

**Klonierung und Charakterisierung
einer Adenylatcyclase
aus *Plasmodium falciparum***

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Jost Holger Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2. 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. E. Schultz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Ruth

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Januar 1999 und Juni 2002 am Pharmazeutischen Institut der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas, die exzellenten Arbeitsbedingungen in seinem Labor, eine stets offene Bürotür und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. P. Ruth danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn PD Dr. J. U. Linder danke ich für kompetenten Rat, die zahlreichen wissenschaftlichen Anstöße und viele angeregte Diskussionen.

Herrn PD Dr. J. Kun vom Institut für Tropenmedizin danke ich für die Versorgung mit *P.falciparum*-Parasitenmaterial und die Immunfluoreszenzaufnahmen mit den Parasiten.

Herrn Prof. H. Plattner und Frau Dr. D. Geissinger von der Universität Konstanz danke ich für die heterologe Expression der GFP-markierten Plasmodium AC in Paramecien.

Herrn Dr. I. Skovorodkin von der Russischen Akademie der Wissenschaften, St.Petersburg, Gast im AK von Prof. D. Ammermann (Zoologie, Universität Tübingen) danke ich ebenso für solche Expressionsversuche.

Herrn Prof. B. Fakler und Herrn Dr. N. Kloecker vom Institut Berghof danke ich für die Durchführung der Immunfluoreszenzversuche in CHO-Zellen und die versuchten Strommessungen an Oozyten.

Herrn Dr. Heinz Schwarz vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen danke ich für die elektronenmikroskopische Untersuchung von *P.falciparum*-Parasiten mit immunogoldmarkierten Antikörpern.

Bei Frau A. Schultz bedanke ich mich für die Hilfe bei der Klonierung der N- und C-terminal GFP-markierten Plasmodium AC-Konstrukte zur Expression in CHO-Zellen.

Den Technischen Assistentinnen I. Mayer, G. Kleefeld und U. Kurz danke ich für die vielen großen und kleinen Handreichungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen meinen Kollegen gilt Dank für die Geduld, die sie mit mir hatten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für Unterstützung aller Art.

Inhaltsverzeichnis:

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	SEKUNDÄRE BOTENSTOFFE UND ADENYLATCYCLASEN	1
1.2	ZYKLISCHE NUKLEOTIDE IN PLASMODIUM	2
1.3	AUFGABENSTELLUNG	4
2	<u>MATERIAL</u>	5
2.1	ENZYME, KITS UND CHEMIKALIEN	5
2.2	GERÄTE UND MATERIALIEN	7
2.3	OLIGONUKLEOTIDE	9
2.3.1	SEQUENZIERPRIMER	9
2.3.2	PRIMER TETRAHYMENA AC	10
2.3.3	PRIMER ZUR BESTIMMUNG DER GENOMISCHEN UND DER cDNA-SEQUENZ DER PLASMODIUM AC	11
2.3.4	PRIMER ZUM ZUSAMMENBAU DES PLASMODIUM AC-GENS	14
2.3.5	RESYNTHESEPRIMER	15
2.3.6	SONSTIGE PRIMER	19
2.4	PLASMIDE	20
2.5	PUFFER UND LÖSUNGEN	22
2.5.1	MOLEKULARBIOLOGIE	22
2.5.1.1	Lösungen zum Auftrennen, Reinigen und Lagern von DNA	22
2.5.1.2	Lösungen zur Modifikation und Transfektion von DNA	22
2.5.1.3	Puffer für PCR und Sequenzierung	22
2.5.1.4	Lösungen für Genbankscreens	22
2.5.1.5	Medien für E.coli	23
2.5.2	PROTEINCHEMIE	24
2.5.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.5.2.2	Westernblotting	24
2.5.2.3	Immundetektion	25
2.5.2.4	Puffer zur nativen Ni^{2+} -NTA-Reinigung	25
2.5.3	LÖSUNGEN ZUM TEST VON ADENYLAT- UND GUANYLATCYCLASEAKTIVITÄT	25
2.5.4	SF9-ZELLKULTURMEDIEN	26
2.5.5	PUFFER ZUM WASCHEN VON ZELLEN	26
3	<u>METHODEN</u>	27
3.1	GENTECHNOLOGISCHE METHODEN	27
3.1.1	PLASMIDISOLIERUNG AUS E.COLI	27
3.1.2	AUFTRENNEN UND DETEKTION VON DNA MIT AGAROSEGELEN	27
3.1.3	ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN	27

3.1.4	ISOLIERUNG, REINIGUNG UND KONZENTRIERUNG VON DNA AUS WÄSSRIGER LÖSUNG	27
3.1.4.1	Entsalzung zum Umpuffern (<i>NucleoTrap</i> -Kit)	27
3.1.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
3.1.4.3	Ethanol-fällung	28
3.1.5	KONZENTRATIONSABSCHÄTZUNG VON DNA	28
3.1.6	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA-MOLEKÜLEN	28
3.1.7	GLÄTTEN VON DNA-ÜBERHÄNGEN	28
3.1.8	5'-PHOSPHORYLIERUNG VON PCR-PRODUKTEN	29
3.1.9	5'-DEPHOSPHORYLIERUNG VON PLASMIDVEKTOREN	29
3.1.10	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	29
3.1.11	mRNA-ISOLIERUNG, REVERSE TRANSKRIPTION UND RT-PCR	29
3.1.12	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) ZUR VERVIELFÄLTIGUNG VON DNA	30
3.1.12.1	PCR mit dem <i>Air Thermo-Cycler</i>	31
3.1.12.2	Heizblock-PCR	32
3.1.12.2.1	Reverse Transkription mit anschließender PCR	32
3.1.12.2.2	PCR-Suche mit <i>gewobbelten</i> Primern in sscDNA von <i>T.pyriformis</i>	33
3.1.12.2.3	DNA-Amplifikation aus Phagenbanken	33
3.1.12.2.4	PCR zur Resynthese des Plasmodium AC-Leserahmens	34
3.1.12.2.5	PCR am Bacmid und an genomischer DNA von transgenen Paramecien	34
3.1.13	PCR ZUR DNA-SEQUENZIERUNG	35
3.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	36
3.2.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER E.COLI-BAKTERIEN	36
3.2.2	TRANSFORMATION VON E.COLI	36
3.2.3	E.COLI-DAUERKULTUREN	36
3.2.4	BLAU-WEIß- <i>SCREEN</i>	36
3.2.5	PROTEINEXPRESSION IN E.COLI-ZELLEN	36
3.3	<i>SCREENING</i> VON GENBANKEN	37
3.3.1	HERSTELLUNG KONDITIONIERTER E.COLI ZUR INFEKTION MIT λ -PHAGEN	37
3.3.2	HERSTELLUNG VON PHAGENPLATTEN	37
3.3.3	TITERN VON PHAGENBANKEN UND PHAGENSUSPENSIONEN	37
3.3.4	AMPLIFIKATION VON PHAGENBANKEN (SUBFRAKTIONIERUNG)	37
3.3.5	GENBANKDURCHMUSTERUNG	38
3.3.5.1	Identifikation positiver Fraktionen mittels PCR	38
3.3.5.2	Genbankdurchmusterung mit einer radioaktiven Sonde	38
3.3.5.2.1	Herstellung der radioaktiven Sonde	38
3.3.5.2.2	Anreicherung von gesuchten Phagen (<i>Grobscreen</i>)	39
3.3.5.2.3	Isolierung von Einzelklonen (<i>Feinscreen</i>)	39
3.3.5.3	<i>In vivo excision</i>	40
3.4	<i>SF9</i>-INSEKTENZELLKULTUR	40
3.4.1	ANLEGEN VON KULTUREN AUS GEFRORENEN ZELLEN	40
3.4.2	PASSAGIEREN DER ZELLEN	40
3.4.2.1	Monolayerkulturen	40
3.4.2.2	Suspensionskulturen	41

3.4.3	HERSTELLUNG REKOMBINANTER BACULOVIREN	41
3.4.3.1	In vivo-Transposition in <i>E.coli DH 10 Bac</i> -Zellen	41
3.4.3.2	Bacmidisolierung	42
3.4.3.3	Lipobacmidtransfektion von <i>Sf9</i> -Zellen (Herstellung von Primärviren)	42
3.4.4	INFEKTION VON <i>Sf9</i> -ZELLEN MIT BACULOVIREN	42
3.4.4.1	Herstellung von Sekundärviren	42
3.4.4.2	Infektion von Zellen zur Gewinnung von exprimiertem Protein	43
3.4.5	BESTIMMUNG DER VIRUSINFEKTIOSITÄT DURCH VERDÜNNUNGSREIHEN	43
3.4.6	HERSTELLUNG VON <i>Sf9</i> -ZELLHOMOGENATEN	43
3.4.7	MEMBRANPRÄPARATIONEN AUS <i>Sf9</i> -ZELLEN	44
3.4.8	Ni^{2+} -NTA-AFFINITÄTSREINIGUNG	44
3.5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	45
3.5.1	BIO-RAD-PROTEINBESTIMMUNG	45
3.5.2	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	45
3.5.3	ABSCHÄTZEN DER PROTEINMENGE MIT HILFE VON SDS-PAGE-GELN	46
3.5.4	WESTERNBLOT	46
3.5.4.1	Elektroblot	46
3.5.4.2	Immunodetektion	46
3.5.4.3	Verwendete Antikörper und Präimmunsereen, sowie deren Verdünnungen (in <i>M-TBS</i>)	47
3.5.4.3.1	Detektion von <i>HexaHis-Tags</i>	47
3.5.4.3.2	Detektion des C-terminus der Plasmodium AC auf PAGE-Gelen	47
3.5.4.4	<i>Preblock</i> tests der <i>AK 4020g</i> und <i>AK 4021g</i> sowie der Präimmunsereen	47
3.6	HERSTELLUNG EINES C-TERMINAL BINDENDEN PLASMODIUM AC-PEPTIDANTIKÖRPERS	47
3.7	IMMUNMARKIERUNG VON P.FALCIPARUM-KULTURAUSTRICHEN	48
3.7.1	FIXIERUNG DER AUSSTRICHE	48
3.7.1.1	Methanolfixierung	48
3.7.1.2	Acetonfixierung	48
3.7.2	IMMUNMARKIERUNG	48
3.8	IMMUNOGOLDMARKIERUNG VON P.FALCIPARUM-KULTUREN ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPIE	49
3.9	AUFARBEITUNG VON TRANSGENEN PARAMECIEN ZUR PCR-KONTROLLE	49
3.10	ENZYMTESTS	50
3.10.1	ADENYLATCYCLASETEST	50
3.10.1.1	AC-Test zur Bestimmung des pH-Optimums	50
3.10.2	GUANYLATCYCLASETEST	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	HOMOLOGIEKLONIERUNG DER TETRAHYMENA AC	52
4.1.1	PCR-SUCHE MIT <i>GEWOBBELTEN</i> PRIMERN	52
4.1.2	<i>SCREENING</i> DER cDNA-TETRAHYMENAGENBANK <i>GB3</i>	53
4.1.2.1	PCR-Suche mit spezifischen Primern	53
4.1.2.2	Suche mit radioaktiv markierter Sonde in <i>GB3 Fr.11/Subfr.15</i>	53

4.1.3	BESTIMMUNG DES FEHLENDEN 5'-ENDES	54
4.1.3.1	Suche nach einem genomischen Klon in der Genbank <i>GB2</i> (Fraktionen 1-11)	54
4.1.3.2	Bestimmung des Leserahmens mit PCRn aus <i>sscDNA</i>	55
4.1.4	cDNA-SEQUENZ DER TETRAHYMENA AC	56
4.1.5	INTRONS DER TETRAHYMENA AC	59
4.1.6	TETRAHYMENA AC-ISOFORMEN	60
4.2	PARAMECIUM AC-ISOFORMEN	60
4.3	PLASMODIUM AC	61
4.3.1	KONTROLLE DER GENOMISCHEN SEQUENZ	61
4.3.2	BESTIMMUNG DER cDNA-SEQUENZ	66
4.3.2.1	„Fehlspleißing“	68
4.3.2.2	Das „Intron -1“	69
4.3.2.3	cDNA-Sequenz der Plasmodium AC	70
4.3.2.4	Introns der Plasmodium AC	72
4.3.3	KONSTRUKTION DES PLASMODIUM AC-GENS	74
4.3.3.1	Expression des katalytischen Bereichs in <i>E.coli</i>	74
4.3.4	RESYNTHESE DER ADENYLATCYCLASE IN MAMMALIACODONUSAGE	75
4.3.4.1	Konstruktbeginn ab Methionin 1 in zwei <i>Kozak</i> sequenzvarianten (MPEP I/II)	77
4.3.4.2	Konstruktbeginn ab Methionin 55 in zwei <i>Kozak</i> sequenzvarianten (MLKYK a/b)	78
4.3.4.3	Synthesepplan	78
4.4	PLASMODIUM AC-KONSTRUKTE (EXPRIMIERT IN <i>Sf9</i>-ZELLEN)	82
4.4.1	CHARAKTERISIERUNG DES KATALYTISCHEN BEREICHS	82
4.4.1.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität des Leervirus	83
4.4.1.2	Bestimmung der optimalen Virusmenge	83
4.4.1.3	Optimierung der Expressionszeit	84
4.4.1.4	Affinitätsreinigung und Westernblot	85
4.4.1.5	Bestimmung der Temperatur und des pH-Optimums	85
4.4.1.6	Test auf Guanylatcyclaseaktivität	86
4.4.1.7	Test auf Forskolinstimulierbarkeit und Einfluß von Mn^{2+} und Mg^{2+} als Cofaktoren	86
4.4.1.8	Bestimmung der kinetischen Parameter V_{max} und K_m	87
4.4.1.9	Proteinabhängigkeit	88
4.4.2	N-TERMINAL VERLÄNGERTE KONSTRUKTE	89
4.4.3	C-TERMINAL VERKÜRZTE KONSTRUKTE	90
4.4.4	EXPRESSION DES HOLOENZYMS AB METHIONIN 1	91
4.4.4.1	Westernblot der Konstrukte ab Methionin 1, sowie der C-terminal verkürzten Konstrukte	92
4.4.5	EXPRESSION DES HOLOENZYMS AB METHIONIN 55	92
4.5	PEPTIDANTIKÖRPERPRODUKTION	93
4.5.1	WESTERNBLOTS MIT IN <i>Sf9</i> -ZELLEN EXPRIMIERTEN PROTEINEN	93
4.5.2	WESTERNBLOTS MIT <i>P.FALCIPARUM</i> -INFIZIERTEN BLUTZELLHOMOGENATEN	95
4.5.2.1	AK 4021g (u. Präimmunserum)	95
4.5.2.2	AK 4020g	96
4.5.3	FLUORESZENZIMMUNMARKIERUNG VON <i>P.FALCIPARUM</i> -PARASITEN	97
4.5.4	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	98

4.6	EXPRESSION DER PLASMODIUM AC IN PARAMECIUM	98
4.6.1	AUFBAU DES C-TERMINAL GFP-GEKOPPELTEN AC-GENS	98
4.6.2	INJEKTION IN PARAMECIUM CAUDATUM	99
4.7	EXPRESSION VON GFP-MARKIERTEN	
	PLASMODIUM AC-KONSTRUKTEN IN CHO-ZELLEN	100
4.7.1	KONSTRUKTE MIT N-TERMINAL GEKOPPELTEM GFP	101
4.7.2	KONSTRUKTE MIT C-TERMINAL GEKOPPELTEM GFP	102
4.7.3	FLUORESZENZMESSUNGEN IN CHO-ZELLEN	103
4.8	EXPRESSION DER PLASMODIUM AC IN OOZYTEN	103
4.9	ALIGNMENT VON PLASMODIUM AC-ISOENZYMEN	104
4.9.1	VOLLSTÄNDIGE ISOENZYMSEQUENZEN	104
4.9.1.1	<i>P.knowlesi</i>	104
4.9.1.2	<i>P.yoelii yoelii</i>	105
4.9.2	TEILSEQUENZEN VON ISOENZYMEN	105
4.9.2.1	<i>P.chabaudi</i>	105
4.9.2.2	<i>P.berghei</i>	106
4.9.2.3	<i>Cryptosporidium parvum</i>	107
4.9.2.4	<i>Toxoplasma gondii</i>	109
4.9.3	SEQUENZALIGNMENT	110
5	DISKUSSION	115
5.1	ANALYSE DES IONENKANALS UND DER KATALYTISCHEN DOMÄNE	115
5.1.1	DER K _v -KANALÄHNLICHE BEREICH	116
5.1.1.1	Der N-Terminus	116
5.1.1.2	Die transmembranspannenden Domänen	116
5.1.1.2.1	Transmembranspannen 1-3 (TM1-3)	117
5.1.1.2.2	Transmembranspanne 4, Spannungssensor (TM4)	118
5.1.1.2.3	Der Prä-TM5-Bereich, sowie die Transmembranspannen 5 und 6 (TM5, TM6)	120
5.1.1.3	Der <i>Poreloop</i>	122
5.1.1.4	Die Schleifen (extra- und intrazellulär)	123
5.1.1.5	Der Linker	124
5.1.1.6	Zusammenfassung (5.1.1.1-5.1.1.5)	124
5.1.2	DER AC-BEREICH	125
5.1.2.1	Die katalytische Domäne	125
5.1.2.2	Das TPRL-Motiv	127
5.1.2.3	Der C-Terminus	130
5.2	TOPOGIEVORSCHLAG	131
5.3	EINE MÖGLICHE FUNKTION DES ENZYMS?	132
6	ZUSAMMENFASSUNG	133

7	ANHANG	134
7.1	DATENBANKSUCHEN ZUR VERIFIZIERUNG DER PROTEINSEQUENZEN DER PLASMODIUM AC UND DER TETRAHYMENA AC	134
7.1.1	<i>TOPPRED2</i> -SUCHE NACH TRANSMEMBRANSPANNEN	134
7.1.1.1	Tetrahymena AC	134
7.1.1.2	Plasmodium AC	135
7.1.2	PROTEIN-PROTEIN- <i>BLAST</i> (NCBI)	136
7.1.2.1	Tetrahymena AC	136
7.1.2.2	Plasmodium AC	139
7.1.3	SUCHE IN SEQUENZMOTIV-DATENBANKEN (<i>EXPASY-PROSITE MOTIF SCAN</i>)	142
7.1.3.1	Plasmodium AC	142
7.1.3.2	AC-Isoformen der Spezies Plasmodium	143
7.1.3.2.1	<i>P.yoelii yoelii</i> AC	143
7.1.3.2.2	<i>P.knowlesi</i> AC	143
7.1.3.3	Tetrahymena AC	143
7.1.4	SUCHE IN PLASMODIENSPEZIFISCHEN DATENBANKEN (<i>PLASMODB-SUCHE</i>)	144
7.2	EIN WEITERES ISOENZYM AUS PLASMODIUM VIVAX	145
8	LITERATUR	146

Abkürzungen:

AC(n)	Adenylatcyclase(n)
ACC	Zugriffsnummer
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS(n)	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar(e)
CDD	Conserved Domain Database
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen
cpm	Zerfälle pro Minute
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GC(n)	Guanylatcyclase(n)
GFP	Green Fluorescent Protein
IPTG	Isopropylthiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Lennox L-Medium
LF	Luftfeuchte
MCS	Multiple Cloning Site
MOI	Multiplicity of Infection
Ni ²⁺ -NTA	Nickelnitrilotriessigsäure
NZY (-Medium)	NZ-amine (enzymatisch hydrolysiertes Casein) und Hefeextrakt (yeast extract) enthaltendes Medium
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR(n)	Polymerasekettenreaktion(en)
pfu	Plaque Forming Unit
PBG	phosphatgepufferte BSA-Gelatine

POD	Meerrettichperoxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBC	humane rote Blutzellen
S	Transmembransegment
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf9</i> -Zellen	Ovarzelllinie des Schmetterlings <i>Spodoptera frugiperda</i>
SOB	Natriumchloridhaltiges Bacto Trypton-/ Hefeextraktmedium
SOC	glucosehaltiges SOB-medium für kompetente Zellen (competent cells)
sscDNA	einzelsträngige komplementäre DNA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranbereich
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TPR(L)	Tetratricopeptidrepeat (-like-Domäne)
Tris	Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Genabschnitt
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β - D-Galaktopyranosid

Der Ausdruck Plasmodium AC bezeichnet die bearbeitete Adenylatcyclase aus *P.falciparum*; analog wurden die Begriffe Paramecium AC, Tetrahymena AC, etc. für die Isoenzyme anderer Organismen verwendet. Anabaena AC steht für die CyaB1-Adenylatcyclase aus *Anabaena* sp. PCC7120, Stigmatella AC für die CyaB-Adenylatcyclase aus *Stigmatella aurantiaca*.

1 Einleitung

1.1 Sekundäre Botenstoffe und Adenylatcyclasen

Zellen müssen auf ihre Umwelt reagieren und sind darauf geeicht, extrazelluläre Signale überlebensentscheidender Bedeutung zu integrieren, um dann mit einer spezifischen Reaktion zu antworten. Sehr unterschiedliche Reize werden dabei über ähnliche Integrationswege weitergeleitet, egal ob es sich dabei um die Gewebe von Vielzellern oder um einzellige Organismen handelt. Die Reize können sowohl chemischer [z.B. Hormone (98)], als auch physikalischer Natur [z.B. Licht, Kälte (39, 76)] sein. Nach der rezeptorvermittelten Stimulation der Zelle finden, der eigentlichen Zellantwort vorrausgehend, intrazelluläre Konzentrationsänderungen sogenannter sekundärer Botenstoffe statt (6, 78). Diese Botenstoffe modulieren die Aktivität von Biomolekülen und führen damit zur Zellantwort (3, 45).

Bedeutsame sekundäre Botenstoffe sind unter anderem zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP). Sie werden aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) bzw. Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch die katalytische Aktivität von Guanylat- und Adenylatcyclasen gebildet. Dabei entsteht Pyrophosphat, welches durch Pyrophosphatasen gespalten wird. So wird die Reaktion vollständig auf die Seite der zyklischen Nukleotide gedrängt.

Adenylatcyclasen lassen sich in mindestens vier Klassen einteilen, die sich auf Aminosäureebene nicht besonders ähnlich sehen (5, 93). Klasse I wird in gramnegativen fakultativ anaerob lebenden Bakterien gefunden. Die Enzyme sind membranassoziiert. Klasse II beinhaltet die calmodulinaktivierten toxischen bakteriellen Cyclasen aus *Bordetella pertussis* und *Bacillus anthracis*, welche sezerniert werden.

Weitaus am umfangreichsten ist die Klasse III, in der die neun Säugercyclasen mit jeweils zweimal sechs transmembranspannenden Domänen und zwei katalytischen Teilbereichen zu finden sind (97). Auch eine Vielzahl von Enzymen protozoischer und prokaryotischer Herkunft befinden sich darunter [z.B. aus *Dictyostelium discoideum*, *Nostoc* sp. und *Mycobakterium tuberculosis* (43, 68, 81)]. Alle Proteine zeigen deutliche Sequenzähnlichkeiten innerhalb der für die Katalyse verantwortlichen Bereiche. Klasse III-ACn sind den Guanylatcyclasen ähnlich. Dies geht soweit, daß sich durch Mutagenese die Substratspezifitäten der einzelnen Enzyme ineinander umwandeln lassen (96).

In der Klasse IV befindet sich bis jetzt nur ein einzelnes Enzym aus *Aeromonas hydrophila*.

[Ein weiteres Enzym, welches keiner der vier genannten Klassen angehört, ist für den Anaerobier *Prevotella ruminicola* beschrieben worden¹. Bei der ebenfalls einer neuen Klasse zugeordneten *cyaC* aus *Rhizobium etli*² scheint es sich dagegen um eine modifizierte Klasse III-AC zu handeln (58).]

1.2 Zyklische Nukleotide in Plasmodium

Die Spezies *Plasmodium* mit den vier für Menschen infektiösen Erregern *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* und *P.falciparum* ist die Ursache der Malaria, einer Erkrankung, die nach der Tuberkulose die meisten Toten pro Jahr fordert (WHO, Fact Sheet No. 94). Jährlich sind etwa 300 Millionen Menschen akut betroffen, wobei mehr als eine Million, meistens Kinder, der Erkrankung zum Opfer fallen. *P.falciparum* ist derjenige dieser Erreger mit der höchsten Mortalitätsrate.

Die Parasiten durchlaufen einen komplexen Entwicklungszyklus, bei dem der Mensch und über sechzig verschiedene Anophelesmückenarten als Wirte dienen. Der Erreger wechselt bei den Blutmahlzeiten der Mücken zwischen diesen und seinem zweiten Wirt hin und her, wobei unterschiedliche infektiöse Stadien ausgetauscht werden. Die Mücke nimmt die in geringer Zahl im Blut des Infizierten zirkulierenden männlichen und weiblichen Gametozyten auf. Diese verschmelzen im Fliegendarm zu Zygoten, die in Ookineten differenzieren, welche die Mitteldarmwand durchdringen und auf der dem Darmlumen abgewandten Seite zu Oozysten heranreifen. Letztere bringen die für Fliegenspeicheldrüsen invasiven Sporoziten hervor, welche beim nächsten Stich auf den Menschen übertragen werden (92).

¹ Cotta M.A., Whitehead T.R., Wheeler M.B.: *Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, Prevotella ruminicola D31d*. FEMS Microbiol. Lett. (1998) **164**: 257-260

² Tellez-Sosa J., Soberon N., Vega-Segura A., Torres-Marquez M.E., Cevallos M.A.: *The Rhizobium etli cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class*. J. Bacteriol. (2002) **184**:3560-3568

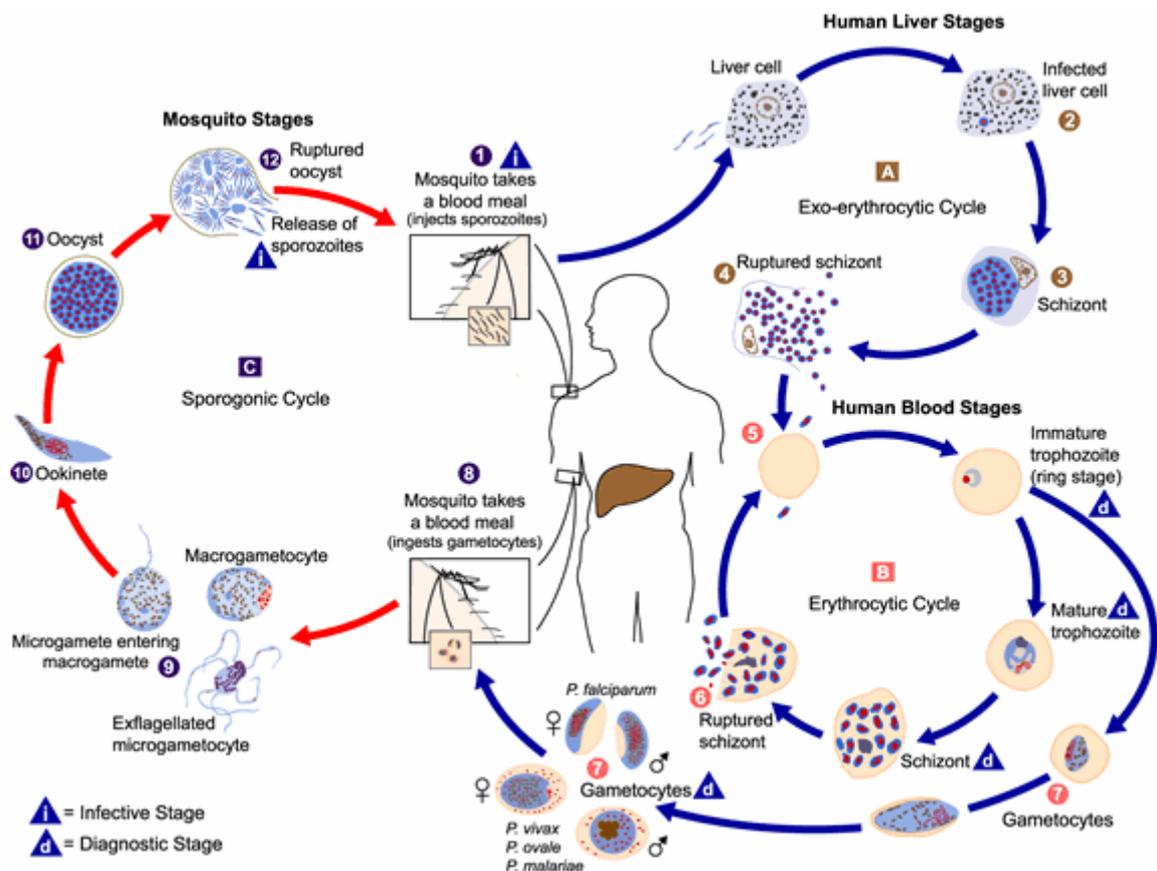


Abb 1: Der Entwicklungszyklus des Malariaerregers in seinen beiden Wirten: (1): Injektion von Sporozoit bei Blutsaugen einer Anophelesmücke und Invasion einer Leberzelle; **A**: *exoerythrozytärer Zyklus* (Leber): (2), (3): Heranreife von Schizonten in Leberzellen; (4): Aufplatzen eines Schizonten und Freisetzung von Merozoiten in das Blut; **B**: *erythrozytärer Zyklus*: (5): Infektion von Erythrozyten mit Merozoiten; (6): Freisetzung von Merozoiten nach der Differenzierung eines aus (5) hervorgegangenen Trophozoitenringstadiums zu einem Schizonten; (7): Bildung von geschlechtsreifen männlichen und weiblichen Gametozyten aus einem Ringstadium; (8): Aufnahme von Gametozyten durch eine Anophelesmücke bei einer Blutmahlzeit; **C**: *sporogonischer Zyklus*: (9): Bildung einer Zygote nach Verschmelzung der zu Gameten differenzierten Gametozyten; (10): Differenzierung in motile Ookineten; (11): Entwicklung von Oozysten; (12): Wachstum und Aufplatzen von Oozysten mit anschließender Freisetzung von Sporozoit, welche bei der nächsten Blutmahlzeit (1) in den Blutstrom abgegeben werden [Abbildung von der Parasite Image Library (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>)]

Mit diesem Zyklus ist eine Vielzahl morphologischer Veränderungen der Erreger verbunden. Lange Zeit wurde über die Rolle von zyklischen Nukleotiden im Entwicklungsprozess der Parasiten diskutiert:

Für cGMP wurde angenommen, daß es bei der Differenzierung männlicher Gametozyten in Mikrogameten (Flagellen) eine Rolle spielt. Die Experimente beschränkten sich jedoch auf den indirekten Nachweis durch den Zusatz von Phosphodiesteraseinhibitoren (Erhöhung des cGMP-Spiegels durch Blockierung des cGMP-Abbaus) zu Gametozytenkulturen unterschiedlicher Plasmodienspezies, welche dann differenzierten (46, 66). Der Nachweis einer Guanylatcyclase in *P.falciparum* war bis dahin nicht gelungen. Diese wurde erstmals 1999 im

Plasmodiumgenomprojekt entdeckt (59). Ein funktioneller Nachweis und die Immunodetektion in den Gametozyten schloß sich an (7).

Die molekulare Identifizierung einer Adenylatcyclase aus *P.falciparum* stand noch aus. Bekannt war nur, daß sich die Adenylatcyclaseaktivität in Plasmodien deutlich von der der roten Blutzellen unterscheidet (32, 79, 80). Weiterhin wurde widersprüchlich über den Einfluß von cAMP auf die Gametozytogenese, also auf den Übergang von Merozoiten in die geschlechtsreifen Formen berichtet (37, 44).

1.3 Aufgabenstellung

Grundlage für diese Arbeit war die Klonierung einer Adenylatcyclase mit einem daran gekoppelten Ionenkanal aus *Paramecium tetraurelia*. Es wurde schon länger spekuliert, ob membranverankerte Adenylatcyclasen des Mammaliatyps möglicherweise kanal- oder transporterartige Strukturen ausbilden können (52). Gezeigt werden konnte es bisher nicht. Anfang der 90er Jahre war es Dr. S. Klumpp gelungen, aus Cilien von Pantoffeltieren ein membranständiges Protein zu isolieren, das neben der Fähigkeit cAMP zu produzieren auch eine intrinsische Ionenleitfähigkeit besaß (88). Da die reinigbare Proteinmenge zu gering war, um mittels eines *Edman*abbaus Sequenzdaten zu erhalten, blieb die Aminosäuresequenz unbekannt. Dr. K. Hambach gelang es, ein Gen mit einer Ionenkanal- und einer Adenylatcyclasedomäne zu klonieren (25). Der funktionelle Nachweis der enzymatischen Aktivität gestaltete sich jedoch schwierig und die Tatsache, daß es auch noch unterschiedliche Isoformen des Enzyms in *Paramecien* gibt, läßt nicht ausschließen, daß Heterodimere die eigentlich aktive Spezies bilden. Somit wurde nach Alternativen gesucht. Dr. J. Linder fand im Genomprojekt von *P.falciparum* Sequenzbruchstücke, die dem gefunden *Paramecium*gen hochähnlich waren und alles wies darauf hin, daß es hier keine zweite Genkopie gibt, das Enzym daher ein Homodimer sein sollte.

2 Material

2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien

AGS, Heidelberg: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern

Ambion (USA): *Single Strand Binding Protein* (T4 Gene 32 Protein)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: *ECL Plus Western Blot Detection System*, *Rainbow* Proteinstandards, *Hyperfilm ECL*, *Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP*, *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*, *OnePhorAll*-Puffer für Restriktionsendonukleasen, G418 (Sulfat), 25mM MgCl₂-Puffer for PCR (USB), *QuickPrep Micro mRNA Purification Kit*

AppliChem, Darmstadt: Acrylamid 4K-Lösung 30%

Appligene Oncor, Heidelberg: *Taq*-DNA-Polymerase mit 10x Reaktionspuffer

BIO-RAD, München: *BIO-RAD PROTEIN ASSAY*-Reagenz, Coomassie Brilliant-Blue G-250

BioGenes, Berlin: Herstellung und Reinigung des Peptidantikörpers gegen den C-Terminus der Plasmodium AC durch Immunisierung zweier Kaninchen (*AK 4020g* und *AK 4021g*)

Biosyntan, Berlin: Synthese des C-terminalen Plasmodium AC-Peptids, sowie dessen Reinigung zur Immunisierung

Biozym Diagnostik, Hess.-Oldendorf: *Sequagel™ XR*, *Sequagel™ Complete* Buffer Reagent, *Chill-Out 14 Liquid Wax* von MJ Research

Canberra PACKARD, Taunusstein: *Ultima Gold XR* Szintillator

Clontech, de Schelp (Niederlande): Expressionsplasmid *pEGFP-C1/-C2*

Dianova, Hamburg: Sekundärer Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Fc-Antikörper konjugiert mit Meerrettichperoxidase, sekundärer Ziege-anti-Maus-IgG-Fc-Antikörper konjugiert mit Meerrettichperoxidase

Difco Laboratories, Detroit (USA): Agar, Casamino Acids, Bacto Trypton, Bacto Yeast Extract

EUROGENTEC, Seraing (Belgien): Oligonukleotide für Gensynthese

Fluka, Buchs (Schweiz): Natriumdodecylsulfat, Formamid

GIBCO BRL Life TECHNOLOGIES, Karlsruhe: Insektenzellkulturmedium *TC100*, *CellFECTIN*, Plasmid *pFastBac1*, *E.coli DH 10 Bac*-Bakterienzellen, Gentamycinlösung (50 mg/ml), NZ-Amine

Henkel ECOLAB, Düsseldorf: *Spitacid* Lösung

ICN, Eschwege: Radionukleotide: [α - 32 P]-ATP, [α - 32 P]-dCTP, [α - 32 P]-GTP, [2,8- 3 H]-cAMP, [8- 3 H]-cGMP; *7X PF* Reinigungsdetergenz, Ehtidiumbromidtabletten

Invitrogen, Groningen (Niederlande): *Sf9*-Insektenzellen

Labor AK Prof. Schultz: cDNA-Tetrahymenagenbank *GB3* (Frakt. 1-21) und genomische *Mfe I*-geschnittene Tetrahymenagenbank *GB2* (Frakt. 1-11); beide mit dem *Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP*-Kit von Stratagene erzeugt

Macherey-Nagel, Düren: *Nucleobond AX PC 20*, *NucleoTrap*

Melitta Haushaltsprodukte, Minden: *Toppits*-Frischhaltefolie

MERCK, Darmstadt: Aluminiumoxid *90 aktiv, neutral*, Ethanol, Methanol, Chloroform, 2-Mercaptoethanol, Isoamylalkohol, DMSO, Glycerol 87%, Essigsäure 100%, Dioxan, alle nicht aufgeführten Chemikalien in *p.a.* Qualität

MESSER-Griesheim: flüssiger und gasförmiger Stickstoff

MR4/American Type Culture Collection (USA): *MRA-61* Pf Dd2 cDNA-library (λ ZapII Phagenbank), *MRA-101* Pf 3D7 cDNA-library (Uni-ZAP XR Phagenbank) aus *P.falciparum* (mixed stage)

MWG-Biotech, Ebersberg: Oligonukleotide (PCR-Primer und fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer (5'-IRD 800-Markierung))

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, *T4-Polynukleotidkinase* mit 10x Reaktionspuffer, BSA für die Molekularbiologie (10 mg/ml)

Novagen, Darmstadt: *E.coli B121(DE3)[pRep4]*

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen: *E.Z.N.A. Gel Extraktion Kit*

Polysciences, Eppelheim: *Aqua-Poly/Mount*

Promega, Madison (USA): *Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit* (*Minipreps* und *Midipreps*)

QIAGEN, Hilden: Ni^{2+} -NTA Agarose, Ni^{2+} -NTA Magnetic Agarose Beads, monoklonaler Antikörper *anti-RGS(His)₄*

Roche Diagnostics, Mannheim: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, Alkalische Phosphatase, *Klenowpolymerase*, *Rapid DNA Ligation Kit*, dNTPs, Fötale Kälberserum (FCS), Kreatinkinase, Kreatinphosphat, ATP, *Titan One Tube RT-PCR System*, *mRNA Capture Kit*, RNase-Inhibitor

ROTH, Karlsruhe: Glycin, Brillant Blau R250, Ampicillin, Kanamycin

SIGMA, Deisenhofen: APS, Glycerol 99%, Tris, EDTA, X-Gal, IPTG, Dowex 50WX4-400, Ponceau S, Tween 20, Pluronic-F68 10% Lösung, TEMED, LB-Agar Fertigpulver, LB-Broth Fertigpulver, Phenol, Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Dithiothreitol, Kanamycin, Bromphenolblau, Xylencyanol, Thioglycerin, Calciumchlorid für die Zellkultur, DMSO, FITC-markierter *Anti Rabbit IgG (from goat)*

STRATAGENE, Heidelberg: Plasmid *pBluescript II SK(-)*, *E.coli XL1Blue MRF'*-Bakterienzellen, *E.coli SOLR*-Bakterienzellen, *ExAssistTM*-Helferphage, *ProteinaseK*

2.2 Geräte und Materialien

American National Can (USA): *PARAFILM M*

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: *Hybond-N* Nylonfilter (82 mm und 132 mm)

B.Braun, Melsungen: *OMNIFIX 40 SOLO* Insulinspritzen 1ml, *Sterican* Kanülen Gr.18, (26 G x 1'')

BECKMAN, München: Ultrazentrifuge *Optima L-60*, Rotor *Ti50.2*

BECTON DICKINSON (USA): *FALCON BLUE MAX* konische Polypropylenröhrchen [15 ml (Jr.), 50 ml], 10 ml *LUER-LOK*-Spritzen (steril)

BELCO GLASS, INC. (USA): *Culture Tube closure* (38 mm with fingers) für *Sf9*-Kolben

BENDER & HOBEIN AG, Ulm: *Vortex Genie2*

Biometra, Göttingen: *TRIO-Thermoblock* Thermocycler [für große (0,5 ml) und kleine (0,2 ml) PCR-Cups], *TRIO Heated Lid* beheizbare Deckel für *TRIO-Thermoblock*

BIO-RAD, München: Blotapparatur *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*

BRANSON, Danbury (USA): Ultraschallsonde *SONIFIER B-12*, Ultraschallbad *BRANSONIC 12*

Bühler, Edmund Laborgerätebau, Tübingen: Schüttler *KL 2*

DYNAL, Oslo (Norwegen): *DYNAL MPC-E-1*-Magnet

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifugen: *Zentrifuge 3200*, *Centrifuge 5410*, *Centrifuge 5414*, Kühlzentrifuge *Centrifuge 5402*; Thermoschüttler *5436*, *BioPhotometer*, *Pipette Varipette 4810* (0,2-10 µl), *Pipette Reference* (0,1-2,5 µl), *Multipette*

Feather (Japan): Skalpellklingen *Surgical Blades No.23 for No.4 Handle*, Griff für chirurgische Klinge *Surgical Blade Handle No.4*

GATC, Konstanz: *DNASTARTM Lasergene* Software

Gesellschaft für Labortechnik GFL, Burgwedel: Wasserbad *Typ GFL1083*

Gilson (Frankreich): Laborpipetten *pipetman* (bis jeweils 20, 200, 1000, 5000 µl)

Greiner labortechnik: *CELLSTAR* Gewebekulturschalen 35 mm, Gewebekulturflaschen 50 ml, Kulturröhrchen 10 ml

Heraeus SEPATECH, Osterode: *Megafuge 1.0R (BS 4402/A)*, *Varifuge 3.0*, *LaminAir HLB2448 GS*

HIRSCHMANN Laborgeräte, Eberstadt: *EM pipetus* Pipettierhilfe

HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, San Francisco (USA): Gelgießapparatur *Dual Gel Caster Mighty Small SE245*, Gellaufkammer *Mighty Small SE250/SE260*

- H.Saur Laborbedarf, Reutlingen:** Vakuumzentrifuge *Typ BA-VC-300H*
- Idaho Technology, Idaho Falls (USA):** *Air Thermo-Cycler*
- INFORS HT, Basel:** Induktionsgetriebene Schüttler *TR-1*
- Karl Hecht KG, Glaswarenfabrik, Sondheim:** *Assistent Neubauer-Zählkammer: 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm²*
- Kodak, New Haven (USA):** Röntgenfilm *BioMax MR*
- KONTRON-HERMLE, Gosheim:** *CENTRIKON H401 und ZK401, Rotoren A6.14 (SS34) und A8.24*
- KSG STERILISATOREN GMBH, Olching:** Hochdruckdampfsterilisator *KSG 40-2-1*
- Leitz, Wetzlar:** Mikroskop *LABOVERT TYPE 090-122.012*
- LTF Labortechnik, Wasserburg:** Videoprinter *Mitsubishi Video Copy Processor P91* mit *Sony CCD Video Camera Modul XC-ST500E*, Thermopapier *K65HM*, Software *BioCapt Version 99.01s*
- LKB WALLAC/BROMMA (Schweden):** *LIQUID SCINTILLATION COUNTER RACK-BETA 120, POWER SUPPLY 2197*
- Macherey-Nagel, Düren:** Blotmembran *porablot PVDF*
- Metrohm, Herisau (Schweiz):** pH-Meter *E 512*
- METTLER-TOLEDO GmbH, Giessen:** *InLab 423* pH-Elektrode
- MILLIPORE, Eschborn:** Reinwasseranlage *Milli-Q UF Plus*
- MWG, Ebersberg:** *LI-COR dna sequencer model 4000, BaseImagIR Version 4.0* Software, Hybridisierschrank *MINIOVEN MKII (HYBAID LIMITED)*, *HYBAID HB-OV-BL* Hybridisierungsglasröhren
- Panasonic, Osaka (Japan):** *CCTV Kamera WV-CD20/G, Video Cassette Recorder AG-7350*
- Promega, Madison (USA):** *Vac-Man* (Vakuuman schlüsse für Plasmidpräparationen); *Wizard* Minicolumns (zur Proteinreinigung mit Ni^{2+} -NTA-Agarose verwendet)
- Roche Diagnostics, Mannheim:** *Reflotron Applicator, Quick Spin Columns Sephadex G 50, fine*
- Roland Vetter, Ammerbuch:** Sterile Petrischalen 92 mm und 145 mm, Reaktionsgefäße nach Eppendorf mit 0,2, 0,5 und 1,5 ml Volumen, sterile Plastikpipetten mit 10 und 25 ml Volumen
- Sartorius, Göttingen:** Tischwaage *BP 2100 S*, Analysenwaage *handy*, Sterilfilter 0,2 µm
- Schleicher & Schuell, Dassel:** Whatmanpaper 3MM

SCHOTT Glaswerke, Mainz: *DURAN*-Kulturkolben in Erlenmeyerform mit geradem Hals (\varnothing 38 mm) für die *Sf9*-Kultur: 2000 ml (300-500 ml)³, 1000 ml (125-250 ml), 250 ml (50 ml), 100 ml (15-20 ml)

STRATAGENE, Heidelberg: UV-Ofen *Stratalinker 2400*

Techne, Princeton (USA): DRI-BLOCK DB-2D

Vetter Laborgeräte Wiesloch: *UV Kontaklampe CHROMA 43*

Werkstatt Pharmazie, Tübingen: Flachbettgelelektrophoresekammern

WOLF, Geislingen: Tischaufoklav *Sanoclav*

WTB binder, Ulm: Wärmeschränke (u.a. für Heißluftsterilisation)

ZEISS, Oberkochen: SPEKTRALPHOTOMETER *PM2 DL*

2.3 Oligonukleotide

Folgend werden die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Gelieferte Lyophilisate wurden zu 100 pmol/ μ l in *TE-Puffer* nach den Konzentrationsangaben des Herstellers aufgenommen. Diese Stammlösungen wurden 1:5 mit Wasser verdünnt und 25 pmol/50 μ l PCR-Ansatz eingesetzt.

2.3.1 Sequenzierprimer

Die Primer lagen gelöst vor. Pro Reaktionsansatz wurde 1 μ l (\equiv 2 pMol) verwendet.

Tab. 1: die Nukleotide sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert

Name	Richtung	Anlagerungs-temperatur	Position		Plasmid
T3-Primer	s	56°C	772-791	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	<i>pBluescript II SK(-)</i>
T7-Primer	as	56°C	626-645	TAA TAC GAC GCA CTA TAG GG	<i>pBluescript II SK(-)</i>
polyL	s	44°C	3952-3970	TTT ACT GTT TTC GTA ACA G	<i>pFastBac1</i>
polyR	as	44°C	4182-4200	CAA GTA AAA CCT CTA CAA A	<i>pFastBac1</i>

³ In Klammern die jeweiligen Kulturvolumina

Name	Richtung	Anlagerungs- temperatur	Position		Plasmid
U-pQE-IR	s	54°C	88-108	GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA	<i>pQE-30</i>
R-pQE-IR	as	54°C	212-233	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G	<i>pQE-30</i>

2.3.2 Primer Tetrahymena AC

Nachfolgend sind alle Primer zur Arbeit mit der Tetrahymena AC und deren Isoformen wiedergegeben.

Tab. 2: Primer zur Bestimmung der Tetrahymena AC-Sequenz: die Positionsangaben beziehen sich auf den unter 4.1.4 angeführten cDNA-Klon; kursiv: nicht bindende Primerüberhänge

Name	Richtung	Position	
tetcd-4s/n	s	-216 bis -199	GCA AAT ACG AGT GAG AGT
tetcd-3s/n	s	-37 bis -20	TAT ATT GTT GGT AGT TTG
tetcd-2s/n	s	3-20	GTC ATA AGA AAA GCT CAG
tetcd-1s/n	s	129-145	GTC ATA AGA TGA TTA AGT
tetcd1strue	s	145-155	TAA ATA GGG AGA AGA AGA
Tetcdas	as	576-593	ATT ATA ATT TCT ATT GCG
ACTet1s	s	1966-1983	TTG CAA GAA GAT GTT ATG
ACTet1as	as	2353-2370	ATT TGG ACT GAG ATA GGA
ACTet2s	s	596-613	GTA TGA TTG AAA AGA AGG
ACTet2as	as	921-938	TCT CCA GGA CCA GGA TGG

Tab. 3: diese Primer binden innerhalb von Intron 4 (vgl. 4.1.5); die Nummerierung bezieht sich auf dieses 349 bp lange Intron

tetcd1s	s	53-70	CAT GAT TAT AAA TTG GGA
tetcd2s	s	247-264	CAA ATG TTT TTT GAT TAT

**Tab. 4: gewobbelte Primer zur Amplifizierung der Tetrahymena AC und deren Isoformen:
Positionsangaben beziehen sich auf die in 4.1.4 angegebene Sequenz; die kodierten AS-
Sequenzen sind in eckigen Klammern angegeben**

Name	Richtung	Position	
CIIBAC1-s	s	1933-1949	GAT ATT AG (GA) (GA)A (TC) TT (TC) AC [DIR(N/D)FT]
CIIBAC1-as	as	2371-2387	CTA CT (AT) GC (GATC) A (CT) (AG) TT (G ATC) AC [VN(I/M/V)AS(R/S)]
tetACiso-s1	s	2047-2063	AAT AA (AG) AA (CT) AT (ACT) GG (AGCT) GA [NKNIGD]
tetACiso-as1	as	2341-2357	TAA GA (AGCT) GC (AG) TC (AGT) AT (CT) TT [KIDASY]

2.3.3 Primer zur Bestimmung der genomischen und der cDNA-Sequenz der Plasmodium AC

Mit diesen Primern wurde die im Genomprojekt annotierte Sequenz reproduziert und der offene Leserahmen der AC bestimmt.

Tab. 5: Primer, die außerhalb des annotierten cDNA-Klons lagen (4.3.2.3)

Name	Richtung	Position	
PIAC-s1/eI	s	-27 bis -10	CAC CCT TTT AAG TAT TCA
PIACc 9s	s	-371 bis -347	TGT AAT ACT TAA GAT GGA AAA AAA G
PIACc 9s/b	s	-320 bis -290	AAT AAA AAA TAT AAA ATA AAA ATG ATT ATC T
PIACs StartM	s	-230 bis -207	GGA AAA GGT ACT AAT CTT TAA TTA
PIACc8s	s	-85 bis -59	TCC ATT TGA TTA TAT ATT CTA TGA ACA
PIAC-s1	s	-60 bis -43	CAC GTA AAT GTA TAG AGA
PIAC 9s/c	s	-41 bis -18	TAA TAA AAT AAT TAA CAC CCT TTT A
PIACc-3'-as	as	2680-2705	AAC TCA ATC CTT TTA ATA GTA TCA AT

Name	Richtung	Position	
PIACc-3'-asII	as	2809-2837	AAC TCC CAT ATG TAA TTA TTT ATA TAT TT
PIAC-3'-asIII	as	3000-3024	CAA AAA ACT GTT CAG GAA AAG GCT T

Tab. 6: Primer, die innerhalb des offenen Leserahmens liegen (vgl. 4.3.2.3)

Name	Richtung	Position	
PIACc7s	s	1-26	ATG CCA GAA CCA AAA CAA ATA TAT GC
PIACc7s/b	s	124-148	ATA AAT GAA GAG AAG AGA AAA AGC A
PIACasStart-M Nest.	as	118-141	TCT CTT CTC TTC ATT TAT GAT GTC
PIACasStartM	as	140-166	ACA TGC ACA AGT TAT TTT TGC TTT TTC
PIACc7s/c	s	185-209	GTC TTA ATA TAC ATA CAA GCA AAT T
PIAC4u	s	211-228	TTC AAA TAC TCC AAA TGG
PIAC-as1	as	267-284	TTG TTT AAA AGA AGA TAG
PIAC-as1/eI	s	331-348	TAT TTC GAT AAG ACA TCC
PIACcas5	as	313-437	AAG ATA TCA AAG AAT AAC AGC ATG A
PIACcas4	as	491-515	TCT TTG TCA ATT TTT TTC CAT GTA T
PIACc6s	s	531-555	AAT ACA ATT ATT TAA GTC CTT GCG A
PIACc3as	as	554-579	TAC GAA GCG ATA TAT CTT AAT TAT TC
PIAC-s2	s	601-618	ACT AAG GAA AAA TAC AAG
PIACc5s	s	709-733	GCT CTT ATC AAA AGA TAT TTC ATG T
PIAC4r/s/eI	s	789-806	GGA GAG CAA AAG CCC TAT
PIAC3u	s	994-1011	ATT AAT TAT CTG CTA TGG
PIAC-s3	s	1050-1067	TGT TAC TCC TTC AAG TGC
PIAC4r	s	1071-1088	TCT TCT TCA ACA TTT TGG
PIACc4r/eI	as	1084-1101	GTC CAA AAT AAT TTC TTC
PIAC3r/s	s	1340-1357	CCA ATC CGA CCT TAG CTT
PIAC-as3	as	1359-1376	AAT TCT TCT TGC ATT TCC
PIACc4s	s	1443-1471	TTA TGA AAT TTT AAA AAT GGA AGA AAA CT

Name	Richtung	Position	
PIAC2u	s	1467-1484	AAA CTT AAT GAA ATT AGG
PIACcas2	as	1475-1502	CCT AAT AAC ATT AAT GTT CCT AAT TTC A
PIAC3r	as	1487-1504	AAC CTA ATA ACA TTA ATG
PIAC2ui-s	s	1542-1561	TAA CGA ACA GGA AAG AGT AA
PIAC2ui-as	as	1569-1592	GAA TAA ACG ATT TCT CCA TTG ATC
PIACc3s	s	1736-1761	GTG ATG CAT TTT TAT TAG TTT GGA AA
PIAC2r/s	s	1774-1791	GAA TAT TCG AAT AAG AAA
PIAC2u/as	as	1794-1811	GGA GAC TTA AAC ATA TTC
PIAC2u/as/eI	as	1854-1871	GCC AAA TCA CAT ATC CTG
PIAC1u/eI	s	1977-1994	GGA GTT AAG TTT TGG ACT
PIAC1u	s	1993-2010	CTT CAT TTT GGA TGG GCT
PIAC2r	as	2013-2030	CTT CCT ATT GCT CCT TCT
PIACc2s	s	2060-2084	CAG AAA ATG TAA ATA TAG CTA GTC G
PIACc1s	s	2179-2203	AAA ATT GAT AGG GTT ACT CTT AAA G
PIACcas1	as	2208-2234	AAA GTA TAT AAA TTT AAT GGG TTC CTA
PIAC1ar/s	s	2275-2292	GAA AAT TTT GAC GCC AAG
PIAC1u/as/eI	as	2286-2303	TCA AAA TGA GGC TTG GCG
PIAC1u/as	as	2294-2311	GTT TTA CGT CAA AAT GAG
PIAC1br/eI	as	2610-2627	CCA CAC CAA TCA CTG GGT
PIAC1br	as	2620-2637	TTT TCT ATA TCC ACA CCA
PIAC 1br/eI+1br	as	2610-2637	TTT TCT ATA TCC ACA CCA ATC ACT GG
PIAC1ar	as	2647-2664	AAA TAA TTT TTA TGA CTT

Tab. 7: Primer, die teilweise mit einem Intron überlappen; Positionsangaben beziehen sich auf 4.3.2.3; die Überhänge in die Introns sind kursiv gedruckt

Name	Richtung	Position	
PIAC1i-as	as	118-138	CTT CTC TTC ATT TAT GAT GTC CTA (Intron 1)
PIAC4u/as	as	620-636	CAT TCC ACT CAT TTC TGT (Intron 5)
PIAC2u/eI	s	1425-1435	CCT ATA GGA AAA GCA TTA (Intron 14)

Tab. 8: Primer, die innerhalb von Intronbereichen binden [Die Positionsangaben beziehen sich auf die Introns (vgl. 4.3.2.4)]

Name	Primer	Intron Nr. / Position	
PIAC1i-s	s	1 / 190-213	TTT TCT AAA TAA ATG TAA AAG CTC
PIAC4r/s	s	8 / 66-83	CAA TAT TCT TCA TTT CTA
PIAC-as2	as	8 / 110-125	ACT ACA AAA TCG GTT TAG (1. Base auf Exon)

2.3.4 Primer zum Zusammenbau des Plasmodium AC-Gens

Tab. 9: Die Positionsangaben beziehen sich auf 4.3.2.3; kursiv: nicht bindende Primerüberhänge; fett: Schnittstellen

Name	Richtung	Position	
NatExp-s	s	1540-1563	AAA GGA TCC TCA AAG AAC ATT AAC GAA CAG GAA AGA GTA AAT
NatExp-as	as	2632-2653	TTT GAG CTC TCA TGA CTT TTG TAA AAA TTT TCT
PINat5'-EcoRI;SpeI	s	1-21	AAA GAA TTC ACT AGT AAT ATA ATG CCA GAA CCA AAA CAA ATA
PINat3'-sSTOP+BglII	as	2632-2652	AAA AGA TCT TGA CTT TTG TAA AAA TTT TCT
PINat3'-PvuII	s	2566-2592	CTT AAT CAG CTG TGG AAC TTT TTG AGT
PINat5'-EcoRI	s	163-206	CCC GAA TTC AAA AAT GTT AAA ATA TAA AAA TAT ATG TCT TAA TAT ACA TAC AAG CAA
PINat3'-MslII	as	546-629	AAA TCA TTT CTG TGC TTG TAT TTT TCC TTA GTA TGT TTT TTT ATA AAA TTA ATT ACG AAG CGA TAT ATC TTA ATT ATT CGC AAG GAC
PINat5'-EarI	s	1413-1501	AAA AAA ATT GAA GAG GAA AAG CAT TAA AGA AAA TTA TGA AAT TTT AAA AAT GGA AGA AAA CTT AAT GAA ATT AGG AAC ATT AAT GTT ATT AG

Name	Richtung	Position	
PINat3'- HindIII	as	2605- 2655	CCC AAG CTT TTA TGA CTT TTG TAA AAA TTT TCT ATA TCC ACA CCA ATC ACT GGG TGC AAT

2.3.5 Resyntheseprimer

Diese Primer dienen der Resynthese der Plasmodium AC in Mammaliacodonusage. Die zusammengehörigen Primerpaare (z.B. *PLAC.Synt.1s* und *PLAC.Synt.1as*) überlappen mit 24 bp an ihren 3'-Enden miteinander und ermöglichen die Extension zu großen, doppelsträngigen Fragmenten mit flankierenden Schnittstellen.

Tab. 10: Positionsangaben beziehen sich auf Abb. 25, S. 77; fett: Schnittstellen (Bezeichnungen unterhalb der Primernamen in Klammern); kursiv: Bereiche vor dem Startcodon; unterstrichen: Kozaksequenzbereiche; aaa: 5'-Überhang vor Schnittstelle

Name	Richtung	Position	
PIACSynt. 5'-s/a (Hpa I)	s	163-198	aaa GTT AAC <u>GCC GCC ACC</u> ATG CTG AAG TAC AAG AAC ATA TGC CTG AAC ATC CAC
PIACSynt. 5'-s/b (HpaI)	s	166-198	aaa GTT AAC <u>GCC GCC ACC</u> ATG <u>GGA</u> CTG AAG TAC AAG AAC ATA TGC CTG AAC ATC CAC
PIACSynt. 5'-as (Sfu I)	as	628-645	CTT TTC GAA GTT CCA CTC
MPEPs1 (BamH I)	s	1-105	aaa GGA TCC <u>GCC GCC ACC</u> ATG CCC GAG CCC AAG CAG ATC TAC GCC AAC AAC ATC TTC GAC AAC GAC AAG CTG AAG CGC TTC TTC CTG AAG TAC CGC TCC AAG GAG AAG GTC CTG TAC TCC TTC
MPEPs2 (BamH I)	s	4-105	aaa GGA TCC <u>GCC GCC ACC</u> ATG <u>GGA</u> CCC GAG CCC AAG CAG ATC TAC GCC AAC AAC ATC TTC GAC AAC GAC AAG CTG AAG CGC TTC TTC CTG AAG TAC CGC TCC AAG GAG AAG GTC CTG TAC TCC TTC
MPEPas (Nde I)	as	82-186	aaa GCA TAT GTT CTT GTA CTT CAG CAT GCA CAG GTT GTT CTT GGA CTT GCG CTT CTC CTC GTT GAT GAT GTC GTT CTC GGA GGT GAA GGA GTA CAG GAC CTT CTC CTT

Name	Richtung	Position	
PlAC.Synt. 1s (<i>Nde I</i>)	s	267-380	GAA CAT ATG CCT GAA CAT CCA CAC CTC CAA GTT CTT CAA GTA CTC CAA GTG GGT CTA CCT GTT CCT GAT CAT CTT CTC CAA GGA CTT CTT CTA CCT GCT ACT GAA CAA GAA GTA
PlAC.Synt. 1as (<i>SnaB I</i>)	as	267-380	ATG TAC GTA GAG TCC ATC AGG AAG TTA AAG ATG ATT TCG ATC AGG CAG CCG AAC AGC AGG ATC GAG ATG AAT ATG TCC GAG ATG AAG TCG TAC TTC TTG TTC AGT AGC AGG TAG
PlAC.Synt. 2s (<i>SnaB I</i>)	s	369-518	CTC TAC GTA CAT CTT CTA CTT TAT GTT CTT CGA CAT CAT CTC ATT CAT GCT GCT GTT CTT CGA CAT CTT CCT GTT CGA GAA GTA CTT CTT CGA CTT TTT CAT CTA CTT CAC CAA CTC CCT GTA CAC CTG GAA GAA GAT CGA CAA GGA CAA
PlAC.Synt. 2as (<i>Sfu I</i>)	as	495-645	CTT TTC GAA GTT CCA CTC GTT GCG GTG CTT GTA CTT CTC CTT GGT GTG CTT CTT GAT GAA GTT GAT GAC GAA GCG GTA GAT CTT GAT GAT GCG CAG GGA CTT GAA CAG TTG GAT CAG GTA GAT GAT GTT GTC CTT GTC GAT CTT CTT CCA G
PlAC.Synt. 3s (<i>Sfu I</i>)	s	634-725	AAC TTC GAA AAG ATG GAG TCC ATG AAG AAC CGC CCC CTG AAG GAG TCC CTG AAG TTC ACC AAC AAG ATG CAC CTG GCC CTG ATC AAG CGC TA
PlAC.Synt. 3as (<i>Sty I</i>)	as	702-793	ACT CCT TGG AGA TGT ATA TGA TCT CGA TCA TGA TGT AGG ACA GCA TGA TGA AGA TCA GGG ACA TGA AGT AGC GCT TGA TCA GGG CCA GGT GC
PlAC.Synt. 4s (<i>Sty I</i>)	s	782-896	TCT CCA AGG AGT CCA AGT CGC CCA TGA ACT ACT TCA TCT ACA ACC TGG ACC TGA TCG TGT TCG ACG AGT TCT ACG AGA CCG AGT TCC TGA AGG CCC TGT ACT TCT ACT CCG CCA T
PlAC.Synt. 4as (<i>Cla I</i>)	as	873-987	TAT ATC GAT CTC CTT CTT GTT GAT GAA GTT CTT CAG CTT GCG CTT GGA CTT GAT GGA GAT CAG GTA CTC CTC GTC GCG CTT GTT CTT TTG GAT GGC GGA GTA GAA GTA

Name	Richtung	Position	
			CAG GGC C
PlAC.Synt. 5s (<i>Cla I</i>)	s	976- 1077	GAG ATC GAT ATA TCC GGC ATC AAC TAC CTG CTG TGG GAC TTC ACC AAC CTG TCC CAC AAC GAC CTG CTG AAG TTC GTG ACC CCG TCC TCC GCC AAC CAA AAC
PlAC.Synt. 5as (<i>Bgl II</i>)	as	1054- 1153	CGT AGA TCT TGG TCT CGA AGT AGC GCA GCT CGT TGA TGT TCT TGA TGG TGT GGT CCA GGA TGA TTT CCT CCT CCA CGT TTT GGT TGG CGG AGG ACG GGG T
PlAC.Synt. 6s (<i>Bgl II</i>)	s	1142- 1226	CCA AGA TCT ACG AGT CCA AGG ACT TCA TCT TCC ACA TCA ACA TCA AGC GCT ACA TCG AGC GCA CCA TCA AGA ACA TCA TAA TCC T
PlAC.Synt. 6as (<i>Sac I</i>)	as	1203- 1287	GTT GAG CTC GCA CGT GAA GTA GAA CAG TAT GAT AAA GGA GAA GAT GAT TAT GAA TAT CTT CAG GAT TAT GAT GTT CTT GAT GGT G
PlAC.Synt. 7s (<i>Sac I</i>)	s	1276- 1361	TGC GAG CTC AAC GTC CTG CTG TTC CCC ATC GAG TCC ATC CTG AAG AAG CTG AAG CTG ATG AAG TCC AAC CCC ACC CTG GCC CTG GA
PlAC.Synt. 7as (<i>Hind III</i>)	as	1338- 1422	CTT AAG CTT GGT GTT GAT CAG GAT GTT CTT CAG CTC GTG GTT CAG CAG CTC CTC CTG CAT CTC CAG GGC CAG GGT GGG GTT GGA C
PlAC.Synt. 8s (<i>Hind III</i>)	s	1411- 1498	ACC AAG CTT AAG CGC AAG TCC ATC AAG GAG AAC TAC GAG ATC CTG AAG ATG GAG GAG AAC CTG ATG AAG CTG GGC ACC CTG ATG CTG C
PlAC.Synt. 8as (<i>Mlu I</i>)	as	1475- 1562	TTG ACG CGT TCC TGC TCG TTG ATG TTC TTG GAG ATG ATC TTG GCC CCG GCC TCG CCG AAG CCC AGC AGC ATC AGG GTG CCC AGC TTC A
PlAC.Synt. 9s (<i>Mlu I</i>)	s	1551- 1692	GGA ACG CGT CAA CCT GCT GAT CAA CGG CGA GAT CGT GTA CTC CGT GTT CTC CTT CTG CGA CAT CCG CAA CTT CAC CGA GAT CAC CGA GGT CCT GAA GGA GAA GAT CAT GAT CTT CAT CAA CCT GAT CGC CGA GAT CAT CCA C

Name	Richtung	Position	
PlAC.Synt. 9as (<i>Dra I</i>)	as	1669- 1809	GGA TTT AAA CAT GTT CAT CTT CTT GTT GGA GTA CTC CTT CTT CTG GTA CTT CCA GAC CAG CAG GAA GGC GTC GCC GAT GTT CTT GTT GAT GGT GCC GCC GTA GAA GTC GCA GCA CTC GTG GAT GAT CTC GGC GAT CAG GTT
PlAC.Synt. 10s (<i>Dra I</i>)	s	1798- 1925	ATG TTT AAA TCC CCC AAC AAT AAC TAC GAC GAG TAC TCC GAG AAG GAG AAC ATC AAC CGC ATC TGC GAC CTG GCC TTC CTG TCC ACC GTG CAA ACC CTG ATC AAG CTG CGC AAG TCC GAG AAG ATC CA
PlAC.Synt. 10as (<i>Pvu I</i>)	as	1902- 2029	AGC CGA TCG CGC CCT CGA TGG CCC AGC CGA AGT GCA GGC CGA AGG ACA GCT CCA GGA TGT TGT TCT TGA TCA GCT CGT CCA TGT TCT CGT TGT TCA GGA AGA TGT GGA TCT TCT CGG ACT TGC GCA GC
PlAC.Synt. 11s (<i>Pvu I</i>)	s	2018- 2143	GCG CGA TCG GCT CCT CCT ACA AGA TCG ACC TGT CCT ACC TGT CCG AGA ACG TCA ACA TCG CCT CCC GAC TGC AAG ACA TCT CCA AGA TCT ACA AGA ACA ACA TCG TCA TCT CCG GCG ACT TCT ACG
PlAC.Synt. 11as (<i>EcoR V</i>)	as	2120- 2244	GCA GAT ATC GAA GGT GTA CAG GTT CAG GGG GTT GCG GCA GCC CTT CAG GGT GAC GCG GTC GAT CTT GCG CAG GGA GTT CTT GAA CTT CTC GGA CAT GTT GTC GTA GAA GTC GCC GGA GAT GAC GA
PlAC.Synt. 12s (<i>EcoR V</i>)	s	2233- 2356	TTC GAT ATC TGC CTG AAC AAG ATC ACC AAG AAG GTC AAC ATG GAG AAC TTC GAC GCC AAG CCC CAC TTC GAC GTG AAG CTG CTG AAG GTG TTC GAC GAC ATC AAG AAA AAG GCC GAG CGT AAG A
PlAC.Synt. 12as (<i>Sty I</i>)	as	2333- 2455	AGT CCT TGG GGT AGT GGA TCT TGA TGA ACT TGA TGT CGT CGT TCT TGG CGT ACT CCT CGT ACA GGT TGT AGG ACA GGT TCA GGA CCT CTT TCT TGC GCT TCT TAC GCT CGG CCT TTT TCT TGA
PlAC.Synt. 13s (<i>Sty I</i>)	s	2444- 2567	ACC CCA AGG ACT ACC TGG AGC AGT TCA AGA TCG CCC TGG AGT CCT ACC TGA TCG GCA AGT GGA ACG AGT CCA AGA ACA TCC TGG AGT ACC TGA AGC GCA ACA ACA TCT

Name	Richtung	Position	
			TCG AGG ACG AGA TCC T
PlAC.Synt. 13as (Not I)	as	2544- 2663	AAA GCG GCC GCT CAG GAC TTT TGC AGG AAC TTG CGG TAG CCG CAC CAG TCG GAG GGG GCG ATG AAG TTG TTC ATG GAC AGG AAG TTC CAC AGC TGG TTC AGG ATC TCG TCC TCG AAG ATG TTG

2.3.6 Sonstige Primer

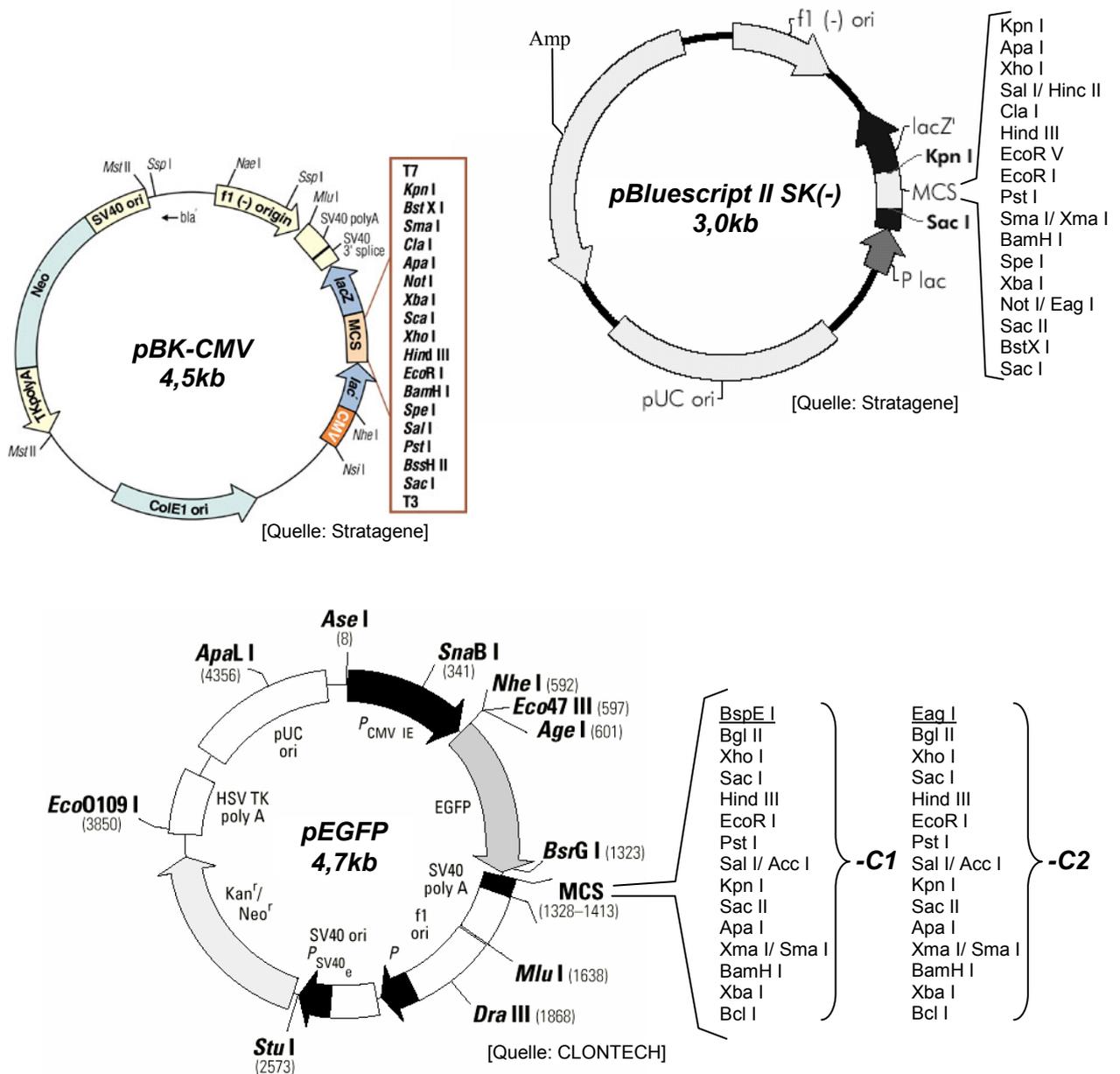
Tab. 11: Positionsangaben beziehen sich auf Abb. 25, S. 77; kursiv: nicht bindende Primerbereiche; fett: Schnittstellen

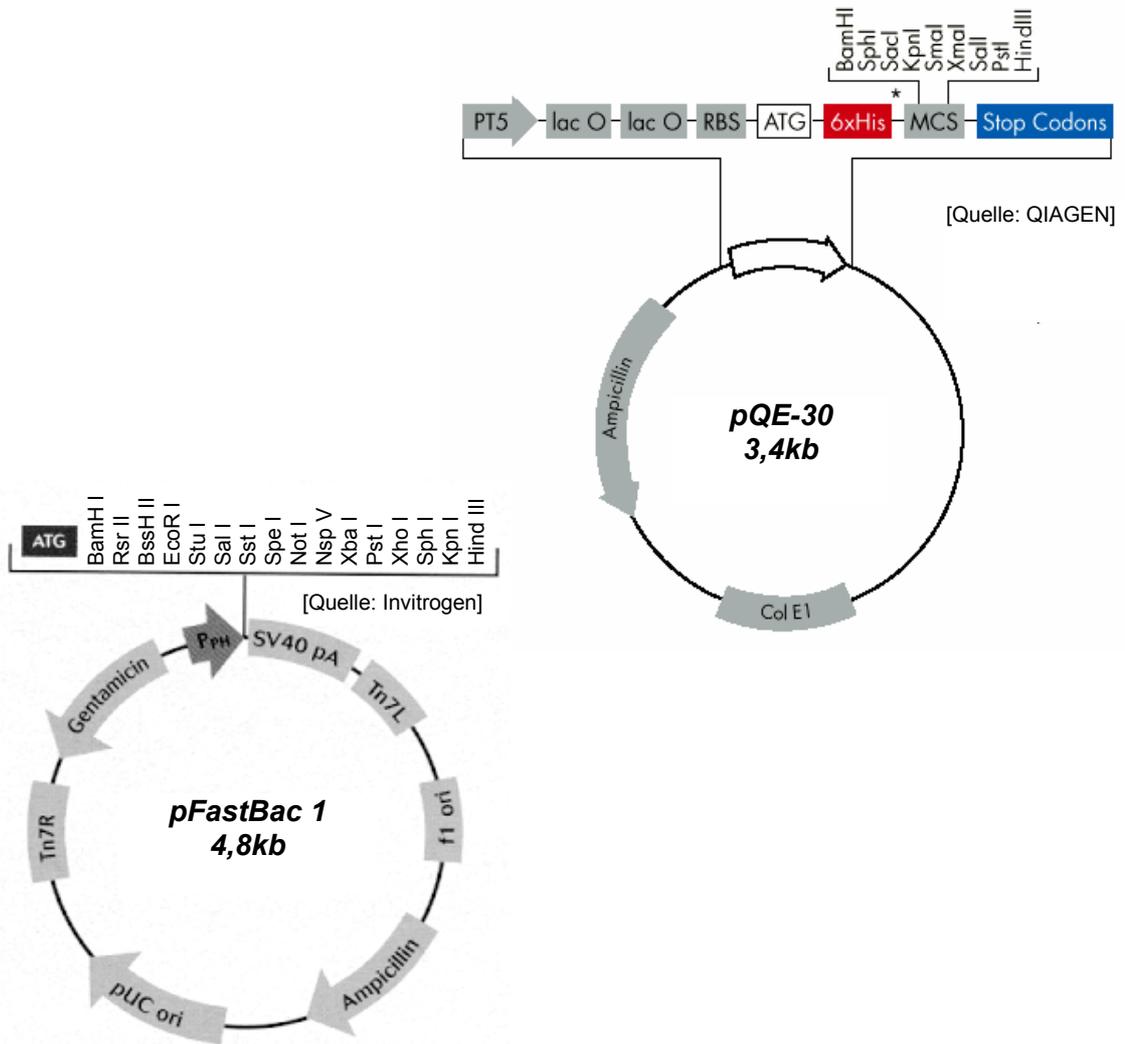
Name	Richtung	Position	
pUC-rev	as	-	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
PlACSynt. Kats	s	1575-1593	AAA GGA TCC GGC GAG ATC GTG TAC TCC
PlACSynt. Katas	as	2643-2663	AAA GCG GCC GCT CAG GAC TTT TGC
PlACSynt. EcoRVs	s	2230-2247	ACC TTC GAT ATC TGC CTG
PlACSynt. sineTGAas	as	2635-2652	AAA GCG GCC GCG GAC TTT TGC AGG AAC TT
PlACSynt. 7sTCEL	s	1272-1290	AAA GGA TCC ACG TGC GAG CTC AAC GTC
PlACSynt. 7s (OS)	s	1276-1290	TGC GAG CTC AAC GTC
PlACSynt. 7As (OS)	as	1406-1422	CTT AAG CTT GGT GTT GA
PlACSynt. Channel as	as	1573-1587	AAA GCG GCC GCCAC GAT CTC GCC GTT
PlACSynt. SKNINE	s	1529-1595	AAA GGA TCC TCC AAG AAC ATC AAC GAG CAG GAA CGC GTC AAC CTG CTG ATC AAC GGC GAG ATC GTG TAC TCC GT
PlACSynt. ERVNL	s	1552-1595	AAA GGA TCC GAA CGC GTC AAC CTG CTG ATC AAC GGC GAG ATC GTG TAC TCC GT

Name	Richtung	Position	
PIACHolo Synt	s	162-198	AAA GGA TCC ATG CTG AAG TAC AAG AAC ATA TGC CTG AAC ATC CAC
PIACsine TPRL1	as	2248-2265	AAA GCG GCC GCT CAC TTC TTG GTG ATC TTG TT
PIACsine TPRL2	as	2422-2439	AAA GCG GCC GCT CAG ATC TTG ATG AAC TTG AT

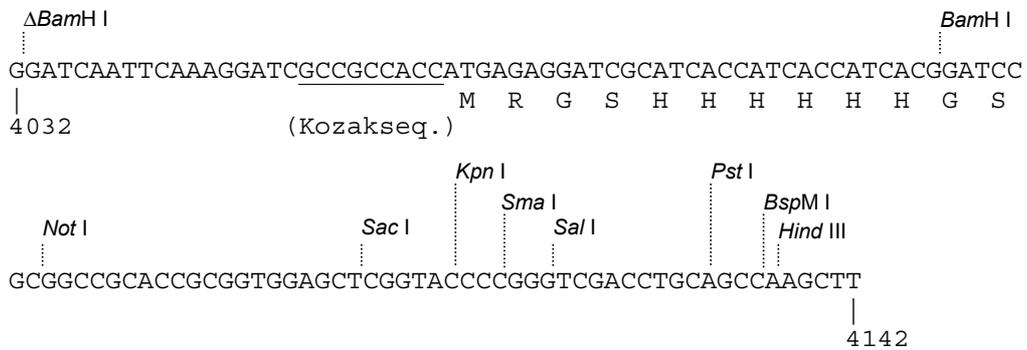
2.4 Plasmide

Abb. 2: Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide





MCS des *pFastBacHis* [Modifiziert nach (25)]:



2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Molekularbiologie

2.5.1.1 Lösungen zum Auftrennen, Reinigen und Lagern von DNA

TAE

40 mM Tris/Acetat pH 8,0
1 mM EDTA

10x TBE-Puffer (LI-COR)

1,34 M Tris
440 mM Borsäure
25 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5
1 mM EDTA

Probenpuffer (Agarosegel)

1x TAE
5,0% Glycerol
0,5% Bromphenolblau
0,5% Xylencyanol

Phenol-Chloroform-Lösung

50% (v/v) Phenol, pH 7,5
48% (v/v) Chloroform
2% (v/v) Isoamylalkohol

Chloroform-Isoamylalkohol-Lsg.

96% (v/v) Chloroform
4% (v/v) Isoamylalkohol

2.5.1.2 Lösungen zur Modifikation und Transfektion von DNA

10x CM

100 mM CaCl₂
100 mM MgCl₂

10x Dephosphorylierungspuffer

500 mM Tris/HCl pH 8,5
1 mM EDTA

dNTPs

20 mM je dNTP

10x Klenowpuffer (ohne BSA)

200 mM Tris/HCl pH 7,9
60 mM MgCl₂
10 mM Dithiothreitol
(+5 µg/10 µl Reaktionsansatz BSA, frisch zugeben)

2.5.1.3 Puffer für PCR und Sequenzierung

10x Air Thermo-Cycler-Puffer

500 mM Tris/HCl pH 8,3
2,5 mg/ml BSA
30 mM MgCl₂

Stoppuffer:

10 ml Formamid
1 Spatelspitze Fuchsin

2.5.1.4 Lösungen für Genbankscreens

20x SSC

300 mM Natriumcitrat pH 7,0
3 M NaCl

50x Denhards Lösung

10 g/l Ficoll
10 g/l Polyvinylpyrrolidin
10 g/l BSA

Prähybridisierungslösung

5x Denhards Lösung
 5x SSC
 50% Formamid
 0,1% SDS
 100 µg/ml denaturiertes
 Heringssperma

Hybridisierungslösung

$2,5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Bq/ml
 denaturierte, radioaktiv markierte Sonde
 in Prähybridisierungs-Lösung

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH
 1,5 M NaCl

Neutralisationslösung

0,5 M Tris/HCl pH 7,5
 1,5 M NaCl

Waschpuffer

1x SSC
 0,1% SDS

2.5.1.5 Medien für E.coli

LB-Medium

20 g/l LB Broth

LB-Medium mit Antibiotika

100 µg/ml Ampicillin und/oder
 50 µg/ml Kanamycin und/oder
 10 µg/ml Tetracyclin und/oder
 7 µg/ml Gentamycin

LB-Medium für Dauerkulturen

20 g/l LB Broth
 20% Glycerol
 (Aufbewahrung
 bei -20°C)

SM-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 15 mM MgSO₄

LB-Medium für konditionierte E.coli

10 mM MgSO₄
 0,2% Maltose
 in LB-Medium

NZY-Medium

10 g/l NZ-Amine
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 2 g/l MgSO₄

LB-Plattenagar

35 g/l LB Agar

NZY-Plattenagar

1,5% Agar
 in NZY-Medium

LB-Plattenagar mit Antibiotika

100 µg/ml Ampicillin und/oder
 50 µg/ml Kanamycin und/oder
 10 µg/ml Tetracyclin und/oder
 7 µg/ml Gentamycin

NZY-Topagar

0,75% Agarose
 in NZY-Medium

SOB-Medium

20 g/l Bacto Trypton
 0,5 g/l NaCl
 5 g/l Bacto Yeast Extract
 auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂ (frisch zugeben)

SOC-Medium

25 mM Glucose
 in SOB-Medium

2.5.2 Proteinchemie**2.5.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8
 0,4% SDS

Sammelgelpuffer

500 mM Tris/HCl pH 6,8
 0,4% SDS

Hoefer-Laufpuffer

25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1% SDS

4x Probenpuffer

130 mM Tris/HCl pH 6,8
 10% SDS
 2% Lithiumdodecylsulfat
 10% β-Mercaptoethanol
 20% Glycerol
 0,03% Bromphenolblau

Coomassie Färbelösung

0,2% Brilliant Blue G-250
 40% Methanol
 1% Essigsäure

Entfärber

10% Essigsäure
 30% Ethanol

2.5.2.2 WesternblottingTowbin-Transferpuffer (100)

25 mM Tris
 192 mM Glycin
 20% Methanol

M-TBS

5% Milchpulver
 in TBS-Puffer

TBS-Puffer

20 mM Tris/HCl pH 7,6
 0,8% NaCl

TBS-T

0,1% Tween 20
 in TBS-Puffer

2.5.2.3 ImmundetektionPBS/BSA

0,9 mg/ml BSA
in PBS (s. 2.5.5)

PBG

0,2% Gelatine
0,5% BSA
in PBS (s. 2.5.5)

Antigenlösung

1 mg/ml C-terminales Peptid der Plasmodium AC
in 20 mM Tris/HCL pH 7,5

2.5.2.4 Puffer zur nativen Ni^{2+} -NTA-ReinigungSf9-Lyse-/Bindepuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0
2 mM $MgCl_2$
15 mM Imidazol
0,025% Thioglycerol

Sf9-Elutionspuffer

37,5 mM Tris/HCl pH 8,0
260 mM Imidazol
0,02 % Thioglycerol

(Beide Puffer wurden ohne Thioglycerol gelagert; kurz vor dem Einsatz wurde mit N_2 -Gas entgast und das Antioxidans frisch zugegeben.)

2.5.3 Lösungen zum Test von Adenylat- und GuanylatcyclaseaktivitätSf9-AC-Suspensionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0
100 mM KCl
2 mM $MgCl_2$
0,025% Thioglycerol (frisch, vgl. 2.5.2.4)

10x AC-Startlösung

1 mM ATP
inkl. $2,5-4 \times 10^6$ Bq/ml
[α - ^{32}P]-ATP

1,5x AC-Stoppuffer

3 mM cAMP
1,5% SDS

10x GC-Startlösung

1 mM GTP
inkl. $2,5-4 \times 10^6$ Bq/ml
[α - ^{32}P]-GTP

1,5x GC-Stoppuffer

2% SDS

2x AC-Cocktail

43,5%	Glycerol
100 mM	Tris/HCl pH 9,0
4 mM	cAMP
	inkl. $2-4 \times 10^3$ Bq/ml
	[2,8- 3 H]-cAMP
0,45 mg/2ml	Kreatinkinase
6 mM	Kreatinphosphat
4 mM	MnCl ₂ und/oder
20 mM	MgCl ₂

2x GC-Cocktail

43,5%	Glycerol
100 mM	Tris/HCl pH 9,0
4 mM	cGMP
	inkl. $2-4 \times 10^3$ Bq/ml
	[8- 3 H]-cGMP
0,45 mg/2ml	Kreatinkinase
6 mM	Kreatinphosphat
4 mM	MnCl ₂

Forskolinlösung

10 mM	Forskolin in DMSO
-------	-------------------

2.5.4 Sf9-ZellkulturmedienSf9-Monolayerkulturmedium

500 ml	TC100 Insektenmedium
50 ml	FCS
5 mg	Gentamycin

Sf9-Suspensionskulturmedium

500 ml	TC100 Insektenmedium
50 ml	FCS
5 mg	Gentamycin
0,1%	Pluronic F-68

Sf9-Transfektionsmedium

TC100 Insektenmedium
ohne Zusätze

Sf9-Einfriermedium

15%	DMSO
	in Sf9-Monolayer-
	kulturmed.

2.5.5 Puffer zum Waschen von ZellenPBS (pH 7,4)

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	H ₂ O

3 Methoden

3.1 Gentechnologische Methoden

3.1.1 Plasmidisolierung aus E.coli

Zur Plasmidisolierung wurden *Wizard-Plus-SV-Plasmid-Purification-Kits* verwendet. Nach Wachstum der Bakterien in 5-100 ml LB-Kulturmedium für 10-20 h wurde durch Zentrifugieren geerntet (1560xg) und eine *Mini-* oder *Midipräparation (-prep)* nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte entweder in Wasser, *TE-Puffer* oder 1:10-verdünntem *TE-Puffer* (Miniprep: 50 µl, Midiprep: 400 µl).

3.1.2 Auftrennen und Detektion von DNA mit Agarosegelen

Mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA oder PCR-Produkte wurden auf ein Agaroseflachbettgel geladen und bei einer Spannung zwischen 80 und 105 V mit *TAE-Puffer* laufen gelassen. *EcoR I/Hind III-verdaute λ-DNA (λ-Marker)* und *Msp I/Ssp I-verdauter pBluescript II SK(-)-Vektor (π-Marker)* dienten als Marker. Die Konzentration der Gele betrug in Abhängigkeit der Größe der zu erwartenden Fragmente zwischen 0,8 und 4% Agarose. Gefärbt wurde nach unterschiedlichen Laufzeiten in einem Ethidiumbromidbad (0,01 mg/ml) für 1-2 min. Die Detektion erfolgte nach weiteren 10 min Laufzeit mit einer UV-Lampe bei 302 nm; dokumentiert wurde mit einem Videoprintersystem.

3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Aus einem Gel wurde mit einem Skalpell das Stück, welches die interessierende DNA enthielt, ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem *NucleoTrap*-Kit nach Herstellervorschrift („*Purification of DNA fragments from agarose gels*“). Die Elution erfolgte mit 25 µl Wasser.

3.1.4 Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von DNA aus wässriger Lösung

3.1.4.1 Entsalzung zum Umpuffern (*NucleoTrap*-Kit)

War es nicht möglich, für bestimmte Kombinationen von Restriktionsenzymen gemeinsame Puffer zu verwenden, mußte die singular geschnittene DNA entsalzt und umpuffert werden,

bevor mit dem zweiten Enzym geschnitten werden konnte. Dieselbe Prozedur wurde auch vor Ligationsreaktionen durchgeführt. Die Entsalzung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers („*Concentration and desalination of DNA fragments*“). Die Elution erfolgte mit 25 µl Wasser.

3.1.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um DNA von Proteinen zu befreien, wurde das Volumen der Probe mit Wasser auf 200–300 µl erhöht und zweimal mit der gleichen Menge *Phenol-Chloroform-Lösung* durch kräftiges *Vortexen* extrahiert. Der dritte Schritt bestand im Entfernen des Phenols aus der wässrigen Phase mit *Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung* gleichen Volumens (86). Die Phasen trennten sich bei Zentrifugation in der Tischzentrifuge (10.000xg, RT, 5 min). Der wässrige Überstand wurde zur Konzentrierung einer Ethanol-fällung unterworfen.

3.1.4.3 Ethanol-fällung

Zur wässrigen DNA-Lösung wurde 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat pH 4,5 zugegeben und mit der zweieinhalbfachen Menge an Ethanol p.a. versetzt. Bei -20°C erfolgte die Fällung für minimal 45 min, dann wurde bei 4°C zentrifugiert (15.000xg, 20 min). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und eine abermalige Zentrifugation schloß an (10 min). Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in der Vakuumzentrifuge von anhaftenden Flüssigkeitsresten bei RT befreit (3-5 min). Die DNA konnte dann in Wasser oder einem geeigneten Puffer aufgenommen werden.

3.1.5 Konzentrationsabschätzung von DNA

Durch den Vergleich der Intensität der Bandenstärke einer DNA-Probe mit DNA-Markerbanden war es möglich, die aufgetragene Menge abzuschätzen.

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Die Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Ein typischer Ansatz hatte ein Volumen von 10 µl und enthielt 200 bis 500 ng Plasmid-DNA sowie 0,2 µl Enzym. Die Inkubationszeit betrug 45-60 min. Zur Stabilisierung der Enzyme erfolgte oftmals ein BSA-Zusatz von 5 µg/10 µl.

3.1.7 Glätten von DNA-Überhängen

Zum „*blunten*“ von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten aus Restriktionsverdauen fand das *Klenow*fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* Verwendung. In einem Reaktions-

ansatz von 10 µl befanden sich 1 µl *10x Klenowpuffer (ohne BSA)*, 0,5 µl *BSA für die Molekularbiologie*, 6,7 µl DNA, 0,8 µl *Klenowenzym* und 1 µl *dNTPs*. Letztere wurden, wenn 3'-Überhänge zu glätten waren, erst nach 10 min Vorinkubation zugesetzt (37°C). Die Reaktionszeit betrug 35 min. Danach wurde das Enzym bei 70°C für 10 min denaturiert.

3.1.8 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten sind, wenn man sie über ihre geglätteten Enden ligieren will, 5'-Phosphatreste notwendig. Diese wurden mit der *T4-Polynukleotidkinase* eingeführt. Ein Reaktionsansatz von 15 µl enthielt den *Klenowansatz*, 10 U Enzym, 2,5 µl 10 mM ATP und 1,5 µl 10x Reaktionspuffer. Die Reaktionszeit betrug 1 h (37°C).

3.1.9 5'-Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Um Religationsprodukte zu vermeiden, wurden linearisierte Plasmide, in die ein Fragment kloniert werden sollte, nach oder während des Restriktionsverdau mit 1 U *alkalischer Phosphatase (AP)* behandelt. Dies geschah entweder nach Verdünnen des Verdauungsansatzes auf 22,5 µl und Zugabe von 2,5 µl Puffer und 1 µl des Enzyms, oder 0,6 µl AP wurden direkt mit in den Restriktionsverdau gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h (37°C).

3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurde der *Rapid DNA Ligation Kit* nach den Herstellerangaben verwendet. Für eine Standardligation mit Vektor (Optimal: 50 ng) und einem Insert wurde ein Stoffmengenverhältnis von 1:2 bis 1:3 benutzt. Bei *Tripleligationen* betrug das Verhältnis des Vektors zu den Inserts 1:1:1. Die Inkubation erfolgte bei RT zwischen 5 und 20 min, in Ausnahmefällen, wenn sich die Ligation als schwierig erwies, auch über Nacht.

DNA-Fragmente aus PCRn wurden immer in *EcoR V*-geschnittenen *pBluescript II SK(-)*-Vektor kloniert.

3.1.11 mRNA-Isolierung, Reverse Transkription und RT-PCR

Total-RNA von *P.falciparum* wurde von Dr. Jürgen Kun (Arbeitskreis Prof. Kremsner, Parasitologie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt (üblicherweise stammte diese aus 25 µl roten Blutzellen mit bis zu 10% Parasitämie in einem Volumen von 50-100 µl, woraus schätzungsweise 20-50 ng mRNA gewonnen wurde).

Daraus wurde mit Hilfe des *QuickPrep Micro mRNA Purification Kits* die benötigte mRNA gereinigt: die wässrige Lösung wurde mit der gleichen Menge Extraktionspuffer versetzt, die

Aufarbeitung erfolgte nach der Herstellervorschrift. Die gefällte mRNA wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und 1,25 bis 5 µl in die RT-PCR (*Titan One Tube RT-PCR System*) eingesetzt.

Alternativ wurde auch mit dem *mRNA Capture Kit* gereinigt: total-RNA wurde zu einem Endvolumen von 50 µl in Lysepuffer aufgenommen und mit 1 µl einer 1:20-Verdünnung der biotinmarkierten oligo(dT)-Sonde für 5 min bei 37°C in einem mitgelieferten Reaktionsgefäß inkubiert. Die Ribonukleinsäuren befanden sich nach den vorgeschriebenen Waschschritten immobilisiert an der Wand des streptavidinbeschichteten PCR-Gefäßes.

Die Reverse Transkription und die PCR erfolgten anschließend mit dem *Titan One Tube RT-PCR System*. Der Reaktionsansatz wurde nach den Herstellerangaben angesetzt, 0,5 µl RNase-Inhibitor waren enthalten. Nach 32 min Inkubation bei 50°C wurden 6 Zyklen mit einer 2°C höheren T_m (3.1.12) als errechnet durchgeführt (Verringerung von Primerfehlbindungen). Darauf folgten 34 Zyklen bei der errechneten T_m (vgl. 3.1.12.2.1). Wenn nach dieser Reaktion noch keine, oder nur sehr wenig DNA erhalten wurde, ist mit einer *nested-* oder *seminested-PCR* nachamplifiziert worden. Zumindest einer der im ersten Reaktionsschritt verwendeten Primer wurde gegen einen anderen, weiter innen auf der Matrize bindenden ausgetauscht. Für die Reaktion wurde 1 µl des 1:10-verdünnten RT-PCR-Ansatzes in eine *Air Thermo-Cycler-PCR* eingesetzt (vgl. 3.1.12.1, Tab. 12).

3.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA

Vgl. auch Literaturstellen (70, 83).

Die Anlagerungstemperatur eines Primers in °C [= T_m (auch Schmelztemperatur genannt)] errechnet sich nach folgender Formel:

$$T_m [\text{°C}] = 4 \cdot (\text{GC}) + 2 \cdot (\text{AT})$$

(GC): Anzahl an bindenden Guanin- und Cytosinnukleotiden des Primers

(AT): Anzahl an bindenden Adenin- und Thyminnukleotiden des Primers

Sofern sich die Temperaturen zweier gemeinsam benutzter Primer unterschieden, wurde mit der niedrigeren gearbeitet. Ist keine DNA erhalten worden, sind erneute Reaktionen mit um 5°C-Schritten herabgesetzten Temperaturen durchgeführt worden.

Ein üblicher PCR-Ansatz mit 50 µl Volumen enthielt neben der zu amplifizierenden DNA die Primer (jeweils 25 pmol = 500 nM), je 200 µM der *dNTPs*, 1 U *Taq*-Polymerase, sowie den benötigten Puffer. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne DNA.

3.1.12.1 PCR mit dem *Air Thermo-Cycler*

Es hat sich bewährt, AT-reiche DNA mit Hilfe der Heißluft-PCR zu vervielfältigen. Verwendung fand der *10x Air Thermo-Cycler-Puffer*.

Um bessere Ergebnisse mit der genomischen DNA von *T.pyriformis* und *P.falciparum* zu erhalten, wurden unterschiedliche Zusätze in den Reaktionen verwendet. 2,5% Glycerol hat sich am besten bewährt, daneben wurden aber auch 25 mM TMAC, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 5% DMSO oder 150 ng/50 µl *Single Strand Binding Protein (SSB)* benutzt.

Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde in eine Kapillare (10 µl/ 5,1 cm) aufgenommen und die Enden an der Bunsenbrennerflamme zugeschmolzen. Der Rest konnte für weitere Reaktionen auch über Nacht auf Eis aufgehoben werden.

Tab. 12: PCR mit dem *Air Thermo-Cycler* und *P.falciparum*-DNA

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	94	300	
Denaturierung	94	60	20-40
Primeranlagerung	<i>T_m</i>	60	
Verlängerung	68	10 s minimal (15-30 s/ Kilobase)	
Auffüllen	68	300	
	RT		

Tab. 13: PCR-Programm zur Bestimmung des 5'-Endes der Tetrahymena AC aus sscDNA

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	94	15	
Denaturierung	94	60	45
Primeranlagerung	<i>T_m</i>	5	
Verlängerung	68	5	
Auffüllen	68	10	
	RT		

3.1.12.2 Heizblock-PCR

Verwendet wurde entweder der mit dem jeweiligen Enzym gelieferte Reaktionspuffer oder der *10x Air Thermo-Cycler-Puffer*.

3.1.12.2.1 Reverse Transkription mit anschließender PCR

Tab. 14: Programm für die Arbeit mit dem *Titan-RT-PCR-Kit*

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Rev. Transkr.	50	32	
Denaturierung	94	2	
Denaturierung	94	0,5	6
Primeranlagerung	$T_m+2^{\circ}\text{C}$	0,5	
Verlängerung	68	1	
Denaturierung	94	0,5	34
Primeranlagerung	T_m	0,5	
Verlängerung	68	1	
Auffüllen	68	5	
Kühlen	4		

3.1.12.2.2 PCR-Suche mit *gewobbelten* Primern in sscDNA von *T. pyriformis*

Da bekannt war, daß bestimmte Proteinbereiche von Adenylatcyclasen sehr invariant sind, wurde mit *gewobbelten* Primerpaaren nach diesen gesucht. 25 ng sscDNA [Präparation von Dr. T. Hoffmann mit 5 ng/µl, (35)] wurden eingesetzt. Ein Extraansatz mit zusätzlich 50 nmol MgCl₂ (1 mM) wurde zur möglichen Verbesserung der Primerbindung parallel angesetzt (36).

**Tab. 15: Programm für PCR mit *Wobbel*primern
(von 37°C auf 72°C stieg die Temperatur mit 0,15°C/s)**

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Denaturierung	94	5	
Denaturierung	94	1	5
Primeranlagerung	37	1	
Verlängerung	72	1	
Denaturierung	94	1	
Primeranlagerung	40	1	
Verlängerung	72	1	
Auffüllen	72	10	
Kühlen	4		

3.1.12.2.3 DNA-Amplifikation aus Phagenbanken

Für einen Reaktionsansatz wurden 1 oder 5 µl der entsprechenden Phagenbanken verwendet.

Tab. 16: Programm zur PCR mit Phagenbanken; in Klammern: modifizierte Zeiten und Temperaturen für die Bestimmung des Introns 3 der Plasmodium AC aus den MR4-cDNA-Phagenbanken *MRA-61* und *MRA-101*

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Denaturierung	94	10 (3)	
Denaturierung	94	1 (50 s)	40
Primeranlagerung	<i>T_m</i> (49)	1 (50 s)	
Verlängerung	72 (68)	2 (50s)	
Auffüllen	72 (68)	10 (50 s)	
Kühlen	4		

3.1.12.2.4 PCR zur Resynthese des Plasmodium AC-Leserahmens

Zur Anfertigung der Plasmodium AC in Mammaliacodonusage wurden mit sich gegenseitig überlappenden Primerpaaren (24 bp) PCRn durchgeführt. Ein 100 µl-Reaktionsansatz enthielt neben 50 pmol (=500 nM) der komplementären Primer je 400 µM der *dNTPs* und 2 U *Taq*-Polymerase, sowie den dazugehörigen 10x Reaktionspuffer.

Tab. 17: PCR-Programm zur Resynthese des Plasmodium AC-Gens

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Denaturierung	94	5	
Denaturierung	94	1	10
Primeranlagerung	52	1	
Verlängerung	72	1	
Auffüllen	72	10	
Kühlen	4		

3.1.12.2.5 PCR am Bacmid und an genomischer DNA von transgenen Paramecien

Zur Kontrolle, ob die *in vivo*-Transposition zur Erzeugung rekombinanter AcNPV-Viren gelang, wurde mit isoliertem Bacmid eine PCR durchgeführt (3 von 15 µl *Nucleobond AX*-präparation). Der auf dem Bacmidgenom bindende *pUC-rev*-Primer sowie insertspezifische Primer kamen zum Einsatz.

Ob aus einer makronukleär injizierten Einzelzelle hervorgegangene Paramecien transgen sind, wurde mit den Primern *PLACc7s/b* und *PLACc3as* getestet (vgl. 3.9).

Tab. 18: PCR-Programm zur Bacmid-Transpositionskontrolle; in Klammern: das Programm für die Kontrolle von transgenen Paramecien

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	94 (95)	300 (420)	
Denaturierung	94 (95)	60 (60)	20 (40)
Primeranlagerung	<i>T_m</i> (53)	60 (60)	
Verlängerung	72 (68)	75 (60)	
Auffüllen	72 (68)	300	
Kühlen	4		

3.1.13 PCR zur DNA-Sequenzierung

Zum „Cycle sequencing“ wurde der *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* verwendet. Mit Wasser sind etwa 130 ng DNA pro Kilobase Plasmid, 2 pmol des benötigten 5'-IRD 800-markierten Primers (=1 µl) und 0,7 µl DMSO zu einem Volumen von 13 µl aufgefüllt worden („Premix“). Je 3 µl dieses „Premix“ wurden dann mit den vorgelegten vier Reaktionsansätzen (je 3 µl) gemischt. Die PCR-Cups wurden mit einem Tropfen *Chill-Out 14 Liquid Wax* überschichtet, 3-5 s zentrifugiert und die Reaktion gestartet (Das Kit reagierte empfindlich auf die Anwesenheit von EDTA aus *TE-Puffer*, daher wurden die *Minipreps* mit 1:10-verdünntem *TE-Puffer* eluiert.).

Vormals fand das *Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP* Verwendung, das Volumen des „Premix“ betrug 21 µl. Davon wurden viermal 5 µl mit je 1 µl der Reaktionsansätze gemischt.

Tab. 19: PCR- Programm für die Sequenzierreaktion

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zyklen
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	20	30/25 ⁵
Primeranlagerung	<i>Anlagerungstemperatur</i> ⁴	20	
Verlängerung	70	20	
Kühlen	4		

Anschließend wurden die Ansätze mit 6 µl *Stoppuffer* denaturiert und 1-1,2 µl der Lösungen auf das 6% Polyacrylamidgel des DNA-Sequenziergeräts geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50°C und einer Leistung von 50 W (max. 1500 V oder max. 37 mA) nach den Herstellerangaben.

⁴ Die Anlagerungstemperatur ist abhängig von der Art des verwendeten Primers und kann in Tab. 1, S. 9 abgelesen werden

⁵ 30 Zyklen gelten für das neue Sequenzierkit, 25 Zyklen wurden mit dem Vorgängerprodukt durchgeführt

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien

Im Verhältnis 1:100 wurde eine Übernachtskultur E.coli auf 100 ml frisches *LB-Medium* überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 gezüchtet. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis folgte Zentrifugation bei 4°C (1000xg, 15 min) und anschließend vorsichtige Suspendierung in 50 ml eiskalter 100 mM $CaCl_2$ -Lösung. Die Zellen wurden nach 20 min nochmals zentrifugiert und in 10 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 20% Glycerol resuspendiert. Nach zwei weiteren Stunden auf Eis wurden sie á 100 µl aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Transformation von E.coli

Kompetente Zellen wurden entweder mit 1 µl Plasmid-DNA, oder einer 100 µl-Mischung aus Ligationsansatz, 10 µl *10x CM-Puffer* und Wasser versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 0°C für 15-20 min, dann ein 42°C Hitzeschock für exakt 1 min. Nach weiteren zehn Minuten auf Eis wurden 500 µl *LB-Medium* zugegeben und bei 37°C für 45–90 min bewegt. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Platten mit den nötigen Antibiotika ausgebracht.

3.2.3 E.coli-Dauerkulturen

Die Aufbewahrung wichtiger Plasmide erfolgte in E.coli-Zellen, von denen nach Wachstum über Nacht ein Aliquot abzentrifugiert wurde (7 s, 10.000xg). Das erhaltene Pellet ist sofort nach Resuspendieren in *LB-Medium für Dauerkulturen* bei -80°C eingefroren worden.

3.2.4 Blau-Weiß-Screen

Um die Rekombination eines *pBluescript II SK(-)*-Plasmids oder die Transposition in das AcNPV-Genom zur Erzeugung rekombinierter Baculoviren in vivo zu überprüfen, wurde ein Blau-Weiß-Screen durchgeführt. Auf vorgetrocknete LB-Platten wurden je 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl 2% X-gal aufgetragen und die transformierten Zellen ausgestrichen (37°C, über Nacht). Bakterienkolonien, die inserthaltige Plasmide tragen, erscheinen weiß, solche ohne Inserts sind blau gefärbt.

3.2.5 Proteinexpression in E.coli-Zellen

DHP1[pRep4]-Zellen (42) oder *Bl21(DE3)[pRep4]*-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid transformiert und in 5 ml *LB-Medium* über Nacht hochgezogen. 800 µl Zellen wurden in 20 ml frisches Medium überimpft und bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,4

wachsen gelassen. Nach weiteren 30 min Schütteln bei RT erfolgte die Induktion mit 30 μ M IPTG (3 h Expressionszeit). Das geerntete Pellet ist einmal mit Flüssigstickstoff geschockt worden, dann wurde in 1 ml eiskaltem Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Nach 1x 10 s Ultraschallbehandlung (Stufe 5, auf Eis) wurde für 20 min bei 4°C abzentrifugiert (15.000xg) und der Überstand sowie das Pellet für anschließende Versuche verwendet. Als Negativkontrolle dienten mit *pQE-30*-Vektor transformierte Zellen.

3.3 Screening von Genbanken

Siehe auch Literaturreferenzen (25, 57, 86).

3.3.1 Herstellung konditionierter E.coli zur Infektion mit λ -Phagen

200 μ l einer Übernachtskultur *E.coli* XLI Blue MRF'-Zellen wurden auf 20 ml frisches Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 1100xg, 4°C) und dann in 10 mM Mg₂SO₄-Lösung zu einer OD₆₀₀ von 0,5 suspendiert. Die Haltbarkeit betrug bei 4°C bis zu vier Tagen.

3.3.2 Herstellung von Phagenplatten

200 oder 650 μ l konditionierter E.coli sind in Abhängigkeit der Plattengröße (92 mm, 145 mm) mit der gewünschten Menge an Phagen vereint und schüttelnd inkubiert worden (100 UPM, 20 min, 37°C). Die Suspension wurde entweder mit 5 oder 9 ml geschmolzenem NZY-Topagar (50°C) gemischt und auf NZY-Platten ausgebracht (30 min RT, 37°C über Nacht). Nächstentags ließen sich gegen den trüben Hintergrund eines E.coli-Rasens die durchscheinenden phagenhaltigen Plaques lysierter Zellen erkennen. Die Platten waren bei 4°C mehrere Tage haltbar.

3.3.3 Titern von Phagenbanken und Phagensuspensionen

Um die Konzentration einer Phagensuspension zu bestimmen, wurde diese von 1:10 bis 1:100.000 mit *SM-Puffer* verdünnt und je 10 μ l der Virusverdünnungen nach dem in 3.3.2 beschriebenen Verfahren auf kleine Platten ausgebracht. Platten bis etwa 350 Plaques wurden ausgezählt und daraus der Titer in pfu/ml errechnet.

3.3.4 Amplifikation von Phagenbanken (Subfraktionierung)

Große Platten mit ~10.000 pfu wurden wie beschrieben ausgebracht. Am folgenden Morgen wurde mit 15 ml *SM-Puffer* überschichtet, die Platten mit *PARAFILM* umschlossen und

schüttelnd extrahiert (70 UPM, 4°C, 24 h). Die Phagenextrakte wurden mit 1/20 des Volumens an CHCl_3 versetzt, gemischt und für 20-30 min bei RT belassen. Nach Zentrifugation (10 min, 2000xg) wurde der Überstand in ein anderes Behältnis überführt und wiederum mit 1/20 an CHCl_3 versetzt. Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.3.5 Genbankdurchmusterung

3.3.5.1 Identifikation positiver Fraktionen mittels PCR

Fraktionen von Genbanken (je 5 μl) wurden in eine PCR nach 3.1.12.2.3 eingesetzt.

3.3.5.2 Genbankdurchmusterung mit einer radioaktiven Sonde

3.3.5.2.1 Herstellung der radioaktiven Sonde

Um eine radioaktive Sonde zu erhalten, wurde eine Markierungsreaktion mit *Taq*-Polymerase und den folgenden weiteren Inhaltsstoffen durchgeführt (als Matrize diente entweder das erhaltene Fragment einer PCR mit *Wobbel*primern aus sscDNA oder die aus einer genomischen Phagenbank mit spezifischen Primern herausamplifizierte DNA-Bande).

Tab. 20: Substanzen und deren Konzentrationen zur Erzeugung einer $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCMP-markierten Sonde

Inhaltsstoff	Endkonzentration im Ansatz
zu markierende DNA	ca. 30 ng/100 μl
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP	100 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ ($\geq 0,032 \text{ nmol}$)
dATP, dGTP, dTTP	jeweils 2 nmol/100 μl (20 μM)
Primer	jeweils 0,5 μM
<i>Taq</i> -Polymerase	2 U/100 μl
10x Reaktionspuffer	10 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$

Der Mix wurde ohne das $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP auf Eis vorgelegt.

Nach Zugabe des radioaktiven *Tracers* wurde die Reaktion schrittweise auf drei Heizblöcken durchgeführt:

- 1) 95°C, 10 min (nach 5 und 10 min 1-2 s zentrifugieren)
- 2) 40°C, 5 min
- 3) 72°C, 20 min (jeweils nach 10 min 1-2 s zentrifugieren)
- 4) Eis, 5 min

Zum Abtrennen der radioaktiv markierten DNA von den Nukleotiden wurde der Ansatz mit 3 μl BX-Puffer gemischt und auf eine nach Herstellervorschrift vorbereitete *Quick Spin*-Gel-filtrationssäule aufgetragen. Etwa 85 μl der Sonde wurden so nach Zentrifugation gewonnen (1100xg, 4 min, 4°C).

Zur Herstellung von *Hybridisierungslösung* wurde das erhaltene Zentrifugat für 7 min auf 95°C erhitzt, dann sofort auf Eis gekühlt und in *Prähybridisierungslösung* pipettiert.

3.3.5.2.2 Anreicherung von gesuchten Phagen (Grobsscreen)

Große Platten mit ~10.000 pfu wurden gemäß 3.3.2 gegossen und über Nacht inkubiert. Die Platten wurden für 1 h bei 4°C inkubiert und mit *Hybond-N*-Nylonmembranen belegt (Erst-abzüge, 5 min RT), welche mit einer Injektionskanüle an vier Punkten asymmetrisch durchstoßen wurden. Ebenso sind Zweitabzüge angefertigt worden (10 min RT); die Markierungspunkte im Agar wurden mit einer Kanüle auf die Nylonmembranen übertragen. Zur Denaturierung und Neutralisation sind die Abzüge mit den phagenbehafteten Seiten nach oben auf mit den entsprechenden Lösungen getränktes Whatmanpapier gelegt worden (je 5 min), um sie danach im UV-*Stratalinker*-Ofen „crosszulinken“ (1,2 mJ Strahlungsenergie). Die Verwahrung der Filter bis zum Beginn der Hybridisierung erfolgte in 2x SSC.

Die fächerartig übereinandergelegten in Hybridisierungsröhren verpackten Nylonmembran-abzüge wurden im Hybridisierungsofen mit 20 ml *Prähybridisierungslösung* bei Stufe 5 gedreht (2 h, 42°C). Die Lösung wurde gegen die *Hybridisierungslösung* ausgetauscht und unter gleichen Bedingungen über Nacht gedreht.

Die nach Hybridisierung abgegossene Lösung konnte bei -20°C für anschließende Experimente gelagert werden. Mehrere Filterwaschschritte schlossen sich an:

Noch im Ofen ist 2x 7 min mit *Waschpuffer* gespült worden (>20 ml), dann wurden die Membranen entnommen und für zweimal 25 min bei 50°C in einem Edelstahlbehälter mit weiterer Waschlösung geschüttelt (>50 ml).

Nach dem Trocknen fand die Autoradiographie für zwei oder drei Tage bei -80°C statt. Anhand gleich lokalisierter Signale auf den Erst- und Zweitabzügen wurden positive Plaques festgestellt und konnten aus den Platten mit der weiten Öffnung einer Pasteurpipette ausgestochen werden. Die Elution der Phagen erfolgte unter Schütteln mit 500 µl *SM-Puffer* und 20 µl Chloroform zur Konservierung (200 UPM, 1-2 h, 37°C).

3.3.5.2.3 Isolierung von Einzelklonen (Feinscreen)

Um die im *Grobsscreen* erhaltenen Phagen zu klonieren, sind unterschiedliche Mengen (1-250 µl) einer 1:2000-Eluatverdünnung in Form kleiner Platten zur weiteren Vereinzelung der Klone ausgebracht worden. Mit derselben, zur Denaturierung kurz erhitzten radioaktiven Sonde (20 min, 65°C) wurde dann eine erneute Hybridisierung durchgeführt. Die Filmex-

position der Membranen erfolgte entweder über Nacht oder für zwei Tage. Positive, isoliert liegende Plaques wurden mit der engen Öffnung einer Pasteurpipette ausgestochen und wie beschrieben in *SM-Puffer* eluiert.

3.3.5.3 *In vivo excision*

Die Koinfektion von *E.coli XL1Blue MRF'*-Zellen mit den im Feinscreen gewonnenen Phageneluat und dem *ExAssist*-Helferphagen führte zur Wiedergewinnung von rezirkuliertem Plasmid, verpackt in neue Helferphagen:

200 µl konditionierte *E.coli XL1Blue MRF'*-Zellen wurden zusammen mit 100 µl Eluat eines Klonen aus einem Feinscreen und 1 µl *ExAssist*-Helferphagen geschüttelt (100 UPM, 15 min, 37°C). Nach Zugabe von 3 ml *LB-Medium* ist weiterhin für 2 h schüttelnd inkubiert worden. Dann sind die Bakterienzellen abgetötet worden (15 min, 70°C). Der Zentrifugationsüberstand (4000xg, 15 min, 4°C) enthielt die für *E.coli SOLR*-Zellen infektiösen Phagen mit rezirkuliertem Plasmid. Infizierte *SOLR*-Zellen trugen nach Selektion über ampicillinhaltiges Plattenmedium das gesuchte Insert in *pBluescript II SK(-)*. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (95).

3.4 *Sf9*-Insektenzellkultur

Die Transfektion der Zellkultur wurde mit dem *BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expression System* durchgeführt. Die Arbeit mit den Insektenzellen orientierte sich wesentlich an den Erfahrungen, die Dr. P. Engel im Labor gemacht hatte (17). Es wurde aber auch die von den Herstellern zur Verfügung gestellte Literatur zu Rate gezogen (18, 19, 38)

3.4.1 Anlegen von Kulturen aus gefrorenen Zellen

Eine in flüssigem Stickstoff aufbewahrte Kultur (1:1-Gemisch von *Sf9-Monolayerkulturmedium* mit Zellen und *Sf9-Einfriermedium*) wurde durch Handwärme gerade so weit erwärmt, daß sie antaute. Der Inhalt wurde in eine 50 ml Kulturflasche mit 4 ml vorgelegtem *Monolayerkulturmedium* gegossen und die Zellen durften 30-45 min adhären (27°C). Der Überstand wurde gegen 5 ml frisches Medium ausgetauscht.

3.4.2 Passagieren der Zellen

3.4.2.1 Monolayerkulturen

Das Wachstum der Zellen erfolgte unter 5 ml *Sf9-Monolayerkulturmedium* in 50 ml Kulturflaschen bei leicht aufgedrehtem Deckel zum Gasaustausch (27°C). Bis zur vollständigen

Konfluenz der Zellen dauerte es drei bis fünf Tage. Das Medium wurde gewechselt und die Zellen von ihrer Unterlage mit der Pasteurpipette nach dem „*sloughing*“-Verfahren heruntergespült. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 verdünnt und in eine neue Flasche überführt („*Splitting*“).

3.4.2.2 Suspensionskulturen

Zur Erzeugung einer Suspensionskultur wurden fünf konfluente Monolayerkulturen geerntet und in *Sf9-Suspensionskulturmedium* angezchtet (10^6 Zellen/ml). Die Kulturen wurden bei 90 UPM sanft bewegt. Die Dichte betrug $0,7 \times 10^6$ (nach dem Verdünnen der Kultur) bis 4×10^6 Zellen/ml. Für die Infektion mit Viren wurden die Kulturen auf $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden jeweils montags, mittwochs und freitags gezählt, auf eine Dichte von $0,8-1 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt und in frische Kolben gegeben („Passagierung“). An jedem zweiten Passagetag wurde das Medium außerdem komplett durch Zentrifugation abgetrennt (150xg, 5 min) und gegen frisches ausgetauscht.

3.4.3 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Da die für Baculoviren kodierende DNA mit 130 kb zu groß ist, um sie durch in vitro-Ligation zu rekombinieren, wird mittels der in vivo-Transposition gearbeitet. Dabei wird das zu exprimierende Gen in das Donorplasmid *pFastBac1* kloniert und in *E.coli DH 10 Bac*-Zellen eingeschleust. Diese tragen ein Helferplasmid und das Genom des AcNPV (*Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus*). Mit den auf dem Helferplasmid kodierten Proteinen findet eine Transposition des zu exprimierenden Gens, welches beidseitig von den Transposongrenzen *Tn 7L* und *Tn 7R* flankiert wird (Transposondonorseite), aus dem *pFastBac1*-Plasmid in die Akzeptorseite (mini-attTn7) des AcNPV-Bacmids statt. Über die Akzeptorseite kodiert ein lacZ α -Komplementationsselektionsmarker. Daher können transponierte Klone durch einen Blau-Weiß-Screen detektiert werden (das Verhältnis positiver weißer Kolonien beträgt etwa 1 zu 100 blauen Kolonien). Das transponierte Fragment bringt weiterhin auch den starken Polyhedrinpromotor mit, der die Expression steuert. Es wurde zumeist ein modifizierter *pFastBac1*-Vektor mit einem bereits inserierten N-terminalen *HexaHis-Tag* verwendet [= *pFastBacHis*, nach Hambach (25)].

3.4.3.1 In vivo-Transposition in *E.coli DH 10 Bac*-Zellen

Etwa 1 μ g rekombinante *pFastBacHis*-DNA wurde auf angetaute kompetente *E.coli DH 10 Bac*-Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für genau 1 min und 10 min auf Eis. In 1 ml *SOC-Medium* wurde für 4-5 h schüttelnd inkubiert (37°C).

Zwischen 300 und 500 µl dieses Ansatzes wurden dann plattiert [LB-Platten mit Gentamycin, Tetracyclin und Kanamycin, sowie IPTG und X-gal (vgl. 3.2.4)] und für 48-60 h inkubiert (37°C). Große, rein weiße Klone wurden in *LB-Medium* mit den entsprechenden Antibiotika überimpft und über Nacht hochgezogen (5 ml, 37°C).

3.4.3.2 Bacmidisolierung

Die Reinigung transponierten Bacmids wurde mit dem *Nucleobond AX-Kit* gemäß der Vorschrift „*Purification of low copy plasmids, cosmids, P1 constructs, BAC's and PAC's*“ aus 3 oder 5 ml Kultur durchgeführt. Die DNA befand sich zum Schluß in 15 bis 30 µl *TE-Puffer*. Der Transpositionserfolg wurde mit einer PCR überprüft (vgl. 3.1.12.2.5).

3.4.3.3 Lipobacmidtransfektion von Sf9-Zellen (Herstellung von Primärviren)

Zur Infektion der Insektenzellen mit dem Bacmid ist mit *CellFECTIN*-Reagenz gearbeitet worden. Die Mischung aus kationischem und neutralem Lipid bildet spontan mit der DNA Komplexe, welche dann in die Zellen aufgenommen werden. Die Bacmid-DNA mußte aus Stabilitätsgründen innerhalb von 6 h nach der Reinigung transfiziert werden.

Für einen Transfektionsansatz wurde ein Monolayer von $0,8-1 \times 10^6$ Zellen in *Sf9-Transfektionsmedium* auf einer 35 mm-Gewebekulturschale ausgesät (45-60 min Adhärenzzeit, 27°C). Derweil wurde folgende Probe vorbereitet:

Die Bacmidlösung wurde mit *TC 100 Insektenmedium* zu 100 µl Endvolumen aufgefüllt und mit einer Mischung aus 10 µl *CellFECTIN* und 90 µl *TC 100 Insektenmedium* bis kurz vor das Ende der Adhärenzzeit bei RT inkubiert.

Dann wurden weitere 800 µl *Sf9-Transfektionsmedium* zugegeben und die Mischung auf die vom Überstand befreiten Zellen tropfenweise pipettiert (5 h, 27°C). Das Medium wurde abgesaugt und gegen 2 ml *Sf9-Monolayerkulturmedium* ausgetauscht (72 h, 27°C).

Der abgenommene Überstand enthielt die Primärviren, welche nach Zentrifugation zur Entfernung verschleppter Zellen (4 min, 250xg, 4°C) direkt weiter amplifiziert wurden. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C. Das Zellpellet konnte zu einer ersten PAGE-Gel-Analyse auf exprimiertes Protein Verwendung finden.

3.4.4 Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren

3.4.4.1 Herstellung von Sekundärviren

15 ml oder 50 ml einer frisch passagierten Schüttelkultur wurden entweder mit 300 µl oder der Gesamtmenge an Primärvirus versetzt und inkubiert (48 h, 27°C). Der zentrifugierte

Überstand (5 min, 150xg) enthielt die Sekundärviren. Lagerung erfolgte bei 4°C. Das Zellpellet konnte für erste AC-Tests verwendet werden.

Die Herstellung von Tertiärvirenstocks erwies sich als nicht effektiv, gewonnene Viren waren fast nicht mehr infektiös.

3.4.4.2 Infektion von Zellen zur Gewinnung von exprimiertem Protein

Frisch passagierte Suspensionskulturen wurden mit Virus versetzt und für 48-56 h bei 27°C inkubiert (vgl. 3.4.5). Die Zellen wurden geerntet (150xg, 4 min), gewaschen (1x min. 5 ml *PBS*) und dann erneut pelletiert (alles auf Eis). Entweder schloß sich nun direkt der Enzymtest an oder es wurde mit Flüssigstickstoff eingefroren, um danach bei -80°C zu lagern.

3.4.5 Bestimmung der Virusinfektiosität durch Verdünnungsreihen

Da Plaqueassays zur Titerbestimmung sehr zeitaufwendig und mit einer großen Unsicherheit behaftet sind, mußte eine effiziente Möglichkeit gefunden werden, um die Infektiosität von Viren zu bestimmen. Dazu wurden je 15 ml passagierte Zellen (8×10^5 Zellen/ml) mit 0,1, 1, 10 und 100 µl Sekundärviren infiziert. Die optimale Infektionsrate wurde anhand der Zellzahl, der Morphologie und der Expressionsrate nach 48-56 h ermittelt:

- 1) Die Zellen sollten nicht wie bei einer Überinfektion nahezu total lysiert vorliegen (kaum noch intakte Zellen, fast nur noch Membranbruchstücke zu erkennen); die Zellzahl geht leicht zurück ($0,8 \times 10^6 \rightarrow 0,6 \times 10^6$ Zellen/ml).
- 2) Die Morphologie der Zellen ist als rund aufgetrieben und von „stacheliger“ Oberfläche im Vergleich zu uninfizierten Zellen zu beschreiben.
- 3) Die Expressionsrate läßt sich mit der Hilfe von PAGE-Gelen und Westernblots, aber am eindeutigsten mit einem AC-Test der Pellets bestimmen.

3.4.6 Herstellung von Sf9-Zellhomogenaten

Zellen, behandelt wie unter 3.4.4.2 beschrieben, wurden entweder in *Sf9-AC-Suspensionspuffer* oder *Sf9-Lyse/-Bindepuffer* resuspendiert (jeweils 200-800 µl). Der Aufschluß erfolgte durch zweimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und daran anschließendem Auftauen bis zur kompletten Schmelze unter ständiger vorsichtiger Bewegung (32°C, Wasserbad). Die erhaltene Suspension ist mit einer Kanüle (Gr. 18) unter Zuhilfenahme einer vorgekühlten U-40 Insulinspritze durch zwei- bis dreimaliges Einziehen und wieder Ausstoßen weiter geschert worden. Schaumbildung war zu vermeiden.

Dann folgte eine Zentrifugation für 20-30 min (17.100xg, 4°C). Der resultierende Überstand wurde entweder direkt in einen Enzymtest eingesetzt oder das Protein zuvor daraus gereinigt.

3.4.7 Membranpräparationen aus Sf9-Zellen

Es wurde zunächst wie in 3.4.6 im ersten Absatz beschrieben verfahren. Dann folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 2400xg um Zellkerne und große Partikel abzutrennen (4°C). Der abgenommene Überstand wurde für weitere 35 min bei 28.200xg zur Abtrennung der Membranen zentrifugiert (4°C). Das Pellet ist mit einer 10 µl-Pipette in 100 µl *Sf9-AC-Suspensionspuffer* rehomogenisiert und in den AC-Test eingesetzt worden.

3.4.8 Ni²⁺-NTA-Affinitätsreinigung

Die meisten getesteten Konstrukte trugen einen N-terminalen *HexaHis-Tag*. Dieser komplexiert mit den Ni²⁺-beladenen Nitrilotriessigsäureseitenketten des Säulenmaterials und bindet so das Protein. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte nach ein oder zwei Waschschritten mit imidazolhaltigen Puffer.

Das im Lagerungspuffer zur Konservierung der Bindematrix vorhandene Ethanol mußte entfernt werden: die Vorequilibration der Ni²⁺-NTA Agarose (50-100 µl), bzw. der Ni²⁺-NTA *Magnetic Agarose Beads* (50 µl) erfolgte durch die Zugabe von je 1 ml *Sf9-Lyse-/Bindepuffer* und anschließender Abtrennung durch zentrifugieren (7 s, 10.000xg), oder die Verwendung eines Magneten. Das Pellet wurde in 500 µl frischem Puffer resuspendiert.

Die Zellen wurden wie in 3.4.6 beschrieben behandelt und der gewonnene Überstand in 3-5 ml eiskaltem *Sf9-Lyse-/Bindepuffer* aufgenommen. Dort hinein wurde die Ni²⁺-NTA Agarose gegeben und für zumindest eine Stunde unter ständiger Bewegung auf Eis äquilibriert. Zum Abtrennen und Waschen der Matrix wurde die Suspension in eine vorgekühlte 10 ml-Spritze mit einer aufgesetzten *Wizard*-Minisäule gegeben, durchgedrückt und zweimal mit je 1 ml *Sf9-Lyse-/Bindepuffer* gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100-1000 µl *Sf9-Elutionspuffer*, der zur Erhöhung der Ausbeute ein zweites Mal über die Säule gegeben wurde. Für die Bindung an Ni²⁺-NTA *Magnetic Agarose Beads* wurde identisch verfahren, die Separation erfolgte jedoch mit dem Magneten. Zum Waschen und Eluieren ist mit den gleichen Volumina gearbeitet worden.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 *BIO-RAD*-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung von Zellhomogenaten erfolgte mit dem *BIO-RAD PROTEIN ASSAY*-Reagenz. Das Protein wurde in 800 µl Wasser pipettiert, dann wurden 200 µl des Reagenz zugegeben und kräftig gemischt. Als Proteinstandard diente 1, 3, 5, 8 und 12 µg BSA. Die Meßwellenlänge betrug 595 nm.

3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Siehe auch Literaturreferenz (53).

Zur Auftrennung von Proteinen wurde mit der Apparatur der Firma HOEFER gearbeitet. Die Benutzung erfolgte nach den Herstellerangaben. Verwendung fand der *Hoefer-Laufpuffer*. Üblicherweise wurden 12,5%-Gele verwendet.

Tab. 21: Rezepturen für SDS-PAGE-Gele; die Trenngelkonzentration wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Proteingröße gewählt

Trenngel					Sammelgel	
Inhaltsstoffe	7,5%	10%	12,5%	15%	Inhaltsstoffe	
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	Sammelgelpuffer	1 ml
Wasser	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	Wasser	2,4 ml
Acrylamidfertiglg. (AppliChem)	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	Acrylamidfertiglg. (AppliChem)	0,6 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl
APS 10%	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	APS 10%	40 µl

Als Proteingrößenstandard dienten Markerproteine (je 1,1 µg):

Phosphorylase b	97,4 kDa
BSA	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
GAPDH	36 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Chymotrypsinogen A	25 kDa
Cytochrom C	12,5 kDa

Die Proteinproben wurden mit unterschiedlichen Mengen *4x Probenpuffer* gemischt. Die Plasmodium AC-Holoenzymvarianten sind für 2 h bei 37°C inkubiert worden, andere Proben wurden zur Denaturierung bei 95°C zwischen 1 und 5 min belassen.

Die Stromstärke betrug maximal 20 mA/Gelplatte, die Spannung lag bei 200 V. Die Elektrophorese wurde mit dem Herauslaufen des Bromphenolblaus aus dem Gel beendet und die Proteine mit *Coomassie-Färbelösung* gefärbt (>20 min, ~175 UPM). Anschließend wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden mit *Entfärber* behandelt und schließlich gewässert.

3.5.3 Abschätzen der Proteinmenge mit Hilfe von SDS-PAGE-Gelen

Da aus einem halben Liter *Sf9*-Schüttelkultur maximal 15 µg Protein reinigbar waren, wurde die Proteinmenge von 15 µl Eluat über ein PAGE-Gel abgeschätzt. Als Proteinstandard dienten 0,2-1 µg BSA. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Bandenstärken.

3.5.4 Westernblot

3.5.4.1 Elektroblot

Die mit einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* auf eine *PVDF*-Membran elektrophoretisch übertragen. Die Blotzeit betrug 3 h bei 20 V und 3 mA/cm², 230 mA maximal.

Die Membran mußte wie folgt vorbereitet werden: Zunächst wurde sie für 5 s in Methanol geschwenkt, dann erfolgte eine 5-10 minütige Wasserexposition, worauf sich eine mindestens 10 minütige Behandlung mit *Towbin-Transferpuffer* anschloß.

Diese Membran wurde auf drei Lagen mit demselben Puffer getränkter *Whatman*papiere gelegt, das fertige SDS-PAGE-Gel (ohne Trenngel) wurde darübergelegt und der „Sandwich“ mit drei weiteren befeuchten Papierlagen beschossen. Alle Lagen hatten die identische Größe.

Die transferierten Proteine ließen sich mit *Ponceau S* reversibel färben. Markerbanden wurden zur Kenntlichmachung mit Bleistift rechts und links punktiert.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden 12,5%-ige PAGE-Gele für die Blots verwendet.

3.5.4.2 Immunodetektion

Folgende Prozedur wurde zur Bindung der Antikörper an das entsprechende Protein auf der Membran bei RT angewendet (sachte Bewegung bei ~50 UPM):

- 1) Blockierung der Membran mit *M-TBS* (min. 45 min)
- 2) Bindung des primären Antikörpers in *M-TBS* (1 h)
- 3) Waschen mit *TBS-T* (2x einige Sekunden, 1x 15 min, 2x 5min)
- 4) Bindung des sekundären Antikörpers in *M-TBS* (1 h)
- 5) Waschen mit *TBS-T* wie 3)

Detektiert wurde mit dem *ECL Plus Western Blot Detection System* nach der Herstelleranleitung. Die Exposition der von Flüssigkeit befreiten, jedoch nicht trockenen, in eine *Toppits*-Frischhaltefolie blasenfrei eingeschlagenen Membran gegenüber einem *ECL Hyperfilm* dauerte von einigen Sekunden bis zu 10 min.

3.5.4.3 Verwendete Antikörper und Präimmunseren, sowie deren Verdünnungen (in *M-TBS*)

3.5.4.3.1 Detektion von *HexaHis*-Tags

Primärer AK: monoklonaler Antikörper *anti-RGS(His)₄* (1:1000)

Sekundärer AK: Ziege-anti-Maus-IgG-Fc-Antikörper konjugiert mit POD (1:5000)

3.5.4.3.2 Detektion des C-terminus der Plasmodium AC auf PAGE-Gelen

Verwendete AK: s. 3.6.

Primärer *AK 4020g*: 1:250 oder 1:1000

Primärer *AK 4021g*: 1:500

Präimmunseren: 1:500

Sekundärer AK: Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Fc-Antikörper konjugiert mit POD

3.5.4.4 Preblocktests der *AK 4020g* und *AK 4021g* sowie der Präimmunseren

Um spezifische von unspezifischen Bindungen zu unterscheiden, wurden die Antikörper vorher mit Antigen abgesättigt (Inkubation der AK mit etwa der 50-100fachen molaren Antigenmenge für 1 h bei RT. Das entspricht bei den 1:500-Verdünnungen in 30 ml Volumen 200 µl *Antigenlösung*).

Für die Durchführung des Preblocks wurde ein PAGE-Gel doppelt beladen und geblottet. Die erhaltene Membran wurde in zwei Hälften geschnitten und die Teile dann jeweils mit dem unblockierten AK sowie mit dem geblockten AK inkubiert. Die mit dem geblockten AK behandelte Membran sollte keine Signale mehr zeigen.

3.6 Herstellung eines C-terminal bindenden Plasmodium AC-Peptidantikörpers

Für die Produktion des Peptids wurde der C-Terminus der Plasmodium AC als Antigen gewählt. Nach einer Analyse auf ausreichende Antigenizität mit dem *DNASTAR-Protean*-Analyseprogramm wurde die Sequenz von AS P871 bis zur letzten AS festgelegt (S884). C875 wurde gegen S ausgetauscht, um Fehlkopplungen des Peptids an die Reinigungssäule zu verhindern. Am N-Terminus wurde zum Koppeln ein Cysteinrest ansynthetisiert. Die Sequenz des Peptids lautete: C-PSDWSGYRKFLQKS-Amid.

Die Herstellung des Peptids erfolgte durch die Firma Biosyntan, die Immunisierung der Kaninchen sowie die Affinitätsreinigung der AK wurden von Biogenes durchgeführt.

Die im ELISA-Test bestimmten Titer der Antikörper wurden für den AK von Tier 4020g mit 1:200.000 und den AK von Tier 4021g mit 1:50.000 angegeben (später nur noch *AK 4020g* und *AK 4021g* genannt). Die Präimmunseren zeigten in einer Verdünnung von 1:100 keine Reaktion mit dem Antigen. Die Konzentrationen der gereinigten AK betragen für *AK 4020g* 10,4 mg/7,0 ml und für *AK 4021g* 10,1 mg/7,7 ml.

3.7 Immunmarkierung von *P.falciparum*-Kulturausstrichen

Fertige, auf Objektträger ausgestrichene und luftgetrocknete Kulturen von *P.falciparum* wurden von Dr. Jürgen Kun (Arbeitskreis Prof. Kremsner, Parasitologie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

3.7.1 Fixierung der Ausstriche

3.7.1.1 Methanolfixierung

Die Ausstriche wurden für maximal 2 s in Methanol getaucht und dann an der Luft getrocknet.

3.7.1.2 Acetonfixierung

Die Fixierung erfolgte für 2 min in auf -10°C gekühltem Aceton (Eis/Wasser/NaCl-Kältemischung). Danach wurde an der Luft getrocknet.

3.7.2 Immunmarkierung

Unfixierte und fixierte Ausstriche wurden mit Hilfe von Nagellack in 25-36 mm² große Rasterflächen unterteilt, auf denen die Immunmarkierung stattfand.

Getestet wurden beide AK (vgl. 3.6), deren zugehörige Präimmunseren sowie die Immunseren, jeweils 1:10-verdünnt in *PBS/BSA* (Für Preblocks wurden 100 µl der Antikörperverdünnungen mit 33 µl *Antigenlösung* für 1 h bei RT inkubiert.).

Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer Klimakammer bei 100% LF, als sekundärer AK diente 1:100 verdünnter FITC-markierter *Anti Rabbit IgG*:

- 1) Primäre AK, bzw. Präimmunseren: 1 h
- 2) Waschen mit jeweils >25 ml *PBS* (2x kurz herunterspülen, dann 3x 5 min)
- 3) Sekundärer AK: 1 h
- 4) Waschen mit *PBS* wie 2)

Die Objektträger wurden mit *Aqua-Poly/Mount* betropft und mit einem Deckglas und Nagellack verschlossen.

3.8 Immunogoldmarkierung von *P.falciparum*-Kulturen zur Elektronenmikroskopie

Die nachfolgenden Arbeiten wurden zum Großteil von Dr. H. Schwarz (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt:

Durch Zentrifugation angereicherte Zellpellets (rote Blutzellen mit Trophozoitenstadien, erhalten von Dr. J. Kun) wurden in Zellosedialyseschläuche von 0,1 mm Durchmesser aufgenommen und nach einem Standardverfahren des Labors kryofixiert. Mit den eingefrorenen Zellen ist daraufhin eine Gefriersubstitution zum Austausch des Zellwassers gegen Ethanol (mit 0,5% Uranylacetat) durchgeführt worden. Anschließend erfolgte die Einbettung in Lovicryl K11M oder HM20.

Die primäre Markierung der geschnittenen Kunststoffeinbettungen erfolgte getrennt mit *AK 4020g* und *AK 4021g* (s. 3.6) in einem Verhältnis von 1:10 in *PBG* nach einem Laborprotokoll. Als sekundäres Agens diente ProteinA konjugiert mit 15 nm-Gold. Die fertig markierten Schnitte wurden einer Nachkontrastierung mit 1% Uranylacetat und Bleicitrat (4 mg/ml) unterzogen.

3.9 Aufarbeitung von transgenen Paramecien zur PCR-Kontrolle

Sechs Zellen wurden separiert und in 500 µl Ethanol für 15 min bei 4°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C (15 min, 15.000xg). Der Überstand wurde bis auf ~50 µl abgenommen, der Rest eingedampft [Vakuum (20 mBar), 40°C]. Dann wurde mit *ProteinaseK* für 1 h 30 min bei 56°C in einem Volumen von 150 µl (50 mM Tris HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 9,0; 0,5% SDS; 500 µg/ml *ProteinaseK*; 20 mM CaCl₂) verdaut. Die inkubierte Lösung wurde mit 75 µl S3-Puffer des *Nucleobond AX-Kits* einer Kaliumacetatfällung zur Abtrennung des SDS unterworfen (0°C, 5 min). Nach zehnssekündigem Abzentrifugieren in der Tischzentrifuge wurde der Überstand Phenol-Chlorform-extrahiert, dann ethanolgefällt und die Hälfte des in 10 µl Wasser resuspendierten Pellets in eine PCR eingesetzt (vgl. 3.1.12.2.5; Größe des Produkts: 470 bp).

3.10 Enzymtests

Siehe auch Literaturreferenz (84).

3.10.1 Adenylatcyclasetest

Zur Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivitäten von gereinigtem Protein oder Zellhomogenaten wurde radioaktiv markiertes α - ^{32}P -ATP verwendet, welches im Test zu α - ^{32}P -cAMP umgesetzt wurde. Der interne Standard zur Ausbeutebestimmung war (2,8- ^3H)-cAMP. cAMP wurde chromatographisch mit Hilfe zweier hintereinandergeschalteter Säulen isoliert (Säule 1: 1,2 g *Dowex-50WX40-400*; Säule 2: 1 g *Al₂O₃ 90 aktiv, neutral*).

Der Standardtest ist mit 100 μM ATP durchgeführt worden.

Ein Testansatz bestand aus 50 μl vorgelegtem *2x AC-Cocktail*, der Proteinprobe in 40 μl Volumen und 10 μl *10x AC-Startlösung*. Jeder Ansatz wurde doppelt angesetzt. Der Mittelwert wurde für die Auswertung benutzt. Negativkontrolle waren mit einem Leervirus (von Dr. P. Engel stammend) infizierte *Sf9*-Zellen.

Der *2x AC-Cocktail* wurde mit Stickstoffgas vor der MnCl_2 -Zugabe entgast, um die Oxidation des Mn^{2+} zu Braunstein zu verhindern. Sofern nicht anders angegeben, wurde mit Mn^{2+} getestet. Bei gereinigtem Protein wurde kein ATP-regenerierendes System verwendet, jedoch befand sich 20 $\mu\text{g/ml}$ BSA im vorgelegten *2x AC-Cocktail*.

Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurde mit 150 μl *1,5x AC-Stoppuffer* gestoppt, 750 μl Wasser zugegeben und alles auf Dowexsäulen aufgetragen. Nach dem Einsickern wurde je einmal mit 3 ml Wasser gespült und danach mit je 5 ml Wasser auf die Aluminiumoxidsäulen eluiert. Je 4,5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 eluierten die Proben in vorgelegte Szintillationsgefäße mit 4 ml *Ultima Gold XR Szintillator*.

Zur Regeneration der Säulen wurde wie folgt verfahren: Dowexsäulen: 1x 5 ml 2N HCl, 2x 5 ml Wasser; Al_2O_3 -Säulen: 2x 5 ml Tris/HCl pH 7,5.

3.10.1.1 AC-Test zur Bestimmung des pH-Optimums

Es wurden 45 μl *2x AC-Cocktail* (43,5% Glycerol, 20 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 4 mM cAMP inkl. $2\text{-}4 \times 10^3$ Bq/ml [2,8- ^3H]-cAMP, 4 mM MnCl_2) mit 5 μl des zu testenden Puffers und 15 μl *Sf9-Elutionspuffer* gemischt und 25 μl Proteineluat zugegeben. Der AC-Test erfolgte wie beschrieben.

3.10.2 Guanylatcyclasetest

Für die Bestimmung der GC-Aktivität wurde wegen der verwendeten Paramecium GC-HEK-Zellenhomogenate (Positivkontrolle) ein regenerierendes System verwendet. Im parallelen AC-Test wurde ebenso verfahren, obwohl hier mit gereinigtem Protein getestet wurde (Reagenzien in 2.5.3).

Zur Isolierung des cGMP wurden analog zum AC-Test zwei Säulen verwendet. Die erste Säule war mit 4 g Dowexmaterial befüllt, die zweite mit 0,8 g Al₂O₃. Das Spülen der Dowexsäulen nach dem Probenauftrag erfolgte mit 3 ml Wasser, die Elution auf die Al₂O₃-Säulen mit 2 ml Wasser. Mit je 4,5 ml 0,1 M Tris/HCL pH 7,5 wurden die Proben von den Aluminiumoxidsäulen in 4 ml *Ultima Gold XR Szintillator* eluiert. Die Säulenregeneration verlief identisch wie bei den AC-Testsäulen.

4 Ergebnisse

4.1 Homologieklonierung der Tetrahymena AC

Ausgehend von der Paramecium AC-Sequenz wurde via Homologieklonierung versucht, ein entsprechendes Gen des Ciliaten Tetrahymena pyriformis zu erhalten. So sollte es möglich sein, durch Vergleich Informationen über konservierte Proteinstrukturen zu erhalten.

Alle beschriebenen λ -Phagenbanken waren im Labor vorhanden.

4.1.1 PCR-Suche mit gewobbelten Primern

Mit dem Primerpaar *CIIIbAC1-s* und *CIIIbAC1-as* (von Dr. K. Hambach) wurde eine PCR mit sscDNA durchgeführt (3.1.12.2.2). In der Annahme, daß die kodierte Proteinsequenz etwa die gleiche Länge wie die Paramecium AC hat, wurden Produkte von ca. 450 bp erwartet. Zwei Banden wurden erhalten und sequenziert. Die niedriger laufende lieferte das gesuchte Produkt.

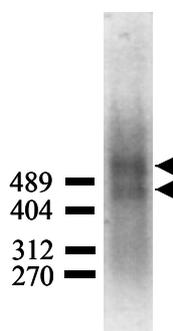


Abb. 3: Die mit *CIIIbAC1-s* und *CIIIbAC1-as* erhaltenen Banden (~2,5% Agarosegel)

Die Proteinsequenz zeigt 65%ige Identität zur Paramecium AC.

```

T.pyrif. : DATEVLQEDVMLFVNNIGDTVHTITDRFLGAANKNIGDAFLLVWRINEQKYSIND : 55
P.tetrau. : DATEVLQKDVMLFVNNIAELVHSMVDRYQGSANKNIGDAFLLVWKINDSOWYEDG : 599

T.pyrif. : ETNEISFSQKYLQILSDFACLAFRLIQSQVNRVPKILAYRRDKRLQDRIENYKV : 110
P.tetrau. : --NETKWSNLTFINQLADCALIAFMKIYAKINREPKILFYRNDERLSQRLPGYKV : 654

T.pyrif. : KMGFGLHMGWGIEGAIGSEFKIDASYLSP : 139
P.tetrau. : KMGFGLHIGWGIEGAIGSEFKIDASYLSP : 683

```

Abb. 4: Sequenzvergleich des gefundenen Tetrahymena AC-Fragments mit der Paramecium AC

Damit war eine Isoform der Paramecium AC in *T.pyriformis* identifiziert worden.

4.1.2 Screening der cDNA-Tetrahymenagenbank GB3

4.1.2.1 PCR-Suche mit spezifischen Primern

Ausgehend von der oben erhaltenen DNA-Sequenz wurden spezifische Primer festgelegt. Die Primer *ACTet1s* und *ACTet1as* (T_m : 47°C) dienen zu PCRn (3.1.12.2.3) mit den Fraktionen 1-21 der GB3 (je 5µl). Außer 12, 14, 16 und 21 waren alle Fraktionen positiv.

Fraktion 11 wurde in 16 Subfraktionen fraktioniert (\equiv GB 3 Fr.11/ Subfr.1-16).

Mit einer auf 44°C herabgesetzten T_m wurden mit diesen Subfraktionen weitere PCR-Reaktionen durchgeführt. Von den positiven Subfraktionen 6 und 15 ist *Subfraktion 15* für die anschließende Arbeit gewählt worden.

4.1.2.2 Suche mit radioaktiv markierter Sonde in GB3 Fr.11/ Subfr.15

Als Matrize für die radioaktive Sonde diente das PCR-Fragment aus 4.1.1. Mit insgesamt acht Platten zu ca. je 8300 pfu wurde ein Grobscreen angefertigt, der auf zwei Filtern Signale zeigte (3 und 7). Der gewonnene Klon (*Platte 3*) wurde einem Feinscreen unterworfen. So wurden insgesamt vier positive Signale detektiert, die zur Isolierung eines Einzelklons führten (*Klon 3*), mit welchem eine *in vivo excision* durchgeführt wurde.

Der Klon war 2705 bp lang. In der Sequenzanalyse war zu erkennen, daß der N-Terminus nicht vollständig war. Der Leserahmen begann in der zweiten Transmembranspanne.

```

P.tetrau. : MSEAQVNPEVDNQSVISEDSDNEDVDVFGDQDEIDKFPLLTSILDSSWSQILVN : 54
                -----TM1--

T.pyrif.   :                               FATEIIM-SMIEKKDYTFSS : 209
P.tetrau. : LLTIYALFGDDIRIIAFDKRADGFDVITIICMIIFSIEIIIASLV-RTDYFNS : 107
                -----TM2-----

T.pyrif.   : FFFWLDLLSTVSMILDINLLTNIMFNSGGNQINGIAKAGQ---ASRVGSKAGRVS : 260
P.tetrau. : FFFWLDIISTVSOILDITSFNIAVGLQGSVAAKSASQLSQANKASKTSSKAIRV : 161
                -----TM3-----

T.pyrif.   : VRLVRLIRIVKLYKAAQQQTDHSSSQTSQNNFKLMEKIRKRKMKKKVHPGPGDS : 314
P.tetrau. : VRLVRLIRIVKLYKAAYSYSEQAFKRQPIRTQTTKKSKATIYPSVYENINNGPV : 215
                -----TM4-----

```

Abb. 5: N-terminales Alignment zwischen dem gefundenen AC-Teilstück aus Tetrahymena und der Paramecium AC; die Bereiche der Transmembranspannen sind unterstrichen

Der C-Terminus war vollständig (das komplette Alignment findet sich in 4.9.3, S. 110 ff).

```

T.pyrif. : DQFIKDTKDLALIFETRNEEFQKNFAVGFISKYIDGNWSESKNVLNAGLKMCPDD : 949
P.tetrau. : ELYIKRNKDLGLITKNVNOEFLHOFGOGFYLLGNWKEAHMLFEKAKQIRPND : 835
          -----TPRL-----

T.pyrif. : GPTRTILEVMGSHGYOAPSDWVGFRELTEK. : 979
P.tetrau. : GPISITLTFNVMGETNFKAPSDWKGYRELTEK. : 865
          --C-Terminus--

```

Abb. 6: C-terminales Alignment zwischen dem gefundenen AC-Teilstück aus Tetrahymena und der Paramecium AC; TPRL und C-Terminus sind unterstrichen

4.1.3 Bestimmung des fehlenden 5'-Endes

Um zur Gesamtsequenz der Tetrahymena AC zu gelangen, wurde zunächst in einer genomischen Genbank gesucht. Der ORF wurde dann durch PCRn aus sscDNA bestimmt.

4.1.3.1 Suche nach einem genomischen Klon in der Genbank GB2 (Fraktionen 1-11)

Am 5'-Ende der bekannten Sequenz wurden die Primerpaare *ACTet2s* und *ACTet2as* festgelegt und die 11 Fraktionen (je 5 µl) der *MfeI*-geschnittenen genomischen Genbank GB2 via PCR untersucht (*Tm*: 48°C). Die Fraktionen 5 und 9 waren positiv, *Fraktion 9* mit der stärkeren Produktbande wurde in 20 Subfraktionen unterteilt (\equiv GB2 Fr.9/1-20).

Eine PCR unter den gleichen Bedingungen wies die Subfraktionen 2, 7, 9, 11 und 12 als positiv aus. Mit *Subfraktion 9* ist ein Grobsscreen durchgeführt worden (6 Platten). Als Sonde diente das PCR-Produkt des obigen Primerpaars aus genomischer Tetrahymena-DNA. Drei Platten (3, 5 und 6) zeigten jeweils einen Klon (a, c, b). Mit *Klon c* (Platte 5) wurde ein Feinscreen durchgeführt. Ein erhaltener Klon wurde ausgestochen (*Klon A, Platte 1*) und einer *in vivo excision* unterzogen. Der Klon war 8530 bp lang.

Im Vergleich mit der Sequenz des cDNA-Klons zeigte sich, daß der genomische Klon sechs Introns besitzt (Introns 5-10, vgl. 4.1.5, S. 59).



Abb. 7: Der 8,53 kb-Klon mit den sechs Introns (Kästchen; Nummerierung erfolgt im Vorgriff); der bisherige N-Terminus [vgl. Klon Abb. 5, FAIEII (ab bp 3287; bp 574 in 4.1.4)] ist eingetragen, das Stopcodon ist bei bp 6038-6040

4.1.3.2 Bestimmung des Leserahmens mit PCRn aus sscDNA

Zur Bestimmung des 5'-Endes und des Startcodons wurden PCRn mit sscDNA durchgeführt (Tab. 13, S. 31). Dazu wurde am 5'-Ende der genomischen Sequenz der Antisenseprimer *tetcdas* festgelegt und Reaktionen mit 5'-bindenden Senseprimern durchgeführt (*tetcd1s* und *tetcd2s*).

Der Primer *tetcd1s* lieferte ein Produkt, welches zwei weitere Introns enthielt (3 und 4). Mit *tetcd2s* wurde kein der Sequenz entsprechendes Produkt gefunden. Die Sequenzanalyse zeigte überraschend, daß beide Primer in das Intron 4 gelegt waren, *tetcd1s* durch eine Fehlpaarung jedoch weiter am 5'-Ende gebunden hatte.

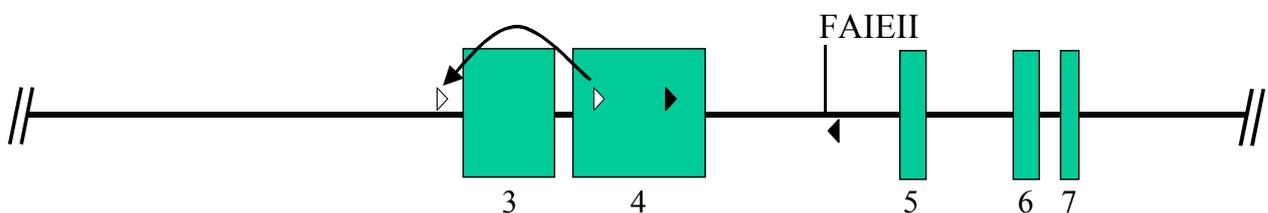


Abb. 8: vergrößerter und ergänzter Ausschnitt aus Abb. 7; die 5'-Fehlbindung des *tetcd1s*-Primers ist angedeutet (helle Dreiecke), die beiden neu gefundenen Introns (3 und 4) ebenso; *tetcd2s* liegt 3'-orientiert vom fehlgebundenen Primer, die Position von *tetcdas* ist unterhalb der horizontalen Linie angedeutet (schwarze Dreiecke)

Das 5'-Ende war nicht gefunden, es wurden PCRn mit den noch weiter zum 5'-Ende orientierten Senseprimern *tetcd-1strue*, *tetcd-1s/n*, *tetcd2s/n* und dem *tetcdas*-Antisenseprimer durchgeführt. Alle Primer lieferten Produkte, welche der gesuchten Sequenz entsprachen. Zwei weitere Introns (1 und 2) wurden gefunden (vgl. Abb. 10).

Mit diesen Informationen konnte gezeigt werden, auf welche Sequenz der *tetcd1s*-Primer gebunden hatte.

```
tetcd1s : CAT--GATTATAAAATTGGA : 18
T.pyrif. : CATAAGATGATTAA---GGA : 147
```

Abb. 9: Alignment des *tetcd1s*-Primers mit der Sequenz auf die er gebunden hat; grau: bindende Basenpaare (Positionsangaben der Tetrahymena AC bezogen auf 4.1.4)

Durch weitere PCRn mit *tetcd-4s/n*, bzw. *tetcd-3s/n* und jeweils *tetcdas* als Antisenseprimer wurde die Position des Startcodons festgelegt. Mit dem weiter zum 5'-Ende orientierten Primer (*tetcd-4s/n*) wurde auch bei variierten Primerbindetemperaturen kein Produkt erhalten (43°C, 49°C, 52°C). Das Primerpaar *tetcd-3s/n*, *tetcdas* lieferte eine Produktbande (640 bp), welche die erwartete Nukleotidabfolge hatte.

Die bekannte Sequenz reicht also zumindest bis -19 bp vor das erste mögliche ATG-Startcodon, welches durch ein im Leserahmen befindliches TGA-Stopcodon (bp -18 bis -16) bestätigt wird (vgl. 4.1.4).

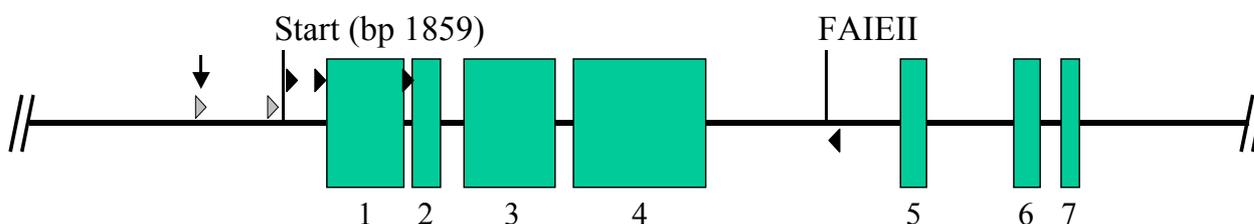


Abb. 10: Suche nach dem Startcodon: der weiter zum 5'-Ende orientierte *tetcd-4s/n*-Primer (Pfeil) lieferte im Gegensatz zum weiter 3'-orientierten *tetcd-3s/n* kein Produkt (graue Dreiecke); die Positionen der Primer mit deren Hilfe die ersten beiden Introns gefunden wurden sind ein Stück nach oben versetzt angedeutet (von 5' nach 3': *tetcd-2s/n*, *tetcd-1s/n*, *tetcd1strue*), der Antisenseprimer *tetcdas* ist unterhalb der horizontalen Linie markiert (schwarze Dreiecke)

Die genomische Sequenz mit der Angabe aller Introns wurde unter der Zugangsnummer AJ491316 in den *EMBL/Genbank/DDBJ-Databases* als *ac1* gene von *T.pyriformis* hinterlegt.

Die cDNA-Sequenz (ACC: AJ276392) ist in 4.1.4 ersichtlich.

4.1.4 cDNA-Sequenz der Tetrahymena AC

-19	1	
ttgagatagataccggttta	ATGTCATAAGAAAAGCTCAGAGAAGTGGAAATAAATACACTCCAGAACAGCG	52
	M S Q E K L R E V E I N T L Q N S	17
AGTCAAAAATGAATTCTCATGAAAAGCAAAGTTAAAATCATGAACATGCTGTACCTTACCTCATAAGTAG		123
E S K M N S H E K Q S Q N H E H A V T L P H K Q		24
CAATAGTCATAAGATGATTAAGGAGAAGAAGAAAAAATCGTTTACTGAAATAGGACTCATCAGATAAGAA		194
Q Q S Q D D Q G E E E K N R L L K Q D S S D K K		65
AAATCAGAATAGAACCTCCATTGATACTAATTCAAAAAACGAAGCCACAGAAGCATTAACTGAGCTTACAA		265
N Q N R T S I D T N S K N E A T E A L T E L T		88
AGAAAGTTAATCCCAGAATTTCTTAAATTGGCTTAGAAGCCTAAAGAGAATCTAATAGGAGTGATTCTGCT		336
K K V N P R I S Q I G L E A Q R E S N R S D S A		112
TCTAATTAAGAAGATACTAAGAATTTATCTATTTTTAAGGATGAAGAAGAAAAGAAAGAATAAGCAAATAA		407
S N Q E D T K N L S I F K D E E E K K E Q A N K		136
GCCAAGAATAAAAATATTTAAGATTGTATTGGAAAGCCATATCTTTTCAATTTTAATTAATGTCTTTACTA		478
P R I K I F K I V L E S H I F S I L I N V F T		159

TTTACTCTTTGTTTCTGCTGATAATATTAGAATCATGACAACAAGAGAAAGTGCAGATTTAGGTTTTGATGTT	549
<u>I Y S L F A</u> D N I R I M T T R E S A D L G F D <u>V</u>	183
TGCACCATAAATTGCACTTAGTTTATTTCGCAATAGAAATTATAATGAGTATGATTGAAAAGAAGGATTACAC	620
<u>C T I I A L S L F A I E I I M S M I E K K D Y T</u>	207
TTTTTCTTTCTTCTTCTGGTTAGATTTACTCTCAACTGTTTCTATGATTCTTGATATAAAATCTGCTTACTA	691
<u>F S F F F W L D L L S T V S M I L D I N L L T</u>	230
ATATTATGTTTAACTCTGGTGGTAATTAATTAATGGTATTGCCAAGGCAGGTTAAGCTTCTCGTGTGGT	762
N I M F N S G G N Q I N G I A K A G Q A S R V G	254
TCTAAAGCTGGTAGAGTAGTAAGACTTGTAAGACTTATTCGTATTGTAAAGTTATATAAAGCAGCACAATA	833
<u>S K A G R V V R L V R L I R I V K L Y K A A Q Q</u>	278
ATAAACAGATCACAGCTCAAGTTAAACATCTTAGAATAATTTTAAACTAATGGAAAAGATCAGAAAGAGAA	904
Q T D H S S S Q T S Q N N F K L M E K I R K R	301
AGATGAAAAAGAAAGTCCATCCTGGTCTGGAGATTCAAAGGGTATTTCTGATTCTAAAGGTCCAAATGAT	975
K M K K K V H P G P G D S K G I S D S K G P N D	325
TCTAGTGGTTAATTC AATGAATAAGAGGAAGGAAGTAAATCATAAGTACAGACATCAACTAAAGAATC	1046
S S G Q F N E Q E E G S K S Q V Q T S S T K E S	349
TTCAATCTAACAAAAGGGAGGGTTAATCCACCAAAAAGAACTAAAGTATCTAAAATTCTCACTGATATCA	1117
S I Q Q K G G F N P P K E S K V S K I L T D I	372
CTACAAAAAGAGTTATTATATTAGTCTTAGTCCTCGTTTTTCATTATGCCACTTTTTCTCTGTTGACTATTAT	1188
<u>T T K R V I I L V L V L V F I M P L F S V D Y Y</u>	396
TTTGACCCACCTTCTCCTATTGAGATCTCTGTGAAGTAGATAAAGATGGTTTGTGAAAGTTAACTACTCT	1259
F D P P S P I E I S V K Q I K M V C E S Q T T L	420
TACTGATATCAAGAATTAATGGATTATATTGTCTAAATGTTTGATTCAATCTCTGCTACTTTTACTAT	1330
T D I K N Q M D Y I V Q M F D S I S A T L S L	443
TCTAAACACCTTTCCAGATTCAATTTATGAAGGAGTATAAAGATAGTGATTATCATAATCTACGTGATGAA	1401
F Q T P F P D S F M K E Y K D S D Y H N L R D E	467
GAGCAACTGGGTATAATTTATACTATTGACTATGATACTTTTTGTAAAATACCATCCACCTTCTGATTCAAC	1472
E Q L G I I Y T I D Y D T F V K Y H P P S D S T	491
TGCATAATCTATAAATTCCTATCTCAAACAAAACTAGATTCTGATGGAGCTCTCAATATTATAGGTATTA	1543
A Q S I N S Y L K Q K L D S D G A L N I I G I	514
TTTCTACTAGAGACTCAGCTGTAATTAGTGCCGGTCTTTTCATTCTGTTCTACTATCTTTGTCTGTATTGTT	1614
I S T R D S A V I S A G L S <u>F C S T I F V C I V</u>	538
CTCACTGCAGGTGCTCTTCTTTTCTCTAAAGATGCTAATGATTTAGCACTTGGTCCTATTGAGCGTATGAG	1685
<u>L T A G A L L F</u> S K D A N D L A L G P I E R M R	562
AGATAAGGTTATCGCTATTGCTAATGATCCTCTTTCTTCCAAAGATTAGAACTAATCAGCGATGATGAAA	1756
D K V I A I A N D P L S S K D Q K L I S D D E	585
ATAAGGAATAATATGAAACAGTTATTATAGAAAATGCTATTGTAAAATTTGGTACCCTTCTTGCTCTTGGT	1827
N K E Q Y E T <u>V I I E N A I V K I G T L L A L G</u>	609
TTTGGTGAAGCAGGTTCTGAAATCATTGCTATTAATATGGGTAGATAAGGTGATGTTGACCCTATGATTCC	1898
<u>F G E A G S</u> E I I A I N M G R Q G D V D P M I P	633
TGGTAAAAAAAATGTGCTATTTATGGATTTTGTGATATCAGAACTTTACAGATGCTACAGAAGTTTTGC	1969
<u>G K K K C A I Y G F C D I R N F T D A T E V L</u>	656
AAGAAGATGTTATGCTTTTTGTCAACAATATTGGTGATATTGTGCATACTATTACAGACAGATTCTTGGGT	2040
<u>Q E D V M L F V N N I G D I V H T I T D R F L G</u>	680
GCTGCAATAAAAAATATCGGTGATGCCTTCTTATTAGTCTGGAGAATTAACGAATAGAAATATAGTATTA	2111
<u>A A N K N I G D A F L L V W R I N E O K Y S I N</u>	704
TGATGAAACAAATGAGATCAGTTTCAGTGATTAGAAATACATTCAAATCCTAAGTGATTTTCGCTTGTCTTG	2182
<u>D E T N E I S F S D Q K Y I Q I L S D F A C L</u>	727

CTTTCTTGAGAATTTAATCATAAGTTAATAGAGTTCCAAAGATTCTTGCTTATCGTCGTGATAAGCGTTTA	2253
<u>A F L R I O S O V N R V P K I L A Y R R D K R L</u>	751
CAAGACAGAATTGAAAATTATAAGGTTAAAATGGGTTTTCGGTCTCCATATGGGTTGGGGTATTGAAGGTGC	2324
<u>Q D R I E N Y K V K M G F G L H M G W G I E G A</u>	775
TATTGGTTCTGAATTCAAAATCGATGCATCCTATCTCAGTCCAAATGTCAACATGGCTGCTCGTTTAGAAG	2395
<u>I G S E F K I D A S Y L S P N V N M A A R L E</u>	799
CTGCTACTAAATAGTATGGTGTCCCTCTTCTAATTTCTTCTGATCTCTAAGCTTATTTCTCTCCTGAAATG	2466
<u>A A T K O Y G V P L L I S S D L O A Y F S P E M</u>	822
AAATCATTCAAGATATATTGACAGAGTAACAGTTAAGGGTTCAATTCGTCCTATTGGCCTTTACTACTGT	2537
<u>K S F T R Y I D R V T V K G S I R P I G L Y T V</u>	846
TGATATGGATGTAGAGAATTTGCCCCCTAAAAAGAAGTACCTAATTTCTCTAAATATGATATTCATA	2608
<u>D M D V E N L P P K K E L D P N F S K Y D I H</u>	869
GTATGAACCAAGTAAAGAAGGAAGAAATGAAGGAATACATGGAATTAGCTCTTTCTAACGAAGAACCTTGG	2679
<u>S M N Q V K K E E M K E Y M E L A L S N E E P W</u>	893
AATGCTGATTAATTTATTAAAGATACAAAGGATTTGGCTTTAATATTTGAAACAAGAAATGAAGAGTTCCA	2750
<u>N A D Q F I K D T K D L A L I F E T R N E E F Q</u>	917
AAAGAATTTTGCTGTTGGTTTCTCCAAGTACATAGATGGTAATTGGAGTGAGTCCAAAAATGTGTTAAATG	2821
<u>K N F A V G F S K Y I D G N W S E S K N V L N</u>	941
CTGGGCTTAAGATGTGCCCTGATGACGGTCCTACAAGAACTATTCTTGAAGTAATGGGTAGTCATGGTTAC	2892
<u>A G L K M C P D D G P T R T I L E V M G S H G Y</u>	964
TAAGCACCATCAGATTGGGTAGGTTTTAGAGAAGTACACAGAAAAATGATTATCGAGAAATAAAGTTTACAT	2963
<u>Q A P S D W V G F R E L T E K</u> .	979
AATTCTAATTTAATAAATATAAATATTAATTCTAATATGGAAAATTTGATCTATCACTCTTCTAACTAAT	3034
CTTCTAATTATATACAATAAATAAGCCCTTACCTTGATTATTTTCTTGCCTCCCTCTTCCATTCTCTAACA	3105
ATCACTACTTCGAAGCATGCACTTACTTGCATGCCTAACTTTATTTTTAGGAATATTAATTATTAACCTTC	3176
ATATCATAGTTATCGTAATAGTTGTTTATGTGAACTATTAGATTTAAGGATTTATTGCTTTCAAAAAAAA	3247
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	3274

Abb. 11: Die cDNA-Sequenz der Tetrahymena AC (ac1 gene): TM 1-6, Poreloop, katalytischer Bereich, IPRL, C-Terminus sind entsprechend unterstrichen, das im Leserahmen befindliche 5'-terminale tga ist hervorgehoben (bp (-18)-(-16))

4.1.5 Introns der Tetrahymena AC

Tab. 22: Die zehn Introns der Tetrahymena AC; Positionen bezogen auf 4.1.4

Intron	Position	Sequenz
1	120/121	GTTCATATTACTATTCATTATTATTTCAAATGATTGCTAAATATTTATGTTG AATTGAAATAAAAATTCAGGATTTTCTTCATTTATGAAATATATAGTTTCAT GGAGCATTATTCTAAATTATTATTTCCACCGATTTTCTATTTAGCAAATTATT TTTTTGAAAATGTATTATATTTTTTTTTTTATCTAATTCCTCTAG (200 BP)
2	144/145	GTAAAAAGTTTTAGATATTGAATATCATAGCCTAATCCAAATAACCTTTATT ATCATTAATAG (64 bp)
3	202/203	GTATTTATATTTTAATTTAGATTTATTTTAAGGGAAAAAGCAAGTTAGTTGT GTTTCTTGTCCTCATTGATTTAGAGGATGAATGACAGAAAATTTAAAGCA GTATTATTGATTAAAAACTGATAGTTTTTACATATTACACTTCAAACCTT TTTTATATAACATTTGCAAAGGACTCATTACCAGCTATTTCTCTCGAAAT ATTTTCCAATATTGAAATAATTTATTAATAAACAG (242 bp)
4	254/255	GTAATTTTTTAAAAACTTTCTTTTCAGGAATTTTTTAAATTTTATCAAC ATGATTATAAATGGGAGTTTATTTACTACCCTTTATTTAATAAGTTAAGCG AATTTATTAATTTTATTTATTTATTTTAAAAACCAAGAATCAAAGTTAATTT TGTTTATTGAATTATTTAAAAGAGATAGTTATTTTTTATAATTTTTTTTGCA TAAATAAATTTATTTTACTCTTTCCATAAATTTACAAATGTTTTTTGATTA TTTTTAAAACACTAAAGTTACATTTAATTAACAATCAAGTTTCTTTTGAAA TTCTTATTTAATCAAATTAATTCTTATTTAATAG (349 bp)
5	767/768	GTAATTAATTAGGTTTGAGTATAATAAATTAGTATTTTTTTTTTAAAAAAA ATTTAATTAG (62 bp)
6	1003/1004	GTAATTTCTTTAAAATATAGATGAATTTTATTTGTAAAATGAATGAATGTAT TTAAATTTAATAG (66 bp)
7	1062/1063	GTAAATTCCTTCTTTTTAAATTGTGTTTTTAAAAATAGTTTATTAAAAAAG (50 bp)
8	1840/1841	GTAAATAATTTATACCATAAACTCCTGACCAATTATATTTAATTATTTTTT TATTATTAATTTAG (66 bp)
9	1971/1972	GTAATTTATAAATTGTCAAATTATCTATTCAATAAATTAATGAAAAAAT AATTAATTAG (61 bp)
10	2604/2605	GTAATTTATAAACTATTTTATTATTTCTAATCCAAAGTAGAACCTTAAGT TCTAACATGTTTTTAAATTAATTATAG (81 bp)

4.1.6 Tetrahymena AC-Isoformen

Mit den *gewobbelten* Primern *tetACiso-s1* und *tetACiso-as1* wurden PCRn mit sscDNA von *T.pyriformis* angesetzt (Tab. 15, S. 33). Eine Bande, die etwa der erwarteten Größe entsprach (312 bp), wurde subkloniert und zwölf Einzelklone sequenziert.

Es fanden sich zwei Fragmente von Isoenzymen der Tetrahymena AC (die von den Primern überspannten ASn sind nicht wiedergegeben)⁶:

```

Isoform 1      : AFLLVWKFREODYLNKHD-GSMFELPNDITSNYADLSVIAFLKIMAGITLSND
Isoform 2      : AFLLVWKFREODYLNKLD-GGVEFLKNDITSNYADCSVLSFIKIMAAITLSNK
Tetrahymena AC : AFLLVWRINEOKYSINDETNEISFSDQKYIQILSDFACLAFLRIQSQVNRVPK
Paramecium AC   : AFLLVWKINDSQWY--EDGNEIKWSNLTFINQLADCALIAFMKIYAKINREP

```

```

Isoform 1      : LKKYKHNPGLKARLRGYRVKMGFGLHFGWAIEGAIGSSF : 97
Isoform 2      : LRKYKHHPGLOKRLKGYRVKMGFGLHFGWAIEGAIGSDF : 97
Tetrahymena AC : LLAYRRDKRLQDRLENYKVKMGFGLHMGWGIEGAIGSEF : 780
Paramecium AC   : LLEYRNDERLSQRLPGYKVKMGFGLHIGWGIEGAIGSEF : 674

```

4.2 Paramecium AC-Isoformen

Analog oben wurde mit dem gleichen Primerpaar auch aus 700 ng genomischer Paramecien-DNA eine PCR-Suche nach Isoformen durchgeführt.

Eine Bande, die etwa der erwarteten Größe von 312 bp entsprach, wurde subkloniert und acht Einzelklone sequenziert. Es fanden sich drei neue Isoformen (die von den Primern überspannten ASn sind nicht wiedergegeben)⁷:

```

Isoform 1      : AFLLVWKTREP-ETYSFEEDN--VIWHDKOYXSIISDCALISFMKIQCKTINREP
Isoform 2      : AFLLVWKF--ESDYQDKDGNLSLKSYEHTXQIADMSILSFVTIITNVTLSQK
Isoform 3      : AFLLVWKYLPMEYHPNPONPSKLVKTDHHTKQKGDMAVLAFLKIITSISISKK
Paramecium AC   : AFLLVWKIN--DSQWY-EDGNEIKWSNLTFINQLADCALIAFMKIYAKINREP

```

```

Isoform 1      : LLAYRODKRLQARMDNYKVKIGFGLHMGWGIEGAIGSNY : 90
Isoform 2      : LQYKQHEGLNRIIPNYSVKMGFGLHVGWAIEGAIGSEY : 91
Isoform 3      : LERYKHAGLNARMKDYSVKMGFGLHMGWGIEGAIGSSF : 93
Paramecium AC   : LLEYRNDERLSQRLPGYKVKMGFGLHIGWGIEGAIGSEF : 103

```

⁶ Die Isoformen 1 und 2 wurden unter ACC AJ536336 und AJ536337 als partielle ac2- und ac3-Gene aus *T.pyriformis* hinterlegt.

⁷ Die Isoformen 1-3 wurden unter ACC AJ536333, AJ536334 und AJ536335 als partielle ac2-, ac3- und ac4-Gene aus *P.tetraurelia* hinterlegt.

4.3 Plasmodium AC

4.3.1 Kontrolle der genomischen Sequenz

Im *P.falciparum* Genomprojekt wurde von Dr. J. Linder eine DNA-Sequenz von 24,8 kb gefunden (Chromosom 14, Contig 5265, keine ACC), welche zur *Paramecium AC* ähnliche Bereiche enthielt. Zur Überprüfung wurden *Air Thermo-Cycler-PCR*n (s. 3.1.12.1) mit genomischer *P.falciparum*-DNA und Primern aus 2.3.3 durchgeführt und die Produkte sequenziert [Die invertierte Sequenz (ohne die ersten 290 und die letzten 8 bp) entspricht bp 143858-168324 auf Chromosom 14].

{Zunächst fanden 18mere als Primer Verwendung. Um Produkte zu erhalten, war ein hoher Optimierungsaufwand (Variation der T_m , Zusätze in den PCR-Ansatz) notwendig. Besprechungen mit Dr. Kun und seinen Mitarbeitern ergaben, daß längere Primer (25mere) aufgrund einer höheren Matrizenaffinität [80% AT-Gehalt des Plasmodiumgenoms (TIGR, Institute for Genomic Research)] besser geeignet sind und wurden fortan verwendet.}

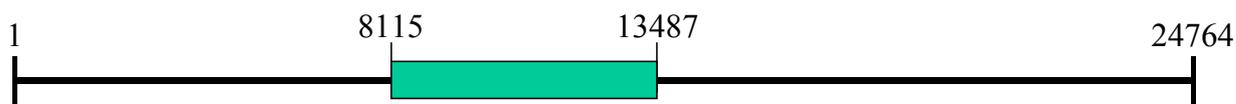


Abb. 12: Der sequenzierte Teil (5372 bp) des 24,8 kb-Genbereichs (s.o.)

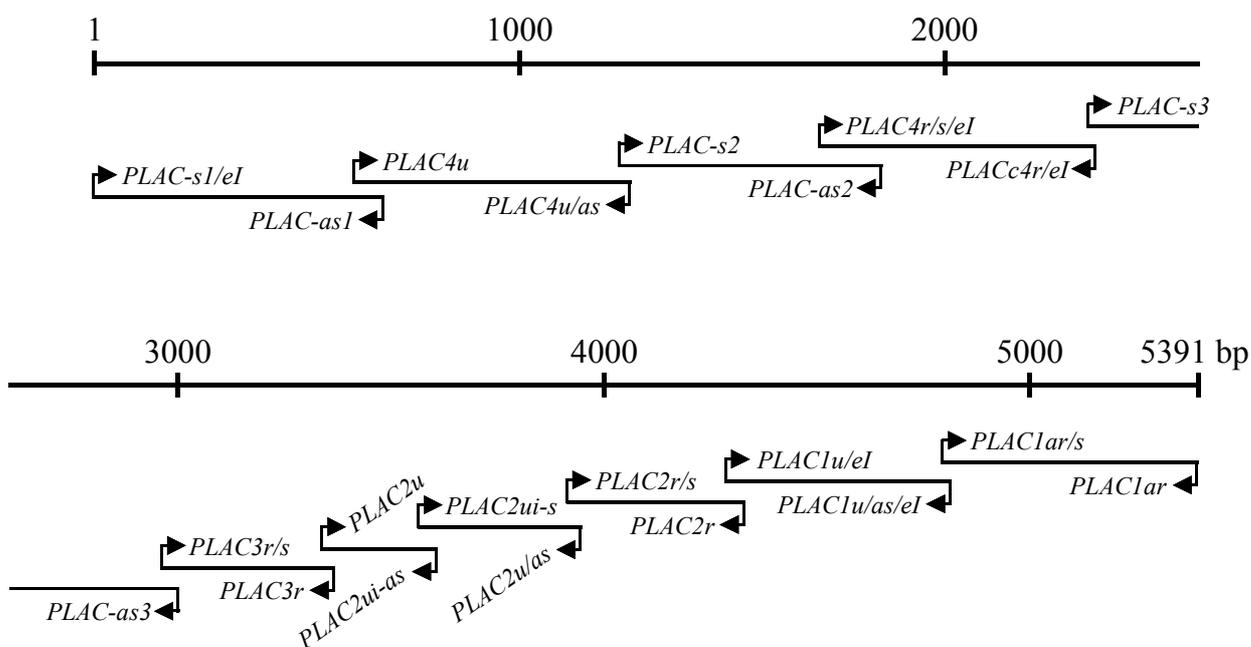


Abb. 13: Die relative Lage der überlappenden PCR-Produkte zueinander. Die Skalierung bezieht sich auf die Sequenz inklusive der flankierenden Primer. Die Längendifferenz von 19 bp beruht auf Unterschieden in Intronbereichen (5372 bp im Genomprojekt, 5391 bp hier; vgl.u.)

AGATACTTTGAAACAAAGATATATGAATCCAAAGATTTTATATTTTCATATAAATATAAAGAGATATATAGAAAGAACTATT	2592
<u>R Y F E T K I Y E S K D F I F H I N I K R Y I E R T I</u> D T L K Q R Y M N P K I L Y F I . I . R D I . K E L L E I L . N K D I . I Q R F Y I S Y K Y K E I Y R K N Y	
AAAAATATTATAATATTGAAAATTTTATTATAATAGTAAATATAAAACAAATGAAAAAAAAATATATATATGTATATA	2673
<u>K N I I I L K I F I I I V N I K Q I E K K N I Y M Y I</u> K I L . Y . K Y L L . . . I . N K L K K K I Y I C I Y . K Y Y N I E N I Y Y N S K Y K T N . K K K Y I Y V Y	
TATATATATGTGTATTATTTATAATATATTATAAATTTCTTATGATTTACTCATCTTTCATTTTTGTATTTCTTTCAGTT	2754
<u>Y I Y V Y Y L . Y I I N F L . F T H L S F L Y F F A V</u> I Y M C I I Y N I L . I S Y D L L I F H F C I S L Q F I Y I C V L F I I Y Y K F L M I Y S S F I F V F L C S	
TTCTTTTATAATATTGTCTATTTTACATGTGAATTAATGTCTTATTATTTCCATAGAAAGCATATTGAAAAATTTAA	2835
<u>F F Y N I V L F Y M . I K C L I I S Y R K H I E K I K</u> S F I I L F Y F T C E L N V L L F P I E S I L K K L K F L L . Y C S I L H V N . M S Y Y F L . K A Y . K N .	
ACTTATGAAGTACTTTTATATAGATATTTATACATATTTTGTGTGTAGAATATTATTATGTATACAGTAATACATTTTTTT	2916
<u>T Y E V L L Y R Y L Y I F C V . N I I M Y T V I H F F</u> L M K Y F Y I D I Y T Y F V C R I L L C I Q . Y I F L N L . S T F I . I F I H I L C V E Y Y Y V Y S N T F F	
ATTTTTTATTTTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGATCCAATCCGACCTTAGCTTTGGAAATGCAAGAAGAAATTATG	2997
<u>I F Y F Y F F F F F F C R S N P T L A L E M Q E E L L</u> F F I F I F F F F F F V D P I R P . L W K C K K N Y . Y F L F L F F F F F F L . I Q S D L S F G N A R R I I	
AACCATGAGTTAAAAATATATTAATAAACACAAAATGAAGAGGTGAATTGTGATTTTCATATATATAAAGAAAAGAA	3078
<u>N H E L K N I L I N T K L K R . I V I S Y I . . E K N</u> T M S . K I Y . T Q N . R G E L . F H I Y N K K R I E P . V K K Y I N K H K I E E V N C D F I Y I I R K E	
AATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCTTCTTTGATTTCAAATAAAAAATATATTTAAGTGTGTACAGT	3159
<u>N . K K K K K K K K K K A F F D F K . K Y I . V L Y S</u> I K K K K K K K K K R L S L I S N K N I F K C C T V . L K K K K K K K K K K G F L . F Q I K I Y L S V V Q	
TGCAATGAAAAATACCTATTAGACAAAAATATAATAATATAAAGAAAAATAAGACAAAAAATAAATATATATATAT	3240
<u>C N G K Y L L D K N I I I Y K K N K T K K K K I Y I Y</u> A M E N T Y . T K I . . Y I R K I R Q K K K K Y I Y I L Q W K I P R Q K Y N N I . E K . D K K K K N I Y I	
ATATATATATATATATATATATATATATATATTTTCCATAGGAAAAGCATTAAAGAAAATTATGAAATTTTAAAAATGGA	3321
<u>I Y I Y I Y I Y I Y I Y I F L . E K H . R K L . N F K N G</u> Y I Y I Y I Y I Y I Y I F S Y R K S I K E N Y E I L K M E Y I Y I Y I Y I Y I Y I Y F P I G K A L K K I M K F . K W	
AGAAACTTAATGAAATTAGGAACATTAATGTTATTAGGTTATAAGAGGGAAAAAATAACATACATATATATATAT	3402
<u>R K L N E I R N I N V I R L . E G K K K N T Y I Y I Y</u> E N L M K L G T L M L L G Y K R E K K K I H T Y I Y I K K T . . N . E H . C Y . V I R G K K K Y I H I Y I	
ATTTATATTTATTTATTTATATATATGCTCTTTATAATATATAAATGCTTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	3483
<u>I Y I F I Y I Y I C S L . Y I K M L . F F F F F F F F</u> F I Y L F I Y I Y A L Y N I L K C F N F F F F F F F F Y L Y I Y L F I Y M L F I I Y . N A L I F F F F F F F F	
TTTTTTTTTTTGTATTGATTTTCTAGGTTTTTGGTGAAGCAGGAGCGAAAAATATCTCAAAAAATTAACGAACAGGAAA	3564
<u>F F F L F M I F . V L V K Q E R K L S Q K I L T N R K</u> F F F C L . F S R F W . S R S E N Y L K K Y . R T G K F F F V Y D F L G F G E A G A K I I S K N I N E Q E	
GAGTAAATTTATGATCAATGGAGAAATCGTTTATTCTGTTTTTCTTTTTCGACATAAGAAATTTACAGAAATAACAG	3645
<u>E . I Y . S M E K S F I L F F P F A T . E I L Q K . Q</u> S K F I D Q W R N R L F C F F L L R H K K F Y R N N R R V N L L I N G E I V Y S V F S F C D I R N F T E I T	
AAGTTTTTAAAGAAAAAGTAAAGCATATAAAATATGTTTTGTTATACTACTTGAGGAAATAAATAGACGCACACACATA	3726
<u>K F . K K K . K H I K Y V L L Y Y L R E I N R R T H I</u> S F K R K S K S I . N M F C Y T T . G K . I D A H T Y E V L K E K V K A Y K I C F V I L L E G N K . T H T H	
TATATATATATATATATATATATATATATATTTTATTTTATATAAATTTAACAGATTATGATTTTTCATAAATTTGATG	3807
<u>Y I Y I Y I Y I Y I Y I F I Y L Y K F N R L . F S . I . L</u> I Y I Y I Y I Y I Y I Y L F I Y I N L T D Y D F H K F D C I Y I Y I Y I Y I Y I Y I Y L F I . I . Q I M I F I N L I	

CTTTTACATTTTGTAGCTTTATGAAGAATATGCAAAAAATGACGACATAAAATTCATAAAGATACACTATCCTAAAGATTAT	5184
<u>L L H F . L Y E E Y A K N D D I K F I K I H Y P K D Y</u>	
F Y I F S F M K N M Q K M T T . N S . R Y T I L K I I	
T F T F L A L . R I C K K . R H K I H K D T L S . R L	
TTGGAACAATTCAAAATGCCCCTTGAGTCATATTTAATAGGGAAATGGAATGAATCAAAAAATATATTAGAGTATTTAAAA	5265
<u>L E Q F K I A L E S Y L I G K W N E S K N I L E Y L K</u>	
W N N S K L P L S H I . . G N G M N Q K I Y . S I . K	
F G T I Q N C P . V I F N R E M E . I K K Y I R V F K	
AGAAATAATATTTTGAAGATGAAATCTTAATCAGCTGTGGAACCTTTTGTAGTATGAACAATTTTATTGCACCCAGTGAT	5346
<u>R N N I F E D E I L N Q L W N F L S M N N F I A P S D</u>	
E I I F L K M K F L I S C G T F . V . T I L L H P V I	
K K . Y F . R . N S . S A V E L F E Y E Q F Y C T Q .	
TGGTGTGGATATAGAAAATTTTACAAAAGTCATAAAAATTATTT	5391
<u>W C G Y R K F L Q K S . K L F</u>	
G V D I E N F Y K S H K N Y	
L V W I . K I F T K V I K I I	

Abb: 14: Die Sequenz mit den vermuteten für die Plasmodium AC kodierenden Bereichen (unterstrichen)

Es wurden Sequenzabweichungen wie Basenaustausche und -verluste sowie „Repeat“verdopplungen und Einschübe gefunden. Diese waren jedoch stets innerhalb von (bis dahin noch postulierten) Introns lokalisiert und sind in 4.3.2.4 vermerkt.

4.3.2 Bestimmung der cDNA-Sequenz

Da ein durchgängiger Leserahmen nicht eindeutig erkennbar war, mußte davon ausgegangen werden, daß Introns vorhanden sind. Im Vergleich mit der Paramecium AC-Proteinsequenz war es möglich, Intron-/ Exonbereiche vorauszusagen und Primer für kodierende Bereiche festzulegen.

Mit diesen Primern (vgl. 2.3.3) und Reverser Transkriptase wurde die mRNA in sscDNA umgeschrieben und anschließende PCRn durchgeführt (3.1.11). Es wurden gleichzeitig unterschiedlich große Produktbanden amplifiziert. Die Banden wurden zunächst alle sequenziert, die größeren enthielten noch ungespleißte Introns. Später wurden nur noch die kleinsten Banden unter der Annahme sequenziert, daß sie vollständig gespleißte Produkte darstellten.

Bei einem vermuteten Intron (Intron 3) war es unmöglich, mit RT-PCRn das gespleißte Produkt zu amplifizieren. Für diesen Zweck wurde mit den beiden cDNA-Phagenbanken *MRA-61* (5 µl) und *MRA-101* (1 µl) eine PCR mit dem Primerpaar *PLACc7s/c* / *PLACcas5* durchgeführt (Tab. 16, S. 33). Nur aus *MRA-61* wurde eine kaum sichtbare Bande erhalten (nicht wiedergegeben), die der erwarteten Größe entsprach (245 bp).

Beide PCR-Ansätze wurden 1:10 verdünnt und je 2 µl in eine *nested-PCR* mit dem *Air Thermo-Cycler* eingesetzt [Primer *PLAC4u* und *PLAC-as/eI*; 49°C Primerbindetemperatur, 21

Zyklen (Tab. 12, S. 31)]. *MRA-101* lieferte wiederum kein Produkt, aus der anderen Bank wurde die erwartete Bande von 145 bp amplifiziert, welche das gesuchte Produkt war.

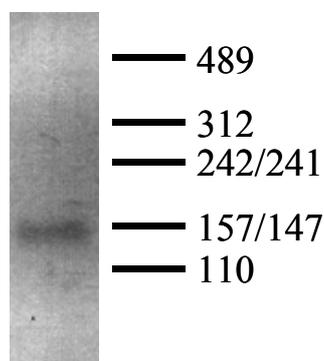


Abb. 15: Suche nach Intron 3: die aus *MRA-61* durch *nested-PCR* erhaltene Bande (~4% Agarosegel)

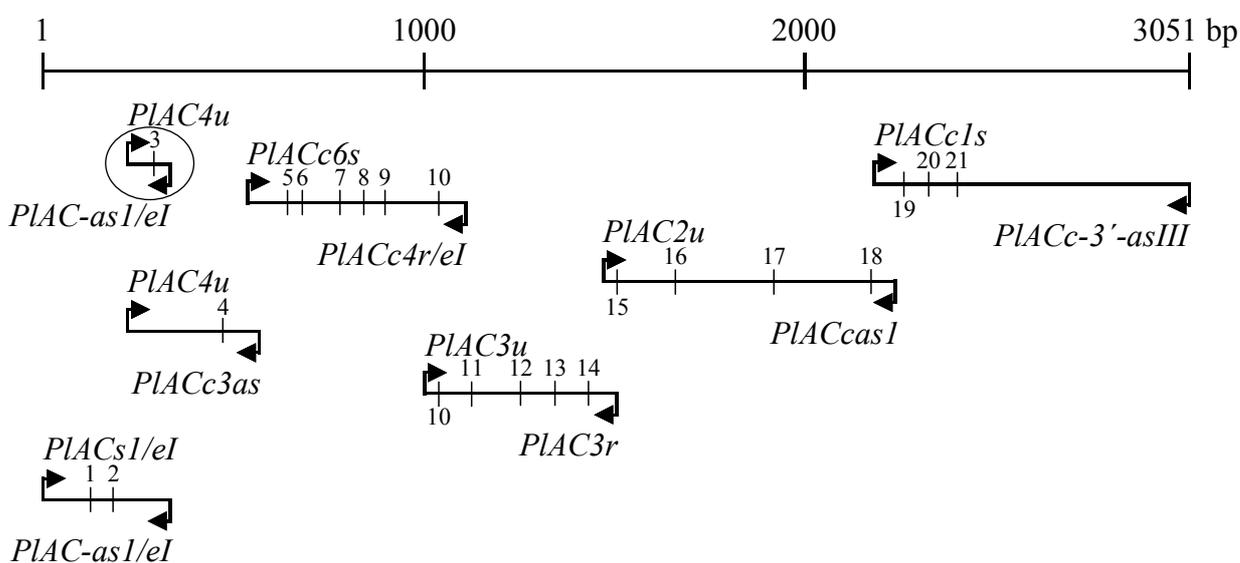


Abb. 16: Bestimmung der Plasmodium AC-cDNA-Sequenz; oben: Skalierung, die Zahlen 1-21 indizieren Positionen ausgespleißter Introns der mit den angegebenen Primern erhaltenen Fragmente. Das aus der *MRA-61*-cDNA-Phagenbank erhaltene PCR-Produkt ist umkreist

Durch die überlappenden Fragmente war es möglich, zu einem cDNA-Klon von 3008 bp mit einem ORF von 2655 bp zu gelangen (Sequenz zwischen *PLACs-1/eI* und *PLAC-3'-asIII*, s. Abb. 19, S. 70).

Der Vergleich mit der genomischen Sequenz zeigte 21 Introns (Tab. 25, S. 72; die bereits in 4.3.1 erwähnten und auch hier wiedergefundenen Längeninhomogenitäten und Einzelbasenaustausche sind vermerkt).



Abb. 17: Die 21 Introns der Plasmodium AC (offener Leserahmen: 2665 bp); kodierende Bereiche: schwarz

Die Sequenz wurde in die *EMBL Nucleotide Sequence Database* eingespeist (AC1 gene; ACC: AJ289136).

4.3.2.1 „Fehlspleißing“

Viermal sind „Fehlspleißings“ beobachtet worden, wobei die Introns erst am 3'-Ende des nächsten folgenden AG-Basenpaars ausgeschnitten wurden. Es ergaben sich Leserasterverschiebungen und daraus resultierende verkürzte Proteinsequenzen durch das Auflaufen auf Stopcodons (Tab. 23).

Tab. 23: Die vier fehlgespleißten Introns; die Positionsbezeichnungen der zusätzlich ausgespleißten Basen beziehen sich auf Abb. 19, S. 70

Intron	Anzahl zusätzlich ausgespleißter Basen	Position	Stopcodon / Position	Ort des Abbruchs
8	5	834-838	TGA / 843-845	18 ASn nach TM5
10	32	1033-1064	TAA / 1068-1070	85 ASn nach TM5
12	61	1246-1306	TGA / 1316-1318	Nach 10. AS in TM6
17	4	1912-1915	TAA / 1934-1936	katalyt. Domäne

Einmal wurde ein Herausschneiden der Introns 12 und 13 inklusive des dazwischen liegenden Exons 13 beobachtet. Auch hier verschiebt sich der Leserahmen und die Sequenz läuft auf ein Stop (TGA / bp 1386-1388, Positionsbezeichnungen bezogen auf Abb. 19, S. 70).

Tab. 24: Die sich aus den fehlgespleißten Introns ergebenden Proteinabbruchsequenzen; Zahlen: Position der Plasmodium AC-Sequenz; fett: von der Plasmodium AC abweichende ASn

Fehlgespleißtes Intron	Sequenz
8	269-MNYFIYNLDLI .
10	335-LLWDF'TNLSHC .
12	406-IIILKIFIIIKAY .
Exon 13 „Skip“	406-IIILKIFIIIIQSDLSFGNARRIIEP .
17	628-TVQTLIKLRKKKYIYS .

4.3.2.2 Das „Intron -1“

Auf der Suche nach dem Startcodon wurde aus gereinigter mRNA nach reverser Transkription eine PCR mit dem Primerpaar *PLACsStartM* und *PLACasStartM* durchgeführt (3.1.11). Mit einer anschließenden *seminested*-PCR (Tab. 12, S. 31; Zeiten herabgesetzt auf 30s, 10s, 10s, 25s, 25s; 47°C Primerbindetemperatur; 20 Zyklen) mit dem Primerpaar *PLACsStartM* und *PLACasStartM Nest.* wurde ein Produkt mit einem zusätzlich gespleißten Intron gefunden („Intron -1“, 83% AT-Gehalt).

```

TTTTAATTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAAGGTACTAATCTTT - 212
AATTATAAAAATGTTAAATTATATTGTAAGGAAAAATTTATTCCTTAAATAAATATACATATATATATATA - 141
      . . . . . I . . . . . I . . . . . L
      M . . . . . I . . . . . N . . . . . Y . . . . . I
TATATATATATATATATAAATATTGTTATGTTTTATTTTAATTATTTCTCATATTATCCATTTGATTATATA - 70
TTCTATGAACACGTAATGTATAGAGATAAATAAAATAATTAACACCCTTTTAAGTATTCATAACACATAAT   2
                                                    M   1
GCCAGAACC AAAACAAATATATGCAAATAATATTTTTGATAATGATAAGTTGAAAAGATTTTTCTTAAAAAT 73
  P E P K Q I Y A N N I F D N D K L K R F F L K   24
ATAGATCAAAAGAAAAAGTATTATATTCCTTTACATCAGAAAATGTAAATATTATCTTTAAAAAAAAAAAAA 144
Y R S K E K V L Y S F T S E N   39
  . . . . . I . . . . . K . . . . . R . . . . . K . . . . . S . . . . . I . . . . . I . . . . . F . . . . . L . . . . . Y . . . . . I . . . . . R . . . . . K
TAATAATAATAATAAGATGAACATGTAATAATATGTATGTTTTATATGTCTATAAATATCTGATTTGTTTT 215
TTCTTTTTTTTTTAATGAAAACATGTTGTTAAATATTTTTTTTTTATCGTATACTTTTATAAAATATATATATCA 286
TTATATATATCCTATGTTGTTTTTCTAAATAAATGTAAAAGCTCGTGAAATAAGAAATTTTTCTTATTCTG 357
TAGGACATCATAAATGAAGAGAAGAGAAAAAGCAAAAATAACTTGTGCATGTTAAAATATAAA 420
  D I I N E E K R K S K N N L C M L K Y K   59
..

```

Abb. 18: Der Bereich mit dem zusätzlich gespleißten „Intron -1“ (**dunkelgrau:** „Intron -1“, **grau:** Intron 1). Der annotierte Leserahmen ist unterstrichen (M1 und M55 sind fett gedruckt, vgl. Abb. 19). Doppelt unterstrichen ist die Sequenz, welche sich aus der 5'-Verlängerung des Exons 2 bei gespleißtem „Intron -1“ ergibt und von einem N-terminalen Stop begrenzt wird. Der nachfolgend besprochene nicht mögliche, da auf ein Stop laufende Leserahmen ist unterbrochen unterstrichen.

Das Ausspleißen des „Introns -1“ führt zum Verlust des annotierten Starttriplets (M1). Das einzige nun mögliche Starttriplett ist das ATG, welches für M55 kodiert. Verlängert man den annotierten Leserahmen ausgehend vom zweiten Exon in 5'-Richtung über beide gespleißte Introns hinweg, so endet dieser ohne ATG auf einem Stop [bp (-197)-(-195), doppelte Unterstreichung]. Das ATG an Position (-201)-(-199) scheidet als Start aus, da der Leserahmen nach Intron 1 auf ein Stop läuft (unterbrochen unterstrichener Leserahmen).

Ob M1 oder M55 als Startcodon fungiert, konnte nicht festgestellt werden. Wegen der N-terminalen Sequenzhomologien der *P.knowlesi*- und *P.yoelii yoelii*-ACn wurde M1 annotiert, obwohl nicht auszuschließen ist, daß auch M55 bei Spleißen des „Introns -1“ möglich sein kann (34).

4.3.2.3 cDNA-Sequenz der Plasmodium AC

-9	1		
		taacacataATGCCAGAACCAAAACAAATATATGCAAATAATATTTTTGATAATGATAAGTTG	54
		M P E P K Q I Y A N N I F D N D K L	18
AAAAGATTTTTCTTAAATATAGATCAAAAGAAAAAGTATTATATTCCTTTACATCAGAAAATGACATCAT			125
K R F F L K Y R S K E K V L Y S F T S E N D I I			42
AAATGAAGAGAAGAGAAAAAGCAAAAATAAAGTGTGCATGTTAAAATATAAAAATATATGTCTTAATATAC			196
N E E K R K S K N N L C M L K Y K N I C L N I			65
ATACAAGCAAATTTTTCAAATACTCCAAATGGGTATATTTATTTTTGATCATATTTTCAAAGATTTTTTC			267
H T S K F F K Y S K W V Y L F L I I F S K D F F			89
TATCTTCTTTTAAACAAAAAATATGATTTTATATCAGATATTTTTATTTCCATTCTCTTATTTGGATGTCT			338
<u>Y L L L N K K Y D F I S D I F I S I L L F G C L</u>			113
TATCGAAATAATTTTAATTTTAAATGGATTCAACATATATCTTTTATTTTATGTTTTTTGATATTATAT			409
<u>I E I I F N F L M D S T Y I F Y F M F F D I I</u>			136
CGTTCATGCTGTTATTCTTTGATATCTTTCTTTTCGAAAAATATTTTTTTGACTTTTTTATTTACTTTACA			480
<u>S F M L L F F D I F L F E K Y F F D F F I Y F T</u>			160
AATAGCTTATATACATGGAAAAAATGACAAAGATAATATAATATACCTAATACAATTATTTAAGTCCTT			551
N S L Y T W K K I D K D N <u>I I Y L I Q L F K S L</u>			185
GCGAATAATTAAGATATATCGCTTCGTAATTAATTTTATAAAAAACATACTAAGGAAAAATACAAGCACA			622
<u>R I I K I Y R F V I N F I K K H T K E K Y K H</u>			207
GAAATGAGTGAATTTTGAAAAATGAAAGTATGAAAAATAGACCATTGAAGGAAAGTTTAAAGTTCACA			693
R N E W N F E K M E S M K N R P L K E S L K F T			231
AATAAAATGCACTTAGCTCTTATCAAAAGATATTTTCATGTCTTTAATTTTTATAATGTTATCTTATATAAT			764
N K M H L A L I K R <u>Y F M S L I F I M L S Y I M</u>			255
GATAGAAATAATATATATCTCAAAGGAGAGCAAAAGCCCTATGAATTATTTTCATCTATAATTTGGATCTTA			835
<u>I E I I Y I S K E S K S P M N Y F I Y N L D L</u>			278
TAGTATTTGATGAATTTTATGAAACGGAATTTTAAAAGCTCTATACTTTTATAGTGCTATTCAGAAAAAT			906
I V F D E F Y E T E F L K A L Y F Y S A I Q K N			302
AAAAGAGATGAAGAATATTTAATAAGTATTAATCAAAAAGGAAATTGAAAAATTTTATTAACAAGAAAGA			977
K R D E E Y L I S I K S K R K L K N F I N K K E			326
AATAGATATATCAGGAATTAATTATCTGCTATGGGATTTTACAACTTATCACATAATGATCTATTTAAAT			1048
I D I S G I N Y L L W D F T N L S H N D L L K			349
TTGTTACTCCTTCAAGTGCTAACCAAAATGTTGAAGAAGAAATATTTTGGACCATAACAATTTAAAAATATA			1119
F V T P S S A N Q N V E E E I I L D H T I K N I			373
AATGAATTGAGATACTTTGAAACAAAGATATATGAATCCAAAGATTTTATATTTTCATATAAATATAAAGAG			1190
N E L R Y F E T K I Y E S K D F I F H I N I K R			397
ATATATAGAAAGAACTATTTAAAAATATTATAATATTGAAAATATTTATTATAATATTTTCTTTTATAATAT			1261
Y I E R T I K N <u>I I I L K I F I I I F S F I I</u>			420
TGTTCTATTTTACATGTGAATTAATGTCTTATTATTTCTATAGAAAGCATATTGAAAAAATTTAAACTT			1332
<u>L F Y F T C E L N V L L F P I E S I L K K L K L</u>			444

<u>ATGAAATCCAATCCGACCTTAGCTTTGGAAATGCAAGAAGAATTATTGAACCATGAGTTAAAAAATATATT</u>	1403
M K S N P T L A L E M Q E E L L N H E L K N I L	468
AATAAACACAAAATTTGAAGAGGAAAAGCATTAAAGAAAATTATGAAATTTTAAAAATGGAAGAAAACCTTAA	1474
I N T K L K R K S I K E N Y E I <u>L K M E E N L</u>	491
TGAAATTAGGAACATTAATGTTATTAGGTTTTGGTGAAGCAGGAGCGAAAATTATCTCAAAAAATATTAAC	1545
<u>M K L G T L M L L G F G E A G A</u> K I I S K N I N	515
GAACAGGAAAAGATAAATTTACTGATCAATGGAGAAATCGTTTTATTCTGTTTTTTTCCTTTTTCGCGACATAAG	1616
E Q E R V N L L I N G E I V Y S V F S F C D I R	539
AAATTTTACAGAAATAACAGAAGTTTTAAAAGAAAAAATTATGATTTTCATAAATTTGATTGCTGAAATAA	1687
<u>N F T E I T E V L K E K I M I F I N L I A E I</u>	562
TACATGAGTGTGTGATTTCTATGGGGGAACAATAAACAAAAATATTGGTGATGCATTTTTATTAGTTTGG	1758
<u>I H E C C D F Y G G T I N K N I G D A F L L V W</u>	586
AAATATCAAAAAAAGAATATTCGAATAAGAAAATGAATATGTTAAGTCTCCAAACAATAATTATGATGA	1829
<u>K Y Q K K E Y S N K K M N M F K S P N N N Y D E</u>	610
ATATTCAGAAAAAGAAAATATAAACAGGATATGTGATTTGGCTTTTTCTATCTACAGTACAAACATTAATTA	1900
<u>Y S E K E N I N R I C D L A F L S T V O T L I</u>	633
AACTCAGAAAGTCAGAAAAAATACATATATTCTAAATAATGAAAATATGGATGAGTTAATTAAGAACAAT	1971
<u>K L R K S E K I H I F L N N E N M D E L I K N N</u>	657
ATTCTGGAGTTAAGTTTTGGACTTCATTTTTGGATGGGCTATAGAAGGAGCAATAGGAAGTAGTTATAAAAT	2042
<u>I L E L S F G L H F G W A I E G A I G S S Y K I</u>	681
TGATTTATCATATTTATCAGAAAATGTAAATATAGCTAGTCGATTACAAGATATTTCTAAAATATACAAAA	2113
<u>D L S Y L S E N V N I A S R L O D I S K I Y K</u>	704
ACAATATTGTTATATCAGGAGATTTTTATGACAATATGTCGGAGAAATTTAAAAATTTCTCTTAGGAAAATT	2184
<u>N N I V I S G D F Y D N M S E K F K N S L R K I</u>	728
GATAGGGTTACTCTTAAAGGATGTAGGAACCCATTAAATTTATATACTTTTGATATATGTCTTAATAAGAT	2255
<u>D R V T L K G C R N P L N L Y T F D I C L N K I</u>	752
TACGAAGAAAAGTCAATATGGAATAATTTGACGCCAAGCCTCATTTTGACGTAAAACTTTTAAAGTTTTTG	2326
T K K V N M E N F D A K P H F D V K L L K V F	775
ATGATATAAAAAAAGAAGGCCGAACGAAAAAAGAAAAAAGAAGTTCTTAATCTTTCATATAATCTTTAT	2397
D D I K K K A E R K K R K K E V L N L S Y N L Y	799
GAAGAATATGCAAAAAATGACGACATAAAATTCATAAAGATACACTATCCTAAAGATTATTTGGAACAATT	2468
E E Y A K N D D I K F I K I H Y P K D <u>Y L E O F</u>	823
CAAAATTGCCCTTGAGTCATATTTAATAGGGAAATGGAATGAATCAAAAAATATATTAGAGTATTTAAAAA	2539
K I A L E S Y L I G K W N E S K N I L E Y L K	846
GAAATAATATTTTTGAAGATGAAATTTCTTAATCAGCTGTGGAACTTTTTGAGTATGAACAATTTTATTGCA	2610
<u>R N N I F E</u> D E I L N Q L W N F L S M N N F I A...	870
CCCAGTGATTGGTGTGGATATAGAAAATTTTTACAAAAGTCATAAAAATTATTTATATATATATAAAATAT	2681
...P...S...D...W...C...G...Y...R...K...F...L...Q...K...S .	884
TGATACTATTAAGGATTGAGTTAATTATTTTTTTTTTTTTTAAAAACAAAAAAATGAAATAATAAATAAA	2752
TATAAATATAAATATATATATATATATATATATATATATTTAATGTTGTACATAAAAAATATATAAATAAT	2823
TACATATGGGAGTTATATAAAAAATAAATTATATGTCAATTATAATATATATATATATATATATATATATT	2894
TTATATTTTATTTAATTTTTTTTATAATTACATATGGATAACATTTTTTATGATTTTCATTTTTGTTATTACT	2965
CATACAAGGGCGTTTAAACTTTCAACATACTTAT	2999

Abb. 19: Die Sequenz des Plasmodium AC-cDNA Klon; M1 und M55 sind fett hervorgehoben; TM 1-6, Poreloop, katalytischer Bereich, TPRL, C-Terminus sind entsprechend unterstrichen

Ein Sequenzalignment der Plasmodium AC mit anderen ACn findet sich in 4.9.3.

4.3.2.4 Introns der Plasmodium AC

Nachfolgend sind die Introns 1-21, einschließlich der gefundenen Veränderungen im Vergleich zur annotierten Sequenz (Plasmodiumgenomprojekt) aufgeführt.

Tab. 25: Die Introns 1-21: Positionsangaben beziehen sich auf den cDNA-Klon in 4.3.2.3; eingeklammerte Nukleotide sind in der Genomprojektsequenz vorhanden, wurden jedoch beim Sequenzieren nicht gefunden (Deletionen); fett: zusätzlich gefundene Basen; Basenaustausche sind mit (Y←X) hinter der betreffenden Base benannt (Y: gefundene Base, X: Base im Genomprojekt)

Intron	Position	Sequenz
1	117/118	GTAAATATTATCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAATAATAATAATAAGATGAAC ATGTAATAATATGTATGTTTTATATGTCTATAAATATCTGATTTGTTTTT CTTTTTTTAATGAAAACATGTTGTTAAATATTTTTTTTATCGTATACTTT TATAAATATATATATCATTATATATATCCTATGTTGTTTTCTAAATAA ATGTAAAAGCTCGTGAAATAAGAAATTTTCTATTCTGTAG (243 bp)
2	177/178	GTAAACAAAAAAAAATCAAAATATCAACAAATAAGGAGAAATATATATA AATTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTCGAACAATATAG (129 bp)
3	285/286	GTTAAAGCGAAAAATATAAAAAATGTATATCAATACTTTTATATATATA TATTTATATTTATATTTTGAGTAG (73 bp)
4	485/486	GTAATCGAAAATAAGCACTTAAATAATATATACA(TATATATGTATG)TA TATATGTATGTATATATGTATGTATATATGTATGTATATATGTATGTATA TATGTATGTATATATGTATGTATATATGTATGTATATTCTTGTGTCTATA TATTTTTATCCTTTAG (152 bp)
5	636/637	GTAAAAAAAAAAAAAAAAATAATATATACTAGGAGTATCGTAAATATAG GTTT(TATATATATATA)TATATATATATATATATATATGTGTATATATTA TAG (88 bp)
6	675/676	GTATAAACAAAAACACAATTTTTAAAGAATATATTTATATATATTCAT ATATAGAAAGATATATTTACATACAATTTATTTTATTTATATTATTTTTT TCAG (104 bp)
7	774/775	GTAAAAGATAAATAAAAAAATTATACATTATCATAAATGTTCAACATAG GTTAGTTCTTTTTTTTTTATTTATTTCTTTTTTTCTTTTGTATGTGTAG (100 bp)
8	833/834	GTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(AAA)TATACACACA TATTTATTTATATTTTATACAATATCTTCATTTCTAACATGATTATTTAT TTTTATTTTTTCTAAACCGATTTTGTAG (123 bp)
9	891/892	GTATATATAAAAAGAGAAATCAAATATTATATATATATATATATATA T(T←C)ATATATATATATCGTACGACAAAAATAAAAGTATATATG(G←A) ATAAATGTATTCACATATTTAACTTTATATTATAG (124 bp)
10	1032/1033	GTAAAAGGAAAAATATATAAAAGAAAAATAATGAAATATGGTTTA CTCAAAAAATATAACAAAAGAAAACATATGAATATGTTGTATATTATAT

Intron	Position	Sequenz
		AATCCTTTTATGTACATAG (116 bp)
11	1120/1121	GTAAAGAATGAAAAATATAAATAATGTATTTTAATATATATATATATAT ATATATAT(ATAT)GTAAGGTGTATAAAAAATATAAATATTTTTATTTTGT CTAG (98 bp)
12	1245/1246	GTAAATATAAAACAAATTGAAAAAAAAAATATATATATGTATATATATA TATATGTGTATTATTTATAATATATTATAAATTTCTTATGATTTACTCATC TTTCATTTTTGTATTTCTTTGCAG (124 bp)
13	1337/1338	GTAATTTTATATAGATATTTATACATATTTTGTGTGTAGAATATTATTAT GTATACAGTAATACATTTTTTTATTTTTATTTTTATTTTTTTTTTTTTTTT TTTGTAG (109 bp)
14	1424/1425	GTGAATTGTGATTTTCATATATATAATAAGAAAAGAATAATTAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCTTCTTTGATTTCAAATAAAAA TATATTTAAGTGTGTACAGTTGCAATGGAAAATACCTATTAGACAAAA ATATAATAATATATAAGAAAAATAAGACAAAAAAAAAAAAAAAA(AA)TAT ATTTTTCTATAG (241 bp)
15	1501/1502	GTTATAAGAGGGAAAAAAAAAAAAATACATACATATATATATATATTTAT ATATTTATTTATTTATATATATGCTCTTTATAATATATTAATAATGCTTTAA TT (152 bp)
16	1653/1654	GTAAAAGCATATAAAATATGTTTTGTTATACTACTTGAGGGAAATAAAT AGACGCACACACATATATATATATATATATATATATATATATATATTTA TTTATTTATATAAATTTAACAG (120 bp)
17	1911/1912	GTAGGAAGAATATGAAAAAAAAAAAAAATATATATATATATATATATA TATAGAAAGAATTGAAATAATGTACTTTTTATATTACATTATATATTA TTATATAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCACACATATATATAT ATATATGTCACATATTTAAG (170 bp)
18	2166/2167	GTAATATATTATGCCACTAACATATAATATATGCTTGTCACATATATATA TATATATATATATAAATATATATATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTATATATGTATATATATTTAAG (125 bp)
19	2253/2254	GTTAATTTTAAAGGGGGGAGAGTAAAATAAATATGCAAATATACACA TATATATACATATATATTATATATAAATTTATGTATATTAG (91 bp)
20	2319/2320	GTTATTATGATATTGTAATTTGACCTTTTTTTTAAAATATACATATATA TATATATATATATATATAACATATAAATGAATTAATAAATAAATGCA G (100 bp)
21	2391/2392	GTAAGGCTAGGCTTATATTTATACCTTAACACATATAAATAAATAGATT AATATATATATATATATATATATATATATATATATTTTTATTTTTTTTTATTT AACTTTACATTTTATAG (117 bp)

4.3.3 Konstruktion des Plasmodium AC-Gens

Aus den subklonierten cDNA-Fragmenten wurde das Plasmodium AC-Gen zusammengesetzt. Die Fragmente wurden über flankierende Restriktionsstellen geschnitten und schrittweise zusammengefügt. In Einzelfällen war es notwendig, die Fragmente mittels PCRn mit überhängenden Primern der fehlenden Sequenz zu verlängern (Primer: 2.3.4, S. 14).

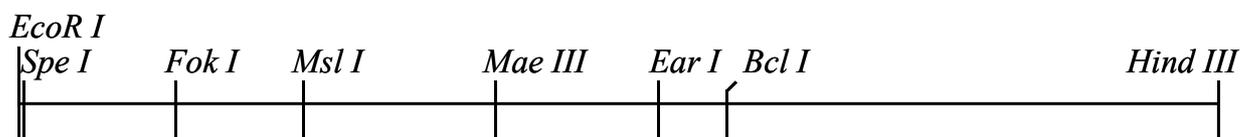


Abb. 20: Die zur Herstellung des Plasmodium AC-Gens verwendeten Schnittstellen (Größe des offenen Leserahmens 2665 bp). Am 5'-Ende befindet sich EcoR I mit Spe I verbunden, gefolgt von einer AAT ATA-Sequenz vor dem Startcodon (PINat5'-EcoRI;SpeI-Primer). Am 3'-Ende wurde das ursprüngliche TGA in TAA mutiert, es folgt eine Hind III-Schnittstelle (PINat3'-HindIII-Primer)

4.3.3.1 Expression des katalytischen Bereichs in E.coli

In Analogie zu den katalytischen Domänen der Adenylatcyclasen aus *Anabaena* sp. PCC7120 (CyaB1) und *S.aurantia*ca (CyaB) ist eine Sequenz festgelegt worden, die auch den katalytischen Bereich der Plasmodium AC umfassen sollte.

		▽	
PlAC	:	KIISKNINEQERVNLLIN GE IVYSVFS FC DIRNFTEIT EV LKEKIMIFIN	: 557
A. CyaB1	:	TPHVAEQVMALGEDAL MV GERKEVTVL FS DIRGYTTLTENLGAAEVVSL	: 626
S. CyaB	:	SDAVVEEILKSPDTV LT GEKREVTVL EA DIRNETGLAESLPPEQVGV	: 333

Abb. 21: Alignment der Plasmodium AC (PlAC) mit der *Anabaena* AC (A.CyaB1) und der CyaB AC aus *Stigmatella* (S.CyaB); das Dreieck deutet auf den konservierten Beginn der katalytischen Bereiche

Mit den Primern *NatExp-s* und *NatExp-as* wurde ein PCR-Produkt ab AS 511 (SKNINEQ-ERVN...) bis S 884 erzeugt und über die 5'-*BamH I*- und die 3'-*Sac I*-Schnittstellen in *pQE-30* kloniert. Die N-terminale Aminosäuresequenz lautete: MRGSH₆GSSKNINEQERVN....

Die Expression in *E.coli* war erfolglos (s.S. 36). Es war weder AC-Aktivität meßbar, noch Protein nachweisbar. Daher wurde beschlossen, den Leserahmen in „üblicher“ Codonusage nachzubauen, da die AT-reiche Sequenz für das Scheitern verantwortlich sein könnte.

4.3.4 Resynthese der Adenylatcyclase in Mammaliacodonusage

Für eine erfolgreiche Expression in verschiedenen Zellsystemen ist eine Anpassung der Codonusage an einen niedrigeren AT-Gehalt sinnvoll (59).

Zum Übersetzen der Aminosäuresequenz in einen Säugercode wurde das *DNAstar*-Programm *EditSeq* verwendet und „silent“-Schnittstellen zur Klonierung eingeführt (Abstand: 131-264 bp). Dazwischen liegende Bereiche wurden jeweils halbseitig von komplementären Primerpaaren überspannt (Tab. 10, S. 15).

Der Leserahmen der Plasmodium AC hat einen AT-Anteil von 76,9%, welcher durch Resynthese auf 49% gesenkt wurde.

<u>Original:</u>	<u>Resynthese:</u>
% A = 42.4 [1125]	% A = 28.3 [752]
% G = 13.5 [358]	% G = 20.8 [552]
% T = 34.5 [916]	% T = 20.7 [549]
% C = 9.6 [256]	% C = 30.2 [802]

Abb. 22: Prozentuale Basenverteilungen des Original- und resynthetisierten Gens; Zahlen in Klammern: Anzahl der jeweiligen Basen

GCA (A): 0 (6)	CAG (Q): 6 (3)	UUG (L): 0 (19)	UAA (.): 0 (1)
GCC (A): 18 (3)	Σ (Q): 12 (12)	Σ (L): 99 (99)	UAG (.): 0 (0)
GCG (A): 1 (1)	GAA (E): 4 (58)	AAA (K): 3 (84)	UGA (.): 1 (0)
GCU (A): 0 (9)	GAG (E): 64 (10)	AAG (K): 106 (25)	Σ (.): 1 (1)
Σ (A): 19 (19)	Σ (E): 68 (68)	Σ (K): 109 (109)	ACA (T): 0 (17)
AGA (R): 0 (16)	GGA (G): 0 (13)	AUG (M): 24 (24)	ACC (T): 23 (1)
AGG (R): 0 (6)	GGC (G): 17 (0)	Σ (M): 24 (24)	ACG (T): 2 (2)
CGA (R): 1 (3)	GGG (G): 1 (2)	UUC (F): 72 (16)	ACU (T): 0 (5)
CGC (R): 24 (1)	GGU (G): 0 (3)	UUU (F): 5 (61)	Σ (T): 25 (25)
CGG (R): 0 (0)	Σ (G): 18 (18)	Σ (F): 77 (77)	UGG (W): 9 (9)
CGU (R): 1 (0)	CAC (H): 13 (3)	CCA (P): 0 (5)	Σ (W): 9 (9)
Σ (R): 26 (26)	CAU (H): 0 (10)	CCC (P): 11 (1)	UAC (Y): 50 (7)
AAC (N): 80 (17)	Σ (H): 13 (13)	CCG (P): 1 (1)	UAU (Y): 0 (43)
AAU (N): 1 (64)	AUA (I): 8 (62)	CCU (P): 0 (5)	Σ (Y): 50 (50)
Σ (N): 81 (81)	AUC (I): 106 (11)	Σ (P): 12 (12)	GUA (V): 0 (8)
GAC (D): 39 (10)	AUU (I): 0 (41)	AGC (S): 0 (7)	GUC (V): 12 (2)
GAU (D): 2 (31)	Σ (I): 114 (114)	AGU (S): 0 (11)	GUG (V): 8 (0)
Σ (D): 41 (41)	CUA (L): 1 (6)	UCA (S): 1 (20)	GUU (V): 0 (10)
UGC (C): 11 (2)	CUC (L): 1 (2)	UCC (S): 51 (7)	Σ (V): 20 (20)
UGU (C): 0 (9)	CUG (L): 96 (5)	UCG (S): 3 (3)	
Σ (C): 11 (11)	CUU (L): 1 (18)	UCU (S): 1 (8)	Total : 885 (885)
CAA (Q): 6 (9)	CUA (L): 1 (6)	Σ (S): 56 (56)	

Abb. 23: Codonstatistik des Gens nach der Resynthese; Zahlen in Klammern: Anzahl Codons im Ursprungsgen

Die PCR erfolgt nach 3.1.12.2.4, S. 34.



Abb. 24: Extension von Primern mit überlappenden Überhängen

Tab. 26: Längen der PCR-Fragmente von Schnittstelle zu Schnittstelle (Positionen im resynthetisierten Endprodukt: vgl. Abb. 25); die beiden *MPEP*-Primerprodukte unterscheiden sich um ein GGA-Codon im *Kozak*sequenzbereich, die *BamH I*-Schnittstelle beginnt 15 bp vor dem A1 des ATG-Startcodons; die *Not I*-Schnittstelle des Fragment 13 folgt unmittelbar dem Stopcodon

Fragment	Flankierende Restriktionsstellen	Position	Länge
MPEP1+2	BamH I / Nde I	-14 / 181	195 bzw. 198
1	Nde I / SnaB I	182 / 374	193
2	SnaB I / Sfu I	375 / 638	264
3	Sfu I / Sty I	639 / 785	147
4	Sty I / Cla I	786 / 980	195
5	Cla I / Bgl II	981 / 1145	165
6	Bgl II / Sac I	1146 / 1283	138
7	Sac I / Hind III	1284 / 1414	131
8	Hind III / Mlu I	1415 / 1554	140
9	Mlu I / Dra I	1555 / 1803	249
10	Dra I / Pvu I	1804 / 2024	221
11	Pvu I / EcoR V	2025 / 2238	214
12	EcoR V / Sty I	2239 / 2447	209
13	Sty I / Not I	2448 / 2657	210

(±GGA)
 1 |
 GGATCCGCCGCCACCATGCCCGAGCCCAAGCAGATCTACGCCAACAACATCTTCGACAACGACAAGCTGA 55
 AGCGCTTCTTCTGAAGTACCGCTCCAAGGAGAAGGTCTGTACTCCTTCACCTCCGAGAACGACATCAT 125
 CAACGAGGAGAAGCGCAAGTCCAAGAACAACCTGTGCATGCTGAAGTACAAGAAC**CATATG**CCTGAACATC 195
 CACACCTCCAAGTTCTTCAAGTACTCCAAGTGGGTCTACCTGTTCCCTGATCATCTTCTCCAAGGACTTCT 265
 TCTACCTGCTACTGAACAAGAAGTACGACTTCATCTCGGACATATTCATCTCGATCCTGCTGTTTCGGCTG 335
 CCTGATCGAAATCATCTTTAACTTCTGATGGACT**CTACGTAC**ATCTTCTACTTTATGTTCTTCGACATC 405
 ATCTCATTCATGCTGCTGTTCTTCGACATCTTCCTGTTTCGAGAAGTACTTCTTCGACTTTTTTCATCTACT 475
 TCACCAACTCCCTGTACACCTGGAAGAAGATCGACAAGGACAACATCATCTACCTGATCCAACCTGTTCAA 545
 GTCCCTGCGCATCATCAAGATCTACCGCTTCGTCATCAACTTCATCAAGAAGCACACCAAGGAGAAGTAC 615

```

AAGCACCGCAACGAGTGGAACTTTCGAAAAAGATGGAGTCCATGAAGAACCGCCCCCTGAAGGAGTCCCTGA 685
AGTTCACCAACAAGATGCACCTGGCCCTGATCAAGCGCTACTTTCATGTCCCTGATCTTCATCATGCTGTC 755
CTACATCATGATCGAGATCATATACATCTCCAAGGAGTCCAAGTCGCCCATGAACTACTTCATCTACAAC 825
CTGGACCTGATCGTGTTCGACGAGTCTACGAGACCGAGTTCCTGAAGGCCCTGTACTTCTACTCCGCCA 895
TCCAAAAGAACAAGCGGACGAGGAGTACCTGATCTCCATCAAGTCCAAGCGCAAGCTGAAGAACTTCAT 965
CAACAAGAAGGAGATCGATATATCCGGCATCAACTACCTGCTGTGGGACTTCACCAACCTGTCCCACAAC 1035
GACCTGCTGAAGTTCGTGACCCCGTCCCTCCGCCAACCAAAACGTGGAGGAGGAAATCATCCTGGACCACA 1105
CCATCAAGAACATCAACGAGCTGCGCTACTTTCGAGACCAAGATCTACGAGTCCAAGGACTTCATCTTCCA 1175
CATCAACATCAAGCGCTACATCGAGCGCACCATCAAGAACATCATAATCCTGAAGATATTCATAATCATC 1245
TTCTCCTTTATCATACTGTTCTACTTCACGTGCGAGCTCAACGTCCTGCTGTTCCCCATCGAGTCCATCC 1315
TGAAGAAGCTGAAGCTGATGAAGTCCAACCCCACCTGGCCCTGGAGATGCAGGAGGAGCTGCTGAACCA 1385
CGAGCTGAAGAACATCCTGATCAACACCAAGCTTAAGCGCAAGTCCATCAAGGAGAACTACGAGATCCCTG 1455
AAGATGGAGAGAACCTGATGAAGCTGGGCACCTGATGCTGCTGGCTTCGGCGAGGCCGGGGCCAAGA 1525
TCATCTCCAAGAACATCAACGAGCAGGAACGCGTCAACCTGCTGATCAACGCGAGATCGTGTACTCCGT 1595
GTTCTCCTTCTGCGACATCCGCAACTTCACCGAGATCACCGAGTCCCTGAAGGAGAAGATCATGATCTTC 1665
ATCAACCTGATCGCCGAGATCATCCACGAGTGTGCGACTTCTACGGCGGCACCATCAACAAGAACATCG 1735
GCGACGCTTCTGCTGGTCTGGAAGTACCAGAAGAAGGAGTACTCCAACAAGAAGATGAACATGTTTAA 1805
ATCCCCAACAATAACTACGACGAGTACTCCGAGAAGGAGAACATCAACCGCATCTGCGACCTGGCCTTC 1875
CTGTCCACCGTGCAAACCTGATCAAGCTGCGCAAGTCCGAGAAGATCCACATCTTCTGAACAACGAGA 1945
ACATGGACGAGCTGATCAAGAACAACATCCTGGAGCTGTCTTCGGCCTGCACTTCGGCTGGGCCATCGA 2015
GGGCGCGATCGGCTCCTCCTACAAGATCGACCTGTCTACCTGTCCGAGAACGTCAACATCGCCTCCCGA 2085
CTGCAAGACATCTCCAAGATCTACAAGAACAACATCGTCATCTCCGGCGACTTCTACGACAACATGTCCG 2155
AGAAGTTCAAGAACTCCTGCGCAAGATCGACCGCGTACCCTGAAGGGCTGCCGCAACCCCTGAACCT 2225
GTACACCTTCGATACTGCTGAACAAGATCACCAAGAAGGTCAACATGGAGAACTTCGACGCCAAGCCC 2295
CACTTCGACGTGAAGCTGCTGAAGGTGTTCGACGACATCAAGAAAAAGGCCGAGCGTAAGAAGCGCAAGA 2365
AAGAGGTCTGAACCTGTCTACAACCTGTACGAGGAGTACGCCAAGAACGACGACATCAAGTTCATCAA 2435
GATCCACTACCCCAAGGACTACCTGGAGCAGTTCAGATCGCCCTGGAGTCTACCTGATCGGCAAGTGG 2505
AACGAGTCCAAGAACATCCTGGAGTACCTGAAGCGCAACAACATCTTCGAGGACGAGATCCTGAACCAGC 2575
TGTGAACTTCTGTCCATGAACAACTTCATCGCCCCCTCCGACTGGTGCGGCTACCGCAAGTTCCTGCA 2645
AAAGTCTTGAGCGGCCGC 2663

```

Abb. 25: Sequenz des resynthetisierten Gens (ACC: AJ536339); die Schnittstellen sind fett gedruckt, die Kozaksequenz unterstrichen, Position 1 besonders markiert, die Position des zusätzlichen GGA-Codons eingetragen

Anfangs war unbekannt, ob Methionin 1 (M1) oder Methionin 55 (M55) das Startcodon ist. Das PCR-Fragment 1 begann mit einer *Nde I* (Produkt von *PLAC.Synt.1s / PLAC.Synt.1as*) 16 bp vor dem zweiten ATG-Triplett (M55; bp 163-165). Dieses Fragment mußte anschließend bis M1 oder M55 verlängert werden.

4.3.4.1 Konstruktbeginn ab Methionin 1 in zwei Kozaksequenzvarianten (MPEP I/II)

Die Klonierung der beiden Konstruktvarianten erfolgte wie nachfolgend beschrieben (S. 79-81). Es wurden die Produkte der sense-Primer *MPEPs1* und *MPEPs2* mit dem Antisense-primer *MPEPas* verwendet.

Beide *MPEPs*-Primer tragen eine 5'-*BamH I*-Schnittstelle gefolgt von einer Kozaksequenz vor dem Startcodon (**GGA TCC GCC GCC ACC** ATG). Der *MPEPs1*-Primer läuft unmittelbar in die Sequenz weiter, der *MPEPs2*-Primer wird nach dem Start von einem GGA-Codon (Glycin) gefolgt, um die Kozaksequenz möglicherweise in ihrer Wirkung zu verstärken (49).

4.3.4.2 Konstruktbeginn ab Methionin 55 in zwei Kozaksequenzvarianten (MLKYK a/b)

Mit den Primern *PLACSynt.5'-s/a* (*Hpa I*) und *PLACSynt.5'-s/b* (*Hpa I*) und *PLACSynt.5'-as* (*Sfu I*) als Antisenseprimer wurden zwei unterschiedliche PCR-Produkte erhalten (\pm GGA-Codon, analog oben). Am 5'-Ende befand sich eine *Hpa I*-Schnittstelle, an welche die Kozaksequenz gefolgt vom ATG (M55) anschloß (**GTT AAC GCC GCC ACC ATG**). Der *a*-Primer läuft in die Sequenz des (verkürzten) Holoenzym weiter, der *b*-Primer trägt zur Kozakverstärkung das zusätzlich inserierte GGA-Codon vor dem anschließenden Leserahmen. Die 5'-Klonierung erfolgte ungeschnitten *blunt* auf *Cla I* des Vektors, die 3'-Klonierung über die *Sfu I*-Schnittstelle des Antisenseprimers (vgl. S. 81, letzter Schritt).

4.3.4.3 Syntheseplan

Auf S. 79 ff findet sich das Schema der Resynthese des ab M1 beginnenden Konstrukts.

Dicke horizontale Striche markieren den *pBluescript II SK(-)*-Klonierungsvektor (T_3 -Promotor links ausgerichtet, T_7 rechts), die dünnen Striche die Schnittstellenüberhänge der in *EcoR V* klonierten Fragmente. Untere Beschriftungen beziehen sich auf Schnittstellen des Plasmids, obere auf solche der Inserts.

Zahlen mit Doppelpunkt bezeichnen die PCR-Produkte der korrespondierenden Primerpaare (z.B. 5: Produkt von *PLAC.Synt. 5s* und *PLAC. Synt.5as*); MPEP steht stellvertretend für die Produkte von *MPEP1s* und *MPEP2s* mit *MPEPas*.

In Kästchen auf den Pfeilen sind die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme eingetragen und die Information darüber, ob das herausgeschnittene Insert (I.), oder der Vektor inklusive eines noch enthaltenen Fragments kloniert wurden (V.). *Tripligationen* sind besonders vermerkt.

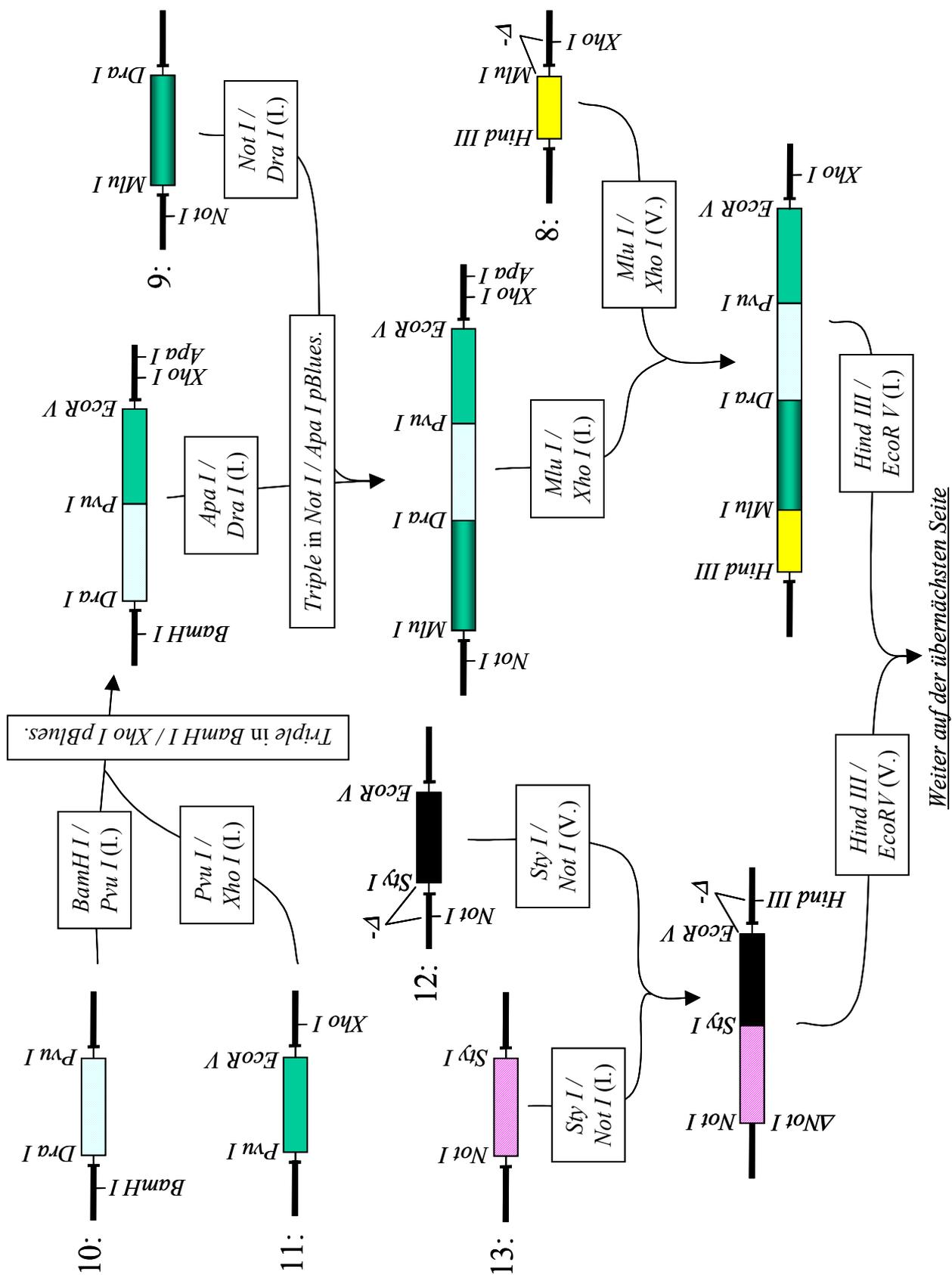


Abb. 26: Resynthese der Plasmodium AC, Erläuterungen s.S. 78

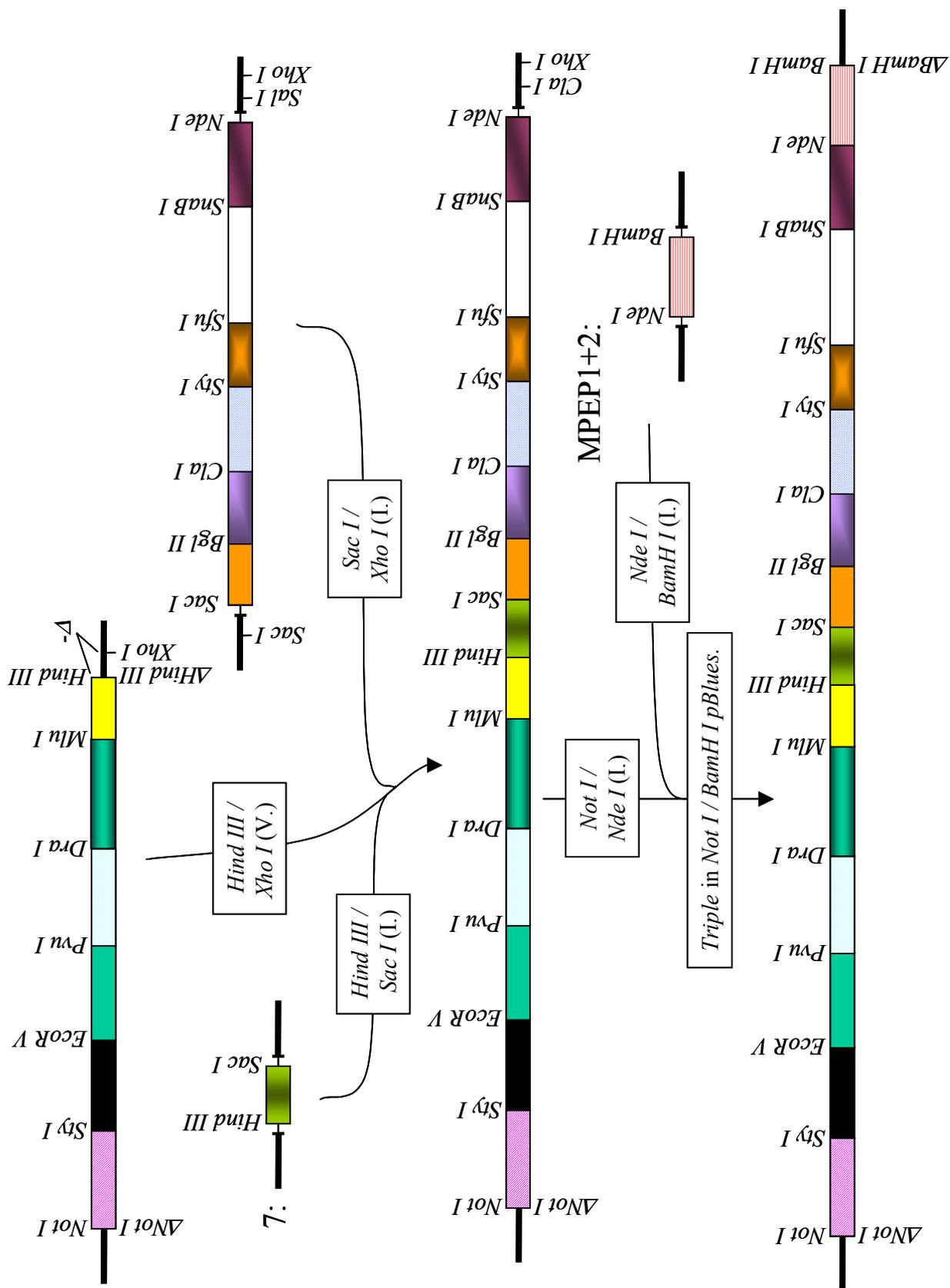


Abb. 28: Resynthese der Plasmodium AC, Erläuterungen s.S. 78

4.4 Plasmodium AC-Konstrukte (exprimiert in Sf9-Zellen)

Experimente mit den ACn aus *Anabaena* sp. PCC7120 (CyaB1) und *S. aurantiaca* (CyaB) zeigten, daß für enzymatische Aktivität die Expression ab dem konservierten G595 (CyaB1), bzw. G302 (CyaB) sinnvoll ist (s. Abb. 21, S. 74). Analog dazu wurde die Plasmodium AC ab Glycin 526 (GEIVYS) exprimiert. Zwei N-terminal verlängerte Konstrukte waren nicht ausreichend aktiv (ab S511 und E518).

Untersuchungen mit der *Anabaena* AC haben weiter gezeigt, daß das Vorhandensein des TPRL (vgl. 5.1.2.2, S. 127) eine Voraussetzung für Aktivität ist. Das Abschneiden führte zu *Inclusionbodies*. Zwei C-terminal verkürzte Plasmodium AC-Konstrukte wurden in Analogie getestet.

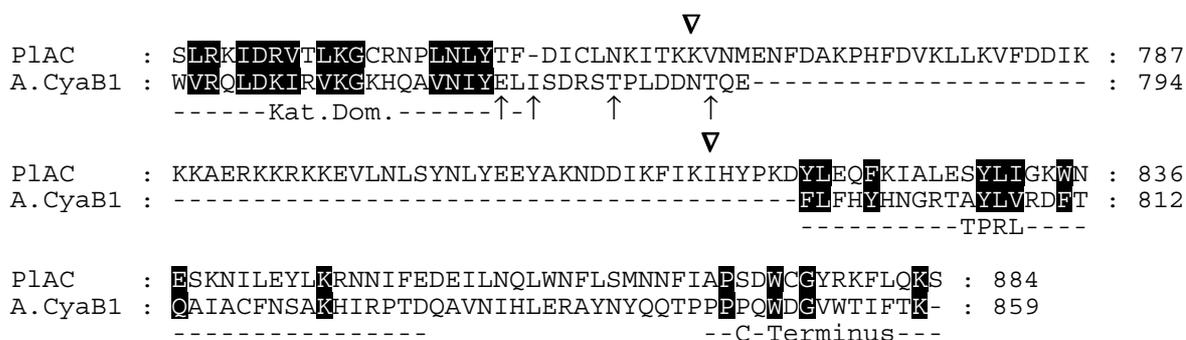


Abb. 29: C-terminale Verkürzungen der Plasmodium AC (K755, I813; Dreiecke oberhalb) verglichen mit den Verkürzungen der *Anabaena* AC (E779, I781, T786, T792; Pfeile unterhalb; T. Kanacher, persönliche Mitteilung)

Das Holoenzym wurde in zwei Varianten getestet (beide jeweils in zwei *Kozak*sequenzvarianten). Zunächst eine N-terminal verkürzte Version beginnend ab Methionin 55 (M55), dann auch die Version beginnend ab Methionin 1 (M1).

4.4.1 Charakterisierung des katalytischen Bereichs

Mit den Primern *PLACSynt.Kats* und *PLACSynt.Katas* wurden N-terminal eine *BamH I*- und C-terminal eine *Not I*-Schnittstelle eingeführt und das Produkt in den *pFastBacHis*-Vektor kloniert. Das Konstrukt trug einen N-terminalen *HexaHis-Tag*. Es begann mit MRGSH₆GS GEIVYS... und lief bis zum C-Terminus hinab (GS: aus der *BamH I*). Die Herstellung rekombinanter Viren und die Infektion von *Sf9*-Zellen erfolgte wie in 3.4.3 ff beschrieben.

4.4.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität des Leervirus

Um AC-Eigenaktivität des als Kontrolle verwendeten Leervirus auszuschließen, wurden *Sf9*-Zellen mit 0,1 bis 100 μl Virus infiziert und die spezifischen Aktivitäten der Homogenate gemessen.

Durchschnittlich wurden $0,1 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ gemessen, die Positivkontrolle (GEIVYS-Konstrukt) zeigte $5,6 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.4.1.2 Bestimmung der optimalen Virusmenge

Die Expression in *Sf9*-Zellen ist abhängig von der Zahl der Viren pro Zelle. Die Bestimmung der optimalen Virusmenge erfolgte nach 3.4.5 (48 h Expression). Jeweils 40 μl der erhaltenen Zentrifugationsüberstände wurden in einen AC-Test eingesetzt (Modifizierter *2x AC-Cocktail*: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM KCl; *10x AC-Startlösung*: 5 mM ATP)

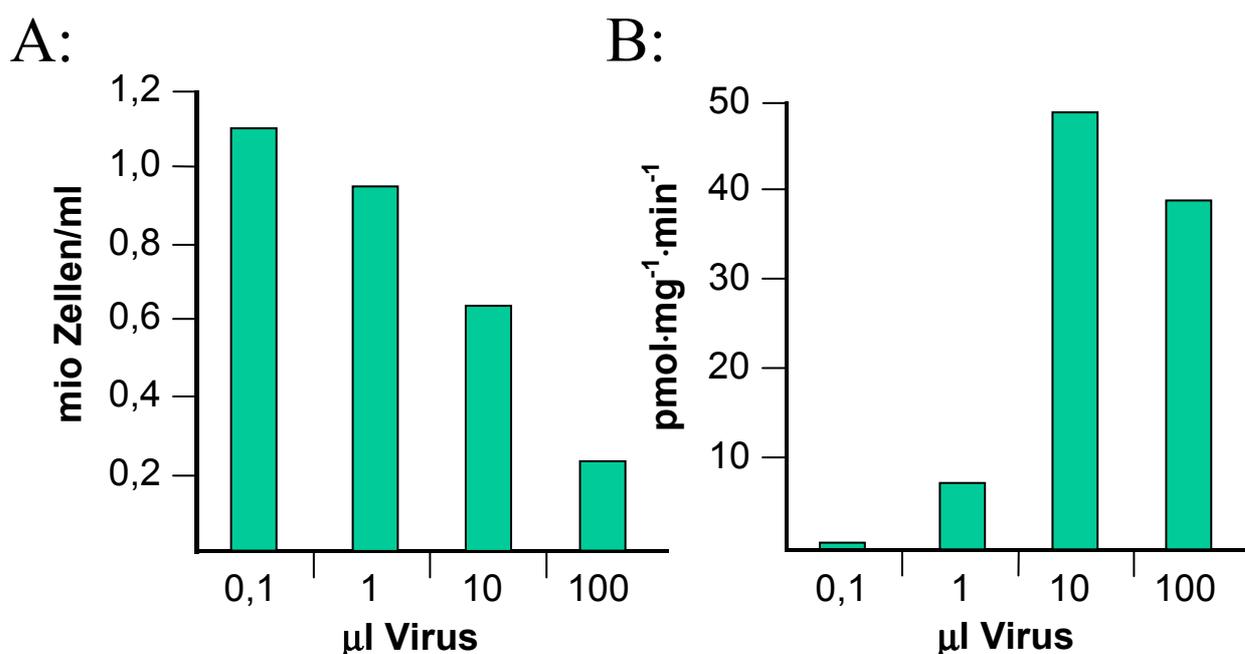


Abb. 30: A: Zellzahlen in Abhängigkeit der Virusmenge; B: spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Virusmenge

Zur genaueren Eingrenzung der viralen Infektiosität wurde ein weiterer AC-Test mit einer Infektionsreihe von 5, 10, 20, 40, 80 und 100 μl Virus durchgeführt. 5 μl Virus brachten nur 61% des Umsatzes von 10 μl ($45 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), 20 μl nur 78%.

Die optimale Menge lag also bei 10 μl Virus / 12×10^6 Zellen.

Ein Plaque-Assay erbrachte $2,5 \times 10^7$ – $4,75 \times 10^7$ pfu/ml [nach (17)].

Mit diesen Daten lässt sich die *MOI* errechnen. Sie beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl eingesetzter Viruspartikel und der Zellzahl. Eine *MOI* von 1 bedeutet ein 1:1-Verhältnis, entsprechend kommt bei einem Wert von 0,1 nur ein Viruspartikel auf zehn Zellen. Die *MOI* liegt zwischen 0,02 und 0,04 (Optimal: 0,01-0,1; zu hohe *MOI*'s führen zu einer Überinfektion der Zellkultur mit raschem Absterben der Zellen).

4.4.1.3 Optimierung der Expressionszeit

Sieben Testkolben wurden gleichzeitig angeimpft und nach 24, 36, 42, 48, 54, 60 und 72 h geerntet. Die Zellpellets wurden in N₂ gefroren und bei -80°C gelagert. Um zu testen, ob sich enzymatisch aktives Protein im Kulturmedium befindet, wurden die Medienüberstände gleichfalls eingefroren (AC-Tests wie 4.4.1.2).

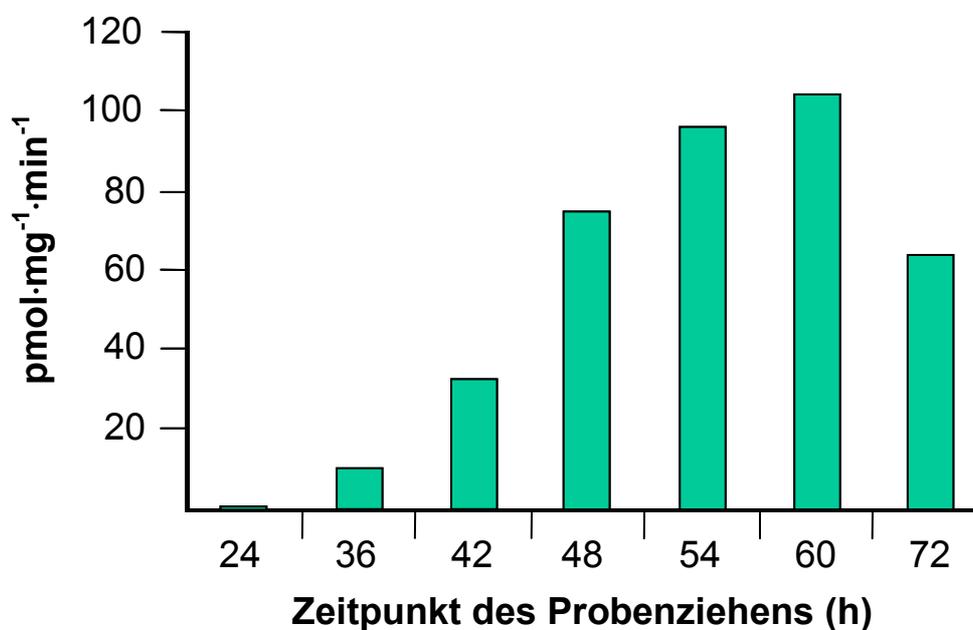


Abb. 31: spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Expressionsdauer

Das Maximum an AC-Aktivität ist bei 60 h am höchsten. Aus praktischen Gründen wurden die Zellen nach 54-56 h geerntet.

Die *Sf9*-Medienüberstände zeigten keine AC-Aktivität.

4.4.1.4 Affinitätsreinigung und Westernblot

Mit dem exprimierten Protein wurde eine Ni^{2+} -NTA-Reinigung und ein Westernblot durchgeführt (30 s Belichtungszeit). Als Kontrolle dienten uninfizierte *Sf9*-Zellen.

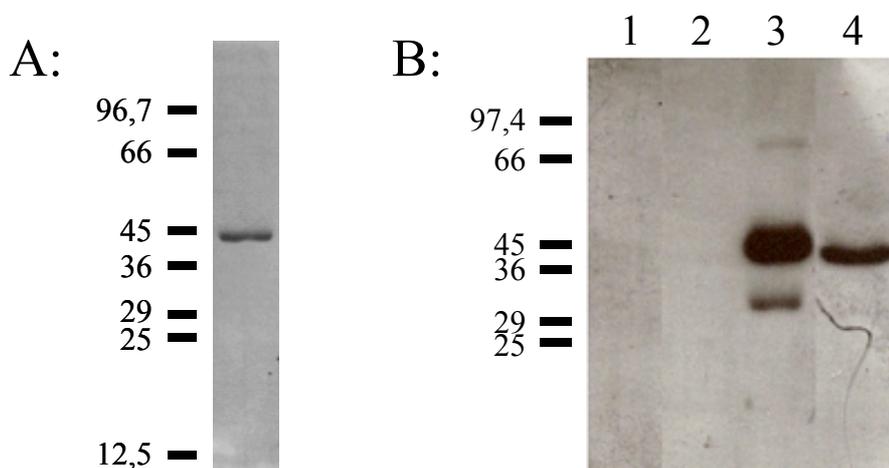


Abb. 32 A: PAGE-Gel: ~0,6 μ g gereinigtes Protein; **B: Westernblot:** 1: Eluat der Kontrollzellen, 2: Durchlauf der Kontrollzellen, 3: gereinigtes Protein, 4: Durchlauf der Proteinreinigung; aufgetragene Proteinmengen: 1: nicht abschätzbar, 2 und 4: 6-8 μ g Protein, 3: ~1 μ g Protein

Das exprimierte Protein ist über den *HexaHis-Tag* reinigbar, im Westernblot zeigte sich jedoch ein Abbauprodukt und extrem wenig einer hochmolekularen Spezies. Die Laufhöhe des Proteins entsprach den erwarteten 44 kD.

4.4.1.5 Bestimmung der Temperatur und des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte nach 3.10.1.1.

In Mischungen aus 400 μ l *Sf9-Elutionspuffer*, 450 μ l Wasser, 100 μ l 10 mM ATP, pH 7,5 und jeweils 50 μ l Puffer (je 1M) wurden bei RT folgende pH-Werte gemessen:

Tab. 27: pH-Werte bei RT in Gegenwart der angegebenen Puffer

Puffer	pH
MOPS/Tris pH 6,5	7,14
Tris/HCl pH 8,0	7,98
Tris/HCl pH 9,0	8,56
Glycin pH 10,0	9,4

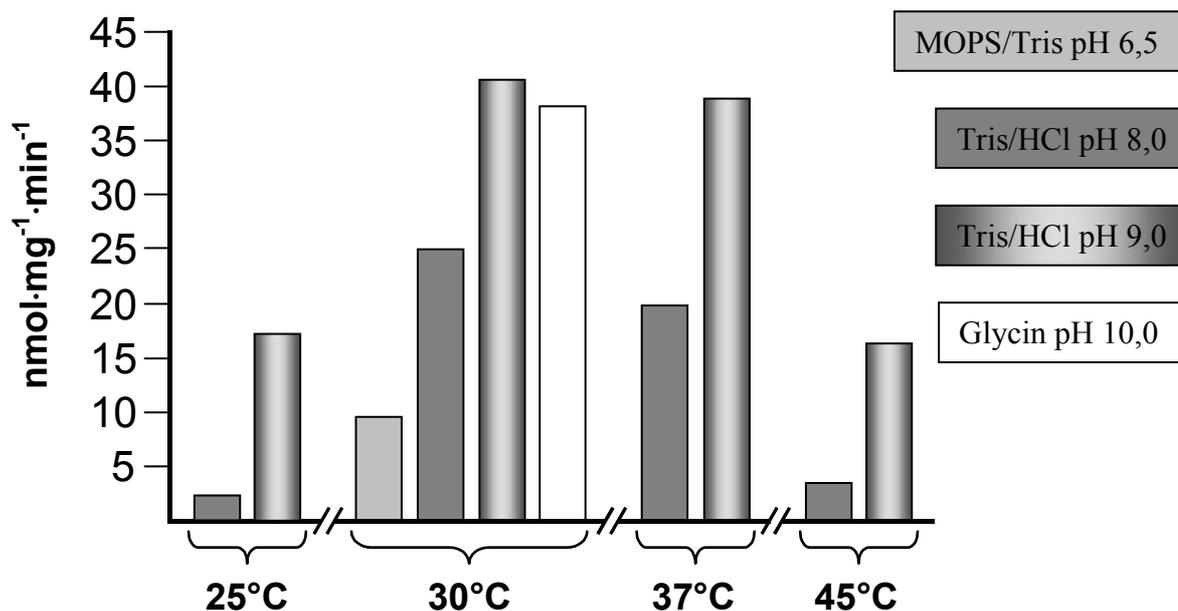


Abb. 33: spezifische AC-Aktivität in Abhängigkeit von Puffer und Temperatur

Der maximale Umsatz erfolgt bei 30°C und Tris/HCl pH 9,0 (pH 8,56 bei RT). Alle folgenden AC-Tests wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

4.4.1.6 Test auf Guanylatcyclaseaktivität

Mit gereinigtem Protein wurde parallel sowohl AC- als auch GC-Aktivität gemessen. Als GC-Positivkontrolle diente eingefrorenenes Paramecium GC-HEK-Zellenhomogenat (20 pmol·mg⁻¹·min⁻¹). Die Plasmodium AC hatte keine GC-Seitenaktivität.

4.4.1.7 Test auf Forskolinstimulierbarkeit und Einfluß von Mn²⁺ und Mg²⁺ als Cofaktoren

Mammalia-ACn sind forskolinstimulierbar. Die Wirkung des Diterpens auf die Plasmodium AC wurde mit 100 µM Forskolin (1 µl *Forskolinlösung*, s. 2.5.3) oder 1 µl DMSO in Gegenwart von MnCl₂ oder MgCl₂ getestet.

Mit Mn²⁺ betrug die spezifische Aktivität 9,9 nmol·mg⁻¹·min⁻¹. Zusatz von Forskolin stimulierte nicht (7,2 nmol·mg⁻¹·min⁻¹). DMSO hatte keinen Effekt (9,6 nmol·mg⁻¹·min⁻¹).

Mit Mg²⁺ war keine AC-Aktivität meßbar.

4.4.1.8 Bestimmung der kinetischen Parameter V_{\max} und K_m

Da die Menge an gereinigtem Protein auf PAGE-Gelen abgeschätzt wurde (3.5.3) ergab sich für V_{\max} eine Spanne von 23-45 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ($\bar{\varnothing} = 32 \pm 9 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Der K_m war 95-128 μM ($\bar{\varnothing} = 115 \pm 15 \mu\text{M}$; beides aus drei unabhängigen Tests).

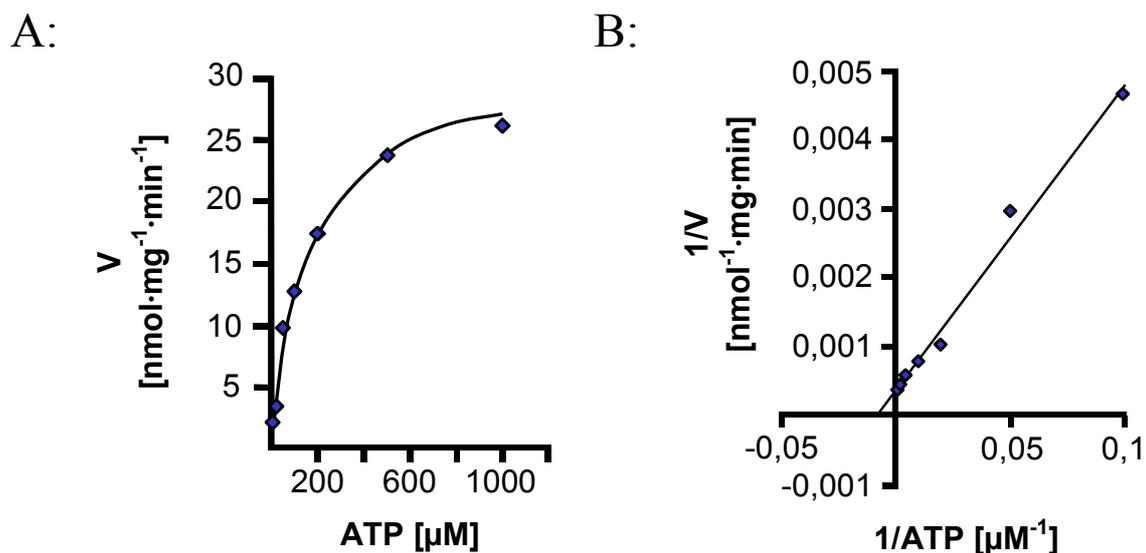


Abb. 34: A: representative Michaelis-Menten-Kurve (0,01-1 mM ATP); B: zugehörige Lineweaver-Burk-Linearisierung (V_{\max} : 29 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; K_m : 128 μM)

Aus den Hill-Plots ergaben sich R^2 -Werte zwischen 0,9597 und 0,9941 ($\bar{\varnothing} = 0,9801 \pm 0,015$). Die Steigungen lagen zwischen -0,9205 und -1,0717 ($\bar{\varnothing} = -1,008 \pm 0,06$), d.h. keine Kooperativität.

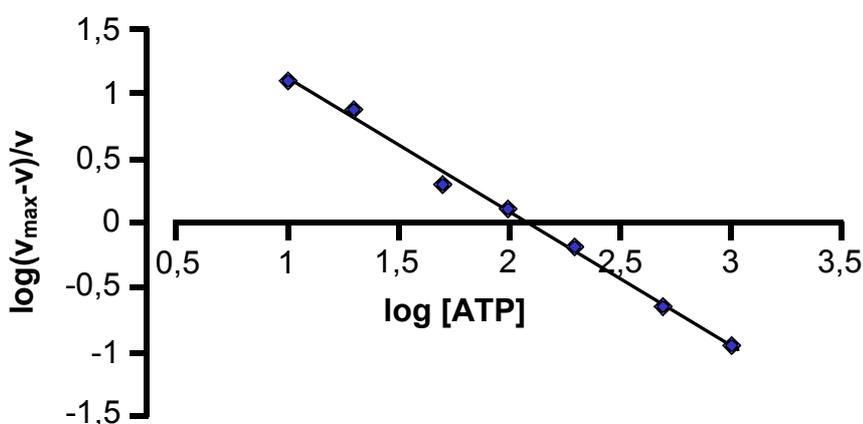


Abb. 35: der zu Abb. 34 gehörende Hill-Plot ($R^2 = 0,9941$; $y = -1,0329 \cdot x + 2,1471$)

4.4.1.9 Proteinabhängigkeit

Die Proteinabhängigkeit wurde mit 0,1-0,4 μg Protein bestimmt.

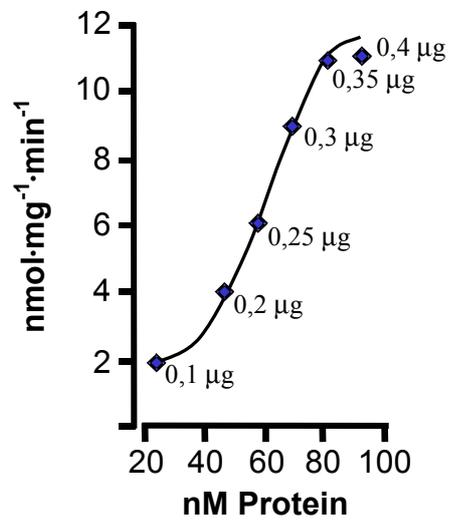


Abb. 36: spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Proteinkonzentration

4.4.2 N-terminal verlängerte Konstrukte

Mit den Primern *PLACSynt.SKNINE* bzw. *PLACSynt.ERVNL* und *PLACSynt.Katas* wurden zwei längere Konstrukte hergestellt (ab S511 und E518). Die Klonierung erfolgte über *BamH I* und *Not I* in den *pFastbacHis*-Vektor, weshalb die Konstrukte mit MRGSH₆GS beginnen.

50 ml Zellen ($8,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden mit je 200 μ l Virus infiziert und für 48 h exprimiert (modifizierter *2x AC-Cocktail*: 100 mM Tris/HCL pH 7,5; *10x AC-Startlösung* mit 0,75 mM ATP). Es wurden sowohl die Zellhomogenate, als auch die gereinigten Proteine getestet [Positivkontrolle: GEIVYS-Konstrukt (4.4.1)].

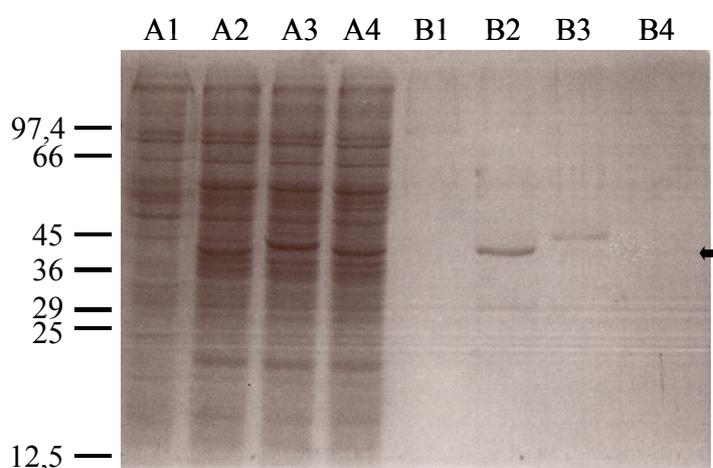


Abb. 37: A: Zellpellets (~5,5 μ g Protein/Spur), B: Eluate der Proteinreinigung (~0,6 μ g Protein/Spur); 1: Leervirus, 2: GEIVYS-Konstrukt, 3: SKNINE-Konstrukt, 4: ERVNL-Konstrukt; der Pfeil deutet auf die Position von Spuren gereinigten Proteins, die auf dem Originalgel noch sichtbar waren

Die Laufstrecken entsprachen den erwarteten Größen (GEIVYS: 44 kD; SKNINE: 46 kD; ERVNL: 45 kD).

Tab. 28: spezifische Aktivitäten ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) der Konstrukte GEIVYS, SKNINE, ERVNL

Konstrukt	Zentrifugations- überstand	gereinigtes Protein
GEIVYS	10,5	327
SKNINE	2,7	93
ERVNL	1,6	n.d.
Leervirus	0,72	13

Von den gereinigten Proteinen zeigte das SKNINE-Konstrukt knapp 30% der Aktivität des GEIVYS-Konstrukts.

4.4.3 C-terminal verkürzte Konstrukte

Mit dem Primer *PLACSynt.Kats* (vgl. 4.4.1) und den Antisenseprimern *PLACsineTPRL1* und *PLACsine TPRL2* wurden zwei verkürzte Konstrukte hergestellt (G526-K755 und G526-I813). Die Klonierungen erfolgten über die N-terminalen *BamH I*- und die C-terminalen *Not I*-Schnittstellen in den *pFastBacHis*-Vektor.

Je 100 µl der Viren wurden auf 50 ml Zellen gegeben, 48 h Expressionsdauer. Es wurden die gereinigten Proteine und die Zentrifugationsüberstände getestet (Regenerierendes System in beiden Fällen; *2x AC-Cocktail* mit 100 mM Tris/HCL pH 8,0; *10x AC-Startlösung* mit 5 mM ATP).

Enzymatische Aktivität war nicht meßbar. Ein PAGE-Gel zeigte, daß beide Expressionsprodukte in *Inclusionbodies* waren.

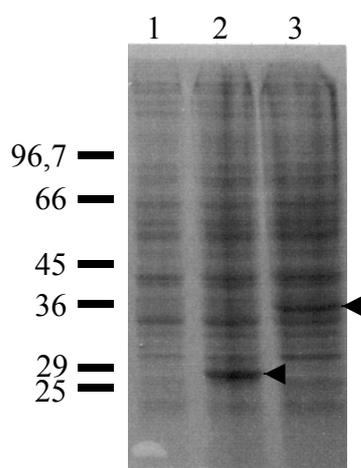


Abb. 38: PAGE-Gel der Pellets (~13µg Protein/Spur): 1: Leervirus; 2: K755-Konstrukt; 3: I813-Konstrukt; die Dreiecke deuten auf exprimiertes Protein

Die Laufstrecken entsprachen den erwarteten 28, bzw. 35 kD. Die Proteine wurden ebenfalls in einem Westernblot detektiert (Abb. 39, S. 92).

Die bisherigen Proteine waren Varianten der katalytischen Domäne. Es wurde gezeigt, daß für optimale Expression und Reinigung mit G526 begonnen werden muß und daß eine C-terminale Verkürzung nicht möglich ist.

Die nachfolgenden Experimente wurden mit zwei Holoenzymvarianten beginnend ab Methionin 1 (MPEP) und Methionin 55 (MLKYK) durchgeführt.

4.4.4 Expression des Holoenzym ab Methionin 1

Vom gleichen Konstrukt wurden zwei *Kozak*sequenzvarianten hergestellt (4.3.4.1).

Da die Konstrukte ursprünglich für andere Expressionssysteme gedacht waren, ergaben sich aus der *Kozak*sequenz mit dem *pFastBacHis*-Vektor (Klonierung über *Bam H I* und *Not I*) folgende N-terminale Proteinsequenzen:

Konstrukt I (MPEP I): MRGSH₆GSAATMPEP....

Konstrukt II (MPEP II): MRGSH₆GSAATMGPEP....

MRGSH₆: *HexaHis-Tag*; GS: aus den *BamH I*-Schnittstellen resultierende ASn;
AAT, G: aus der *Kozak*sequenz resultierende ASn; M: Methionin 1 des Holoenzym

Je 50 µl Virus wurde auf 15 ml Zellen gegeben, 56 h Expressionsdauer. Die Zellen wurden in *Sf9-AC-Suspensionspuffer* ohne KCl₂ und MgCl₂ aufgeschlossen. Eine Membranpräparation erfolgte gemäß 3.4.7. Die aus der Präparation erhaltenen 2400xg Pellets wurden auch getestet.

Tab. 29: spezifische Aktivitäten (pmol·mg⁻¹·min⁻¹) von MPEP I und MPEP II

	Membranpräparation	2400xg-Pellets
Leervirus	54,6	45,6
MPEP I	32,8	40,4
MPEP II	28	38,3

AC-Aktivität war nicht vorhanden. Die Expressionsprodukte wurden durch einen Westernblot detektiert (4.4.4.1).

4.4.4.1 Westernblot der Konstrukte ab Methionin 1, sowie der C-terminal verkürzten Konstrukte

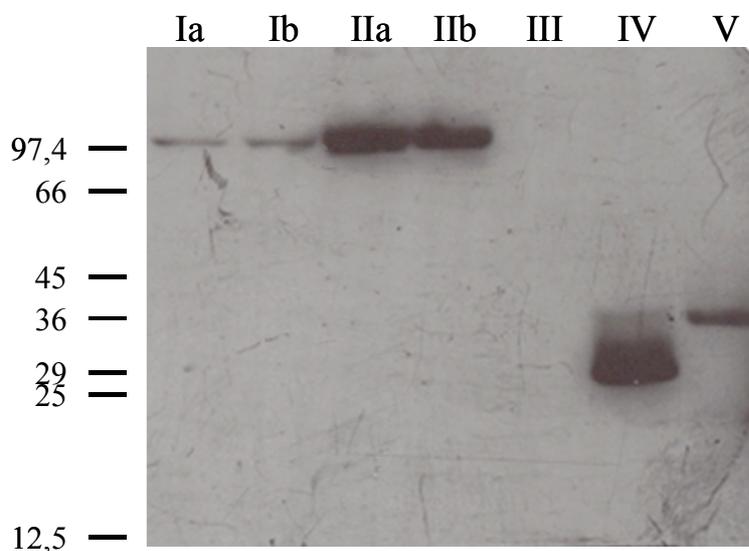


Abb. 39: Westernblot (12,5%-Gel, 5s Exposition, ca. 6 μ g Protein pro Spur): Ia, Ib: Membranen; IIa, IIb: 2400xg-Pellets; a: MPEP I-Konstrukt, b: MPEP II-Konstrukt; III: Leervirus; IV: K755-Konstrukt; Spur V: I813-Konstrukt

Die beiden großen Konstrukte liefen bei \sim 100 kD (erwartete Größe: 108 kD). Die C-terminal verkürzten Konstrukte liefen auf den erwarteten Höhen von 28 kD (K755) und 35 kD (I813).

4.4.5 Expression des Holoenzym ab Methionin 55

Als die Genomprojekte noch nicht weit genug fortgeschritten waren, um das Startmethionin sicher zuzuweisen, wurde eine Expression ab M55 versucht. Zwei Produkte mit unterschiedlicher *Kozak*sequenz wurden hergestellt (4.3.4.2). Die Klonierung in den *pFastBac 1*-Vektor erfolgte am 5'-Ende über eine *Hpa I*-Schnittstelle, welche *blunt* auf *Stu I* des Vektors ligiert wurde, am 3'-Ende wurde regulär über die *Not I*-Schnittstelle kloniert. Die N-terminalen Sequenzen lauten:

Konstrukt a (MLKYK a): MLKYK....

Konstrukt b (MLKYK b): MGLKYK....

M: Methionin 55; G: aus der *Kozak*sequenz resultierende AS

Die Infektion der Zellen erfolgte mit je 10 μ l Virus auf 15 ml Zellen, 48 h Expressionsdauer. Der AC-Test der Zellhomogenate (23 und 25 pmol \cdot mg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$) zeigte keine erhöhte Aktivität gegenüber dem Leervirus (28 pmol \cdot mg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$), (*2x AC-Cocktail* mit Tris/HCl pH 8,0).

Die Proteine wurden kaum exprimiert (SDS-PAGE-Analyse).

4.5 Peptidantikörperproduktion

Mit einem spezifischen Antikörper sollte es gelingen, das Holoenzym in Plasmodien nachzuweisen. Verschiedene Versuche in *E.coli* reinigbares Protein zu gewinnen scheiterten. Daher wurde mit einem synthetischen Pentadekapeptid gegen den Plasmodium AC-C-Terminus immunisiert (3.6).

(Verdünnungen der AK und Präimmunseren s. 3.5.4.3.2, S. 47; Preblocks s. 3.5.4.4, S. 47)

4.5.1 Westernblots mit in *Sf9*-Zellen exprimierten Proteinen

Aufgetragen wurden die 2400xg-Pellets von MPEP I und MPEP II (s. 4.4.4), das GEIVYS-Konstrukt (Pellet, s. 4.4.1), sowie das Antigen (vgl. 2.5.2.3).

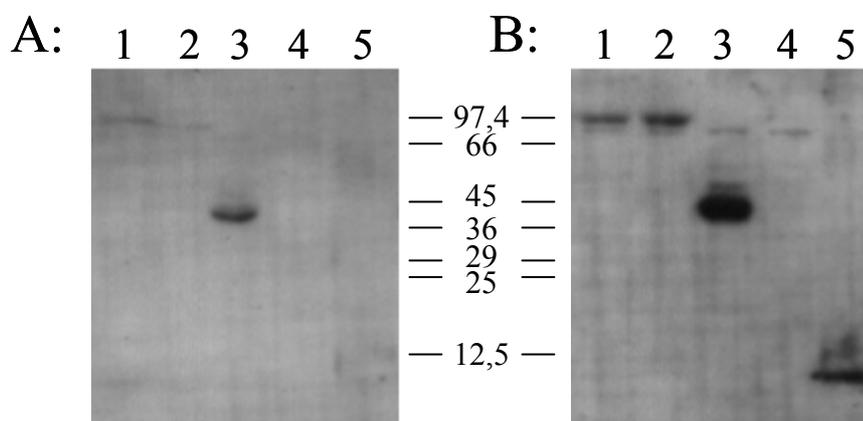


Abb. 40: A: Westernblot mit *AK 4020g* (1:1000), B: Westernblot mit *AK 4021g* (1:500); [1: MPEP I-Konstrukt, 2: MPEP II-Konstrukt, 3: GEIVYS-Konstrukt, 4: Leervirus (1-4: je 6,8-7,8 µg Protein), 5: 10 µg Peptid; 90 s Expositionszeit, 12,5% PAGE-Gel]

Nur *AK 4021g* erkennt in allen Fraktionen Plasmodium AC-Expressionsprodukte. Es gibt eine unspezifische Bande unterhalb von 97,4 kDa, die auch in der Leerkontrolle auftritt.

Mit beiden AK und dem MPEP I-Konstrukt wurde ein Preblock durchgeführt, der die Spezifität der AK bestätigt.

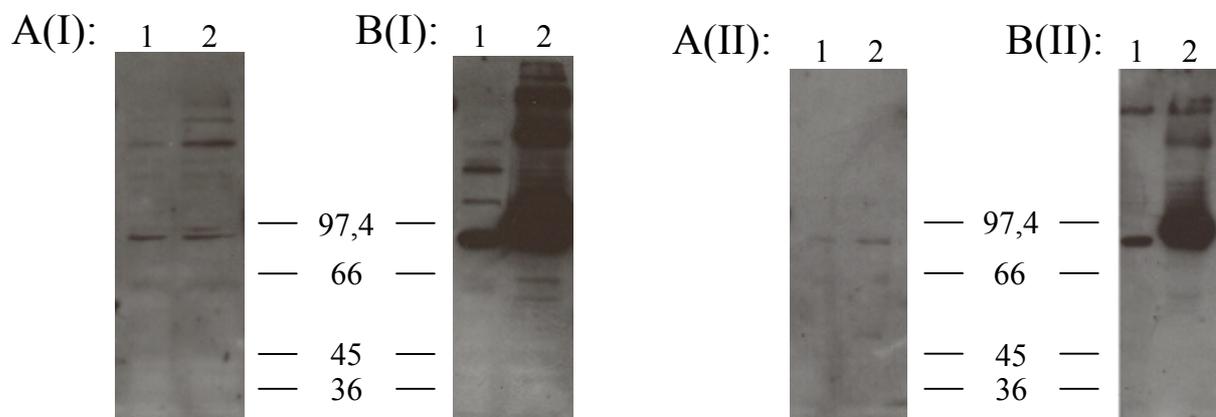


Abb. 41: A: Preblock, B: unblockierter AK; (I): AK 4020g (1: 250), (II): AK 4021g (1:500); 1: Leervirus (7,8 μ g Protein), 2: MPEP I-Konstrukt (6,8 μ g Protein); (7,5% PAGE-Gele; 10 min Expositionszeit)

4.5.2 Westernblots mit *P.falciparum*-infizierten Blutzellhomogenaten

Es wurden Blutzellpräparationen der Binh1 und 2042-Stämme verwendet, die für unterschiedliche Zeiten nach einer Synchronisation kultiviert wurden (12, 24, 36, 48, 60 und 72 h). Weiterhin wurden angereicherte Trophozystenstadien benutzt, humane rote Blutzellen (RBC) dienten als Negativkontrolle. Die Aufarbeitung erfolgte durch Dr. M. Hansen (26). Alle Blots wurden mit 7,5% PAGE-Gelen durchgeführt (*AK 4020g*: 1:250; *AK 4021g*: 1:500).

4.5.2.1 *AK 4021g* (u. Präimmunserum)

Zunächst wurde der AK getestet, welcher mit Protein aus *Sf9*-Zellen das stärkere Signal lieferte (s. Abb. 40). Es wurden eine RBC-Präparation und späte Trophozysten des 2042-Stamms (12 h) aufgetragen. Ein Preblock wurde parallel durchgeführt (10 min Exposition).

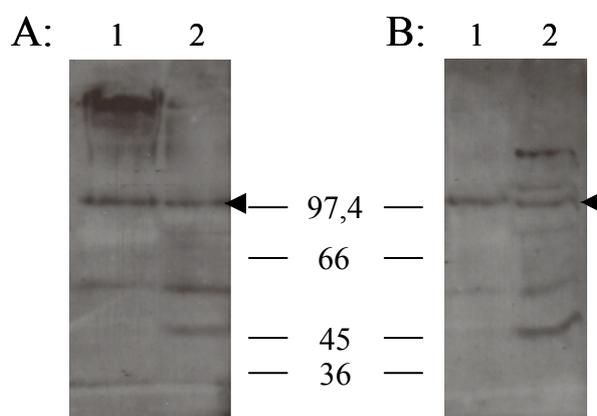


Abb. 42: *AK 4021g*: A: pregeblockter Westernblot; B: nicht blockierter Westernblot [1: RBC, 2: mit *P.falciparum* infizierte RBC (jeweils >10 µg Protein)]; Dreiecke: Proteinbande aus RBC, detektiert durch den sek. AK

Eine Bande ist auch im Preblock nicht zu eliminieren. Sie entsteht durch Bindung des sekundären Antikörpers an ein Protein aus RBC (nachgewiesen durch Inkubation eines Blots mit dem sekundären AK allein).

Für die Analyse bedeutsam sind die Banden bei 121 und 148 kD. Ihre Größen entsprechen nicht den erwarteten 107 kD.

Zur Kontrolle, ob bereits Banden durch das Serum des nicht immunisierten Kaninchens detektiert werden, wurde ein Blot mit den gleichen Präparationen und dem *Präimmunserum* von *AK 4021g* durchgeführt:

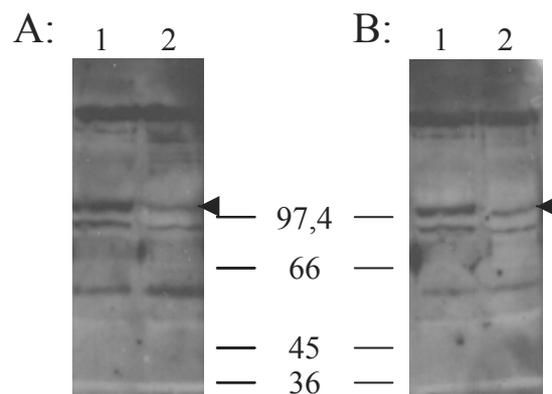


Abb. 43: Präimmenserum von AK4021g: A: pregeblockter Westernblot; B: unblockierter Westernblot [1: RBC, 2: mit *P.falciparum* infizierte RBC; (s. Abb. 42)]; Dreiecke: spezifische Proteinbande aus RBC, detektiert durch den sek. AK

Sowohl bei den RBC, als auch bei den parasiteninfizierten Zellen unterscheiden sich die Muster nicht. Die beiden spezifischen durch das Immenserum detektierten Banden fanden sich nicht wieder, wurden also allein durch *AK 4021g* erfasst.

4.5.2.2 *AK 4020g*

AK 4020g wurde ebenfalls einer Spezifitätsuntersuchung unterworfen.

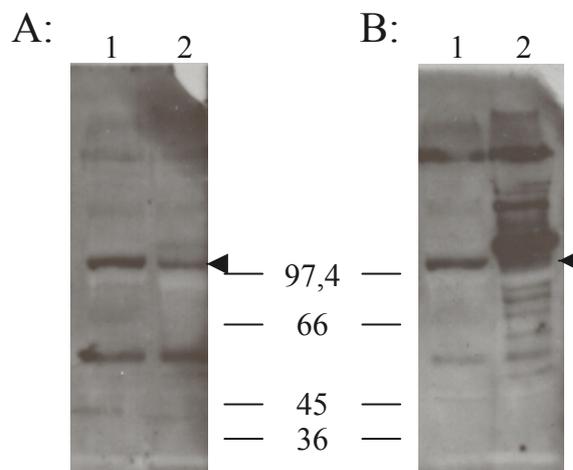


Abb. 44 *AK 4020g*: A: pregeblockter Westernblot; B: nicht blockierter Westernblot [1: RBC, 2: mit *P.falciparum* infizierte rote Blutzellen (angereicherte Trophozoiten); (Mengen: vgl. Abb. 42)]; Dreiecke: spezifische Proteinbande aus RBC (sek. AK)

Die dicke Bande in Spur B2 entspricht der mit *AK 4021g* detektierten 121 kD-Bande. Versuche mit dem Präimmenserum (gleichfalls mit Preblock) zeigten nahezu das Bandenmuster der Abb. 43.

4.5.3 Fluoreszenzimmunmarkierung von *P.falciparum*-Parasiten

Trotz fehlender Detektion einer 107 kD-Bande der Plasmodium AC im Westernblot wurde eine Fluoreszenzimmundetektion an fixierten Malariaerregern versucht (s. 3.7). Dafür gab es zwei Gründe: zum einen besteht die Möglichkeit eines atypischen Laufverhaltens auf dem SDS-PAGE-Gel, zum anderen ist denkbar, daß posttranslationale Modifizierungen zu Laufveränderungen führen (22, 33, 47).

AK 4021g erbrachte mit den methanolfixierten Ausstrichen Fluoreszenzsignale.

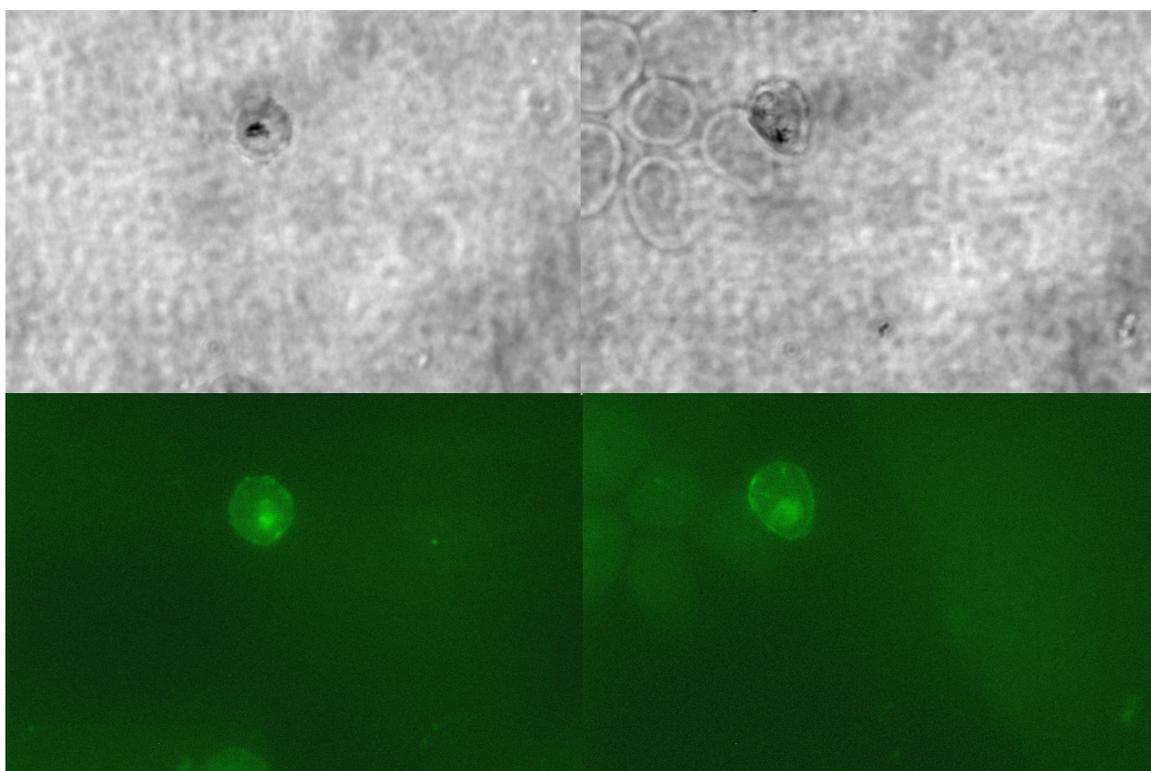


Abb. 45 Zwei repräsentative, mit *AK 4021g* markierte *P.falciparum*-Parasiten: oben: Durchlicht; unten: Fluoreszenzemission; bei den runden bis ovalen Strukturen handelt es sich um rote Blutzellen [Die Aufnahmen wurden am physiologischen Institut gemacht; Mikroskop: Nikon *Optiphot*; bildverarbeitendes Programm: *MetaVue*, Version 4.6r3 von Universal Imaging Corporation; Kamera: SPOT JR von Diagnostic Instruments, Inc.; Belichtungszeit im Durchlicht 1,5 s, im Fluoreszenzlicht (495nm) 10 s]

Die Parasiten und die von ihnen befallenen RBC's werden durch den Antikörper markiert. Von der gesamten Parasitenpopulation zeigten jedoch nur etwa 10% diese Fluoreszenz. Es handelt sich um späte Trophozoitenstadien. Bei der intrazellulären Struktur handelt es sich vielleicht um die *Food vacuole* der Erreger.

RBC's ohne Parasitenbefall zeigen eine minimale Hintergrundemission. Eine etwas stärkere Emission ist sowohl bei Behandlung mit pregeblocktem Antikörper, als auch mit Präimmuns serum zu beobachten (keine Markierung der Parasiten).

Es wurden ebenfalls Untersuchungen mit angereicherten Gametozyten durchgeführt (fertige Ausstriche von Wijnand Eling/ Nijmegen, Department of Medical Microbiology, University Medical Center St.Radbond). Diese blieben negativ.

4.5.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In Zusammenarbeit mit Dr. H. Schwarz (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) wurde eine Immundetektion auf elektronenmikroskopischer Ebene versucht (3.8).

Die Markierung erfolgte über die gesamte Fläche der Parasitenquerschnitte, membranäre Strukturen wurden nicht besonders markiert (Aufnahmen liegen bis jetzt nicht vor).

4.6 Expression der Plasmodium AC in Paramecium

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. H. Plattner (Zellbiologie und Ultrastrukturforschung, Universität Konstanz) und Dr. I. Skovorodkin (Russische Akademie der Wissenschaften, St.Petersburg als Gast im Arbeitskreis Prof. Ammermann, Zoologie, Universität Tübingen) wurde versucht, C-terminal GFP-markiertes Holoenzym in *Paramecium caudatum* zu exprimieren. Da im Arbeitskreis Plattner bereits positive Erfahrungen mit der Überexpression GFP-markierter sarkoplasmatischer Ca^{2+} -ATPase in *P.caudatum* gemacht wurden, war dies ein Leitfaden für die folgenden Experimente (9, 28, 77).

4.6.1 Aufbau des C-terminal GFP-gekoppelten AC-Gens

Mit Hilfe der Primer *PlNat5'-EcoRI;SpeI* sowie *PlNat3'sSTOP+BglIII* wurde ein Konstrukt gebaut, das C-terminal über einen Linker an GFP gekoppelt war.

Dies wurde mit Hilfe eines GFP-haltigen *pBluescript II SK(-)*-Vektors realisiert [=pGFP C1C aus dem Arbeitskreis von Prof. Plattner, modifiziert von A. Schultz]. Die 3'-*Bgl II*-Schnittstelle der AC wurde *sticky* auf die 5'-*BamH I*-site des aus dem Vektor stammenden GFP-Linkers ligiert. Als Expressionsvektor diente *pPXV* [(29), (Klonierung via *Spe I* und *Xho I*)].

klonalen Kultur heran. Die erhaltenen Zellen fluoreszierten nicht mehr. Durch PCR wurde gezeigt, daß das injizierte Gen oder Bruchstücke davon weiterhin propagiert wurden [(82); zur Aufarbeitung vgl. 3.9].

D. Geissinger (Arbeitskreis Prof. Plattner) führte ebensolche Injektionsexperimente durch. Die Injektanden zeigten innerhalb der ersten 12 h eine starke Fluoreszenz im endoplasmatischen Retikulum, sowie ein schwaches Signal in den kortikalen Membranen und den Cilien. Nach 24 h war eine Restfluoreszenz in vakuolären Strukturen sichtbar, die Membran war weiterhin markiert, aber die Zellen starben.

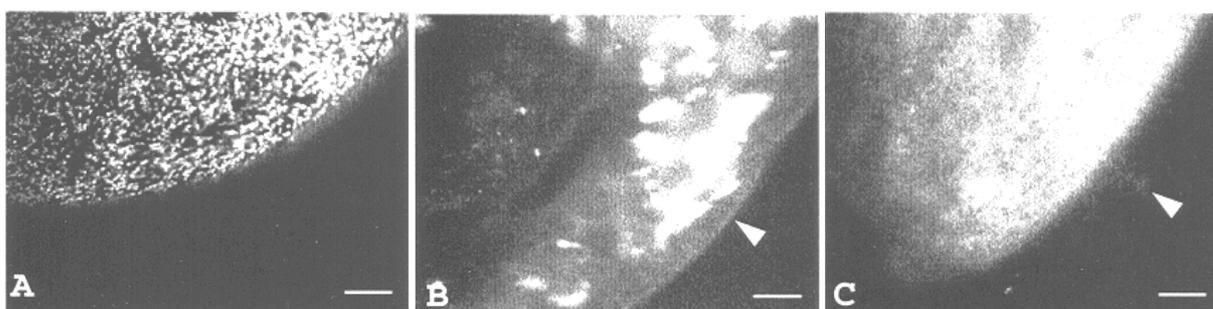


Abb. 48: Fluoreszenzaufnahmen von Paramecien nach Prof. Plattner (Z-Stufe 0,5 μm): A: 12 h nach Injektion, granuläre Strukturen: endoplasm. Retikulum; B: 24 h nach Injektion, Pfeil: markierte Membran, innen: vakuoläre Strukturen (Superposition der Bilder 15 und 16, entspricht 6,9-7,4 μm); C: 12 h nach Injektion, Pfeil: Cilium (Superposition der Bilder 1-5 (entspricht 0,0-2,0 μm); Balken: 10 μm ; 63fache Vergrößerung

4.7 Expression von GFP-markierten Plasmodium AC-Konstrukten in CHO-Zellen

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. B. Fakler (Institut Berghof, Tübingen) wurde versucht, die Plasmodium AC ab dem Methionin 55 sowohl in zwei *Kozak*sequenzvarianten des Holoenzym (vgl. 4.4.5) als auch in einer C-terminalen Verkürzung eines dieser Konstrukte ohne die katalytische Domäne in CHO-Zellen zu exprimieren. Die Konstrukte waren N- und C-terminal an GFP gekoppelt. Ziel war es, zu membranständig exprimiertem Protein zu gelangen, um elektrophysiologische Untersuchungen durchführen zu können. Die Klonierung erfolgte durch A. Schultz.

4.7.1 Konstrukte mit N-terminal gekoppeltem GFP

Die zwei *Kozak*sequenzvarianten (ab M55) wurden N-terminal über *Xho I* (aus dem *pBluescript II SK (-)*-Vektor) und C-terminal über *Not I* (*blunt* auf *Sma I*) kloniert. Da sich vor Beginn des Leserahmens im Linker 5'-Längenheterogenitäten aus den Primern befanden, wurden die Vektoren *pEGFP-C1* und *-C2*, die sich im Leseraster unterscheiden, verwendet.

In *pEGFP-C1* (Produkt des *PLACSynt.5'-s/b*-Primers: MLKYK b):

```

...TACAAGTCCGGACTCAGATCTCGAGGTCGACGGTATCAAGTTAACGCCGCCACCATGGGACTG...
  Y  K  S  G  L  R  S  R  G  R  R  Y  Q  V  N  A  A  T  M  G  L
    238                                     55  56
←GFP→ |                               ←Linker→ | ←Holoenzym→

```

In *pEGFP-C2* (Produkt des *PLACSynt.5'-s/a*-Primers: MLKYK a):

```

...TACAAGTCCGGCCGGACTCAGATCTCGAGGTCGACGGTATCGAAAGTTAACGCCGCCACCATGCTG...
  Y  K  S  G  R  T  Q  I  S  R  S  T  V  S  K  V  N  A  A  T  M  L
    238                                     55  56
←GFP→ |                               ←Linker→ | ←Holoen.→

```

Abb. 49: Die Übergänge aus den *pEGFP*-Vektoren in die Holoenzymkonstrukte; unterstrichen: *Xho I*-Klonierungsstelle; *Kozak*sequenz; 238: letzte AS des GFP; 55: M55 der Holoenzymvarianten; 56: L56 der Holoenzymvarianten; dunkelgrau: primerbedingte Längenheterogenitäten

Für das um die katalytische Domäne verkürzte Konstrukt wurde das *PLACSynt.5'-s/b*-Primerprodukt verwendet, ebenfalls in *pEGFP-C1*-Vektor N-terminal über *Xho I* kloniert.

Die Verkürzung wurde mit Hilfe des Primers *PLACSynt.Channelas* realisiert, welcher die ersten vier Aminosäuren der katalytischen Domäne noch mitnimmt und dann ohne ein Stopcodon auf einer *Not I*-Schnittstelle endet (*blunt* auf *Sma I* des Vektors ligiert). Das Stopcodon stammt aus dem Vektor, es ergibt sich ein C-terminaler Aminosäureüberhang:

```

...ATCAACGGCGAGATCGTGGCGGCCGGGATCCACCGGATCTAG
  I  N  G  E  I  V  A  A  G  I  H  R  I  .
    526          529
←verk.Holoenzym→ |   ←C-Überhang→ |

```

Abb. 50: Das C-terminale Ende des verkürzten Konstrukts; 526: Beginn des katalytischen Bereichs, 529: letzte „native“ Aminosäure des Konstrukts; die Sequenzen der *blunt* klonierten (ehemaligen) Schnittstellen sind wie folgt markiert: *Not I*, *Sma I*!

4.7.2 Konstrukte mit C-terminal gekoppeltem GFP

Für diese Konstrukte wurde ein GFP aus dem Arbeitskreis von Prof. Flockerzi, Heidelberg verwendet (Es entspricht dem GFP aus *pS65T-CI* von Clontech, ACC: AAA73906). Die Stopcodons der beiden M55-Kozaksequenzvarianten wurden mit Hilfe des Primers *PLACsine TGAAs* herausmutiert. Das um die katalytische Domäne verkürzte Konstrukt entsprach der Sequenz in Abb. 50.

Alle drei Konstrukte wurden N-terminal über *Xho I* in *pBK-CMV*-Vektor kloniert. C-terminal wurden die *Not I*-Schnittstellen *blunt* auf *EcoR V* des N-terminalen GFP-*Stuffers* kloniert.

```

... CGCAAGTTCCTGCAAAAGTCCCGGGCCATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACCATGGGTAAA...
   R  K  F  L  Q  K  S  A  A  I  E  F  L  Q  P  G  G  S  T  M  G  K
                   884                                     1
←Holoenzym→ |                               ←Linker→ | ←GFP→

```

Abb. 51: Der Linkerbereich zwischen den M55-Holoenzymkonstrukten und GFP; 884: letzte AS der Plasmodium AC; 1: erste AS von GFP; die Sequenzen der *blunt* klonierten (ehemaligen) Schnittstellen sind wie folgt markiert: *Not I*, *EcoR V*.

```

... ATCAACGGCGAGATCGTGCGGGCCATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACCATGGGTAAA ...
   I  N  G  E  I  V  A  A  I  E  F  L  Q  P  G  G  S  T  M  G  K
                   529                                     1
←verk.Holoenzym→ |                               ←Linker→ | ←GFP→

```

Abb. 52: Der Linkerbereich zwischen dem verkürzten Holoenzym und GFP; 529: letzte AS der verkürzten Holoenzymvariante; 1: erste AS von GFP; die Sequenzen der *blunt* klonierten (ehemaligen) Schnittstellen sind wie folgt markiert: *Not I*, *EcoR V*.

Das C-terminale Ende aller drei Konstrukte wurde über *Not I* mit einem *Stuffer* aus dem *pBluescript II SK(-)*-Vektor kloniert.

```

... TACAAATAATAAGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCGGGCCCATCG...
   Y  K  .
   238
←GFP→ | ←pBlue.-Stuffer→ | ←pBK-CMV →

```

Abb. 53: Der C-terminale Übergang in *pBK-CMV*; unterstrichen: *Not I*-Klonierungsstelle; 238: letzte AS des GFP

4.7.3 Fluoreszenzmessungen in CHO-Zellen

Die Transfektion von CHO-Zellen und die Fluoreszenzmessungen wurden von Dr. N. Kloecker durchgeführt. Das Protein aller Konstrukte war in diffusen Strukturen in den Zellen verteilt. Eine membranständige Expression war nicht erkennbar.

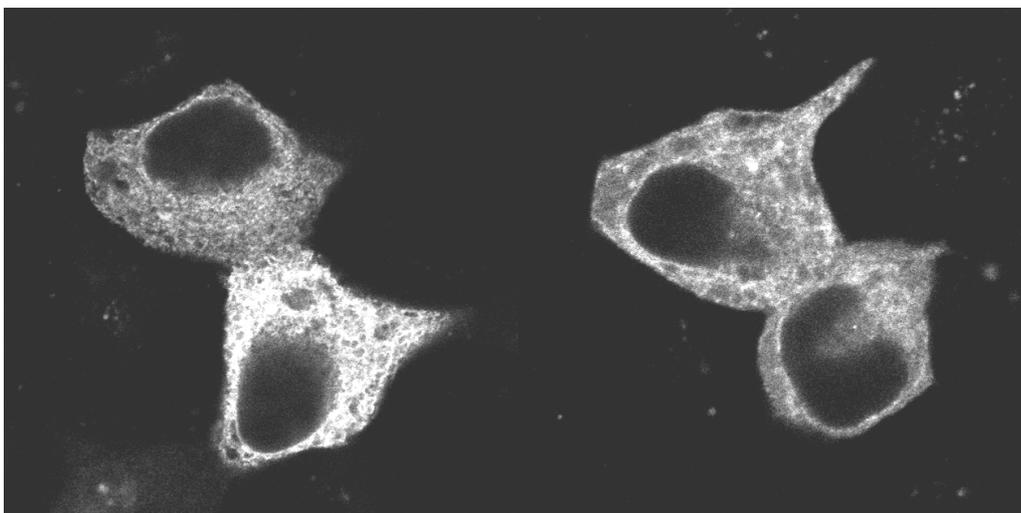


Abb. 54: Zwei repräsentative Beispiele für Expressionsmuster der Plasmodium AC-Konstrukte in CHO-Zellen

4.8 Expression der Plasmodium AC in Oozyten

Ebenso wurde auch in Oozyten versucht das Holoenzym membranständig zu exprimieren, um elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen.

Als Expressionsvektor diente *pBF1*. Kloniert und exprimiert werden sollten die unter 4.3.4.1 beschriebenen Konstrukte (MPEP I/II). Da die im Vektor singuläre *Mlu I*-Linearisierungsstelle wegen einer ebensolchen in den Inserts nicht verwendet werden konnte, mußte der Vektor an dieser Stelle mutiert werden. Nach schneiden des Vektors mit *Mlu I*, anschließender *Klenow*-behandlung und Religation wurde eine *BssH II*-Linearisierungsstelle generiert (*BssH II* schneidet in den Inserts nicht.) Die *BamH I* dieses Vektors wurde dann regulär auf die 5'-*BamH I* der Inserts kloniert, am 3'-Ende der Inserts wurde *Not I* jeweils *Klenow*-behandelt und *blunt* auf *Pvu II* des Vektors gesetzt.

Die Linearisierung über *BssH II*, sowie die mRNA-Synthese und Messung nach Injektion erfolgte im Labor von Prof. Fakler. Ionenströme waren nicht detektierbar.

4.9 Alignment von Plasmodium AC-Isoenzymen

Es wurde zunächst ein Sequenzalignment der vollständig bekannten, auf cDNA-Basis charakterisierten ACn von *P.falciparum*, *T.pyriformis* und *P.tetraurelia* erstellt.

Wie *tblastn*-Suchen mit der Plasmodium AC in Datenbanken [*TIGR*, *Sanger*, *PlasmoDB*, *Cryptosporidium parvum Genome Sequence Projekt*, *ToxoDB*, *NCBI-genomic Blast* (other eucaryotes)] ergaben, ist die Struktur in sechs weiteren Organismen der Alveolata wiederzufinden.

Die Sequenzen aus den Datenbanken waren genomischer Herkunft und wurden durch Vergleich mit dem bereits erstellten Alignment auf Intron- und Exonstrukturen untersucht. Das Gesamtalignment findet sich in 4.9.3.

4.9.1 Vollständige Isoenzymsequenzen

Von zwei Plasmodienspezies wurden Leseraster gefunden, die Ähnlichkeiten zur Plasmodium AC zeigten. Die Anzahl und die Positionen der Introns waren konserviert.

4.9.1.1 *P.knowlesi*

gnl|pk|Sanger_PKN.0.008975 (17669 bp, 137 reads), Plasmodium knowlesi partial genome shotgun, sense (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/P_knowlesi/P_knowlesi.contigs.fasta.7.9.01):

Die kodierenden Bereiche wurden wie folgt festgelegt:

Exon 1: bp 10106-10222, Exon 2: bp 10616-10682, Exon 3: bp 10882-10986, Exon 4: bp 11131-11330, Exon 5: bp 11474-11609, Exon 6: bp 11743-11784, Exon 7: bp 11893-12039, Exon 8: bp 12157-12215, Exon 9: bp 12372-12429, Exon 10: bp 12584-12724, Exon 11: bp 12886-12976, Exon 12: bp 13152-13276, Exon 13: bp 13400-13491, Exon 14: bp 13593-13679, Exon 15: bp 13772-13848, Exon 16: bp 14023-14174, Exon 17: bp 14308-14580, Exon 18: bp 14672-14926, Exon 19: bp 15118-15204, Exon 20: bp 15385-15451, Exon 21: bp 15575-15646, Exon 22: bp 15809-16072 (Stop)

4.9.1.2 *P.yoelii yoelii*

gnl|py|TIGR_c5m269 (05/29/01), [ftp://ftp.tigr.org/pub/data/p_yoelii/py_contigs_5x_annot.fasta.gz] (June 01, 2001 Release):

Es handelt sich um zwölf vorläufige Contigs (ohne Einzelbezeichnungen), die überlappen und von denen drei den kompletten Leserahmen enthalten.

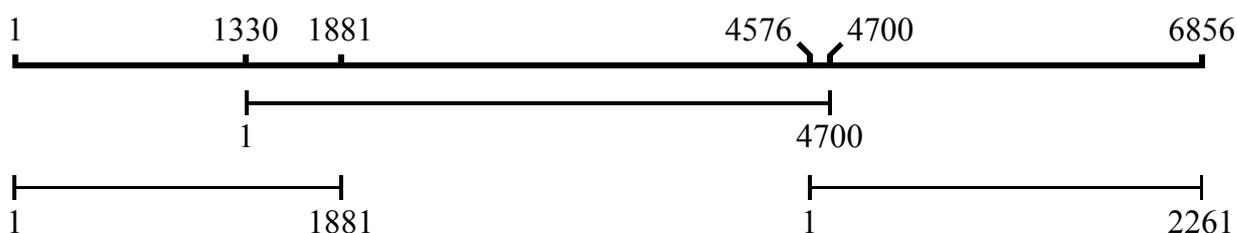


Abb. 55: Schema des Zusammenbaus dreier Fragmente zu einem Contig von 6856 bp

Die kodierenden Bereiche wurden wie folgt festgelegt:

Exon 1: bp 190-306, Exon 2: bp 580-642, Exon 3: bp 774-881, Exon 4: bp 1019-1218, Exon 5: bp 1353-1503, Exon 6: bp 1642-1683, Exon 7: bp 1781-1879, Exon 8: bp 2033-2091, Exon 9: bp 2234-2289, Exon 10: bp 2375-2515, Exon 11: bp 2630-2717, Exon 12: bp 2823-2947, Exon 13: bp 3159-3250, Exon 14: bp 3426-3513, Exon 15: bp 3622-3698, Exon 16: bp 3881-4032, Exon 17: bp 4170-4436, Exon 18: bp 4584-4838, Exon 19: bp 4976-5062, Exon 20: bp 5250-5324, Exon 21: bp 5431-5502, Exon 22: bp 5596-5859 (Stop)

4.9.2 Teilsequenzen von Isoenzymen

Nachfolgend sind Treffer wiedergegeben, die Bruchstücke mit Ähnlichkeit zur Plasmodium AC darstellen. Den Bezeichnungen der Reads oder Contigs sind die Identitäts- und Wahrscheinlichkeitsangaben angefügt. Darunter stehen die manuell bestimmten kodierenden Bereiche (Exons) und deren Position bezogen auf die zur Plasmodium AC „sense“-orientierten Fragmente.

4.9.2.1 *P.chabaudi*

Es wurde eine Sequenz mit Ähnlichkeit zur Plasmodium AC gefunden:

gnl|pcgss|Sanger_PC7d2.p1t bases 36 to 445 (QL to QR), Plasmodium chabaudi clone AS shotgun genomic DNA sequence (Länge: 409 bp), (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/chabaudi/chab.clipped.dbs>):

Score = 74.3 bits (181), Expect(2) = 6e-16, Identities = 47/95 (49%),
Positives = 51/95 (53%), Gaps = 37/95 (38%), Frame = -2

(bp 285-1, AS 444-501);

Score = 25.8 bits (55), Expect(2) = 6e-16, Identities = 12/13 (92%),
Positives = 12/13 (92%), Frame = -1

(bp 409-371, AS 434-446)

Reverse complement: 1. Exon: bp 1-38, 2. Exon: bp 133-219, 3. Exon: bp 331-409

4.9.2.2 P.berghei

Insgesamt wurden fünf Sequenzen gefunden:

- I) *gnl|pbgss|UFL_253PbF09*, Plasmodium berghei ANKA clone Genome Survey Sequence (GSS) made from mung bean nuclease-digested genomic DNA library (Länge: 628 bp), (<http://plasmodb.org/cgi-bin/plasmodb/servlet/sequenceImgPage.pl?naSeqId=93289907&start=1&end=628&download=fasta>):

Score = 102 bits (255), Expect = 1e-22, Identities = 48/87 (55%),
Positives = 61/87 (69%), Frame = -3

(bp 306-46, AS 798-884)

Reverse complement: 1. Exon: bp 164-236, 2. Exon: bp 323-582

- II) *gnl|pbgss|UFL_253PbA06*, Plasmodium berghei ANKA clone Genome Survey Sequence (GSS) made from mung bean nuclease-digested genomic DNA library (Länge: 634 bp), (<http://plasmodb.org/cgi-bin/plasmodb/servlet/sequenceImgPage.pl?naSeqId=93289964&start=1&end=634&download=fasta>):

Score = 50.8 bits (120), Expect = 5e-07, Identities = 21/28 (75%),
Positives = 23/28 (82%), Frame = -2,

(bp 402-319, AS 185-212)

Reverse complement: 1. Exon: bp 155-316 (1A im Read zuviel annotiert im PolyA-stretch von bp 231-236), 2. Exon: bp 462-503

- III) *gnl|pbgss|UFL_216PbF06*, Plasmodium berghei ANKA clone Genome Survey Sequence (GSS) made from mung bean nuclease-digested genomic DNA library (Länge: 604 bp), (<http://plasmodb.org/cgi-bin/plasmodb/servlet/sequenceImgPage.pl?naSeqId=93292976&start=1&end=602&download=fasta>):

Score = 50.4 bits (119), Expect = 7e-07, Identities = 26/40 (65%),
Positives = 31/40 (77%), Frame = -2,

(bp 309-390, AS /)

Score = 49.3 bits (116), Expect = 1e-06, Identities = 24/27 (88%),
Positives = 25/27 (91%), Frame = -3

(bp 116-36, AS 475-501)

Reverse complement: 1. Exon: bp 297-384, 2. Exon: bp 491-567

- IV) 93293631 *P. berghei* ANKA GSS AZ522546 (Länge: 557 bp), (<http://plasmodb.org/cgi-bin/plasmodb/servlet/sequenceImgPage.pl?naSeqId=93293631&start=65&end=166&download=fasta>):

Score = 140 (54.3 bits), Expect = 1.7e-08, P = 1.7e-08 Identities = 25/34 (73%),
Positives = 33/34 (97%), Frame = +2
(bp 65-166, AS 226-259)

Exon: bp 65-163

- V) 93289964 *P. berghei* ANKA GSS AZ526215 (Länge: 634 bp), (<http://plasmodb.org/cgi-bin/plasmodb/servlet/sequenceImgPage.pl?naSeqId=93289964&start=1&end=634&download=fasta>):

Score = 51.2 bits (120), Expect = 5e-06, Identities = 21/28 (75%),
Positives = 23/28 (82%), Frame = -2
(bp 402-319, AS 185-212)

Reverse complement: 1. Exon: bp 165-316 (1A zuviel annotiert im PolyA-Stretch bei bp 232), 2. Exon: bp 462-530

4.9.2.3 *Cryptosporidium parvum*

Die Sequenzen sind Rohdaten. Sie überlappen miteinander und waren Matrizen für erneute Datenbanksuchen, um daran anschließende Fragmente zu finden. Die Proteinsequenz wurde durch Vergleichen herausgearbeitet. Zum Teil war es unmöglich, Exons und Introns vorherzusagen, daher wird nach den Wahrscheinlichkeitsangaben nur vermerkt, welche translatierten Bereiche für das Alignment verwendet wurden.

- I) CP010505_A042_B01_009.R cp010505A042_B01_009.r CHROMAT_FILE:;
cp010505_A042_B01_009.r PHD_FILE: cp010505A0 (Länge: 919 bp),
(<ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A042/seqfiles/>):

Score = 155 bits (387), Expect = 5e-37, Identities = 101/273 (36%),
Positives = 146/273 (52%), Gaps = 1/273 (0%), Frame = +3
(bp 141-866, AS 426- 697)

bp 111-824

Die Suche mit Sequenz I erbrachte folgendes Ergebnis:

- II) CP010912_A170_B07_059.F cp010912_a170_b07_059.f CHROMAT_FILE:
cp010912_a170_b07_059.f PHD_FILE: cp010912 (Länge: 879 bp),
(<ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A170/>):

(keine Wahrscheinlichkeitsangaben)

Reverse complement: bp 141-804

Mit Sequenz II wurde die folgende anschließende Sequenz gefunden:

- III) *CP010601_A075_A07_049.F cp010601_a075_a07_049.f CHROMAT_FILE:*,
cp010601_a075_a07_049.f PHD_FILE: cp010601 (Länge: 889 bp),
[\(ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A075/seqfiles/\)](ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A075/seqfiles/):

(keine Wahrscheinlichkeitsangaben)

bp 83-721

- IV) *CP011211_A370_H08_064.R cp011211_a370_h08_064.r, CHROMAT_FILE:*
cp011211_a370_h08_064.r PHD_FILE: cp011211 (Länge: 725 bp),
[\(ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A370/seqfiles/\)](ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A370/seqfiles/):

Score = .172 bits (431), Expect = 3e-42, Identities = 89/217 (41%),
 Positives = 127/217 (58%), Frame = -1

(bp 701-114, AS 526-742)

Reverse complement: Exon: min. bp 22-592

- V) *CP020408_A554.F_F06_047.AB1 CP020408A554.f_F06_047.ab1,*
CHROMAT_FILE: CP020408_A554.f_F06_047.ab1 PHD_FILE: CP
 (Länge: 910 bp), [\(ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A554/seqfiles/\)](ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A554/seqfiles/):

Score = 111 bits (275), Expect(3) = 1e-40, Identities = 52/105 (49%),
 Positives = 73/105 (69%), Frame = +1

(bp 91-402, AS 487-591)

Score = 72.6 bits (175), Expect(3) = 1e-40, Identities = 35/84 (41%),
 Positives = 52/84 (61%), Frame = +2

(bp 425-676, AS 620-703)

Score = 25.1 bits (53), Expect(3) = 1e-40, Identities = 12/19 (63%),
 Positives = 12/19 (63%), Frame = +1

(bp 733-789, AS 722-740)

bp 75-680; 1 T zuviel gelesen bei bp 414

Mit Sequenz V wurde eine Suche am NCBI durchgeführt und ein Contig gefunden:

- VI) *gnI|CVMUMN|cparvum Contig 1431* (Länge: 4665 bp), (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/dumpgnl.cgi?db=Microbial%2F5807&na=1&gnl=gnI%7CCVMUMN_5807%7Cparvum_Contig1431&RID=1042840648-025890-11794&segs=36-369&seal=8B0B77C3CE0D64CD0DE08B37F36814A7&FULLSEQ=yes):

Score = 1400 bits (728), Expect = 0.0
 Identities = 770/793 (97%), Gaps = 5/793 (0%)

(bp 119-908, bp 2275-1485)

bp 38-619 (Stop)

VII) *CP010904_A194_F02_025.R cp010904_a194_f02_025.r, CHROMAT_FILE: cp010904_a194_f02_025.r PHD_FILE: cp010904* (Länge: 917 bp),
(<ftp://ftp.vcu.edu/pub/parvum/A194/seqfiles/>):

Score = 159 bits (397), Expect = 3e-38, Identities = 84/209 (40%),
Positives = 123/209 (58%), Frame = +3

(bp 114-674, AS 501-709)

bp 141-674

4.9.2.4 *Toxoplasma gondii*

Es wurden drei Isoenzyme der Plasmodium AC gefunden:

I) *TGG_12849* (Länge: 2865 bp), (http://www.toxodb.org/cgi-bin/toxodb/SeqRetrieval.cgi?release=2.0&contig=TGG_12849&start=1&end=2864&go.x=5&go.y=3):

Score = 154 (59.3 bits), Expect = 2.0e-18, P = 2.0e-18,
Identities = 32/90, (35%), Positives = 54/90 (60%)

(bp 525-614, AS 609-697)

Score = 145 (56.1 bits), Expect = 2.0e-18, P = 2.0e-18,
Identities = 31/69(44%), Positives = 46/69 (66%)

(bp 1338-1406, AS 500-567)

Score = 132 (51.5 bits), Expect = 3.8e-17, P = 3.8e-17,
Identities = 20/47(42%), Positives = 29/47 (61%)

(bp 1103-963; AS 541-587)

Score = 52 (23.4 bits), Expect = 2.0e-18, P = 2.0e-18,
Identities = 11/32(34%), Positives = 19/32 (59%)

(bp 171-76; AS: 693-724)

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 1.9e-18, P = 1.9e-18,
Identities = 11/50(22%), Positives = 25/50 (50%)

(bp 2150-2001, AS: 383-430)

Reverse complement: 1. Exon: bp 321-414, 2. Exon: bp 612-862, 3. Exon: bp 972-1154, 4. Exon: bp 1528-1702, 5. Exon: bp 1794-1993 (Stop)

II) *TGG_12221* (Länge: 6280 bp), (http://www.toxodb.org/cgi-bin/toxodb/SeqRetrieval.cgi?release=2.0&contig=TGG_12221&start=1&end=6280&go.x=0&go.y=2):

Score = 529 (191.3 bits), Expect = 2.8e-57, P = 2.8e-57,
Identities = 113/251(45%), Positives = 164/251 (65%)

(bp 81-331, AS 474-722)

Score = 143 (55.4 bits), Expect = 2.8e-57, P = 2.8e-57,
Identities = 39/160(24%), Positives = 82/160 (51%)

(bp 1555-1714, AS 726-883)

1. Exon: bp 84-792, 2. Exon: bp 1540-2073 (Stop)

III) *TGG_4401* (Länge: 3633 bp), (http://www.toxodb.org/cgi-bin/toxodb/SeqRetrieval.cgi?release=2.0&contig=TGG_4401&start=1&end=3633&go.x=14&go.y=3):

Score = 156 (60.0 bits), Expect = 2.2e-11, P = 2.2e-11,
Identities = 30/74(40%), Positives = 48/74 (64%)

(bp 513-586, AS 673-746)

Score = 83 (34.3 bits), Expect = 2.2e-11, P = 2.2e-11,
Identities = 22/81(27%), Positives = 42/81 (51%)

(bp 1095-1175, AS 805-883)

Score = 53 (23.7 bits), Expect = 2.2e-11, P = 2.2e-11,
Identities = 8/15(53%), Positives = 12/15 (80%)

(bp 326-370, AS 659-673)

1. Exon: bp 273-368, 2. Exon: bp 514-547, 3. Exon: bp 1123-1331 (Stop)

4.9.3 Sequenzalignment

Auf den folgenden sechs Seiten ist das Sequenzalignment der elf bekannten Isoenzyme wiedergegeben.

Abkürzungen:

P.chab.: Plasmodium chabaudi

P.berg.: Plasmodium berghei

P.know.: Plasmodium knowlesi

P.yoel.: Plasmodium yoelii yoelii

P.falc.: Plasmodium falciparum

T.pyrif.: Tetrahymena pyriformis

P.tetra.: Paramecium tetraurelia

C.parv.: Cryptosporidium parvum

T.gond. (sowie *T.gond.2 und 3*): Toxoplasma gondii

Die einzelnen strukturellen Bereiche sind unterhalb der Sequenzen eingetragen und mit Gedankenstrichen markiert. Nummerierung erfolgte nur bei vollständigen Sequenzen.

Konservierung: **schwarz**: 100%, **dunkelgrau**: 80-99%, **grau**: 60-80% (ähnliche AS werden als direkt vergleichbar behandelt)

Die katalytische Domäne ist mit Punkten unterhalb der Sequenz markiert, M steht für metallbindende, P für purinbindende, X für phosphatbindende, * für die den Übergangszustand stabilisierende Aminosäuren.

P.know.	: : MPDL	4
P.yoel.	: : MPDF	4
P.falc.	: : MPEP	4
T.pyrif.	: MSQEKLRVEINTLQNSESKMNSHEKQSQNHHEAVTLPHKQQQSQDDQGEFEKKNRLLKQDSSDKKNQNRISIDTN	75
P.know.	: : KHIYAKEIFPNEKLIKYYFLKCRSKEKVLYSFTSDNEIIDEK - KYDNQLETQKVEDLYSDALTRLVNL - LYLLY	76
P.yoel.	: : KDICTKEIFPSKKIKRFFLKRCSKEKVLYSFTSENEHGEKRRSYKNIKQIKNIHFELLTRRFHKCLSFY	79
P.falc.	: : KQIYANNIFDNDKIKRFFLKYRSKEKVLYSFTSENDIINEEK - RSKNNLCMLKYKNICLNHITSKFFKYSKWVY	78
T.pyrif.	: : SKNEATEALTELTKKVNPRISQIGLEAQRESNRSDSASNOEDTKNLSIFKDEEEKKEQANKPRIKIFKI - VLESH	149
P.tetrau.	: : MSEAQVNPEVDNQSVISEDSNNEVDVDFGQDQEIFKFPLLTS - ILDSS	47
P.know.	: : LFFVIFSKDVFYILLL - - - - - EKKYDTLSD - YLILLLIFICYVEMMI - NPL - TRRTYTCYFMEF - FEVISLIS	138
P.yoel.	: : LILLIFSKDILYIFF - - - - - DKGQNILMDT - ITVLIIUNIVETIF - HL - SINTSYIYFMEF - FDLVLSLIM	141
P.falc.	: : LFLIFSKDFFYLLL - - - - - NKKYDFISD - IFISILLFGCLIEIF - NPL - MDSTYIFYFMEF - FDIISFML	140
T.pyrif.	: : LFSILINVTIYSIFADNIRIMTTRESADLGF - VCTIALSFAIEIIM - SMI - EKKDYTFSEFFFWLJLLSTVS	221
P.tetrau.	: : WSQILLVNLITIALFGDDIRIIAFDKRADDF - VITICMIIFSIEIIASLV - - RTDYFNSEFFFWLJLLSTVS	119
P.berg.	: : FYRAEDINNEE - - - - - IFYLMQLFKA LKIKIYRLVIKIIKDHTKDKYKHRNE	203
P.know.	: : LFSDLFVFEYYLFDLDFYVK - - - - - SDVGSEE - - - - - VVYLHLVKA LRVTKIYRLIICFVERHTREKYKHRNE	211
P.yoel.	: : IFGLSICENYVFN YLCSFKFYHVEDINNEE - - - - - IFYLIQLFKA LKIKMYRLVIKIIKDHTKDKYKHRNE	210
P.falc.	: : LFFDIFLFEKYFFDFIYFTNSLYTWKIDKDN - - - - - IYLIQLFKS LRIIKIYRFVINFIKKEKYKHRNE	210
T.pyrif.	: : MILDINLTNIMFENSGNQINGIAKAGQ - - - - - ASRVGSKAGRWRLVRLIRIVKLYKAA - QQQTDHSSQTSQNF	292
P.tetrau.	: : QILDITSFNIAVGLQGSVAAKASASQLSQANKAKTSSKAIRVRLVRLIRIVKLYKAA - SYSQEQAFKQPIRTQ	193
P.berg.	: : WNFEKME SMKNKTCLKVKKIFIYF - - - - -	234
P.know.	: : WNFEKME SMQNR TNLKWLDSDPHGDAFSPF - - - - -	226
P.yoel.	: : WNFEKME SMKNKTCL - - - - -	224
P.falc.	: : WNFEKME SMKNRPL - - - - -	360
T.pyrif.	: : KLMEKIRKRKM KKVHPGPGDSKGISDSKGPNDSSGQFNEQEEGSKSQVQTSSTKESSIQKGGFNPP - - - - -	268
P.tetrau.	: : TTKKSKA TIYPSVYENINNGPVEQENLNKKENNTQREGEDNANSENRENQNMVAKQQIDNSIPKVQQIRRQS	
C.parv.	: : QINRS AFLS IKNLSQLS I LRNQYPGDKSWPIAYMLEL CNFVY TNSIGDSTKWMKLVAIQSPY	
T.gond.	: : NGEIAWKW	

P. berg.	-----RDNLKFTNKMHLLTIKRFFVSLIFVMLSYILIEL	287
P. know.	-----QESLKFINKMHLALIIRYFMSMFFVMSLFIETMSIPKVQNSMEYFIYNLDLISLEDYYES	289
P. yoel.	-----KDNLKFTINKMHLTIKRFFVSLIFVMSYILIELVTFKGNKSSMSYFIYNIDRTNFDDHYES	287
P. falc.	-----KESLKFINKMHLALIIRYFMSLIFIMLSYIMIEIYISKESKSPMNYFIYNLDLIVDFEFYET	421
T. pyrif.	-----KES-KVSKILTDTITTKRVIILVVLVFIIMPLFSVDYY-FDPPSPIEISVKQIKMVCESTTLT	342
P. tetrau.	MKEPSQVKAKEKES-RVSKRLSDSTTKKVIILVLLLIIMPLFSSDYFEPYSLAYAAEYVRVVAEIPNTKLT	
C. parv.	TLNPNPTCEGCPKSNLEIMTDAMSIISNSEIPSWFVGLTLPTLKEGI-----SLPIEDYRKIRKQSLRQYVSQV	
T. gond.	QILQYAGVTRENDSK-LLMLYVVTNHTTLFFVWCGCSPIIIGIRNPNCPWRDDEQDLIVYEERGIRTYAKFLKR	
	<-----Prä-TM5-----><-----TM5----->	
P. know.	EFLKALYFYTEIQEKEGAHEYIVSF--KSKRKLQNFINKKEINVGTQKWTLWDFSHLSHKELLLKFISMNPPNGR	359
P. yoel.	EFLKALYFYSNIQRTKNDEEYLISF--KSKVKLQNFVNKKEINIGKEKHILWDFTKSPYTEMMKLLDMKIPN-A	360
P. falc.	EFLKALYFYSAIQKNRDEEYLISI--KSKRKLKNFINKKEIDISGINYLLWDFTNLSHNDLLKFVTPSSAN-Q	358
T. pyrif.	DIKNQMDY--IVQMFDYSATLSLQTPFPDPSFMKEYKSDYHNLRDEEQLGIIYTDYDTFVKYHPPSDSTA-Q	493
P. tetrau.	EINQTYFVIDQHKSFDPVGYIT--NPFTEIE-----NYETPSYQYLRSSKSYFELVDPVLVGLIYI	
C. parv.	CMRSGIDSI SNFYSSCPEELKAKITM-----	
T. gond.	EERQOEAIL-----	
P. know.	DDEEEVILSGTLKDLNLSLRRYETKVYQSAEFTFYINVKENVKKR-IGN-----VVLLKILVIVFSFIILFYFTSE-L	429
P. yoel.	QNEEEITMDSTIKNSSQLRQYEMRVYKSKDFIFYINIKKIKIQK-IGN-----IVILKLFILFSFFILFYFSIE-L	430
P. falc.	NVEEEILDHTIKNINELRYFETKIYESKDFIFHINIKRYIERT-IGN-----IILKIFIIFFSFIILFYFTCE-L	428
T. pyrif.	SINSYLKQKLD-----SDGALNIGIISTRDSAVISAGLSFCSTIFVC-VLTAGALLF-SKDAN	551
P. tetrau.	GDPVILFVSD-----NSDVESKNSIIN-----IVNTLFSAVLLFGAIAF-SNDAN	450
C. parv.	-----VFDTTTM-OGAGLSIGISFVTL-LTTLMLILV-HCVLE	
T. gond.	-----NMLLTLFVIVLVCVLIIFVFARDTQ	
	<-----TM6----->	
P. chab.	PIESITTKIKIMKSNPITLALEMQEEELN--HELDNILRTKQKKCEIKGNYEILKMEENLMKIGTLMJL	
P. berg.	-----SNPITLALEMQEEELN--HELDNILRTKQKKCEIKGNYEILKMEENLMKIGTLMJL	
P. know.	NILFPIESITKIKIMKSNPITLALEMQEEELN--HELDNILRTNKKRGIKQNYEILKMEENLMKIGTLMJL	501
P. yoel.	NILFPIESITKIKIMKSNPITLALEMQEEELN--HELDNILRTKQKKCEIKGNYEILKMEENLMKIGTLMJL	502
P. falc.	NVLFPPIESITKIKIMKSNPITLALEMQEEELN--HELNILINTKIKRKSIKENYEILKMEENLMKIGTLMJL	500
T. pyrif.	DIALGPIERMVDKVIANDP-ISSKQD-----KLSDDENKEQYETVIIEENAVKIGITLAL	608
P. tetrau.	NVALKPIDRMIVKVNIIAKNPQAKEM-----KLESDDGT--QKETTQIENAVIKIGALLAL	504
C. parv.	KHIFSSIKRINDTLISIASNPILALKM-----SNNAYNELSNENATMGKFSNKMLEETFSKIGITLAV	
T. gond.	ILVVAPIEKMNIVKQLADPILRQPTMIEPQTEESSEKQKSANQLETSSKQKSANQLETSMLETTIKIGGLIQV	
T. gond. 2	GKGGAESMEITAMLEKTKIKIGGLIAL	
	<-----Poreloop-->	

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, eine Klasse III-Adenylatcyclase mit einem N-terminal gekoppelten sechs Transmembranspannen umfassenden möglichen Ionenkanal aus *P.falciparum* zu klonieren, die einer Paramecium AC entspricht. Bruchstücke davon waren im Plasmodiumgenomprojekt sichtbar.

Zunächst ist durch Homologieklonierung der offene Leserahmen eines Isoenzym der Paramecium AC aus *T.pyriformis* bestimmt worden, um konservierte Bereiche festzustellen. PCR-Suchen mit *Wobbel*primern zeigten, daß mehrere Isoformen vorhanden sind, so daß prinzipiell die Möglichkeit einer AC-Heterodimerbildung in Analogie zur Pseudoheterodimerisierung der Mammalia-ACn besteht.

Die Tatsache, daß nur ein Gen dieses Typs von *P.falciparum* gefunden wurde (s.a. Nature 419), legte eine homodimere Spezies nahe. Mit Hilfe von RT-PCRn gelang es, den offenen Leserahmen zu bestimmen, welcher als Grundlage für die Neusynthese des Gens diente.

5.1 Analyse des Ionenkanals und der katalytischen Domäne

Die Analyse der Proteine wurde vergleichend mit der Paramecium AC unter Zuhilfenahme der *DNASTAR*-Programme *Protean* und *MegAlign* durchgeführt. Wie Dr. K. Hambach zeigte, besteht im Bereich der Transmembranspannen Ähnlichkeit zu spannungsgesteuerten K_v -Kanälen (25). Der wahrscheinliche K^+ -Selektivitätsfilter ist hier jedoch nicht wie üblich zwischen TM5 und TM6 angeordnet, sondern folgt der TM6.

Mit den über das Internet zur Verfügung stehenden Programmen war es unmöglich, die AC-Domänen eindeutig zuzuordnen, der K_v -Kanal (Ausnahme: Tetrahymena AC) und der TPRL wurden gar nicht vorhergesagt (vgl. 7.1 fff).

Anhand von Alignments sollen diese Ähnlichkeiten nachfolgend gezeigt werden (vergleichend wurden die anderen aus Datenbanken extrahierten AC-Isoenzymsequenzen einbezogen; zugrunde gelegt wird das Sequenzalignment aus 4.9.3).

5.1.1 Der K_v-kanalähnliche Bereich

5.1.1.1 Der N-Terminus

Die N-Termini der Plasmodien ACn sind in Sequenz und Länge einander ähnlich, die Enzyme der Ciliaten dagegen längenheterogen. Eine Analyse der Ciliaten-ACn ergab keinen Hinweis auf ein Signalpeptid (58). Auch der Vergleich der Plasmodien ACn mit bekannten *P.falciparum*-Signalsequenzen war negativ (71). Der bei K_v-Kanälen für die Tetramerisierung verantwortliche T1-Bereich, welcher der ersten Transmembranspanne vorangeht, ist in den Protozoen-ACn nicht vorhanden (51).

Bei der cDNA-Analyse der Plasmodium AC wurde ein zusätzlich gespleißtes Intron („Intron - 1“) gefunden (4.3.2.2). Möglicherweise wird dadurch ein anderer 5'-UTR generiert, der zum alternativen Start ab Methionin 55 führt (48, 55, 73). Vergleicht man die N-Termini der beiden anderen Plasmodienspezies, so besitzt nur *P.yoelii yoelii* ein weiteres Methionin (M42) vor TM1. Daher wurde Methionin 1 als Beginn der Plasmodium AC-Sequenz festgelegt.

Das Auftreten „falsch“ ausgespleißter Introns scheint bei *P.falciparum* keine Seltenheit zu sein (Dr. Baker, London). Ein weiteres ist für den C-terminalen Bereich der Plasmodium AC beschrieben (4): 5'-GT: bp 2591/2592 (s. 4.3.2.3); 3'-AG: 317/318 bp dem TAA-Stopcodon folgend. Es ergäbe sich ein alternativer C-Terminus der Plasmodium AC mit folgender Sequenz:

860
...**WNFL**RRLLNFQHTYKPFPEQFFGYAYFLDFFRIVTIL.

(Fett: die letzten vier Aminosäuren des Holoenzym, W860 ist beziffert)

Ob dies realisiert wird, ist fragwürdig. Unterhalb der konservierten C-Termini der Enzyme aus *P.knowlesi* und *P.yoelii yoelii* finden sich in den Leserastern keine vergleichbaren Sequenzen. Die Bereiche sind sehr AT-reich und von niedriger Komplexität auf Proteinebene. Auch hier müßte man ein unterschiedliches Prozessierungsverhalten bei verschiedenen Plasmodien annehmen.

5.1.1.2 Die transmembranspannenden Domänen

Stellvertretend für die Gruppe der K_v-Kanäle wurde der CIK1-Kanal der Ratte, welcher bei der *ExPASy-MotifScan*-Suche mit der Paramecium AC den höchsten Treffer erbringt [=K_v1.1 (IA), (P10499)] und ein *Shaker*kanal aus der gleichen Gruppe (Sequenz von Prof. Fakler) mit den ACn „alignt“. Sie besitzen wie die Isoenzyme sechs transmembranspannende Segmente

(S1-S6) mit einem Spannungssensor im vierten Abschnitt und einen für K⁺-Ionen spezifizierenden Selektivitätsfilterbereich (*Poreloop*).

Bei unterschiedlichen K_v-Kanälen finden sich innerhalb der Transmembranbereiche (außer in S4-S6) positionskonservierte Aminosäuren, Aspartat oder Glutamat und Serin oder Threonin (72). Variabilitäten sind an solchen Positionen bei K_v-Kanälen relativ selten. Daneben sei noch auf ein durchgängig konserviertes Arginin in S2 und das PXP/G-Motiv in S6 verwiesen. Die hydrophilen Aminosäuren einer Transmembranspanne treten mit Aminosäuren anderer Helices in Wechselwirkung und führen damit zur Stabilisierung einer bestimmten Konformation des Kanals in der Zellmembran (1, 24, 74). Die positiven Ladungen des Spannungssensors in der vierten TM bezwecken, daß auf Änderungen der Membranspannung mit einer Konformationsänderung der Helix reagiert wird, die an die Öffnung des Ionenkanals gekoppelt ist (16, 69).

5.1.1.2.1 Transmembranspannen 1-3 (TM1-3)

Im ersten Segment der K_v-Kanäle finden sich zwei konservierte Serinreste in einem Abstand von sieben Aminosäuren. Das erste S von Shaker und CIK1 (Position 5) findet nur in *P.tetraurelia* ein Pendant, das Serin an Position 12 ist innerhalb der Gruppe der Plasmodien konserviert. Auffällig sind bei den Ciliaten zwei konservierte Threoninreste an Position 15, ebenso wie die konservierten Serinreste an Position vier. Die Plasmodien besitzen ein bemerkenswertes Lysin-, Aspartatmotiv (Positionen 13 und 14).

In der zweiten Transmembranspanne ist ein in der K_v-Kanalgruppe konserviertes Glutamat vorhanden. Dieses tritt bei K_v-Kanälen mit einem Aspartat aus S3 und einem Lysin des Spannungssensors in Wechselwirkung und stabilisiert so die Struktur (74).

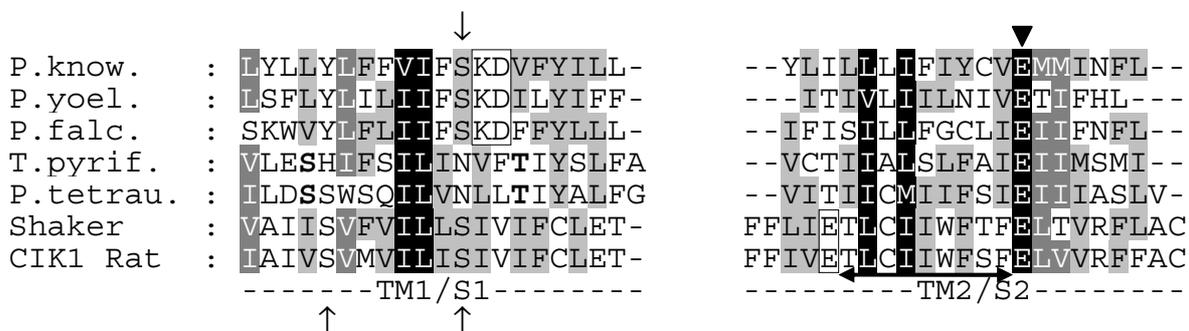


Abb. 56: Die ersten beiden Transmembranspannen der Protozoen-ACn, Shaker und CIK1. TM1/S1: Das konservierte Serin der Plasmodien ACn wird durch den oberen Pfeil bezeichnet, konservierte hydrophile ASn der K_v-Kanäle durch die unteren Pfeile. Das KD-Motiv der Plasmodien ist umrahmt, konservierte hydrophile ASn der Ciliaten sind fett gedruckt. TM2/S2: Das durchgängig konservierte Glutamat wird durch ein Dreieck bezeichnet, ein weiter N-terminal gelegenes (nur in K_v-Kanälen konserviertes) Glutamat ist umrahmt (Querpfeil: s. Diskussion u.)

Dagegen ist die in nahezu allen K_v -Kanälen vorhandene, erste kationische AS (hier: Glu) in den Protozoen-ACn nicht wiederzufinden.

In der dritten Helix tragen Shaker und CIK1 ein konserviertes Aspartat an Position 5 und an den Positionen 15 und 18 ein Threonin. Hier ist eine direkte Positionskonservierung nicht nachvollziehbar. Bei den Protozoen-ACn finden sich jedoch zwei konservierte Aspartate (P.knowlesi: einmal E) und ein durchgängig konserviertes Serin.

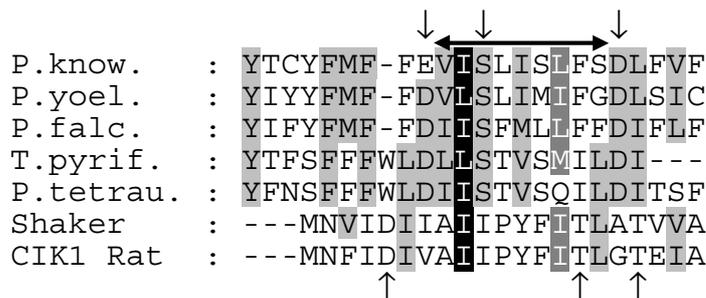


Abb. 57: Die dritte Transmembranspanne der Protozoen-ACn, Shaker und CIK1; Pfeile oberhalb: konservierte hydrophile ASn der Isoenzyme. Pfeile unterhalb (senkrecht): konservierte hydrophile ASn der K_v -Kanäle (waagerechter Pfeil: s. Diskussion u.)

Vergleicht man weiterhin die Abstände der kationischen ASn der K_v -Kanäle in S2 mit denen der Protozoen-ACn in S3, so fällt auf, daß sich jeweils neun ASn dazwischen befinden (s.a.⁸).

5.1.1.2.2 Transmembranspanne 4, Spannungssensor (TM4)

Die vierte Helix ist der Spannungssensor des Kanals, den sowohl K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} - und cGMP-abhängige spannungsgeschaltete Kanäle besitzen (72).

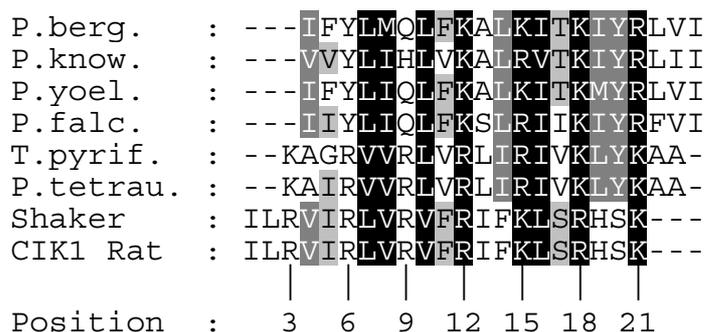


Abb. 58: Die Spannungssensoren der Protozoen-ACn, Shaker und CIK1; Positionen positiver Ladungen sind beziffert

⁸ Sato Y., Sakaguchi M., Goshima S., Nakamura T., Uozumi N.: *Molecular dissection of the contribution of negatively and positively charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the voltage sensor in the K^+ channel, KATI*. J. Biol. Chem. (2003, Jan. 29.; epub ahead of print)

Spannungssensoren tragen mehrere positive Ladungen, die durch zwei lipophile Aminosäuren voneinander getrennt werden. Das Konsensusmotiv lautet (R/K)XX(R/K). Kanäle der *Shaker*-subfamilie tragen sieben, die der *Shaw*-subfamilie sechs und die der *Shab*-subfamilie nur fünf positive Ladungen. *T.pyriformis* und *P.tetraurelia* stehen dem Shakerkanal mit sieben Ladungen näher als die Gruppe der Plasmodien mit nur vier basischen Aminosäuren. Die geneigt in die Membran eingelassene Helix reagiert bei Veränderungen des Membranpotentials mit einer leichten Transversalverschiebung und Drehung und führt so zu einer Konformationsänderung und Öffnung des Kanals (8, 20). Daß der Aufbau des Sensors einen entscheidenden Einfluß auf das spannungsabhängige Öffnen des Kanals und die anschließende Inaktivierung hat, wurde gezeigt (62, 63, 75). Das in spannungsabhängigen Ionenkanälen konservierte Leucin-Heptaden-Motiv ist bei den Protozoen-ACn nicht vorhanden, schon weil die Schleifenbereiche zwischen TM4 und TM5 bedeutend länger sind. Insgesamt sind dabei fünf Leucinreste in einem Abstand von jeweils sieben Aminosäuren angeordnet. Das Motiv erstreckt sich vom Ende des Spannungssensors bis in das fünfte Transmembransegment (67).

ILRVIRLVRFRIFKLSRHSGKQILGRTKASMREGLLIFFFIGVVLFSSAVYFA

Abb. 59: Das Leucin-Heptaden-Motiv am Beispiel von Shaker, es findet sich ebenso im CIK1-Kanal wieder; S4; S5

Das erste Leucin wird normalerweise in allen spannungsabhängigen Kanälen mit Ausnahme den Mitgliedern *Shal*-Subfamilie gefunden, die dort ein Phenylalanin tragen. Bis heute ist die Funktion nicht verstanden, in jedem Fall hat es Einfluß auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (72).

5.1.1.2.3 Der Prä-TM5-Bereich, sowie die Transmembranspannen 5 und 6 (TM5, TM6)

Der fünften Transmembranspanne ist eine konservierte Region vorangestellt, die sich in K_v -Kanälen nicht findet (Prä-TM5-Bereich). Bei den Plasmodien- sowie den Ciliaten-ACn fällt auf, daß vier bis fünf positive ASn in diesem 16-17 ASn langen cytosolischen Abschnitt auftreten und diesen damit sehr basisch machen. Alle Strukturen tragen darüber hinaus hydrophile ASn.

```

P.berg.      : RDNLKFTNKMHLLTIKR
P.know.     : QESLKFTNKMHLLALIKR
P.yoel.     : KDNLKFTNKMHLLTIKR
P.falc.     : KESLKFTNKMHLLALIKR
T.pyrif.    : KES-KVSKILLTDITTKR
P.tetrau.   : KES-RVSKRLSDSTTKK
C.parv.     : PKSNLEIMTDAMSIISN
T.gond.     : SDS-KLLWLYVVINHTT
    
```

Abb. 60: Der Prä-TM5-Bereich der Protozoen-ACn

Sowohl TM5, wie auch TM6 zeigen kein besonderes Konservierungsmuster im Vergleich mit den entsprechenden Transmembransegmenten aus Shaker und CIK1.

```

P.berg.      : FFVSLIFVMSYILIEL
P.know.     : YFMSMFFVMSLFIETMSI
P.yoel.     : FFVSLIFVMSYILIELVTF
P.falc.     : YFMSLIFVMSYIMIEIYYI
T.pyrif.    : VIILVVLVLFIMPLFSVDYY
P.tetrau.   : VIILVILLLIMPLFSSDYY
C.parv.     : SEIPSWFGIITLPTLKEGI-
T.gond.     : LFFVMCGCSPIIGIRNPNC
Shaker      : LGLLIFFFIFGVVLFSSAVY
CIK1 Rat    : LGLLIFFFIFGVVLFSSAVY
-----TM5/S5-----
                -VVLLKILVIVFSFIILFYF--
                -IVILKLFIIIFSFFILFYF--
                -IIILKIFIIIFSFIILFYF--
                -FCSTIFVCIVLTAGALLF---
                -IVNTLFVSAVLLFGAIAF---
                -IGISFVTLILLTTLMLLV---
                -NMLLTLFVIIVLCVLIQVF--
                IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIV
                IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIV
                -----TM6/S6-----
    
```

Abb. 61: Die fünfte und die sechste Transmembranspanne der Protozoen-ACn, Shaker und CIK1. TM5/S5: die Prolinreste sind unterstrichen (konservierte Proline sind zusätzlich fett gedruckt); TM6/S6: das PVP-Motiv der K_v -Kanäle ist unterstrichen

Auffällig ist die im Vergleich zu Shaker und CIK1 bis zu vier ASn kürzere TM6 der ACn. Das in S6 von K_v -Kanälen vorhandene PXP- bzw. PXG-Motiv ist in spannungsunabhängigen K^+ -Kanälen, wie zum Beispiel dem bakteriellen KcsA-Kanal nicht vorhanden. Es bedingt einen Knick in der Helix, so daß diese unterhalb der Zellmembran abgewinkelt verlängert weiterläuft (13). Ein konserviertes Prolin befindet sich jedoch in TM5 von T.pyriformis, P.tetraurelia und C.parvum. Fünf der acht Protozoen-ACn haben in den TM5-Segmenten Proline, wogegen die TM6-Segmente prolinfrei sind.

In Shaker und anderen Kaliumkanälen sind die S5- und S6-Segmente (entsprechend TM5 und TM6 der Protozoen-ACn) diejenigen Helices, welche in Verbindung mit dem dazwischen angeordneten extrazellulären *Poreloop* den eigentlichen Ionenkanal bilden (innere und äußere Helix). Dabei bildet das S6-Segment den eigentlichen Kanal und S5 dient der Struktur-stabilisierung (15, 64).

Analysiert man die Länge des sich zwischen TM5 und TM6 befindenden Loops, der deutlich länger als alle anderen helixverbindenden Stücke ist, ist eine andere topologische Wechselwirkung als die zwischen diesen beiden TMs und dem *Poreloop* denkbar. Möglich wäre, daß eine andere Helix an die Stelle der TM5 tritt, diese somit zwischen TM5 und TM6 eingeschoben ist und sich somit am strukturellen Grundaufbau des Kanaldurchgangs beteiligt. Ist dies der Fall, wären damit zumindest teilweise die geringen Ähnlichkeiten zwischen den K_v-Kanälen und den Protozoen-ACn in den letzten beiden Transmembranspannen erklärt [zur unterschiedlichen Anordnung von Helices in Kaliumkanälen vgl. (11)].

G(Y/F)G-Motiv ist überall konserviert, nur *C.parvum* hat ein GLG-Motiv. Ein G(Y→V)G-Austausch zeigte weiterhin K⁺-Selektivität (30).

Über das Vorhandensein einer α -helikalen *Porehelix* kann nur spekuliert werden [vgl. (15)]. Die beiden, meistens aromatischen Aminosäuren [(W/Y/selten L), (W/selten F/selten L)], welche mit der aromatischen Aminosäure des G(Y/F)G-Motivs in Wechselwirkung treten und so die Öffnungsweite des Kanals bestimmen, sind nicht zu finden. Nur *C.parvum* trägt noch ein Phenylalanin an der ersten Position, die zweite ist durch einen Serinrest besetzt. (In einigen Ausnahmefällen ist auch das Vorhandensein eines Leucinrestes zulässig [z.B. im romk-Kanal von *Rattus norvegicus* (acc Swissprot P35560): LF; oder im mSlo-Kanal aus *Mus musculus* (acc PIR A48206): YL.]).

Das *DNAstar*-Programm *Protean* gibt jedoch Hinweise auf α -helikale Strukturen.

P.falc.: NILINTKLKRKSIKENYEILKMEENLMKLGTLMLLGFGEAGAKIISK (466-512)
P.tetrau.: NPQLAKEMKLESDGTQKETTQIENAIKIGGALLALGFGDAGSAIIGT (470-516)
T.pyrif. : SSKDQKLISSDENKEQYETVVIENAIVKIGTLLALGFEAGSEIIAI (574-620)
C.parv. : NNAYNELSNENATMGKFSNKMLEETFSKLGTLLAVGLGSAGANI I I H (224-270)
T.gond. : EPQTEESSEKQKSANQLETSMLETTILKIGGLLQVGFEAGASIIIGR (122-168)
T.gond.2: GKGGAESMETAMLEKTIKIGGLLALGFEAGAEIIAK (1-38)

Abb. 63: Von *Protean* vorhergesagte α -helikale Bereiche sind unterstrichen; grau: Porehelixbereich; fett: K⁺-Selektivitätsfilter; die ersten beiden Treffer waren Ergebnis einer Chou-Fasman-Analyse, die vier anderen errechnete der Algorithmus nach Garnier-Robson

Man erkennt vermutete α -Helices überwiegend N-terminal des Selektivitätsfilters lokalisiert. Die Existenz einer solchen Struktur ist damit zwar nicht bewiesen, aber möglich. Weitere berechnete α -Helices finden sich in deutlichen Abständen. Vermutlich wird sich die Feinstruktur des Filters wegen der fehlenden konservierten aromatischen Aminosäuren anders darstellen als bei anderen K⁺-Kanälen.

5.1.1.4 Die Schleifen (extra- und intrazellulär)

Die Schleifen, welche die Helices 1-3 miteinander verbinden, sind bei allen Protozoen-ACn relativ kurz und halten diese daher in räumlicher Nähe. Die Verbindung zwischen der vierten und der fünften TM ist dagegen sehr längenheterogen. Besonders auffällig ist die lange TM5- und TM6-verknüpfende Schleife. Möglicherweise erlaubt sie, daß sich zwischen beide Transmembranspannen eine TM-Helix (TM1-4) schiebt und gestattet damit eine besondere Topologie des Kanals im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen (vgl. Abb. 68 A, S. 131).

5.1.1.5 Der Linker

Dem *Poreloop* folgt ein nahezu längenkonserviertes Verbindungsstück zum katalytischen Bereich aller Protozoen-ACn.

		↓ ↓	↓	
P.know.	:	KTISK	KNINAQER	-VNLLVN
P.yoel.	:	KTISK	KNINDQER	-INLLIN
P.falc.	:	KTISK	KNINEQER	-VNLLIN
T.pyrif.	:	EIIA	INMGROG	-DVDPMIP
P.tetrau.	:	AIIG	TNMASSG	-DVDPMLP
C.parv.	:	NIII	IHNPKD	-DKVVVK-LP
T.gond.	:	SIIG	RNMRS	GDGDLNIMIP
T.gond.2	:	EIIA	KNMKNADGGL	NAMLID

Abb. 64: Der dem *Poreloop* folgende Linkerbereich; ↓: hochkonservierte Aminosäuren (Konservierung: **schwarz**: 80-100%, **dunkelgrau**: 60-80%, **grau**: 40-60%)

Auffällig ist die durchgängige Konservierung zweier Isoleucine und eines Asparagins.

Sowohl die Längenkonservierung, als auch das Vorhandensein dreier hochkonservierter Aminosäuren läßt auf eine funktionelle Bedeutung des Linkers schließen, die über eine alleinige Verknüpfungsfunktion zur Adenylatcyclasedomäne hinausgeht. Möglicherweise koppelt er die Öffnung oder Schließung des Kanals und die damit einhergehenden Strukturverschiebungen der Helices an eine Modulation der Aktivität der katalytischen Domäne.

5.1.1.6 Zusammenfassung (5.1.1.1-5.1.1.5)

Die Analyse der Transmembranhelices legt die Verwandtschaft zu spannungsgesteuerten Ionenkanälen nahe. Dies wurde durch bioinformatische Untersuchungen von Robert Guy bestätigt (24).

Der *Poreloop* ist intrazellulär. Diese Anordnung ist im Vergleich zu bekannten kaliumselektiven Kanälen atypisch. Alleine die Gruppe der Glutamatrezeptoren (GluRs; zwei oder drei Membrandurchgänge mit einem stets intrazellulären N-Terminus; durchlässig für Na⁺, K⁺, Ca²⁺-Ionen) zeichnet sich durch eine intrazelluläre *Poreloop*lokalisierung aus und bildet damit eine Ausnahme (10). Beim direkten Vergleich des *Poreloops* eines solchen Rezeptors (GluR0) mit den Protozoen-ACn ist keine Besonderheit zu erkennen (Abb. 62).

Die Topologie der Protozoen-ACn muß sich deutlich von anderen Kaliumkanälen unterscheiden. Dies kann ein Grund dafür gewesen sein, warum eine membranständige Expression in *CHO*-Zellen im Gegensatz zu Paramecien nicht gelungen ist. Eine funktionelle Expression (Ionenleitfähigkeit) des Holoenzym in Oozyten verlief negativ. Möglicherweise besitzt die Gruppe der Alveolata, aus der diese Protozoen-ACn stammen, eine spezielle Faltungs-

maschinerie, die es ermöglicht, das Enzym in eine funktionelle Struktur zu überführen und membranständig zu exportieren.

Da eine Messung der Kanalströme bisher nicht gelang, wäre die Herstellung eines mit Teilstrukturen (Spannungssensor und K⁺-Filter) der Protozoen-ACn chimärisierten K_v-Kanals denkbar, um die Funktionalität dieser konservierten Bereiche zu zeigen. Porenbereiche lassen sich wie gezeigt wurde zwischen unterschiedlichen Kaliumkanälen unter dem Erhalt der Funktion austauschen (65).

5.1.2 Der AC-Bereich

Die Adenylatcyclasedomäne teilt sich in drei Abschnitte: N-terminal befindet sich die katalytische Domäne mit den konservierten, für die Reaktion verantwortlichen Aminosäuren. Daran schließt sich über einen 10 (T.gondii AC 3) bis 76 (P.yoelii yoelii AC) langen Linker das sogenannte TPRL-Motiv an, welches wiederum durch ein kurzes Verbindungsstück (16-21 ASn) vom konservierten C-Terminus abgesetzt ist.

5.1.2.1 Die katalytische Domäne

Der Protein-Protein-*BLAST* belegt die Verwandtschaft zu bakteriellen ACn der Klasse III und den löslichen Testes-ACn aus Mensch und Ratte (7.1.2). Dem folgenden Alignment wurden die Kristallstrukturen der Säugradenylatcyclasen zugrunde gelegt (61, 99).

P.know.	: SVFSFCDIRNFTTEITEVL	SINKNIGDAFLLVWK
P.yoel.	: SVFSFCDIRNFTTEITEAL	SINKNIGDAFLLVWK
P.falc.	: SVFSFCDIRNFTTEITEVL	TINKNIGDAFLLVWK
T.pyrif.	: AIYGFCDIRNFTDATEVL	AANKNIGDAFLLVWR
P.tetrau.	: AIYGFCDIRNFTDATEVL	SANKNIGDAFLLVWK
C.parv.	: GIYGFCDIRNFTDATEIL	SANKNVGDAFLFVWK
T.gond.	: AIFGFCDIRSFTTEITECL	AANQNVGDAFLFTWK
T.gond.2	: AVFGFCDIRNFTDATEIL	CANKNIGDAFLLVWK
T.pallid.	: ATIFFS DVRSFTTEMSEKL	VVDKFIGDAIMAIWG
Stig.aur.	: VTVLFADIRNFTGLAESL	TLDKFLGDGLMAVWG
A.cylind.	: VTVLFS DIRGYTTLTENL	TLDKFIGDALMAVFG
Rat sol.	: GVLMFVDISGFTAMTEKF	DILKFAGDALLALWK
ACI-C _{2a}	: VGVMFASIPNFNDFYIEL	EKIKTIGSTYMAAVG
GCs-β1	: VTILFSGIVGFNAFCSKH	YKVEITVGDKYMTVSG
ACI-C _{1a}	: VSILFADIVGFTGLASQC	RRIKILGDCYICVSG
GCs-α1	: VTMLFSDIVGFTAICSQC	YKVEITIGDAYCVAGG
	Me ²⁺ Rib	Pur Me ²⁺

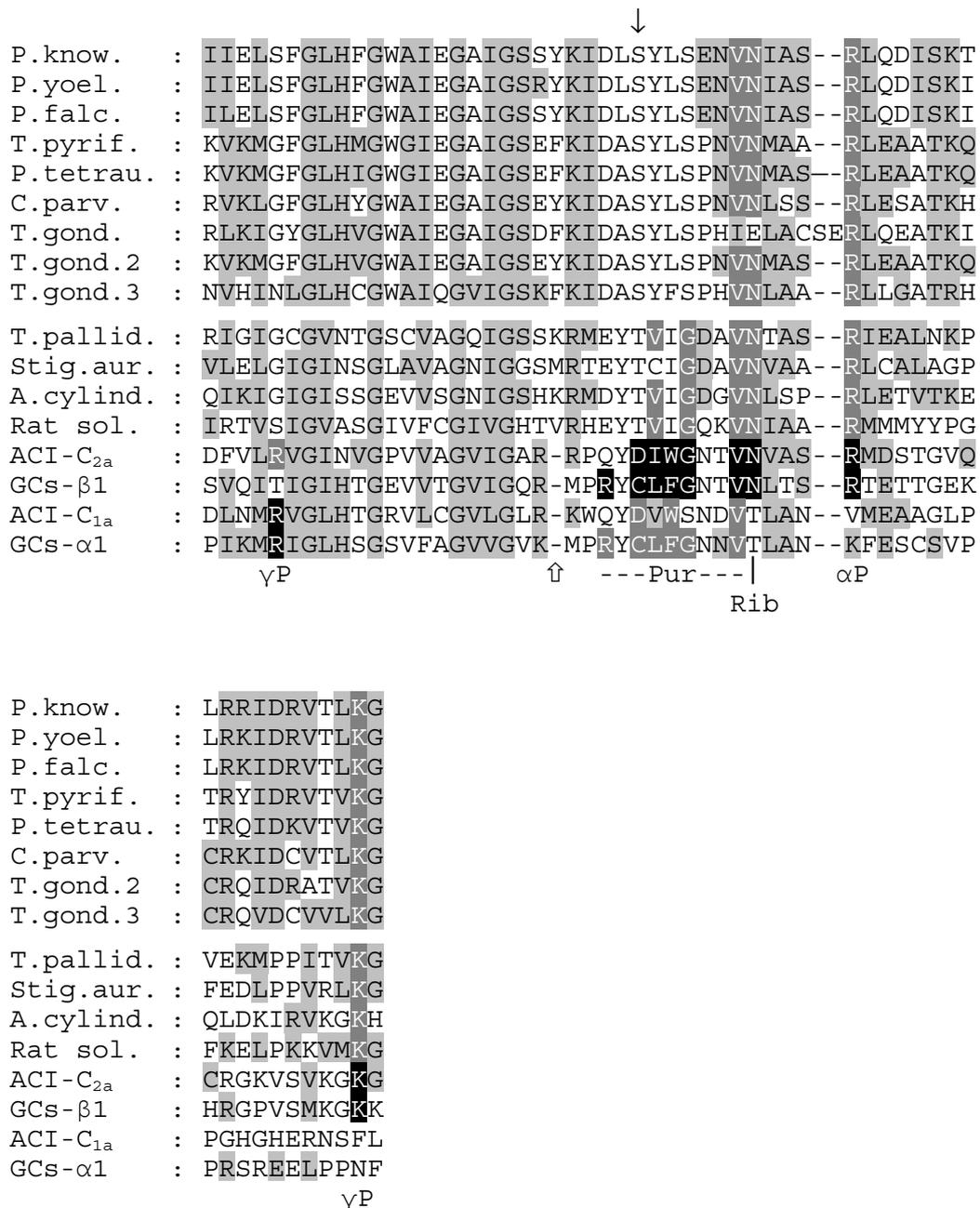


Abb. 65: Alignment der katalytischen Bereiche der Protozoen-ACn mit anderen Adenylatcyclasen. Abgebildet sind die vier Abschnitte des katalytischen Bereichs, welche die für die Reaktion verantwortlichen konservierten Aminosäuren tragen. {T.pallid.: *Treponema pallidum* (NP_218926), Stig.aur.: *Stigmatella aurantiaca* (CyaB-AC), A.cylind.: *Anabaena* sp. PCC7120 (Nostoc; CyaB1-AC), Rat sol.: lösliche Rattenhodent-AC (NP_067716), ACI-C_{2a/1a}: C_{2a/1a}-Schleifen der Säuger-AC Typ I (P19754), GCs-β1/α1: heteromere lösliche Säuger-GCn [GCs-β1 (Q02153) und GCs-α1 (Q02108)]; grau: konservierte Positionen, schwarz: aus Kristallstrukturen und „Modelling“ bekannte, für Substratbindung und Katalyse verantwortliche ASn, dunkelgrau: zu Kristallstrukturen und „Modelling“ konservierte ASn; Me²⁺: Mg²⁺ und Mn²⁺ koordinierende ASn; αP, γP: Koordination der α-, bzw. der γ-Phosphatgruppe des ATPs; Pur: Ausrichtung der Purinrings; Rib: Koordination der Ribose; ↑: zusätzliche AS der Protozoen-ACn; ↓: Serin, bzw. Threonin (Protozoen-ACn, Stig.aur. und A.cylind.) als ACI-C_{2a} D 1000-„Substitut“}

Die wesentlichen für Substratbindung und katalytische Aktivität verantwortlichen Aminosäuren sind in den Protozoen-ACn konserviert. Das für die Wechselwirkung mit Forskolin verantwortliche S876 der ACI-C_{2A}-Schleife ist nicht vorhanden [zweite Me²⁺-bindende Position im Alignment; (61)]. Die Plasmodium AC war durch das Diterpen unstimulierbar. Selbiges gilt auch für die Adenylatcyclase aus Paramecien (87).

In der Gruppe der Säuger ACn lagern sich die zwei zytosolischen katalytischen Schleifen (C1 und C2) zu einem Pseudoheterodimer zusammen, so daß ein Proteinkomplex mit zwei potentiellen katalytischen Taschen gebildet wird (102, 103). Für die Plasmodium AC wurde gezeigt, daß Homodimere für den enzymatischen Umsatz verantwortlich sind, analog der *Rv1625c*-AC aus *Mycobacterium tuberculosis* (23).

Auffällig ist das durchgängige Vorhandensein eines Serinrestes anstelle des sonst konservierten D1000 der AC I-C_{2a}-Schleife (Substratspezifität). Da sich bei der strukturell vergleichbaren *Anabaena* AC bei einer T721A-Mutation eine V_{max}-Mutante ergab, der K_m jedoch gleich blieb, konnte darauf geschlossen werden, daß diese Aminosäure im Gegensatz zu K646 weniger wichtig für die Substratbindung ist. Möglicherweise ist das Threonin nur für die Substratausrichtung verantwortlich, worauf zwei Tatsachen hinweisen. Einerseits ergibt sich durch die eingeschobene AS Y679 eine vermutlich differierende Feinstruktur der katalytischen Tasche, andererseits führte eine Mutation der anderen substratspezifisierenden AS (K646) zur gleichzeitigen K_m- und V_{max}-Veränderung (40). An der Position der N-terminalen γ -Phosphatbindestelle (Arginin) findet sich in allen ACn entweder Serin, Glycin oder Asparagin. Möglicherweise ist auch dieser Bereich durch die zusätzlich eingeschobene AS in seiner Feinstruktur modifiziert.

Die Plasmodium AC ist alleine durch Mn²⁺ stimulierbar, dies steht im Einklang mit der AC-Aktivität aus Parameciencilien und den Daten aus (80). K_m und der V_{max} liegen im Bereich von Werten, die auch für andere ACn gefunden wurden, so zum Beispiel die ACV [K_m: 64 μ M, V_{max}: 8,5 nmol·mg⁻¹·min⁻¹; (91)].

5.1.2.2 Das TPRL-Motiv

Tetratricopeptidrepeats sind unter anderem für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich (104). Sie können aber auch autoinhibitorische Effekte vermitteln oder die aktivierende Bindung von Lipiden bewirken (41). Die 34 Aminosäuren eines Motives bilden zwei über einen kurzen Linker verknüpfte α -Helices aus, die wie ein Knopf mit einem Knopfloch in Wechselwirkung treten und so eine parallel gefaltete Struktur stabilisieren (54). Eine Gruppe von sieben teilkonservierten Aminosäuren wird für diesen Effekt diskutiert: W4, L7,

G8, Y11 (bilden das Loch in Helix A) und in Helix B: A20, F24 (Knopf), A27. Üblicherweise bilden 3-16 dieser Doppelhelices ein tandemartiges, rechtshändiges, superhelikales Gefüge aus, das eine amphipatische Furche bildet (12). Über diesen Furchenbereich und auch über oberflächlich lokalisierte Aminosäuren können Interaktionen mit anderen Proteinen entweder über direkte TPR-TPR-, oder auch TPR- α -Helix-Wechselwirkungen vermittelt werden. Da es sich bei der gefundenen Struktur der Protozoen-ACn nicht um klassische Motive mit einer Reihe von TPR-Einzeldomänen, sondern um einen isolierten Repeat handelt, wurde die Bezeichnung *Tetratricopeptidrepeat-like-Domäne* (TPRL) gewählt.

	Helix A	Helix B
P.berg.	: YLNLFEQSLELYLNGKWNESKKLLDNLKNKFYFE	
P.know.	: YLRLEFENALELYLGGQWQESHRLKHLKGNSSYE	
P.yoel.	: YLNLFEQSLELYLNGKWNESKKLLDNLKNKFYFE	
P.falc.	: YLEQFKTALLESYLIIGKWNESKNILEYLKRNNIFE	
T.pyrif.	: FQKNFAVGFASKYIDGNWSESKNVLNACLKMCPPDD	
P.tetrau.	: FLHDFGQGFQGYLLGNWKEAHMLFEKAKQIRPND	
C.parv.	: FYYRFNKGLKHYLGNWYVSKQILLDLERDCIEN	
T.gond.2	: FLTTFRRGFCHYQAGEWHRAREIFVKTFQFMLGVE	
T.gond.3	: FQGMWRQALDNYLRGEWGAEEFARKCLMVPED	
A.cylind.	: FLFHYHNGRTAYLVRDFTQALACEFNSAKHTRPTD	
PP5 P.falc.	: CDALKNIGNKYFKENNYIISLRYYTEADLIKKS	
PP5 P.falc.	: DVEVDEDKELFKEYNKSATSKKSDFISIKETD	
PP5 P.falc.	: HIYYTNRSFCHIKLENYGTALIEDIDEAKINPY	
PP5 P.falc.	: AKAYRKCSCSYLLSLLKRASECFQKVLKLTDKD	
PP5 Human	: AEELKTQANDYFKAKDYENAIKFYSQATELNP	
PP5 Human	: AIYYGNRSLAYLRTECYGALGDATRAIELDKKY	
PP5 Human	: IKGYRRAASNALGKFRALRDYETVVVKVPHD	
CYA3 Rhime	: ANAYTALGTIRDFQGRHEEALALYTRAHRLDPQF	
CYA3 Rhime	: PQGHYTLALALSWMRRLDEAEHAAERAIELDPNS	
SSN6 Yeast	: AKALTSLAHLYRSRDMFORAAELYERALLVNP	
SSN6 Yeast	: PKLWHGIGILYDRYGSLDYAEAEFAKVLLEDPHF	
SSN6 Yeast	: SDVWATLGHCYLMLDDLQRAYNAYQQALYHLSNP	
SSN6 Yeast	: WDIWFQLGSVLESMEGWEQAKEAEHVLQNH	
SSN6 Yeast	: PIFWCSTGVLYYQISQYRDALDAYTRAIRLNPYI	
CC23 Yeast	: TNAWTLMGHEFVELSNSHAAIECYRRAVDICPRD	
LGN Human	: AKASGNLGNLTKVLGNFDEAIVCCQRHLDISREL	
LGN Human	: RRAYSNLGNAYIFLGEFETASEYVKKTLLLARQL	
LGN Human	: AQSCYSLGNITYTLLQDYEKALDYHLKHLAIAQEL	
NCF2 Human	: AVAYFQRCMLYYQTEKYDLAIKDLKEALIQLRGN	
Konsensus 1	: W LG Y A F A P	
Konsensus 2	: b bl b bbl b lbb blbb b	

Abb. 66: Alignment von TPR-Motiven mit den TPRLs der Protozoen-ACn {A.cylind.: Anabaena AC, [Anabaena sp. PCC7120 (Nostoc)], PP5 P.falc.: Proteinphosphatase 5 [P.falciparum (AL049185)], PP5 Human: Proteinphosphatase 5 [H.sapiens (P53041)], CYA3 Rhime: putative AC 3 [R.meliloti (Q9Z3Q0)], CC23 Yeast: cell division control protein 23 (cdc23) [S.cerevisiae (P16522)], LGN Human: Mosaik protein, [H.sapiens (P81274)], NCF2 Human: Neutrophil NADPH oxidase factor 2 (p67-phox) [H.sapiens (P19878)]; **Konsensus 1:** nach (54), **dunkelgrau:** schwach konservierte ASn; **Konsensus 2:** nach (14), (b: hydrophobe ASn, l: hydrophile ASn); die beiden α -Helices sind oben angedeutet; **Kasten:** konserviertes G/(K/Q/N)/W-Motiv; **unterstrichen:** von Protean vorhergesagte α -helikale Bereiche}

Abb. 66 basiert auf zwei Konsensusmotiven:

Konsensus 1 („harter“ Konsensus) orientiert sich an „fixen“ ASn.

Konsensus 2 („weicher“ Konsensus) unterscheidet hydrophobe (b) von hydrophilen (l) ASn.

Der TPRL von *P.tetraurelia* zeigt gefolgt von *T.pyriformis* und *T.gondii* 2 die höchste Konservierung gemäß Konsensus 1. In der Gruppe der Plasmodien zeigen nur noch *P.falciparum* und *P. knowlesi* je ein im Vergleich zu Glycin schwächer konserviertes Alanin (A826, A832), *P.falciparum* hat zusätzlich ein im Vergleich zu Leucin schwächer konserviertes Isoleucin. Dies erklärt, weshalb in der *ExPASy*-Suche keine TPR-Motiv-Treffer mit Ausnahme der *Paramecium AC* gefunden wurden. Betrachtet man dagegen die Musterverteilung des Konsensus 2, so ist das TPR-Signaturmotiv deutlich in allen Isoenzymen wiederzuerkennen.

Auffällig ist das drei Aminosäuren lange G/(K/Q/N/E)/W-Motiv (Kasten), welches sich bei den Protozoen-ACn stets wiederfindet, bei den anderen TPRs jedoch kein Pendant besitzt. Es ist das Verbindungsstück, das die beiden Helices zueinander ausrichtet. Vom *DNASTAR*-Programm *Protean* werden in allen Protozoen-ACn α -helikale Bereiche in der Nähe dieses Motivs vorhergesagt.

Die Experimente belegten, daß das Vorhandensein des TPRL in Verbindung mit dem konservierten C-terminus für die funktionelle lösliche Expression der Adenylatcyclase notwendig ist. Die Verkürzung des Plasmodium AC-GEIVYS-Konstrukts (4.4.1) auf K755 (64 ASn vor dem TPRL) und I813 (6 ASn vor dem TPRL) führten dazu, daß kein Protein mehr löslich exprimierbar war. Möglicherweise dient die Domäne der Homodimerisierung des Enzyms und wenn diese nicht mehr vorhanden ist, führen freie, normalerweise durch den TPRL verdeckte hydrophobe Regionen zur Proteinaggregation.

5.1.2.3 Der C-Terminus

Die Protozoen-ACn besitzen einen konservierten C-Terminus mit zwei hochkonservierten Motiven: DW an den Positionen vier und fünf, sowie G, (Y/F), R an den Positionen sieben bis neun. An Position 2 befindet sich ein konserviertes Prolin, an Position 14 ein konserviertes Lysin.

P.berg.	:	TPYDWPGYRMFLHKS
P.know.	:	APSDWGGFRRFLQKS
P.yoel.	:	TPYDWPGYRMFLHKS
P.falc.	:	APSDWCGYRKFLQKS
T.pyrif.	:	APSDWVGFRELTEK
P.tetrau.	:	APSDWKGYRELTEK
C.parv.	:	CPIDWKGYRVWDEK
T.gond.2	:	APADWMGFRELVEK
T.gond.3	:	PEPDWQGYRNMQMK

↑ ← ← ← ↑
 ↑ ← ← ← ↑

Abb. 67: Der C-Terminus der Protozoen-ACn; ↑: hochkonservierte ASn; ↔: DW- und G/(Y/F)R-Motiv

5.2 Topogievorschlag

Die diskutierten ACn unterscheiden sich in der grundlegenden Anordnung ihrer Strukturelemente nicht voneinander. Die beiden Hauptkomponenten finden sich in allen Isoformen wieder (Membrananker und AC-Domäne).

Ein besonderes Problem ist die Anordnung der Domänen innerhalb einer Quartärstruktur. Kaliumkanäle sind normalerweise tetramer aufgebaut (31), die für die Katalyse verantwortlichen Bereiche bilden jedoch Dimere aus (103). Daher müssen sich unterhalb der tetrameren Kanaleinheit zwei dimere AC-Domänen befinden, die sehr eng mit Hilfe des längenkonservierten Verbindungsstücks zum *Poreloop* hin an der Struktur festgehalten werden.

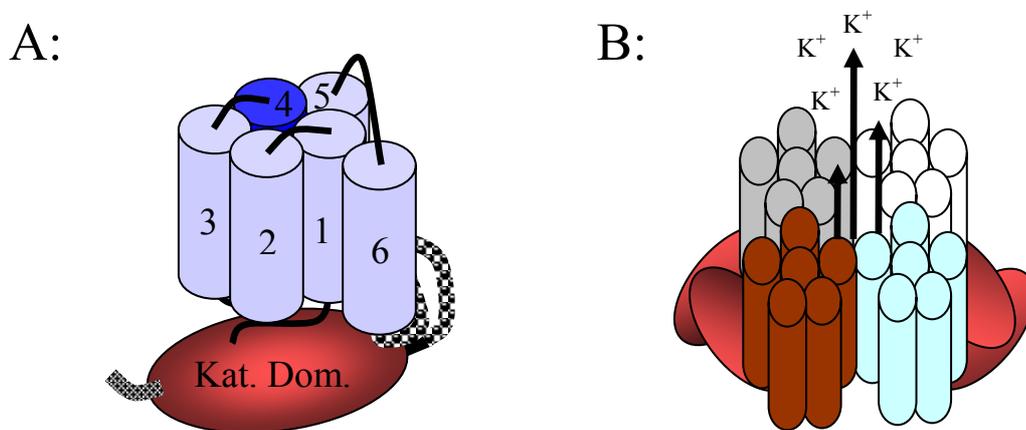


Abb. 68: A: ein denkbare Modell für ein AC-Monomer, das einen tetrameren Kanal mit zwei dimeren katalytischen Zentren ausbilden sollte (die einzelnen Strukturelemente sind farblich gesondert hervorgehoben); B: das Modell des tetrameren Ionenkanals, gebildet aus zwei über die katalytischen Bereiche dimerisierten Dimeren

Zunächst muß also eine Dimerbildung sowohl über die Transmembranpackungen als auch über die katalytischen Bereiche stattfinden, worauf anschließend zwei dieser Strukturen zu einem Tetramer zusammenfinden sollten [vgl. auch (60)]. Möglicherweise führen eine besondere Anordnung der TM's zueinander und das „Verschränken“ der katalytischen Bereiche zu einer Überforderung der Faltungsmaschinerie von Zellen, die nicht der Gruppe der Alveolata angehören. Damit könnte das Steckenbleiben des Proteins im endoplasmatischen Retikulum bei heterologer Expression erklärt werden (vgl. 4.7.3, S. 103).

5.3 Eine mögliche Funktion des Enzyms?

Die kombinierte Struktur aus einem membranständigen Ionenkanal, der mit einer AC-Domäne verknüpft ist, läßt darauf schließen, daß das Protein auf abrupte Veränderungen des Ionenmilieus reagiert.

Bei der nativ aus Paramecien gereinigten AC war nicht zu unterscheiden, ob bereits eine Veränderung des Membranpotentials oder der Ionenstrom selbst zur Aktivierung der AC und cAMP-Produktion führte (88). Experimente mit Paramecien und dem Ciliaten Tetrahymena legten jedoch die Vermutung nahe, daß die Adenylatcyclase durch einen Kaliumausstrom aktiviert wird (89, 90).

Auszuschließen ist vermutlich, daß das Enzym beim Eindringen des Parasiten in den Erythrozyten eine Rolle spielt. Bei der Ingestion entsteht kein direkter Kontakt mit dem Hochkaliummilieu der Erythrozyte, der Erreger ist am Ende der Prozedur topologisch vollständig von der Außenmembran der Blutzelle umschlossen, er stülpt sie sich gleichsam selbst über (50). Während des Eindringens und des Wachstums beginnen in der Wirtszelle verschiedene parasitengesteuerte Umbauprozesse, die nicht nur den Einbau von Fremdproteinen wie beispielsweise Transportern in die Zellmembran umfassen. Das gesamte ionale Milieu des Wirts wird verändert und dem Außenmedium zumindest bezüglich Na^+ und K^+ gleich [5 bzw. 145,5 mM nach ca. 45 h; (92, 94)].

Nach einem anfänglichen leichten Schrumpfen der Wirtszelle nimmt das Volumen immer mehr zu, gleichzeitig differenziert das Parasitenringstadium über den Trophozoiten zum späten Stadium, das nach „Platzen“ des Erythrozyten freigesetzt wird.

Über die ionalen Verhältnisse der Vakuole, in der sich der Malariaerreger befindet, ist nichts publiziert. Denkbar wäre aber, daß dort eine hohe Kaliumkonzentration herrscht und diese sich bei der Ruptur der Erythrozytenmembran schlagartig verdünnt. Möglicherweise führt dieser Kaliumverdünnungsschock, analog zu den Experimenten mit Paramecium, zu einem kurzen Kaliumausstrom aus dem Parasiten und zu einer Aktivierung der AC (88). Das freigesetzte cAMP aktiviert nun Proteinkinase, die ihrerseits Phosphorylierungen an Proteinen durchführen und dem Parasiten ermöglichen, sich auf ein erneutes Eindringen in ein anderes rotes Blutkörperchen vorzubereiten (56).

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung einer an einen vermutlichen Ionenkanal gekoppelten Adenylatcyclase aus *P.falciparum*. Weiterhin wurde versucht, eine Immunlokalisation dieses Enzyms durchzuführen.

Ausgehend von der Sequenz der Paramecium AC wurde durch Homologieklonierung ein Isogen aus *T.pyriformis* isoliert (10 Introns; ORF: 2940 bp, 979 ASn, 123,8 kD). Mit diesen Sequenzinformationen gelang es, in einem genomischen *P.falciparum*-Contig kodierende AC-Bereiche vorherzusagen und RT-PCRn durchzuführen, um den vermuteten Leserahmen zu bestätigen (21 Introns; ORF: 2655 bp, 884 ASn, 106,6 kD). Die DNA wurde wegen des hohen AT-Gehalts (77%) mit Hilfe von überlappenden Primerpaaren in „normaler“ Codonusage resynthetisiert und in *Sf9*-Zellen exprimiert. Analog der *CyaB1-AC* aus *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde ein N-terminal *HexaHis*-, „getagtes“ Konstrukt der katalytischen Domäne angefertigt, welches mit einer Ni^{2+} -NTA-Affinitätssäule reinigbar war und charakterisiert wurde. Das Enzym war Mn^{2+} -abhängig und im Gegensatz zu *Mammalia-ACn* unstimulierbar durch Forskolin. Mit einem affinitätsgereinigten Peptidantikörper wurde durch Immunlokalisation ein Signal in späten Trophozoitenstadien erhalten. Die Laufstrecken von zwei spezifisch detektierten Banden aus Plasmodien unterschieden sich jedoch von in *Sf9*-Zellen exprimiertem Holoenzym, möglicherweise auf Grund von posttranslationalen Modifikationen.

Es gelang, Sequenzen anderer Isoenzyme aus Datenbanken zu extrahieren. Sie stammen alle aus Organismen der Gruppe der Alveolata und zeigen eine deutliche Konservierung des K_v -kanalähnlichen Bereichs und der AC-Domäne. Inzwischen wurde die Sequenzierung des *P.falciparum*-Genoms abgeschlossen und die Sequenzen der Chromsomen publiziert (Nature 419). Teile des vermuteten Ionenkanals und der katalytischen Domäne wurden mit Hilfe von Programmen als AC-ähnliche Strukturen vorhergesagt, umfaßten jedoch nicht die vollständige Sequenz.

7 Anhang

7.1 Datenbanksuchen zur Verifizierung der Proteinsequenzen der Plasmodium AC und der Tetrahymena AC

7.1.1 TopPred2-Suche nach Transmembranspannen

Es wurde mit den Holoenzymsequenzen und *TopPred2* gesucht (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

7.1.1.1 Tetrahymena AC

Tab. 30: *TopPred2* fand acht transmembranäre Elemente; links sind die Suchparameter wiedergegeben, rechts die vorgeschlagenen Strukturen

Algorithm specific parameters	Found: 8 segments
Full window size : 21	<u>Candidate membrane-spanning segments:</u>
Core window size : 11	Helix Begin - End Score Certainty
Wedge window size: 5	1 146 - 166 1.265 Certain
Using hydrophobicity file: GES-scale	2 182 - 202 1.601 Certain
Cutoff for certain transmembrane segments: 1.00	3 206 - 226 1.429 Certain
Cutoff for putative transmembrane segments: 0.60	4 376 - 396 1.997 Certain
Critical distance between 2 transmembrane segments: 2	5 429 - 449 0.769 Putative
Critical loop length: 60	6 527 - 547 2.199 Certain
Kingdom: eucaryote	7 602 - 622 0.614 Putative
	8 760 - 780 0.624 Putative

Es ergeben sich Differenzen zur festgelegten Topologie:

Tab. 31: Vergleich der mit *TopPred2* vorhergesagten Motive mit der Tetrahymena AC

<i>TopPred2</i> -Vorschlag	Annotation in 4.9.3
146 – 166	TM1: 145 – 165
182 – 202	TM2: 183 – 201
206 – 226	TM3: 206 – 226
n.d.	TM4: 256 – 276
376 – 396	TM5: 377 – 396
429 – 449	extrazell. Schleife
527 – 547	TM6: 529 – 546
602 – 622	<i>Poreloop</i> : 595 – 615
760 – 780	katal. Domäne

Die TMs 1-3, 5 und 6 werden mit einer guten „Trefferquote“ vorhergesagt. Der Spannungssensor (TM4) wird seiner Ladungen wegen nicht erkannt. Der von AS 602-622 vorhergesagte Bereich entspricht Teilen des Kaliumselektivitätsfilters. Da diese *Poreloop*region nach dem Kristallstrukturmodell des KcsA-Kanals ein Stück weit in die Membran eintaucht, erklärt sich, daß sie auf Grund hydrophober Eigenschaften gefunden wird. Die beiden weiteren gefundenen Bereiche sind Teile einer extrazellulären Schleife und der katalytischen Domäne.

7.1.1.2 Plasmodium AC

Tab. 32: Die TopPred2-Analyse sagte sieben transmembranäre Elemente voraus; links sind die Suchparameter wiedergegeben, rechts die vorgeschlagenen Bereiche

Algorithm specific parameters	Found: 7 segments
Full window size : 21	<u>Candidate membrane-spanning segments:</u>
Core window size : 11	Helix Begin - End Score Certainty
Wedge window size: 5	1 74 - 94 0.705 Putative
Using hydrophobicity file: GES-scale	2 99 - 119 1.520 Certain
Cutoff for certain transmembrane segments: 1.00	3 124 - 144 1.847 Certain
Cutoff for putative transmembrane segments: 0.60	4 242 - 262 1.774 Certain
Critical distance between 2 transmembrane segments: 2	5 406 - 426 2.246 Certain
Critical loop length: 60	6 491 - 511 0.697 Putative
Kingdom: eucaryote	7 659 - 679 0.797 Putative

Das Ergebnis ist bis auf das Fehlen der extrazellulären Schleife mit der Tetrahymena AC vergleichbar:

Tab. 33: Vergleich der TopPred2-Vorraussage mit der Plasmodium AC

TopPred2-Vorschlag	Annotation in 4.9.3
74 – 94	TM1: 74 – 93
99 – 119	TM2: 103 – 121
124 – 144	TM3: 126 – 148
n.d.	TM4: 174 – 194
242 – 262	TM5: 242 – 261
406 – 426	TM6: 406 – 424
491 – 511	<i>Poreloop</i> : 487 – 507
659 – 679	katal. Domäne

Die TMs 1-3, 5 und 6 und ein Teil des *Poreloops* werden auch hier vorhergesagt. TM4 wird nicht detektiert. Die siebte gefundene Struktur ist ein Teil der katalytischen Domäne.

7.1.2 Protein-Protein-BLAST (NCBI)

Mit der Tetrahymena AC und der Plasmodium AC wurden *BLAST*-Suchen am NCBI durchgeführt (November 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

7.1.2.1 Tetrahymena AC

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value	Organismus
gi 23509264 ref NP_701931.1 (NC_004317) hypothetical prote...	191	4e-47	P.falciparum
gi 23484448 gb EAA19773.1 (AABL01000268) hypothetical prot...	118	4e-25	P.yoelii
gi 16265216 ref NP_438008.1 (NC_003078) putative adenylate...	69	3e-10	S.meliloti
gi 23043645 gb ZP_00074910.1 (NZ_AA01000095) hypotetica...	68	6e-10	T.erythraeum
gi 24215534 ref NP_713015.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	68	6e-10	L.interrogans
gi 23039991 gb ZP_00071530.1 (NZ_AA01000005) hypotetica...	67	2e-09	T.erythraeum
gi 23013499 gb ZP_00053387.1 (NZ_AA010003744) hypotetica...	67	2e-09	M.magnetoc.
gi 24215985 ref NP_713466.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	66	3e-09	L.interrogans
gi 1169150 sp P43524 CYAA_ANACY Adenylate cyclase (ATP pyro...	65	4e-09	A.cylindrica
gi 24217179 ref NP_714662.1 (NC_004343) adenylate cyclase ...	65	5e-09	L.interrogans
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AA01000003) hypotetica...	65	6e-09	T.erythraeum
gi 23043682 gb ZP_00074939.1 (NZ_AA01000099) hypotetica...	65	7e-09	T.erythraeum
gi 22964234 gb ZP_00011840.1 (NZ_AA01000001) hypotetica...	64	1e-08	R.palustris
gi 24215236 ref NP_712717.1 (NC_004342) Adenylate cyclase ...	64	1e-08	L.interrogans
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AA01000134) hypotetica...	64	1e-08	N.punctiforme
gi 24215667 ref NP_713148.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	64	2e-08	L.interrogans
gi 17229758 ref NP_486306.1 (NC_003272) adenylate cyclase ...	62	3e-08	N.sp. PCC 7120
gi 23127008 gb ZP_00108886.1 (NZ_AA01000163) hypotetica...	62	5e-08	N.punctiforme
gi 15639476 ref NP_218926.1 (NC_000919) adenylate cyclase ...	62	5e-08	T.pallidum
gi 14209675 gb AAK56849.1 AF292554_1 (AF292554) putative ad...	61	8e-08	T.roseopers.
gi 22999584 gb ZP_00043557.1 (NZ_AA01000154) hypotetica...	61	8e-08	Magnetoc.sp.
gi 22998280 gb ZP_00042382.1 (NZ_AA01000025) hypotetica...	61	9e-08	Magnetoc.sp.
gi 19881021 gb AAM00644.1 (AF480916) adenylate cyclase [Le...	60	1e-07	L.pneumophila
gi 23000412 gb ZP_00044344.1 (NZ_AA01000195) hypotetica...	60	1e-07	Magnetoc.sp.
gi 24215933 ref NP_713414.1 (NC_004342) Adenylate cyclase ...	60	2e-07	L.interrogans
gi 24216542 ref NP_714023.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	59	3e-07	L.interrogans
gi 15965714 ref NP_386067.1 (NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	59	4e-07	S.meliloti
gi 24217155 ref NP_714638.1 (NC_004343) adenylate cyclase ...	59	4e-07	L.interrogans
gi 22998786 gb ZP_00042813.1 (NZ_AA01000100) hypotetica...	58	7e-07	Magnetoc.sp.
gi 15889837 ref NP_355518.1 (NC_003062) AGR_C_4673p [Agrob...	58	8e-07	A.tumefaciens
gi 5737842 gb AAD50121.1 AF153362_1 (AF153362) adenylyl cyc...	57	1e-06	D.discoideum
gi 22998867 gb ZP_00042887.1 (NZ_AA01000107) hypotetica...	56	3e-06	Magnetoc.sp.
gi 1754640 dbj BAA13999.1 (D89624) adenylate cyclase [Anab...	55	6e-06	Anabaena sp.
gi 17229396 ref NP_485944.1 (NC_003272) adenylate cyclase ...	55	7e-06	N.sp. PCC 7120
gi 2575805 dbj BAA22996.1 (D49530) adenylate cyclase [Spir...	54	2e-05	S.platensis
gi 16263053 ref NP_435846.1 (NC_003037) Probable adenylate...	53	2e-05	S.meliloti
gi 15890956 ref NP_356628.1 (NC_003063) AGR_L_1679p [Agrob...	52	3e-05	A.tumefaciens
gi 23000780 gb ZP_00044701.1 (NZ_AA01000206) hypotetica...	52	4e-05	Magnetoc.sp.
gi 16265162 ref NP_437954.1 (NC_003078) putative adenylate...	52	5e-05	S.meliloti
gi 21623552 dbj BAC00918.1 (AB066096) adenylyl cyclase [My...	52	6e-05	M.xantus
gi 16330472 ref NP_441200.1 (NC_000911) adenylate cyclase ...	51	9e-05	Synechoc.sp.
gi 15966612 ref NP_386965.1 (NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	50	1e-04	S.meliloti
gi 23042287 gb ZP_00073685.1 (NZ_AA01000038) hypotetica...	49	3e-04	T.erythraeum
gi 24213693 ref NP_711174.1 (NC_004342) Adenylate cyclase ...	49	5e-04	L.interrogans
gi 15598413 ref NP_251907.1 (NC_002516) probable adenylate...	49	5e-04	P.aeruginosa
gi 22963767 gb ZP_00011373.1 (NZ_AA01000001) hypotetica...	49	5e-04	R.palustris
gi 24213884 ref NP_711365.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	47	0.001	L.interrogans
gi 23109064 gb ZP_00095259.1 (NZ_AA01000153) hypotetica...	47	0.002	N.aromaticiv.
gi 23001363 gb ZP_00045270.1 (NZ_AA01000220) hypotetica...	46	0.003	Magnetoc.sp.

gi 24212988 ref NP_710469.1	(NC_004342)	adenylate cyclase ...	45	0.004	L.interrogans
gi 23015233 gb ZP_00055015.1	(NZ_AAAP01003850)	hypothetica...	45	0.004	M.magnetotac.
gi 23106061 gb ZP_00092515.1	(NZ_AAAD01000091)	hypothetica...	45	0.005	A.vinelandii
gi 22299953 ref NP_683200.1	(NC_004113)	adenylate cyclase ...	44	0.009	T.elongatus
gi 15966204 ref NP_386557.1	(NC_003047)	PUTATIVE ADENYLATE...	44	0.010	S.meliloti
gi 95175 pir B35266	adenylate cyclase (EC 4.6.1.1) - Rhizo...		44	0.010	R.meliloti
gi 6014766 sp P40137 CYAA_STIAU	ADENYLATE CYCLASE 1 (ATP PY...		44	0.011	S.aurantiaca
gi 23013584 gb ZP_00053462.1	(NZ_AAAP01003754)	hypothetica...	44	0.013	M.magnetotac.
gi 15964012 ref NP_384365.1	(NC_003047)	ADENYLATE CYCLASE ...	44	0.014	S.meliloti
gi 23030048 gb ZP_00068317.1	(NZ_AAAT01000053)	hypothetica...	44	0.017	M.degradans
gi 17228613 ref NP_485161.1	(NC_003272)	adenylate cyclase ...	43	0.018	N.sp. PCC 7120
gi 24215344 ref NP_712825.1	(NC_004342)	adenylate cyclase ...	43	0.023	L.interrogans
gi 22955212 gb ZP_00003013.1	(NZ_AAAY01000001)	hypothetica...	43	0.027	N.europea
gi 16263995 ref NP_436787.1	(NC_003078)	putative adenylate...	43	0.028	S.meliloti
gi 22962768 gb ZP_00010374.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	42	0.045	R.palustris
gi 22999989 gb ZP_00043939.1	(NZ_AAAN01000177)	hypothetica...	42	0.046	Magnetoc.sp.
gi 15888487 ref NP_354168.1	(NC_003062)	AGR_C_2127p [Agrob...	41	0.077	A.tumefaciens
gi 22963180 gb ZP_00010786.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	41	0.087	R.palustris
gi 7470942 pir T17197	adenylate cyclase homolog - Spirulin...		41	0.094	S.platensis
gi 23011588 gb ZP_00051904.1	(NZ_AAAP01003316)	hypothetica...	41	0.096	M.magnetotac.
gi 1754642 dbj BAA14000.1	(D89625)	adenylate cyclase [Anab...	40	0.12	Anabaena sp.
gi 17232455 ref NP_489003.1	(NC_003272)	adenylate cyclase...	40	0.13	N.sp. PCC 7120
gi 9631400 ref NP_048301.1	(NC_001993)	ORF MSV230 hypothet...	40	0.16	M.s.entomopoxv.
gi 22963556 gb ZP_00011162.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	40	0.24	R.palustris
gi 21616128 gb AAM66143.1 AF299111_1	(AF299111)	adenylate cy...	39	0.30	R.etli
gi 21228017 ref NP_633939.1	(NC_003901)	hypothetical senso...	39	0.46	M.mazei Goel
gi 24212727 ref NP_710208.1	(NC_004342)	adenylate cyclase ...	39	0.46	L.interrogans
gi 22971226 gb ZP_00018206.1	(NZ_AAAP01000237)	hypothetica...	39	0.50	C.aurantiacus
gi 23127822 gb ZP_00109683.1	(NZ_AAAP01000174)	hypothetica...	38	0.78	N.punctiforme
gi 15234599 ref NP_195422.1	(NM_119868)	patatin, putative;...	38	0.87	A.thaliana
gi 20466260 gb AAM20447.1	(AY099596)	patatin-like protein ...	38	0.91	A.thaliana
gi 23002056 gb ZP_00045802.1	(NZ_AAAN01000381)	hypothetica...	37	1.6	Magnetoc.sp.
gi 547858 sp Q02510 LIP_STAEP	Lipase precursor (Glycerol es...		37	1.7	S.epidermidis
gi 18996331 dbj BAB85620.1	(AB031226)	beta subunit of phot...	36	2.5	E.gracilis
gi 18654149 gb AAL77521.1 L80003_1	(L80003)	guanylyl cyclas...	36	2.7	C.elegans
gi 23126551 gb ZP_00108442.1	(NZ_AAAP01000154)	hypothetica...	36	2.8	N.punctiforme
gi 23041455 gb ZP_00072909.1	(NZ_AAAP01000022)	hypothetica...	36	3.7	T.erythraeum
gi 9628443 ref NP_043293.1	(NC_001676)	minor capsid protei...	35	4.0	Hum.papillomav.54
gi 23612581 ref NP_704142.1	(NC_004328)	hypothetical prote...	35	4.0	P.falciparum
gi 15608459 ref NP_215835.1	(NC_000962)	hypothetical prote...	35	7.0	M.tuberculosis
gi 15840771 ref NP_335808.1	(NC_002755)	adenylate cyclase,...	35	7.0	M.tuberculosis
gi 15840772 ref NP_335809.1	(NC_002755)	adenylate cyclase,...	35	7.7	M.tuberculosis
gi 20808379 ref NP_623550.1	(NC_003869)	Membrane proteins ...	35	8.0	T.tengcongengs.
gi 23509840 ref NP_702507.1	(NC_004317)	hypothetical prote...	34	9.1	P.falciparum

Hier die ersten drei Treffer im Detail:

```
>gi|23509264|ref|NP_701931.1| (NC_004317) hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]
gi|23497106|gb|AAN36655.1|AE014816_40 (AE014816) hypothetical protein
[Plasmodium falciparum 3D7]
Length = 347
```

```
Score = 191 bits (486), Expect = 4e-47
Identities = 127/394 (32%), Positives = 206/394 (52%), Gaps = 57/394 (14%)
```

```
Query: 595 IENAIVKIGTLLALGFGEAGSEIIAINMGRQGDVDPMPGKKAICYGFCDIRNFTDATE 654
+E ++K+GTL+ LGFGEAG++II+ N+ Q V+ +I G+ +++ FCDIRNFT+ TE
Sbjct: 1 MEENLMKLGTLMLLGFGEAGAKIISKNNINEQERVNLLINGEIVYSVFSFCDIRNFTTEITE 60
```

```
Query: 655 VLQEDVMLFVNNIGDIVHTITDRFLGAANKNIGDAFLLVWRINEQKYS-----INDET 707
VL+E +M+F+N I +I+H D + G NKNIGDAFLLVW+ +++YS +
Sbjct: 61 VLKEKIMIFINLIAEIIHECCDFYGGTINKNIGDAFLLVWVYQKKEYSNKKNMFMKSPNN 120
```

```
Query: 708 NEISFSDQKYIQILSDFACLAFLRIQSQVNRVPKILAYRRDKRLQDRIENYKVKMGFGLH 767
N +S+++ I + D A L+ ++ ++ + KI + ++ + + I+N +++ FGLH
Sbjct: 121 NYDEYSEKENINRICDLAFLSTVQTLIKLRKSEKIHIFLNENMDELIKNNILELSFGLH 180
```

```
Query: 768 MGWGIEGAIGSEFKIDASYSNPNVMAARLEAATKQYGVPLLISSDLQAYFSPMKSFTR 827
GW IEGAIGS +KID SYLS NVN+A+RL+ +K Y ++IS D S + K F
Sbjct: 181 FGWAIEGAIGSSYKIDLSYSENVNIAASRLQDISKIYKNNIVISGDFYDNMSEKFKVF-238
```

```
Query: 828 YIDRVTVKGSIRPIGLYTVDMVDVENLPPKKELDPNFSKYDIHSMNQVKEEMKEYMELAL 887
D + K + +++ L ++K D + +K K+Y+E
Sbjct: 239 --DDIKKAERKKRKEVLNLSY-----NLYEYAKND--DIKFIKIHYPKDYLE--- 284
```

```
Query: 888 SNEEPWNADQFIKDTKDLALIFETRNEEFQKNFAVGFSKYIDGNWSESKNVLNAGLKMCP 947
F + Y+ G W+ESKN+L LK
Sbjct: 285 -----QFKIALESYLIGKNWESKNILEY-LKRNN 312
```

```
Query: 948 --DDGPTRTILEVMGSHGYQAPSDWVGFRELTEK 979
+D + + + + APSDW G+R+ +K
Sbjct: 313 IFEDEILNQLWNFLSMNFIAPSDWCGYRKFLOK 346
```

```
>gi|23484448|gb|EAA19773.1| (AABL01000268) hypothetical protein [Plasmodium yoelii yoelii]
Length = 221
```

```
Score = 118 bits (296), Expect = 4e-25
Identities = 64/173 (36%), Positives = 103/173 (58%), Gaps = 10/173 (5%)
```

```
Query: 661 MLFVNNIGDIVHTITDRFLGAANKNIGDAFLLVWR-----INEQKYSINDETNEI 710
M+F+N + +I+H D + G+ NKNIGDAFLLVW+ ++ Q+Y T+
Sbjct: 1 MIFINLVAEIIHECCDFYDGSINKNIGDAFLLVWYKKNYCLNKNLSNQEYIKTGVTSYE 60
```

```
Query: 711 SFSDQKYIQILSDFACLAFLRIQSQVNRVPKILAYRRDKRLQDRIENYKVKMGFGLHMGW 770
+S++K I + D A L+ ++ ++ + KI + + +++ + + N +++ FGLH GW
Sbjct: 61 YYSEKKINRICDLAFLSTIKTLIKLKQSEKIRTFKSEKIDELVNNNIIELSFGLHFGW 120
```

```
Query: 771 GIEGAIGSEFKIDASYSNPNVMAARLEAATKQYGVPLLISSDLQAYFSPMK 823
IEGAIGS +KID SYLS NVN+A+RL+ +K Y ++IS D S K
Sbjct: 121 AIEGAIGSRYKIDLSYSENVNIAASRLQDISKIYKSNNIIISGDFYDNMSENFK 173
```

```
>gi|16265216|ref|NP_438008.1| (NC_003078) putative adenylate cyclase protein
[Sinorhizobium meliloti]
gi|15141356|emb|CAC49868.1| (AL603647) putative adenylate cyclase protein
[Sinorhizobium meliloti]
Length = 649
```

```
Score = 68.9 bits (167), Expect = 3e-10
Identities = 57/208 (27%), Positives = 96/208 (45%), Gaps = 30/208 (14%)
```

```
Query: 634 GKKKCAIYGFCDIRNFTDATEVQLQEDVMLFVNNIGDIVHTITDRFL---GAANKNIGDAF 690
G+++ FCD+R FT +E +++D I ++ +++ L G +K IGD
Sbjct: 403 GERRTLTVLFCDVGRGFTTISEDMMKDDPEGLTTLINRLLTPLSEAVLNRRGTIDKYIGDCL 462
```

```

Query: 691 LLVWRINEQKYSINDETNEISFSDQKYIQLSDFACL-AFLRIQSQ-VNRVPKILAYRRD 748
      + W      + D+ +      + Q      +L+      L A L+ +++      R PK L
Sbjct: 463 MAFWN-----APLDDDPHAVHAVQAARDMLTALGDLNLAELQAEAKAAGRPPKAL----- 511

Query: 749 KRLQDRIENYKVKMGFGLHMGWIEGAIQSEFKIDASYLSPNVNMAARLEAATKQYGVPL 808
      ++G G++ G + G +GS + D S L      VN+A+RLE A+K YGVPL
Sbjct: 512 -----RIGIGINTGECVVGNMGSARRFDYSALGDAVNLAASRLEGASKDYGVPL 559

Query: 809 LISSDLQAYFSPEMKSFTRYIDRVTVKG 836
      L+      +      K      +DR+TVKG
Sbjct: 560 LLGERTATLAA--RKFAVAELDRITVKG 585

```

Bei dem ersten Treffer handelt es sich um eine errechnete Proteinstruktur von *P.falciparum*, wie sie als gene_chrl4_1.phat_41 beschrieben ist (7.1.4). Die zweite Struktur umfasst von AS 1-173 einen Teil des katalytischen Bereichs der *P.yoelii yoelii* AC (AS 555-727), danach schließt eine falsch vorhergesagte Sequenz an (IQNEKTINKFDIIGSTSNDRKMTKIIIEKI ILLNKFNFRCFLSIFIDF).

7.1.2.2 Plasmodium AC

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value	Organismus
gi 23509264 ref NP_701931.1 (NC_004317) hypothetical prote...	557	e-157	<i>P.falciparum</i>
gi 23484448 gb EAA19773.1 (AABL01000268) hypothetical prot...	227	5e-58	<i>P.yoelii</i>
gi 15639476 ref NP_218926.1 (NC_000919) adenylate cyclase ...	75	4e-12	<i>T.pallidum</i>
gi 24215236 ref NP_712717.1 (NC_004342) Adenylate cyclase ...	72	3e-11	<i>L.interrogans</i>
gi 23043682 gb ZP_00074939.1 (NZ_AAAU01000099) hypotetica...	71	5e-11	<i>T.erythraeum</i>
gi 24215933 ref NP_713414.1 (NC_004342) Adenylate cyclase ...	71	7e-11	<i>L.interrogans</i>
gi 24215344 ref NP_712825.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	63	2e-08	<i>L.interrogans</i>
gi 1169150 sp P43524 CYAA_ANACY Adenylate cyclase (ATP pyro...	63	2e-08	<i>A.cylindrica</i>
gi 22998786 gb ZP_00042813.1 (NZ_AAAN01000100) hypotetica...	62	5e-08	<i>Magnetoc.sp.</i>
gi 23125697 gb ZP_00107619.1 (NZ_AABC01000134) hypotetica...	60	1e-07	<i>N.punctiforme</i>
gi 17229758 ref NP_486306.1 (NC_003272) adenylate cyclase ...	60	2e-07	<i>N.sp. PCC 7120</i>
gi 23127008 gb ZP_00108886.1 (NZ_AABC01000163) hypotetica...	60	2e-07	<i>N.punctiforme</i>
gi 23043645 gb ZP_00074910.1 (NZ_AAAU01000095) hypotetica...	59	2e-07	<i>T.erythraeum</i>
gi 24215985 ref NP_713466.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	59	3e-07	<i>L.interrogans</i>
gi 23132571 gb ZP_00114356.1 (NZ_AAAX01000001) hypotetica...	58	6e-07	<i>P.marinus</i>
gi 24215534 ref NP_713015.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	58	7e-07	<i>L.interrogans</i>
gi 23015233 gb ZP_00055015.1 (NZ_AAAP01003850) hypotetica...	57	1e-06	<i>M.magnetotac.</i>
gi 24215667 ref NP_713148.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	57	2e-06	<i>L.interrogans</i>
gi 22998280 gb ZP_00042382.1 (NZ_AAAN01000025) hypotetica...	56	3e-06	<i>Magnetoc.sp.</i>
gi 1754640 dbj BAA13999.1 (D89624) adenylate cyclase [Anab...	55	4e-06	<i>Anabaena sp.</i>
gi 17229396 ref NP_485944.1 (NC_003272) adenylate cyclase ...	55	4e-06	<i>N.sp. PCC 7120</i>
gi 22998867 gb ZP_00042887.1 (NZ_AAAN01000107) hypotetica...	55	4e-06	<i>Magnetoc.sp.</i>
gi 23039680 gb ZP_00071232.1 (NZ_AAAU01000003) hypotetica...	55	6e-06	<i>T.erythraeum</i>
gi 6166050 sp P40138 CYAB_STIAU Adenylate cyclase 2 (ATP py...	55	6e-06	<i>S.aurantiaca</i>
gi 15966612 ref NP_386965.1 (NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	54	8e-06	<i>S.meliloti</i>
gi 19881021 gb AAM00644.1 (AF480916) adenylate cyclase [Le...	54	1e-05	<i>L.pneumophila</i>
gi 16265216 ref NP_438008.1 (NC_003078) putative adenylate...	54	1e-05	<i>S.meliloti</i>
gi 16265162 ref NP_437954.1 (NC_003078) putative adenylate...	54	1e-05	<i>S.meliloti</i>
gi 23000412 gb ZP_00044344.1 (NZ_AAAN01000195) hypotetica...	54	1e-05	<i>Magnetoc.sp.</i>
gi 24213693 ref NP_711174.1 (NC_004342) Adenylate cyclase ...	54	2e-05	<i>L.interrogans</i>
gi 23013584 gb ZP_00053462.1 (NZ_AAAP01003754) hypotetica...	53	2e-05	<i>M.magnetotac.</i>
gi 24217179 ref NP_714662.1 (NC_004343) adenylate cyclase ...	53	2e-05	<i>L.interrogans</i>
gi 15966204 ref NP_386557.1 (NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	52	3e-05	<i>S.meliloti</i>
gi 24212727 ref NP_710208.1 (NC_004342) adenylate cyclase ...	52	4e-05	<i>L.interrogans</i>

gi 22964234 gb ZP_00011840.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	52	4e-05	R.palustris
gi 23039991 gb ZP_00071530.1	(NZ_AAAP01000005)	hypothetica...	52	5e-05	T.erythraeum
gi 23013499 gb ZP_00053387.1	(NZ_AAAP01003744)	hypothetica...	51	7e-05	M.magnetotac.
gi 22999989 gb ZP_00043939.1	(NZ_AAAN01000177)	hypothetica...	50	1e-04	Magnetoc.sp.
gi 14209675 gb AAK56849.1 AF292554_1	(AF292554)	putative ad...	50	1e-04	T.roseopers.
gi 15890956 ref NP_356628.1	(NC_003063)	AGR_L_1679p [Agrob...	50	2e-04	A.tumefaciens
gi 24216542 ref NP_714023.1	(NC_004342)	adenylate cyclase ...	48	6e-04	L.interrogans
gi 15889837 ref NP_355518.1	(NC_003062)	AGR_C_4673p [Agrob...	48	7e-04	A.tumefaciens
gi 22963767 gb ZP_00011373.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	48	7e-04	R.palustris
gi 2575805 dbj BAA22996.1	(D49530)	adenylate cyclase [Spir...	47	9e-04	S.platensis
gi 22999584 gb ZP_00043557.1	(NZ_AAAN01000154)	hypothetica...	47	0.001	Magnetoc.sp.
gi 6014766 sp P40137 CYAA_STIAU	ADENYLATE CYCLASE 1 (ATP PY...		47	0.001	S.aurantiaca
gi 15965714 ref NP_386067.1	(NC_003047)	PUTATIVE ADENYLATE...	47	0.001	S.meliloti
gi 95175 pir B35266	adenylate cyclase (EC 4.6.1.1) - Rhizo...		47	0.002	R.meliloti
gi 15964012 ref NP_384365.1	(NC_003047)	ADENYLATE CYCLASE ...	47	0.002	S.meliloti
gi 17228613 ref NP_485161.1	(NC_003272)	adenylate cyclase ...	46	0.002	N.sp. PCC 7120
gi 5737842 gb AAD50121.1 AF153362_1	(AF153362)	adenylate cyc...	46	0.003	D.dicoideum
gi 23001363 gb ZP_00045270.1	(NZ_AAAN01000220)	hypothetica...	46	0.003	Magnetoc.sp.
gi 17232455 ref NP_489003.1	(NC_003272)	adenylate cyclase ...	45	0.004	N.sp. PCC 7120
gi 1754642 dbj BAA14000.1	(D89625)	adenylate cyclase [Anab...	45	0.004	Anabaena sp.
gi 23109064 gb ZP_00095259.1	(NZ_AAAP01000153)	hypothetica...	45	0.006	N.aromaticiv.
gi 22955212 gb ZP_00003013.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	45	0.006	N.europaea
gi 22971226 gb ZP_00018206.1	(NZ_AAAP01000237)	hypothetica...	44	0.009	C.aurantiacus
gi 16263020 ref NP_435813.1	(NC_003037)	Probable adenylate...	44	0.010	S.meliloti
gi 23126551 gb ZP_00108442.1	(NZ_AAAP01000154)	hypothetica...	44	0.012	N.punctiforme
gi 7470942 pir T17197	adenylate cyclase homolog - Spirulin...		43	0.024	S.platensis
gi 22299953 ref NP_683200.1	(NC_004113)	adenylate cyclase ...	42	0.029	T.elongatus
gi 13472842 ref NP_104409.1	(NC_002678)	contains partial s...	42	0.033	M.loti
gi 22998771 gb ZP_00042799.1	(NZ_AAAN01000099)	hypothetica...	42	0.037	Magnetoc.sp.
gi 23484447 gb EAA19772.1	(AABL01000268)	hypothetical prot...	42	0.037	P.yoelii
gi 23106061 gb ZP_00092515.1	(NZ_AAAP01000091)	hypothetica...	42	0.047	A.vinelandii
gi 23042287 gb ZP_00073685.1	(NZ_AAAP01000038)	hypothetica...	42	0.049	T.erythraeum
gi 22973339 gb ZP_00020062.1	(NZ_AAAP01000494)	hypothetica...	42	0.052	C.aurantiacus
gi 23000780 gb ZP_00044701.1	(NZ_AAAN01000206)	hypothetica...	42	0.054	Magnetoc.sp.
gi 24213884 ref NP_711365.1	(NC_004342)	adenylate cyclase ...	41	0.071	L.interrogans
gi 22955691 gb ZP_00003492.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	41	0.079	N.europaea
gi 15598413 ref NP_251907.1	(NC_002516)	probable adenylate...	41	0.089	P.aeruginosa
gi 23041455 gb ZP_00072909.1	(NZ_AAAP01000022)	hypothetica...	39	0.28	T.erythraeum
gi 24212988 ref NP_710469.1	(NC_004342)	adenylate cyclase ...	39	0.35	L.interrogans
gi 17228238 ref NP_484786.1	(NC_003272)	adenylate cyclase ...	39	0.41	N.sp. PCC 7120
gi 24217155 ref NP_714638.1	(NC_004343)	adenylate cyclase ...	38	0.65	L.interrogans
gi 21623552 dbj BAC00918.1	(AB066096)	adenylate cyclase [My...	38	0.70	M.xanthus
gi 13473854 ref NP_105422.1	(NC_002678)	adenylate cyclase ...	38	0.84	M.loti
gi 23011588 gb ZP_00051904.1	(NZ_AAAP01003316)	hypothetica...	37	1.5	M.magnetotac.
gi 23039579 gb ZP_00071137.1	(NZ_AAAP01000002)	hypothetica...	37	1.9	T.erythraeum
gi 11067413 ref NP_067716.1	(NM_021684)	soluble adenylate c...	36	2.0	R.norvegicus*
gi 2126564 pir I39623	probable adenylate cyclase (EC 4.6.1...		36	2.3	A.variabilis
gi 22963556 gb ZP_00011162.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	36	3.3	R.palustris
gi 13472852 ref NP_104419.1	(NC_002678)	adenylate cyclase ...	35	3.3	S.meliloti
gi 22963180 gb ZP_00010786.1	(NZ_AAAP01000001)	hypothetica...	35	3.4	R.palustris
gi 23002056 gb ZP_00045802.1	(NZ_AAAN01000381)	hypothetica...	35	3.7	Magnetoc.sp.
gi 15964342 ref NP_384695.1	(NC_003047)	PUTATIVE ADENYLATE...	35	4.6	S.meliloti
gi 15383934 gb AAK96045.1 AF299350_1	(AF299350)	testicular ...	34	8.5	H.sapiens*
gi 8923844 ref NP_060887.1	(NM_018417)	soluble adenylate cy...	34	8.6	H.sapiens*

(Bei den mit * markierten Treffern handelt es sich um lösliche ACn vom Testestyp.)

Die ersten beiden Treffer entsprechen der Suche mit der Tetrahymena AC, der dritte ist hier im Detail wiedergegeben:

```
>gi|15639476|ref|NP_218926.1| (NC_000919) adenylate cyclase [Treponema pallidum]
gi|7520886|pir||C71320 probable adenylate cyclase - syphilis spirochete
gi|3322767|gb|AAC65466.1| (AE001224) adenylate cyclase [Treponema pallidum]
Length = 614

Score = 75.1 bits (183), Expect = 4e-12
Identities = 62/242 (25%), Positives = 118/242 (48%), Gaps = 35/242 (14%)

Query: 504 EAGAKIISKININEQE-RVNLLINGEIVYSVFSFCDIRNFTEITEVL-KEKIMIFINLIAE 561
EA K ++++I E+ + L + GE + F D+R+FTE++E L E ++ F+N
Sbjct: 364 EAFGKFVNRDIAEKAMKGEALGGERTATIFFSDVRSFTEMSEKLPPEDVVEFLNEYMS 423

Query: 562 IIHECCDFYGGTINKNIGDAFLLVWKYQKKEYSNKKMMMFKSPNNNYDEYSEKENINRIC 621
+ +C + GG ++K IGDA + +W S +
Sbjct: 424 CMVDCIEQTGGVVDFKFIGDAIMAIWGAPVSLGSAR----- 458

Query: 622 DLAFSLSTVQTLIKLRKSEKIHIFLNNENMDELIKNNILELSFGLHFGWAIEGAIGSSYKI 681
L L +++ + +R+S + NE K I + G++ G + G IGSS ++
Sbjct: 459 -LDALQSMKAVFLMRES----LIQLNEKRVACSKPRI-GIGCGVNTGSCVAGQIGSSKRM 512

Query: 682 DLSYLSENVNIASRLQDISKIYKNNIVISGDFYDNMSEKFNLSLRKIDRVTLKGCNRPLN 741
+ + + + VN ASR++ ++K + + +IS + Y+ + + + K+ +T+KG R PLN
Sbjct: 513 EYTVIGDAVNTASRIEALNKPFGTDFLISENTYELVKDML--IVEKMPPITVKGKREPLN 570

Query: 742 LY 743
+Y
Sbjct: 571 VY 572
```

Sowie der Treffer der löslichen Rattenhoden-AC (21):

```
>gi|11067413|ref|NP_067716.1| [LocusLink info] (NM_021684) soluble adenyl cyclase [Rattus
norvegicus]
gi|7513905|pir||T17201 adenylate cyclase (EC 4.6.1.1), cytosolic - rat
gi|4140400|gb|AAD04035.1| [LocusLink info] (AF081941) soluble adenyl cyclase [Rattus
norvegicus]
Length = 1608

Score = 36.2 bits (82), Expect = 1.7,
Identities = 24/73 (32%), Positives = 34/73 (45%), Gaps = 9/73 (12%)

Query: 532 VFSFCDIRNFTEITEVLK-----EKIMIFINLIAEIIHECCDFYGGTINKNIGDAF 582
V F DI FT +TE E+++ +N I E +GG I K GDA
Sbjct: 42 VLMFVDISGFTAMTEKFSTAMYMDRGAEQLVEILNYYISAIVEKVLIFGGDILKFAGDAL 101

Query: 583 LLVWKYQKKEYSN 595
L +WK ++K+ N
Sbjct: 102 LALWKVERKQLKN 114
```

Eine Suche mit der Plasmodium AC in plasmodienspezifischen Datenbanken belegt, daß auch *P.falciparum* eine AC des Rattenhodentyps auf Chromosom 8 besitzt [Mal8P1.150, Genbank ACC: NP_704518; (58)].

7.1.3 Suche in Sequenzmotiv-Datenbanken (*ExPASy-Prosite Motif Scan*)

Analog zur Suche, die Dr. K. Hambach mit der Sequenz der Paramecium AC über *EMBL-Heidelberg* durchgeführt hatte (25), wurde eine *SMART*-Suche, die auch eine *Pfam*-Suche beinhaltet, mit der Plasmodium AC durchgeführt (Juli 2002). Der einzige Treffer bezog sich auf die katalytische Domäne der AC. Eine erneute Suche mit der Paramecium AC brachte ein vergleichbares Ergebnis, die Ionen-transfereinheit und der TPRL-Bereich wurden genauso wenig gefunden, wie die damals angezeigte Superoxiddismutase. Es bestand noch die Möglichkeit die *Pfam*-Suche direkt über das *Sanger-Center* laufen zu lassen (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Es zeigte sich, daß in der neuen Programmversion 7.0 zwar 320 neue Proteinfamilien aufgenommen wurden, dafür aber auch 33 Stück gelöscht worden sind. Dies mag das differierende Suchergebnis erklären.

Die Suche mit dem *ExPASy*-Programm *Motif Scan* (*Prosite*-Database) (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) [Als Quelle wurden alle Datenbanken ausgewählt: The Prosite profiles including the pre-released ones, The Prosite patterns, Prosite patterns that match very frequently (low specificity!), The Pfam collection of hidden Markov models; weekly update unverändert.]] ermöglichte es, daß die beschriebenen Motive der Paramecium AC wieder-erkannt wurden.

Mit diesem Programm wurden daher die nachfolgenden Sequenzen untersucht und folgende Ergebnisse erhalten.

7.1.3.1 Plasmodium AC

1. Pfam collection of hidden Markov models:

GUANYLATE_CYC, Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain:
pos.: 528-747: raw-score = -5.5, N-score = 12.247, E-value = 1.2e-05;

2. Prosite profiles:

GUANYLATE_CYCLASES_2, Guanylate cyclases profile:
pos.: 532-697: raw-score = 710, N-score = 13.791, E-value = 2.1e-06.

Als weiterhin signifikant wurden eine isoleucinreiche Region

(pos.: 364-420: raw-score = 57, N-score = 9.538, E-value = 0.021)

und eine phenylalaninreiche Region

(pos.: 70-159: raw-score = 85, N-score = 13.760, E-value = 2.1e-06)

eingestuft.

Da weder der Ionenkanal, noch das TPR-Motiv detektiert wurden, sind folgende anschließende Suchen durchgeführt worden.

7.1.3.2 AC-Isoformen der Spezies Plasmodium

7.1.3.2.1 P.yoelii yoelii AC

Prosites profiles:

- a) NLS_BP, Bipartite nuclear localization signal:
pos.: 777-794: raw-score = 3, N-score = 3.000, E-value = 2.1e+04
- b) ILE_RICH, Isoleucine-rich region:
pos.: 392-440: raw-score = 41, N-score = 7.211, E-value = 2.1
- c) GUANYLATE_CYCLASES_2, Guanylate cyclases profile:
pos.: 534-702 : raw-score = 691, N-score = 13.431, E-value = 2.1e-06

7.1.3.2.2 P.knowlesi AC

Prosites profiles:

- GUANYLATE_CYCLASES_2, Guanylate cyclases profile:
pos.: 533-703: raw-score = 676, N-score = 13.147, E-value = 2.1e-06;
pos.: 1423-1593: raw-score = 676, N-score = 13.147, E-value = 2.1e-06

In beiden AC-Isoformen wurde ausschließlich die katalytische Domäne gefunden.

7.1.3.3 Tetrahymena AC

1. Pfam collection of hidden Markov models:

- a) HLYC: RTX toxin acyltransferase family:
pos.: 176-299: raw-score = -113.0, N-core = 6.428, E-value = 7.9
- b) PATCHED: Patched family:
pos.: 955-1562: raw-score = -573.0, N-score = 6.362, E-value = 9.2
- c) GUANYLATE_CYC: Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain:
pos.: 630-842: raw-score = -31.4, N-score = 10.469, E-value = 0.00072
- d) ION_TRANS: Ion transport protein:
pos.: 183-498: raw-score = -14.0, N-score = 6.372, E-value = 9

2. Prosites Profiles:

- a) CATION_CHANNEL_TM: Cation channels, 6TM region (non-ligand gated):
pos.: 149-274: raw-score = 452, N-score = 6.827, E-value = 21; pos.: 1128-1253:
raw-score = 452, N-score = 6.827, E-value = 21
- b) GUANYLATE_CYCLASES_2: Guanylate cyclases profile:
pos.: 640-798, raw-score = 591, N-score = 11.538, E-value = 0.00021;
pos.: 1619-1777: raw-score = 591, N-score = 11.538, E-value = 0.00021

Von der Tetrahymena AC wird der Ionenkanal detektiert, das TPR-Motiv nicht.

7.1.4 Suche in plasmodienspezifischen Datenbanken (*PlasmoDB*-Suche)

Über den *PlasmoDB*-Server (Datenbank für Plasmodien genomprojekte, <http://www.plasmodb.org/>) wurde eine Suche mit der Plasmodium AC durchgeführt.

Es finden sich zwei Verweise auf postulierte Genstrukturen. Sie wurden durch *Genefinder* und *FullPhat* errechnet (2, 85). Die erste Struktur (gene chr14_1.phat_41) umfaßt N-terminal bis auf zwei ASn den gesamten *Poreloop*bereich sowie Teile der katalytischen Domäne. Drei Transmembrandomänen werden vorausgesagt. Der zweite Vorschlag (gene chr14_1.gen_734) umfaßt TM4, PraeTM5, TM5 und den Beginn der TM6, sowie etwas andere Teile der katalytischen Domäne. Sechs Transmembrandomänen werden vermutet. Für jedes der postulierten Gene wurde eine 29%ige Ähnlichkeit zur *T.pallidum*-AC angegeben und auf zwei *CDD*-Einträge verwiesen (gnl|CDD|778, pfam00211, guanylate_cyc und gnl|CDD|37, smart 00044, CYCc), welche die Verwandtschaft zu ACn belegen.

gene_chr14_1.phat_41:

```
MEENLMKLGTLMLLG | 15 | FGEAGAKIISKNNINEQERVNLLINGEIVYSVFSFCDIRNFTEITEVLKEK | 16 | IM
IFINLIAEIIHECCDFYGGTINKNIGDAFLLVWVYQKKEYSNKKMNMFKSPNNNYDEYSEKENINRICDLAFLST
VQTLIKLRK | 17 | SEKIHFNNENMDELIKNNILELSFGLHFGWAIEGAIGSSYKIDLSYLSENVNIASRLQDI
SKIYKNNIVISGDFYDNMSEKFK | 18 | 20 | VFDDIKKKAERKKRKEVLNLSYN | 21 | LYEEYAKNDDIKFIKIH
YPKDYLEQFKIALESYLGKWNESKNILEYLKRNNIFEDEILNQLWNFLSMNFIAPSDWCGYRKFLQKS
(347 AS)
```

gene_chr14_1.gen_734:

```
MPEPKQIYANNIFDNDKLRFFLKYRSKEKVLYSFTSEN | 1 | DIINEEKRKSNNLC | 4 | ILYTWKKIDKDNII
YLIQLFKSLRIIKIYRFVINFIKKHTKEKYKHRNEWN | 5 | FEKMESMKNRPLK | 6 | ESLKFTNKMHLALIKRYFM
SLIFIMLSYIMIEI | 7 | IYLSKESKSPMNYFIYNLDL | 8 | IVFDEFYETEFLKALYFYS | 9 | VYIKREIKYIYIY
IYIYTYRTTKIK | 9 | AIQKNRDEEYLSIKSKRKLKNFINKKEIDISGINYLLWDFTNLSH | 10 | NDLLKFVT
PSSANQNVEEEIILDHTIKNIN | 11 | ELRYFETKIYESKDFIFHINIKRYIERTIKNIIILKIFIII | 12 | VNI
KQIEKKNIIYI | 13 | SNPTLALEMQEELLNHELKNILINTKLR | 14 | KSIKENYEILKMEENLMKLGTLMLLG |
15 | FGEAGAKIISKNNINEQERVNLLINGEIVYSVFSFCDIRNFTEITEVLKEK | 16 | IMIFINLIAEIIHECCDF
YGGTINKNIGDAFLLVWVYQKKEYSNKKMNMFKSPNNNYDEYSEKENINRICDLAFLSTVQTLIKLRK | 17 | SEK
IHFNNENMDELIKNNILELSFGLHFGWAIEGAIGSSYKIDLSYLSENVNIASRLQDISKIYKNNIVISGDFYD
NMSEKFK | 18 | 21 | LYEEYAKNDDIKFIKIHYPKDYLEQFKIALESYLGKWNESKNILEYLKRNNIFEDEILNQ
LWNFLSMNFIAPSDWCGYRKFLQKS
(708 AS)
```

Abb. 69: Die von *Genefinder* und *FullPhat* vorhergesagten Gene [unterstrichen: vorhergesagte Transmembranspannen; fett: falsch vorhergesagte Bereiche; senkrechte Striche: berechnete Intron-/ Exongrenzen; Bezifferungen: experimentell bestätigte Introns; kursiv: *Poreloop*bereich; grau: TM4, Prä-TM5, TM5 und Beginn der TM6; dunkelgrau: Teile der katalytischen Domäne]

Keine der Strukturen gibt die mit RT-PCR ermittelten Daten vollständig wieder. Der K_v -kanalähnliche Bereich wurde nicht erkannt.

7.2 Ein weiteres Isoenzym aus Plasmodium vivax

Bei einer nachträglich durchgeführten Suche mit der Plasmodium-AC in einer P.vivax-spezifischen Datenbank (<http://tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=pval>) wurden zwei genomische Contigs mit ähnlichen Sequenzen zum beschriebenen AC-Typ gefunden. Die Sequenzen überlappen nicht miteinander, enthalten jedoch einen vollständigen vergleichbaren Leserahmen.

I) Contig 401788 76 (11104 bp)

Die kodierenden Bereiche wurden wie folgt festgelegt (reverse complement):

1. Exon: bp 5515-5631, 2. Exon: bp 5984-6040, 3. Exon: bp 6217-6321, 4. Exon: bp 6470-6669, 5. Exon: bp 6836-6986, 6. Exon: bp 7113-7154, 7. Exon: bp 7290-7388, 8. Exon: bp 7518-7576, 9. Exon: bp 7710-7767, 10. Exon: bp 7870-8010, 11. Exon: bp 8161-8251, 12. Exon: bp 8446-8570, 13. Exon: bp 8679-8770, 14. Exon: bp 8877-8963, 15. Exon: bp 9067-9143, 16. Exon: bp 9361-9512, 17. Exon: bp 9647-9919, 18. Exon: bp 10095-10349, 19. Exon: bp 10640-10726, 20. Exon: bp 10884-10949

II) Contig 401787 37 (6532 bp)

Die kodierenden Bereiche wurden wie folgt festgelegt (reverse complement):

1. Exon: bp 49-120, 2. Exon: bp 264-527 (Stop)

MPDLKHIYAKEILPNEKLKRYFLKCRSKEKVLVSFTSDNEITNGERKYDDEVEISKYEGLHSNAR	65
TRLANLLYLLLYLFFVIFSKDVFYFLLEKKHDTLSDYLIILLILTCCVEVMINFLTRKTYTCYFMF	130
FEIVSLVSLCFDLYFCECYLFDWFDYSVKRINRISDVGSEDVLYLINLVKALRVTKIYRLIICFV	195
GRHTKEKYKHRNEWNFEKMESMQNRNLKESLKFTNKMHLLALIKRYFMSLFFVMLSCILIIETVSV	260
PKVQNNMEYFIYNLDLISLEDYIESELLKALYFYTKIQKEKGAEYLVSFKSKRKLQNFVNKKE	325
LTVGTQKRTLWDFAHLSHKELLKFISMSPPSGGDDEEEVILSGTIKDLNSLRRYETKVYQSAEFT	390
FYINVQKNVKKRIKNVLLKILVIVFSFIILFYFTSELNVLLFPPIESILKKLKLMKSNPTLALEM	455
QEELLNHELDNILRNTKMKRKGIKQNYEILKMEENLMKLGTLMLLGFGEAGAKIISKNAQERV	520
NLLVNGEVVYSVFSFCDIRNFTEITEVLKEKIMIFINLVAEIIHDCCDFYGGSSINKNIGDAFLLV	585
WKCKKRDHFNERISLLTSKYHVPGGGNRGEISEGACINRVCDLAFLATVKTLIRLHESEKIRSFL	650
KSEKIHVGSNVIELSFGHLFGWAIEGAIGSSYKIDLSYLSENVNIASRLQDISKTYKRNVIS	715
GEFYDNMSEGFKKSLRRIDRVTLKGCNPLDLYTFDIRLDKIPKKNVEAFDVARNVDIKMKVIL	780
NDIKQKTERRRRKKEVLNLAYDLYEEYSKSEDIKSIQMNFPPEEYLRLFGNALELYLGGDWRESHR	845
LLHRLRGNFSCEDDIVCQLGDFLRASNLTPSPDWGGFRRFLOKS	889

Abb. 70: Die Sequenz der P.vivax-AC: **TM 1-6**, **Poreloop**, katalytischer Bereich, **TPRL** und **C-Terminus** sind entsprechend unterstrichen

8 Literatur

1. Adamian, L., Liang, J.: *Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins*. J. Mol. Biol. (2001) **311**: 891-907.
2. Aggarwal, G., Ramaswamy, R.: *Ab initio gene identification: prokaryote genome annotation with GeneScan and GLIMMER*. J. Biosci. (2002) **27 Suppl 1**: 7-14.
3. Andrisani, O.M.: *CREB-mediated transcriptional control*. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. (1999) **9**: 19-32.
4. Baker, D.A.: *persönliche Mitteilung*.
5. Barzu, O., Danchin, A.: *Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes*. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. (1994) **49**: 241-283.
6. Berridge, M.J.: *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature (1993) **361**: 315-325.
7. Carucci, D.J., Witney, A.A., Muhia, D.K., Warhurst, D.C., Schaap, P., Meima, M., Li, J.L., Taylor, M.C., Kelly, J.M., Baker, D.A.: *Guanylyl cyclase activity associated with putative bifunctional integral membrane proteins in Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. (2000) **275**: 22147-22156.
8. Cha, A., Snyder, G.E., Selvin, P.R., Bezanilla, F.: *Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy*. Nature (1999) **402**: 809-813.
9. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.: *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science (1994) **263**: 802-805.
10. Chen, G.Q., Cui, C., Mayer, M.L., Gouaux, E.: *Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor*. Nature (1999) **402**: 817-821.
11. Clapham, D.E.: *Unlocking family secrets: K⁺ channel transmembrane domains*. Cell (1999) **97**: 547-550.
12. Das, A.K., Cohen, P.W., Barford, D.: *The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions*. EMBO J. (1998) **17**: 1192-1199.
13. Del Camino, D., Holmgren, M., Liu, Y., Yellen, G.: *Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications*. Nature (2000) **403**: 321-325.
14. Dobson, S., Kar, B., Kumar, R., Adams, B., Barik, S.: *A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, Plasmodium falciparum*. BMC Microbiol. (2001) **1**: 31.

15. Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfützner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R.: *The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity*. Science (1998) **280**: 69-77.
16. Durell, S.R., Hao, Y., Guy, H.R.: *Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K^+ channels in open, closed, and inactivated conformations*. J. Struct. Biol. (1998) **121**: 263-284.
17. Engel, P.: *Klonierung und Expression einer Guanylatcyclase aus Paramecium tetraurelia*. Dissertation der Universität Tübingen (1999).
18. Gibco BRL Life Technologies: *BAC-To-BACTM Baculovirus Expression System, Instruction Manual* (1997).
19. Gibco BRL Life Technologies: *Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques, Instruction Manual* (1997).
20. Glauner, K.S., Mannuzzu, L.M., Gandhi, C.S., Isacoff, E.Y.: *Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel*. Nature (1999) **402**: 813-817.
21. Gordeladze, J.O., Hansson, V.: *Mn^{2+} -dependent adenylyl cyclase (AC) in rat testis: kinetic properties and optimalization of assay conditions*. Int. J. Androl. (1980) **3**: 539-552.
22. Gowda, D.C., Davidson, E.A.: *Protein glycosylation in the malaria parasite*. Parasitol. Today (1999) **15**: 147-152.
23. Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U., Schultz, J.E.: *Adenylyl cyclase Rv1625c of Mycobacterium tuberculosis: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases*. EMBO J. (2001) **20**: 3667-3675.
24. Guy, R.: *persönliche Mitteilung an J.E. Schultz*.
25. Hambach, K.: *Klonierung einer Adenylatcyclase aus Paramecium tetraurelia*. Dissertation der Universität Tübingen (2002).
26. Hansen, M.: *Klonierung und Charakterisierung eines Aquaglyceroporins aus Plasmodium falciparum*. Dissertation der Universität Tübingen (2002).
27. Hartmann, H.A., Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Tagliatela, M., Joho, R.H., Brown, A.M.: *Exchange of conduction pathways between two related K^+ channels*. Science (1991) **251**: 942-944.
28. Hauser, K., Pavlovic, N., Klauke, N., Geissinger, D., Plattner, H.: *Green fluorescent protein-tagged sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase overexpression in Paramecium cells: isoforms, subcellular localization, biogenesis of cortical calcium stores and functional aspects*. Mol. Microbiol. (2000) **37**: 773-787.
29. Haynes, W.J., Ling, K.Y., Saimi, Y., Kung, C.: *Induction of antibiotic resistance in Paramecium tetraurelia by the bacterial gene APH-3'-II*. J. Eukaryot. Microbiol. (1995) **42**: 83-91.

30. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R.: *Mutations in the K⁺ channel signature sequence*. Biophys. J. (1994) **66**: 1061-1067.
31. Heginbotham, L., Odessey, E., Miller, C.: *Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel*. Biochemistry (1997) **36**: 10335-10342.
32. Hertelendy, F., Toth, M., Fitch, C.D.: *Malaria enhances cyclic AMP production by immature erythrocytes in vitro*. Life Sci. (1979) **25**: 451-455.
33. Hirayama, B.A., Wright, E.M.: *Glycosylation of the rabbit intestinal brush border Na⁺/glucose cotransporter*. Biochim. Biophys. Acta (1992) **1103**: 37-44.
34. Hoffman, S.L., Subramanian, G.M., Collins, F.H., Venter, J.C.: *Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria*. Nature (2002) **415**: 702-709.
35. Hoffmann, T.R.: *Membranständige Guanylatcyclasen aus Paramecium und Tetrahymena: Klonierung und bakterielle Expression der katalytischen Bereiche*. Dissertation der Universität Tübingen (1999).
36. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.: *PCR Protokolls, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc.: San Diego, California (1990)
37. Inselburg, J.: *Stage-specific inhibitory effect of cyclic AMP on asexual maturation and gametocyte formation of Plasmodium falciparum*. J. Parasitol. (1983) **69**: 592-597.
38. Invitrogen: *Growth and Maintenance of Insect Cell Lines, Instruction Manual, Version E*. (1997).
39. Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T., Watanabe, M.: *A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in Euglena gracilis*. Nature (2002) **415**: 1047-1051.
40. Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J.U., Schultz, J.E.: *A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from Anabaena is a selfactivating cAMP switch*. EMBO J. (2002) **21**: 3672-3680.
41. Kang, H., Sayner, S.L., Gross, K.L., Russell, L.C., Chinkers, M.: *Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation*. Biochemistry (2001) **40**: 10485-10490.
42. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., Ladant, D.: *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998) **95**: 5752-5756.
43. Katayama, M., Ohmori, M.: *Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120*. J. Bacteriol. (1997) **179**: 3588-3593.
44. Kaushal, D.C., Carter, R., Miller, L.H., Krishna, G.: *Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture*. Nature (1980) **286**: 490-492.
45. Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., Uyeda, K.: *Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the*

- carbohydrate response element binding protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2001) **98**: 13710-13715.
46. Kawamoto, F., Alejo-Blanco, R., Fleck, S.L., Kawamoto, Y., Sinden, R.E.: *Possible roles of Ca²⁺ and cGMP as mediators of the exflagellation of Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. (1990) **42**: 101-108.
 47. Kimura, E.A., Katzin, A.M., Couto, A.S.: *More on protein glycosylation in the malaria parasite*. Parasitol. Today (2000) **16**: 38-40.
 48. Knapp, B., Nau, U., Hundt, E., Kupper, H.A.: *Demonstration of alternative splicing of a pre-mRNA expressed in the blood stage form of Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. (1991) **266**: 7148-7154.
 49. Kozak, M.: *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. Cell (1986) **44**: 283-292.
 50. Kreier, J.P. (Editor): *Malaria. Epidemiology, Chemotherapy, Morphology, and Metabolism*. Vol. 1. Academic Press, New York (1980).
 51. Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F., Choe, S.: *Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel*. Nature (1998) **392**: 945-948.
 52. Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R., Gilman, A.G.: *Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter- like structure*. Science (1989) **244**: 1558-1564.
 53. Laemmli, U.K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature (1970) **227**: 680-685.
 54. Lamb, J.R., Tugendreich, S., Hieter, P.: *Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?* Trends Biochem. Sci. (1995) **20**: 257-259.
 55. Levitt, A., Dimayuga, F.O., Ruvolo, V.R.: *Analysis of malarial transcripts using cDNA-directed polymerase chain reaction*. J. Parasitol. (1993) **79**: 653-662.
 56. Li, J., Cox, L.S.: *Isolation and characterisation of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit gene from Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. (2000) **109**: 157-163.
 57. Linder, J.U.: *Klonierung einer Adenylatcyclase aus Paramecium*. Dissertation der Universität Tübingen (1997).
 58. Linder, J.U.: *persönliche Mitteilung*.
 59. Linder, J.U., Engel, P., Reimer, A., Krüger, T., Plattner, H., Schultz, A., Schultz, J.E.: *Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in Paramecium, Tetrahymena and Plasmodium*. EMBO J. (1999) **18**: 4222-4232.
 60. Liu, D.T., Tibbs, G.R., Paoletti, P., Siegelbaum, S.A.: *Constraining ligand-binding site stoichiometry suggests that a cyclic nucleotide-gated channel is composed of two functional dimers*. Neuron (1998) **21**: 235-248.

61. Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D., Hurley, J.H.: *Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1997) **94**: 13414-13419.
62. Logothetis, D.E., Kammen, B.F., Lindpaintner, K., Bisbas, D., Nadal-Ginard, B.: *Gating charge differences between two voltage-gated K^+ channels are due to the specific charge content of their respective S4 regions*. Neuron (1993) **10**: 1121-1129.
63. Logothetis, D.E., Movahedi, S., Satler, C., Lindpaintner, K., Nadal-Ginard, B.: *Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K^+ channel result in corresponding decreases in gating charge*. Neuron (1992) **8**: 531-540.
64. Lopez, G.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y.: *Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K^+ channel comprises part of the pore*. Nature (1994) **367**: 179-182.
65. Lu, Z., Klem, A.M., Ramu, Y.: *Ion conduction pore is conserved among potassium channels*. Nature (2001) **413**: 809-813.
66. Martin, S.K., Miller, L.H., Nijhout, M.M., Carter, R.: *Plasmodium gallinaceum: induction of male gametocyte exflagellation by phosphodiesterase inhibitors*. Exp. Parasitol. (1978) **44**: 239-242.
67. McCormack, K., Tanouye, M.A., Iverson, L.E., Lin, J.W., Ramaswami, M., McCormack, T., Campanelli, J.T., Mathew, M.K., Rudy, B.: *A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K^+ channels*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1991) **88**: 2931-2935.
68. McCue, L.A., McDonough, K.A., Lawrence, C.E.: *Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in Mycobacterium tuberculosis*. Genome. Res. (2000) **10**: 204-219.
69. Miller, C.: *An overview of the potassium channel family*. Genome Biol (2000) **1**.
70. Mullis, K.B., Faloona, F.A.: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol. (1987) **155**: 335-350.
71. Nacer, A., Berry, L., Slomianny, C., Mattei, D.: *Plasmodium falciparum signal sequences: simply sequences or special signals?* Int. J. Parasitol. (2001) **31**: 1371-1379.
72. North, A.R. (Editor): *Handbook of Receptors and Channels. Ligand- and Voltage-gated Ion Channels*. CRC Press, Boca Raton, Florida (1995).
73. Pace, T., Birago, C., Janse, C.J., Picci, L., Ponzi, M.: *Developmental regulation of a Plasmodium gene involves the generation of stage-specific 5' untranslated sequences*. Mol. Biochem. Parasitol. (1998) **97**: 45-53.
74. Papazian, D.M., Shao, X.M., Seoh, S.A., Mock, A.F., Huang, Y., Wainstock, D.H.: *Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K^+ channel*. Neuron (1995) **14**: 1293-1301.

75. Papazian, D.M., Timpe, L.C., Jan, Y.N., Jan, L.Y.: *Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence*. Nature (1991) **349**: 305-310.
76. Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A.: *A TRP channel that senses cold stimuli and menthol*. Cell (2002) **108**: 705-715.
77. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J.: *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene (1992) **111**: 229-233.
78. Rall, T.S., Sutherland, E.W., Berthed, J.: *The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates*. J. Biol. Chem. (1957) **224**: 463-475.
79. Read, L.K., Mikkelsen, R.B.: *Comparison of adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase in gametocytogenic and nongametocytogenic clones of Plasmodium falciparum*. J. Parasitol. (1991) **77**: 346-352.
80. Read, L.K., Mikkelsen, R.B.: *Plasmodium falciparum-infected erythrocytes contain an adenylate cyclase with properties which differ from those of the host enzyme*. Mol. Biochem. Parasitol. (1991) **45**: 109-119.
81. Roos, W., Malchow, D., Gerisch, G.: *Adenylyl cyclase and the control of cell differentiation in Dictyostelium discoideum*. Cell. Differ. (1977) **6**: 229-239.
82. Ruiz, F., Vayssie, L., Klotz, C., Sperling, L., Madeddu, L.: *Homology-dependent gene silencing in Paramecium*. Mol. Biol. Cell (1998) **9**: 931-943.
83. Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: *Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. Nature (1986) **324**: 163-166.
84. Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M.: *A highly sensitive adenylate cyclase assay*. Anal. Biochem. (1974) **58**: 541-548.
85. Salzberg, S.L., Pertea, M., Delcher, A.L., Gardner, M.J., Tettelin, H.: *Interpolated Markov models for eukaryotic gene finding*. Genomics (1999) **59**: 24-31.
86. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
87. Schultz, J.E., Klumpp, S.: *Adenylate cyclase in cilia from Paramecium, Localisation and partial characterization*. FEBS Lett. (1983) **154**: 347-350.
88. Schultz, J.E., Klumpp, S., Benz, R., Schürhoff-Göters, W.J., Schmid, A.: *Regulation of adenylyl cyclase from Paramecium by an intrinsic potassium conductance*. Science (1992) **255**: 600-603.
89. Schultz, J.E., Schönborn, C.: *Cyclic AMP formation in Tetrahymena pyriformis is controlled by a K⁺ conductance*. FEBS Lett. (1994) **356**: 322-326.

90. Schultz, J.E., Uhl, D.G., Klumpp, S.: *Ionic regulation of adenylate cyclase from the cilia of Paramecium tetraurelia*. *Biochem. J.* (1987) **246**: 187-192.
91. Seebacher, T., Linder, J.U., Schultz, J.E.: *An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity*. *Eur. J. Biochem.* (2001) **268**: 105-110.
92. Sherman, I.W. (Editor): *Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. American Society for Microbiology, Washington (1998).
93. Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C., Danchin, A.: *Aeromonas hydrophila adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria*. *J. Bacteriol.* (1998) **180**: 3339-3344.
94. Staines, H.M., Ellory, J.C., Kirk, K.: *Perturbation of the pump-leak balance for Na⁺ and K⁺ in malaria-infected erythrocytes*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2001) **280**: C1576-1587.
95. Stratagene: *Lambda ZAP II/EcoR I/ CIAP Cloning Kit, Instruction Manual* (1993).
96. Sunahara, R.K., Beuve, A., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., Garbers, D.L., Gilman, A.G.: *Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases*. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**: 16332-16338.
97. Sunahara, R.K., Dessauer, C.W., Gilman, A.G.: *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1996) **36**: 461-480.
98. Sutherland, E.W.: *Studies on the mechanism of hormone action*. *Science* (1972) **177**: 401-408.
99. Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G., Sprang, S.R.: *Two-metal-Ion catalysis in adenylyl cyclase*. *Science* (1999) **285**: 756-760.
100. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1979) **76**: 4350-4354.
101. Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., MacKinnon, R.: *Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel*. *Science* (1991) **251**: 939-942.
102. Zhang, G., Liu, Y., Qin, J., Vo, B., Tang, W.J., Ruoho, A.E., Hurley, J.H.: *Characterization and crystallization of a minimal catalytic core domain from mammalian type II adenylyl cyclase*. *Protein Sci.* (1997) **6**: 903-908.
103. Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E., Hurley, J.H.: *Structure of the adenylyl cyclase catalytic core*. *Nature* (1997) **386**: 247-253.
104. Zhang, H., Grishin, N.V.: *The alpha-subunit of protein prenyltransferases is a member of the tetratricopeptide repeat family*. *Protein Sci.* (1999) **8**: 1658-1667.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Privatdozenten/-innen und Professoren/-innen:

K.-D. Bremecker	Pharm. Technologie
P. Dilg	Pharm. Terminologie
A. Fahr	Pharm. Technologie
B. Feuser	Physik
T. Gillman	Pharm. Chemie
M. Haake	Pharm. Chemie
H. Haeberlein	Pharm. Biologie
W. Hanefeld	Pharm. Chemie
W. Haneke	Mathematik
J. Hölzl	Pharm. Biologie
P. Imming	Pharm. Chemie
T. Kissel	Pharm. Technologie
G. Klebe	Pharm. Chemie
S. Klumpp	Pharm. Biochemie
K. Kuschinski	Pharmakologie und Toxikologie
J. Krieglstein	Pharmakologie und Toxikologie
R. Matusch	Pharm. Analytik
U. Matern	Pharm. Biologie
K. Radsak	Mikrobiologie
G. Seitz	Pharm. Chemie