zellen, welche analog zu den Sporozoiten behandelt wurden.

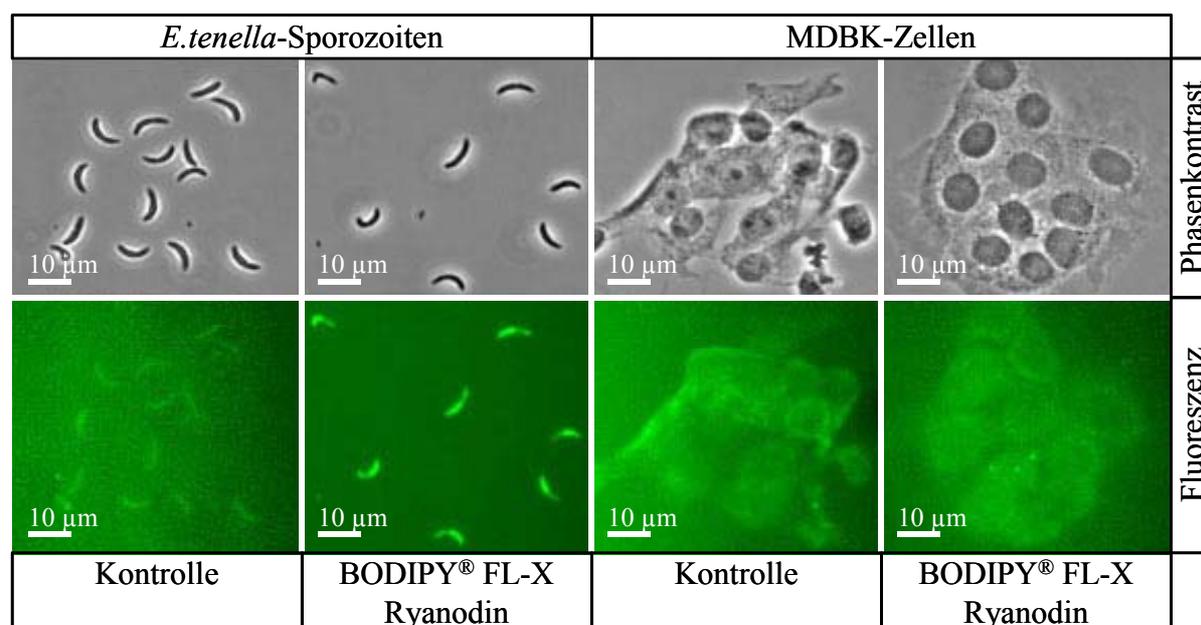


Abb. 38: Bindung eines fluoreszierenden Ryanodinderivats an *E.tenella*-Sporozoiten. Die auf einem Objektträger immobilisierten Parasiten wurden 2 h mit 0,5 μM BODIPY[®] FL-X Ryanodin inkubiert und danach gewaschen. Zum Vergleich wurden adhärenente MDBK-Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle der Eigenfluoreszenz dienten Proben, welche ohne BODIPY[®] FL-X Ryanodin, aber ansonsten analog behandelt wurden. Dargestellt sind die entsprechenden fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen von Sporozoiten und MDBK-Zellen.

Abb. 38 zeigt, daß sowohl bei den unmarkierten Sporozoiten als auch bei den MDBK-Zellen eine deutliche Eigenfluoreszenz zu erkennen war. Mit BODIPY[®] FL-X Ryanodin inkubierte Sporozoiten fluoreszierten jedoch deutlich stärker, vor allem im Bereich der refraktilen Körper. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Ryanodin spezifisch an *E.tenella*-Sporozoiten bindet und diese möglicherweise Ryanodin-bindende Strukturen besitzen.

4.4.4 Hängt der Effekt von Ryanodin mit Ca²⁺-Signalvorgängen zusammen?

Die Wirkung von Ryanodin auf Ca²⁺-abhängige Signalvorgänge ist bei Vertebraten sehr gut untersucht. Bei Apikomplexa konnte dieser Zusammenhang bisher nur bei *T.gondii* gezeigt werden: In mit Ca²⁺-sensitivem Farbstoff beladenen Tachyzoiten wurde bei Zugabe von Ryanodin ein Anstieg der Ca²⁺-Konzentration gemessen [Lovett et al., 2002].

Um nachzuweisen, daß Ca^{2+} -Signalwege auch für die Wirkung von Ryanodin auf die Invasion von *E.tenella*-Sporozoiten eine Rolle spielen, sollte der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Calcium Green-1 AM eingesetzt werden. In lebenden Zellen kann durch eine zelleigene Esterase die Spaltung dieses lipophilen Azetoxymethylester-(AM-)Derivates erfolgen. Die dabei entstehenden Anionen akkumulieren im Inneren der Zelle [Roos, 2000].

Leider war dies bei *E.tenella*-Sporozoiten nicht der Fall. Auch unter verschiedenen Pufferverhältnissen konnte weder eine Internalisierung noch eine Esterspaltung von Calcium Green-1 AM beobachtet werden. Damit war auch die Messung möglicher Ryanodin-induzierter Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nicht möglich.

Um zu prüfen, ob die Ryanodin-Wirkung auf den Sporozoiten-Invasionshemmtest von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig ist, wurden mit CFDA-SE-markierte *E.tenella*-Sporozoiten mindestens 2 h mit 0 mM und 1,8 mM Ca^{2+} bzw. 0 μM und 100 μM Ryanodin inkubiert. Anschließend wurde die Ca^{2+} -Konzentration aller Proben auf 1,8 mM eingestellt, die Sporozoiten 2 h mit Monolayern von MDBK-Zellen inkubiert und die Infektionsraten mit Hilfe eines Durchflußzytometers bestimmt. Die mit relativ hohen Abweichungen behafteten Werte zeigten eine durch 100 μM Ryanodin verursachte Invasionshemmung zwischen 50 % und 60 %. Die durch Ca^{2+} -Mangel bei der Vorinkubation verursachte Hemmung der Invasion lag bei rund 20 %. Mit Ryanodin und ohne Ca^{2+} inkubierte Sporozoiten zeigten eine Hemmung von etwa 75 %. Dies ist ein Hinweis auf einen additiven Effekt der durch Ca^{2+} -Mangel und Ryanodin-Wirkung verursachten Invasionshemmung. Demnach wird die Reaktion der Sporozoiten auf Ryanodin durch einen Mangel an extrazellulärem Ca^{2+} wahrscheinlich nicht beeinflusst.

5 Diskussion und Ausblick

Parasitierende Protozoen vom Stamm der Apikomplexa sind für eine Vielzahl von human- und veterinärmedizinisch bedeutenden Krankheiten verantwortlich. Zu ihnen gehören auch die verschiedenen *Eimeria*-Arten - sehr wirtsspezifische Tierpathogene, die als Erreger der Kokzidiose bei Rindern, Schweinen und Geflügel große wirtschaftliche Verluste verursachen [Williams, 1999].

Sieben verschiedene *Eimeria*-Arten sind als Parasiten beim Haushuhn bekannt [Shirley, 1986]. Sie vermehren sich in verschiedenen Darmabschnitten und können dort großflächige Läsionen des Darmepithels verursachen, welche die Pathogenität dieser Kokzidioseerreger ausmachen. Das Eindringen von *Eimeria*-Sporozoitin und –Merozoiten in ihre Wirtszellen (Invasion) und damit deren Schädigung und anschließende Zerstörung ist ein entscheidender Prozeß bei der Entwicklung der Parasiten im Tier.

Für die Kokzidiosetherapie und –prophylaxe in der Hühnerproduktion wurden bisher v.a. Chemotherapeutika eingesetzt. Deren längerfristige Anwendung stößt jedoch durch die Entwicklung von resistenten *Eimeria*-Stämmen häufig an ihre Grenzen [Chapman und Hacker, 1994; Stephen et al., 1997; Chapman, 1998]. Dies und andere Nachteile, wie die medikamentöse Belastung des Huhnes [Dowling, 1992] und der relativ hohe Kostenaufwand, führen zu einem wachsenden Interesse an neuen Strategien zur Bekämpfung von Hühnerkokzidiose, welche die alten Therapiemethoden ergänzen oder besser noch ersetzen können. Der Schlüssel zur Entwicklung wirksamer Antikokzidia liegt im besseren Verständnis der Biologie und Biochemie der Kokzidioseerreger.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Ansätze zur Entwicklung neuer Strategien gegen *Eimeria*-Infektionen zu untersuchen. Diese sollten eine Hemmung der Invasion von Sporozoitin erreichen, dem Vorgang, welcher die erste Konfrontation des Wirtstieres mit dem Parasiten darstellt. Um diesem Ziel näher zu kommen, wurden zwei Vorgehensweisen gewählt: Zum einen sollten Antikörperfragmente isoliert werden, welche ein invasionsrelevantes Oberflächenprotein von *E.tenella*-Sporozoitin binden, es dadurch neutralisieren und auf diese Weise die Infektionsrate verringern können. Zum anderen sollte die Bedeutung von Ca^{2+} für den Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoitin *in vitro* untersucht werden. Grundlage dafür war die Vermutung, daß Ca^{2+} als Botenstoff bei Signaltransduktionsvorgängen eine Rolle spielt, welche an der Invasion beteiligte Prozesse, wie die Proteinsekretion oder die Motilität des Parasiten, regulieren.

5.1 Versuch der Isolierung von *Eimeria*-spezifischen scFv durch die „Phage Display“-Technologie – Probleme und Diskussion alternativer Strategien

Spezifisch bindende rekombinante Antikörper sind sehr gut geeignet, um bestimmte Antigene zu charakterisieren. Außerdem können sie durch die Bindung relevanter Epitope auch inhibitorische bzw. neutralisierende Effekte haben. Dazu werden verschiedene Formate rekombinanter Antikörper und Antikörperfragmente, wie z.B. scFv, eingesetzt (vgl. 1.2.2).

ScFv besitzen häufig Antigenbindungseigenschaften, die mit denen entsprechender kompletter Antikörpermoleküle vergleichbar sind. Durch ihre geringe Größe und monomere Struktur können sie leicht in *E.coli* exprimiert werden [Plückthun, 1990; 1991].

Eine sehr effektive Vorgehensweise, scFv gegen bestimmte Antigene zu isolieren, ist die Verwendung von „Phage Display“-Banken, welche eine große Variabilität dieser Antikörperfragmente enthalten, und die Anreicherung der bindenden scFv am immobilisierten Antigen [Clackson et al., 1991]. Diese Methode wurde bereits vereinzelt auch auf dem Gebiet der Apikomplexaforschung angewendet. Dabei konnten z.B. wachstumshemmende scFv gegen *Plasmodium* erhalten werden [Vukovic et al., 2002]. Ein Ziel war es deshalb, mit Hilfe der „Phage Display“-Technologie scFv zu isolieren, die spezifisch an *Eimeria*-Proteine binden, die an der Invasion beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde Etmic2, ein Mikronemenprotein von *E.tenella*, einer der am stärksten pathogenen *Eimeria*-Arten, als Zielprotein für die Isolierung rekombinanter scFv ausgewählt [Tomley et al., 1996]. - Die Beweglichkeit der Eimerien und die Sekretion bestimmter Organellen (Mikronemen, Rhoptrien und dichten Granula) sind für die Invasion essentiell. Die Proteine der Mikronemen sind dabei vor allem an der Beweglichkeit des Parasiten und entscheidenden Vorgängen bei der Erkennung von Wirtszellen und der Anheftung an die Wirtszellmembran beteiligt [Dubremetz et al., 1998]. Ihre Charakterisierung könnte deshalb eine gezielte Hemmung der Invasion ermöglichen.

Für die Gewinnung von größeren Mengen an *Eimeria*-Sporozoiten kommt nur die Isolierung von Oozysten aus infizierten Hühnern und deren *in vitro*-Exzystation in Frage [Dulski und Turner, 1988]. Dies ist sehr kostenintensiv sowie relativ verlustreich und macht das Untersuchungsmaterial zu einem limitierenden Faktor. Eine Reinigung von Etmic2 aus *E.tenella*-Material, die überdies noch nicht etabliert ist, kam also nicht in Frage. Aus diesem Grund wurde für die Anreicherung Etmic2-bindender scFv rekombinantes Antigen verwendet: Ausgehend von Merozoiten-cDNA konnte Etmic2 amplifiziert und in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert werden. Die Reinigung von in *E.coli* exprimiertem

rekombinantem Etmic2-His erfolgte über die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und ergab eine ausreichende Menge an Antigen, welches kaum Verunreinigungen enthielt (vgl. 4.1.2). Dieses wurde anschließend für die Isolierung von spezifisch bindenden scFv aus einer „Phage Display“-Bank eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Immun-Bank [Clackson et al., 1991], welche die kombinierten Gene für die V_L- und V_H-Regionen des Antikörper-Repertoires von Mäusen enthält, die u.a. mit Material von verschiedenen *E.tenella*-Stadien immunisiert worden waren. Nach drei Selektionsrunden wurden 21 unikale scFv erhalten, die im Phagen-ELISA eine Etmic2-spezifische Bindung zeigten. Ihre Aminosäuresequenzen wiesen Homologien zwischen 55 % und 99 % auf. Dabei waren die V_L-Regionen aller scFv vom κ-Typ. Dies ist nicht überraschend, sind doch 95 % der Immunglobulinketten bei Mäusen vom κ- und nur 5 % vom λ-Typ [Woloschak und Krco, 1987].

Für 16 der scFv konnte eine spezifische Bindung an rekombinantes Etmic2 nachgewiesen werden (vgl. 4.2.2). Durch Western Blot-Untersuchungen mit fragmentiertem Etmic2-His wurde gezeigt, daß sich die Epitope von mindestens drei der anti-Etmic2-scFv von denen der übrigen unterscheiden.

Mit verschiedenen Methoden wurde untersucht, ob die anti-Etmic2-scFv auch an natives Etmic2 binden. - Als „nativ“ werden in der vorliegenden Arbeit Proteine verstanden, die nicht rekombinant exprimiert, sondern aus ihrer natürlichen Quelle isoliert wurden, ohne damit den Faltungszustand der Moleküle zu charakterisieren.

Weder mit Hilfe eines ELISAs noch eines Immunoblots konnte gezeigt werden, daß die scFv an natives Etmic2 aus Extrakten von *E.tenella*-Sporozoiten bzw. -Oozysten binden. Auch durch einen Zellanheftungs- bzw. einen indirekten Immunfluoreszenztest, bei denen intakte Sporozoiten eingesetzt wurden, war keine Bindung dieser Antikörperfragmente an die Oberfläche der Parasiten nachweisbar. Die scFv waren deshalb für eine Charakterisierung von nativem Etmic2 oder gar für eine Hemmung der Sporozoiteninvasion nicht geeignet.

Deshalb stellt sich die Frage: Ist rekombinantes Etmic2 geeignet, um scFv aus „Phage Display“-Banken anzureichern, die auch an das entsprechende native Antigen binden?

Für die Selektion von anti-Etmic2-scFv wurde in der vorliegenden Arbeit bakteriell exprimiertes rekombinantes Etmic2-His verwendet, dessen Reinigung unter Nutzung des His-Tags über eine Bindung an Ni-NTA-Agarose (IMAC) erfolgte.

Für *Eimeria*-Antigene spezifische scFv wurden bisher nicht durch den Einsatz von „Phage Display“-Banken und die Anreicherung an heterolog exprimiertem Protein isoliert, sondern

nur auf der Grundlage von Hybridomzelllinien hergestellt, welche entsprechende monoklonale Antikörper produzierten [Kim et al., 2001; Kim et al., 2002; Refega et al., 2004]. Die „Phage Display“-Technologie wurde auf dem Gebiet der *Eimeria*-Forschung bisher nur für die Isolierung bindender Moleküle aus einer Peptidbank eingesetzt [da Silva et al., 2002].

Daß durch die Anreicherung rekombinanter Antikörper aus „Phage Display“-Banken mit rekombinantem Antigen auch an natives Antigen bindende und sogar inhibitorische Antikörper erhalten werden können, zeigen beispielsweise die Arbeiten von Chowdhury et al. [1998] und Laukkanen et al. [2003], wo die Hemmung eines Allergens bzw. des Wachstums bestimmter Tumoren erzielt werden konnte.

Die Verwendung von heterolog exprimiertem rekombinantem Protein an Stelle von nativem, aus Parasitenmaterial isoliertem Antigen ist jedoch für die Selektion von Antikörpern *in vitro* und *in vivo* nicht in jedem Fall unproblematisch: Wie verschiedene Immunisierungsversuche mit rekombinantem Antigen zeigen, werden die dominanten Epitope des nativen Antigens bei der rekombinanten Form nicht immer auch adäquat ausgeprägt [Riley et al., 1995]. Manche der dabei erhaltenen Antikörper binden an Epitope, welche auf dem nativen Antigen nicht vorkommen bzw. nicht zugänglich sind [Wicher et al., 1994]. Mit Hilfe von heterolog exprimierten Proteinen kann auch nicht immer ein im Vergleich zur nativen Form homologer Immunschutz in Tieren induziert werden [Luo et al., 1999].

Folgende Gründe sind dafür denkbar: Antikörper erkennen häufig Konformationsepitope. Die Faltung von Proteinen in ihre dreidimensionale Struktur spielt deshalb eine entscheidende Rolle für ihre Funktion als Antigen. An der Proteinfaltung sind eine ganze Reihe unterschiedlicher Hilfsfaktoren und Chaperone beteiligt, die sich bei den verschiedenen Organismen in Vorkommen und Funktion unterscheiden können [Beispiele für Chaperone bei Apicomplexa: Kumar et al., 1991; Dunn et al., 1996a; Sijwali et al., 2002]. Disulfidbrücken sind bei einigen Proteinen ebenfalls an der Ausbildung der Konformation beteiligt. Für ihre korrekte Ausbildung spielen Faltungshelferenzyme, wie die Protein-Disulfid-Isomerase, und das Zellmilieu eine Rolle [Alberts et al., 2002]. Deshalb ergibt z.B. die Expression rekombinanter Proteine mit geschlossenen Disulfidbrücken im Zytoplasma von Prokaryoten häufig Einschlußkörper aus aggregiertem, denaturiertem Protein, das über einen aufwendigen Prozeß renaturiert werden muß [Sambrook und Russell, 2001].

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist der Export der rekombinanten Proteine in den periplasmatischen Raum Gram-negativer Bakterien, in dem keine reduzierenden Bedingungen herrschen und die Proteine nicht durch intrazelluläre Proteasen abgebaut werden

können [Talmadge et al., 1980]. Dieser Sekretionsvorgang kann durch ein N-terminales Signalpeptid, wie z.B. *pelB*, vermittelt werden [Keen und Tamaki, 1986]. *Etmic2* besitzt drei Cysteinreste, die an der Ausbildung interner Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Das Konstrukt *pET22b-Etmic2-c-myc* erlaubt es, das Antigen mit einem N-terminalen *pelB*-Signalpeptid zu exprimieren. Eine Sekretion in das Periplasma konnte jedoch nicht beobachtet werden, deshalb mußte die Reinigung von *Etmic2-c-myc* nicht aus periplasmatischem, sondern aus Gesamtzellextrakt erfolgen (vgl. 3.2.3, 4.1.2). Der fehlende Export des rekombinanten Antigens in den periplasmatischen Raum kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen besteht die Möglichkeit, daß nicht das ATG am 5'-Ende der *pelB*-Sequenz als Translationsstart benutzt wird, sondern eines der 3' davon liegenden möglichen Startkodons. Davon befinden sich zwei am Ende der *pelB*-Sequenz und eines am Anfang der für *Etmic2* kodierenden Sequenz. Wäre dies der Fall, würde ein um zwei bis drei kDa verkürztes Polypeptid entstehen. Eine anderer Grund könnte in der Struktur des *Etmic2*-Polypeptids liegen. Wie bereits 1996 von Tomley et al. beschrieben, zeigt das Antigen bei der elektrophoretischen Auftrennung ein abweichendes Laufverhalten und erscheint auch unter denaturierenden Bedingungen in einem deutlich höheren Molekulargewichtsbereich. Möglicherweise sind dafür Bereiche der Tertiärstruktur verantwortlich, welche sich spontan ausbilden und eine hohe Konformationsstabilität aufweisen. Dies könnte den Transport über die innere Zellmembran der Wirtsbakterien behindern.

Ein anderer, potentiell problematischer Aspekt bei der bakteriellen Expression eukaryotischer Proteinen können fehlende bzw. veränderte posttranslationale Modifizierungen, wie z.B. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, sein. Die Glykosylierung von Proteinen findet nach der Translation im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat statt. Dabei werden Kohlenhydrate O- bzw. N-glykosidisch mit den Aminosäureresten von Serin, Threonin, Hydroxylysin oder Asparagin verknüpft. Während in Prokaryoten exprimierte Proteine nicht glykosyliert werden, finden sich in eukaryotischen Zellen, wie auch den Apikomplexa, vielfältige Glykosylierungsmuster [Dieckmann-Schuppert et al., 1994]. Belege dafür sind z.B. eine bei *T.gondii* beschriebene Glykosyltransferase [Stwora-Wojczyk et al., 2004] und die Charakterisierung glykosylierter Proteine in der Oozysten-hülle von *E.tenella* [Eschenbacher et al., 1996]. Aber auch die Proteine der Mikronemen können Glykosidreste tragen, wie Untersuchungen von Heise et al. zeigen [1999].

Konkrete Anzeichen für posttranslationale Modifizierungen bei *Etmic2* sind nicht bekannt. Dieses Antigen besitzt hinsichtlich Sequenz und Lokalisierung deutliche Ähnlichkeit mit

Proteinen, welche durch Phosphorylierung reguliert werden [Tomley et al., 1996]. Des weiteren enthält es viele glykolysierbare Aminosäurereste, wobei jedoch noch nicht klar ist, ob das Protein in *E.tenella* tatsächlich phosphoryliert oder glykosyliert wird. Das Laufverhalten im reduzierenden SDS-Acrylamidgel entspricht zwar nicht dem anhand der Primärsequenz berechneten Molekulargewicht, eine posttranslationale Modifikation kann dafür jedoch nicht die Ursache sein, weil auch bakteriell exprimiertes Etmic2 bei etwa 48 kDa nachgewiesen wurde. Man kann jedoch auch nicht ausschließen, daß eine Glykosylierung oder Phosphorylierung stattgefunden hat, weil sich relativ geringe Molekulargewichtsunterschiede zu bakteriell exprimiertem Etmic2 bei einem Vergleich der Bandenhöhe nach der Gelelektrophorese nicht bemerkbar machen.

Posttranslationale Modifikationen können Bestandteil von Epitopen nativer Antigene sein oder bei bakteriell exprimierten Antigenen identifizierte Epitope maskieren, wie sich auch aus den Arbeiten von Shaw et al. [1996] sowie Cao und Karsten [2001] schließen läßt. Geht man davon aus, daß die Epitope der scFv auf dem rekombinanten Etmic2 durch solche Modifizierungen auf dem nativen Antigen maskiert werden, könnte dies ein Grund dafür sein, warum die anti-Etmic2-scFv nicht an natives Etmic2 binden. Daß Glykosylierungen und andere posttranslationale Modifizierungen das Epitop eines aus den Mikronemen stammenden Antigens verdecken können, zeigen Untersuchungen von Heise et al. [1999].

Bei der vorliegenden Arbeit konnten keine scFv isoliert werden, die sowohl an rekombinantes als auch an natives Etmic2 binden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Verwendung von rekombinantem Antigen für die Selektion von „Phage Display“-Banken nicht immer zu Antikörpern führt, deren Spezifität sich auch auf die native Form des Antigens bezieht. Diese Ergebnisse legen nahe, daß auf andere Vorgehensweisen zurückgegriffen werden sollte. Eine solche Alternative könnte die Verwendung anderer, am besten eukaryotischer Expressionssysteme für die Herstellung des Antigens sein. Mit Hilfe von Säugerzellen, transgenen Pflanzen, Hefen oder Insektenzellkulturen werden mehr oder weniger glykosylierte und in der Regel richtig gefaltete rekombinante Proteine exprimiert. Daß dies für die Antigenbindung tatsächlich von Vorteil sein kann, zeigen beispielsweise Untersuchungen mit einem Antigen aus *T.gondii*, bei welchen in Insektenzellen exprimiertes Protein besser zur Identifizierung von Antikörpern im Serum Toxoplasmose-infizierter Katzen geeignet war als die bakteriell exprimierte Form des Antigens [Huang et al., 2002].

Für die Anreicherung von Antikörpern mit der „Phage Display“-Technologie können jedoch nicht nur einzelne Proteine verwendet werden: Die Verwendung ganzer Zellen im Selektionsprozeß stellt eine weitere Alternative dar [Cai und Garen, 1995; Figini et al., 1998; Hoogenboom et al., 1999]. Diese wurde bereits erfolgreich für die Isolierung eines antimikrobiell wirksamen Peptids angewendet, das durch seine Bindung an lebenden *E.acervulina*-Sporozoitien isoliert werden konnte [da Silva et al., 2002].

Es kann zwei Ursachen dafür geben, daß sich trotz der Vielzahl der verwendeten Methoden keine Bindung der scFv an natives Etmic2 nachweisen ließ: Ein möglicher Grund ist die bereits diskutierte Vermutung, daß die scFv an Epitope des rekombinanten Etmic2 binden, die auf dem nativen Etmic2 nicht vorkommen. Aber auch die schwache Affinität und niedrige Avidität der scFv zusammen mit möglicherweise sehr geringen Etmic2-Mengen in den *Eimeria*-Extrakten und auf den Sporozoitien könnten eine denkbare Ursache dafür sein, daß kein erfolgreicher Bindungsnachweis möglich war. Ein kompetitiver ELISA gab Hinweise darauf, welcher dieser Gründe am wahrscheinlichsten ist. Dabei wurde untersucht, ob Serum gegen natives Etmic2 die Bindung von anti-Etmic2-scFv an rekombinantes Etmic2 beeinträchtigt. Falls die scFv an ähnliche Epitope binden wie ein Teil der Serumantikörper, sollten sie durch diese aufgrund ihrer geringen Affinität verdrängt werden. Falls sich jedoch die durch das Serum erkannten Hauptepitope von den durch die scFv erkannten Epitopen unterscheiden, ist kein kompetitiver Effekt zu beobachten. - Dies war auch der Fall.

Für diesen Unterschied hinsichtlich der Epitopspezifitäten von anti-Etmic2-scFv und Serumantikörpern kann, wie bereits erwähnt, eine Verschiedenheit der auf dem rekombinanten bzw. auf dem nativen Etmic2 vorkommenden Epitope die Ursache sein. Ebenfalls zu bedenken ist jedoch, daß die Serumantikörper aus einem Kaninchen stammen, während die V_L- und V_H-Regionen der scFv murinen Ursprungs sind. Man kann nicht sicher davon ausgehen, daß bei der Immunantwort dieser beiden Nagetierspezies auf ein Protein wie Etmic2 auch Antikörper gegen die selben Epitope dieses Antigens produziert werden. Folgendes legt nahe, daß sich die Epitopspezifitäten der ursprünglich in den immunisierten Mäusen exprimierten Antikörper und der von ihnen abgeleiteten scFv durchaus unterscheiden können: Das künstliche Antikörperformat „scFv“ und vollständige Ig-Molekülen sind hinsichtlich ihrer Avidität und anderer Eigenschaften deutlich verschiedenen voneinander. Des weiteren können durch die freie Kombination von V_L - und V_H-Regionen bei der Konstruktion der „Phage Display“-Bank Bindungsstellen mit neuen Spezifitäten entstehen.

Nicht nur die Wahl des Antigens, sondern auch die Verwendung einer geeigneten Methode zu seiner Immobilisierung kann das Ergebnis eines Selektionsvorgangs beeinflussen.

Viele Biomoleküle können durch eine passive Adsorption an Polystyrenmatrices mit geeigneten Oberflächenmodifikationen, wie z.B. MaxiSorp™ gebunden werden [Nissim et al., 1994]. Diese Methode wird sehr häufig bei ELISA oder Selektionsprozessen zur Immobilisierung von Proteinen eingesetzt, ist auf verschiedenste Antigene anwendbar und benötigt in der Regel keinerlei Vorbehandlung der Proben. Die passive Adsorption beruht auf einer Vielzahl relativ schwacher Wechselwirkungen zwischen Molekül und Matrix, welche die Konformation des immobilisierten Antigens verändern können (Denaturierung). Dies kann zu einer geringeren Bindungseffizienz von Antikörpern führen, die für native Strukturen spezifisch sind.

Alternativen zur passiven Adsorption können z.B. die Verwendung schwach biotinylierter Antigene oder eine indirekte Immobilisierung sein [Grob et al., 1998; Hoogenboom et al., 1998] (siehe Abb.39). Dadurch wird eine geringe Anzahl stärkerer Interaktionen zwischen Antigen und Matrix geschaffen und so die Wahrscheinlichkeit einer Denaturierung des Antigens verringert. All dies ist jedoch nur relevant für die Verwendung von gelöstem Protein und stellt bei der Immobilisierung von ganzen Zellen oder Gewebeabschnitten kein Problem dar.

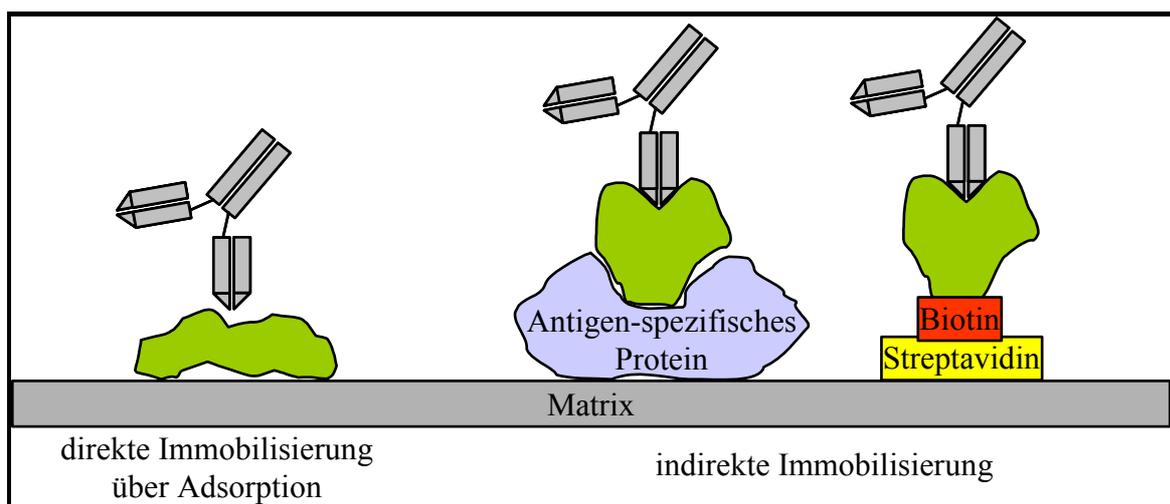


Abb. 39: Schematische Darstellung verschiedener Methoden zur Immobilisierung von Antigenen. Durch die direkte Immobilisierung des Antigens über eine Adsorption an die Matrix kann es zur Denaturierung und zur Veränderung von Epitopen kommen. Dies kann möglicherweise durch eine indirekte Immobilisierung über kovalent gekoppeltes Biotin oder nicht kovalente Wechselwirkungen mit einem Antigen-spezifischen Protein verbessert werden.

Die Wahl einer geeigneten „Phage Display“-Bank ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Isolierung von Antikörpern mit entsprechender Spezifität und hoher Affinität.

Die Ursachen dafür, daß keine an natives Etmic2 bindenden scFv isoliert werden konnten, können nicht nur auf der Seite des Antigens, sondern auch bei der verwendeten „Phage Display“-Bank liegen. Die in ihr enthaltenen scFv-Varianten bestehen aus den V_L- und V_H-Regionen von mit *Eimeria*-Material immunisierten Mäusen. Die Antikörpertiter dieser Tiere waren durch einen indirekten Immunfluoreszenztest an *E.tenella*-Sporozoitentestet worden (vgl. 4.1). Die Seren der Mäuse enthielten demnach Antikörper mit Spezifitäten für die Antigene auf der Sporozitenoberfläche. Solch ein Test ermöglicht es jedoch nicht, speziell gegen Etmic2 gerichtete Antikörper im Serum nachzuweisen.

Bei der Immunantwort sind die meisten der gebildeten Antikörper in der Regel gegen ganz bestimmte immunodominante Epitope gerichtet. Dies kommt beispielsweise bei Infektionen mit verschiedenen Stämmen von Influenza-Viren zum Tragen, bei welchen häufig eine Veränderung gerade solcher Epitope („antigenic drift“) stattgefunden hat. Dadurch ist die erworbene Grippe-Immunität gegen einen Influenza-Stamm bei der Neuinfektion mit einem anderen oft wirkungslos [Provenzano et al., 2003; Berkhoff et al., 2004].

Auch bei Immunisierungen mit *Eimeria*-Material konnten bereits immunodominante Antigene und Antigenfraktionen identifiziert werden [Jenkins et al., 1988; Tomley et al., 1991; Guzman et al., 2003; Belli et al., 2004]. Bei der Immunisierung von Kaninchen mit Mikronemenpräparationen wurde ein Serum erhalten, das an Etmic1, Etmic2 und Etmic3 bindet [Bumstead und Tomley, 2000].

Bei der vorliegenden Arbeit wurde u.a. ein Serum aus mit rekombinantem Etmic2 immunisierten Mäusen verwendet (anti-rEtmic2-Serum). Dieses bindet nicht nur an rekombinantes, sondern auch an natives Etmic2 wie Western Blot-Untersuchungen zeigen, bei denen unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennte Oozysten- und Sporozitensextrakte verwendet wurden. Das anti-rEtmic2-Serum bindet dabei an ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 48 kDa. Diese Bande wurde auch bei der Verwendung eines Kaninchenserums gegen natives Etmic2 (anti-nEtmic2-Serum) erhalten. Es handelt sich dabei mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Etmic2.

Das anti-rEtmic2-Serum wurde auch für einen Immunfluoreszenztest (IFAT) mit *E.tenella*-Sporozoitent eingesetzt. Dabei war eine über die ganze Zelle verteilte Fluoreszenzmarkierung zu erkennen (vgl. 4.3.3). Untersuchungen von Bumstead und Tomley [2000] zeigen, daß

sowohl fötales Kälberserum (FCS) als auch gereinigtes Albumin die Sekretion von Etmic2 bei *E.tenella*-Sporoziten auslösen, welches danach mit einem aktinabhängigen Transportmechanismus über die Oberfläche des Parasiten verteilt wird. Im Einfriermedium der Sporoziten war FCS enthalten. Es ist also davon auszugehen, daß sich sekretiertes Etmic2 auf der Oberfläche der Zellen befindet. Die Fluoreszenzmarkierung im IFAT kann also durchaus auf eine Bindung des anti-rEtmic2-Serums an Etmic2 zurückzuführen sein. Das Serum von mit rekombinantem Etmic2 immunisierten Mäusen enthält also sehr wahrscheinlich Antikörper gegen natives Etmic2.

Es stellt sich nun die Frage, warum aus der „Phage Display“-Bank keine scFv gegen natives Etmic2 isoliert werden konnten, wenn die enthaltenen V_L- und V_H-Regionen doch das Repertoire von Mäusen repräsentieren, die mit *Eimeria*-Material und dem darin enthaltenen nativem Etmic2 immunisiert wurden. - Geht man davon aus, daß die mit dem *Eimeria*-Material immunisierten Mäuse Antikörper gegen natives Etmic2 gebildet hatten, so kann vermutet werden, daß die meisten der erkannten Epitope nicht auf dem immobilisierten rekombinanten Antigen vorhanden waren. Warum wurden dann aber überhaupt spezifisch bindende scFv isoliert? – Bei der Herstellung der „Phage Display“-Bank werden die Gene der V_L- und V_H-Regionen der Antikörper zufällig miteinander kombiniert. Auf diese Weise können rekombinante Antikörperfragmente mit neuen Spezifitäten entstehen, welche im Antikörperrepertoire der immunisierten Mäuse nicht vorhanden waren. Außerdem ist es denkbar, daß in der Maus die Antikörper mit den V_L- und/oder V_H-Regionen der anti-Etmic2-scFv gegen völlig andere Antigene gerichtet waren und es sich hier um sogenannte Kreuzreaktionen handelt.

Um die Affinitäten der aus der „Phage Display“-Bank erhaltenen Antikörperfragmente abzuschätzen, waren exemplarisch fünf der scFv mit einem kompetitiven ELISA auf ihre Bindung an gelöstes Etmic2 untersucht worden. Dabei zeigte AH17 eine Affinität von etwa 0,3 µM und AH6 von 3 µM. Bei den anderen drei scFv wurde kein ausreichend großer Wettbewerbseffekt erreicht, um die Affinität genauer abschätzen zu können, welche damit also noch über 3 µM liegt. Diese Affinitäten sind, verglichen mit denen anderer aus Immunbanken isolierter Antikörperfragmente, relativ niedrig [Clackson et al., 1991].

Die Bindungseigenschaften der Antikörper von immunisierten Säugetieren werden während einer Affinitätsreifung durch den Prozeß der somatischen Hypermutation (vor allem im Bereich der CDRs) verbessert. Deshalb ist zu erwarten, daß von ihnen abgeleitete Banken Antikörperfragmente enthalten, welche relativ stark an das zur Immunisierung eingesetzte Antigen binden und während der Selektion angereichert werden.

Es wurden bereits etliche Beispiele für hochaffine scFv beschrieben [Boder et al., 2000; Hanes et al., 2000]. Dieses Antikörperformat kann in einigen Fällen jedoch auch eine geringere Stabilität und eine scheinbar reduzierte Affinität im Vergleich zu den entsprechenden Fab-Fragmenten aufweisen [Reiter et al., 1994]. Ein Grund hierfür könnte eine sterische Behinderung der Antigenbindung durch das Linkerpeptid sein, welches sich in unmittelbarer Nähe zu den CDRs befindet. Denkbar ist aber auch, daß die Affinität durch Instabilitätseffekte scheinbar verringert werden kann. Das Linkerpeptid ist eine flexible Verbindung der V_L- und V_H-Regionen. Wenn auch die Stabilität einiger scFv mit der vollständiger IgG-Moleküle vergleichbar ist, so sind doch viele scFv deutlich instabiler. Dies macht sich nicht nur bei der Antigenbindung bemerkbar: Bei der vorliegenden Arbeit konnte häufig beobachtet werden, daß die scFv leicht aggregieren und aus der Lösung ausfallen. Des Weiteren nahm bei einigen die Aktivität während der Lagerung deutlich ab. Diese Effekte konnten durch die Zugabe von Glycerin teilweise verringert werden.

Eine verbesserte Stabilität kann man durch die Verknüpfung der V_L- und V_H-Regionen über Disulfidbrücken erhalten. Die resultierenden Fv (dsFv) enthalten Cysteinreste in den Gerüstsequenzen abseits des Paratops, über welche die V_L- und V_H-Regionen kovalent und wesentlich enger als durch ein flexibles Linkerpeptid miteinander verbunden werden. Die meisten dsFv verlieren auch über Wochen bei 37°C nicht an Aktivität, während sich bei den entsprechenden scFv schon nach wenigen Tagen oder teilweise sogar schon nach wenigen Stunden ein deutlicher Aktivitätsverlust feststellen läßt [Kontermann und Dübel, 2001]. Trotz der vergleichsweise geringen Expressionsraten können dsFv wie scFv für die „Phage Display“-Technologie eingesetzt werden [Brinkmann et al., 1995].

Einiges weist darauf hin, daß die Isolierung *Eimeria*-hemmender scFv ausgehend vom V-Gen-Repertoire immunisierter Mäuse problematisch ist: Trotz intensiver Aktivitäten auf dem Gebiet der Kokzidioseforschung wurden bisher erstaunlich wenige hemmende Antikörper gegen *Eimeria* identifiziert. Es sind zwar etliche an *Eimeria*-Antigene bindende Antikörper und Antikörperfragmente, darunter auch scFv, bekannt, eine hemmende Wirkung wurde jedoch bislang nur von monoklonalen Antikörpern (mAK) beschrieben [Larsen et al., 1991; Rick et al., 1998; Tennyson, 2000; Kim et al., 2001; 2002; Mouafo et al., 2002; Refega et al., 2004]. Bereits 1983 wurden inhibitorische mAK charakterisiert [Danforth]. Wie die meisten anderen mAK stammen auch diese aus von Mäusen abgeleiteten Hybridomlinien [Whitmire et al., 1988; Augustine, 1991; Uchida et al., 1997; Augustine, 2001; Binger et al., 2003]. Aufgrund der Vermutung, daß mit Mäusen keine optimale Immunantwort auf die Antigene

der hühnerpathogenen Eimerien zu erhalten ist, wurden B-Zell-Hybridome von Hühnern entwickelt, welche entsprechende mAK herstellen [Lillehoj et al., 1994]. Ausgehend davon wurden auch hemmende aviane mAK identifiziert [Sasai et al., 1996; Sasai et al., 1998; Lillehoj, 2002]. Hühner-Hybridomzelllinien sind jedoch nicht ganz unproblematisch: Kritisch sind u.a. die relativ geringen Antikörpermengen im Überstand, die Produktion von nicht-spezifischem IgM und ein eventueller Verlust der Fähigkeit zur Antikörper-Herstellung [Nishinaka et al., 1991; 1996].

Für eine erfolgreiche Identifizierung von Antikörpern, welche zur Charakterisierung invasionsrelevanter Antigene und zur Hemmung der Invasion eingesetzt werden können, wären ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit außerdem noch folgende Aspekte bedenkenswert: Von immunisierten Spendern abgeleitete „Phage Display“-Banken sind häufig nicht optimal, um aus ihnen eine größere Vielfalt spezifisch bindender Antikörper zu isolieren. Eventuell sind naive Banken, welche dem Antikörperrepertoire nicht-immunisierter Spender entsprechen, oder semisynthetische bzw. synthetische Banken mit genetisch randomisierten (CDR-)Sequenzen besser geeignet, um Antikörper gegen möglicherweise nicht immunodominante, aber invasionsrelevante Antigene zu erhalten.

Für die Wahl des zur Anreicherung eingesetzten Antigens empfehlen sich Antigene, die bei Hühnern eine protektive Immunantwort auslösen können oder eine Selektion an der Oberfläche vollständiger *Eimeria*-Sporozoit. Möglicherweise weniger gut geeignet sind *Eimeria*-Antigene, welche mit mAK von Mäuse-Hybridomlinien identifiziert wurden. Grund hierfür ist, daß von den Antikörpern der Immunseren von Mäusen und Hühnern nicht immer die selben Antigene gebunden werden [Jenkins und Dame, 1987].

Vergleiche mit Antikörpern gegen andere Apikomplexa können Hinweise für erfolgreiche Strategien geben: Bei *Plasmodium* wurde erfolgreich ein bispezifischer Antikörper getestet, welcher aus zwei durch ein Linkerpeptid verbundenen scFv besteht und spezifisch für ein Oberflächenantigen des Parasiten sowie für das CD3-Antigen von T-Zellen ist. Dadurch werden Immunzellen und Pathogen miteinander verknüpft, was verstärkte Abwehrreaktionen des Wirtes induzieren kann [Yoshida et al., 2003]. Eine analoge Anwendung bei Kokzidioseerregern wäre denkbar. Eine andere Strategie, deren Anwendung für die Kokzidiosetherapie ebenfalls vorstellbar wäre, ist die Verwendung eines Fusionsproteins aus einem scFv und einem Toxin. Bei *Plasmodium* wurde bereits die Effizienz eines solchen Immunotoxins beschrieben, bei dem die parasitenschädigende Wirkung eines toxischen Peptids durch die spezifische Bindung des fusionierten scFv deutlich verstärkt werden konnte [Yoshida et al., 2001].

5.2 Hemmung der Invasion von *E.tenella*-Sporozoiten durch Ca^{2+} -Mangel und Ryanodin

Ca^{2+} -Mangel im Medium hemmt die Invasion von *E.tenella*-Sporozoiten *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit wurden MDBK-Zellen als Wirtszellsystem verwendet, um *in vitro* den Einfluß von Ca^{2+} -Mangel auf die Invasion von *E.tenella*-Sporozoiten zu untersuchen. Dabei konnte eine starke Abhängigkeit dieses Vorgangs von extrazellulärem Ca^{2+} festgestellt werden. Verglichen mit einer Konzentration von 1,8 mM Ca^{2+} , wie sie im Zellkulturmedium vorliegt, war unter den verwendeten Bedingungen bei einer 0 mM Ca^{2+} eine Hemmung der Sporozoiteninvasion von etwa 70 % zu beobachten. Der halbmaximale Effekt - eine 35 %ige Hemmung - tritt bereits bei der noch relativ hohen Ca^{2+} -Konzentration von 600 μM auf.

Beim Eindringen von *Eimeria*-Sporozoiten in Wirtszellen spielen die Sekretion bestimmter Organellen und die Beweglichkeit des Parasiten eine entscheidende Rolle. Sekretions- und Bewegungsvorgänge werden bei Vertebraten in der Regel durch Ca^{2+} -abhängige Signalvorgänge ausgelöst und reguliert. Auch bei Apikomplexa wurden durch Ca^{2+} regulierte Prozesse identifiziert. So werden beispielsweise bei *Toxoplasma gondii*, einer den Eimerien nahe verwandten Art, die Mikronemensekretion, die Anheftung an die Wirtszelle und die Tachyzoiten-Invasion von einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration begleitet [Carruthers und Sibley, 1999; Vieira und Moreno, 2000]. Außerdem waren die invasionsrelevanten Prozesse von *T.gondii*-Tachyzoiten sensitiv gegenüber Wirkstoffen, wie z.B. Ionomycin, Koffein, Thapsigargin und Ryanodin, deren Effekt auf das Ca^{2+} -Signalsystem bei Vielzellern bereits recht gut untersucht ist [Mondragon und Frixione, 1996; Lovett und Sibley, 2003b]. All dies sind Hinweise darauf, daß *T.gondii* und wahrscheinlich auch verwandte Parasiten vom Stamm der Apikomplexa Ca^{2+} -sensitive Effektorsysteme besitzen.

Die Bedeutung von Ca^{2+} für die Invasion von *Eimeria*-Sporozoiten ist weit weniger gut aufgeklärt. Bei *T.gondii* sind bereits etliche Proteine identifiziert worden, die wahrscheinlich zur Funktion von Ca^{2+} -Signalsystemen beitragen, wie z.B. Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlichen Domänen [Pezzella et al., 1997; Bouchot et al., 2001; Kieschnick et al., 2001]. Bei Eimerien wurden bis jetzt nur wenige Proteine beschrieben, welche Regionen mit Homologie zu Ca^{2+} -bindenden Domänen aufweisen [Dunn et al., 1996c; Witcombe et al., 2003; 2004]. Ein direkter Effekt von Ca^{2+} -Ionen oder Ca^{2+} -Signale beeinflussenden Wirkstoffen auf *Eimeria*-Sporozoiten konnte bisher nicht beobachtet werden [Wiersma et al., 2004].

Der invasionshemmende Effekt bei Ca^{2+} -Mangel ist spezifisch für die Sporozoiten.

Mit Hilfe eines Vorinkubationsversuches sollte geklärt werden, ob der invasionshemmende Effekt des Ca^{2+} -Mangels sich auf die Wirtszellen oder auf die *E.tenella*-Sporozoiten zurückführen läßt (vgl. 4.4.1). Dabei konnte beobachtet werden, daß die Infektiosität von ohne Ca^{2+} vorinkubierten Sporozoiten 10-20 % niedriger war als die von Sporozoiten, welche sich auch schon vor dem Invasionsprozeß in Ca^{2+} -haltigen Medium (1,8 mM) befanden. Dies weist darauf hin, daß der Ca^{2+} -Mangel die Sporozoiten beeinflusst.

Bisher wurden im Zusammenhang mit der Invasion von *Eimeria*-Sporozoiten nur wirtsspezifische Ca^{2+} -Effekte beschrieben. Ein Beispiel dafür ist die Untersuchung einer als „L-651,582“ bezeichneten Verbindung, deren Wirkung auf die Invasion von *E.tenella*-Sporozoiten *in vitro* wahrscheinlich auf einer Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms in die Wirtszellen (MDBK-) beruht [Hupe et al., 1991].

Während es bei der vorliegenden Arbeit darum ging zu zeigen, welchen Effekt ein Mangel an extrazellulärem Ca^{2+} auf *E.tenella*-Sporozoiten hat, untersuchte Augustine [1980] unter Verwendung von *E.meleagrimitis*-Sporozoiten und Nierenzellkulturen von Puten den Effekt von Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 1,3 mM und 4,1 mM. Dabei war eine Zunahme des Anteils intrazellulärer Sporozoiten nur dann zu beobachten, wenn die Wirtszellen vorher 20 min mit mindestens 3,1 mM Ca^{2+} inkubiert worden waren. Bei einer Verlängerung dieser Vorinkubationszeit auf zwei Stunden konnte jedoch kein Unterschied mehr festgestellt werden. Die Vorinkubation von Sporozoiten mit Ca^{2+} hatte auch keinen Effekt auf die Infektionsrate der Zellen, deshalb wurde ein wirtszellspezifischer Effekt vermutet.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden andere Wirtszellen und eine andere *Eimeria*-Art verwendet. Überdies erfolgte die Inkubation der *E.tenella*-Sporozoiten mit den MDBK-Zellen über mindestens zwei Stunden und mit Ca^{2+} -Konzentrationen von nicht mehr als 1,8 mM. Ein mit den Untersuchungen von Augustine vergleichbarer Effekt war deshalb nicht unbedingt zu erwarten. Möglicherweise haben zu hohe Ca^{2+} -Konzentrationen Effekte auf die Wirtszellen und zu niedrige hemmen die Infektiosität der Sporozoiten.

Um zu prüfen, ob der Ca^{2+} -Mangel die Lebensfähigkeit der Sporozoiten beeinträchtigt und auf diese Weise zu einer verringerten Invasionsrate führt, wurden nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen in Puffer mit bzw. ohne Ca^{2+} verschiedene Viabilitätstests durchgeführt. Dabei konnte weder bei einer Vitalfärbung mit Trypanblau noch durch einen Zytotoxizitätstest eine Schädigung der *E.tenella*-Sporozoiten beobachtet werden. Auch eine

Fluoreszenzfärbung mit CFDA-SE, einem durch die Esterase von lebenden Zellen gespaltenem Succinimidylester, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Ca^{2+} und ohne Ca^{2+} inkubierten Sporozoiten. Der invasionshemmende Effekt bei Ca^{2+} -Mangel beruht also wahrscheinlich nicht auf einer verringerten Lebensfähigkeit der Sporozoiten.

Thapsigargin, Kalzimyzin und NH_4Cl schädigen den MDBK-Zellrasen und sind deshalb für eine Untersuchung mit dem Sporozoiten-Invasionshemmtest nicht einsetzbar.

Nachdem auf der Grundlage der im vorangegangenen Kapitel diskutierten Ergebnisse von der Beteiligung von Ca^{2+} an invasionsrelevanten Prozessen ausgegangen werden konnte, wurden verschiedene Wirkstoffe getestet, von denen bekannt war, daß sie Ca^{2+} -Signalvorgänge beeinflussen können.

Zu den untersuchten Wirkstoffen gehört Thapsigargin, ein zellpermeabler Inhibitor von Ca^{2+} -ATPasen des sarko- bzw. endoplasmatischen Retikulums (SERCA), welcher zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt [Lytton et al., 1991; Moreno und Zhong, 1996]. Bei *T.gondii*-Tachyzoiten induzieren Thapsigarginkonzentrationen von $0,5 \mu\text{M}$ die Ausstülpung des Konoids [Mondragon und Frixione, 1996].

Des weiteren wurde Kalzimyzin getestet, ein Ca^{2+} -Ionophor, das in Membranen integriert wird und dadurch den nichtregulierten Ca^{2+} -Einstrom immens verstärkt. Ionomyzin, ein anderes Ca^{2+} -Ionophor induziert auf diese Weise die Ausstülpung des Konoids und die Mikronemensekretion bei *T.gondii*-Tachyzoiten [Mondragon und Frixione, 1996; Carruthers und Sibley, 1999].

Ebenfalls wirksam bei *T.gondii* ist NH_4Cl . Bei einer Konzentration von 20 mM wird bei den Tachyzoiten ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Sekretion von Mikronemenproteinen induziert [Moreno und Zhong, 1996; Carruthers und Sibley, 1999]. Grund dafür ist die Freisetzung von Ca^{2+} aus einem sauren Kompartiment, das bei *Toxoplasma* und anderen Apikomplexa, jedoch nicht bei Eimerien beschrieben wurde: dem Azidokalziosom.

Die Testung von Thapsigargin, Kalzimyzin und NH_4Cl im Sporozoiten-Hemmtest hätte sicherlich zu interessanten Ergebnissen geführt. In Vorversuchen zeigten sich jedoch sichtbare Schädigungen des MDBK-Zellrasens durch diese drei Verbindungen bei Konzentrationen, die in der Literatur als wirksam beschrieben wurden. Diese Wirkstoffe in einem Sporozoiten-Invasionshemmtest einzusetzen, der auf der Infektion von adhärennten MDBK-Zellen beruht, war deshalb nicht sinnvoll. Die Untersuchung des Effektes auf die Mikronemensekretion, einem invasionsrelevanten Vorgang, wäre in diesem Fall eher möglich.

Koffein (250 μM) beeinflusst die Invasion von *E.tenella*-Sporozoiten nicht.

Ryanodin und 2-APB setzen die Infektionsrate der Sporozoiten beim Invasionshemmtest mit MDBK-Zellen herab. Der Effekt von Ryanodin ist dabei v.a. auf eine Beeinflussung der Sporozoiten zurückzuführen.

Bei 2-APB, Koffein und Ryanodin konnte im untersuchten Konzentrationsbereich keine Schädigung des MDBK-Zellrasens beobachtet werden. Diese Stoffe konnten deshalb in einem entsprechenden Zellkulturtest eingesetzt werden, um ihre Wirkung auf den Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoiten *in vitro* zu untersuchen. Als invasionshemmende Kontrollproben für diesen Test dienten ein inhibitorischer monoklonaler Antikörper [aus einer von Prof. Dr. Entzeroth, TU Dresden, erhaltenen Hybridomzelllinie: Zgrzebski, 1994] und Salinomycin, ein Polyether-Ionophor, dessen hemmende Wirkung auf die Invasion von *Eimeria*-Sporozoiten bereits seit längerem bekannt ist [Smith et al., 1981].

Während Koffeinkonzentrationen von bis zu 250 μM keinen Effekt auf die Infektionsrate der MDBK-Zellen hatten, zeigten Ryanodin (20 nM, 200 μM) und 2-APB (10 μM , 100 μM) eine hemmende Wirkung. - Bei *Toxoplasma* induziert Koffein die Mikronemensekretion und die Ausstülpung des Konoids, beides Vorgänge, die bei der Invasion eine Rolle spielen [Mondragon und Frixione, 1996; Lovett et al., 2002]. Die Effekte von Koffein auf Zellen können relativ komplex sein. Darunter sind die Hemmung des cAMP-Abbaus und die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Diese sind sehr wahrscheinlich eine wesentliche Ca^{2+} -Quelle für das Signalsystem in *T.gondii* [Vieira und Moreno, 2000; Lovett und Sibley, 2003b]. Wie Untersuchungen von Lovett et al. [2002] zeigen, ist für die Koffein-induzierte Mikronemensekretion bei *T.gondii*-Tachyzoiten kein extrazelluläres Ca^{2+} notwendig. Geht man von der Annahme aus, daß die Invasion von *Eimeria*-Sporozoiten im wesentlichen von extrazellulärem Ca^{2+} abhängt, könnte dies eine Erklärung dafür sein, daß Koffein keine invasionsrelevante Wirkung auf Eimerien besitzt.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Hemmung der Sporozoiteninvasion durch 10 μM bzw. 100 μM 2-APB beobachtet. Wie Untersuchungen mit vorinkubierten und nicht vorinkubierten Sporozoiten zeigten, ist dieser Effekt sehr wahrscheinlich auf die Wirtszellen zurückzuführen. 2-APB wurde in vielen Studien eingesetzt, um die Beteiligung von IP_3 -Rezeptoren bei der Entstehung von Ca^{2+} -Signalen zu prüfen, zeigt dabei jedoch unterschiedliche Wirksamkeit. Des weiteren gibt es Hinweise darauf, daß sich die Wirkung dieser zellpermeablen Verbindung nicht nur auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beschränkt [Bootman et al., 2002].

Die Wirkung von Ryanodin wurde bei Konzentrationen von 20 nM und 200 μ M untersucht. Dabei war eine Hemmung der Invasion von 20 % bzw. 30 % zu beobachten. Wie die Vorinkubationsversuche zeigten, beruht der Effekt von Ryanodin im Gegensatz zu dem von 2-APB auf seiner Wirkung gegenüber *E.tenella*-Sporozoitien. Darauf weist auch die Färbung mit einem Fluorophor-gekoppeltem Derivat, dem BODIPY[®] FL-X Ryanodin, hin: Nach der Inkubation mit diesem Farbstoff, fluoreszierten Sporozoitien wesentlich stärker als die zum Vergleich eingesetzten MDBK-Zellen.

Ryanodin ist ein Alkaloid aus der Pflanze *Ryania speciosa* und wurde als Inhibitor von bestimmten Ca^{2+} -Kanälen, den sogenannten Ryanodinrezeptoren, im endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum von Vertebraten und Nonvertebraten charakterisiert [Überblick bei Sutko et al., 1997; Zucchi und Ronca-Testoni, 1997]. Dort stabilisiert es in mikromolaren Konzentrationen den offenen Zustand des Ryanodinrezeptors und führt so zur Ca^{2+} -Freisetzung [Zucchi und Ronca-Testoni, 1997]. Bei höheren Ryanodinkonzentrationen kehrt sich der Effekt jedoch um und es wird eine dauerhafte Blockierung des Ca^{2+} -Kanals erreicht [Buck et al., 1992].

Bei Apikomplexa wurden bisher keine dieser sogenannten Ryanodinkanäle beschrieben. Außerdem konnten durch Vergleiche bekannter Ryanodinrezeptoren mit den DNA-Sequenzdaten des *E.tenella*-Genoms keine signifikanten Homologien festgestellt werden (Zugang zu den Sequenzdaten über das Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK). Eine Arbeit von Lovett et al. [2002] zeigt jedoch am Beispiel von *Toxoplasma gondii*, daß Ryanodin durchaus auch auf Apikomplexa wirken kann. So induziert es bei *Toxoplasma*-Tachyzoiten eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie die Sekretion der Mikronemen. Dieser Effekt war auch noch bei einer Konzentration von 1 nM zu beobachten. Bei hohen Ryanodinkonzentrationen (100 μ M) wurde festgestellt, daß sich diese Wirkung umkehrt und die Mikronemensekretion der Tachyzoiten nicht stimuliert, sondern inhibiert wird. Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologien zu bekannten Ryanodinrezeptoren muß man entweder davon ausgehen, daß *Toxoplasma* Ryanodin-sensitive Ca^{2+} -Kanäle besitzt, die sich stark von den bekannten unterscheiden, oder daß der durch Ryanodin verursachte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über alternative Mechanismen funktioniert.

Für die Identifizierung von Ryanodin-bindenden Proteinen in *E.tenella*-Sporozoitien könnte die „Phage Display“-Technologie Verwendung finden. Ein Beispiel dafür findet sich in einer Arbeit von Beghetto et al. [2001]: Dort wurde eine cDNA-Bank von *T.gondii* eingesetzt, bei welcher die cDNA-Fragmente als Fusionsproteine mit einem Kapsidprotein des Lambda-Bakteriophagen exprimiert wurden und so zur Selektion eingesetzt werden konnten.

Die Hemmung von *E.tenella*-Sporozoiten durch Ryanodin *in vitro* ist von dem durch Ca^{2+} -Mangel verursachten Effekt unabhängig.

Um genauer zu klären, ob der invasionshemmende Effekt von Ryanodin bei *E.tenella*-Sporozoiten auf der veränderten Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma und der Mikronemensekretion beruht, wären weitere Untersuchungen sinnvoll.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, daß die Ryanodinwirkung nicht von extrazellulärem Ca^{2+} abhängt: *E.tenella*-Sporozoiten wurden dazu zwei Stunden mit bzw. ohne Ca^{2+} und mit bzw. ohne Ryanodin inkubiert. Anschließend wurden alle Proben auf dieselbe Ca^{2+} -Konzentration eingestellt und zur Infektion von MDBK-Zellrasen eingesetzt. Beim Vergleich der Infektionsraten war eine Addition der Effekte zu erkennen: Der Ca^{2+} -Mangel verursachte eine Hemmung von etwa 20 %. Der hemmende Effekt einer Ryanodinkonzentration von 100 μM lag zwischen 50 % und 60 %. Und beide Faktoren zusammen, d.h. die Vorinkubation der Sporozoiten ohne Ca^{2+} und mit Ryanodin, bewirkten eine Hemmung von etwa 75 % - der Summe der durch die Einzelfaktoren verursachten Effekte. Deshalb ist davon auszugehen, daß die Mechanismen, über welche Ryanodin und Ca^{2+} -Mangel die Invasion beeinflussen, unabhängig voneinander sind und für die Ryanodinwirkung auf *E.tenella*-Sporozoiten kein extrazelluläres Ca^{2+} benötigt wird.

Falls durch Ryanodin die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei *E.tenella*-Sporozoiten ansteigt, so wäre dies auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und nicht auf einen Ca^{2+} -Einstrom von außen zurückzuführen. Anders als bei *Toxoplasma* sind bei Eimerien bisher noch keine intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bekannt. Möglicherweise kommen dafür, wie bei anderen Eukaryoten der Fall, das endoplasmatische Retikulum und/oder die Mitochondrien in Frage.

Für Untersuchungen intrazellulärer Signalvorgänge können Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Um zu testen, ob Ryanodin die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von *E.tenella*-Sporozoiten beeinflusst, wurden die Zellen daher mit Calcium Green-1 AM inkubiert. Dieser lipophile Azetoxymethylester kann durch die Esterase lebender Zellen gespalten werden, wobei ein anionischer, Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff entsteht, der sich im Zellinneren anreichert [Roos, 2000]. Bei *E.tenella*-Sporozoiten konnte dies jedoch auch bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden. Möglicherweise Ryanodin-induzierte Verschiebungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration konnten deshalb auf diese Weise nicht untersucht werden.

Bei *T.gondii* wurden bereits erfolgreich Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Dafür wurden Tachyzoiten mit Fura-2 AM, ebenfalls einem Azetoxymethylester, beladen und bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen oder nach Zugabe bestimmter Wirkstoffe spektrofluorometrisch untersucht [Carruthers et al., 1999].

E.tenella-Sporozoitien können mit CFDA-SE gefärbt werden. Dies weist darauf hin, daß sie wie auch *T.gondii*-Tachyzoiten eine aktive Esterase besitzen. Das Problem bei der Fluoreszenzmarkierung mit Calcium-Green-1 liegt also wahrscheinlich nicht bei der mangelhaften Esterspaltung des Farbstoffes, sondern bei seiner fehlenden Internalisierung.

Einiges weist darauf hin, daß die Sporozoitien von Eimerien für viele Wirkstoffe außergewöhnlich impermeabel sind. Bei *T.gondii*-Tachyzoiten hochgradig wirksame Verbindungen, wie z.B. BAPTA-AM, Ethanol oder Ionomycin, haben kaum einen Effekt auf *Eimeria*-Sporozoitien [Wiersma et al., 2004]. Ein Grund dafür könnte sein, daß sich auf der Oberfläche der Sporozoitien vermutlich wesentlich mehr Glykoproteine und Glykolipide befinden als bei *Toxoplasma*-Tachyzoiten oder *Eimeria*-Merozoiten. Diese Schicht könnte eine größere Permeabilitätsbarriere darstellen. Auf die Sekretion einer großen Menge von Oberflächenantigenen weisen auch die durch Immunfluoreszenz anfärbbaren Schleimspuren von *Eimeria*-Sporozoitien hin, welche besonders stark ausgeprägt sind (persönliche Mitteilung von Dr. Donald, Merck Research Laboratories, Rahway).

In dieser Arbeit wurde zum erstem Mal der invasionshemmender Effekt von Ryanodin auf *Eimeria*-Sporozoitien beschrieben. Durch seine Wirksamkeit *in vitro* sowie die geringe Toxizität könnte Ryanodin erfolgreich für die Kokzidiosetherapie und -prophylaxe eingesetzt werden, was durch eine Patentanmeldung geschützt wurde [Schubert und Zoufal, 2004].

Die Hemmung der Sporozoitieninvasion durch den Mangel an extrazellulärem Ca^{2+} bzw. durch Ryanodin, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, weist darauf hin, daß die Ca^{2+} -Signaltransduktion eine entscheidende Rolle beim Invasionsvorgang von *Eimeria*-Sporozoitien spielt. Davon ausgehend sollten alternative Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe und andere Methoden eingesetzt werden, um diesen vielversprechenden Angriffspunkt für neue Antikokzidiose-Wirkstoffe genauer zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Die durch *Eimeria*-Infektionen verursachte Kokzidiose beim Haushuhn stellt ein ernsthaftes Problem in der Geflügelwirtschaft dar, dessen Bekämpfung, u.a. durch die Entwicklung resistenter Parasitenstämme, schwierig und kostenintensiv ist. Es besteht deshalb großer Bedarf für Alternativen in der Therapie und Prophylaxe dieser Erkrankung.

Die Penetration von Darmzellen durch *Eimeria*-Sporozoiten (Invasion) ist die erste Auseinandersetzung zwischen Wirt und Parasit. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Strategien gesucht, um diesen Vorgang zu hemmen. Dabei wurden zwei Wege beschritten: die Isolierung von Antikörperfragmenten zur Neutralisation eines invasionsrelevanten Oberflächenproteins des Parasiten und ein Ansatz auf dem Gebiet der Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktion. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Ein am Invasionsvorgang der Sporozoiten beteiligtes Mikronemenprotein von *Eimeria tenella*, Etmic2, wurde kloniert und in zwei Varianten - mit einem His-Tag bzw. mit einem *c-myc*-Tag - in *E.coli* exprimiert. Die Reinigung dieser rekombinanten Proteine erfolgte unter Nutzung des His-Tags mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) bzw. bei der nur mit einem *c-myc*-Tag versehenen Form des Antigens durch eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und eine anschließende Anionenaustauscher-Chromatographie.
2. Um an Etmic2 bindende Antikörperfragmente zu erhalten, wurde die „Phage Display“-Technologie genutzt: Ausgehend von einer anti-*Eimeria*-scFv-Bank wurden durch drei Selektionsrunden an immobilisiertem rekombinatem Etmic2 21 verschiedene scFv isoliert.
3. Die Charakterisierung der Bindung dieser anti-Etmic2-scFv an fragmentiertem rekombinatem Etmic2 ergab Hinweise auf unterschiedliche Epitopspezifitäten. Bei Bindungsuntersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz und der Affinitätsbestimmung durch einen kompetitiven ELISA zeigten die scFv relativ geringe Affinitäten und bis auf eine Ausnahme hohe Dissoziationskonstanten.
4. Für die an rekombinantes Etmic2 bindenden scFv konnte weder bei einem ELISA noch bei einem Immunoblot eine Bindung an in Sporozoiten- bzw. Oozystenextrakt enthaltenes Etmic2 nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung der Bindung von anti-Etmic2-scFv an Etmic2 auf der Oberfläche von *E.tenella*-Sporozoiten mittels Zellanheftungstest bzw.

indirektem Immunfluoreszenztest hatten ein negatives Resultat. Während sich mit den anti-Etmic2-scFv keine Bindung an Etmic2 aus natürlicher Quelle nachweisen ließ, war dies jedoch mit einem Mausserum gegen das rekombinante Antigen möglich.

5. Zum Vergleich der Epitopspezifitäten von anti-Etmic2-scFv und einem Kaninchenserum gegen aus *E.tenella*-Material isoliertes Etmic2 wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Dabei war keine Verdrängung der scFv vom immobilisierten rekombinanten Etmic2 durch Serumantikörper festzustellen. Man kann deshalb davon ausgehen, daß sich die Hauptepitopspezifitäten der Serumantikörper von den Spezifitäten der scFv unterscheiden.

Unter Verwendung eines *in vitro*-Testsystems und dem Einsatz der Durchflußzytometrie wurde untersucht, ob und inwieweit Ca^{2+} -Mangel oder Stoffe, welche eine Wirkung auf die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion besitzen, den Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozysten hemmen. Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

6. Bei Ca^{2+} -Mangel im Medium wird die Invasion von *E.tenella*-Sporozysten *in vitro* gehemmt. Bei den Untersuchungen wurde eine maximale Hemmung von 70 % beobachtet. Der halbmaximale Effekt, d.h. eine 35 %ige Hemmung, trat bereits bei einer Ca^{2+} -Konzentration von etwa 600 μM auf.
7. Durch die Vorinkubation von Sporozysten in Medium mit bzw. ohne Ca^{2+} wurde in dem anschließenden Sporozysten-Invasionshemmtest gezeigt, daß der hemmende Effekt bei Ca^{2+} -Mangel spezifisch für die Parasiten und nicht für die Wirtszellen ist.
8. Es wurden verschiedene Viabilitätstests durchgeführt, bei welchen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Ca^{2+} bzw. ohne Ca^{2+} inkubierten Sporozysten beobachtet wurden. Der invasionshemmende Effekt bei Ca^{2+} -Mangel beruht also wahrscheinlich nicht auf einer verringerten Lebensfähigkeit der Sporozysten.
9. Verschiedene Stoffe mit Wirkung auf Ca^{2+} -Signalvorgänge wurden im Sporozysten-Invasionshemmtest eingesetzt. Dabei zeigte Koffein, das bis zu einer Konzentration von 250 μM eingesetzt wurde, keinen Effekt, während durch Ryanodin und 2-APB die Infektionsrate herabgesetzt wurde. Vorinkubationsversuche zeigten, daß 2-APB dabei wahrscheinlich die Wirtszellen beeinflußt, während Ryanodin auf die Sporozysten wirkt.

10. Die Kombination von Ca^{2+} -armem Medium und Ryanodin hatte einen additiven Effekt auf die Sporozoiten-Invasion *in vitro*. Man kann deshalb davon ausgehen, daß die Mechanismen, über welche Ryanodin und der Mangel an extrazellulärem Ca^{2+} die Invasion hemmen, voneinander unabhängig sind.

Unter Verwendung einer anti-Eimeria-„Phage Display“-Bank an rekombinantem Etmic2 selektierte scFv sind aufgrund geringer Affinität und/oder fehlender Spezifität für das natürlich vorkommende Etmic2 nicht zur Bekämpfung von Eimeria-Infektionen geeignet.

Untersuchungen mit einer permanenten Wirtszelllinie zeigten, daß der Invasionsvorgang von *E.tenella*-Sporozoiten *in vitro* stark von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig ist und durch Ryanodin gehemmt werden kann. Der Ca^{2+} -Mangel wirkt dabei wahrscheinlich nicht durch eine Verringerung der Lebensfähigkeit des Parasiten und beeinflußt den Effekt von Ryanodin nicht.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Attar M.A. und Fernando M.A. (1987) Transport of *Eimeria necatrix* sporozoites in the chicken: effects of irritants injected intraperitoneally. *J Parasitol* 73, 494-502
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. und Watson J.D. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 2002
- Arntzen C.J. (2002) Oral immunization with transgenic plants. US Patent 6395964
- Arrizabalaga G. und Boothroyd J.C. (2004) Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *Int J Parasitol* 34, 361-8
- Artsaenko O., Peisker M., Zur Nieden U., Fiedler U., Weiler E.W., Muntz K. und Conrad U. (1995) Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J* 8, 745-50
- Artsaenko O., Kettig B., Fiedler U., Conrad U. und Düring K. (1998) Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding* 4, 313-319
- Augustine P.C. (1980) Effect of polyions, Ca⁺⁺, and enzymes on penetration of cultured cells by *Eimeria meleagridis* sporozoites. *J Parasitol* 66, 498-505
- Augustine P.C. und Danforth H.D. (1985) Effects of hybridoma antibodies on invasion of cultured cells by sporozoites of *Eimeria*. *Avian Dis* 29, 1212-23
- Augustine P.C. und Danforth H.D. (1986) A study of the dynamics of the invasion of immunized birds by *Eimeria* sporozoites. *Avian Dis* 30, 347-51
- Augustine P.C. (1991) Monoclonal antibody produced against partially purified sporozoite antigen inhibits invasion of cells by sporozoites of avian *Eimeria* species. *Proc Soc Exp Biol Med* 198, 606-11
- Augustine P.C. (2001) Invasion of different cell types by sporozoites of *Eimeria* species and effects of monoclonal antibody 1209-C2 on invasion of cells by sporozoites of several apicomplexan parasites. *J Eukaryot Microbiol* 48, 177-81
- Balauca N. (1976) Experimental reproduction of necrotic enteritis in the chicken. 1. Mono- and polyinfections with *Clostridium perfringens* and coccidia with reference to cage management. *Arch Exp Veterinarmed* 30, 903-12
- Balauca N., Kohler B., Horsch F., Jungmann R. und Prusas E. (1976) Experimental reproduction of necrotic enteritis in the chicken. 2. Further mono- and polyinfections with *CL. perfringens* and coccidia with special reference to ground-kept chickens. *Arch Exp Veterinarmed* 30, 913-23
- Bateman A., Coin L., Durbin R., Finn R.D., Hollich V., Griffiths-Jones S., Khanna A., Marshall M., Moxon S., Sonnhammer E.L., Studholme D.J., Yeats C. und Eddy S.R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue, D138-41
- Begent R.H., Verhaar M.J., Chester K.A., Casey J.L., Green A.J., Napier M.P., Hope-Stone L.D., Cushen N., Keep P.A., Johnson C.J., Hawkins R.E., Hilson A.J. und Robson L. (1996) Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat Med* 2, 979-84
- Beghetto E., Pucci A., Minenkova O., Spadoni A., Bruno L., Buffolano W., Soldati D., Felici F. und Gargano N. (2001) Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *Int J Parasitol* 31, 1659-68
- Belli S.I., Mai K., Skene C.D., Gleeson M.T., Witcombe D.M., Katrib M., Finger A., Wallach M.G. und Smith N.C. (2004) Characterisation of the antigenic and immunogenic properties of bacterially expressed, sexual stage antigens of the coccidian parasite, *Eimeria maxima*. *Vaccine* 22, 4316-25

- Berkhoff E.G., Boon A.C., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Sintnicolaas K., Osterhaus A.D. und Rimmelzwaan G.F. (2004) A mutation in the HLA-B*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *J Virol* 78, 5216-22
- Bernard O., Cory S., Gerondakis S., Webb E. und Adams J.M. (1983) Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *Embo J* 2, 2375-83
- Better M., Chang C.P., Robinson R.R. und Horwitz A.H. (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240, 1041-3
- Bhat M.B., Zhao J., Zang W., Balke C.W., Takeshima H., Wier W.G. und Ma J. (1997) Caffeine-induced release of intracellular Ca²⁺ from Chinese hamster ovary cells expressing skeletal muscle ryanodine receptor. Effects on full-length and carboxyl-terminal portion of Ca²⁺ release channels. *J Gen Physiol* 110, 749-62
- Biagini G.A., Bray P.G., Spiller D.G., White M.R. und Ward S.A. (2003) The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular Ca²⁺ store. *J Biol Chem* 278, 27910-5
- Binger M., Chizzonite R., Kramer R., Lomedico P., McAndrew S. und Altenburger W. (2003) Recombinant coccidiosis vaccines. US Patent Application 20030175311
- Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Johnson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S. und Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-6
- Boder E.T., Midelfort K.S. und Wittrup K.D. (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10701-5
- Bonhomme A., Pingret L., Bonhomme P., Michel J., Balossier G., Lhotel M., Pluot M. und Pinon J.M. (1993) Subcellular calcium localization in *Toxoplasma gondii* by electron microscopy and by X-ray and electron energy loss spectroscopies. *Microsc Res Tech* 25, 276-85
- Bonhomme A., Bouchot A., Pezzella N., Gomez J., Le Moal H. und Pinon J.M. (1999) Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev* 23, 551-61
- Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Roderick H.L., Berridge M.J. und Peppiatt C.M. (2002) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *Faseb J* 16, 1145-50
- Boss M.A., Kenten J.H., Wood C.R. und Emtage J.S. (1984) Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 12, 3791-806
- Bouchot A., Zierold K., Bonhomme A., Kilian L., Belloni A., Balossier G., Pinon J.M. und Bonhomme P. (1999) Tachyzoite calcium changes during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 85, 809-18
- Bouchot A., Jaillet J.D., Bonhomme A., Alessandro N.P., Laquerriere P., Kilian L., Burlet H., Gomez-Marin J.E., Pluot M., Bonhomme P. und Pinon J.M. (2001) Detection and localization of a Ca²⁺-ATPase activity in *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct Funct* 26, 49-60
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54
- Brenner S. und Stretton A.O. (1964) The Amber Mutation. *J Cell Physiol* 64, Suppl 1, 43-9
- Brinkmann U., Chowdhury P.S., Roscoe D.M. und Pastan I. (1995) Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J Immunol Methods* 182, 41-50

- Brown P.J., Billington K.J., Bumstead J.M., Clark J.D. und Tomley F.M. (2000) A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma prekallikrein. *Mol Biochem Parasitol* 107, 91-102
- Buck E., Zimanyi I., Abramson J.J. und Pessah I.N. (1992) Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* 267, 23560-7
- Bumstead J. und Tomley F. (2000) Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 110, 311-21
- Bumstead J.M., Dunn P.P. und Tomley F.M. (1995) Nitrocellulose immunoblotting for identification and molecular gene cloning of *Eimeria maxima* antigens that stimulate lymphocyte proliferation. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 524-30
- Cabilly S., Riggs A.D., Pande H., Shively J.E., Holmes W.E., Rey M., Perry L.J., Wetzel R. und Heyneker H.L. (1984) Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3273-7
- Cai X. und Garen A. (1995) Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6537-41
- Cao Y. und Karsten U. (2001) Binding patterns of 51 monoclonal antibodies to peptide and carbohydrate epitopes of the epithelial mucin (MUC1) on tissue sections of adenolymphomas of the parotid (Warthin's tumours): role of epitope masking by glycans. *Histochem Cell Biol* 115, 349-56
- Carruthers V.B., Moreno S.N. und Sibley L.D. (1999) Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular $[Ca^{2+}]$ and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J* 342, 379-86
- Carruthers V.B. und Sibley L.D. (1999) Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 31, 421-8
- Chapman H.D. und Hacker A.B. (1994) Sensitivity of field isolates of *Eimeria* from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken. *Poult Sci* 73, 1404-8
- Chapman H.D. (1998) Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. *Int J Parasitol* 28, 1141-4
- Chowdhury P.S., Viner J.L., Beers R. und Pastan I. (1998) Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 669-74
- Clackson T., Hoogenboom H.R., Griffiths A.D. und Winter G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-8
- Conrad U., Fiedler U., Phillips J. und Artsaenko O. (1996) Kasette zur Expression und lagerstabilen Genproduktion in Pflanzen. PCT DE9700285
- Conrad U. und Fiedler U. (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol* 38, 101-9
- Conrad U., Fiedler U., Artsaenko O. und Phillips J. (1998) High level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs. *J Plant Physiol* 152, 708-711
- Conrad U. und Manteuffel R. (2001) Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. *Trends Plant Sci* 6, 399-402
- Conrad U. und Scheller J. (2005) Considerations on Antibody-Phage Display Methodology. *Comb Chem High Throughput Screen* 8, 117-126

- Cramer R., Jaussi R., Menz G. und Blaser K. (1994) Display of expression products of cDNA libraries on phage surfaces. A versatile screening system for selective isolation of genes by specific gene-product/ligand interaction. *Eur J Biochem* 226, 53-8
- Crane M.S., Schmatz D.M., Stevens S., Habbersett M.C. und Murray P.K. (1984) *Eimeria tenella*: in vitro development in irradiated bovine kidney cells. *Parasitology* 88, 521-30
- Crane M.S., Murray P.K., Gnozzio M.J. und Macdonald T.T. (1988) Passive protection of chickens against *Eimeria tenella* infection by monoclonal antibody. *Infect Immun* 56, 972-6
- Da Silva A., Jr., Kawazoe U., Freitas F.F., Gatti M.S., Dolder H., Schumacher R.I., Juliano M.A., Da Silva M.J. und Leite A. (2002) Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries. *Mol Biochem Parasitol* 120, 53-60
- Danforth H.D. (1983) Use of monoclonal antibodies directed against *Eimeria tenella* sporozoites to determine stage specificity and in vitro effect on parasite penetration and development. *Am J Vet Res* 44, 1722-7
- Daszak P., Ball S.J., Pittilo R.M. und Norton C.C. (1993) Ultrastructural observations on caecal epithelial cells invaded by first-generation merozoites of *Eimeria tenella* in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 87, 359-64
- Daugochies A., Bose R., Marx J., Teich K. und Friedhoff K.T. (2002) Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. *Vet Parasitol* 103, 299-308
- De Bellis D. und Schwartz I. (1990) Regulated expression of foreign genes fused to lac: control by glucose levels in growth medium. *Nucleic Acids Res* 18, 1311
- Del Cacho E., Lopez-Bernad F., Gallego M., Quilez J. und Sanchez-Acedo C. (1998) Expression and localization of an S100 protein-like molecule in *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 84, 1174-7
- Dieckmann-Schuppert A., Bause E. und Schwarz R.T. (1994) Glycosylation reactions in *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, and *Trypanosoma brucei brucei* probed by the use of synthetic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1199, 37-44
- Docampo R. und Moreno S.N. (2001) The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 114, 151-9
- Dowling L. (1992) Ionophore toxicity in chickens: a review of pathology and diagnosis. *Avian Pathol* 21, 355-368
- Du G.G., Guo X., Khanna V.K. und MacLennan D.H. (2001) Ryanodine sensitizes the cardiac Ca(2+) release channel (ryanodine receptor isoform 2) to Ca(2+) activation and dissociates as the channel is closed by Ca(2+) depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13625-30
- Dübel S. und Schmiedl A. (2000) Antikörperkonstrukte mit variablen Regionen. German Patent Application 10021678.1
- Dubremetz J.F. und Ferreira E. (1978) Capping of cationised ferritin by coccidian zoites. *J Protozool* 25, 9B
- Dubremetz J.F., Garcia-Reguet N., Conseil V. und Fourmaux M.N. (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28, 1007-13
- Dulski P. und Turner M. (1988) The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using Percoll density gradients. *Avian Dis* 32, 235-9
- Dunn P., Bumstead J. und Tomley F. (1996a) Primary structure of a BiP homologue in *Eimeria* spp. *Parasitol Res* 82, 566-8

- Dunn P.P., Bumstead J.M. und Tomley F.M. (1996b) Sequence, expression and localization of calmodulin-domain protein kinases in *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. *Parasitology* 113 (Pt 5), 439-48
- Dunn P.P., Bumstead J.M. und Tomley F.M. (1996c) Sequence, expression and localization of calmodulin-domain protein kinases in *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. *Parasitology* 113, 439-48
- Eschenbacher K.H., Eggli P., Wallach M. und Braun R. (1996) Characterization of a 14 kDa oocyst wall protein of *Eimeria tenella* and *E. acervulina*. *Parasitology* 112, 169-76
- Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G. und Bishop J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-6
- Feldhaus M.J., Siegel R.W., Opresko L.K., Coleman J.R., Feldhaus J.M., Yeung Y.A., Cochran J.R., Heinzelman P., Colby D., Swers J., Graff C., Wiley H.S. und Wittrup K.D. (2003) Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol* 21, 163-70
- Feys V., De Waele P., Van De Voorde A., Casneuf P. und Fiers W. (1988) Expression of functional mouse antibodies directed against the tumour marker human placental alkaline phosphatase in non-lymphoid cells. *Int J Cancer Suppl* 2, 26-7
- Fiedler U. und Conrad U. (1995) High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Biotechnology* 13, 1090-3
- Fiedler U., Phillips J., Artsaenko O. und Conrad U. (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3, 205-16
- Figini M., Obici L., Mezzanzanica D., Griffiths A., Colnaghi M.I., Winter G. und Canevari S. (1998) Panning phage antibody libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection. *Cancer Res* 58, 991-6
- Fuller A.L. und McDougald L.R. (2001) Cell membrane labeling of *Eimeria tenella* sporozoites with the fluorescent dye PKH-67 GL for tracking parasite-host interactions. *Parasitol Res* 87, 521-5
- Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.S., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M., Fairlamb A.H., Fraunholz M.J., Roos D.S., Ralph S.A., McFadden G.I., Cummings L.M., Subramanian G.M., Mungall C., Venter J.C., Carucci D.J., Hoffman S.L., Newbold C., Davis R.W., Fraser C.M. und Barrell B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511
- Gazarini M.L., Thomas A.P., Pozzan T. und Garcia C.R. (2003) Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol* 161, 103-10
- Gilchrist C.A., Leo M., Line C.G., Mann B.J. und Petri W.A., Jr. (2003) Calcium modulates promoter occupancy by the *Entamoeba histolytica* Ca²⁺-binding transcription factor URE3-BP. *J Biol Chem* 278, 4646-53
- Grob P., Baumann S., Ackermann M. und Suter M. (1998) A system for stable indirect immobilization of multimeric recombinant proteins. *Immunotechnology* 4, 155-63
- Guzman V.B., Silva D.A., Kawazoe U. und Mineo J.R. (2003) A comparison between IgG antibodies against *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* and oocyst shedding in broiler-breeders vaccinated with live anticoccidial vaccines. *Vaccine* 21, 4225-33
- Haberkorn A. (1970) Susceptibility of non-specific hosts to schizogonic stages of different *Eimeria* species. *Z Parasitenkd* 35, 156-61

- Hanes J. und Plückthun A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4937-42
- Hanes J., Schaffitzel C., Knappik A. und Pluckthun A. (2000) Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* 18, 1287-92
- Harrison J.L., Williams S.C., Winter G. und Nissim A. (1996) Screening of phage antibody libraries. *Methods Enzymol* 267, 83-109
- Heintzelman M.B. und Schwartzman J.D. (2001) Myosin diversity in Apicomplexa. *J Parasitol* 87, 429-32
- Heise A., Peters W. und Zahner H. (1999) Microneme antigens of *Eimeria bovis* recognized by two monoclonal antibodies. *Parasitol Res* 85, 457-67
- Hilpert K., Hansen G., Wessner H., Kuttner G., Welfle K., Seifert M. und Hohne W. (2001) Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng* 14, 803-6
- Hoff E.F. und Carruthers V.B. (2002) Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends Parasitol* 18, 251-5
- Holz G.G., Leech C.A., Heller R.S., Castonguay M. und Habener J.F. (1999) cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca²⁺ signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *J Biol Chem* 274, 14147-56
- Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S., Chiswell D.J., Hudson P. und Winter G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19, 4133-7
- Hoogenboom H.R., De Bruine A.P., Hufton S.E., Hoet R.M., Arends J.W. und Roovers R.C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20
- Hoogenboom H.R., Lutgerink J.T., Pelsers M.M., Rousch M.J., Coote J., Van Neer N., De Bruine A., Van Nieuwenhoven F.A., Glatz J.F. und Arends J.W. (1999) Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library. *Eur J Biochem* 260, 774-84
- Hotta C.T., Gazarini M.L., Beraldo F.H., Varotti F.P., Lopes C., Markus R.P., Pozzan T. und Garcia C.R. (2000) Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* 2, 466-8
- Huang X., Xuan X., Suzuki H., Sugimoto C., Nagasawa H., Fujisaki K., Mikami T. und Igarashi I. (2002) Characterization of *Toxoplasma gondii* SAG2 expressed in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1343-7
- Huhn M., Sasse S., Tur M.K., Matthey B., Schinkothe T., Rybak S.M., Barth S. und Engert A. (2001) Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res* 61, 8737-42
- Hupe D.J., Pfefferkorn E.R., Behrens N.D. und Peters K. (1991) L-651,582 inhibition of intracellular parasitic protozoal growth correlates with host-cell directed effects. *J Pharmacol Exp Ther* 256, 462-7
- Janeway C.A. und Travers P. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995
- Jenkins M.C. und Dame J.B. (1987) Identification of immunodominant surface antigens of *Eimeria acervulina* sporozoites and merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 25, 155-64

- Jenkins M.C., Lillehoj H.S. und Dame J.B. (1988) *Eimeria acervulina*: DNA cloning and characterization of recombinant sporozoite and merozoite antigens. *Exp Parasitol* 66, 96-107
- Johns M., George A.J. und Ritter M.A. (2000) In vivo selection of sFv from phage display libraries. *J Immunol Methods* 239, 137-51
- Johnson J.D., Wong C.J., Yunker W.K. und Chang J.P. (2002) Caffeine-stimulated GTH-II release involves Ca(2+) stores with novel properties. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C635-45
- Kamau S.W., Nunez R. und Grimm F. (2001) Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacol* 1, 1
- Kaplan S., Stretton A.O. und Brenner S. (1965) Amber suppressors: efficiency of chain propagation and suppressor specific amino acids. *J Mol Biol* 14, 528-33
- Kawazoe U., Tomley F.M. und Frazier J.A. (1992) Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology* 104 Pt 1, 1-9
- Keen N.T. und Tamaki S. (1986) Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 168, 595-606
- Kieschnick H., Wakefield T., Narducci C.A. und Beckers C. (2001) *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J Biol Chem* 276, 12369-77
- Kim J., Han J., Song K., Kim S., Min W., Son E., Lillehoj H. und Lillehoj E. (2002) Recombinant scFv antibodies specific to *Eimeria* spp. responsible for coccidiosis. US Patent Application 20030104497
- Kim J.K., Min W., Lillehoj H.S., Kim S., Sohn E.J., Song K.D. und Han J.Y. (2001) Generation and characterization of recombinant ScFv antibodies detecting *Eimeria acervulina* surface antigens. *Hybridoma* 20, 175-81
- Kim K. und Weiss L.M. (2004) *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34, 423-32
- Koch J., Breitling F. und Dübel S. (2000) Rapid titration of multiple samples of filamentous bacteriophages (M13) on nitrocellulose filters. *BioTechniques* 29, 1196-1202
- Kohler G. und Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7
- Kontermann R. und Dübel S. *Antibody Engineering*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001
- Kumar N., Koski G., Harada M., Aikawa M. und Zheng H. (1991) Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Mol Biochem Parasitol* 48, 47-58
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5
- Larsen N.C., Rasmussen K.R. und Healey M.C. (1991) Production and partial characterization of monoclonal antibodies specific for the gamonts of *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 77, 1012-5
- Laukkanen M.L., Mäkinen-Kiljunen S., Isoherranen K., Haahtela T., Soderlund H. und Takkinen K. (2003) Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries. *J Immunol Methods* 278, 271-81
- Lawn A.M. und Rose M.E. (1982) Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J Parasitol* 68, 1117-23

- Le Gall F., Kipriyanov S.M., Moldenhauer G. und Little M. (1999) Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. *FEBS Lett* 453, 164-8
- Lee S.Y., Choi J.H. und Xu Z. (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* 21, 45-52
- Lillehoj E.P., Yun C.H. und Lillehoj H.S. (2000) Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Anim Health Res Rev* 1, 47-65
- Lillehoj H.S. (1986) Immune response during coccidiosis in SC and FP chickens. I. In vitro assessment of T cell proliferation response to stage-specific parasite antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 13, 321-30
- Lillehoj H.S. und Trout J.M. (1993) Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* 22, 3-21
- Lillehoj H.S., Sasai K. und Matsuda H. (1994) Development and characterization of chicken-chicken B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies that detect sporozoite and merozoite antigens of *Eimeria*. *Poult Sci* 73, 1685-93
- Lillehoj H.S. und Lillehoj E.P. (2000) Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis* 44, 408-25
- Lillehoj H.S. (2002) Chicken monoclonal antibodies specific for coccidial antigens involved in invasion of host lymphocytes. US6451984
- Lindl T. und Bauer J. *Zell- und Gewebekultur*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1994
- Lingelbach K. (2001) Life in vacuoles--a strategy for parasite survival. *Int J Parasitol* 31, v-vi
- Lovett J.L., Marchesini N., Moreno S.N. und Sibley L.D. (2002) *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem* 277, 25870-6
- Lovett J.L. und Sibley L.D. (2003a) Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J Cell Sci* 116, 3009-16
- Lovett J.L. und Sibley L.D. (2003b) Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J Cell Sci* 116, 3009-16
- Luo Y., Zeng Q., Glisson J.R., Jackwood M.W., Cheng I.H. und Wang C. (1999) Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* 17, 821-31
- Lytton J., Westlin M. und Hanley M.R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266, 17067-71
- Ma H.T., Venkatachalam K., Li H.S., Montell C., Kurosaki T., Patterson R.L. und Gill D.L. (2001) Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca²⁺ entry channels. *J Biol Chem* 276, 18888-96
- Mansfield E., Amlot P., Pastan I. und Fitzgerald D.J. (1997) Recombinant RFB4 immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors. *Blood* 90, 2020-6
- Marchesini N., Bollo M., Hernandez G., Garrido M.N. und Machado-Domenech E.E. (2002) Cellular signalling in *Trypanosoma cruzi*: biphasic behaviour of inositol phosphate cycle components evoked by carbachol. *Mol Biochem Parasitol* 120, 83-91
- Marks J.D., Hoogenboom H.R., Bonnert T.P., Mccafferty J., Griffiths A.D. und Winter G. (1991) Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-97

- Marks J.D., Hoogenboom H.R., Griffiths A.D. und Winter G. (1992) Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem* 267, 16007-10
- Masumiya H., Li P., Zhang L. und Chen S.R. (2001) Ryanodine sensitizes the Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) to Ca(2+) activation. *J Biol Chem* 276, 39727-35
- Mccafferty J., Griffiths A.D., Winter G. und Chiswell D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-4
- Mehlhorn H. und Piekarski G. *Grundriß der Parasitenkunde*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1989
- Menard R. (2001) Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. *Cell Microbiol* 3, 63-73
- Middelberg A.P. (2002) Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20, 437-43
- Mondragon R. und Frixione E. (1996) Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in Toxoplasma gondii tachyzoites. *J Eukaryot Microbiol* 43, 120-7
- Moreno S.N. und Zhong L. (1996) Acidocalcisomes in Toxoplasma gondii tachyzoites. *Biochem J* 313, 655-9
- Moreno S.N. und Docampo R. (2003) Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* 6, 359-64
- Mouafo A.N., Weck-Heimann A., Dubremetz J.F. und Entzeroth R. (2002) Monoclonal antibodies specific for the two types of wall-forming bodies of Eimeria tenella macrogametes (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol Res* 88, 217-24
- Mullis K.B. und Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50
- Nagai K. und Thogersen H.C. (1987) Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in Escherichia coli. *Methods Enzymol* 153, 461-81
- Neuberger M.S., Williams G.T., Mitchell E.B., Jouhal S.S., Flanagan J.G. und Rabbitts T.H. (1985) A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* 314, 268-70
- Nishinaka S., Suzuki T., Matsuda H. und Murata M. (1991) A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. *J Immunol Methods* 139, 217-22
- Nishinaka S., Akiba H., Nakamura M., Suzuki K., Suzuki T., Tsubokura K., Horiuchi H., Furusawa S. und Matsuda H. (1996) Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci* 58, 1053-6
- Nissim A., Hoogenboom H.R., Tomlinson I.M., Flynn G., Midgley C., Lane D. und Winter G. (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *Embo J* 13, 692-8
- Novilla M.N. (1992) The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores. *Vet Hum Toxicol* 34, 66-70
- Ostrowska A., Bode D.C., Pruss J., Bilir B., Smith G.D. und Zeisloft S. (2000) Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. *Cell Tissue Bank* 1, 55-68
- Passos A.P. und Garcia C.R. (1998) Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite P. chabaudi. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 155-60

- Pedersen J., Lauritzen C., Madsen M.T. und Weis Dahl S. (1999) Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Protein Expr Purif* 15, 389-400
- Petrenko V.A. und Vodyanoy V.J. (2003) Phage display for detection of biological threat agents. *J Microbiol Methods* 53, 253-62
- Pezzella N., Bouchot A., Bonhomme A., Pingret L., Klein C., Burlet H., Balossier G., Bonhomme P. und Pinon J.M. (1997) Involvement of calcium and calmodulin in *Toxoplasma gondii* tachyzoite invasion. *Eur J Cell Biol* 74, 92-101
- Pini A., Viti F., Santucci A., Carnemolla B., Zardi L., Neri P. und Neri D. (1998) Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 273, 21769-76
- Pini A. und Bracci L. (2000) Phage display of antibody fragments. *Curr Protein Pept Sci* 1, 155-69
- Plückthun A. (1990) Antibodies from *Escherichia coli*. *Nature* 347, 497-8
- Plückthun A. (1991) Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology* 9, 545-51
- Plückthun A. und Pack P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3, 83-105
- Pollock D.P., Kutzko J.P., Birck-Wilson E., Williams J.L., Echelard Y. und Meade H.M. (1999) Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods* 231, 147-57
- Power B.E., Ivancic N., Harley V.R., Webster R.G., Kortt A.A., Irving R.A. und Hudson P.J. (1992) High-level temperature-induced synthesis of an antibody VH-domain in *Escherichia coli* using the PelB secretion signal. *Gene* 113, 95-9
- Prakriya M. und Lewis R.S. (2001) Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 536, 3-19
- Provenzano M., Mocellin S., Bonginelli P., Nagorsen D., Kwon S.W. und Stroncek D. (2003) Ex vivo screening for immunodominant viral epitopes by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). *J Transl Med* 1, 12
- Raether H. *Physics of Thin Films*. (eds. HASS G., FRANCOMBE M.H. and HOFFMAN R.W.) Academic Press, New York, 1977
- Refega S., Cluzeaud M., Pery P., Labbe M. und Girard-Misguich F. (2004) Production of a functional chicken single-chain variable fragment antibody derived from caecal tonsils B lymphocytes against macrogamonts of *Eimeria tenella*. *Vet Immunol Immunopathol* 97, 219-30
- Reiter Y., Brinkmann U., Jung S.H., Lee B., Kasprzyk P.G., King C.R. und Pastan I. (1994) Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem* 269, 18327-31
- Reiter Y., Brinkmann U., Lee B. und Pastan I. (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat Biotechnol* 14, 1239-45
- Rich R.L. und Myszka D.G. (2000) Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* 11, 54-61
- Rick B., Dubremetz J.F. und Entzeroth R. (1998) A merozoite-specific 22-kDa rhoptry protein of the coccidium *Eimeria nieschulzi* (Sporozoa, Coccidia) is exocytosed in the parasitophorous vacuole upon host cell invasion. *Parasitol Res* 84, 291-6

- Riley E.M., Williamson K.C., Greenwood B.M. und Kaslow D.C. (1995) Human immune recognition of recombinant proteins representing discrete domains of the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein, Pfs230. *Parasite Immunol* 17, 11-9
- Rodrigues C.O., Ruiz F.A., Rohloff P., Scott D.A. und Moreno S.N. (2002) Characterization of isolated acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* tachyzoites reveals a novel pool of hydrolyzable polyphosphate. *J Biol Chem* 277, 48650-6
- Roos W. (2000) Ion mapping in plant cells - methods and applications in signal transduction research. *Planta* 210, 347-70
- Rose M.E. und Lee D.L. (1977) Interactions in vitro between sporozoites of *Eimeria tenella* and host peritoneal exudate cells: electron microscopical observations. *Z. Parasitenkd.* 54, 1-7
- Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J. und Studier F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-35
- Ruiz F.A., Rodrigues C.O. und Docampo R. (2001) Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 276, 26114-21
- Saalbach I., Giersberg M. und Conrad U. (2001) High-level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *J Plant Physiol* 158, 529-533
- Saffer L.D. und Schwartzman J.D. (1991) A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool* 38, 454-60
- Sambrook J. und Russell D.W. *Molecular Cloning - A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- Sasai K., Lillehoj H.S., Matsuda H. und Wergin W.P. (1996) Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8+ T lymphocytes in vitro. *J Parasitol* 82, 82-7
- Sasai K., Lillehoj H.S., Hemphill A., Matsuda H., Hanioka Y., Fukata T., Baba E. und Arakawa A. (1998) A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora*, and *Toxoplasma*. *J Parasitol* 84, 654-6
- Scheibel L.W. (1992) Role of calcium/calmodulin-mediated processes in protozoa. *Int Rev Cytol* 134, 165-242
- Schenkel (1987a) Antigens and monoclonal antibodies reactive against sporozoites of *Eimeria* spp. US4710377
- Schenkel (1987b) Antigens and monoclonal antibodies reactive against merozoites of *Eimeria* spp. US4650676
- Schmiedl A., Breitling F. und Dübel S. (2000) Expression of a bispecific dsFv-dsFv' antibody fragment in *Escherichia coli*. *Protein Eng* 13, 725-34
- Schubert U. und Zoufal K. (2004) Treatment and prevention of protozoal diseases with ryanodine. European Patent Application 04029694.9
- Shaw P., Freeman J., Bovey R. und Iggo R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12, 921-30
- Sibley L.D., Krahenbuhl J.L., Adams G.M. und Weidner E. (1986) *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol* 103, 867-74

- Sibley L.D., Pfefferkorn E.R. und Boothroyd J.C. (1993) Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 9, 392-5
- Sijwali P.S., Shenai B.R. und Rosenthal P.J. (2002) Folding of the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 is mediated by a chaperone-like peptide and not the prodomain. *J Biol Chem* 277, 14910-5
- Skerra A. und Plückthun A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-41
- Smith C.K., Galloway R.B. und White S.L. (1981) Effect of ionophores on survival, penetration, and development of *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *J Parasitol* 67, 511-6
- Smith G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7
- Smith J.D., Abelson J.N., Clark B.F., Goodman H.M. und Brenner S. (1966) Studies on amber suppressor tRNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31, 479-85
- Smothers J.F., Henikoff S. und Carter P. (2002) Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries. *Science* 298, 621-2
- Soldati D., Dubremetz J.F. und Lebrun M. (2001) Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 31, 1293-302
- Song K.J. und Nam H.W. (2003) Protease activity of 80 kDa protein secreted from the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 41, 165-9
- Speer C.A. (1979) Further studies on the development of gamonts and oocysts of *Eimeria magna* in cultured cells. *J Parasitol* 65, 591-8
- Stephen B., Rommel M., Dausgschies A. und Haberkorn A. (1997) Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet Parasitol* 69, 19-29
- Stretton A.O. und Brenner S. (1965) Molecular Consequences of the Amber Mutation and Its Suppression. *J Mol Biol* 12, 456-65
- Studier F.W. und Moffatt B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30
- Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J. und Dubendorff J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89
- Stwora-Wojczyk M.M., Kissinger J.C., Spitalnik S.L. und Wojczyk B.S. (2004) O-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Int J Parasitol* 34, 309-22
- Sutko J.L. und Airey J.A. (1996) Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiol Rev* 76, 1027-71
- Sutko J.L., Airey J.A., Welch W. und Ruest L. (1997) The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev* 49, 53-98
- Talmadge K., Kaufman J. und Gilbert W. (1980) Bacteria mature preproinsulin to proinsulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3988-92
- Tennyson S.A.B., J. R. (2000) Localization and immunogenicity of a low molecular weight antigen of *Eimeria tenella*. *Parasitol Res* 86, 453-60

- Tomley F.M., Clarke L.E., Kawazoe U., Dijkema R. und Kok J.J. (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 49, 277-88
- Tomley F.M. (1994) Characterization of rhoptry proteins of *Eimeria tenella* sporozoites: antigenic diversity of rhoptry epitopes within species of the genus *Eimeria* and among three asexual generations of a single species, *E. tenella*. *Infect Immun* 62, 4656-8
- Tomley F.M., Bumstead J.M., Billington K.J. und Dunn P.P. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 79, 195-206
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4
- Trout J.M. und Lillehoi H.S. (1993) Evidence of a role for intestinal CD8+ lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina* sporozoites. *J Parasitol* 79, 790-2
- Trout J.M. und Lillehoj H.S. (1995) *Eimeria acervulina* infection: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poult Sci* 74, 1117-25
- Turbadar T. (1959) Complete Absorption of Light by Thin Metal Films. *Proc. Phys. Soc. (London)* 73, 40-44
- Uchida T., Kikuchi K., Takano H., Ogimoto K. und Nakai Y. (1997) Monoclonal antibodies inhibiting invasion of cultured cells by *Eimeria tenella* sporozoites. *J Vet Med Sci* 59, 721-3
- Van Doorninck W.M. und Becker E.R. (1957) Transport of sporozoites of *Eimeria necatrix* in macrophages. *J Parasitol* 43, 40-4
- Vermeulen A., Dijkema R. und Kok J.J. (1994) Coccidiosis vaccine. European patent 0349071B1
- Vermeulen A.N., Kok J.J., Van Den Boogaart P., Dijkema R. und Claessens J.A. (1993) *Eimeria* refractile body proteins contain two potentially functional characteristics: transhydrogenase and carbohydrate transport. *FEMS Microbiol Lett* 110, 223-9
- Vieira M.C. und Moreno S.N. (2000) Mobilization of intracellular calcium upon attachment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. *Mol Biochem Parasitol* 106, 157-62
- Vukovic P., Chen K., Qin Liu X., Foley M., Boyd A., Kaslow D. und Good M.F. (2002) Single-chain antibodies produced by phage display against the C-terminal 19 kDa region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium yoelii* reduce parasite growth following challenge. *Vaccine* 20, 2826-35
- Wallach M., Pillemer G., Yarus S., Halabi A., Pugatsch T. und Mencher D. (1990) Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen. *Infect Immun* 58, 557-62
- Whitmire W.M., Kyle J.E., Speer C.A. und Burgess D.E. (1988) Inhibition of penetration of cultured cells by *Eimeria bovis* sporozoites by monoclonal immunoglobulin G antibodies against the parasite surface protein P20. *Infect Immun* 56, 2538-43
- Wicher K., Abbruscato F., Wicher V. und Schouls L. (1994) Immunization of guinea pigs with *Treponema pallidum* recombinant antigens reveals the presence of novel epitopes. *Int Arch Allergy Immunol* 103, 396-9
- Wiersma H.I., Galuska S.E., Tomley F.M., Sibley L.D., Liberator P.A. und Donald R.G. (2004) A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion. *Int J Parasitol* 34, 369-80

- Willats W.G. (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50, 837-54
- Williams R.B. (1994) Safety of the attenuated anticoccidial vaccine 'Paracox' in broiler chickens isolated from extraneous coccidial infection. *Vet Res Commun* 18, 189-98
- Williams R.B. (1998) Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int. J. Parasitol.* 28, 1089–1098
- Williams R.B. (1999) A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int J Parasitol* 29, 1209-29
- Williams R.B. (2003) Anticoccidial vaccination: the absence or reduction of numbers of endogenous parasites from gross lesions in immune chickens after virulent coccidial challenge. *Avian Pathol* 32, 535-43
- Wilson C.M. (1983) Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 91, 236-47
- Winter G. und Milstein C. (1991) Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-9
- Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E. und Hoogenboom H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-55
- Witcombe D.M., Belli S.I., Wallach M.G. und Smith N.C. (2003) Molecular characterisation of EmTFP250: a novel member of the TRAP protein family in *Eimeria maxima*. *Int J Parasitol* 33, 691-702
- Witcombe D.M., Ferguson D.J., Belli S.I., Wallach M.G. und Smith N.C. (2004) *Eimeria maxima* TRAP family protein EmTFP250: subcellular localisation and induction of immune responses by immunisation with a recombinant C-terminal derivative. *Int J Parasitol* 34, 861-72
- Woloschak G.E. und Krco C.J. (1987) Regulation of kappa/lambda immunoglobulin light chain expression in normal murine lymphocytes. *Mol Immunol* 24, 751-7
- Woods W.G., Whithear K.G., Richards D.G., Anderson G.R., Jorgensen W.K. und Gasser R.B. (2000) Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. *Int J Parasitol* 30, 1019-23
- Yoo E.M., Chintalacharuvu K.R., Penichet M.L. und Morrison S.L. (2002) Myeloma expression systems. *J Immunol Methods* 261, 1-20
- Yoshida S., Ioka D., Matsuoka H., Endo H. und Ishii A. (2001) Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. *Mol Biochem Parasitol* 113, 89-96
- Yoshida S., Kobayashi T., Matsuoka H., Seki C., Gosnell W.L., Chang S.P. und Ishii A. (2003) T-cell activation and cytokine production via a bispecific single-chain antibody fragment targeted to blood-stage malaria parasites. *Blood* 101, 2300-6
- Zhang X., Wen J., Bidasee K.R., Besch H.R., Jr., Wojcikiewicz R.J., Lee B. und Rubin R.P. (1999) Ryanodine and inositol trisphosphate receptors are differentially distributed and expressed in rat parotid gland. *Biochem J* 340, 519-27
- Zucchi R. und Ronca-Testoni S. (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49, 1-51

8 Anhang

Dargestellt ist die in der vorliegenden Arbeit klonierte Sequenz von Etmic2.

umrahmt: vermutliches Signalpeptid [siehe Tomley et al., 1996]

grau unterlegt: Basen- bzw. Aminosäuren-Austausche im Vergleich zur Sequenz Z71755

(NCBI-Nukleotidsequenz-Datenbank)

```

1      ATGGCTCGAGCGTTGTCGCTGGTTCGCTTTGGGGCTTGCTTTTTTCCCTTCCTCCAAGCTCA
1      M A R A L S L V A L G L L F S L P P S S
61     GCCGTTAGGACGAGAGTCCCAGGCGAAGATAGCTTCTCTCCTGAATCTGGCGTTCTCAGT
21     A V R T R V P G E D S F S P E S G V L S
121    GGGACAGATGCGCCGGAACGACGTCCCATCGTGCCTGGACTAGTTGAAGGTAAGTGCGGC
41     G T D A P E R R P I V P G L V E G N C G
181    AGGCTGACGGTTCGTAACGGCCTGAGCGTGATGAGACCATCAAAGTGACCAGCGCTGGA
61     R L T V R N G L S V D E T I K V T S A G
241    TGGACGAAGAGCGAACGGGACTTCATTGTCTCCCTTGTTGCCGACGAAACGCGCAAAGTT
81     W T K S E R D F I V S L V A D E T R K V
301    GTTCAGCTGAGAGAATCAGAAGGTGCATCCGGCGCCAGTGGCCCTGGACCCGCGCCAGCT
101    V Q L R E S E G A S G A S G P G P A P A
361    GAAAAGCCTCCAAGTGGCCAAGGAAGCGCTGAGGAGGCTCCTAAAGGGGAAGGTGGACAG
121    E K P P S G Q G S A E E A P K G E G G Q
421    GAGAAGCCGTCTGTACCCTTGATTGCTGTTTCGCATCCATGGATCTGGCGGCGACAAAGGG
141    E K P S V P L I A V R I H G S G G D K G
481    GAGAGCGCTCCGCAGTCGGCTGTTCTGCTTTACGGAAATGATGAAAGCGAGCCTACGGAG
161    E S A P Q S A V L L Y G N D E S E P T E
541    GTTCCCCTAGAAACAGCAGCTGGACCCGACCACGCCACTCATGGTACTCATTACGCAGCAG
181    V P L E T A A G P T T P L M V L I T Q Q
601    AACCCAAAGGAAGTGAAGTCCGTGTTCTTGCTTGGATATCTACGGACGCTACAACCTGGA
201    N P K E V E V R V L A W I S T D A T T G
661    AAGGGCTCTTGAAAGAAAATTCGGTGGTTCGTTGGCAGCTCCTTGAGCGGGCGCGACCTT
221    K G S W K E N S V V V G S S L S G R D L
721    ACCGTGAACTTGAGCGACTGTGGACCAAGCTCCCTCAGGGTTTATGGCTCGGCATCAGCT
241    T V N L S D C G P S S L R V Y G S A S A
781    GACCTTGTAAGTGTCAAGGAGGGCATGTGTGAGGCAGACGACCCAGAGTTGATCGCGCTG
261    D L V T V K E G M C E A D D P E L I A L
841    ACTCGGCCTCATAACATCGGCAGCTTCTCCGCTGCCTGCAGAGGAAGGAGACGTAGCGCAG
281    T R P H T S A A S P L P A E E G D V A Q
901    GACGCCAGCAGAGCGCAGGAGCCAGCAGGAAGCAGAAAGCCAGGAGGTTGGAGAAGCC
301    D A Q Q S A G A Q Q E A E A Q E V G E P
961    CAGCAGGAAGCAGCTGCTGCAGAGCAAGGAAGCAGCGCTGCAGAGAGTGACACTCAACAG
321    Q Q E A A A A E Q G S S A A E S D T Q Q
1021   TCATCG
340    S S

```

Lebenslauf

Ulrike Schubert

geboren am 30.01.1978 in Meißen

Kontakt: Hühnerbrücke 4
06466 Gatersleben
u-schubert@gmx.net

- 09/1992 - 07/1996 Geschwister-Scholl-Gymnasium Nossen
Allgemeine Hochschulreife: 1,0 („Sehr gut“)
- 10/1996 - 07/2001 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studium der Biochemie
- 09/1998 Biochemie-Vordiplom: „Sehr gut“
- 07/1999 - 09/1999 Arzneimittelwerk Dresden GmbH
Industriepraktikum in der Abteilung für biochemische Forschung
Schwerpunkt: Untersuchung des Effektes potentieller Wirkstoffe auf die Aktivität von Leberenzymen, Aufbau und Optimierung von Testsystemen
- 11/1999 - 12/1999 Institut für Pflanzenbiochemie, Halle
Praktikum in der Arbeitsgruppe "Jasmonatbiosynthese"
- 10/2000 - 07/2001 Diplomarbeit zum Thema: "Untersuchungen zur funktionellen Analyse der Allenoxidcyclase aus *Arabidopsis thaliana* mittels sense- und antisense-Ansätzen" am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle, Arbeitsgruppe „Jasmonatbiosynthese“
- 07/2001 Diplom in Biochemie: „Sehr gut“
- 09/2001 - 12/2004 Novoplant GmbH, Gatersleben
wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Hühnerkokzidiose-Forschung, Schwerpunkte: Isolierung und Charakterisierung von Antikörperfragmenten aus "Phage Display"-Banken anhand rekombinanter Antigene zur Anwendung in der Kokzidiose-Therapie und -prophylaxe, Hemmung der *Eimeria*-Sporozoiteneinvasion durch Beeinflussung der Kalziumsignaltransduktion

Publikation

Schubert, U. und Zoufal, K. (2004) Treatment and prevention of protozoal diseases with ryanodine. European Patent Application 04029694.9

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegenden Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Weiterhin versichere ich, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich zum ersten Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

Gatersleben, Februar 2005

Danksagung

Herrn PD Dr. Udo Conrad danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit, seine hilfreichen Anregungen zum Manuskript sowie die Einführung in das Gebiet der scFv und der "Phage Display"-Technologie.

Ich danke der Novoplant GmbH in Gatersleben, bei welcher ich die vorliegende Arbeit anfertigen konnte. Allen Mitarbeitern der Firma gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, die vielseitige tatkräftige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders Frau Dr. Karen Zoufal sein herzlichst gedankt für ihre engagierte Unterstützung in so vieler Hinsicht sowie ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt Frau Dr. Jana Zimmermann, welche den wesentlichen Anteil bei der Herstellung der verwendeten anti-*Eimeria*-„Phage Display“-Bank trug, Frau Dipl.-Troph. Doreen Jahn für die Bereitstellung des monoklonalen Antikörpers sowie Prof. Dr. Rolf Entzeroth von der TU Dresden für die Überlassung der entsprechenden Zelllinie.

In Dr. Gudrun Mönke fand ich ein hilfreiche Diskussionspartnerin zu Fragen hinsichtlich des Biacore - vielen Dank dafür.

Dr. Andreas Houben danke ich für seine kompetente und freundliche Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie.

Bei Dr. Jörg Fuchs bedanke ich mich vor allem für seine engagierte Unterstützung bei den durchflußzytometrischen Messungen sowie der Fluoreszenzmikroskopie.

Prof. Dr. Werner Roos danke ich sehr für seine hilfreichen Anregungen zu den Themen Kalziumsignaltransduktion und Viabilitätstests. Ihm und Dr. Katrin Viehweger gilt mein Dank für die freundliche theoretische und praktische Unterstützung bei der Calcium-Green-Färbung.

Dr. Fiona Tomley vom IAH Compton danke ich für das von ihr zur Verfügung gestellte Kaninchenserum gegen natives Etmic2.

Den fleißigen Manuskriptlesern Doreen, Dorit und Mandy danke ich sehr herzlich für ihre Einsatzbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der Promotionszeit bedanken.