

**Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Funktion des α 14- und des α 19-
Giardins in Trophozoiten von *Giardia lamblia***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Osnabrück

Anke Vahrman

Osnabrück, Februar 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der intestinale Darmparasit <i>Giardia lamblia</i>	1
1.2 Morphologie und Lebenszyklus	2
1.3 Physiologie	5
1.4 Das giardiale Cytoskelett.....	7
1.5 Annexine.....	8
1.6 α -Giardine / Annexine in <i>G. lamblia</i>	11
1.7 Lipidmodifikationen von Proteinen	12
1.8 Themenschwerpunkt	13
1.8.1 Zielsetzung bei der Untersuchung des α 14-Giardins	13
1.8.2 Zielsetzung bei der Untersuchung des α 19-Giardins	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.2 Medien und Puffer	15
2.3 Verwendete Antikörper	18
2.4 Zellkultur von <i>Giardia lamblia</i>	20
2.4.1 Kulturbedingungen und Stammerhaltung von <i>G. lamblia</i>	20
2.4.2 Ernte und Aufschluss der Trophozoiten zur Herstellung von <i>G. lamblia</i> -Extrakt	20
2.4.3 Kryokonservierung von <i>G. lamblia</i> -Zellen	21
2.5 Molekularbiologische Methoden	21
2.5.1 Bakterienstämme.....	21
2.5.2 Anzucht und Stammerhaltung von <i>E. coli</i>	22
2.5.3 Plasmide	22
2.5.4 Oligonukleotid-Primer	23
2.5.5 Isolierung genomischer DNA aus <i>G. lamblia</i> durch Elu-Quick.....	23
2.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>G. lamblia</i>	24

2.5.7 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)	24
2.5.8 DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.5.9 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	25
2.5.10 Kolonie-PCR	25
2.5.11 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.5.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	26
2.5.13 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	27
2.5.14 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	27
2.5.15 DNA-Restriktion	27
2.5.16 Ligation von DNA-Fragmenten	28
2.5.17 Herstellung kompetenter Zellen	28
2.5.18 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock nach CHUNG <i>et al.</i> (1989)	29
2.5.19 DNA-Sequenzanalyse und Datenverarbeitung	29
2.5.20 Klonierung des <i>E. coli</i> -Stammes BL21(DE3)pLysS/pET16b- α 7.3 bzw. -STK.....	30
2.5.21 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in den <i>E. coli</i> -Stämmen BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) [pAPlacIQ] und BL21 Rosetta.....	30
2.6 Biochemische Methoden	31
2.6.1 Test auf „inclusion bodies“ bei heterolog exprimierten Proteinen	31
2.6.2 Affinitätschromatographien.....	32
2.6.2.1 Reinigung und Anreicherung von rekombinanten Proteinen mittels Metallchelat- Affinitätschromatographie (Ni-NTA).....	32
2.6.2.2 Affinitätschromatographie an mittels CNBr-aktivierter Sepharose 4B immobilisierten Proteinen	32
2.6.2.3 Metallhydroxid-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Phosphoproteinen.....	33
2.6.2.4 Affinitätschromatographie an Heparinsepharose	33
2.6.3 Heparin-Bindeassay und „Sugar Competition“	34
2.6.4 Quantitative Proteinbestimmungsmethoden	34
2.6.4.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1979)	34
2.6.4.2 Proteinbestimmung mit BCA	35
2.6.5 Protein-Dialyse	35
2.6.6 Proteinpräzipitation	35
2.6.6.1 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung	35

2.6.6.2 Aceton-Fällung	36
2.6.6.3 Methanol/Chloroform-Fällung	36
2.6.6.4 Ammoniumsulfatfällung	36
2.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.6.8 Färbemethoden für Polyacrylamidgele.....	37
2.6.8.1 Dispersionsfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue G250	37
2.6.8.2 Silberfärbung	38
2.6.8.3 Dispersionsfärbung von Phosphoproteinen mittels „Pro-Q® Diamond phosphoprotein gel stain-Kit“	38
2.6.9 „Western Blot“-Analyse nach MATSUDAIRA (1987)	39
2.6.10 „Far-Western“-Analysen	39
2.6.11 Gewinnung polyklonaler Antikörper.....	40
2.6.12 Protein-Identifizierung mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)..	40
2.6.12.1 Trypsinverdau von Proteinen im Gel	41
2.6.12.2 Trypsinverdau von Proteinen	41
2.6.12.3 Fahndung nach möglichen Bindeproteinen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	42
2.6.13 Untersuchungen zur Lokalisation von Proteinen in <i>G. lamblia</i> mittels Immunfluoreszenz	42
2.6.14 Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	43
2.6.14.1 Tieftemperatur-Einbettung in Lowicryl-K4M-Harz	43
2.6.14.2 Immun-Goldmarkierung an Ultradünnschnitten	43
2.6.15 Flagellenpräparation von <i>G. lamblia</i>	44
2.6.16 Cytoskelettisolierung	45
2.6.17 Präparation von löslichen α -Giardininen aus <i>G. lamblia</i>	45
2.6.18 Phospholipid-Bindestudie	46
2.6.19 Phosphorylierungsstudie mit [γ - ³² P]-markiertem ATP	46
2.6.20 Crosslinking-Untersuchungen	47
2.6.21 Nachweis von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken mittels SDS-PAGE	48
2.6.22 Extraktion von integralen Membranproteinen.....	48
2.7. „Yeast-Two-Hybrid“-System	48
2.7.1 Hefestämme	50
2.7.2 Hefe kompatible Vektoren	50

2.7.3 Kultivierung der Hefestämme	51
2.7.4 Stammerhaltung von Hefestämmen.....	52
2.7.5 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation.....	52
2.7.6 Test der DNA-BD-Fusionsprotein auf transkriptionale Aktivität	53
2.7.7 Test der DNA-BD Fusionsproteine auf Toxizität	53
2.7.8 Paarung der transformierten Hefestämme Y187 und AH109	54
2.7.9 Selektion der diploiden Hefen.....	54
2.7.10 Immunpräzipitation der potentiell exprimierten Interaktionspartner	55
3. Ergebnisse	56
3.1 Biochemische Charakterisierung des α 14-Giardins und Interaktionsstudien mit potentiellen Bindepartnern	56
3.1.1 Heterologe Expression des rekombinanten α 14-Giardins.....	56
3.1.2 Aufreinigung des rekombinanten α 14-Giardins mittels Ni-NTA.....	58
3.1.3 Immuncytochemische Lokalisierung des α 14-Giardins in <i>G. lamblia</i>	58
3.1.3.1 Lokalisierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.....	58
3.1.3.2 Lokalisierungsstudien mittels Transmission-Elektronenmikroskopie	59
3.1.4 Detektion möglicher Bindepartner mittels Affinitätschromatographie an α 14-Sepharose....	60
3.1.5 Massenspektrometrische Identifizierung der potentiellen Bindepartner des α 14-Giardins..	62
3.1.6 Untersuchungen zur möglichen Interaktion zwischen den Mikrotubuli der Flagellen-Axonema und des α 14-Giardins	62
3.1.6.1 Ko-Lokalisierungsuntersuchungen an permeabilisierten Trophozoiten	62
3.1.6.2 Immuncytochemische Ko-Lokalisierung von α 14-Giardin und giardialem Tubulin-Cytoskelett	64
3.1.7 Biochemische Untersuchungen an und Interaktionsstudien mit den potentiellen Bindepartnern α 7.3-Giardin bzw. Ser/Thr-Kinase	66
3.1.7.1 Herstellung rekombinanter Plasmidkonstrukte pET16b- α 7.3 und - <i>STK</i>	66
3.1.7.2 Heterologe Expression und Aufreinigung des rekombinanten α 7.3-Giardins sowie der Kinase- und der Ankyrin-Domäne	68
3.1.7.3 Interaktionsnachweis mittels „Far Western“-Analyse	69
3.1.7.4 Immuncytochemische Ko-Lokalisierung von α 14-Giardin mit den potentiellen Bindepartnern	70

3.1.7.5 Untersuchung zur Interaktion der Bindepartner mittels „Yeast-Two-Hybrid“-System ...	72
3.1.7.6 Expressionsnachweis der Interaktionspartner in Hefe	73
3.1.8 Phosphorylierungsnachweis des α 14-Giardins	75
3.1.9 Nachweise zur Oligomerisierungsfähigkeit des α 14-Giardins.....	79
3.1.9.1 Detektion von α 14-Oligomeren bei Verwendung des Sulfo-SBED-Crosslinkers	79
3.1.9.2 Nachweis der reversiblen Oligomerisierung des α 14-Giardins	80
3.1.10 Untersuchungen zur Interaktion von α 14-Giardin mit Glykosaminoglykanen	81
3.1.10.1 Nachweis einer Heparin-Bindestelle in α 14 mittels Herapinsäule.....	81
3.1.10.2 Bindestudien zwischen α 14 und Heparin-Sepharose mittels verschiedener Zucker ..	82
3.1.10.3 Immunocytochemische Untersuchungen zum Sekretionsnachweis des α 14-Giardins	83
3.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion des α 19-Giardins.....	84
3.2.1 Expressionsnachweis des α 19-Giardins	84
3.2.2 Heterologe Expression und Aufreinigung des rekombinanten α 19-Giardins	85
3.2.3 Immunocytochemische Lokalisationsstudien von α 19-Giardin in <i>G. lamblia</i>	86
3.2.3.1 Untersuchungen an permeabilisierten Trophozoiten und isolierten Flagellen	86
3.2.3.2 Lokalisationsuntersuchungen an lebenden Trophozoiten.....	89
3.2.3.3 Immunocytochemische Ko-Lokalisierung von α 19-Giardin und giardialem Tubulin- Cytoskelett	90
3.2.4 Phospholipidbindung des α 19-Giardins.....	91
3.2.5 Untersuchung zur Membranassoziation des α 19-Giardins	92
3.2.6 Phosphorylierungsnachweis des α 19-Giardins	92
4. Diskussion.....	94
4.1 Untersuchungen zur Charakterisierung des α 14-Giardins	94
4.1.1 Subzelluläre Lokalisation des α 14-Giardins	94
4.1.2 Identifizierung potentieller Interaktionspartner des α 14-Giardins.....	96
4.1.2.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen giardialen Mikrotubuli und dem α 14-Giardin.....	97
4.1.2.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem α 14 und dem α 7.3-Giardin bzw. der Ser/Thr-Kinase.....	98
4.1.3 Nachweis der Phosphorylierung des α 14-Giardins	100

4.1.4 Oligomierisierungsnachweis des α 14-Giardins	103
4.1.5 Bindung von α 14 an Glykosaminoglykane	104
4.2 Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des	107
4.2.1 Expressionsnachweis des α 19-Giardins	107
4.2.2 Subzelluläre Lokalisation des α 19-Giardins in <i>G. lamblia</i>	108
4.2.3 Nachweis der klassischen Annexin-Eigenschaft.....	110
4.2.4 Untersuchungen zu potentiellen posttranslationalen Modifikation von α 19	111
4.3 Ausblick	113
5. Zusammenfassung	115
6. Literaturverzeichnis	117
7. Anhang	

1. Einleitung

1.1 Der intestinale Darmparasit *Giardia lamblia*

Der einzellige Darmparasit *Giardia lamblia* (*G. lamblia*; Syn. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*), der phylogenetisch zu den Diplomonaden zählt, galt lange Zeit als ursprünglichster Eukaryont. Diese Einordnung beruhte unter anderem auf dem Fehlen von charakteristischen Organellen, wie z.B. Peroxisomen und Mitochondrien (Abb. 1.1; SOGIN *et al.*, 1989, HASHIMOTO *et al.*, 1994; LUJAN & TOUZ, 2003). Erst die Entdeckung von mitochondrialen Genen und Mitosomen, einem sich aus Mitochondrien ableitenden Organell, führten zu der Annahme, dass das nicht Vorhandensein von Mitochondrien auf einen sekundären Verlust dieses Organells zurückzuführen ist (TOVAR *et al.*, 2003; REGOES, 2005). Der Protist ist also nicht, wie früher vermutet, vor den Endosymbionten entstanden. Obwohl der Organismus inzwischen seinen Status als „missing-link“ zwischen Pro- und Eukaryonten eingebüßt hat, spielt er dennoch eine wichtige Rolle für das Verständnis der evolutionären Entwicklung der Eukaryonten.

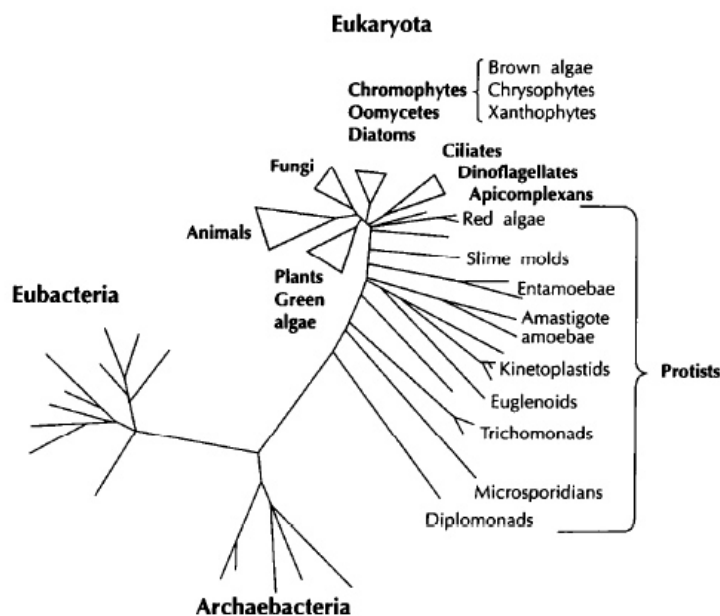


Abb. 1.1: Phylogenetische Einordnung der Diplomonaden anhand von 16S rRNA-Analysen (SOGIN *et al.*, 1991)

Neben diesem Aspekt kommt *G. lamblia* auch aus medizinischer Sicht eine wichtige Bedeutung zu. Wie bei allen anderen Mitgliedern der Gattung *Giardia* handelt es sich auch bei *G. lamblia* um einen intestinalen Parasiten von Vertebraten. Die von ihm verursachte Giardiasis ist eine der am häufigsten durch Protozoen auftretenden Infektionskrankheit beim Menschen. Die weltweite Ausbreitung dieser Parasitose ist hierbei stark an die herrschenden hygienischen Bedingungen gebunden (ROBERT-THOMSON, 1984). Besonders

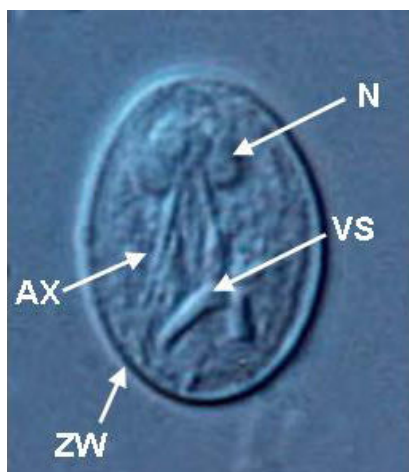
verbreitet ist der Erreger in Entwicklungsländern. So liegt in manchen Regionen Asiens, Afrikas und Lateinamerikas die Infektionsrate bei 4-43%, statt der in Industrieländern erfassten 3-7% (FLANAGAN, 1992). Insgesamt erkranken jährlich ca. 250 Millionen Menschen weltweit an Giardiasis.

Die Erkrankung verläuft meist nicht tödlich, aber die Besiedlung des Wirtsdarms durch den Parasiten geht mit einer Reihe von sehr unangenehmen Symptomen einher. Zu diesen zählen starke Flatulenz, heftiges Erbrechen und schwerer Durchfall. Zusätzlich können die Giardien auch durch den Gallengang in die Gallenblase wandern und dort Entzündungen hervorrufen.

1.2 Morphologie und Lebenszyklus

Der asexuelle Lebenszyklus von *G. lamblia* ist durch den Wechsel zwischen infektiöser Zyste und vegetativen Trophozoiten geprägt. Die ovale Zyste (Abb. 1.2) ist ca. 11-14 µm lang und 6-10 µm breit und besitzt vier Zellkerne (ADAM, 2001). Durch ihre ca. 0,3-0,5 µm dicke Zystwand ist sie in der Lage, extreme Umweltbedingungen wie Temperaturschwankungen, Austrocknung oder niedrige pH-Werte unbeschadet zu überleben (ADAM, 2001; ALEY & GILLIN, 1995).

A



B

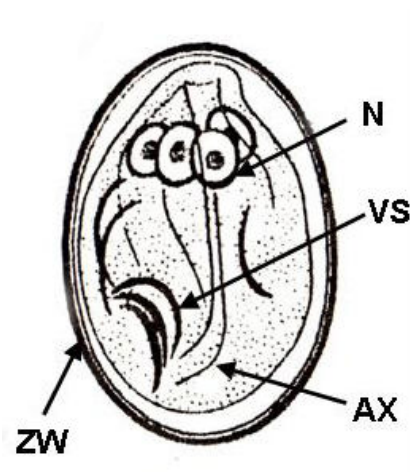


Abb. 1.2: Lichtmikroskopische (A) und schematische Abbildung (B) einer Zyste von *G. lamblia*

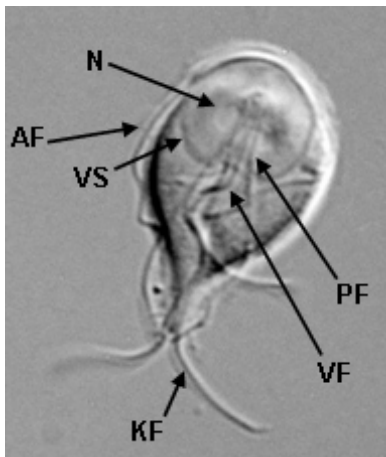
AX, Axonema; ZW, Zystwand; VS, ventrale Scheibe; N, Nuclei (A: Kobe University Faculty of Health Sciences – Parasitology, B: KULDA & NOHYNKOVA, 1995)

Der zweikernige Trophozoit (Abb. 1.3) hingegen, der schon 1681 von Antoni van Leeuwenhoek und 1859 von Alfred Mathieu Giard und Vilém Dusan Lambl morphologisch

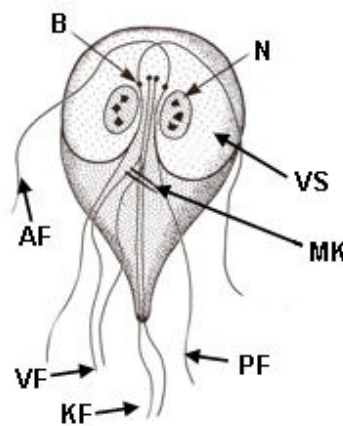
beschrieben wurde, weist eine tropfenförmige Gestalt auf (12-15 µm lang, 5-9 µm breit), die seitlich gesehen als Halbbirne erscheint (ADAM, 2001). Von den vier frei beweglichen Flagellenpaaren, welche dem Trophozoiten erlauben sich in Taumel- und Schaukelbewegungen fortzubewegen, sind drei Paare (anterior, posterior, kaudal) symmetrisch auf der dorsalen Seite lokalisiert, während das vierte Paar auf der ventralen Seite austritt (ELMENDORF *et al.*, 2003).

Der Parasit zeichnet sich durch zwei einzigartige Elemente aus. Dieses ist zum einen eine scheibenartige Struktur auf der ventralen Seite, die es dem Trophozoiten ermöglicht, an das Darmepithel anzuheften und somit die pinocytotische Nahrungsaufnahme von Nährstoffen aus dem Darminhalt zu vollziehen. Zum anderen besitzt *G. lamblia* ein als Mediankörper bezeichnetes einzigartiges Mikrotubuli-Depot (KULDA & NOHYNKOVA, 1995).

A



B



C

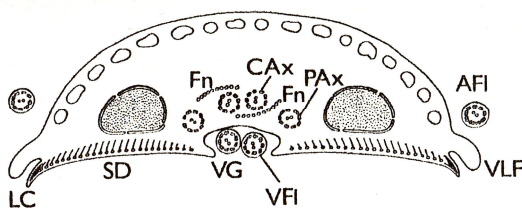


Abb. 1.3: Lichtmikroskopische Aufnahme (A) und schematische Abbildungen (B+C) eines Trophozoiten von *G. lamblia*.

A+B: Ventrale Seite des Trophozoiten. AF, anteriore Flagellen; PF, posteriore Flagellen; KF, kaudale Flagellen; VF, ventrale Flagellen; VS, ventrale Scheibe; N, Nuclei (Quelle für B, MEHLHORN & PIEKARSKI, 2002)

C: Trophozoiten-Querschnitt. LC, lateraler Kamm; SD, Mikrotubuli der ventralen Scheibe; Fn, Funis; VG, ventrale Grube; VLF, ventrolaterale Flanke; CAx/PAx, kaudale und posteriore Axonema; AFI/VFI, anteriore und ventrale Flagellen (KULDA & NOHYNKOVA, 1995)

Innerhalb seines Lebenszyklus (Abb. 1.4) macht sich der Parasit die besonderen Bedingungen des Gastrointestinaltraktes seines Wirts zu Nutze. Der Zyklus beginnt mit der oralen Aufnahme der infektiösen Zyste durch den Wirt (GILLIN *et al.*, 1996; LUJÁN *et al.*, 1997; ADAM, 2001). Der Kontakt der aufgenommenen Zyste mit dem sauren Milieu des Magens und einer hier vorhandenen sauren Phosphatase leiten die ersten Schritte der Exzystierung ein (ALEY & GILLIN, 1995). Durch die Dephosphorylierung von Proteinen in der Zystwand verändern sich die Membraneigenschaften, was zum erleichterten Aufbrechen der Zyste im Dünndarm führt (LLOYD & WALLIS, 2001). Nach dem Eintritt in den Dünndarm wird durch den dort vorherrschenden höheren pH-Wert die Teilung der Zyste in zwei vegetative Trophozoiten induziert.

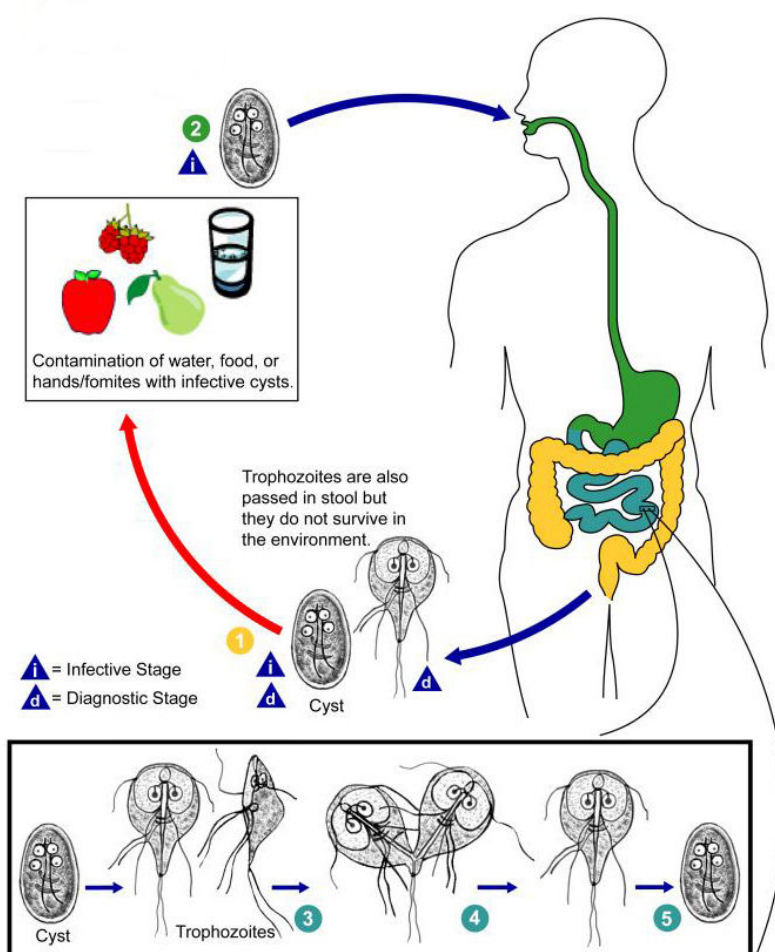


Abb. 1.4: Lebenszyklus von *G. lamblia*. ①, Zyste und Trophozoit mit dem Stuhl ausgeschieden; ②, Orale Aufnahme der Zyste und Exzystierung zu Trophozoiten im Dünndarm; ③ & ④, Vegetative Zellteilung der Trophozoiten und Besiedlung des Darms; ⑤, Enzystierung zur infektiösen Zyste im Dickdarm. Gastrointestinaltrakt: grün, Magen; blau, Dünndarm bestehend aus Zwölffinger- und Leerdarm; gelb, Dickdarm bestehend aus Blinddarm und Enddarm (www.dpd.cdc.gov)

Die freigesetzten Trophozoiten vermehren sich durch Zweiteilung und besiedeln den menschlichen Dünndarm. Hier heften sie sich entweder an das intestinale Epithel des Zwölffinger- (Duodenum) und des Leerdarms (Jejunum) oder schwimmen frei in der Darmflüssigkeit (ECKMANN & GILLIN, 2001; ELMENDORF *et al.*, 2003).

Gelangen die Trophozoiten in den Krummdarm (Ileum) wird die Enzystierung zur Zyste eingeleitet. Als Induktoren dienen dabei die hohe Konzentration an Gallensalzen, sowie das leicht alkalische Milieu des Darms (REINER *et al.*, 1993). Aber auch Cholesterin scheint unter den variablen Auslösern der Enzystierung von *G. lamblia* eine Rolle zu spielen, da ein Überschuss im unteren Teil des Dickdarms (Colon) die Gen-Transkription von Zystwandproteinen inhibiert (LUJAN *et al.*, 1997; WORGALL *et al.*, 2004). Die Enzystierung als extreme intrazelluläre Neuorganisation mit einhergehender Zystwandsynthese wird in drei Stufen unterteilt: Sie beginnt mit der Induktion der Expression von enzystierungsspezifischen Genen. Darauf folgen die intrazelluläre Synthese und der Vesikel-vermittelte Transport von Zystwand-Komponenten zu den enzystierungsspezifischen Vakuolen (ESV). In der dritten Stufe wird dann schließlich die extrazelluläre Zystwand zusammengebaut (LUJÁN *et al.*, 1997; ERLANDSEN *et al.*, 1996).

Während der Enzystierung teilen sich die beiden Zellkerne, ohne dass eine Cytokinese stattfindet, sodass die Zyste des Parasiten vier Zellkerne am anterioren Pol besitzt. Neben der ventralen Scheibe werden auch die Flagellen depolymerisiert und die erhaltenen Fragmente bis zur erneuten Exzystierung gelagert (ELMENDORF *et al.*, 2003). Nur der Mediankörper bleibt bestehen. Die reifen Zysten können aufgrund der dicken Zellwand nach Ausscheidung über den Stuhl für einige Monate im Wasser überleben und anschließend einen neuen Infektionszyklus durchlaufen.

1.3 Physiologie

Die Trophozoiten von *G. lamblia* weisen zwei asymmetrische Zellkerne mit identischem diploidem Genom auf, die sich partiell asynchron in der S- und M-Phase des Zellzyklus teilen. Die Differenz zwischen den Chromosomensätzen beider Kerne deuten dabei auf eine mögliche evolutionäre Divergenz hin (TUMOVA *et al.*, 2007). Das haploide Genom ist 12 Mb groß und besitzt einen mittleren G+C-Gehalt von 45% (FAN *et al.*, 1991; ADAM, 1991/2000). In verschiedenen Genen konnten dabei für Eukaryonten typische Introns detektiert werden (NIXON *et al.*, 2002; RUSSEL *et al.*, 2005). Anders als bei Eukaryonten üblich, fehlen den Zellkernen von *G. lamblia* jedoch erkennbare Kernkörperchen. Seinen Energiebedarf deckt *Giardia* ausschließlich über anaerobe Stoffwechselwege, da Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung fehlen (ADAM, 2001). Der Kohlenhydratabbau erfolgt über den Embden-

Meyerhof-Parnas-Weg bis zum Pyruvat, wobei eine Pyrophosphat- und nicht ATP-abhängige Phosphofruktokinase involviert ist. Die Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels variieren in Abhängigkeit von der O₂-Konzentration. In anaerober Umgebung entsteht aus Pyruvat Alanin, bei geringer O₂-Konzentration (< 25 µM) Ethanol und bei höherer O₂-Konzentration (> 46 µM) wird Pyruvat von der *Giardia*-typischen Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgewandelt. Die *de novo*-Synthese von Fettsäuren, Pyrimidinen und Purinen sowie der meisten Aminosäuren (außer Alanin und Valin) konnte für *G. lamblia* nicht festgestellt werden, sodass diese Verbindungen vom Wirt bezogen werden müssen (ADAM, 2001).

Die Trophozoiten besitzen ein endoplasmatisches Retikulum (ER), lysosomale Vakuolen, Glykogen- und ribosomale Granula und ein ausgeprägtes Cytoskelett (ADAM, 2001; ELMENDORF *et al.*, 2003). Dennoch fehlen, wie schon erwähnt, klassische eukaryotische Zellorganellen wie Peroxisomen und ein typischer Golgi-Apparat (ADAM, 2001). Es gibt jedoch verschiedene Hinweise, dass *Giardia* Organellen mit Golgi-ähnlicher Funktion besitzt (LUJAN *et al.*, 1995). Zusätzlich wird eine kontroverse Diskussion darüber geführt, ob die bei der Enzystierung auftretenden ESVs Golgi-Zisternen entsprechen (MARTI *et al.*, 2003; STEFANIC *et al.*, 2006; GOTTIG *et al.*, 2006).

Der sekundäre Verlust einiger eukaryotischer Zellmerkmale lässt sich durch die parasitäre Lebensweise des Organismus begründen (DACKS & DOOLITTLE, 2002). Diese Vermutung trifft, wie schon zuvor beschrieben, z.B. für die Mitochondrien zu (TOVAR *et al.*, 2003). Die statt dessen vorhandenen Mitosomen sind in die Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese involviert. Durch den Besitz von Eisen-Schwefel-Verbindungen und einer Doppelmembran schützen die Mitosomen die Zelle vor reaktivem Sauerstoff, da dieser die Membran nicht passieren kann (TOVAR *et al.*, 2003). Um ein Überleben von *G. lamblia* im stark degradierenden Darmmilieu zu gewährleisten, befinden sich „variable surface proteins“ (VSP) an der gesamten Oberfläche des Trophozoiten, einschließlich der ventralen Scheibe und den Flagellen (ALEY & GILLIN, 1995). Diese Proteine sind resistent gegen den Abbau durch intestinale Proteasen und weisen eine hohe Variabilität auf, da sie sich alle fünf bis dreizehn Generationen verändern (NASH, 2002). Obwohl kein konkreter giardialer Virulenzfaktor identifiziert wurde, trägt die hohe Variabilität der VSP zum Verbleib des Organismus im Wirt und somit zur Pathophysiologie von *G. lamblia* bei (ECKMANN & GILLIN, 2001).

1.4 Das giardiale Cytoskelett

Eine für höhere Eukaryonten typische Struktur ist das aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten bestehende Cytoskelett, welches sich ständig neu organisiert und somit zu den dynamischen Eigenschaften der Zelle beiträgt. Auch *G. lamblia* besitzt ein komplexes Cytoskelett, dessen Hauptbestandteil Tubulin ist (Abb. 1.5 A; ELMENDORF *et al.*, 2003). Das giardiale Mikrotubulisystem ist gut konserviert und weist alle fünf Tubulinformen sowie auch die für die Mikrotubuli-Modifikation und -Organisation benötigten Proteine auf. Im Gegensatz dazu besitzt das Genom von *G. lamblia* ausschließlich ein Aktin-Gen und keine weiteren Gene für Mikrofilament-Proteine (MORRISON *et al.*, 2007). Generell ist das Cytoskelett für die zelluläre Anheftung, die Formstabilität der Zelle, sowie für die Fortbewegung verantwortlich.

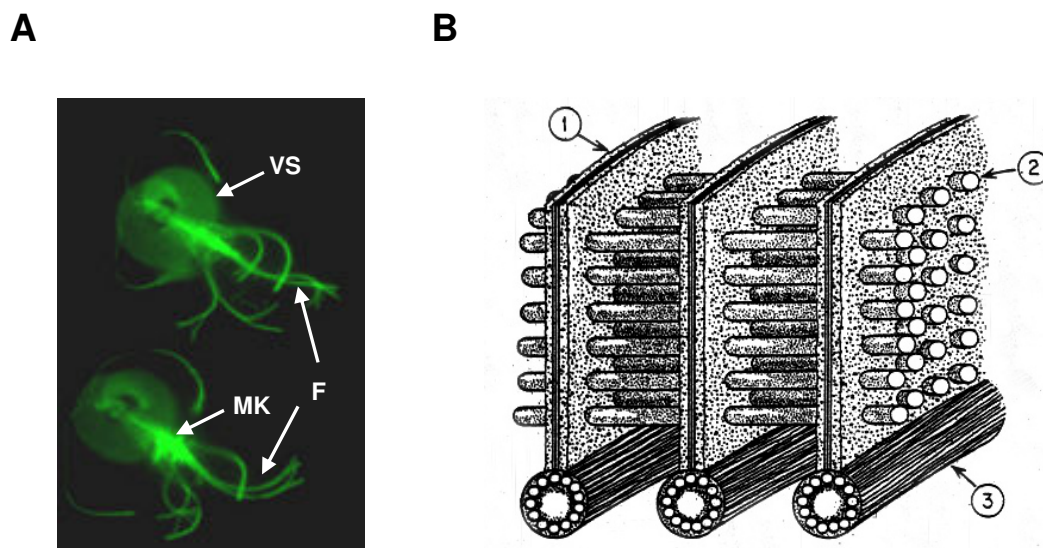


Abb. 1.5: Cytoskelett-Strukturen von *G. lamblia*. Isolierte und mit anti-Tubulin-Antikörpern markierte Cytoskelette (A). VS, ventrale Scheibe; MK, Mediankörper; F, Flagellen (VAHRMANN *et al.*, 2007). Aufbau der ventralen Scheibe (B). 1, Mikrobänder; 2, Quervernetzung; 3, Mikrotubuli (PEATTIE, 1989)

Neben dem Mediankörper und einer weiteren Struktur, der sogenannten Funis, die beide aus Mikrotubuli bestehen und mit den Axonema der kaudalen Flagellen verbunden sind, bilden die ventrale Scheibe und die acht Flagellen die Hauptbestandteile des Cytoskeletts (CAMPANATI *et al.*, 2003). Letztere weisen die für Eukaryonten Mikrotubuli-typische $(9 \times 2) + 2$ -Anordnung des Axonems auf und sind von einer Membran umgeben. Die Flagellen sind in den Basalkörpern zwischen den beiden Zellkernen fixiert, deren genaue Funktion noch unbekannt ist. Es wird jedoch vermutet, dass sie als Kontrollzentrum der Cytoskelett-Organisation während des Wachstums und der Differenzierung dienen, da sie an der Morphogenese beteiligte Signalproteine, wie Proteinkinase A, Calmodulin oder eine Phosphatase, beinhalten (MORRISON *et al.*, 2007). Weitere Lokalisationsorte für diese

Proteine stellen die Flagellen und die ventrale Scheibe dar (MORRISON *et al.*, 2007). Die auffälligste und charakteristischste Struktur des Cytoskeletts von *G. lamblia* ist die ventrale Scheibe (Abb. 1.5 B), deren Kontraktion die Anheftung des Organismus an das Darmepithel des Wirts vermittelt. Sie besteht aus Mikrotubuli, welche direkt über der ventralen Plasmamembran liegen und mit Mikrobändern verbunden sind. Die lamellären Mikrobänder erstrecken sich von der dorsalen Oberfläche jedes Mikrotubulus` aus und sind mit einem dichten Netzwerk aus Querverbindungen verknüpft (HOLBERTON, 1981; HOLBERTON & WARD, 1981). Diese tragen vermutlich mehr als die Mikrobänder zum Zusammenhalt der Ventralplatte bei (CAMPANATI *et al.*, 2003).

Die Kanten der Mikrobänder der ventralen Scheibe werden von einer Gruppe saurer Cytoskelettproteine gebildet, die als Giardine bezeichnet werden (CROSSLEY & HOLBERTON, 1985). Neben dem Vorkommen in der ventralen Scheibe wurden sie sowohl im Mediankörper als auch in den Flagellen identifiziert (CROSSLEY *et al.*, 1986; CLARK & HOLBERTON, 1988). Die 29-38 kDa großen Giardine weisen eine α -helikale Struktur auf und werden aufgrund ihres Verteilungsmusters im 2D-Gel in drei nicht homologe Gruppen, die α -, β - und γ -Giardine, unterteilt (CROSSLEY & HOLBERTON, 1983). Während die α -Giardine eine Homologie zu Annexinen aufweisen, zeigen die β -Giardine eine Verwandtschaft zu den SF-Assemblinen (FIEDLER & SIMONS, 1995; MORGAN & FERNANDEZ, 1995; WEBER *et al.*, 1993). Nur für die γ -Giardine konnte keine Ähnlichkeit zu einer bekannten Proteingruppe nachgewiesen werden (NOHRIA *et al.*, 1992). Eine mögliche Funktion der Giardine liegt wahrscheinlich in der Aufrechterhaltung der ventralen Scheibe durch direkte Interaktion mit anderen Proteinen (PEATTIE, 1990). Auch scheinen sie an der Cytoskelettdynamik während des Trophozoit-Zyst-Übergangs beteiligt zu sein (WEILAND *et al.*, 2005).

1.5 Annexine

Annexine repräsentieren eine Familie 30-70 kDa großer, cytoplasmatischer Proteine, die ubiquitär unter den Eukaryonten vertreten sind. Heute sind bereits mehr als 160 verschiedene Annexine in 65 Organismengruppen bekannt (GERKE & MOSS, 2002). Ausnahmen bilden dabei Hefen und *Entamoeba* sowie menschliche Erythrozyten, was die Frage nach dem evolutionären Ursprung der Annexine aufwirft (FIEDLER & SIMONS, 1995). Die gemeinsame biochemische Eigenschaft, die alle Annexine miteinander teilen, ist die Fähigkeit in Gegenwart von Calcium-Ionen an anionische Phospholipide künstlicher oder biologischer Membranen zu binden (SWAIRJO *et al.*, 1995; WENG *et al.*, 1993). Ihre Löslichkeit in Abwesenheit von Calcium hingegen zeigt den amphipatischen Charakter der Proteine. Die für die Assoziation benötigte Calciumkonzentration (0,1-20 μ M) hängt hierbei sowohl von

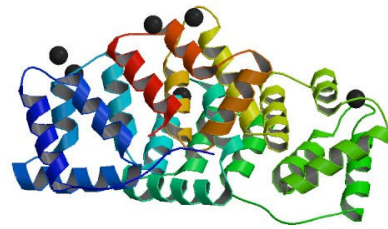
dem jeweiligen Annexin als auch von der Lipidkopfgruppe des Phospholipids ab (RAYNAL & POLLARD, 1994). Generell weisen alle Annexine topologisch einen konservierten C-terminalen Bereich, die sogenannte „core“-Domäne, auf (DÖRING *et al.*, 1995). Diese besteht typischerweise aus vier, bei Annexin A6 allerdings aus acht Wiederholungen von ca. 70 Aminosäuren, von denen jede ein 17 Reste langes Konsensusmotiv, die Endonexinfaltung, besitzt. Mit der charakteristischen GXGT{X₃₈} (D/E)-Sequenz stellt diese Faltung eine hochaffine Typ-II-Calciumbindestelle dar (FIEDLER & SIMONS 1995). Im Gegensatz zur konservierten C-terminalen Domäne (Endonexinfaltung) ist der N-Terminus in Länge und Sequenz variabel und für jeden Annexintyp einzigartig (DÖRING *et al.*, 1995). Er wird als regulatorische Domäne betrachtet, da er z.B. durch Phosphorylierungen oder Proteolyse modifiziert werden kann. Zusätzlich ist bekannt, dass er an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist (RAYNAL & POLLARD, 1994). Um den N-Terminus für eine Interaktion zugänglich zu machen, ist oftmals eine Bindung an Calcium-Ionen erforderlich, die eine Konformationsänderung des Annexins induziert. Ein Beispiel dafür stellt das humane Annexin A1 dar (ROSENGARTH & LUECKE, 2003).

Röntgenstrukturanalysen zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur verschiedener Annexine zeigten, dass die Polypeptidkette der Proteine eine konvex/konkav-Anordnung bestehend aus vier homologen Domänen einnimmt (HUBER *et al.*, 1990; LUECKE *et al.*, 1995; SWAIRJO *et al.*, 1995; FAVIER-PERRON *et al.*, 1996; PATHURI *et al.*, 2007). Jede Domäne besteht dabei aus fünf α -Helices (A-E), wovon die vier Helices A, B, D und E antiparallel orientiert sind und Helix C senkrecht zu ihnen steht (Abb. 1.6 A+B). An der konvexen Seite des Annexins, genauer gesagt in den antiparallelen Helices, befinden sich die Calciumbindestellen. Somit orientiert sich diese Seite zur Membran und kann mit dieser assoziieren (Abb. 1.6 C; SEATON, 1996; KASSAM *et al.*, 1997). Die primäre Bindestelle mit der höchsten Affinität zu Calcium ist in der interhelikalen AB-Schleife lokalisiert, welche die Calcium-umhüllende konservierte Sequenz (K/R)(G/R)XGT enthält. Zusätzlich zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen aus den Peptidbindungen wird die Bindung durch einen weiteren Carboxylsauerstoff aus der 38 Positionen entfernten Aminosäure (D/E) gestützt. Dieses Bindemotiv bezeichnet man im Gegensatz zum Typ-I-Calciumbindemotiv der EF-Hand-Proteinfamilie, wie es z.B. bei Calmodulin zu finden ist, als Typ-II-Bindemotiv. In höheren Eukaryonten enthält mindestens eine der vier Domänen diese kanonische Sequenz. Bei den sekundären Bindestellen niedrigerer Affinität (Typ-III) in der DE-Schleife wird das Calcium-Ion durch zwei Carbonyl-Sauerstoffatome, zwei Wasser- und einen Glutamatrest komplexiert (SEATON, 1996). Aufgrund der Interaktion der Carbonyl- und Carboxylgruppen des Annexins mit den Phosphatgruppen der Phospholipide kann die „core“-Domäne als Phospholipid-Bindemodul angesehen werden (SWAIRJO *et al.*, 1995; GERKE *et al.*, 2005). Dagegen beherbergt die konkave Seite des Proteins den N- und C-Terminus.

A



B



C

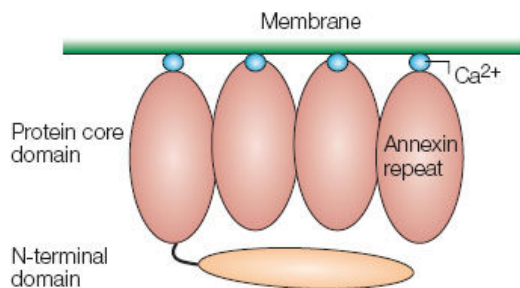


Abb. 1.6: Struktur- und Interaktionsmodell von Annexinen. (A) Humanes Annexin A5. (B) Humanes Annexin A1. Die einzelnen Domänen der Annexine mit ihren fünf α -Helices sind farblich markiert (A-B: www.pdb.org). (C) Calcium-abhängige Annexin-Membran-Interaktion (GERKE *et al.*, 2005)

Diese Seite und im speziellen der N-Terminus ist trotz Membranassoziation weiterhin für eine Wechselwirkung mit möglichen cytoplasmatischen Bindepartnern zugänglich. Durch eine Interaktion mit anderen Zellkomponenten wird die physiologische Funktion der Annexine dynamisch moduliert (GERKE & MOSS, 1997). Generell sind die Funktionen für die meisten Annexine im Einzelnen nach wie vor unbekannt, jedoch gibt es ein paar meist auf *in-vitro*-Daten beruhende Erkenntnisse über Annexine der höheren Eukaryonten (GERKE & MOSS, 2002). Zum einen vermitteln einige Annexintypen zelluläre Aspekte wie Membranverkehr und -organisation oder Vesikelaggregation bei endo- und exocytotischen Vorgängen (DRUST & CREUTZ, 1988; CREUTZ, 1992). Zum anderen inhibieren andere Annexine Membran-assoziierte Enzyme, wie die Phospholipase A2, oder beeinflussen Membran-Cytoskelett-Dynamiken (PEPINSKY *et al.*, 1986; AHN *et al.*, 1988; CHAP *et al.*, 1988; COMERA *et al.*, 1990). Dazu gehört z.B. das Annexin A2, welches mit F-Aktin interagiert und somit Cytoskelett und Plasmamembran miteinander verbindet (FILIPENKO & WAISMAN, 2001). Des Weiteren sind die Annexine A1, A2, A4, A6 und A7 Substrate von Proteinkinasen, wobei die Phosphorylierung des N-Terminus von A1 und A2 zur erhöhten, proteolytischen Sensibilisierung des A1 sowie zur Veränderung der Calcium-Affinität der Kerndomäne bei A2 führt (GERKE & MOSS,

1997/2002; GERKE *et al.*, 2005). Darüber hinaus wird eine Calcium-abhängige Ionenkanal-Aktivität als gemeinsame Eigenschaft dieser Proteinfamilie angesehen (DEMANGE *et al.*, 1994). Die Hypothese, dass die Annexine nicht-redundante biologische Funktionen ausüben, wird durch die Strukturkonservierung in allen eukaryotischen Organismengruppen gestützt (MORGAN *et al.*, 2006).

1.6 α -Giardine / Annexine in *G. lamblia*

Durch Sequenzanalysen an den kürzlich publizierten *Giardia*-Genom-Projektdateien (MCARTHUR *et al.*, 2000) konnten neben den bereits bekannten sieben α -Giardinen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 7.1$, $\alpha 7.2$, $\alpha 7.3$, $\alpha 14$) noch 14 weitere Gene identifiziert werden, die für Annexin-homologe α -Giardine kodieren (PEATTIE *et al.*, 1989; ALONSO & PEATTIE, 1992; WEILAND *et al.*, 2005; PALM *et al.*, 2003; SZKODOWSKA *et al.*, 2002). Da im Vergleich ein Mensch nur 12 Annexin-Gene besitzt und Hefe gar keine aufweist, zeigt die große Anzahl der Gene bei *Giardia* die besondere Bedeutung dieser Proteine für den Protisten. Genau wie die Annexine höherer Eukaryonten weisen die α -Giardine in *G. lamblia* eine konvex/konkav-Struktur auf (Abb. 1.7 A+B), wobei die Funktion der meisten noch weitestgehend ungeklärt ist. Generell besitzen die 21 α -Giardine eine hohe Diversität zueinander und bilden phylogenetisch gesehen zwei getrennte Zweige. 19 von ihnen bilden dabei eine große Gruppe, während das $\alpha 14$ - und das $\alpha 19$ -Giardin auf einem separaten Arm liegen (WEILAND *et al.*, 2005). Der Grund, warum das $\alpha 14$ -Giardin phylogenetisch genauso weit vom $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Giardin wie vom humanen Annexin A5 entfernt ist, liegt im Vorkommen von spezifischen Sequenzmotiven innerhalb der Primärstruktur des Proteins (Abb. 1.7 B).

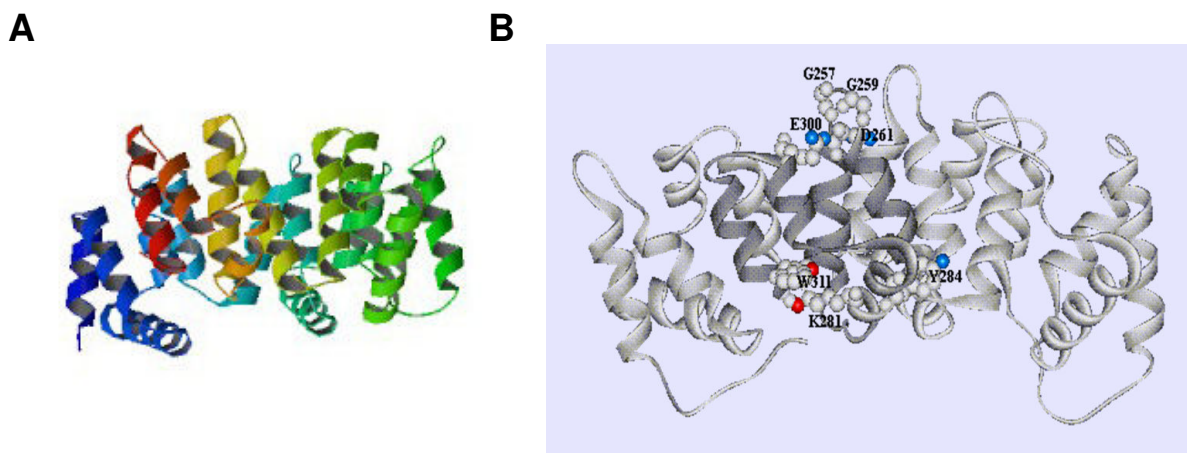


Abb. 1.7: Strukturmodelle von α -Giardinen. (A) $\alpha 11$ -Giardin. Die einzelnen Domänen mit ihren fünf α -Helices sind farblich markiert (www.pdb.org, PATHURI *et al.*, 2007). (B) $\alpha 14$ -Giardin. *Giardia*-spezifische Bindemotive an der konkaven (rot markiert), und Endonexinfaltung (blau markiert) auf der konvexen Seite des Moleküls. Die Endonexinfaltung befindet sich in der zweiten dunkelgrau gekennzeichneten Domäne (SZKODOWSKA *et al.*, 2002).

Einerseits besitzt das $\alpha 14$ wie die meisten α -Giardine *Giardia*-spezifische Motive in der vierten Annexindomäne, die den höheren Eukaryonten fehlen (Anhang 7.2). Diese liegen auf der konkaven Molekülseite und könnten wegen der Orientierung zum Cytoplasma eine Kontaktregion für cytoplasmatische Proteine darstellen (SZKODOWSKA *et al.* 2002). Andererseits weist das $\alpha 14$ an der konvexen Molekülseite neben den drei Calcium-Typ-III-Bindungsstellen (in Domänen I, II und III) eine hochaffine Endonexinfaltung (Kap. 1.5) in der zweiten Proteindomäne auf (Anhang, 7.2; SZKODOWSKA *et al.* 2002). Somit stellt das $\alpha 14$ eine Ausnahme unter den giardialen Annexinen dar, da es als einziges α -Giardin eine vollständige hochaffine Calcium-Typ-II-Bindestelle mit der kanonischen GXGTD/E-Sequenz besitzt (SZKODOWSKA *et al.* 2002).

Das Auftreten des Sequenzmotivs GKATD{37}D in der zweiten Domäne des $\alpha 19$ -Giardins, welches dem entsprechenden Calciumbindemotiv im $\alpha 14$ -Giardins sehr ähnlich ist, spiegelt die verwandtschaftliche Beziehung der beiden Giardine untereinander wider. Im Gegensatz zu allen anderen α -Giardinen zeichnet sich das $\alpha 19$ zusätzlich durch N- und C-terminale Sequenzerweiterungen aus, wobei die Konsensussequenz GCAAS am N-Terminus eine potentielle Myristoylierungsstelle am Glycin beinhaltet (Anhang 7.4; FARAZI *et al.*, 2001). Aus diesem Grund stellt das $\alpha 19$ eine Besonderheit unter den giardialen Annexinen dar.

Diese beiden, sich auf dem separaten Phylogenie-Ast befindlichen α -Giardine, stellen die Forschungsgegenstände der vorliegenden Arbeit dar.

1.7 Lipidmodifikationen von Proteinen

Neben der Glykosylierung, der proteolytische Spaltung und der Phosphorylierung stellt die Lipidmodifikation eine der wichtigsten ko- und posttranslationalen Modifikationen dar. Durch das kovalente Anhängen von Fettsäuregruppen an bestimmte Sequenzmotive durch geeignete Acyltransferasen können Proteine gerichtet zu zellulären Membranen geleitet oder in ihnen verankert werden (ROSKOSKI, 2003). Zu diesen Protein-Modifikationen zählen sowohl die ko-translationalen, N-terminale N-Myristoylierung von cytosolischen Proteinen, die Modifikation von Plasmamembran-Proteinen mit Glykosylphosphatidyl-Inositol sowie die C-terminale Isoprenylierung von cytoplasmatischen Proteinen als auch die post-translationalen Addition von Palmitinsäure an viele integrale und periphere Membranproteine (BIJLMAKERS & MARSH, 2003; RESH, 1999; CASEY *et al.*, 1996).

Bei der N-Myristoylierung handelt es sich um die irreversible Acylierung des N-terminalen Glycinrestes. Das für diese katalytische Reaktion verantwortliche Enzym ist eine N-Myristoyltransferase. Sie koppelt die 14:0-Fettsäure Myristat über eine Säureamidbindung

an das Glycin am Aminosäuremotivs MGXXXS/T (FARAZI *et al.*, 2001). Bevor es jedoch zu diesem Schritt kommen kann, muss durch eine Methionylaminopeptidase das „Start-Methionin“ des Proteins entfernt werden (TOWLER *et al.*, 1987). In der Regel erfolgt diese Modifikation bereits ko-translational, in einigen Fällen kann sie jedoch auch post-translational ablaufen (ZHA *et al.* 2000). Die N-Myristoylierung vermittelt als hydrophober „Anker“ schwache, reversible Protein-Membran- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen und gewährleistet den Transport der Proteine durch die Zelle zu ihrem Bestimmungsort (PEITZSCH & MC LAUGHLIN, 1993; MURRAY *et al.*, 1997). Eine solche Modifikation ist bereits für die Annexine A13 und Annexin A1 bekannt (TURNAY *et al.*, 2005; MORGAN & FERNANDEZ, 1997; SOLITO *et al.*, 2006). Obwohl eine Myristoylierung essentiell für eine Membranbindung ist, wird für eine stabile Membranbindung häufig ein zweites Bindesignal wie z.B. eine Palmitoylierung benötigt (RESH, 1999). Eine Sequenzanalyse des *Giardia*-Genoms hat ergeben, dass auch im Genom des Parasiten ein für eine N-Myristoyltransferase (NMT1) kodierendes offenes Leseraster existiert.

1.8 Themenschwerpunkt

Innerhalb der 21 bekannten Annexin-Homologen in *G. lamblia* (WEILAND *et al.*, 2005) gibt es zwei α -Giardine die eine Sonderstellung unter den giardialen Annexinen einnehmen und auch phylogenetisch zwischen den Annexinen des Parasiten und denen höherer Eukaryonten stehen (Kap. 1.6). Diese zwei sich auf einem separaten Phylogeniezweig befindlichen α -Giardine, α 14 und α 19, sollen in dieser Arbeit näher untersucht werden. Aus diesem Grund ist die Darstellung der Ziele in zwei verschiedene Abschnitte gegliedert.

1.8.1 Zielsetzung bei der Untersuchung des α 14-Giardins

Das α 14-Giardin, welches, wie schon in Kapitel 1.6 erwähnt, als einziges α -Giardin eine vollständige Endonexinfaltung besitzt, weist neben der für Annexine charakteristischen Calcium-abhängigen Bindung an Phospholipide auch eine Assoziation an Detergenz-unlöslichen Cytoskelettkomponenten auf (SZKODOWSKA *et al.* 2002). Aufgrund dieser Fähigkeiten und seiner exklusiven Lokalisierung in allen Flagellen und dem Mediankörper der Trophozoiten von *G. lamblia* (SZKODOWSKA *et al.* 2002) ist es möglich, dass α 14-Giardin eine Calcium-gesteuerte Mittlerrolle zwischen den mikrotubulären Strukturen der Flagellen und der sie umgebenden Plasmamembran einnimmt. Somit könnte dieses α -Giardin indirekt zur Beweglichkeit der Flagellen und letztendlich des ganzen Parasiten beitragen. Um diese Hypothese zu bestätigen und um eine Beziehung zwischen den molekularen Eigenschaften des α 14-Giardins und seiner physiologischen Rolle herstellen zu können, ist es erforderlich, die Bindepartner von α 14 zu identifizieren. Vor diesem Hintergrund sollte die Suche nach

direkten Interaktionspartnern mit Hilfe von immobilisiertem $\alpha 14$ durchgeführt werden. Nach massenspektrometrischer Identifizierung der möglichen Bindepartner sollten einerseits mittels des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems diese potentiellen Wechselwirkungen überprüft werden, andererseits die Proteine heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) produziert werden. Mit den aufgereinigten rekombinanten Proteinen sollten anschließend polyklonale Antikörper hergestellt werden, um durch immunocytoologische Untersuchungen die Wechselwirkung der möglichen Partner in der Zelle und *in vitro* nachzuweisen. Die Identifizierung einer bestehenden Interaktion könnten somit Hinweise auf die physiologische Relevanz und Funktion des $\alpha 14$ zulassen

1.8.2 Zielsetzung bei der Untersuchung des $\alpha 19$ -Giardins

Durch seine einzigartige N-terminale Extension mit dem Erkennungsmotiv für eine Acylierung mit einem Myristoylrest nimmt das $\alpha 19$ eine Sonderstellung unter den giardialen Annexinen ein (Kap. 1.6). Außer den Sequenzinformationen war in der Literatur nichts Weiterführendes über das Protein bekannt. Somit bestand das Primärziel der Untersuchungen an diesem Protein in dem Nachweis und der subzellulären Lokalisierung von $\alpha 19$ in den Trophozoiten von *G. lamblia* und einer ersten biochemischen Charakterisierung. Dafür sollte mittels Klonierung und heterologer Expression in *E. coli* das rekombinante Protein hergestellt und für die Produktion von polyklonalen Antikörpern eingesetzt werden. Dieser sollte für immunocytochemische Lokalisierungsstudien in den Trophozoiten eingesetzt werden. Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob das $\alpha 19$ einen typischen Annexin-Charakter aufweist und Calcium-abhängig an künstliche Phospholipide bindet. Wenn der N-Terminus des $\alpha 19$ -Giardins tatsächlich mit Fettsäuren modifiziert wird, könnte diese Modifikation eine zielgerichtete Membranassoziation ermöglichen und vielleicht eine Verbindung von Membran und Cytoskelett vermitteln. Aus diesem Grund sollten erste Untersuchungen zur Klärung der Frage nach einer potentiellen Fettsäure-Modifikation durchgeführt werden. Durch eine umfangreiche biochemische Charakterisierung wären somit Rückschlüsse auf die mögliche Funktion des Proteins innerhalb des Organismus denkbar.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Falls nicht gesondert aufgeführt, wurden alle verwendeten Chemikalien (in Reinheitsstufe *pro analysis*) und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Apollo Scientific (Stockport, England), AppliChem (Darmstadt), Amersham Bioscience (Freiburg), Beckman Coulter Inc. (Fullerton, USA) Biochrom (Berlin), Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Brand (Wertheim), Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, France), Dianova (Hamburg), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare Europe GmbH (München), Gibco Life Technologies (Eggenheim), Invitrogen (Paisley, UK), Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA) MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Menzel (Braunschweig), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), MWG-Biotech (Ebersberg), Novagen (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), PAN Biotech (Aidenbach), Pierce (Rockford, USA) bzw. Perbio Science (Bonn), Plano GmbH (Wetzlar), Polysciences (Warrington, USA) Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden), Riedel de Haen (Seelze), Roche Applied Science (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Schott (Mainz), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), TPP (Trasadingen, Schweiz) und Whatman (Dassel).

2.2 Medien und Puffer

Alkylating Solution: 54 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5

Binde-Puffer (8-fach): 40 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris/HCl, pH 7,9

BRADFORD-Reagenz: 0,5% Coomassie Brilliant-Blue G250 in 10 ml Ethanol, 14,88% *ortho*-Phosphorsäure auf 1 l H_2O *bideest.*

Charge-Puffer (8-fach): 400 mM NiSO_4

Carbonat-Extraktionspuffer: 500 μl 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 500 μl frisch angesetztem 200 mM Na_2CO_3 , 1 x „Pic“

Destaining Solution: 30% Acetonitril in 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5

Dialyse-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, pH 7,0

Digestion Buffer: 5% Acetonitril in 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5

Dilution Buffer: 100 mM Tris, 1 mM CaCl_2 , pH 8,5

Dropout-Lösung (10-fach): 200 mg/l L-Adenin-hemisulfat, 200 mg/l L-Arginin HCl, 200 mg/l L-Histidin HCl-monohydrat, 300 mg/l L-Isoleucin, 1000 mg/l L-Leucin, 300 mg/l L-Lysin HCl, 200 mg/l L-Methionin, 500 mg/l L-Phenylalanin, 2000 mg/l L-Threonin, 200 mg/l

L-Tryptophan, 300 mg/l L-Tyrosin, 200 mg/l L-Uracil, 1500 mg/l L-Valin; je nach Dropout-Lösung, entsprechende Aminosäuren weglassen

DTT-Lösung: 0,1 M Tris/HCl pH 9,4, 10 mM DTT

Einfriermedium für *G. lamblia*: 10% DMSO, 3% Saccharose in TYI-S-33 Medium (+ Serum + Antibiotika)

Elutions-Puffer (4-fach): 2 M NaCl, 800 mM Tris/HCl, pH 7,9

SDS-Entfärbelösung: 10% Eisessig, 30% Methanol in H₂O_{bidest.}

Harnstoff-Extraktionspuffer: 6 M Harnstoff, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 und 1 x „Pic“

HS-TBS: 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH6,5

HS-Elutionspuffer: 10 mM Tris/HCl, 1M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH6,5

Kopplungs-Puffer für CNBr-Sepharose: 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, (15 g Agar für Festmedium) pro 1 l H₂O_{bidest.}, pH 7,0, autoklavieren

LiAc (10-fach): 1 M LiAc in H₂O_{bidest}

Lysispuffer: 0,5% (w/v) Tween-20, 10% (v/v) Glycerin in TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6)

NaCl-Extraktionspuffer: 1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, und 1 x „Pic“

NET-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Nonidet, 0,1% (v/v) Rinderserum, 0,25% (w/v) Gelatine, pH 7,5

PBSII: 85 g NaCl, 11,5 g Na₂HPO₄ * 2H₂O, pH 6,8

PBSVIII: 150 mM NaCl, 7,5 mM KH₂PO₄, 20 mM K₂HPO₄, pH 6,8

PEG/LiAc-Lösung: 8 Vol. 50% PEG 3350, 1 Vol. 10-fach TE, 1 Vol. 10-fach LiAc

Phosphatase-Inhibitoren Mix : 10 mM NaF, 10 mM NaN₃, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 10 mM Tetrasodiumpyrophosphat, 10 mM β-Glycerophosphat

„Pic“ (1-fach): 1 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid, 1 mM Benzamidin und 10 µg/ml Pepstatin

Ponceau S Solution: 0,2% Ponceau S Solution in 3% TCA

Probenpuffer (2-fach): 125 mM Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (v/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin, pro 5 ml H₂O_{bidest.}, pH 6,8

Probenpuffer (5-fach): 500 mM Tris/HCl, 25% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 25% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

Proteaseinhibitoren: 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), 10 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Pepstatin

Puffer A: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, versetzt je nach Bedarf mit Protease-Inhibitoren (5 µg/ml E-64, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin) oder mit Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 (in 10 mM DMSO, Sigma-Aldrich, München)

Puffer A_L: 20 mM Hepes, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, pH 7,4

Puffer B: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT

Puffer C: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM EGTA, 1 mM DTT

Reducing Solution: 10 mM in 100 mM NH₄HCO₃, pH 8,5

SDS-Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, 8 mM EDTA, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8

SD-Medium: 6,7 g Hefeextrakt ohne Aminosäuren, 7 g Glucose (+ 20 g Agar für Festmedium) pro 1 l H₂O_{bidest.}, pH 5,8 einstellen und autoklavieren, nach Abkühlen 100 ml des gewünschten Dropout-Mediums (und nach Bedarf 2 ml einer 20 mg/ml Stocklösung X-α-Gal) für die spätere Selektion der Hefen zugeben.

SDS-Gel-Elektrodenpuffer (10-fach): 0,05 M Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, 384 mM Glycin, pH 8,5 einstellen

SDS-Gel-Färbelösung: 40 ml Stammlösung II, 10 ml Methanol, 1 ml 5% (w/v) Coomassie Brilliant-Blue G250

Stammlösung II: 2% (v/v) Phosphorsäure 85%-ige, 10% (w/v) Ammoniumsulfat

TBE-Ladepuffer (5-fach): 5% (v/v) Glycerin, 0,04% (v/v) Bromphenolblau, 0,04% (w/v) XylenCyanolFF in 1-fach TBE-Puffer

TBE-Puffer (10-fach): 90 mM Tris/HCl, pH 8,0, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA

TBS-Puffer: 20 mM Tris/ HCl, 150 mM NaCl, pH 6,8

TE (1-fach)/ LiAc (1-fach): 1:1 TE (aus 10-fach Stocklösung) und LiAc (aus 10-fach Stocklösung) in H₂O_{bidest}

TEDAMP: 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM MgSO₄, 150 mM KCl, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 8,3

TE-Puffer (10-fach): 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklavieren

TFB1-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8, sterilfiltrieren

TFB2-Puffer: 10 mM Na-MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 7,0, sterilfiltrieren

TMSK-Puffer (10-fach): 300 mM Tris, 25 mM MgSO₄, 2 M Saccharose, 250 mM KCl, 10 μM E-64, 0,05 (w/v) PMSF, pH 7,4

SDS-Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, 8 mM EDTA, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8

Tris/DTT-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 27,5 mM MgCl, 0,5 mM DTT, pH 7,5

Triton-Extraktionspuffer 100 μl PBSVIII-Puffer + 1% Triton X-100 und 1-fach Pic

Trypsin Digest Solution: 0,01 mg/ml Trypsin (aus Stocklösung) in Digest Buffer

Trypsin Stocklösung: 0,25 mg/ml in 25 mM in NH₄HCO₃

TYI-S-33 Medium: 4 g NaCl, 1,2 g KH₂PO₄, 2,0 g K₂HPO₄, 40 g Trypticase, 20 g Hefeextrakt, 20 g Glucose, 0,092 g Ammonium-Fe(III)-Citrat, 4 g Cystein-HCl, 4,2 g Arginin-HCl, 0,4 g Ascorbinsäure, 1,04 g Galle (Bile, separat in 10 ml 1 M NaOH lösen) pro 2 l H₂O_{bidest.}, pH 6,8,

autoklavieren; supplementieren mit 70 ml inaktiviertem Rinderserum (Pan Systems), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin pro 500 ml vor Gebrauch.

Wasch-Puffer (8-fach): 480 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris/HCl, pH 7,9

WB-TBS-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 0,9% (w/v) NaCl, pH 7,5

Western Blot-Entwicklerlösung: 3 mg 4-Chloro-1-Naphthol (in 1 ml Methanol), 4 ml WB-TBS-Puffer, 5 µl H₂O₂

Western Blot-Transferpuffer: 10 mM CAPS/NaOH, pH 11,0, in 10% (v/v) Methanol

YPDA (0,5-fach): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt pro 1 l H₂O_{bidest.}, pH 5,8. Nach dem Autoklavieren 25 ml einer sterilen 40%-igen Glucoselösung und 7,5 ml einer sterilen 0,2%-igen Adeninhemisulfatlösung nach Abkühlen zugeben

YPDA (2-fach): 40 g Pepton, 20 g Hefeextrakt pro 1 l H₂O_{bidest.}, pH 5,8. Nach dem Autoklavieren 100 ml einer sterilen 40%-igen Glucoselösung und 30 ml einer sterilen 0,2%-igen Adeninhemisulfatlösung nach Abkühlen zugeben

YPDA-Medium: YPD-Medium + 15 ml einer sterilen 0,2%-igen Adeninhemisulfatlösung, zugegeben nach autoklavieren

YPD-Medium: 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, (20 g Agar für Festmedium) pro 1 l H₂O_{bidest.}, pH 5,8. Nach dem Autoklavieren 50 ml einer sterilfiltrierten 40%-igen Glucoselösung nach Abkühlen dazugeben

Zur Herstellung von Selektionsmedien wurden je nach Resistenz der verwendeten Stämme die entsprechenden Antibiotika zum jeweiligen Nährmedium hinzugefügt (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung*	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in 50% Ethanol	200 µg/ml
Kanamycin (Kan)	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	200 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	5 mg/ml in 50% Ethanol	10 µg/ml
Penicillin (Pen)	10000 U/ml in PBSII	100 U/ml
Streptomycin (Strep)	10 g/ml in PBSII	100 mg/ml

* Lagerung bei – 20 °C

2.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.2 zeigt die für die immuncytologischen Untersuchungen verwendeten Antikörper in den bei „Western Blot“-Analysen (1.) und Fluoreszenzmikroskopie (2.) eingesetzten Konzentrationen.

Tabelle 2.2: Primäre und sekundäre Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Mouse anti-Penta-His Antibody (Qiagen)	1:2.000	Peroxidase-conjugated IgG (H+L) anti-Mouse developed in Goat (Biomol)	1:2.000
anti-HA High Affinity Rat Monoclonal Antibody (clone 3F10) (Roche)	1:1.000	anti-Rat IgG (whole molecule) Peroxidase-conjugated developed in Rabbit (Sigma-Aldrich)	1:5.000
anti-c-Myc Mouse Monoclonal Antibody (clone 9E10) IgG ₁ , κ (Sima-Aldrich)	1:1.000	Peroxidase-conjugated IgG (H+L) anti-Mouse developed in Goat (Biomol)	1:2.000
Monoclonal anti-acetylated Tubulin clone 6-11B-1 Mouse Ascit Fluid (Sigma-Aldrich)	1:2.000-5.000 1:1.000	1. Peroxidase-conjugated IgG (H+L) anti-Mouse developed in Goat (Biomol) 2. Cy TM 2-conjugated AffiniPure Goat-anti-Mouse F(ab') ₂ (Dianova)	1:2.000 1:100
anti-AnxE3 (HAUPTMANN, 1999)	1:10.000	Immunopure® Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (Fc) (Pierce)	1:20.000
anti-AnxE2 (BAUER <i>et al.</i> , 1999)	1:10.000	Immunopure® Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (Fc) (Pierce)	1:20.000
anti-Proteasom (β3-UE, EMMERLICH <i>et al.</i> , 1999)	1:1000	Immunopure® Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (Fc) (Pierce)	1:20.000
anti-α14 (LINKE, 2000)	1:10.000 1:500-1.000	1. Immunopure® Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (Fc) (Pierce) 2. anti-Rabbit IgG Cy TM 3-conjugated Antibody developed in Sheep (F ab') ₂ (Sigma-Aldrich)	1:20.000 1:100
anti-α19-Giardin (KELLERSMANN, 2007)	1:10.000-1.000.000 1.500-1.000	1. Immunopure® Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (Fc) (Pierce) 2. anti-Rabbit IgG Cy TM 3-conjugated Antibody developed in Sheep (F ab') ₂ (Sigma-Aldrich)	1:20.000 1:100
anti-α7.3-Giardin (diese Arbeit)	1:100-1:1.000 1:100	1. anti-Guinea Pig IgG (whole molecule) Peroxidase-conjugated developed in Rabbit (Sigma-Aldrich) 2. AlexaFluor®488 Goat-Anti-Guinea pig IgG (H+L), (Molecular Probes)	1:5.000 1:500
anti-STK (diese Arbeit)	1:1.000 1:100	1. anti-Rat IgG (whole molecule) Peroxidase-conjugated developed in Rabbit (Sigma-Aldrich) 2. AlexaFluor® 568 Goat-Anti-Rat IgG (H+L), (Molecular Probes)	1:5.000 1:500
anti-Ank (diese Arbeit)	1:100-1.000 1:100	1. Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey anti-Chicken IgY ⁺⁺ (IgG, H+L) (Dianova) 2. Cy TM 2-conjugated AffiniPure Donkey-anti-Chicken F (ab') ₂ (Dianova)	1:2.000 1.100

CyTM2: Amax, 492 nm; Emax, 510 nm. CyTM3: Amax, 552 nm; Emax, 565 nm. AlexaFluor® 488: Amax, 496nm; Emax, 518nm. AlexaFluor® 568: Amax, 581nm; Emax, 601nm.

2.4 Zellkultur von *Giardia lamblia*

Für Untersuchungen am parasitären Protozoon *Giardia lamblia* wurden Trophozoiten des Stammes WB (clone C6, American Type Culture Collection, ATCC Nr. 50803) herangezogen.

2.4.1 Kulturbedingungen und Stammerhaltung von *G. lamblia*

Die Anzucht der *G. lamblia*-Zellen erfolgte in axenischer Kultur im modifizierten TYI-S-33 Medium (Trypticase, Yeast, Iron-Serum) nach KEISTER (1983) unter Zusatz von Penicillin, Streptomycin und 5 mM Arginin (EDWARDS *et al.*, 1992). Die Trophozoiten von *G. lamblia* wurden in 25 cm² Kulturgefäßen (TPP, Trasadingen, Schweiz) oder 10 ml Gewebekultur-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) anaerob bei 36,5°C kultiviert und nach 3-4 Tagen in frisches Medium überimpft. Hierzu wurden die adhärennten Zellen mittels Kälteschock von der Gefäßwand gelöst, anschließend kurz geschüttelt und ca. 1 ml (10⁵ Zellen) bzw. 0,3 ml (3,3 * 10³ Zellen) in ein neues Kulturgefäß überführt.

2.4.2 Ernte und Aufschluss der Trophozoiten zur Herstellung von *G. lamblia*-Extrakt

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (ca. 3-4 Tage nach dem Animpfen) wurden die Trophozoiten von *G. lamblia* mittels 10-minütiger Eisinkubation von der Kulturgefäßwand abgelöst. Darauffolgend wurden die 50 ml Zellsuspension 10 min bei 500 x *g* und 4°C zentrifugiert und die pelletierten Zellen anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Aus 1 l Zellkultur konnten ca. 1,4 g Zellen geerntet werden, wobei 1 g ca. 1,6 x 10⁹ Zellen entsprachen. Schließlich wurden die Zellen in 300 µl TBS mit 1 µl E-64 (10 mM in DMSO) pro Gramm Zellen resuspendiert und 3 x 1 min (20 kHz, Branson Sonifier 250, Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) aufgeschlossen. Nach Bedarf konnten vor dem Aufschluss auch andere Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin) oder ein Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 (in 10 mM DMSO, Sigma-Aldrich (München) zu den Zellen hinzugefügt werden. Das Zellhomogenat wurde für 35 min bei 100.000 x *g* und 4°C zentrifugiert („Optima™ Max Ultracentrifuge“, Beckmann Coulter, Fullerton, USA), um unlösliche Membranbestandteile abzutrennen. Der erhaltene Überstand der Zentrifugation bildete die lösliche Fraktion des Rohextraktes. Das Pellet wurde in 100 µl TBS resuspendiert und stellte die unlösliche Membranfraktion des Extraktes dar. Beide Fraktionen wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.3 Kryokonservierung von *G. lamblia*-Zellen

Zum Einfrieren von *G. lamblia* wurde ein Zell-„Monolayer“ aus 50 ml Kulturansatz (5×10^6 Zellen) in 5 ml Einfriermedium resuspendiert und 30 min bei RT äquilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Brand, Wertheim) überführt, schrittweise heruntergekühlt (je 1 h bei RT, 16°C, 4°C, 0°C, -20°C) und üN bei -80°C aufbewahrt. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C. Je ein Aliquot wurde in einer 25 cm² Kulturflasche aufgenommen. Nach Anheftung der Zellen (etwa 24 h) wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen, um das DMSO aus der Zellkultur zu entfernen. Die weitere Kultivierung ist in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Bakterienstämme

Die hier verwendeten *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*) sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Zur Vermehrung von Plasmidvektoren wurden ausschließlich die *E. coli*-Stämme XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA) und DH5 α (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet, wohingegen die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Heidelberg), BL21 *Rosetta* (DE3) (Novagen, Heidelberg) und BL21 (DE3) [pAPlacIQ] (zur Verfügung gestellt von Joachim Clos, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) zur heterologen Expression im bakteriellen System dienen.

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i>-Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i>	BULLOCK <i>et al.</i> (1987)
DH5 α	<i>F', Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻ m_k⁻), deoR, thi-1, supE44, λ-gyrA96, relA1</i>	HANAHAN (1983)
BL21 (DE3) pLysS	<i>F', ompT, r⁻, m⁻, Clm^r</i>	STUDIER <i>et al.</i> (1986,1990, 1991)
BL21 (DE3) [pAPlacIQ]	<i>F', ompT, r⁻, m⁻, Km^r</i>	HELLBERG <i>et al.</i> (2002)
BL21 <i>Rosetta</i> (DE3)	<i>F' ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) λ(DE3) pRARE(Cm^R)</i>	Novagen, Heidelberg

2.5.2 Anzucht und Stammerhaltung von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden über Nacht (üN) unter aeroben Bedingungen bei 37°C in (SAMBROOK *et al.*, 1989) oder LB-Flüssigmedium oder auf Agarplatten angezogen. Das Medium wurde vor Gebrauch 30 min bei 120°C autoklaviert. Durch Zugabe der entsprechenden, sterilfiltrierten Antibiotika wurden geeignete Selektionsmedien hergestellt (Tab. 2.1). Zur Stammerhaltung der Bakterienklone wurde eine üN-Flüssigkultur mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.5.3 Plasmide

In der folgenden Tabelle 2.4 sind sowohl die zur Klonierung und heterologen Expression herangezogenen Ausgangsvektoren als auch die im Rahmen dieser Arbeit oder früheren Arbeiten hergestellten Plasmidkonstrukte aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren

Vektoren	Resistenz/ Charakteristika	Referenz
pBlueskript SK (pBSK)	Amp ^r , Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pET16b	Amp ^r , Expressionsvektor	Novagen, Heidelberg
pJC45	Amp ^r , Expressionsvektor	CLOS & BRANDAU (1994), SCHLÜTER <i>et al.</i> , (2000); zur Verfügung gestellt von Joachim Clos
pBSK- α 7.3	α 7.3-Giardin-Gensequenz (901 bp) in pBSK	Diese Arbeit
pET16b- α 7.3	α 7.3-Giardin-Gensequenz (901 bp) in pET16b	Diese Arbeit
pBSK-STK	Sequenzbereich der Kinasedomäne der Ser/Thr-Kinase, AS10-280 (913 bp) in pBSK	Diese Arbeit
pET16b-STK	Sequenzbereich der Kinasedomäne der Ser/Thr-Kinase, AS10-280 (913 bp) in pET16b	Diese Arbeit
pET16b- α 14 _{Δ314-337}	C-terminal verkürztes α 14-Giardin-Genfragment (939 bp) in pET16b	KIELMANN (2002)
pJC45-Ank	Sequenzbereich der Ankyrindomäne der Ser/Thr-Kinase, AS 508-676 (688 bp) in pJC45	LUDWIG (2005)
pJC45- α 19 _{Δ1-15}	N-terminal verkürztes α 19-Giardin-Genfragment (1269 bp) in pJC45	KELLERSMANN (2007)

Kan^r/Amp^r, Plasmidcodierte Kanamycin-/Ampicillinresistenz; AS, Aminosäuren, Bp = Basenpaare

2.5.4 Oligonukleotid-Primer

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.5.8) sowie für die DNA-Sequenzierung (Kap. 2.5.19) eingesetzt. Wie Tabelle 2.5 zeigt, handelt es sich dabei entweder um standardisierte (T7-Promotor/Terminator) Primer, die nahe der „multiple cloning site“ (MCS) des Expressionsvektors banden, oder um anhand der Gensequenz synthetisierte Primer mit spezifischen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Diese wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt.

Tabelle 2.5: Verwendete Primer. Restriktionsschnittstellen gelb: *NdeI*, hellblau: *EcoRI*, grün: *BamHI*, grau: *HindIII*, rot *SmaI*.

Primer	Basensequenz	Referenz
α7.3 vorne	5' –AGCTCGGCAAATTA CATATG GCTGCGGCAAAG– 3'	Diese Arbeit
α7.3 hinten	5' –GCAGCC GGATCC TTACATGACGTGCCAGAG– 3'	Diese Arbeit
STK vorne	5' –AAGGCTACCGCTTC CATATG ACTTTGGCG– 3'	Diese Arbeit
STK hinten	5' –GGCGAGGACCGG GGATCC GTTGGACACAGG– 3'	Diese Arbeit
α14 vorne	5' –GTTTTGTGACA CATATG AGTAAAATGGC– 3'	KIELMANN (2002)
α14 hinten	5' –ACG GGATCC GGTTCCTCCAAAGGAGTTTAATC– 3'	KIELMANN (2002)
Ank vorne	5' –GAGGTAGTCC CATATG ATTCCCACACCACTG– 3'	LUDWIG (2005)
Ank hinten	5' –GAGGATCCTGAT GAATTC CTCCTTCTTGA– 3'	LUDWIG (2005)
β-Tubulin vorne	5' –GCCGGCGCCGATTTA CATATG CGTGAGATCGTC– 3'	WELLING (2007)
β-Tubulin hinten	5' –CTCGTCGCC GAATTC CTCCTCCTCCTCGAACTC– 3'	WELLING (2007)
α19 _{Δ1-15} vorne	5' –GCTGATGCCAAGCTT GAATTC GTAATGGGAAACCAC– 3'	KELLERSMANN (2007)
α19 _{Δ1-15} hinten	5' –GTCCATCGAGTT CCCGGG TCAGTCGCCGCG– 3'	KELLERSMANN (2007)
T7-Promotor	5' –ATTTAGGTGACACTATGG– 3'	MWG-Biotech
T7-Terminator	5' –GCTAGTTATTGCTCAGCGG– 3'	MWG-Biotech
T3-Promotor	5' –AATTAACCCTCACTAAAGGG– 3'	MWG-Biotech

2.5.5 Isolierung genomischer DNA aus *G. lamblia* durch Elu-Quick

Die Isolierung genomischer DNA aus *G. lamblia* erfolgte durch das „Elu-Quick® DNA purification Kit“ von Whatman (Dassel) nach Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden ca. 5×10^6 Zellen, wobei die DNA am Ende der Präparation in $2 \times 10 \mu\text{l H}_2\text{O}_{bidest.}$ aufgenommen

wurde (ca. 1 µg/µl). Anschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration bei 260 nm und 280 nm (Kap. 2.5.13).

2.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus *G. lambia*

Die Gesamt-RNA aus 5×10^6 Zellen (50 ml Zellkultur) wurde mit Hilfe des TRIzol[®]-Reagenz nach Angaben des Herstellers (Gibco BRL, USA bzw. Invitrogen, Paisley, UK) isoliert (CHOMCZYNSKI, 1993; CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Die Bestimmung der quantitativen RNA-Ausbeute wurde mittels einer OD-Messung bei 260 nm durchgeführt (Kap. 2.5.13).

2.5.7 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Die cDNA-Erststrangsynthese beruht auf dem Prinzip der Standard-PCR, jedoch wird bei dieser Methode Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt. Die mRNA aus dem RNA-Gemisch wird dabei durch eine reverse Transkriptase in cDNA „zurückgeschrieben“. Als Primer für die cDNA-Herstellung dient meist ein Gemisch aus Oligonukleotiden, das unspezifisch bindet und somit eine cDNA-Synthese der gesamten mRNA ermöglicht. Die Herstellung erfolgte nach Angaben von Invitrogen (Paisley, UK) unter Benutzung des Enzyms *SuperScript II Reverse Transcriptase* (HOUTS *et al.*, 1979). Die cDNA wurde anschließend für PCR-Reaktionen (Kap. 2.5.8) eingesetzt.

2.5.8 DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, **p**olymerase **c**hain **r**eaction) ist eine *in-vitro*-Methode zur exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen mittels hitzestabiler DNA-abhängiger DNA-Polymerasen (SAIKI *et al.*, 1987). Ausgehend von einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize dienen zwei spezifische Oligonukleotide entgegengesetzter Orientierung der Polymerase als Primerpaare. Diese hybridisieren jeweils an einen der beiden DNA-Stränge, sodass die DNA-Sequenz zwischen ihnen gezielt angereichert wird und neue komplementäre DNA-Stränge entstehen.

Die PCR wurde mit je 45 Zyklen in dem Thermocycler „Eppendorf Mastercycler personal“ (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, wobei genomische DNA aus *G. lambia*, cDNA (RT-PCR, Kap. 2.5.9) oder Zellmaterial aus Bakterienkolonien (Kolonie-PCR, Kap. 2.5.10) als Matrizen verwendet wurden. Als Polymerase diente die *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) aus *Pyrococcus furiosus*, die eine 3'→5'-„proof reading“-Exonukleaseaktivität

besitzt. Die anhand der bekannten Gensequenzen von *G. lamblia* entsprechend synthetisierten homologen Primer (siehe Tab. 2.5) wurden für die Amplifikation der entsprechenden Gensequenzen in einer Konzentration von 5 pmol eingesetzt.

<u>PCR-Ansatz</u>		<u>PCR-Zyklus</u>	
1 µl	Primer forw. (5 pmol)	<u>94°C</u>	→ 10 min
1 µl	Primer rev. (5 pmol)	55/60°C	→ 1 min
2 µl	dNTPs (2 mM)	72°C	→ 1 min 45 Zyklen
1 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2-4 U)	<u>94°C</u>	→ 1 min
2 µl	<i>Pfu</i> -Puffer (10 x)	72°C	→ 5 min
1 µg	DNA	Abkühlen auf 4°C	
ad 20 µl	H ₂ O _{bidest.}		

2.5.9 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Eine PCR im Anschluss an eine reverse Transkription wird Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) genannt und dient z.B. dem Expressionsnachweis von Proteinen. Wie schon in Kapitel 2.5.7 erwähnt, wird bei der Erststrangsynthese von cDNA die mRNA aus dem Pool der gesamten isolierte RNA transkribiert. Wird diese cDNA (1 µg) nun als Matrize für eine PCR eingesetzt und ein PCR-Produkt unter Einsatz der spezifischen Primer gebildet, ist dies eine Bestätigung der Expression des Proteins im Organismus. RT-PCR-Ansatz und –Zyklus wurden wie in Kapitel 2.5.8 durchgeführt.

2.5.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist ein schnelles Nachweisverfahren für eine positive Transformation eines rekombinanten Plasmids in einen Bakterienstamm. Hierbei dient nicht isolierte DNA als Matrize für die PCR, sondern komplette Zellen einer Bakterienkultur. Bei dieser Kolonie-PCR wurden Transformanten von einer Agarplatte gepickt und in den 50 µl H₂O_{bidest.} resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden zum Animpfen einer 5 ml Übernachtskultur zur Kolonieerhaltung entnommen, die verbleibenden 30 µl wurden 5 min bei 95°C gekocht und danach 2 min bei 14.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand enthielt das DNA-Template

für die anschließende PCR. PCR-Ansatz und –Zyklus wurde wie in Kapitel 2.5.8 durchgeführt.

2.5.11 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer Ladung und Größe im elektrischen Feld bei konstanter Spannung (120 V) in horizontalen Elektrophorese-Apparaturen aufgetrennt. DNA ist innerhalb eines großen pH-Bereiches negativ geladen, was auf die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren zurückzuführen ist. Durch diese negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die DNA-Fragmente zur Anode, wobei sie durch die Polymermatrix der Agarose aufgetrennt werden. Kleine Fragmente erfahren dabei aufgrund ihrer größeren Beweglichkeit eine höhere Laufgeschwindigkeit als große Fragmente. Um DNA-Fragmente elektrophoretisch aufzutrennen, wurden TBE-Gele nach SAMBROOK *et al.* (1989) verwendet. Hierfür wurde 0,75-1,4 g Agarose in 100 ml 1-fach TBE-Puffer aufgeköcht, unter Rühren abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Mittels Ethidiumbromid konnte die DNA im UV-Licht ($\lambda=230$ nm) sichtbar gemacht werden, da sich dieses an die Doppelhelix der DNA lagerte und bei Bestrahlung der Nukleinsäuren im UV-Licht orange fluoreszierte. Die DNA wurde mit Hilfe eines 5-fach konzentrierten Ladepuffers auf das Agarosegel aufgetragen. Dieser diente aufgrund des enthaltenen Glycerins einerseits zum Beschweren der DNA und konnte andererseits den Lauf der Proben im Gel durch die Farbstoffe Bromphenolblau und XylenCyanolFF sichtbar machen. Zur Bestimmung der Größen der DNA-Fragmente wurde λ -DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, welche zuvor mit dem Restriktionsenzym *Pst*I in Fragmente definierter Größen (150-11.000 bp) geschnitten worden war.

2.5.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach Auftrennung der DNA durch Elektrophorese wurden ausgewählte Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=230$ nm) ausgeschnitten. Die Isolierung dieser DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde unter Verwendung des „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode ist die selektive Adsorption von DNA an Silikat-Partikel in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Dabei erhöhten säulen-chromatographische Schritte die Reinheit der DNA und entfernten Proteine, Agarose etc. Nach Elution der DNA in nukleasefreiem Wasser wurde deren Menge photometrisch bestimmt (Kap. 2.5.13).

2.5.13 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des UV-Spektrophotometers „Ultrospec 3000“ (Amersham Bioscience, Freiburg) oder „Genesy 10 uv scanning“ (Thermo, Fisher Scientific (Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Liegt eine Absorption von 1 vor, entspricht dieses einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. von 40 µg/ml RNA. Aufgrund des Absorptionmaximums aromatischer Aminosäuren, ließen sich eventuelle Verunreinigungen durch Proteine durch Messung der Extinktionswerte bei 280 nm feststellen. Reine DNA sollte ein 260/280 nm-Verhältnis von 1,8 bis 2 aufweisen, reine RNA hingegen eins von 1,7-1,8 (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.5.14 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

Die Plasmidisolierung erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach BIRNBOIM & DOLY (1979). Aufgrund unterschiedlicher Präzipitationseigenschaften fallen bei pH-Wert-Senkung die genomische DNA und die bakteriellen Proteine aus, währenddessen die Plasmid-DNA in Lösung bleibt, selektiv an die Säulenmatrix bindet und renaturiert wird (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mittels einer Silica-Matrix und wurde aus einer 3 ml Übernachtskultur mit Hilfe des „Perfectprep Plasmid Mini Procedure“-Kits (Eppendorf, Hamburg) bzw. des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 20-30 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (Kap. 2.5.13).

2.5.15 DNA-Restriktion

Unter Restriktion versteht man eine sequenzspezifische Spaltung doppelsträngiger DNA. Diese Spaltung der kovalenten Bindung zwischen dem Ribose- und dem Phosphatanteil wird mit Hilfe von sogenannten Typ-II-Restriktionsendonukleasen, die palindromische Sequenzen erkennen, durchgeführt. Je nach eingesetztem Restriktionsenzym entstehen glatte („blunt end“) oder überhängende, kohäsive („sticky ends“) Enden. Die Restriktion wurde zur Vorbereitung der Plasmid-DNA für die Ligation sowie zur Überprüfung von Vektor-Konstrukten eingesetzt.

Die optimalen Puffermedien und Inkubationstemperaturen für die einzelnen Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) ausgewählt. Die je nach Bedarf zu schneidene DNA-Menge wurde dabei entweder für 2 h mit beiden Enzymen gleichzeitig verdaut oder aber versetzt geschnitten, d.h. nach Einsatz des einen

Enzyms für 1 h wurde das Zweite für weitere 1,5-2 h hinzugefügt. Die gewählten Inkubationstemperaturen der Restriktionsansätze waren entweder 37°C oder seltener 30°C (KELLERSMANN, 2007).

2.5.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der DNA-Ligation (FERETTI & SGARAMELLA, 1981) werden zwei DNA-Doppelstränge an ihren Enden durch eine DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden. Durch die ATP-abhängige Neubildung einer Phosphodiesterbrücke während der Ligase-Reaktion kann zum einen ein durch Endonukleasen geöffneter Vektor wieder geschlossen oder zum anderen ein durch Restriktion geschnittenes PCR-Fragment (Kap. 2.5.15) kovalent in einen geöffneten Plasmid-Vektor inseriert werden. Es gibt zwei Arten der Ligation: Bei der „blunt end“-Ligation wird ein Vektor mit einem Restriktionsenzym geöffnet, das „glatte“ Enden erzeugt (z.B. *EcoRV* geöffneter pBSK-Vektor), und anschließend mit einem durch die *Pfu*-Polymerase synthetisierten PCR-Fragment ligiert. Dagegen liegen bei der „sticky end“-Ligation kohäsive, „klebrige“ Enden im geöffneten Vektor vor, welche durch versetzte Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme entstehen. Um eine komplementäre Verknüpfung zu garantieren, muss nun das zu ligierende DNA-Fragment mit denselben Restriktionsenzymen behandelt werden. Für eine erfolgreiche Ligation sollten Vektor und Insert in einem speziellen Verhältnis eingesetzt werden, wobei die Menge des Inserts die Menge des Vektors mindestens um das 6-fache bzw. 20-fache überschreiten sollte. Die Ligationen wurden mit Hilfe der T4-Ligase der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth) nach Angaben des Herstellers bei 16°C üN durchgeführt.

2.5.17 Herstellung kompetenter Zellen

Unter normalen Bedingungen können die meisten Bakterien, darunter auch *E. coli*, DNA nur im begrenzten Umfang aufnehmen. Mit Hilfe einer chemischen Behandlung kann die Zellmembran permeabel gemacht werden, sodass die Fähigkeit, Fremd-DNA aufzunehmen, was als Transformation (Kap. 2.5.18) bezeichnet wird, erhöht wird. Diese Zellen nennt man kompetente Zellen. Im Allgemeinen kann dieser Zustand bei *E. coli* durch Behandlung mit RbCl und CaCl₂ (DAGERT & EHRLICH, 1979, HANAHAAN, 1983) induziert werden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen für eine anschließende Transformation wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur der *E. coli*-Stämme (Tab. 2.3) in LB-Medium üN angezogen. Dann wurden 100 ml LB-Medium mit 1,5 ml dieser Vorkultur angeimpft und aerob bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 inkubiert. Nach einer Abkühlung auf Eis (10 min)

folgte die Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 4°C und 5.000 x *g*. Das Pellet wurde in 40 ml TFB1-Medium resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde erneut für 10 min (5.000 x *g*, 4°C) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 ml TFB2-Medium aufgenommen und in 200 µl Ansätzen aliquotiert. Diese Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Alle für diese Methode verwendeten Agenzien wurden vor Gebrauch vorgekühlt, um eine hohe Aufnahmekapazität zu erreichen.

2.5.18 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock nach CHUNG *et al.* (1989)

Eine Transformation ist ein Vorgang, bei dem freie DNA von einer Bakterienzelle aufgenommen wird. Zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde ein 200 µl Aliquot 15 min langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock von exakt 90 s bei 42°C sollte die Aufnahme der Fremd-DNA erleichtern. Nach 5-minütigem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium für 2 h bei 37°C aerob angezogen. Zur Selektion wurden 50-100 µl der Zellsuspension anschließend auf geeignete LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Die auf den Plasmiden (Tab. 2.4) codierte, zusätzliche Kanamycin- bzw. Ampicillinresistenz sollte das Wachstum der positiven Transformanten gegenüber den nicht transformierten Zellen garantieren.

2.5.19 DNA-Sequenzanalyse und Datenverarbeitung

Zur Identifizierung von PCR-Produkten sowie zur Überprüfung der Plasmidkonstrukte wurde eine DNA-Sequenzanalyse nach der Desoxy-Kettenabbruch-Methode (SANGER *et al.*, 1977) durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden standardisierte Oligonukleotid-Primer (T7- oder T3-Primer) benutzt, die in Tab. 2.5 aufgelistet sind. Die für die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bestimmten Proben enthielten 1 µg DNA, welche mit Hilfe des Rotations-Vakuum-Konzentrators („SpeedVac“, CHRIST RVC 2-18, Martin Christ GmbH, Osterode) getrocknet wurde. Mittels des Computerprogramms DNAMAN (Version 2.5) konnte die von MWG-Biotech sequenzierte DNA daraufhin in ihre Aminosäuresequenz übersetzt werden.

2.5.20 Klonierung des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)pLysS/pET16b- α 7.3 bzw. -STK

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS stellt in Verbindung mit dem pET16b-Vektor ein geeignetes bakterielles Expressionssystem für rekombinante Proteine dar (STUDIER, 1991). Basierend auf Sequenzinformationen aus der NCBI Genbank, Accessionnr. AF514360 für das α 7.3-Giardin (901 bp) und EAA39130 für die Ser/Thr-Kinase (913 bp, Kinasedomäne mit den Aminosäuren 10-280) aus *G. lamblia* wurden Primer synthetisiert (Tab. 2.5), mit denen an genomischer DNA (Kap. 2.5.5) durch PCR (Kap. 2.5.8) jeweils ein Produkt amplifiziert werden konnte. Diese wurden nach *EcoRV*-Öffnung „blunt-end“ in den pBSK-Vektor (Statogene, La Jolla, USA) ligiert und anschließend in den *E. coli* XL1-Blue-Stamm transformiert (Kap. 2.5.16 – 2.5.18). Dadurch wurden die beiden Konstrukte pBSK- α 7.3 und pBSK-STK effektiv vermehrt. Zur weiteren Klonierung der Fragmente in den endgültigen Expressionsvektor wurden daraufhin die einzelnen Plasmide wieder isoliert (Kap. 2.5.14) und mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI verdaut (Kap. 2.5.15). Die so erhaltenen Fragmente wurden in den Expressionsvektor pET16b (Novagen, Heidelberg) ligiert. Anschließend wurden die rekombinanten Plasmide zur Vermehrung erneut in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert, darauf isoliert und letztendlich in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Die beiden so erhaltenen Stämme BL21(DE3) pLysS/pET16b- α 7.3 bzw. -STK konnten daraufhin zur heterologen Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine herangezogen werden (Kap. 2.5.21).

Die weiteren zur heterologen Expression verwendeten Plasmidkonstrukte (Tab. 2.4) bzw. klonierten Stämme wurden im Rahmen früherer Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe Scholze (Universität Osnabrück) hergestellt.

2.5.21 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) [pAPlacIQ] und BL21 Rosetta

Die heterologe Überproduktion von Proteinen bedeutet, dass in einem ausgewählten Organismus (hier *E. coli*) mit Hilfe von einem Plasmid, welches die für das gewünschte Protein codierende DNA enthält, ein Protein in großen Mengen hergestellt wird. Dieses steht nach Aufreinigung für weitere Untersuchungen oder zur Antikörperproduktion zur Verfügung. Das Genom dieser *E. coli*-Stämme wurde so konstruiert, dass ein plasmidcodiertes DNA-Fragment in den Bakterien kontrolliert exprimiert werden konnte. Durch den Prophagen des Bakteriophagen DE3 wurde der *lacUV5*-Promotor, der *lac*-Operator und das T7-RNA-Polymerase-Gen des Phagen in das bakterielle Genom inseriert. Das T7-RNA-Polymerase-Gen wird im nicht-induzierten Zustand nicht oder nur wenig transkribiert, da der *lac*-Repressor an den *lac*-Operator bindet.

Mittels 5 ml Übernachtskulturen der transformierten BL21-Stämme wurden je 100 ml LB-Medium mit geeigneten Antibiotika auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und unter aeroben Bedingungen bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,7$ angezogen. In einzelnen Fällen war eine Veränderung der Inkubationstemperatur von 37°C auf RT (BL21 (DE3) [pAPIacIQ]/pJC45-*Ank*) erforderlich.

Durch Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalaktosid, 1 mM Endkonzentration) nach Erreichen der OD_{600} von 0,5-0,7 wurden die Zellen induziert und anschließend für weitere 2-3 Stunden angezogen. IPTG stellt einen molekularen Induktor dar und bindet an den Repressor, sodass dieser vom *lac*-Operator getrennt wird. Dadurch kann die bakterielle RNA-Polymerase am *lacUV5*-Promotor binden und die Transkription des T7-RNA-Polymerase-Gens induzieren (CHAMBERLIN *et al.*, 1970). Die translatierte T7-RNA-Polymerase, die auch im nicht-induzierten Zustand auf niedrigem Niveau exprimiert wird, erkennt den T7-Promotor, der vor der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des jeweiligen Vektors liegt. Somit kann die DNA-Zielsequenz exprimiert werden, die über Insertion in die MCS eingebracht wurde. Nach Beendigung der Wachstumszeit wurden die Zellen für 10 min bei 5.000 x g, 4°C pelletiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Vor und während der Induktionsphase wurde stündlich eine 1 ml-Probe für die spätere Überprüfung auf „inclusion bodies“ entnommen (Kap. 2.6.1).

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Test auf „inclusion bodies“ bei heterolog exprimierten Proteinen

Viele in *E. coli* synthetisierte Fusionsproteine akkumulieren als unlösliche Aggregate, denen die funktionelle Aktivität fehlt. Diese Einschlusskörper oder „inclusion-bodies“ finden sich in der unlöslichen Fraktion des Zellaufschlusses wieder. Die Aggregatbildung beschränkt sich aber nicht nur auf heterologe Proteine, sondern ist auch bei extrem hoch exprimierten *E. coli*-eigenen Proteinen zu beobachten (GRIBSKOV & BURGESS, 1983). Um zu untersuchen, ob die rekombinanten Proteine als lösliche Proteine oder in „inclusion bodies“ vorlagen, wurden die geernteten *E.coli*-Zellen aus der Überexpression in 1 ml 1-fach Bindingpuffer resuspendiert und durch Ultraschall im Eisbad aufgeschlossen (Kap. 2.4.2). Das Lysat wurde darauf für 10 min bei 20.800 x g und 4°C zentrifugiert, und so die lösliche von der unlöslichen Fraktion getrennt.

Die Analyse der beiden Fraktionen im Vergleich zu einer nicht induzierten Kontrollprobe des jeweiligen konstruierten Stammes erfolgte über eine SDS-PAGE oder einen „Western Blot“ (Kap. 2.6.7, 2.6.9).

2.6.2 Affinitätschromatographien

2.6.2.1 Reinigung und Anreicherung von rekombinanten Proteinen mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Ni-NTA)

Die verwendeten Expressionsvektoren (Tab. 2.4) zeichnen sich durch einen Sequenzabschnitt aus, der für zehn Histidinreste codiert. Dieser sogenannte Histidin (His)-„tag“ liegt zwischen dem *lac*-Operator und der MCS, sodass er sich stromaufwärts vor den in die MCS inserierten DNA-Fragmenten befindet. Somit weist das jeweilige Protein nach heterologer Expression (Kap. 2.5.21) N-terminal einen „His₍₁₀₎-tag“ auf. Der Vorteil solcher Histidin-Fortsätze an rekombinanten Fusionsproteinen besteht darin, dass die Histidine an Metallionen wie Nickel binden können, was zur spezifischen Anreicherung und Aufreinigung des Zielproteins aus *E. coli*-Zelllysat genutzt werden kann. Dies geschieht mit Hilfe einer Affinitätsmatrix bestehend aus Nitrilotriessigsäure (NTA) gebundener Sepharose. Nach mehreren Waschschritten zur Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen kann das Zielprotein durch das kompetitiv wirkende Imidazol im Elutions-Puffer letztendlich von der Säule verdrängt werden.

Die Säulenchromatographie wurde anhand des „pET-System“-Protokolls nach Angaben des Herstellers (Novagen, Heidelberg) mit 1,25 ml Säulenmaterial im „batch“-Verfahren durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte mit 0,25 M – 1 M Imidazol in Elution-Puffer. Wenn es sich bei den anzureichernden Proteinen um unlösliche Einschlusskörper handelte, wurden die verwendeten Puffer (Binde-, Charge-, Wasch-, und Elution-Puffer) mit 8 M Harnstoff versetzt. Mit jeder Fraktion wurde eine Proteinbestimmung nach BRADFORD (Kap. 2.6.4.1) durchgeführt.

2.6.2.2 Affinitätschromatographie an mittels CNBr-aktivierter Sepharose 4B immobilisierten Proteinen

Die kovalente Kopplung von Proteinen an die CNBr-aktivierte-Sepharose erfolgte nach Angaben des Herstellers (GE Healthcare Europe GmbH, München), bei der 1,5 ml Matrixvolumen (0,6 g) der CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit 1 mM HCl kurz quellen gelassen und mit 1 l 1 mM HCl über einer Glasfritte bei Unterdruck gewaschen wurden. Im Anschluss wurden 4-5 mg des jeweils eingesetzten Proteins nach vorangegangener Metallchelate-Affinitätschromatographie und anschließender Dialyse gegen „Kopplungs“-Puffer (Kap. 2.6.2.1 und 2.6.5) in ein geeignetes Reagenzglas (ca. 5 ml) per „batch“-Verfahren an die gequollene CNBr-Sepharose 4B \bar{u} N bei 4 °C gekoppelt. Die Matrix wurde erneut in eine Glasfritte überführt und mit 0,5 l Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8) gewaschen, um

nicht gebundene Proteine zu entfernen und freie reaktive Gruppen der CNBr-Sepharose 4B zu blockieren. Es folgten drei Waschschr tte mit alternierenden pH-Werten mit je 0,5 l Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 4) und Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8). Die gepackten Säulen wurden bei 4-8°C gelagert. Für die Lagerung über gr oere Zeiträume wurde der Säule 1 mM Na-Azid zugegeben.

Für das an der Säulenmatrix immobilisierte Protein konnten nun potentielle Interaktionspartner mittels Affinitätschromatographie identifiziert werden. Zur Aufreinigung dieser möglichen Bindeproteine wurde die Säulenmatrix per „batch“-Verfahren mit dem Rohextrakt von *G. lamblia* in Gegenwart oder Abwesenheit von 4 mM CaCl₂  N bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Beim eigentlichen Säulenlauf wurde zunächst mit 20 ml Tris-Puffer (und nach Bedarf 4 mM CaCl₂) gewaschen und schließlich mit 3 ml Tris-Puffer, der 5 mM EGTA enthielt, in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Es folgten zur Reinigung der Säule Inkubationsschritte mit einem Tris-Puffer, der entweder 0,3 M, 0,5 M oder 1 M NaCl beinhaltete. Nach der Affinitätschromatographie schlossen sich SDS-PAGE (Kap. 2.6.7) und Analysen mit ESI-MS (Kap. 2.6.12) an. Die Proben wurden für die jeweiligen Methoden entsprechend vorbereitet. Für einen Kontrollversuch wurde die CNBr-Sepharose nach Aktivierung mit 1 mM HCl direkt mit 0,1 M Tris/HCl (pH 8) gewaschen und somit die reaktiven Gruppen blockiert. Anschließend wurde die Matrix mit Rohextrakt und CaCl₂  N inkubiert. Der Waschschritt wurde mit 20 ml TBS durchgeführt und die Elution erfolgte mit 5 mM EGTA. Schließlich wurde die Säule mit 0,5 M und 1 M NaCl gespült.

2.6.2.3 Metallhydroxid-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Phosphoproteinen

Für die Anreicherung von Phosphoproteinen aus *G. lamblia*-Extrakt wurde eine Metallhydroxid-Affinitätschromatographie (MOAC, hier: Aluminiumhydroxid) unter denaturierenden Bedingungen nach WOLSCHIN *et al.* (2005) durchgeführt. Die gef llten Elutionsfraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und „Western Blot“ (Kap. 2.6.7, 2.6.9) analysiert. Als Standardproteine dienten dabei einerseits phosphorylierte Proteine wie α -Casein, Ovalbumin oder Pepsin und andererseits nicht-phosphorylierte Proteine wie Glucose-Oxidase, Lysozym oder BSA.

2.6.2.4 Affinitätschromatographie an Heparinsepharose

Diese Methode diente zum Nachweis einer Calcium-abhängigen Heparinbindestelle in Proteinen (hier: rekombinantes α 14-Giardin). Dafür wurden Affinitätschromatographien in An-

und Abwesenheit von 5 mM CaCl₂ mit Hilfe der „HiTrap™ Heparin HP Column“ (Amersham Bioscience, Freiburg) nach WEILAND *et al.* (2003) durchgeführt. Die einzige Abweichung vom vorgegebenen Protokoll bestand darin, dass die Säulenelution mit einem NaCl-Gradienten zwischen 0,3-1 M erfolgte.

2.6.3 Heparin-Bindeassay und „Sugar Competition“

Zur Überprüfung einer möglichen Bindung verschiedener Zucker an ein Protein (hier: rekombinantes α 14-Giardin) wurde ein Heparin-Bindeassay in Anlehnung an WEILAND *et al.* (2003) durchgeführt. Dazu wurden 20 μ l der Heparinsepharose-Matrix (1:1 in HS-TBS aufgenommen) mit ca. 9 μ g rekombinantem Protein für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert und anschließend 1 min bei 960 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin zweimal mit 100 μ l HS-TBS gewaschen und danach jeweils mit 20 μ l verschiedener Zuckerlösungen (Heparin, Hyaluronsäure, Dextran, Chondroitin C) vermischt. Zusätzlich wurden diese Zucker in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 5 mg/ml) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT (auf Wippe) wurde erneut zentrifugiert, die Überstände in neue E-Cups überführt und die Pellets zweimal mit 100 μ l HS-TBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde das nicht durch die Zucker verdrängte Protein mittels des HS-Elutionspuffers von der Säulenmatrix (nach 5-minütiger Inkubationszeit) gelöst und mit Hilfe eines Zentrifugationschrittes von ihr getrennt. Mit allen erhaltenen Überstandsfraktionen wurde eine SDS-PAGE (Kap. 2.6.7) vollzogen.

2.6.4 Quantitative Proteinbestimmungsmethoden

2.6.4.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1979)

Die Proteinbestimmung von wässrigen Lösungen ohne Detergenzien erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) und war für Proteinproben zwischen 1-150 μ g Protein/ml geeignet. Die Bestimmungsmethode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm bei der Bindung von anionischem Coomassie Brilliant Blue an positive Ladungen des Proteins. Es wurde die zu quantifizierende Proteinlösung mit H₂O_{bidest.} auf 500 μ l verdünnt und mit 500 μ l BRADFORD-Reagenz in einer 1-ml-Halbmikroküvette 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer „Genesy 10 uv scanning“ Thermo, Fisher Scientific (Waltham, USA) gegen eine Referenz ohne Protein gemessen. Die Proteinmenge konnte

anhand einer mit 1-10 µg Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Eichgeraden ermittelt werden.

2.6.4.2 Proteinbestimmung mit BCA

Zur Proteinbestimmung in Gegenwart von Detergenzien wurde ein BCA-Kit (Pierce, Rockford, USA) angewandt. Der Nachweis beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex mit Proteinen bilden. Die dabei entstehenden Cu^+ -Ionen bilden mit Bicinchinon (BCA) einen violetten Farbkomplex. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.5 Protein-Dialyse

Mit Hilfe der Dialyse durch eine semipermeable Membran aus regenerierter Cellulose können Proteine von kleineren Molekülen und Ionen abgetrennt werden. Aufgrund des geringen Porendurchmessers der Membran werden Proteine im Dialyseschlauch zurückgehalten, während kleinere Moleküle frei durch die Membran diffundieren können. Die Dialyse erfolgte zur Entfernung störender Agenzien wie Harnstoff, Imidazol oder Detergenzien in Proben mit gereinigtem Protein (z.B. Elution nach Metallchelat-Affinitätschromatographie (Kap. 2.6.2.1)). Hierzu wurden die Proben in Dialyseschläuche (ZelluTrans, Roth, Karlsruhe; Ausschlussgrenze 30 kDa) gefüllt und unter ständigem Rühren in 5 l geeignetem Dialyse-Puffer bei 4 °C dialysiert.

2.6.6 Proteinpräzipitation

Um Proteinproben anzukonzentrieren oder zu reinigen (z.B. von Triton X-100), wurden verschiedene Proteinfällungen angewendet. Meist erfolgte eine Proteinfällung als Vorbereitung auf eine SDS-PAGE (Kap. 2.6.7).

2.6.6.1 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung

Die zu fällende Proteinprobe wurde mit 10%-iger TCA (w/v) versetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 3-4% TCA einstellte. Die Lösung wurde für 30 min bis max. 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 20.800 x g zentrifugiert. Das pelletierte Protein wurde zweimal mit 80%-igem Aceton gewaschen. Das restliche Aceton wurde nach einem letzten Waschschrift mit 100%-igem Aceton bei 80 °C verdampft.

2.6.6.2 Aceton-Fällung

Der Proteinlösung wurde ein 5-facher Überschuss (bezogen auf das Gesamtvolumen von der Probe) an eiskaltem 100%-igem Aceton zugegeben, und das Protein üN bei -20°C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden 10 min bei 20.800 g und 4°C pelletiert und zweimal mit 80%-igem Aceton gewaschen. Nach einem letzten Waschschriff mit 100%-igem Aceton wurden die Aceton-Rückstände im Wasserbad bei 80°C verdampft.

2.6.6.3 Methanol/Chloroform-Fällung

Die Methanol/Chloroform Fällung ist geeignet für $30\text{-}300\text{ }\mu\text{g}$ Protein in einem Volumen von $100\text{ }\mu\text{l}$. Für die Fällung wurden zu der Proteinprobe nacheinander $600\text{ }\mu\text{l}$ Methanol, $150\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform und $450\text{ }\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gegeben und zwischendurch gründlich gemischt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 15.000 x g und RT bildeten sich drei Phasen. Die oberste Phase wurde verworfen und der Rest mit $450\text{ }\mu\text{l}$ Methanol gemischt. Durch eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 15.000 x g und RT wurde das Protein pelletiert und der Überstand verworfen.

2.6.6.4 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung, eine Proteinpräzipitationsmethode unter nativen Bedingungen, beruht auf dem Prinzip des Aussalzens, wobei die Proteine nicht denaturieren. Die zu fällende Proteinlösung wurde mit Ammoniumsulfat zu 80% gesättigt und 1 h oder üN bei 4°C inkubiert. Schließlich wurden die gefällten Proteine 10 min bei 4°C und 20.800 x g zentrifugiert und in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ aufgenommen.

2.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach DOUGLAS *et al.* (1979) durchgeführt. Hierbei ist die Beweglichkeit des Proteins im SDS-Gel des Logarithmus seiner Masse proportional. Für zwei SDS-Gele der Größe $8,5\text{ x }8,0\text{ x }0,1\text{ cm}^3$ wurden neben den in Kapitel 2.2 aufgeführten Puffern noch Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%; (w/v))-Lösung der Firma AppliChem (Darmstadt) sowie 10%-iges APS in unterschiedlichen Mengen verwendet (unten aufgeführt). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Trenngel-Konzentration je nach Proteingröße variierte, während die Sammelgel-Zusammensetzung bei jedem Gel gleich blieb.

<u>Sammelgel</u>		<u>Trenngel</u>				
	5%		7,5%	10%	12,5%	15%
Acrylamid	1,35 ml	Acrylamid	2,5 ml	3,35 ml	4,2 ml	5,05 ml
Spacerpuffer	2 ml	Trennpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	4,65 ml	H ₂ O	4,95 ml	4,1 ml	3,25 ml	2,4 ml
APS (10%)	50 µl	APS (10%)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	35 µl	TEMED	35 µl	35 µl	35 µl	35 µl

Vor Beginn der Elektrophorese wurde zu dem zu trennenden Proteingemisch 2-fach Probenpuffer hinzugegeben, der aufgrund des enthaltenen Glycerins einerseits zum Beschweren der Proteine diente und andererseits den Lauf der Proben im Gel durch den Farbstoff Bromphenolblau sichtbar machte. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine durch 5-minütiges Kochen. Zur Reduktion der Proteine wurde 100 mM DTT zugegeben und erneut 5 min gekocht. Als Molekulargewichtsstandard diente entweder der SDS-PAGE-Standard „low range“ von Bio-Rad (München) oder „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) für Molekulargewichtsgrößen zwischen 14,4 bis 97,4 bzw. 116 kDa. Die Elektrophorese erfolgte in der Blue Vertical-102-Apparatur (Serva, Heidelberg) 1 h bei 45 mA. Nach der Elektrophorese wurden die Gele einer „Western Blot“-Analyse, einer Dispersionsfärbung mit Coomassie Brilliant-Blue G250 oder einer Silberfärbung unterzogen (Kap. 2.6.8.1-2.6.8.2).

2.6.8 Färbemethoden für Polyacrylamidgele

2.6.8.1 Dispersionsfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue G250

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde eine Dispersionsfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 nach NEUHOFF *et al.* (1988) durchgeführt. Die Entfärbung erfolgte durch Wasser. Die verwendeten Lösungen sind in Kapitel 2.2 aufgelistet.

2.6.8.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung gehört mit einer Nachweisgrenze von 10 ng zu den sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamidgele und eignet sich besonders dann, wenn die Reinheit eines Proteins überprüft werden soll. Die Silberfärbung ist zehnmal sensitiver als die Coomassie-Färbung (Kap. 2.6.8.1), kann aber nur eingeschränkt zur Quantifizierung verwendet werden, da Silber je nach verwendetem Protokoll eine abweichende Affinität zu unterschiedlichen Proteinen aufweist. Die Silberfärbung wurde mit Hilfe des „Color Silver Stain Kits“ (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.8.3 Dispersionsfärbung von Phosphoproteinen mittels „Pro-Q® Diamond phosphoprotein gel stain-Kit“

Die mit dem „Pro-Q® Diamond phosphoprotein gel stain-Kit“ von Molecular Probes (Invitrogen detection technologies, Eugene, USA) durchgeführte Methode basiert auf der Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Phosphatgruppen von Proteinen, die durch Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 555 nm zu einer Emission mit dem Maximum bei 580 nm angeregt werden. Durch die Detektion der Fluoreszenz ist es möglich, eine Phosphorylierung von Proteinen im Bereich von 1-16 ng Phosphorylresten sichtbar zu machen. Die Herstellung der Puffer sowie die Dispersionsfärbung mittels des „Kits“ wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde folgende Belichtungsquelle und Detektionsapparatur verwendet (zur Verfügung gestellt von der Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück):

Anregungslicht Halogenlampe (24 V, 250 W) mit entsprechenden Filtern:

Kurzpassfilter KG3 (Schott)

Bandpassfilter BG39 (Schott)

Interferenzfilter (Schott, 553.6 nm, 6.3 nm Halbwertsbreite)

Detektion:

INTAS Gel-Dokumentationssystem "GelJet Imager 2012"

INTAS High-Resolution-Camera 1360x1024 Pixel, Fire-Wire mit 12bit-Format und Peltierkühlung" Objektiv: Rainbow S6X11

Langpassfilter RG610 (Schott)

2.6.9 „Western Blot“-Analyse nach MATSUDAIRA (1987)

Für den Proteintransfer von einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose bzw. PVDF-Membran, welcher als „Western Blot“-Analyse bezeichnet wird, wurde entweder die Nitrocellulose-Membran von Whatman (Dassel) mit Porengröße von 0,45 µm oder die PVDF-Membran von Bio-Rad (München) mit Porengröße von 0,2 µm verwendet. Der „Western Blot“ erfolgte mit Hilfe der „Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell“ der Firma BioRad (München). Wenn nicht anders erwähnt, wurden die SDS-Gele (Kap. 2.6.7) in CAPS/NaOH-Transferpuffer für 30-45 min bei 20 V nach Angaben des Herstellers (Hoefer Scientific Instruments 1988-1989) geblottet.

Zur Kontrolle des Proteintransfers und zur Markierung des Proteinstandards wurden die Proteine reversibel in Ponceau-S Solution (Serva, Heidelberg) nach SAMBROOK *et al.* (1989) angefärbt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA in NET-Puffer für 2 h blockiert, wodurch Kreuzreaktionen der Antikörper mit der Membran verhindert wurden. Die immunologische Detektion erfolgte über die Inkubation der blockierten Membranen mit spezifischen primären Antikörpern in NET-Puffer. Ungebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit NET-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden, an Meerrettichperoxidase gekoppelten, sekundären Antikörpern. Die Inkubation betrug zwei Stunden in NET-Puffer. Ungebundene Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit NET-Puffer und dreimaliges Waschen mit WB-TBS-Puffer entfernt. Alle Waschschritte betrug dabei 10 min. Die hierfür eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Die Peroxidase-Reaktion wurde durch Zugabe von 0,02% (w/v) 4-Chloro-1-Naphthol (in Methanol gelöst) und 0,015% (v/v) H₂O₂ in 4 ml WB-TBS gestartet. Diese diente zum optischen Nachweis der durch Antikörper detektierten Proteine. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran mit Wasser gespült. Eine weit sensiblere Methode stellte die Chemilumineszenznachweis mit Hilfe des „Super-Signal West Pico Chemoluminescent Substrat“-Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) dar, welches nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Die Entwicklung des mit dem Blot belichteten Photofilm „Hyperfilm™ ECL“ (Amersham Bioscience, Freiburg) wurde mittels einer Entwicklermaschine von Kodak (Rochester, USA) durchgeführt.

2.6.10 „Far-Western“-Analysen

Um eine Bindungsaffinität zwischen zwei potentiellen Interaktionspartnern nachzuweisen, wurde auch eine „Far-Western“-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde mit 5 µg des einen Bindepartners eine SDS-PAGE (Kap 2.6.7) durchgeführt, anschließend das Protein auf eine

Nitrocellulose-Membran geblottet und nach Ponceau-Rot-Färbung mit 1% BSA in NET-Puffer blockiert. Des Weiteren wurde die Membran mit entweder 10-15 mg Trophozoiten-Rohextrakt (Kap. 2.4.2) oder 1 mg des anderen möglichen Bindepartners in TBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit TBS gewaschen. Der verwendete primäre Antikörper war dabei gegen den potentiellen Interaktionspartner, der zur Übersichtung der Blotmembran herangezogen wurde, gerichtet. Der weiterführende Ablauf entspricht der des „Western Blots“ (Kap. 2.6.9).

2.6.11 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Die Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen das α 19-Giardien, das α 7.3-Giardien und die beiden Domänen der Ser/Thr-Kinase (STK und Ank) erfolgte durch Immunisierung eines Kaninchens, Meerschweinchens, einer Ratte und eines Huhns durch Injektion des jeweiligen rekombinanten Proteins. Die drei bis vier Immunisierungen mit je 100-500 μ g Protein (je nach Firma und Tier) wurden von den Firmen Charles River WIGA (Sulzfeld) GmbH bzw. Genaxis (Spechbach) durchgeführt. Mit den erhaltenen verschiedenen Antiseren wurden „Western Blots“ (Kap. 2.6.9) mit Rohextrakt (50 μ g) oder rekombinantem Protein (3 μ g) zur Bestimmung des Antikörpertiters durchgeführt.

2.6.12 Protein-Identifizierung mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Ermittlung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses von Ionen in der Gasphase und wird zur Charakterisierung und Sequenzierung von Polyeptiden eingesetzt. Die ionische Ladung der Peptide resultiert dabei aus der Protonierung der Seitenketten der Aminosäuren von z.B. Lysin und Arginin. Dabei kann von einer bekannten Ladung auf die zugehörige Masse geschlossen werden. Die eingesetzte Endopeptidase Trypsin („sequencing grade“ aus Rinderpankreas von Roche Applied Science, Mannheim) spaltet Peptidbindungen spezifisch C-terminal nach Lysin und Arginin, sodass charakteristische geladene Peptide je nach Protein entstehen. Die Auftrennung der Peptide vor der ESI-MS, welche nur ein mögliches Verfahren bei der Massenspektrometrie darstellt (FENN *et al.*, 1989), wurde durch HPLC mittels einer C18-Säule („Quest Hypersil Division“, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)) realisiert. Alle verwendeten Lösungen waren dabei schwebstofffrei, um eventuelle Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen. Die Elution von der HPLC-Säule erfolgte mit einem Acetonitril-Gradienten. Lösung A enthielt 5% Acetonitril (v/v) in 0,05% wässriger Trifluoressigsäure (TFA) (v/v) und Lösung B 80% Acetonitril (v/v) in 0,05% wässriger TFA (v/v). Die Laufzeit wurde auf 30 min festgesetzt.

2.6.12.1 Trypsinverdau von Proteinen im Gel

Als Vorbereitung für eine Proteinidentifizierung mittels ESI-MS wurden die zu untersuchenden Proteinbanden aus dem SDS-Gel (Kap. 2.6.7) in ca. 1 mm² große Gelwürfel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß (E-Cup) überführt. Nach zweimaligem Waschen unter Schütteln in 100 µl ultrareinem H₂O_{bidest.} folgten mindestens 4 Entfärbungsschritte mit je 100 µl „Destaining Solution“ und zwei erneute Waschschrte mit 100 µl ultrareinem H₂O_{bidest.} Anschließend wurden die Gelstücke in 100 µl 100%-igem Acetonitril inkubiert, der Überstand entfernt und die entfärbten Gelstücke für 10 -15 min und 37°C in einer „SpeedVac“ (CHRIST RVC 2-18, Martin Christ GmbH, Osterode) getrocknet. Zur Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücken des Proteins schloss sich nun eine Inkubation mit 20-30 µl „Reducing Solution“ für 5 min bei RT an, gefolgt von einer 30-minütigen Einwirkzeit bei 50°C. Nach einer erneuten Überschichtung mit 100%-igem Acetonitril wurden die nun reduziert vorliegenden SH-Gruppen durch Einsatz von 20µl „Alkyating Solution“ für 15 min im Dunkeln carboxymethyliert und anschließend zweimal mit „Destainig Solution“ behandelt. Es folgte eine erneute Trocknung in der „SpeedVac“ und schließlich wurden die Gelstücke mit 20 µl „Trypsin Digest Solution“ (enthält 0,01 mg/ml Trypsin,) versetzt. Der Verdau erfolgte üN bei 37°C. Nach dem Verdau wurden die Proben mit 20-50 µl „Digestion Buffer“ versetzt und für 30 s im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 510H, Jürgens, Bremen) sonifiziert. Anschließend wurde der Überstand mit den Peptiden abgenommen und bei 20.800 x g für 5 min zentrifugiert und für die Analyse im ESI-MS eingesetzt. Alle Schritte dieser Prozedur, die keine expliziten Angaben zu Inkubationsdauer und -temperatur aufweisen, wurden für 15 min bei RT und unter Schütteln durchgeführt.

2.6.12.2 Trypsinverdau von Proteinen

Präzipitierte und salzfreie Proteine wurden in 50 µl „Dilution Buffer“ aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde Trypsin aus Rinderpankreas („sequencing grade“, Roche Applied Science, Mannheim), welches nach Angaben des Herstellers gelöst wurde, in einer Endkonzentration von 0,02 mg/ml hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte üN bei 37°C. Nach dem Verdau wurden die Proben abschließend 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert, bevor die Analyse von Proteingemischen mittels ESI-MS angeschlossen wurde.

2.6.12.3 Fahndung nach möglichen Bindeproteinen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Für die Identifizierung von Proteinen im ESI-MS (Bruker esquire HCT) wurden die Proteine zuvor mit Trypsin proteolytisch verdaut (Kap. 2.6.1.12) und die so erhaltenen Peptidfragmente über eine vorgeschaltete „HPLC“ aufgetrennt und ankonzentriert. Anhand der detektierten MS- sowie MS/MS-Spektren wurden mit der Software Data Analysis (Bruker) so genannte „Compounds“ erstellt, die Peptidcharakter aufwiesen. Diese wurden für die anschließende Suche über „Mascot-Search“ in der MSDB nach übereinstimmenden Proteindaten herangezogen. Die erhaltenen Daten wurden über „Biotools“ dargestellt und weiter ausgewertet.

2.6.13 Untersuchungen zur Lokalisation von Proteinen in *G. lamblia* mittels Immunfluoreszenz

Für Lokalisierungsstudien verschiedener Proteine wurden Immunfluoreszenzversuche in Anlehnung an das Protokoll von NOHYNKOVA *et al.* (2000) durchgeführt. Je nach Versuch wurden die Untersuchungen entweder mit Trophozoiten (Kap. 2.4.2), isolierte Flagellen (Kap. 2.6.15) oder Cytoskeletten von *G. lamblia* (Kap. 2.6.16) durchgeführt. Je 10-20 µl einer entsprechenden Suspension wurden auf einen Poly-(L)-Lysin-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert, um eine Anheftung an der Glasoberfläche zu ermöglichen. Im Falle der Trophozoiten und Flagellen wurden diese bei -20°C für 7 min mit Methanol fixiert, für weitere 10 min mit Aceton permeabilisiert und anschließend für 10 min mit TBS rehydriert. Im Gegensatz dazu wurden die Cytoskelette mit einer 3%-igen Paraformaldehydlösung für 45 min fixiert und zweimal mit TBS gewaschen. Danach wurden die Proben 30 min mit Blocking-Puffer (TBS + 3% fötales Serum oder BSA) inkubiert. In speziellen Fällen ging diesem Schritt eine einstündige Inkubation mit Rohextrakt (10 mg) bzw. rekombinantem Protein (1 mg) voraus. Die Kopplung des primären Antikörpers (in TBS) erfolgte für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte die Bindung des sekundären Fluoreszenz-Antikörpers. Die Inkubation für 1 h fand unter Lichtausschluss statt. Für die Analyse am Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM 5500 B; Leica, Solms) bzw. konfokalen LSM (Pascal 5; Zeiss, Jena) wurden die Proben abschließend dreimal mit TBS gewaschen. Die hierfür eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

2.6.14 Transmissions-Elektronenmikroskopie

2.6.14.1 Tiefentemperatur-Einbettung in Lowicryl-K4M-Harz (ROTH *et al.*, 1981, CARLEMALM *et al.*, 1982)

Nach Ernte einer 50 ml Zellkultur (Kap. 2.4.2) und zweimaligem Waschen mit PBSVIII wurden ca. 50 µl Zellpellet in 1 ml PBS + 0,25% Glutaraldehyd und 0,37% Formaldehyd aufgenommen und üN bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen kurz zentrifugiert, der Überstand bis auf wenige µl abgenommen und darin resuspendiert. Ca. 300 µl 50°C warmer 4%-iger Agar wurden in die Zellsuspension eingerührt und nach dem Erhärten in kleine Würfel (ca. 1 x 1 mm) geschnitten. Die anschließende Entwässerung der Gelstücke erfolgte zunächst für je 30 min bei 4°C mit vorgekühltem 15%-igen und danach 30%-igen Methanol. Alle nachfolgenden Entwässerungsschritte wurden bei -20°C durchgeführt und die Lösungen auf -20°C vorgekühlt. Sie erfolgte jeweils 30 min mit folgenden Methanolkonzentrationen: 50%, 70%, 90%, zweimal mit 100%. Danach wurden die Proben in einer 2:1-Lösung von Methanol und Lowicryl-K4M-Harz (Polysciences, Warrington, USA) überführt und 1 h bei -20°C gelagert. Das Harz wurde im Vorfeld nach Angaben des Herstellers hergestellt und in einer „SpeedVac“ entgast. Nach Entfernung des Überstands wurden die Würfel in ein 1:2 Methanol:Harz-Gemisch für 1 h bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Gelstückchen für 2 h mit 100% Harz überschichtet und danach in frischem Harz üN inkubiert. Nach der üN-Infiltration wurden die Agarblöckchen in die Spitze eines mit frischem Harz gefüllten 0,5 ml PCR-Cups übertragen und für 24 h bei -20°C unter UV-Licht polymerisiert. Die endgültige Polymerisation des Harzes wurde nach 48-stündiger Inkubation bei RT unter UV-Licht erreicht.

2.6.14.2 Immun-Goldmarkierung an Ultradünnschnitten

Nach Entfernung des PCR-Cups wurde der auspolymerisierte Harzblock mit Hilfe einer Rasierklinge pyramidenförmig angespitzt, sodass an der Spitze eine quadratische Fläche von ca. 1 mm² entstand. Die nun mittels „Ultracut-E“-Mikrotom (Leica/Reichert-Jung, Solms) und „Diatom Ultra 45^o“-Diamantmesser (Fort Washington, USA) hergestellten Ultradünnschnitte (70 nm) wurden auf die mit Formvar beschichtete Seite von Nickelgrids (200 mesh, Plano GmbH, Wetzlar) gelegt und bis zur Verwendung auf PBSVIII-Tropfen aufbewahrt.

Bei der anschließenden Immun-Markierung erfolgten alle Inkubationsschritte auf 40 µl großen Tropfen, wobei die formvarbeschichtete Gridseite immer nach unten zeigte, d.h. zur Flüssigkeit gerichtet war. Zwischen den Schritten wurde jeweils die komplette Flüssigkeit mit

einem Filterpapier entfernt. Zum Anätzen des Harzes und einhergehender Freilegung des biologischen Materials wurden die Ultradünnschnitte 5 min in 10% (v/v) H₂O₂ gelegt und anschließend in einer 5%-igen Milchpulverlösung für 10 min blockiert. Es folgte ein 15-sekündiger Waschschrift mit H₂O_{bidest.} mit Hilfe einer Spitzflasche, um die restliche Flüssigkeit komplett zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Grids in einer 1:50- bzw. 1:500-Verdünnung des primären Antikörpers in PBSVIII-Tween 20 (0,05%) für 1,5 h. Nach Waschen mit PBSVIII-Tween mittels Spritzflasche wurden die Grids zweimal für 5 min auf einen Tropfen mit PBSVIII-Tween inkubiert. Danach schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper „Gold conjugate 10 nm anti-Rabbit IgG developed in goat“ (Sigma-Aldrich, München) in einer 1:40-Verdünnung (in PBSVIII-Tween) für 1 h statt an. Die Grids wurden erneut mit PBSVIII-Tween aus der Spritzflasche gewaschen und dann zweimal 5 min auf einen Tropfen mit PBSVIII-Tween und einmal auf einen mit PBSVIII gelegt. Im Anschluss an die Kontrastierung mit 3% Phosphorwolframsäure (pH7) für exakt 1 min, erfolgte ein Waschschrift mit H₂O_{bidest.} und die Lufttrocknung der Grids. Nun konnten mit Hilfe des „Zeiss EM 902A“-Transmissions-Elektronenmikroskops (Beschleunigungsspannung von 50 kV, Zeiss, Jena) elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Ultradünnschnitten angefertigt werden. Auf diesen erschien der mit kolloidalen Goldpartikeln gekoppelte sekundäre Antikörper als elektronendichte Punkte.

2.6.15 Flagellenpräparation von *G. lamblia*

Die Präparation der Flagellen von *G. lamblia* erfolgte nach der Methode von CLARK & HOLBERTON (1988). Für die Flagellenpräparation wurde eine 3-4 Tage alte *G. lamblia*-Kultur (1,5 x 10⁷ Zellen) für 10 min auf Eis inkubiert, bei 500 x g, 4°C pelletiert und anschließend zweimal in 0,25 M Saccharose gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 35 ml TMSK-Puffer resuspendiert. Die Ablösung erfolgte durch einen „Ultra Turrax“ (Braun, Melsung, Germany) bei maximaler Drehzahl bis keine Zellbewegung mehr sichtbar war (ca. nach 2-3 min). Das Ablösen der Flagellen wurde dabei regelmäßig unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Um die abgelösten Flagellen von den Zellkörpern zu trennen, wurde das Homogenat mit TMSK-Puffer auf 45 ml aufgefüllt und für 10 min bei 220 x g und 4°C zentrifugiert. Hierdurch pelletierten die Zellkörper, sodass 40 ml des Überstands mit den Flagellen abgenommen werden konnte. Um eventuell verbliebene Zellkörper aus dem Überstand zu entfernen, wurde die Flagellensuspension erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die im Überstand befindlichen Flagellen für 20 min bei 13.000 x g, 4°C pelletiert.

Mit dem erhaltenen Pellet wurde nun eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei wurden die sedimentierten Bestandteile in 10 ml 40% Percoll (Fluka, Neu-Ulm)

resuspendiert und für 60 min bei 48.000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation bildet das Percoll einen Dichtegradienten in dem sich die im Pellet enthaltenen Bestandteile entsprechend ihrer Dichte anordnen. Für die Kalibrierung wurde parallel ein Gradient mit Dichte-Markierungsstandards (Density Marker Beads, Amersham Bioscience (Freiburg)) mitgeführt. Mit Hilfe dieser Marker konnte nach der Zentrifugation die Dichte der in der Probe enthaltenen Fraktionen abgeschätzt werden. Um gezielt einzelne Dichtefraktionen zu isolieren, wurden mit Hilfe einer Kanüle, welche bis zum Boden des Röhrchens geführt wurde, die einzelnen Fraktionen abgesaugt und separat gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit 1 x TMSK-Puffer verdünnt und die enthaltenen Flagellen (Dichte zwischen 1,09-1,11 g/ml) bei 13.000 x *g* pelletiert.

2.6.16 Cytoskelettisolierung

Die Cytoskelettisolierung aus Trophozoiten von *G. lamblia* erfolgte in Anlehnung an CROSSLEY *et al.* (1986). Dabei wurden die Zellen aus 50 ml Zellkultur nach Ernte (Kap. 2.4.2) in 300-500 µl TBS resuspendiert, 1:1 mit TEDAMP-Puffer verdünnt und anschließend für 2 min gevortext. Die isolierten Cytoskelette wurden im darauffolgenden Schritt bei 300 x *g* für 3 min pelletiert und für weitere Studien (z.B. Immunfluoreszenz-Mikroskopie) in 100 µl TBS aufgenommen.

2.6.17 Präparation von löslichen α-Giardinen aus *G. lamblia*

Die Proteinreinigung basiert auf dem reversiblen Calcium-abhängigen Bindeverhalten der α-Giardine an Phospholipidmembranen. Nach Ernte und Aufschluss der Zellen einer 3 Tage inkubierten Kultur (50 ml) von *G. lamblia* wurde das Zellhomogenat in je 200 µl Aliquots aufgeteilt, die mit 800 µl Puffer A mit den Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14.000 x *g* für 15 min bei 4°C wurde der Überstand aufbewahrt und das entstandene Pellet noch einmal in Puffer A behandelt und zentrifugiert. Danach wurden die Überstände vereinigt und mittels einer 1 M CaCl₂-Lösung auf 6 mM CaCl₂ eingestellt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt und für 15 min bei 16.000 x *g* zentrifugiert. Zur Gewinnung der löslichen α-Giardine wurden die Niederschläge in 300 µl Puffer B mit Hilfe eines Pistills resuspendiert, erneut für 30 min geschüttelt und für 15 min bei 10.000 x *g* abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der vorherige Schritt mit Puffer B ohne NaCl (300 µl) und anschließend mit Puffer C (400 µl) wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde daraufhin dreimal mit 200 µl

Puffer C gewaschen und für 15 min bei 16.000 x *g* zentrifugiert. Die jeweiligen Überstände wurden vereinigt und zusammen bei -20°C aufbewahrt.

2.6.18 Phospholipid-Bindestudie

Für den Calcium-abhängigen Bindenachweis von Annexinen bzw. α -Giardinen an Phospholipide in Anlehnung an BOUSTEAD *et al.* (1993) wurden zweimal jeweils 0,5 mg Phospholipide (80% Phosphatidylserin: brain extract; Sigma-Aldrich (München)) in 400 μ l Puffer A_L gelöst. Zu den Phospholipidlösungen wurden je 10 μ g gereinigtes und gelöstes Protein gegeben. Nun wurde zu einem der beiden Ansätze 3,8 mM der CaCl₂-Stammlösung gegeben. Beide Proben wurden für 40 min bei RT geschüttelt und anschließend für 10 min bei 15.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet anschließend wieder im gleichen Volumen resuspendiert. Kontrollexperimente fanden ohne Gehirnextrakt statt. Sowohl Überstand als auch Pellet wurden auf ein Gel für eine SDS-Gelelektrophorese und einen „Western Blot“ eingesetzt (Kap. 2.6.7, 2.6.9).

2.6.19 Phosphorylierungsstudie mit [γ -³²P]-markiertem ATP

Zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen im Rohextrakt von *G. lamblia* wurde eine Phosphorylierungsstudie mit [γ -³²P]-markiertem ATP durchgeführt. Das von Amersham Bioscience (Freiburg) bezogene, [γ -³²P]-markierte ATP (3.000 Ci/mmol) wurde hierfür 1:10 mit „kaltem“ ATP (4,212 mM) in Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5) verdünnt. Die ATP-Endkonzentration im Phosphorylierungsansatz betrug somit 20 μ M. Des Weiteren bestand der Phosphorylierungsansatz aus 40 μ g Extrakt-Proteinen und Tris/DTT-Puffer. Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe des ATPs gestartet, nach 20', 40', 60', 2'', 5'', 10'', 15'', 30'' und 60'' jeweils eine Probe aus dem Phosphorylierungsansatz gezogen und mit 5-fach Probenpuffer abgestoppt. Diese Proben wurden neben dem „Prestained“-Proteinmarker („Pageruler“, MBI Fermentas) auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.6.7). Als Radioaktivstandard dienten 5 μ l einer 1:30.000 Verdünnung des [γ -³²P]-markierten ATPs, welche 5 min vor Ende des Gellaufs in eine freie Geltasche aufgetragen worden waren. Anschließend wurde das Gel getrocknet und vor der Exposition die „Prestained“-Markerspuren mit Radioaktivitätsstandard nachgezeichnet. Nach verschiedenen Expositionszeiten wurde der „Storage Phosphor Screen“ eingescannt und mit zugehöriger Software (Storm, Amersham Bioscience, Freiburg) ausgewertet. Anhand der aufgetragenen Menge Radioaktivstandard im SDS-Gel konnte die eingesetzte Menge Radioaktivität für quantitative Analysen errechnet werden.

2.6.20 Crosslinking-Untersuchungen

Crosslinking-Studien zwischen einem rekombinanten Protein (hier: $\alpha 14$ -Giardin) und potentiellen Bindepartnern aus dem *G. lamblia*-Extrakt wurden mit Hilfe des „ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer-Kit“ von der Firma Pierce (Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden unter Ausschluss von DTT durchgeführt, da ansonsten die sich im Crosslinker befindliche Disulfidbrücke reduziert werden wäre (Abb. 2.1). Zunächst wurde das gereinigte $\alpha 14$ mittels Esterbindung an den Crosslinker gekoppelt. Nach der Inkubation des gereinigten $\alpha 14$ mit dem Crosslinker wurde zu dieser Suspension der *G. lamblia*-Rohextrakt mit den möglichen Partnern gegeben und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Ansatz mit einer UV-Lampe photoaktiviert, sodass der mögliche Bindepartner, der nun mit dem $\alpha 14$ verbunden sein sollte, mit einer weiteren Linkerdomäne kovalent gekoppelt vorlag. Nach Reduktion der S-S-Brücke mittels DTT zwischen den Linkerdomänen des Crosslinkers, konnten beide Bindepartner voneinander getrennt werden. Das $\alpha 14$ konnte anschließend mit Hilfe des $\alpha 14$ -Antiserums im „Western Blot“ (Kap. 2.6.9) nachgewiesen werden, wohingegen der Bindepartner aufgrund des gekoppelten Biotins mittels Streptavidin-Antikörper detektiert wurde. In Abwesenheit von DTT sollte der Crosslinker intakt bleiben und der entstandene Protein-Proteinkomplex nach Immundekoration sichtbar werden.

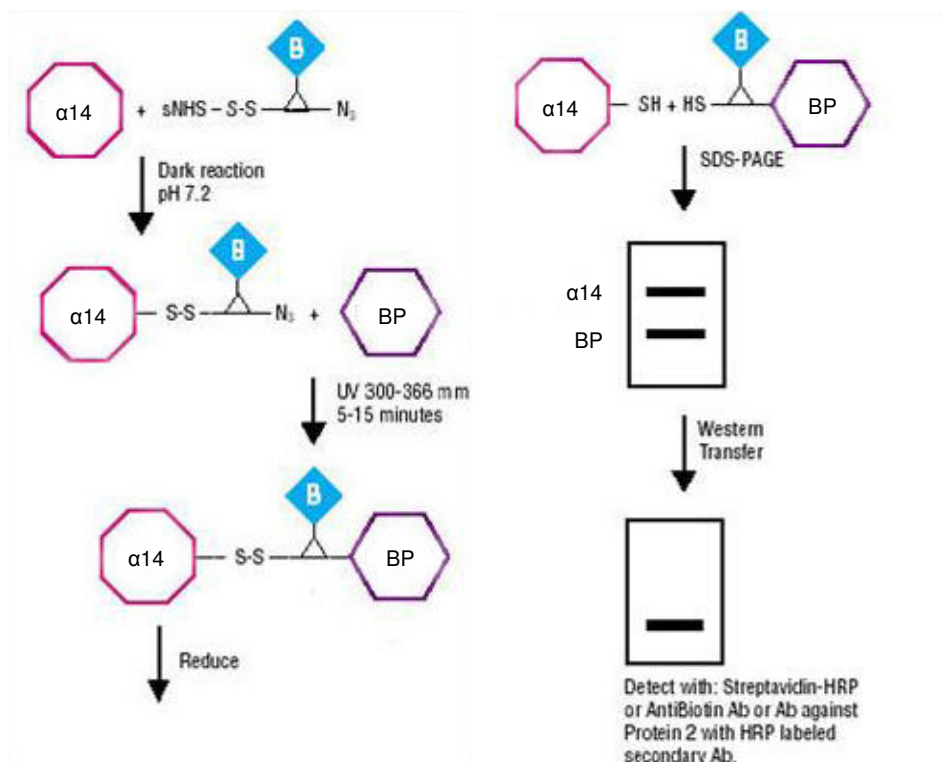


Abb. 2.1: Reaktionsmechanismus des Crosslinkers aus dem „ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer-Kit“. In Anlehnung an Quelle www.piercenet.com. $\alpha 14$, $\alpha 14$ -Giardin; BP, möglicher Bindepartner des $\alpha 14$ -Giardins.

2.6.21 Nachweis von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken mittels SDS-PAGE

In Anlehnung an ALLORE & BARBER (1984) wurde zur Detektion von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken eine SDS-PAGE (7,5%iges Gel, Kap. 2.6.7) mit jeweils 20 µg rekombinantem Protein (hier: α14-Giardin) in An- und Abwesenheit von 50 mM DTT durchgeführt. Waren Disulfidbrücken vorhanden, sollte ein Mobilitäts-Shift der Monomerbande bzw. Oligomerbanden-Bildung unter den verschiedenen Bedingungen im Gel sichtbar werden. Potentielle Oligomerbanden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und erneut einer SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen unterzogen, um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen.

2.6.22 Extraktion von integralen Membranproteinen

Um nachzuweisen, ob ein Protein in der Membran integriert vorliegt, wurde in Anlehnung an UNGERMANN *et al.* (1998) und HOU *et al.* (2005) eine Extraktion der Membranfraktion von *G. lamblia* mit verschiedenen Substanzen durchgeführt. Eine Solubilisierung von integralen Membranproteinen sollte dabei nur unter Einsatz eines Detergenz möglich sein. Als Negativkontrollen wurden zusätzlich Carbonat-, Harnstoff- und NaCl-Extraktionen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5 µl der Membranfraktion eines *G. lamblia*-Rohextraktes (Kap. 2.4.2) eingesetzt und mit verschiedenen Puffern (Triton-Extraktion: 100 µl Triton-Extraktionspuffer, Carbonat-Extraktion: 1 ml Carbonat-Extraktionspuffer, Harnstoff-Extraktion: 500 µl Harnstoff-Extraktionspuffer, NaCl-Extraktion: 500 µl NaCl-Extraktionspuffer) nach vorsichtigem Mischen für 30 min und 4°C (oder RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend wieder im gleichen Volumen resuspendiert. Sowohl das Pellet als auch der Überstand wurden für einen immunbiochemischen Nachweis mittels „Western Blot“ auf ein SDS-Gel aufgetragen (Kap. 2.6.7).

2.7. „Yeast-Two-Hybrid“-System

Das „Yeast-Two-Hybrid“-System ist eine *in-vivo*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen in *Saccharomyces cerevisiae* (FIELDS & SONG, 1989; CHIEN *et al.*, 1991). Mit Hilfe dieses Systems („Matchmaker Library Construction & Screening Kit“, Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, France)), welches freundlicherweise von Dr. Hans Merzendorfer (Abteilung Tierphysiologie, Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt wurde, konnten potentielle Protein-Interaktionen zwischen α14-Giardin und den möglichen Bindepartnern auf genetischem Weg untersucht werden. Die Basis für das „Yeast-

Two-Hybrid“-System stellt der für die Genregulation erforderliche Transkriptionsfaktor GAL4 dar, welcher aus zwei verschiedenen Domänen besteht. Zum einen besitzt er eine DNA-Bindedomäne (GAL4-BD, 147 AS) und zum anderen eine die Transkription aktivierende Domäne (GAL4-AD, 881 AS) (KEEGAN *et al.*, 1986). Beide Domänen sind notwendig für die Gentranskription, fehlt eine der beiden, wird diese nicht ausgeführt. Dabei müssen sich beide Domänen nicht zwangsläufig auf derselben Polypeptidkette befinden, obwohl dieses den Normalfall darstellt. Tatsächlich kann ein Protein mit einer GAL4-BD die Transkription aktivieren, wenn es über nicht-kovalente Wechselwirkungen an ein anderes Protein bindet, welches die GAL4-AD trägt. Es entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor, der die Transkription von nachgeschalteten Genen (z.B. Reportergenen) durch Bindung an den Promotor induziert. Dieses Prinzip bildet die Grundlage für die „Yeast-Two-Hybrid“- Technik.

Zwei in Hefe kompatible Expressionsvektoren wurden so konstruiert, dass das eine Plasmid ein Fusionsgen trug, welches für ein Hybridprotein bestehend aus GAL-BD und dem *Bait*-Protein (für das potentielle Bindepartner gefunden werden sollen, hier: α 14-Giardin) codierte. Das zweite Plasmid hingegen codierte ein Fusionsprotein, das sich aus der GAL4-AD und aus einem möglichen Bindepartner für das *Bait*-Protein zusammensetzte (*Prey*-Protein, hier: α 7.3-Giardin / STK / Ank / β -Tubulin). Dabei wurde das *Bait*-Konstrukt (pGBKT7- α 14 $_{\Delta 314-337}$) in den Hefestamm AH109 transformiert. Die *Prey*-Konstrukte (pGADT7 + jeweiliges Insert) sowie auch die Positiv- und Negativkontrollen (Tab. 2.7) wurden in den Stamm Y187 eingebracht.

Nach Paarung der beiden Hefestämme entstand nun ein Fusionsstamm, der beide Plasmide trägt. Dieser Stamm besaß kein funktionierendes *gal4*-Gen, jedoch mehrere Reportergene, denen eine Bindestelle für den GAL4-Transkriptionsfaktor vorgeschaltet war. Interagierten nun *Bait*- und *Prey*-Protein miteinander, wurde gleichzeitig ein intakter und funktioneller GAL4-Transkriptionsfaktor hergestellt. Dieser fungierte als Induktor für die Expression der Reportergene, die mittels entsprechender Selektionsmedien nachgewiesen werden konnte. Als Reportergene dienten hier Gene, die die Enzyme für die Histidin- und Adeninsynthese codierten, sowie für eine α -Galaktosidase, die eine optische Erkennung der Wechselwirkung von *Bait* und *Prey* zuließ, da sie durch Hydrolyse von X- α -Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galaktopyranosid) die entsprechenden Kolonien blau färbte. Das bedeutete, dass auf einem Mangelmedium für Histidin und Adenin nur die Hefen wuchsen, bei denen *Bait* und *Prey* interagierten und somit die Enzyme für die Histidin- und Adeninsynthese gebildet wurden. Zusätzlich zeigten diese Kolonien aufgrund der α -Galaktosidase-Aktivität einen blauen Phänotyp. Dabei zeigte ein Wachstum auf Histidinmangel eine schwachen, ein Wachstum auf Adeninmangel einen starken Interaktionspartner an.

2.7.1 Hefestämme

Die für das „Yeast-Two-Hybrid“-System („Matchmaker Library Construction & Screening Kit“, Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, France)) verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6 : Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y187	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met ^r , gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL _{TATA} -lacZ, MEL1	HARPER <i>et al.</i> , 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1 _{UAS} , GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ, MEL1	JAMES <i>et al.</i> , 1996
TCO89-3HA	TB50 MAT α <i>TCO89-3HA-kanMX6</i>	A. LORBERG, Universität Osnabrück
TCO89-13myc	TB50 MAT α <i>TCO89-13myc-kanMX6</i>	A. LORBERG, Universität Osnabrück

2.7.2 Hefe kompatible Vektoren

In der folgenden Tabelle 2.7 sind sowohl die zur Klonierung herangezogenen Ausgangsvektoren als auch die im Rahmen der Arbeit von WELLING (2007) hergestellten Plasmidkonstrukte aufgeführt. Die dazu verwendeten Primer entsprechen denen in Tabelle 2.5.

Tabelle 2.7: Verwendete Vektoren

Vektoren	Resistenz/ Charakteristika	Referenz
pGBKT7	Kan ^r , TRP1, DNA-Bindedomäne (BD), Expressionsvektor	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, France
pGADT7	Amp ^r , Leu1, DNA-Aktivierungdomäne (AD), Expressionsvektor	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, France
Positivkontrolle pGBKT7-53	Kan ^r , TRP1, Expression von Fusionsprotein BD-Murin p53	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, France
Negativkontrolle pGBKT7-Lam	Kan ^r , TRP1, Expression von Fusionsprotein BD-humanes Lamin C	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, France
pGBKT7- $\alpha 14_{\Delta 314-337}$	C-terminal verkürztes $\alpha 14$ -Giardin-Genfragment (939 bp) in pGBKT7	WELLING (2007)
pGADT7- $\alpha 7.3$	$\alpha 7.3$ -Giardin-Gensequenz (901 bp) in pGADT7	WELLING (2007)
pGADT7- <i>STK</i>	Sequenzbereich der Kinasedomäne der Ser/Thr-Kinase, AS10-280 (913 bp) in pGADT7	WELLING (2007)
pGADT7- <i>Ank</i>	Sequenzbereich der Ankyrindomäne der Ser/Thr-Kinase, AS 508-676 (688 bp) in pGADT7	WELLING (2007)
pGADT7- β - <i>Tubulin</i>	β -Tubulin-Gensequenz (1330 bp) in pGADT7	WELLING (2007)

Kan^r/Amp^r, Plasmidcodierte Kanamycin-/Ampicillinresistenz; AS, Aminosäuren; Bp, Basenpaare

2.7.3 Kultivierung der Hefestämme

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte entweder in einem Vollmedium (YDP/YPDA) oder nach Transformation von Vektoren (Kap. 2.7.5) in einem geeigneten Selektionsmedium. Hierzu wurden einzelne Kolonien in 5 ml für 16-24 h bei 30°C und 250 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von mindestens 0,8 angezogen, bei 1.000 x g für 5 min abzentrifugiert und in einem

geeigneten Medium/Puffer für weitere Verwendungen resuspendiert. Zur Kultivierung auf Agarplatten konnten nun die aus der Flüssigkultur geernteten Zellen entweder in einer 1:100-Verdünnung ausplattiert oder ein sogenannter „Tropftest“ („Drop Dilution Assay“) durchgeführt werden. Bei diesem wurde die üN-Kultur erneut auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft (in 5 ml), bis 0,6 angezogen, anschließend ausgezählt und eine Verdünnungsreihe erstellt. So konnten exakt $10 \cdot 10^4$ Zellen auf geeignete Selektionsplatten aufgetropft werden konnten.

2.7.4 Stammerhaltung von Hefestämmen

Zur Erstellung einer Glycerinkultur wurde eine Hefekolonie in ein steriles E-Cup mit 250 μ l Selektionsmedium resuspendiert, Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 25% hinzugefügt und bei -80°C eingefroren. Hefestämme wurden dabei in Vollmedium, transformierte Stämme hingegen in entsprechenden Minimalmedien zur Erhaltung des Selektionsdruckes gelagert.

2.7.5 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurden die Hefestämme Y187 und AH109 auf YPD- bzw. YPDA-Platten angezogen, sodass Einzelkolonien entstehen konnten. Anschließend wurde 1 ml YPD- bzw. YPDA-Medium mit den entsprechenden Kolonien angeimpft und zum Resuspendieren 5 min gevortext. Die jeweilige Kultur wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPD- bzw. YPDA-Medium transferiert und üN bei 30°C und 250 UpM inkubiert bis eine OD_{600} von 1,5 erreicht war, bei der sich die Zellen in der stationären Wachstumsphase befanden. Mit den üN-Kulturen wurden erneut 300 ml YPD- bzw. YPDA-Medium auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft und bei 30°C und 230 UpM 3 h bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen. Daraufhin wurden die Hefestämme bei $1.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert, mit sterilem 1-fach TE-Puffer gewaschen und schließlich in 1,5 ml frisch zubereitetem TE (1-fach) / LiAc (1-fach)-Puffer resuspendiert. Die so erhaltenen kompetenten Hefezellen konnten nun zur Transformation eingesetzt werden. 0,1 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA und 0,1 mg „Hering Testes Carrier DNA“ (Clontech-Takara, (Saint-Germain-en-Laye, France) wurden zu 100 μ l kompetente Hefezellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 600 μ l sterile PEG/LiAc-Lösung zum Ansatz und 10-sekündigem kräftigem Mischen mittels Vortexer wurde die Zellsuspension für 30 min bei 30°C und 200 UpM inkubiert. Anschließend wurde 70 μ l DMSO hinzugegeben und vorsichtig geschwenkt. Daraufhin wurden die Zellen für 15 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen

und anschließend für 1–2 min auf Eis gekühlt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei RT für 3 s und 14.000 x *g* und die anschließende Aufnahme der Zellen in 500 µl sterilem 1-fach TE-Puffer. 100 µl Zellsuspension und 100 µl einer 1:10 Verdünnung wurde auf selektiven SD-Platten ausgestrichen. Zur Anzucht der Transformanten wurden die Platten im Brutschrank für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.7.6 Test der DNA-BD-Fusionsprotein auf transkriptionale Aktivität

Der Test auf transkriptionale Aktivität zeigt, ob das BD-Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-Bindedomäne und dem *Bait*-Protein, die Reportergene ohne Interaktion mit der Aktivierungsdomäne aktivieren kann. Dafür wurden die Hefestämme Y187 und AH109 mit dem jeweiligen DNA-BD-Konstrukt transformiert (Kap 2.7.5) und anschließend auf Selektionsmedien (SD/ -Trp/ X-α-Gal (40 µg/ml), SD/ -Trp/ -His/ X-α-Gal, SD/ -Trp/ -Ade/ X-α-Gal) einschließlich einer negativen Kontrolle (transformierte Zellen + leerer Vektor pGBKT7), ausplattiert. Zur Anzucht der Kolonien wurden die Platten im Brutschrank für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert. Das Fusionsprotein war inaktiv, wenn die transformierten Kolonien einen weißen Phänotyp ausbildeten oder nicht auf SD/ -Trp/ -His/ X-α-Gal bzw. SD/ -Trp/ -Ade/ X-α-Gal wuchsen, und aktiv, wenn die Kolonien blau erschienen und auf allen Selektionmedien wachsen konnten. Auch alle AD-Fusionsproteine wurden auf ihre alleinige transkriptionale Aktivität ohne Wechselwirkung mit der BD untersucht und die entsprechenden Experimente wie oben beschrieben durchgeführt.

2.7.7 Test der DNA-BD Fusionsproteine auf Toxizität

Zum Nachweis, ob das Fusionskonstrukt aus pGBKT7 und Insert auf die Hefezellen toxisch wirkte, wurde die Wachstumsrate bei der Anzucht im Selektionsmedium überprüft. Eine bestehende Toxizität würde zu einer geringeren Wachstumsrate oder sogar zum Absterben der Kultur geführt haben, wohingegen nicht-toxische Konstrukte diese nicht beeinflussen sollten. Hierfür wurden je 50 ml SD/ -Trp/ Kan (20 µg/ml) mit einer großen Kolonie der jeweiligen positiven Transformanten angeimpft und bei 30°C für 16-24 h und 250 UpM inkubiert. Lag keine Toxizität vor, sollte nach diesem Zeitraum eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht worden sein. Diese Zellsuspension konnte daraufhin auf SD/-Trp-Platten angezogen und später zur Paarung eingesetzt werden.

2.7.8 Paarung der transformierten Hefestämme Y187 und AH109

Für die Paarung der Fusionsstämmen (AH109 mit pGBKT7- $\alpha 14_{\Delta 314-337}$ bzw. Y187 mit pGADT7- $\alpha 7.3/$ -*STK* / -*Ank* / - β -*Tubulin*) wurden jeweils eine Kolonie ausgewählt und beide Kolonien in 1 ml 0,5 YPDA vollständig resuspendiert. Anschließend wurden 45 ml 2x YPDA/ Kan/ Amp (50 μ g/ml) in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit den resuspendierten Kolonien angeimpft und für 20-24 h bei 30°C vorsichtig geschwenkt (30-50 UpM). Nach 20 h wurde ein Tropfen der Lösung mikroskopisch untersucht. Falls Zygoten der gepaarten Hefezellen zu sehen waren, erfolgte eine weitere Inkubation für 4 h. Danach wurde der gepaarte Fusionsstamm bei 1.000 x *g* für 10 min abzentrifugiert und letztendlich in 10 ml 0,5 YPDA/ Kan / Amp (50 μ g/ml) resuspendiert. Die durchgeführten Paarungen sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tab. 2.8: Durchgeführte „Yeast-Two-Hybrid“-Paarungen

	Bait-Konstrukt	Prey-Konstrukt
Paarung 1	AH109::pGBKT7 - <i>$\alpha 14$</i>	Y187::pGADT7- <i>$\alpha 7.3$</i>
Paarung 2	AH109::pGBKT7 - <i>$\alpha 14$</i>	Y187::pGADT7- <i>β-Tub</i>
Paarung 3	AH109::pGBKT7 - <i>$\alpha 14$</i>	Y187::pGADT7- <i>STK</i>
Paarung 4	AH109::pGBKT7 - <i>$\alpha 14$</i>	Y187::pGADT7- <i>Ank</i>

2.7.9 Selektion der diploiden Hefen

Zur Selektion der Fusionsstämmen (Kap. 2.7.8) wurde 100 μ l einer 1:100-Verdünnung des Paarungsansatzes auf Selektionsmedien (SD/ -Leu, SD/ -Trp, SD/ -Leu/ -Trp , SD/-His/ -Leu/ -Trp (Triple Dropout Medium, TDO), SD/-Ade/ -His/ -Leu/ -Trp/ X- α -Gal (Quadruple Dropout Medium, QDO)) ausgestrichen bzw. ein „Tropftest“ wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben damit durchgeführt. Die Platten wurden bei 30°C für 3–8 Tage inkubiert. Die Kolonien auf den SD/ TDO-Platten wurden auf SD/ QDO/ X- α -Gal (40 μ g/ml)-Platten umplattiert und erneut bei 30°C inkubiert. Die entstandenen blauen Kolonien wurden wiederum zwei bis drei Mal auf SD/ -Leu/ -Trp/ X- α -Gal (40 μ g/ml)-Platten umplattiert, um schließlich zur Bestätigung wieder auf SD/ QDO/ X- α -Gal-Platten ausgestrichen zu werden.

2.7.10 Immunpräzipitation der potentiell exprimierten Interaktionspartner

Zum Expressionsnachweis der im „Yeast-Two-Hybrid“ untersuchten Proteine wurde eine Immunpräzipitation mittels spezifischer Antikörper und Protein-G-Sepharose (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Hefestämme üN in entsprechendem Medium angezogen, erneut in 200 ml Medium auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,7-0,8 kultiviert. Nach Zellernte (4°C , 4 min, $3220 \times g$) wurden die Zellen mit kaltem H_2O *bidest* gewaschen, in 300 μl Lysispuffer (+ 1mM PMSF, Proteaseinhibitoren-Mix „Complete“ (Roche Applied Science, Mannheim), Phosphataseinhibitoren-Mix) resuspendiert und in E-Cups überführt. Es folgte der Zellaufschluss mittels 0,5 mm Glasperlen (Bio Spec Products, Inc., Bartlesville, USA) für 30 min und 4°C auf dem "Disruptor Genie" von Scientific Industries, Inc. (New York, USA) und eine erneute Zentrifugation ($1.700 \times g$, 4°C , 4 min) zum Entfernen der Membranbestandteile. Der Zelllysate-Überstand wurde abgenommen und in ein neues E-Cup überführt, zu dem entstandenen Pellet wurden nochmals 300 μl Lysispuffer hinzugefügt und der Schritt wiederholt. Mit den vereinigten Zelllysaten wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach BRADFORD (Kap. 2.6.4.1) angeschlossen. Für die Immunpräzipitation wurden jeweils 7,5 mg Rohextrakt-Protein der verschiedenen Hefestämme mit den entsprechenden Antikörpern gegen die zu präzipitierenden Proteine für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert (Endvolumen 1 ml). Nach Zugabe von je 20 μl Protein-G-Sepharose (Sigma-Aldrich, München) und einer üN-Inkubation (4°C , Überkopfschüttler) erfolgte ein Zentrifugationschritt bei $960 \times g$ und 4°C für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und die „Sepharose-Beads“ dreimal in Lysispuffer gewaschen. Zum Abkoppeln der „Beads“ von den Antikörpern nebst präzipitierten Proteinen wurde diese in 18 μl 2-fach Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 96°C und 1400 UpM im „Thermomixer compact“ (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt, kurz auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Diese Proben wurden nun für eine SDS-PAGE (Kap. 2.6.7) mit angeschlossenem „Western Blot“ (Kap. 2.6.9) verwendet.

3. Ergebnisse

Aufgrund der Untersuchung zweier unterschiedlicher α -Giardine wurde der Ergebnisteil dieser Arbeit in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil (Kapitel 3.1) werden neben Analysen zur biochemischen Charakterisierung die Studien zur Identifizierung eines potentiellen Interaktionspartners für das α 14-Giardin dokumentiert. Der zweite Teilabschnitt (Kapitel 3.2) befasst sich hingegen mit den molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen zur Funktion des α 19-Giardins. Im Verlauf der Darstellung werden die α -Giardine vorwiegend mit α 14 und α 19 bezeichnet.

3.1 Biochemische Charakterisierung des α 14-Giardins und Interaktionsstudien mit potentiellen Bindepartnern

In Anbetracht seiner Lokalisation in den Flagellen des einzelligen Parasiten *Giardia lamblia* könnte das α 14-Giardin eine wichtige Rolle für dessen Mobilität spielen und damit für die Ausbreitung des Darmparasiten im Wirtsdarm mitverantwortlich sein. Ein wichtiger Schritt zur Verifizierung dieser Hypothese ist neben der biochemischen Charakterisierung die Identifizierung von Bindepartnern des α 14-Giardins innerhalb der Zelle. Beide Punkte werden im folgenden Abschnitt behandelt.

3.1.1 Heterologe Expression des rekombinanten α 14-Giardins

Das für Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung sowie zur Fahndung nach potentiellen Bindepartnern erforderliche rekombinante α 14-Giardin wurde durch heterologe Expression des von KIELMANN (2002) hergestellten Klons BL21 (DE3) pLysS/pET16b- α 14 _{Δ 314-337} gewonnen (Tab. 2.4). Im Gegensatz zu α 1- und α 2-Giardin sowie auch zum humanen Annexin A5 besitzt das α 14 eine C-terminale Extension von ca. 20 Aminosäureresten. Durch die Hydrophobizität mehrerer Aminosäuren in diesem Bereich neigte das komplette α 14 zu unspezifischer Aggregation. Um dieses zu verhindern und eine bessere Löslichkeit des Proteins in wässriger Lösung zu erzielen, wurde dieser Sequenzbereich deletiert. Trotz dieser Deletion wird folgend das rekombinante Protein als α 14 bezeichnet. Während der heterologen Expression (Kap. 2.5.21) stand das in den Vektor inserierte α 14-Genfragment unter der Kontrolle eines T7-Promotors (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Die für ihn spezifische T7-Polymerase konnte durch IPTG induziert werden und somit eine zeitlich gesteuerte Synthese des Fremdproteins ermöglichen. Viele in *E. coli* synthetisierte, rekombinante Proteine akkumulieren als unlösliche Aggregate, denen die

funktionelle Aktivität fehlt. Diese Einschlusskörper oder „inclusion bodies“ finden sich in der unlöslichen Fraktion des Zellaufschlusses wieder. Um zu untersuchen, ob dieses im Falle des rekombinanten α 14-Giardins zutrifft, wurde ein Test auf „inclusion bodies“ durchgeführt (Kap. 2.6.1).

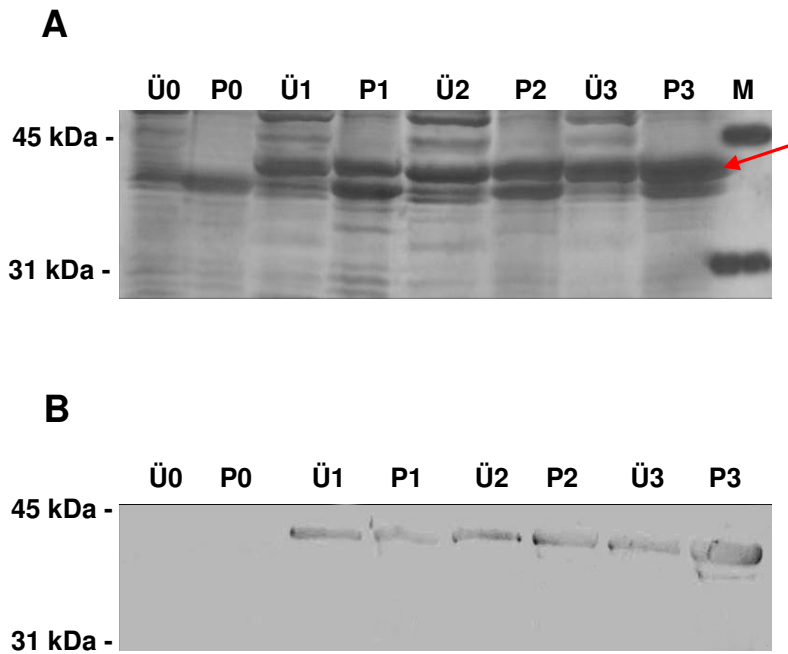


Abb. 3.1.1: SDS-PAGE und „Western Blot“ nach heterologer Expression von α 14. (A) SDS-PAGE der heterologen Expression von α 14. Roter Pfeil zeigt exprimiertes Protein. (B) „Western-Blot“ der Fraktion der heterologen Expression mit anti-Penta-His-Antikörpern (Tab. 2.2). Ü, lösliche Fraktion (je 20 μ l pro Spur); P, unlösliche Fraktion (je 15 μ l pro Spur); 0, vor Induktion mit 1 mM IPTG; 1–3, Wachstumszeit in Stunden nach der Induktion. μ l-Angaben beziehen sich auf den Gesamt-Zellextrakt.

Wie Abbildung 3.1.1A ersichtlich, war nach der Induktion ein deutlicher Konzentrationsanstieg eines 40 kDa großen Proteins sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion zu erkennen. Durch eine angeschlossene „Western Blot“-Analyse (Abb.3.1.1 B; Kap. 2.6.9) mit Hilfe des gegen den „His₍₁₀₎-tag“ des Fusionsproteins gerichteten Antikörper konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem exprimierten Protein um das 40,7 kDa große rekombinante α 14-Giardin handelte.

Ogleich das α 14 in gleich großer Menge in Einschlusskörpern vorlag, wurde für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins nur die lösliche Fraktion herangezogen und somit auf eine Solubilisierung mittels Harnstoff verzichtet.

3.1.2 Aufreinigung des rekombinanten α 14-Giardins mittels Ni-NTA

Da es sich bei dem rekombinanten Protein um ein Fusionsprotein, bestehend aus einem plasmidcodierten N-terminalen „His₍₁₀₎-tag“ und dem α 14-Giardin handelte, konnte es mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Kap. 2.6.2.1) aufgereinigt werden. Die Interaktion zwischen Histidin-Fortsatz und den Nickel-Ionen der Säulenmatrix wurde erst nach Elution mit dem Histidinanalogon Imidazol (0,25, 0,5 und 1 M) geschwächt und das Protein von der Bindestelle verdrängt.

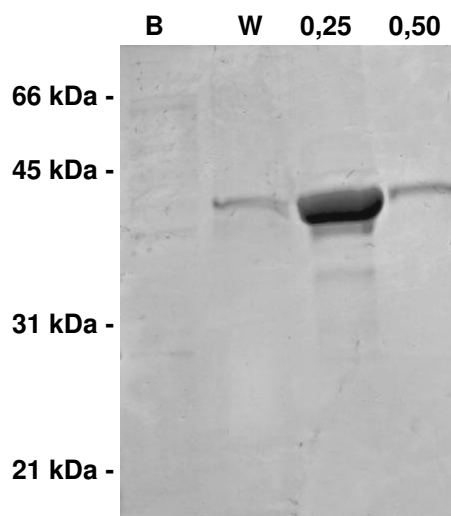


Abb. 3.1.2: Aufreinigung des rekombinanten α 14 mittels Ni-NTA. SDS-Gel mit verschiedenen Fraktionen (je 30 μ l jeder Fraktion) der Aufreinigung von α 14. B, Binde-Puffer; W, letzter Waschschritt; 0,25-0,5, Elutionsfraktion mit 0,25-0,5M Imidazol.

Das SDS-Gel (Abb. 3.1.2; Kap. 2.6.7) zeigt in den Elutionfraktionen wie erwartet eine dominante Bande, welche mittels „Western Blot“ als α 14 identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nach Vereinigung der Elutionen und anschließender Dialyse betrug die Proteinausbeute 2 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 5 ml.

3.1.3 Immunocytochemische Lokalisierung des α 14-Giardins in *G. lamblia*

3.1.3.1 Lokalisierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Obwohl durch SZKODOWSKA *et al.* (2002) die ausschließliche Lokalisation des α 14-Giardins in den Flagellen und dem Mediankörper bereits nachgewiesen worden war, blieb die Frage, mit welcher subzellulären Flagellenkomponente das α 14-Giardin interagiert, ungeklärt. Um eine konkretere Aussage darüber machen zu können, wurden zunächst erneute Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit Hilfe des α 14-Antiserums (Kap. 2.6.13) an fixierten und permeabilisierten Trophozoiten durchgeführt.

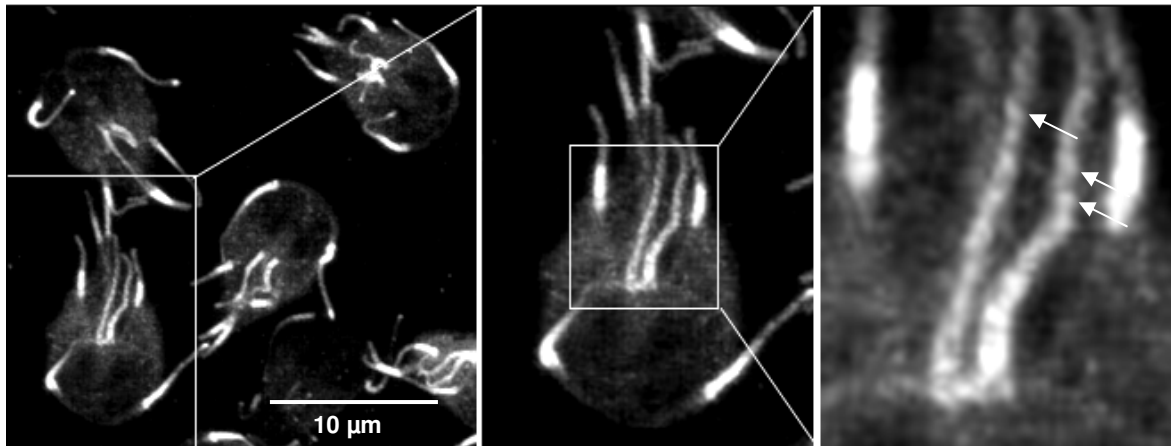


Abb. 3.1.3: Immunocytochemische Lokalisierung des α 14-Giardins in permeabilisierten Trophozoiten. Markierung mit α 14-Antiserum und CY3™-konjugierten sek. Antikörpern (Tab. 2.2). Mit einem Kästchen versehene Bildregionen stellen die vergrößerten Bereiche des nächsten Bildes dar, Pfeile zeigen die lokalen Verdickungen. Aufnahmen wurden am konfocalen Laser Scanning Mikroskop (Pascal 5, Zeiss) durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.1.3 zu sehen ist, konnte die exklusive Lokalisation des α 14-Giardins in den Flagellen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass das Protein nicht in der gesamten Flagelle verteilt, sondern in gewissen proximalen Bereichen und den distalen Enden konzentriert vorlag. Bei genauerer Betrachtung der Abbildung 3.1.3 gleicht diese lokale Konzentration einer Perlenschnur-artigen Aufreihung. Das als Negativkontrolle mitgeführte Prä-Immunsersum zeigte hingegen nur eine Hintergrund-Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.2 Lokalisierungsstudien mittels Transmission-Elektronenmikroskopie

Eine weitere Methode, um die genauere Lokalisation des α 14-Giardins innerhalb der Flagellen zu untersuchen, ist die Elektronenmikroskopie. Dafür wurden zunächst lebende Zellen zur Strukturhaltung durch chemische Fixierung stabilisiert, stufenweise mit Methanol entwässert und in vakuumfestes Harz eingebettet. Nach Aushärtung wurde der Harzblock mit Hilfe eines Ultramikrotoms in dünne (70 nm) und somit elektronentransparente Scheibchen (Dünnschnitte) geschnitten und mittels Transmissions-Elektronenmikroskop (Kap. 2.6.14) untersucht. Aufgrund der geringen Dicke der Schnitte waren alle Zellbestandteile und Strukturen von *Giardia* gut zu erkennen. Zum Sichtbarmachen des α 14-Giardins wurde ähnlich wie bei der Fluoreszenzmikroskopie (Kap. 2.6.13) verfahren, nur dass lediglich ein goldmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt wurde.

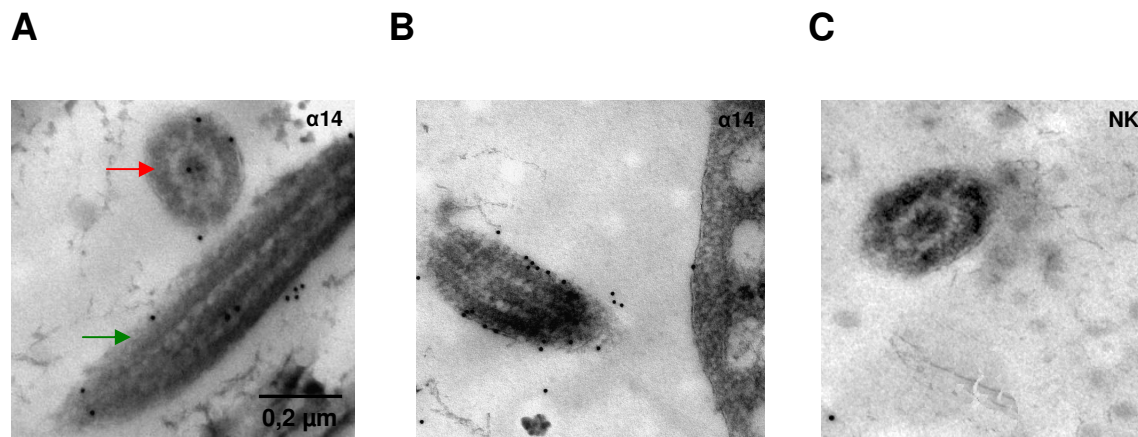


Abb. 3.1.4: Lokalisierung des $\alpha 14$ -Giardins mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Inkubation der Ultradünnschnitte von eingebetteten Trophozoiten mit $\alpha 14$ -Antiserum und Goldpartikel-konjugierten sek. Antikörpern (**A+B**) oder nur mit sek. Goldpartikel-konjugierten Antikörpern (**C**) (Kap. 2.6.14).

In den Bildern 3.1.4 A und B sind jeweils Ultradünnschnitte der Flagellen von *G. lamblia* gezeigt. Der Flagellenquerschnitt in Abbildung A (roter Pfeil) zeigt die für Eukaryonten typische $9 \times 2 + 2$ -Anordnung der Mikrotubuli einer Flagelle. Der grüne Pfeil in A weist auf einen Längsschnitt durch eine Flagelle, währenddessen Bild B eine schräg angeschnittene Flagelle präsentiert. In allen drei Fällen sind die Goldpartikel des sekundären Antikörpers deutlich zu erkennen. Das $\alpha 14$ -Giardin liegt scheinbar einerseits an den Mikrotubuli gebunden vor, was besonders beim zentrierten Mikrotubulipaar im Flagellenquerschnitt deutlich wird, ist aber andererseits auch häufig in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert. Dieses ist vor allem im Längsschnitt der Flagelle zu sehen. Den Bildern ist jedoch nicht zu entnehmen, ob es sich um eine direkte oder indirekte Wechselwirkung mit den jeweiligen Flagellenkomponenten handelt. Als Kontrolle dienten Ultradünnschnitte, die ohne vorherige Inkubation mit primärem Antikörper direkt mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden (Abb. 3.1.4 C) oder ein Ansatz mit Prä-Immunsereum (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Detektion möglicher Bindepartner mittels Affinitätschromatographie an $\alpha 14$ -Sephrose

Ein erster wichtiger Schritt zur Aufklärung der Funktionsweise des $\alpha 14$ -Giardins in den Flagellen ist die Identifizierung von Bindepartnern des Proteins. Zur Fahndung nach potentiellen Interaktionspartnern des $\alpha 14$ -Giardins wurde zunächst das gereinigte, rekombinante $\alpha 14$ kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt (PRIEB, 2005). Anschließend konnte eine Affinitätschromatographie des Rohextrakts an dem so immobilisierten Protein durchgeführt werden (Kap. 2.6.2.2). Da für mehrere Annexine höherer Eukaryonten Calcium-abhängige Interaktionen mit verschiedenen Zellkomponenten

bekannt sind (GERKE & MOSS, 2002), könnte eine Calcium-abhängige Interaktion zwischen $\alpha 14$ und einem Bindeprotein nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund erfolgte die Chromatographie stets in An- und Abwesenheit von Calcium.

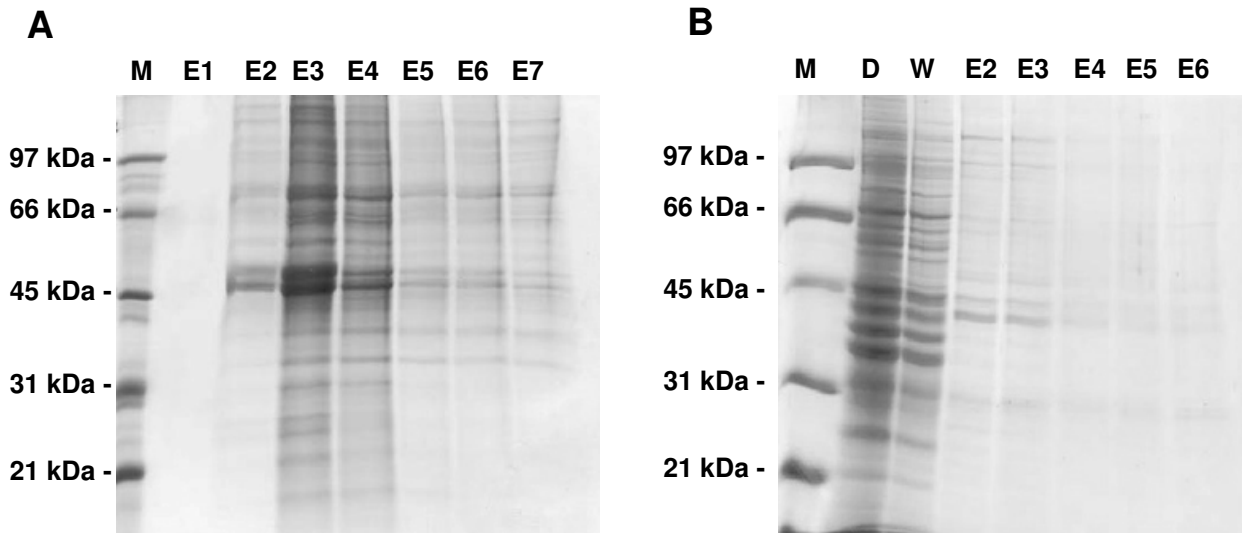


Abb. 3.1.5: SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie von Zellextrakt an einer $\alpha 14$ -Sepharose 4B-Matrix. Säulenmatrix wurde mit 4 mg Zellextrakt und sowie mit 4 mM CaCl₂ (A) oder ohne CaCl₂ (B) im „batch“-Verfahren inkubiert. Eluiert wurde mit 5 mM EGTA in TBS. M, Protein Standard („low range“); E1-7, Elutionsfraktionen; D, Durchlauf; W1, Waschschrift mit TBS.

In Abbildung 3.1.5 A ist zu sehen, dass bei der Inkubation der Säulenmatrix mit Zellextrakt unter Zusatz von 4 mM CaCl₂ der Großteil der Proteine in der 3. und 4. Elutionsfraktion der Elution mit EGTA zu finden war. Auffallend waren dabei wiederkehrende dominante Banden im Bereich von ca. 32, 35, 39, 42 und 50 kDa, welche weitestgehend in allen Fraktionen zu finden waren. In Abwesenheit von Calcium (Abb. 3.1.5 B) zeigte sich hingegen ein ganz anderes Bandenmuster. Ausschließlich in den Fraktionen 2 und 3 waren Proteine zu erkennen, wobei lediglich die eben erwähnte 42 kDa Bande wiederzufinden war. Als Kontrollversuch diente eine Chromatographie mit Sepharose 4B ohne gebundenes $\alpha 14$. Bei diesem Versuch konnten nach Elution mit EGTA oder auch höheren Salzkonzentrationen nahezu keine Proteine von der Säule gewaschen werden.

Vergleichend gesehen sprechen die unter Calciumzugabe sichtbaren signifikanten Proteinbanden für eine Calcium-abhängige Interaktionsweise des $\alpha 14$ -Giardins.

3.1.5 Massenspektrometrische Identifizierung der potentiellen Bindepartner des α 14-Giardins

Die Identifizierung der mittels Affinitätschromatographie eluierten potentiellen Interaktionspartner des α 14-Giardins erfolgte mit Hilfe der Elektronenspray-Massenspektrometrie (ESI-MS, Kap. 2.6.12). Dazu wurden alle erhaltenen Elutionsfraktionen mit Aceton gefällt (Kap. 2.6.6.2) und proteolytisch mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide wurden anschließend mittels HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die durch die Massenspektrometrie ermittelten Peptide wurden mit Datensätzen bekannter Peptide in geeigneten Datenbanken (MSDB) abgeglichen und den entsprechenden Proteinen zugeordnet. Dabei wurden die detektierten Proteine mit einem die Trefferqualität kennzeichnenden „Mowse Score“ versehen. Aufgrund der hohen phylogenetischen Verbreitung der Annexine galt ein Protein mit einem „Mowse Score“ ab 300 als ein relevanter „Treffer“.

Unter dieser Voraussetzung konnten in den Eluaten der Affinitätschromatographie ohne Calciumzugabe keine signifikanten Treffer erzielt werden. In Anwesenheit von Calcium wurden jedoch mehrere relevante Bindepartner detektiert, die einen „Mowse Score“ von 370-400 aufwiesen. Bei den potentiellen Interaktionspartnern des α 14-Giardins handelte es sich neben dem α - und β -Tubulin (NCBI-Accession Nr. XP_001705720 bzw. XP_001707372) und dem α 7.3-Giardin (NCBI-Accession Nr. AF514360) auch um eine Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr-Kinase, NCBI-Accession Nr. EAA39130). Alle möglichen Partnerproteine wurden im Folgenden auf eine Wechselwirkung mit dem α 14 untersucht.

3.1.6 Untersuchungen zur möglichen Interaktion zwischen den Mikrotubuli der Flagellen-Axonema und des α 14-Giardins

3.1.6.1 Ko-Lokalisierungsuntersuchungen an permeabilisierten Trophozoiten

Da das Tubulin als Hauptkomponente der Flagellen einen potentiellen Interaktionspartner des α 14-Giardins darstellte und die Lokalisation des α 14-Giardins in den Flagellen bereits bewiesen wurde (Kap. 3.1.3), konnte von einer Ko-Lokalisation der beiden Proteine ausgegangen werden. Um dieses direkt nachzuweisen und eventuell tiefere Einblicke in die mögliche Wechselwirkung dieser beiden Proteine zu bekommen, wurden zunächst Immunfluoreszenz-Aufnahmen an permeabilisierten Trophozoiten durchgeführt (Kap. 2.6.13). Die dafür eingesetzten primären Antikörper, anti- α 14 und anti-Tubulin, wurden mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-tragenden sekundären Antikörpern detektiert, die sich in ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge unterschieden und somit Ko-Lokalisierungsstudien möglich machten (Tab. 2.2).

Anders als das Tubulin, welches als strukturbildendes Protein in der gesamten Ausdehnung der Axonems nachweisbar war, konnte das $\alpha 14$ -Giardin ausschließlich in dem außerhalb des Zellkörpers liegenden, membranumgebenen Bereich der Flagellen detektiert werden (Abbildung 3.1.6 A). Die Abschnitte, die sich noch im Zellkörper befinden, wurden nicht erkannt. Des Weiteren wurde in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erneut deutlich, dass sich das $\alpha 14$ lediglich in gewissen Regionen, wie z.B. im distalem Ende der Flagellen, befand. Eine Überlagerung beider fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.1.6 A Merge) veranschaulichte dabei die Ko-Lokalisierung von Tubulin und $\alpha 14$ in diesen Bereichen der Flagellen. Gleiche Ergebnisse konnten auch bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an isolierten Flagellen erzielt werden (Abb. 3.1.6 B).

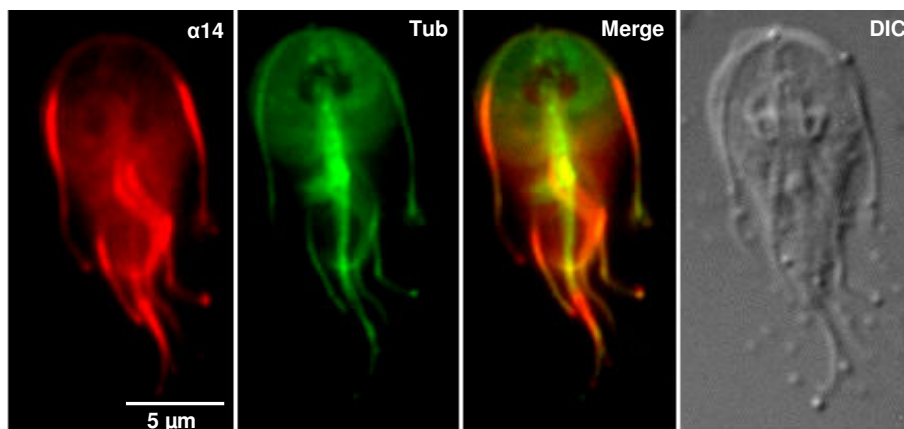
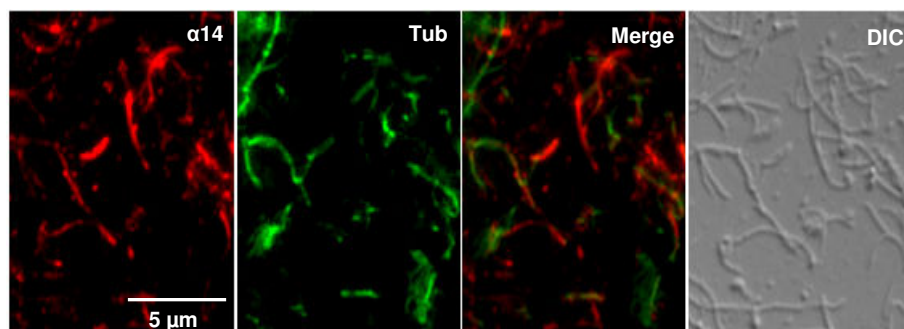
A**B**

Abb. 3.1.6: Immunocytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 14$ -Giardin und Tubulin in *G. lamblia*. Immunfluoreszenz-Aufnahmen von permeabilisierten Trophozoiten (**A**) isolierten Flagellen (**B**). $\alpha 14$, Markierung mit $\alpha 14$ -Antiserum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; Tub, Markierung mit anti-Tubulin-Antikörpern und CY2TM-konjugierten sek. Antikörpern; Merge, Doppelmarkierung mit anti- $\alpha 14$ - und anti-Tubulin-Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

3.1.6.2 Immuncytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 14$ -Giardin und giardialem Tubulin-Cytoskelett

Zur genaueren Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen $\alpha 14$ und den Mikrotubuli der Flagellen wurden Immunfluoreszenz-Aufnahmen an isolierten Cytoskeletten der Trophozoiten durchgeführt (Kap. 2.6.13). Anhand der isolierten Cytoskelette konnte nun mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie festgestellt werden, ob eine direkte Interaktion des $\alpha 14$ -Giardins mit den Axonema vorliegt. Zur exakten Lokalisierung des $\alpha 14$ wurden die Cytoskelette nicht nur mit dem anti- $\alpha 14$ -, sondern auch mit einem anti-Tubulin-Antiserum inkubiert, sodass eine Ko-Lokalisierung der beiden Proteine am Cytoskelett detektiert werden konnte. Wie in Abbildung 3.1.7 zu sehen ist, erzeugten sowohl der Antikörper gegen das $\alpha 14$ als auch das Prä-Immunsereum eine ähnliche Hintergrund-Fluoreszenz, währenddessen das aus ventraler Scheibe und acht Flagellenpaaren bestehende Tubulin-Cytoskelett gut zu erkennen ist. Aus diesem Grund ist eine direkte Interaktion unwahrscheinlich, es sei denn, an Mikrotubuli gebundenes $\alpha 14$ wäre bei der Durchführung des Versuches von dem Cytoskelett getrennt worden.

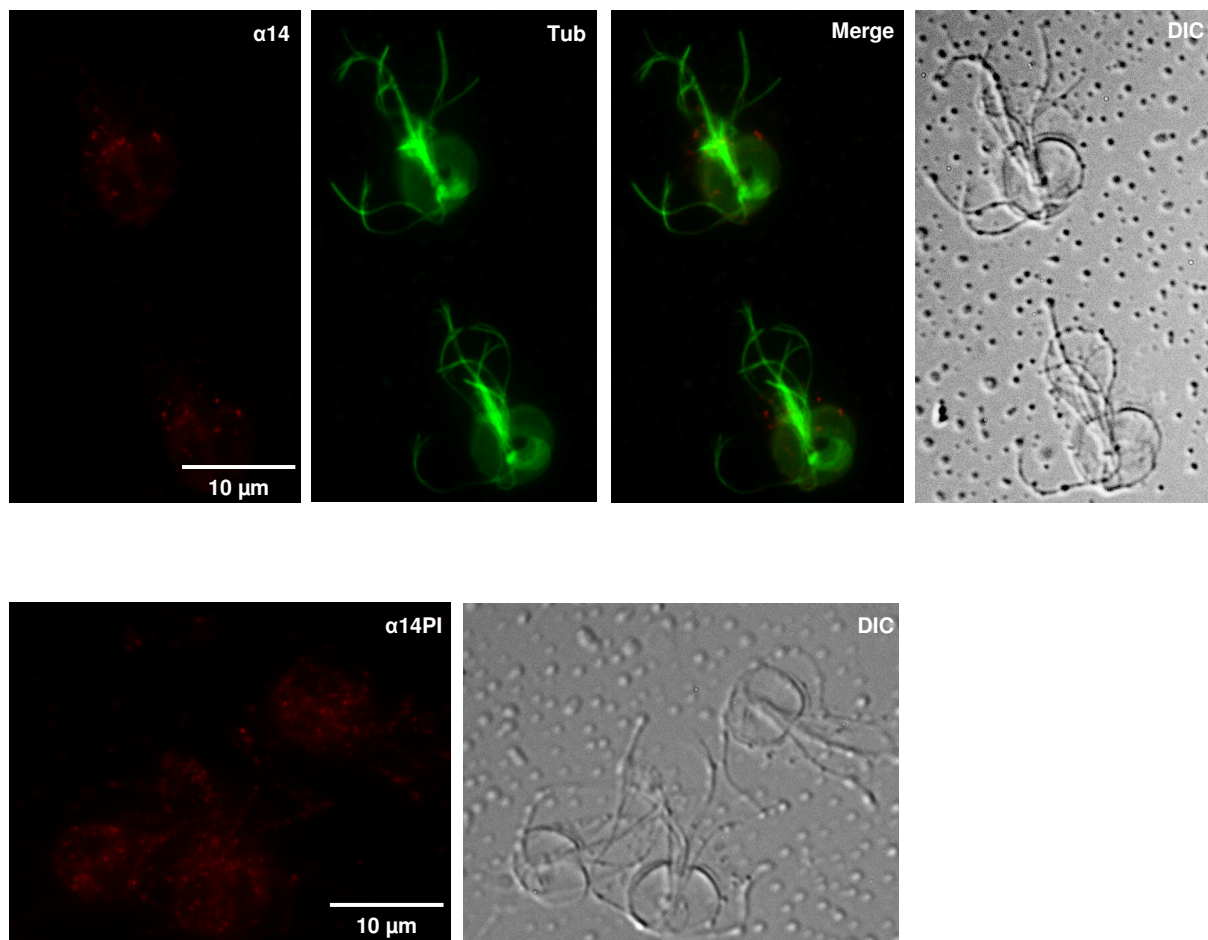


Abb. 3.1.7: Immuncytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 14$ -Giardin und giardialem Tubulin-Cytoskelett. $\alpha 14$, Markierung mit $\alpha 14$ -Antiserum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; Tub, Markierung mit anti-Tubulin-Antikörpern und CY2TM-konjugierten sek. Antikörpern; Merge, Doppelmarkierung mit anti- $\alpha 14$ - und anti-Tubulin-Antikörpern; $\alpha 14$ PI, Markierung mit Prä-Immunsereum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

Obwohl eine direkte Bindung des $\alpha 14$ an die Axonema aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen unwahrscheinlich war, bestand die Möglichkeit, dass die Wechselwirkung über ein Linkerprotein vermittelt wurde, da auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf eine Interaktion mit den Mikrotubuli hindeuteten (Kap. 3.1.3.2, Abbildung 3.1.4). Aus diesem Grund wurden die isolierten Cytoskelette vor der Antikörper-Inkubation mit entweder Rohextrakt (7,5 mg), rekombinanten $\alpha 14$ (1 mg) oder nacheinander mit beiden überschichtet, um eine Linker-vermittelte Interaktion feststellen zu können.

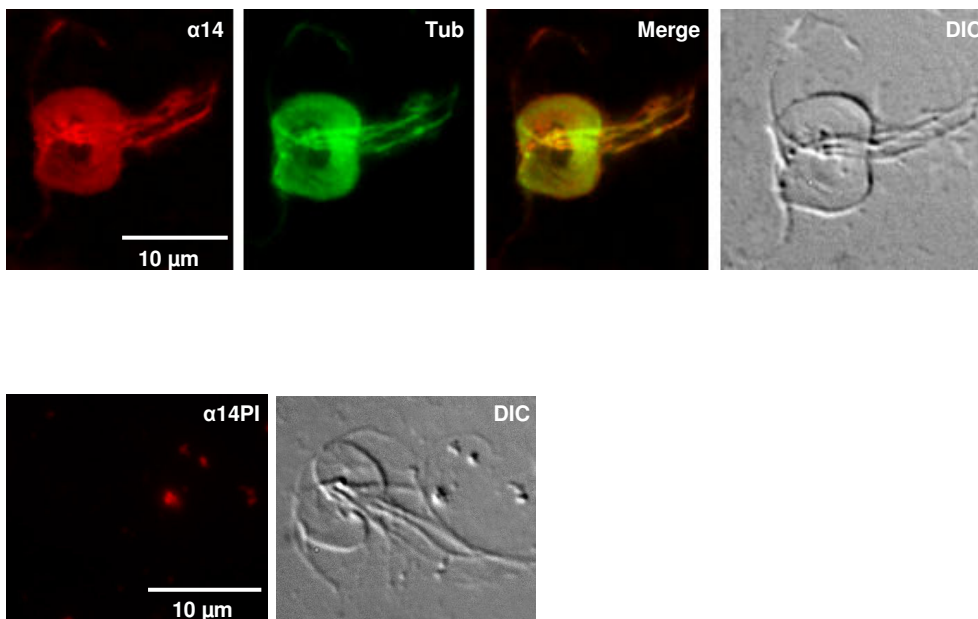


Abb. 3.1.8: Immunocytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 14$ -Giardin und giardialem Tubulin-Cytoskelett nach Inkubation mit rekombinanten $\alpha 14$. $\alpha 14$, Markierung mit $\alpha 14$ -Antiserum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; Tub, Markierung mit anti-Tubulin-Antikörpern und CY2TM-konjugierten sek. Antikörpern; Merge, Doppelmarkierung mit anti- $\alpha 14$ - und anti-Tubulin-Antikörpern; $\alpha 14$ PI, Markierung mit Prä-Immunsereum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

Bei der Überschichtung mit Zellextrakt war jedoch kein Unterschied im Vergleich zum Prä-Immunsereum zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Das Ausbleiben eines Signals nach der Inkubation mit Trophozoiten-Extrakt war wahrscheinlich auf die zu geringe Proteinmenge zurückzuführen. Im Gegensatz dazu war nach der Inkubation sowohl mit rekombinanten $\alpha 14$ (Abb. 3.1.8) als auch mit der Kombination aus Rohextrakt und $\alpha 14$ (Daten nicht gezeigt) eine Zunahme der Fluoreszenz über das ganze Cytoskelett zu erkennen. Dieses kann vermutlich auf ein unspezifisches Binden des rekombinanten Proteins zurückzuführen sein. Die Frage, ob das native $\alpha 14$ eine Wechselwirkung mit Tubulin eingehen kann, konnte durch diese Versuche somit noch nicht beantwortet werden.

3.1.7 Biochemische Untersuchungen an und Interaktionsstudien mit den potentiellen Bindepartnern α 7.3-Giardin bzw. Ser/Thr-Kinase

3.1.7.1 Herstellung rekombinanter Plasmidkonstrukte pET16b- α 7.3 und -STK

Neben dem Tubulin wurden durch Massenspektrometrie auch das α 7.3-Giardin und eine Ser/Thr-Kinase als mögliche Interaktionspartner des α 14-Giardins identifiziert. Um mögliche Wechselwirkungen zwischen diesen potentiellen Bindepartnern und dem α 14-Giardin auch biochemisch nachzuweisen, wurden Antikörper gegen die beiden Proteine benötigt. Aus diesem Grund mussten zunächst Plasmidkonstrukte mit den inserierten Genen von α 7.3 und der Ser/Thr-Kinase hergestellt werden (Kap. 2.5.20). Während das α 7.3-Gen in voller Länge in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert wurde, wurden bei der Kinase nur bestimmte Teilbereiche berücksichtigt. Nach der abgeleiteten Proteinsequenz der Ser/Thr-Kinase wird die N-terminale Kinase-Domäne (AS 10-280) durch eine Linkerregion mit einer Ankyrin-Domäne am C-Terminus (AS 508-676) verbunden. Während die Aktivitäten von Proteinen in vielen Fällen über Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen durch Proteinkinasen reguliert werden, ist das Ankyrinmotiv eines der am häufigsten in der Zelle vorkommenden Protein-Protein-Interaktionsmotive. Da theoretisch jede der beiden Domänen mit dem α 14-Giardin interagieren kann, wurden die verschiedenen Sequenzbereiche der einzelnen Domänen jede für sich in einen Expressionsvektor inseriert. Somit konnten die Domänen nach Überproduktion einzeln auf ihre Interaktion mit den α 14-Giardin untersucht werden. Anhand der Gensequenzinformationen aus NCBI-Datenbank wurden jeweils homologe Primer synthetisiert (Tab. 2.5), die entweder das α 7.3-Giardin-Gen flankierten oder zur Amplifikation der Gene für die Kinase-Domäne (STK) bzw. die Ankyrin-Domäne (Ank) der Ser/Thr-Kinase eingesetzt werden konnten. Die mittels PCR (Kap. 2.5.8) vermehrten Genfragmente wurden über Restriktionsschnittstellen letztendlich in einen Expressionsvektor inseriert und mit Hilfe eines Expressionsstammes heterolog exprimiert (Kap. 2.5.15-2.5.21). Das nachfolgende Schema (Abb. 3.1.9) verdeutlicht die einzelnen Klonierungsstrategien zur Konstruktion der rekombinanten Plasmide pET16b- α 7.3 und pET16b-STK (Anhang 7.6). pJC45-Ank wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von LUDWIG (2005) hergestellt und deswegen hier nicht weiter aufgeführt.

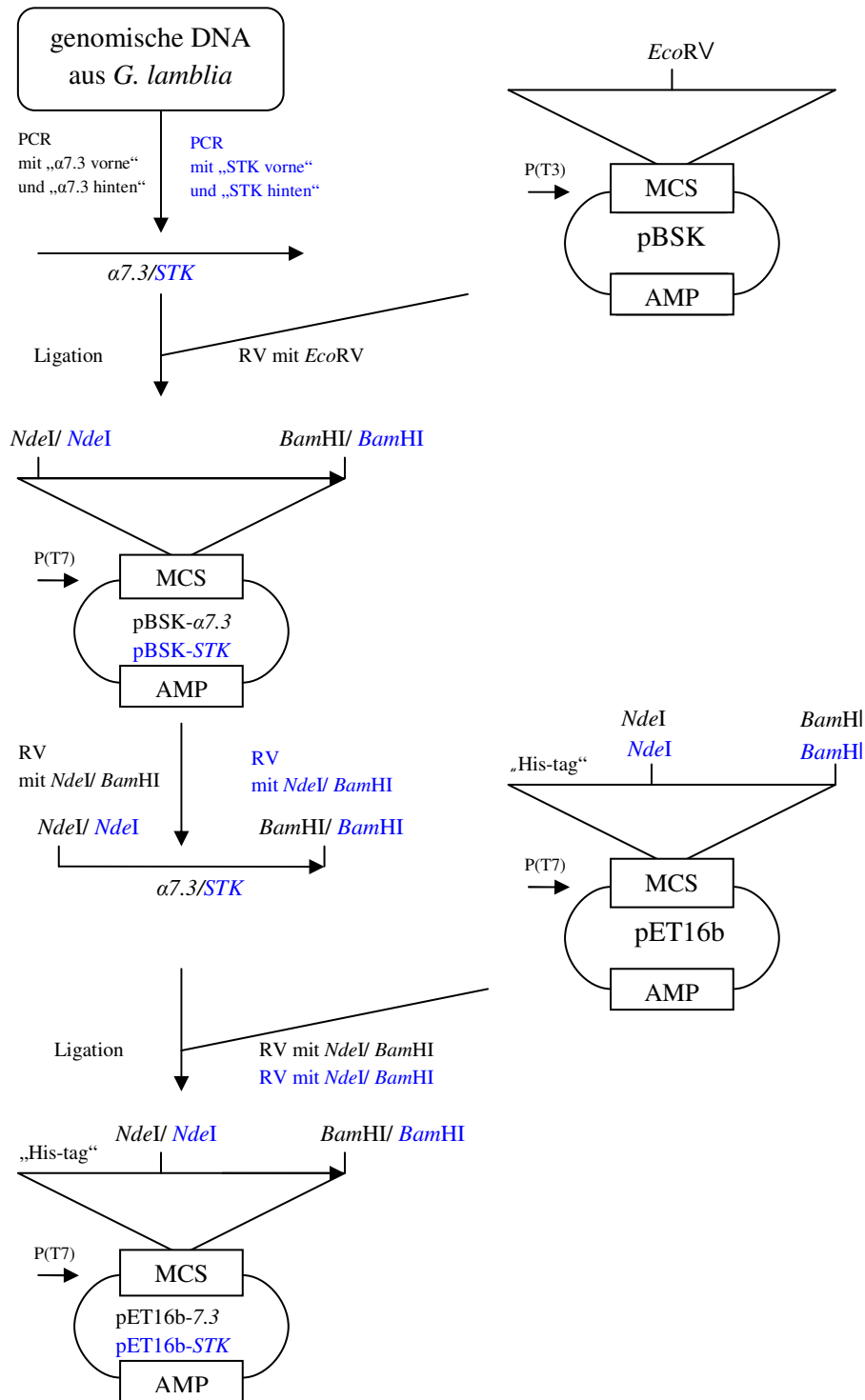


Abb. 3.1.9: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Plasmidkonstrukte pET16b- $\alpha 7.3$ und -STK. Die Konstruktion der Plasmide ist in Kapitel 2.5.20 detailliert beschrieben. Schwarz: Klonierung $\alpha 7.3$, blau: Klonierung STK. AMP, Ampicillin-Resistenz; MCS, „multiple-cloning-site“; „His-tag“, „Histidin-tag“; P(T3), T3-Promotor; P(T7), T7-Promotor; RV, Restriktionsverdau.

3.1.7.2 Heterologe Expression und Aufreinigung des rekombinanten $\alpha 7.3$ -Giardins sowie der Kinase- und der Ankyrin-Domäne

Zur heterologen Expression (Kap. 2.5.21) des rekombinanten $\alpha 7.3$ -Giardins sowie der Kinase- und der Ankyrin-Domäne wurden die konstruierten *E. coli*-Expressionsstämme BL21 (DE3) pLysS /pET16b- $\alpha 7.3$, BL21 (DE3) pLysS/pET16b-*STK* und BL21 (DE3) Rosetta/pJC45-*Ank* verwendet. Wie in Abbildung 3.1.10 A ersichtlich, wurden alle drei rekombinanten Proteine erfolgreich exprimiert, lagen jedoch in Einschlusskörpern vor und mussten vor der Aufreinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie mit 8 M Harnstoff solubilisiert werden (Kap. 2.6.2.1). Die Bestätigung der Expression wurde durch eine immunologische Detektion mittels anti-Penta-His-Antikörper erbracht, der gegen den „His₍₁₀₎-tag“ der Fusionsproteine gerichtet war (Abb. 3.1.10 B, Kap. 2.6.9).

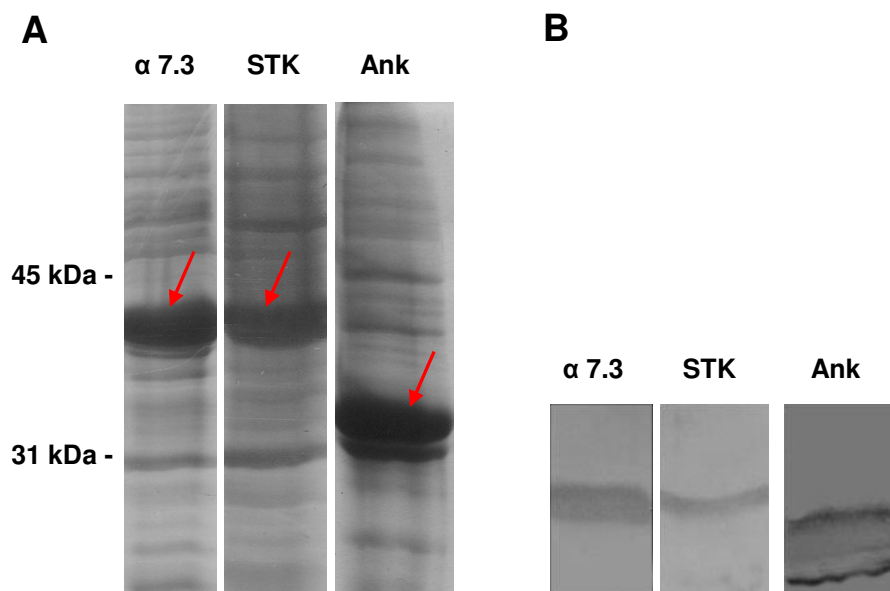
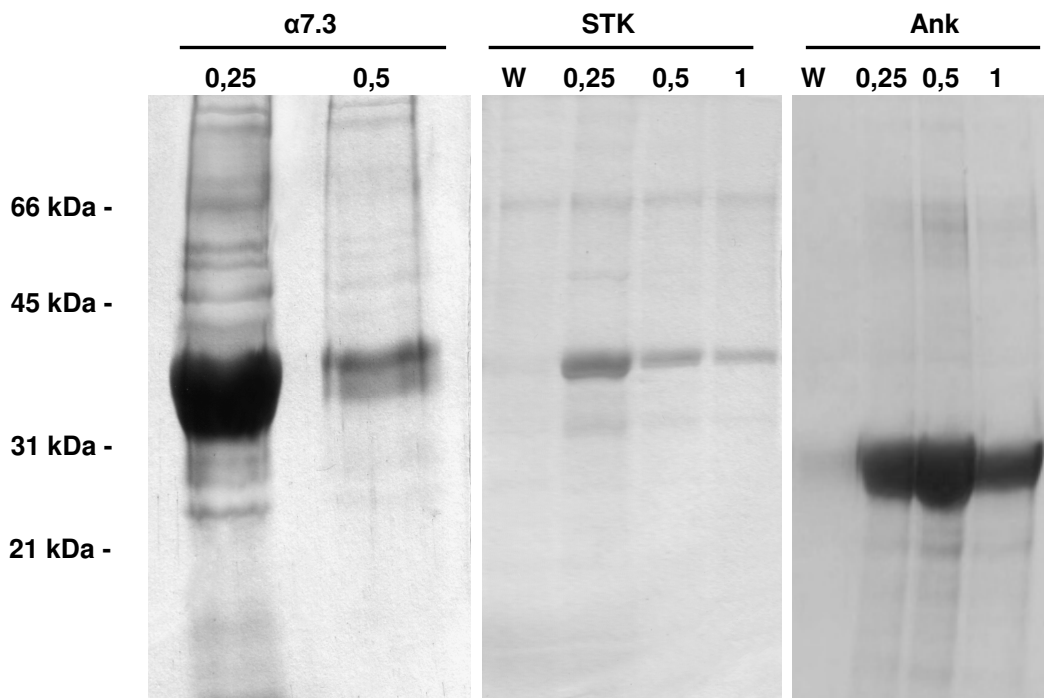


Abb. 3.1.10: SDS-PAGE und „Western Blot“ nach heterologer Expression von $\alpha 7.3$, STK und Ank. (A) SDS-PAGE mit den Pelletfraktionen nach 3-stündiger heterologer Expression von $\alpha 7.3$, STK und Ank (von links nach rechts). Rote Pfeile zeigen exprimierte Proteine. (B) „Western-Blot“ der Pelletfraktionen mit anti-Penta-His Antikörpern (Tab. 2.2). Ca. 20 μ g Gesamtprotein aus Pelletfraktion pro Spur.

Die erhaltenen Elutionsfraktionen nach Aufreinigung der jeweiligen rekombinanten Proteine mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie sind in Abbildung 3.1.11 dargestellt. Diese zeigt eine deutliche Anreicherung des jeweiligen Proteins.



3.1.11: Aufreinigung von $\alpha 7.3$, STK und Ank mittels Ni-NTA. SDS-Gel mit verschiedenen Fraktionen (je 30 μ l jeder Fraktion) der Aufreinigung von $\alpha 7.3$, STK und Ank (von links nach rechts). W, letzter Waschschrift; 0,25-0,1, Elutionsfraktionen mit 0,25 – 1 M Imidazol. Molekulargewichte der rekombinanten Proteine: 35,5 kDa für $\alpha 7.3$, 36,7 kDa für STK und 28,0 kDa für Ank.

Nach Reinigung und Dialyse (Kap. 2.6.5) betrug die Proteinausbeute für das $\alpha 7.3$ und die Ankyrin-Domäne 0,6 mg/ml, für die Kinase-Domäne hingegen 0,1 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 5 ml. Die aufgereinigten Proteine wurden im Anschluss zur Gewinnung von spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kap. 2.6.11) gegen das $\alpha 7.3$ -Giardin, die Kinase-Domäne bzw. die Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase eingesetzt.

3.1.7.3 Interaktionsnachweis mittels „Far Western“-Analyse

Durch eine „Far Western“-Analyse (Kap. 2.6.10) sollte geklärt werden, ob das $\alpha 7.3$ -Giardin oder die Kinase- bzw. Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase eine Bindeaffinität zum $\alpha 14$ -Giardin aufwies. Hierfür wurden jeweils die rekombinanten Proteine ($\alpha 7.3$, STK und Ank) nach SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Kap. 2.6.9) und diese anschließend mit rekombinanten $\alpha 14$ inkubiert. Bei bestehender Interaktion würde das $\alpha 14$ auf der Höhe des möglichen Bindepartners mittels immunologischer Detektion nachzuweisen sein. Abbildung 3.1.12 zeigt eine positive Reaktion für alle drei rekombinanten Proteine, wohingegen das als Negativkontrolle eingesetzte BSA offensichtlich keine Bindung mit dem Giardin einging. Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme einer möglichen Wechselwirkung zwischen den identifizierten Bindepartnern und dem $\alpha 14$ -Giardin.

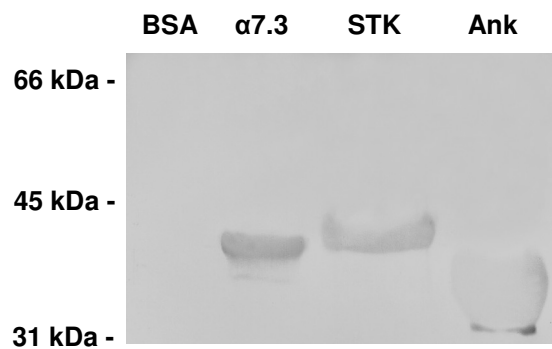


Abb. 3.1.12: „Far Western“-Analyse mit rekombinanten α 7.3, STK und Ank. Nach Auftrennung der rekombinanten Proteine (je 3 μ g) und Inkubation mit α 14 wurde ein immunologischer Nachweis mittels α 14-Antisera (Tab. 2.2) durchgeführt.

3.1.7.4 Immunocytochemische Ko-Lokalisierung von α 14-Giardin mit den potentiellen Bindepartnern

Zur Bestätigung der mittels „Far Western“-Analyse (Kap. 2.6.10) nachgewiesenen Interaktionen zwischen dem α 7.3-Giardin, der Kinase- und der Ankyrin-Domäne mit dem α 14-Giardin wurden immunocytochemische Ko-Lokalisierungsstudien an permeabilisierten Trophozoiten von *G. lamblia* durchgeführt (Kap. 2.6.13). Bei einer Interaktion mit α 14 sollte das jeweilige Protein zumindest teilweise in den Flagellen zu finden sein. Die fixierten und permeabilisierten Trophozoiten wurden sowohl mit dem α 14-Antiserum als auch mit den gegen die Bindepartner gerichteten Antisera inkubiert. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe an den sekundären Antikörpern machten einen Nachweis der Proteine in der Zelle möglich. Während sich die Kinase vorwiegend an der Innenseite der Plasmamembran des Zellkörpers befand (Abb. 3.1.13 B und C), aber auch eine leichte Fluoreszenz in den Flagellen zeigte, war das α 7.3 homogen im Zellkörper verteilt (Abb. 3.1.13 A). Im Gegensatz zur „Far Western“-Analyse ließen diese immunocytochemischen Studien somit keine Ko-Lokalisierung von α 14 und α 7.3 in den Flagellen erkennen, womit eine Wechselwirkung der beiden Proteine unwahrscheinlich wurde. Ein in Anschluss durchgeführter „Western Blot“ (Kap. 2.6.9) mit isolierten Flagellen bestätigte zusätzlich das Vorkommen des Ser/Thr-Kinase in den Flagellen (Abb. 3.1.13 D), womit eine Wechselwirkung von der Kinase mit dem α 14-Giardin wahrscheinlich war.

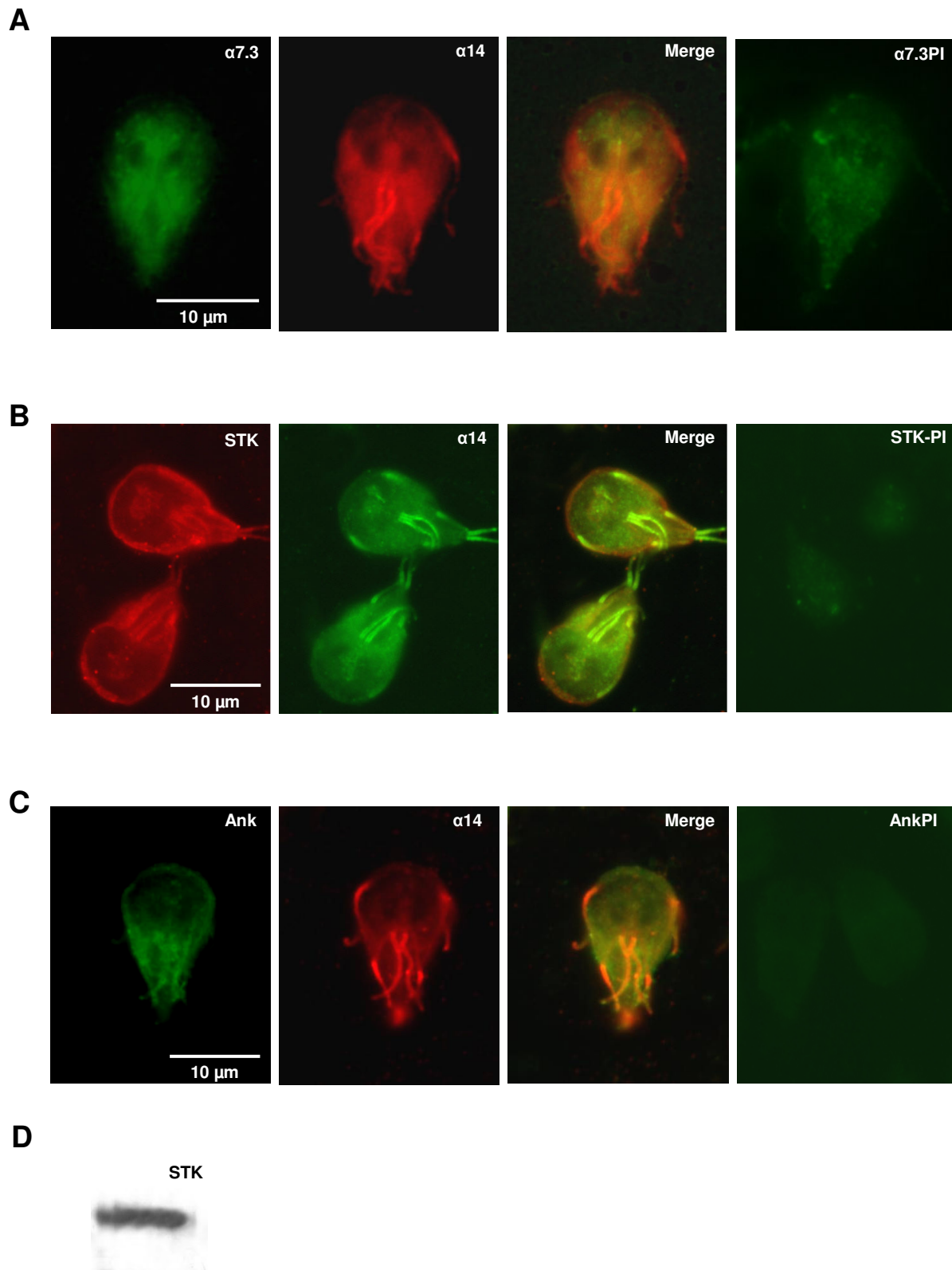


Abb. 3.1.13: Immunocytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 14$ -Giardin mit den möglichen Bindepartnern in *G. lamblia*. Immunfluoreszenz-Aufnahmen an permeabilisierten Trophozoiten. Ko-Lokalisierung von $\alpha 14$ mit dem $\alpha 7.3$ -Giardin (**A**), der Kinase-Domäne (**B**) und der Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase (**C**). Nachweis der STK mittels „Western Blot“ von isolierten Flagellen (**D**). $\alpha 14$, Markierung mit $\alpha 14$ -Antiserum und CY3™- bzw. CY2™ (im Fall von STK) -konjugierten sek. Antikörpern; $\alpha 7.3$, Markierung mit $\alpha 7.3$ -Antiserum und CY2™-konjugierten sek. Antikörpern; STK, Markierung mit STK-Antiserum und Alexa568® oder HRP-gekoppelten sek. Antikörpern; Ank, Markierung mit Ank-Antiserum und Alexa488® sek. Antikörpern; Merge, Doppelmarkierung mit $\alpha 14$ - und jeweiligem Bindepartner-Antiseren; PI, Markierung mit jeweiligem Prä-Immunsereum; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

3.1.7.5 Untersuchung zur Interaktion der Bindepartner mittels „Yeast-Two-Hybrid“-System

Mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems (Kap. 2.7) wurden die potentiellen Protein-Interaktionen zwischen dem α 14-Giardin und den möglichen Bindepartnern auf genetischem Weg untersucht. Auch war eine genauere Analyse, welche Domäne der Ser/Thr-Kinase zur potentiellen Interaktion beiträgt, möglich. Da bereits bekannt war, dass die im Rahmen der Diplomarbeit von S. WELLING (2007) hergestellten Plasmidkonstrukte (Tab. 2.7) weder eine transkriptionale Aktivität (Kap. 2.7.6) noch einen toxischen Einfluss auf das Wachstum der Hefezellen ausübten (Kap. 2.7.7), konnten nach Paarungen der Hefezellen (Tab. 2.8) alle hergestellten Fusionsstämme mit Hilfe eines „Drop Dilution Assays“ (Kap. 2.7.3) auf die mögliche Protein-Protein-Interaktion untersucht werden. Abbildung 3.1.14 A zeigt den durchgeführten Tropftest der gepaarten Fusionsstämme auf den verschiedenen Selektionsmedien.

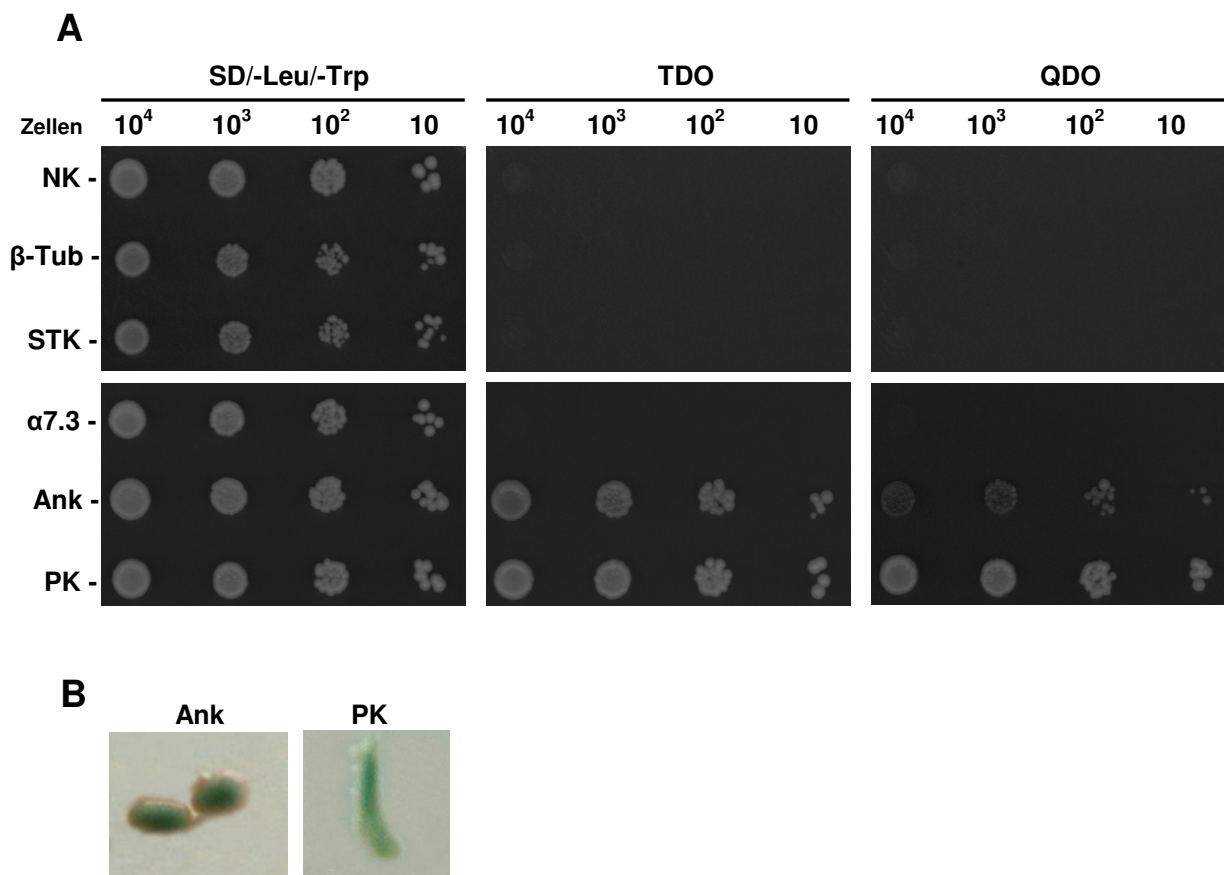


Abb. 3.1.14: Wachstumsnachweis der Fusions-Hefestämme auf verschiedenen Selektionsmedien. (A) Tropftest mit 10 - 10^4 Zellen der jeweiligen gepaarten Stämme auf SD/ -Leu/ -Trp, TDO und QDO. β -Tub/STK/ α 7.3/Ank, jeweiliges pGADT7-Konstrukt gepaart mit pGBKT7- α 14; NK, Negativkontrolle; PK, Positivkontrolle. (B) Wachstum des Fusionsstamms (pGADT7-Ank gepaart mit pGBKT7- α 14) und der Positivkontrolle auf QDO + α -X-Gal.

Die durchgeführten Kombinationen der *Bait + Prey*-Paarung zeigten (Abb. 3.1.14 A), dass die Wechselwirkungen von $\alpha 14$ mit $\alpha 7.3$ -Giardin, β -Tubulin und der Kinase-Domäne der Ser/Thr-Kinase auf genetischer Ebene nicht bestätigt werden konnten. Diese Fusionstämme zeigten ausschließlich ein Wachstum auf den SD/ -Leu/ -Trp- Platten, die zum Nachweis der erfolgreichen Paarung dienen.

Eine positive Interaktion konnte nur bei der Paarung zwischen $\alpha 14$ und der Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase festgestellt werden, da die auf dem speziellen Selektionsmedium gewachsenen Kolonien einen blauen Phänotyp zeigten (Abb. 3.1.14 B). Somit hatten sich durch die Wechselwirkung von $\alpha 14$ und der Ankyrin-Domäne auch die Binde- und Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors gefunden und einen intakten Faktor gebildet. Der Faktor induzierte daraufhin die Expression der Reportergene, sodass der Fusionsstamm auf dem Selektionsmedium ohne Histidin und Adenin wachsen konnte. Gleichzeitig katalysierte die exprimierte α -Galaktosidase einen Farbumschlag des zugegebenen Farbreagens, der optisch als Blaufärbung der Kolonien sichtbar wurde. Die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen wurden in gleicher Weise wie oben beschrieben behandelt und dienen zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems. Die Positivkontrolle bestand aus pGBKT7 + p53, während die Negativkontrolle dem Konstrukt pGBKT7 + lam entsprach. Der Interaktionsvektor für beide Kontrollen war jeweils pGADT7 -recT. Beide Kontrollen entsprachen den Erwartungen. Die Positivkontrolle wuchs nach der Paarung auf allen Selektionsmedien (Abb. 3.1.14 A+B), während die Negativkontrolle nur ein Wachstum auf den SD/ -Leu/ -Trp-Platten zeigte (Abb. 3.1.14 A).

3.1.7.6 Expressionsnachweis der Interaktionspartner in Hefe

Zum Nachweis der Expression sowohl des $\alpha 14$ -Giardins als auch der Ankyrin-Domäne in Hefe wurde wie in Kapitel 2.7.10 beschrieben eine Immunpräzipitation durchgeführt. Da die verwendeten Vektoren neben den Promotoren für die Binde- oder Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors auch einen T7-Promotor aufwiesen, wurden nicht nur die Fusionsproteine $\alpha 14$ +BD bzw. Ank+AD exprimiert, sondern auch die mit einem „tag“ versehenen Fusionsproteine („ $\alpha 14$ +cMyc-tag“ oder „Ank+HA-tag“). Mittels gegen die „tags“ gerichteter Antikörper konnten nun die exprimierten Proteine aus dem Heferohextrakt präzipitiert und immunologisch nachgewiesen werden. Die mit den grünen Pfeilen gekennzeichneten Banden in der Abbildung 3.1.15 zeigen jeweils das nachzuweisende exprimierte Protein ($\alpha 14$ +cMyc 37,3 kDa; Ank+HA 28,4 kDa). Um was es sich bei der höhermolekularen Proteinbande (rote Pfeile), die in den Spuren 3 und 4 auf der gleichen Höhe zu sehen ist, handelt, bleibt unklar. Ein möglicher Proteinkomplex aus beiden

Bindepartnern konnte nicht angenommen werden, da dieser eine andere Molekülgröße aufweisen müsste. Zur Bestätigung, dass die jeweiligen Antikörper auch das mit einem „tag“ versehene Protein erkennen konnten, wurden zwei Hefestämme mitgeführt, wobei einer das TCO89-Protein mit „cMyc-tag“ und der andere das TCO89-Protein mit „HA-tag“ exprimierte. In Spur 2 des Bildes 3.1.15 repräsentiert die oberste Bande das 108,8 kDa große cMyc-gekoppelte TCO89-Protein (TCO89 88,8 kDa + cMyc-tag 20 kDa), die beiden unteren Banden sind auf die Antikörperketten zurückzuführen. Auch die Detektion des exprimierten TCO89+HA verlief erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Der als Negativkontrolle verwendete Wildtypstamm AH109 (Spur 1) sollte etwaige Kreuzreaktionen des Antikörpers ausschließen. Er zeigte, wie erwartet, weder nach Inkubation mit dem anti-cMyc- (Spur 1, Abb. 3.1.15) noch mit dem anti-HA-Antikörper (Daten nicht gezeigt) eine Reaktion.

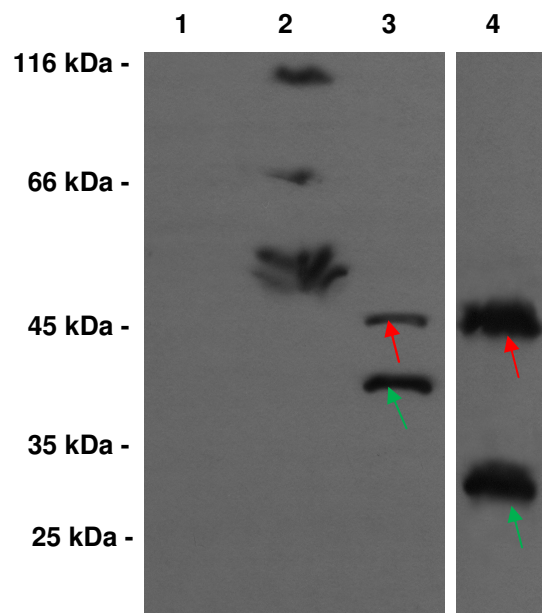


Abb. 3.1.15: „Western Blot“ der Immunpräzipitation zum Expressionsnachweis der möglichen Bindepartner in Hefe. Durchführung wie in Kapitel 2.7.10 beschrieben. Inkubation des mit Sepharose G-Beads behandelten Zellextrakts. Spur 1, Wildtypstamm AH109 mit anti-cMyc-Antiserum; Spur 2, Zellextrakt der Positivkontrolle (TB50 MATa *TCO89-13myc-kanMX6*) mit cMyc-Antiserum; Spur 3, Fusionsstamm (pGADT7-Ank gepaart mit pGBKT7- α 14) mit cMyc-Antiserum; Spur 4, Fusionsstamm (pGADT7-Ank gepaart mit pGBKT7- α 14) mit HA-Antiserum; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

3.1.8 Phosphorylierungsnachweis des α 14-Giardins

Die Interaktion zwischen der Ankyrin-Domäne mit dem α 14-Giardin deutet auf die Möglichkeit einer Phosphorylierung des gebundenen α 14-Giardins durch die Kinase-Domäne der Ser/Thr-Kinase hin. Zur Ermittlung der theoretischen Phosphorylierungsstellen innerhalb der α 14-Sequenz wurde das Computerprogramm „NetPhos 2.0“ und „NetPhosK 1.0“ verwendet (Anhang 7.3). Für sechs der mit „NetPhos 2.0“ ermittelten potentiellen Phosphorylierungsstellen (Abb. 3.1.16) wurde eine Phosphorylierungswahrscheinlichkeit von über 90% vorhergesagt. Kombiniert mit dem Programm NetPhosK 1.0 (BLOM *et al.*, 2004), welches Kinase-spezifische Phosphorylierungsstellen in Eukaryonten feststellt und eine Reihe spezieller Kinasen berücksichtigt, war die wahrscheinlichste Phosphorylierungsstelle am Threonin 178 mit einem Score von 0,91. Um die Phosphorylierungsannahme experimentell zu untermauern, wurden verschiedene Nachweisreaktionen durchgeführt.

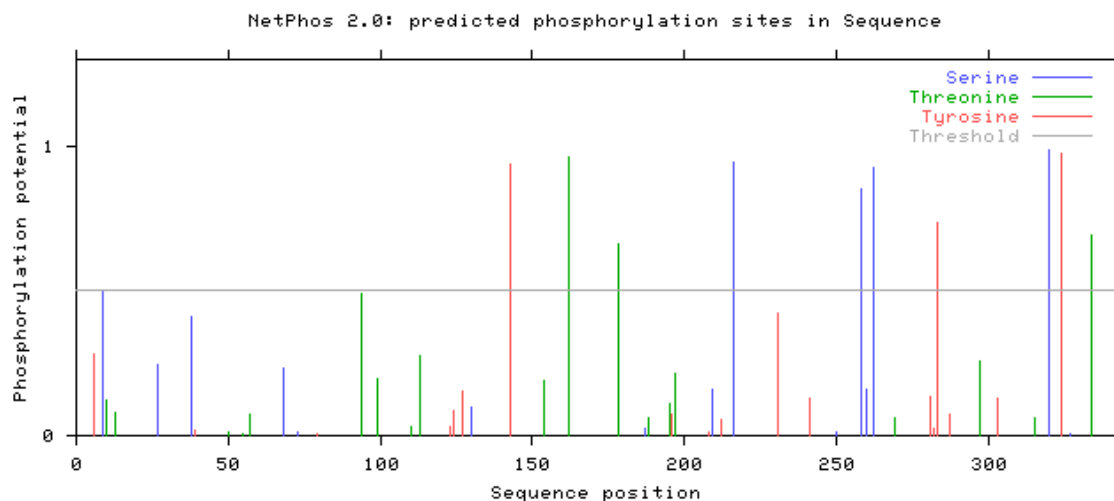


Abbildung 3.1.16.: Potentielle Phosphorylierungsstellen des α 14-Giardins. Online-Sequenzanalyse mit „NetPhos 2.0“.

Zunächst erfolgten Kinasetests mit dem Zellextrakt von *G. lamblia* mittels Phosphorylierungsversuchen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markiertem ATP (Kap. 2.6.19). Dazu wurde *G. lamblia*-Rohextrakt und die Elutionsfraktion nach Affinitätschromatographie an α 14-Sepharose 4B (Kap. 2.6.2.2) auf eine Autophosphorylierung der Kinase und eine mögliche Phosphorylierung des α 14 überprüft.

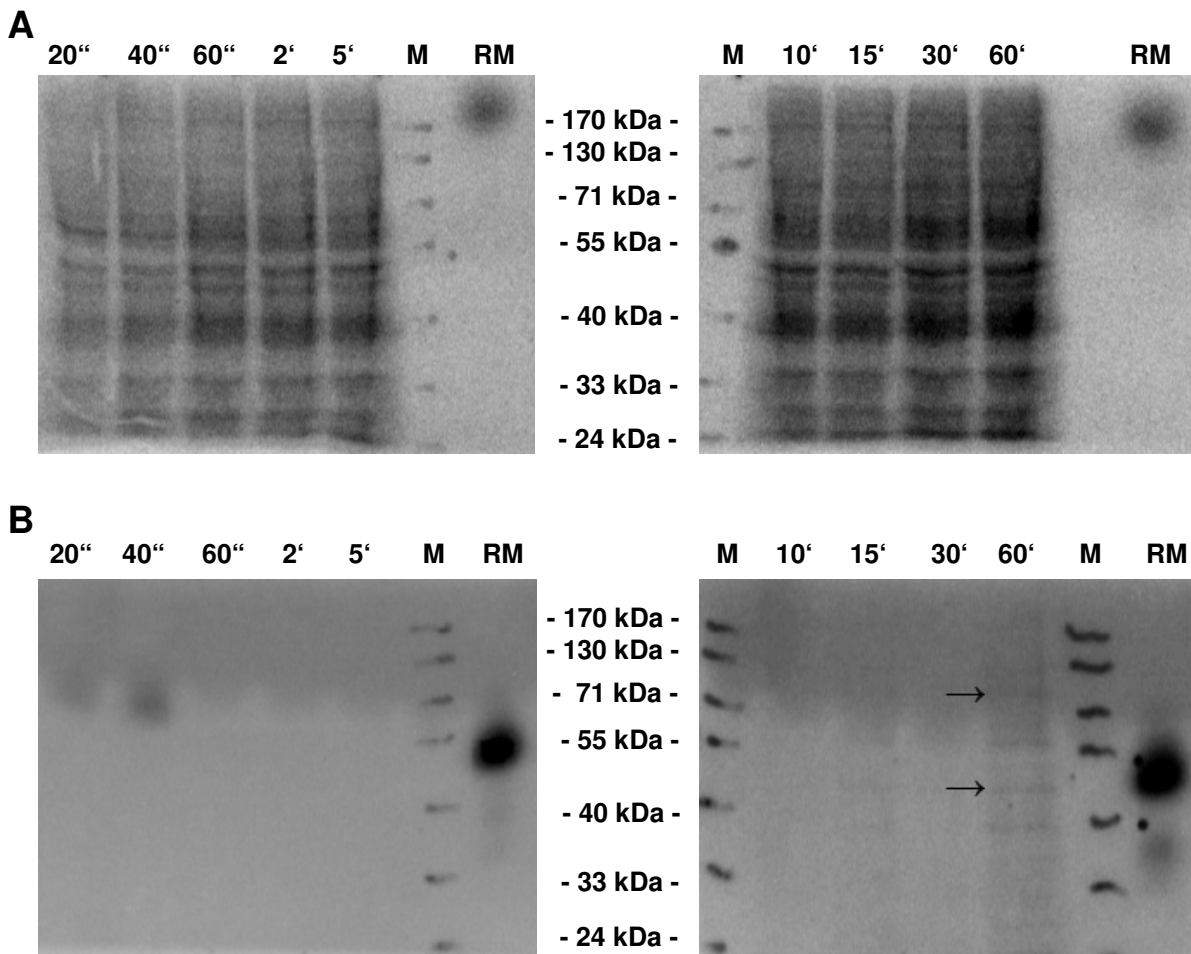


Abb. 3.1.17: Autoradiographische Analyse phosphorylierter Proteine nach SDS-PAGE. A: Rohextrakt aus *G. lamblia*. **B:** Elutionsfraktion nach Affinitätschromatographie an α 14-Sepharose 4B unter Calcium-Zugabe. Die Gele wurden **(A)** 90 min und **(B)** \bar{u} N exponiert. Die Zahlenwerte oberhalb der jeweiligen Abbildungen geben die Phosphorylierungsdauer an. M, Molekulargewichtsstandard „pageruler“ (MBI Fermentas); RM, Radioaktivstandard.

Das Vorhandensein einer allgemeinen Kinaseaktivität im Zellextrakt wurde durch die Zunahme der Signalintensität bei fortschreitender Reaktionsdauer deutlich (Abb. 3.1.17 A). Dabei fielen im Gel einzelne Banden um die 40 bis 60 kDa auf, die eine stärkere Schwärzung als die Restproteine aufwiesen. Bei der Untersuchung der Elutionsfraktion (Abb. 3.1.17 B, Kap. 3.1.4) konnte erst nach 60-minütiger Exposition ein Bandenmuster mit definierten Banden in Höhe von ca. 38, 43, 55, 80 und 120 kDa detektiert werden. Der obere Pfeil in der Abbildung weist auf die potentiell autophosphorylierte Ser/Thr-Kinase hin, während der untere das mögliche phosphorylierte α 14-Giardin kennzeichnet.

Zur Überprüfung, ob es sich bei der unteren Bande um ein α -Giardin handeln könnte, wurden die löslichen α -Giardine wie in Kapitel 2.6.17 beschrieben unter Zugabe eines Phosphatase-Inhibitor-Cocktails aus dem Zellextrakt isoliert. Als Nachweis der erfolgreichen Isolierung

wurde eine „Western Blot“-Analyse mit dem Proteingemisch durchgeführt, bei der gegen das α 1-, das α 2- und das α 14-Giardin gerichtete Antikörper eingesetzt wurden (Abb. 3.1.18).

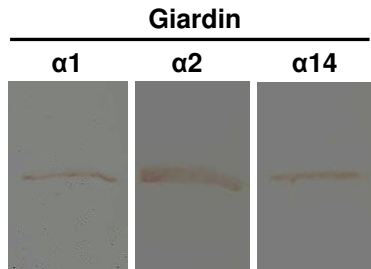


Abb. 3.1.18: Immunologischer Nachweis verschiedener α -Giardine nach Isolierung aus dem Zellektrakt. Je 5 μ g des Proteingemischs wurden pro Spur aufgetragen und mit entweder α 1-, α 2- oder α 14-Antiserum behandelt. Als sekundärer Antikörper diente anti-Kaninchen-HRP konjugierter-Antikörper (Tab. 2.2).

Darauffolgend wurden die isolierten α -Giardine zur Detektion von Phosphoproteinen im SDS-Gel (Abb. 3.1.19, Kap. 2.6.8.3) eingesetzt. Neben diesen und dem zu untersuchenden Rohextrakt dienten Chymotrypsin als Negativ- und phosphoryliertes Tau (Mikrotubuli-assoziiertes Protein) als Positivkontrolle.

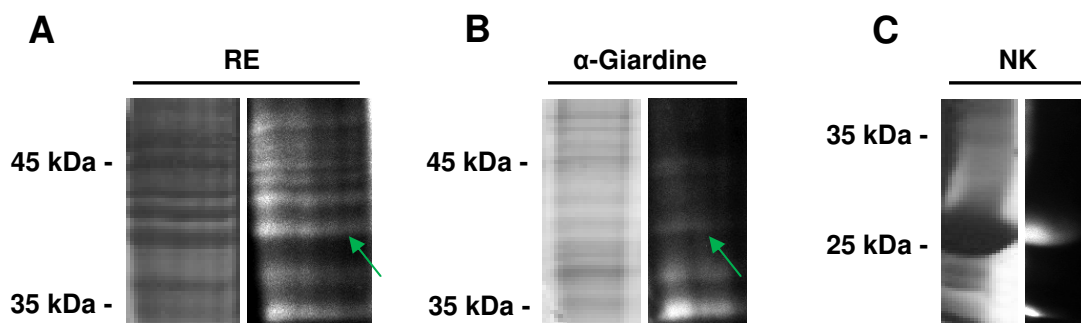


Abb. 3.1.19: Phosphorylungsnachweis mittels „Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain“-Kit. Coomassie-gefärbtes SDS-Gel im Vergleich zum Phosphorylungsgel mit 10 μ g Zellektrakt (in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren) (A), 10 μ g isolierter α -Giardine (in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren) (B), 50 μ g Chymotrypsin als Negativkontrolle (C). Grüner Pfeil kennzeichnet das α 14-Giardin.

In der SDS-PAGE in Abbildung 3.1.19 A und B ist zu sehen, dass sowohl im Zellektrakt als auch bei den isolierten α -Giardinen die gleichen Banden leuchteten. Die grünen Pfeile kennzeichnen dabei das mittels „Western Blot“ detektierte α 14-Giardin. Die Positivkontrolle zeigte die erwartete Tau-Bande bei 65 kDa und auch das sich im Marker befindliche phosphorylierte Ovalbumin fluoreszierte (Daten nicht gezeigt). Jedoch war auch eine leichte Fluoreszenz der Negativkontrolle zu verzeichnen (Abb. 3.1.19 C).

Als letzten Nachweis der potentiellen Phosphorylierung von $\alpha 14$ wurde eine Metallhydroxid-Affinitätschromatographie nach WOLSCHIN *et al.* (2005) durchgeführt (Kap. 2.6.2.3). Das hier verwendete Aluminiumhydroxid bindet an negativ-geladene Phosphatgruppen phosphorylierter Proteine und ermöglicht so deren Anreicherung und Aufreinigung. Wie in Abbildung 3.1.20 A zu sehen ist, entsprachen die mitgeführten Kontrollproteine den Erwartungen. Das nicht phosphorylierte Lysozym (grüner Pfeil) konnte nicht an das Aluminiumhydroxid binden und wurde durch die erfolgten Waschschrte vollständig von der Matrix entfernt, wohingegen das phosphorylierte Ovalbumin (roter Pfeil) erst nach der Verdrängungsreaktion mit Natriumpyrophosphat von der Säule eluierte. Bei der Aufreinigung der Phosphoproteine aus dem *G. lamblia*-Rohextrakt wurde die Matrix solange mit Waschpuffer inkubiert, bis keine Proteine mehr nachweisbar waren. Die erhaltene Elutionsfraktion nach Einsatz des Natriumpyrophosphats wurde aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration komplett gefällt und für eine „Western Blot“-Analyse verwendet. Der immunocytochemische Nachweis des $\alpha 14$ -Giardins bestätigte die Vermutung eines phosphorylierten $\alpha 14$ -Giardins in *G. lamblia* (Abb. 3.1.20 B).

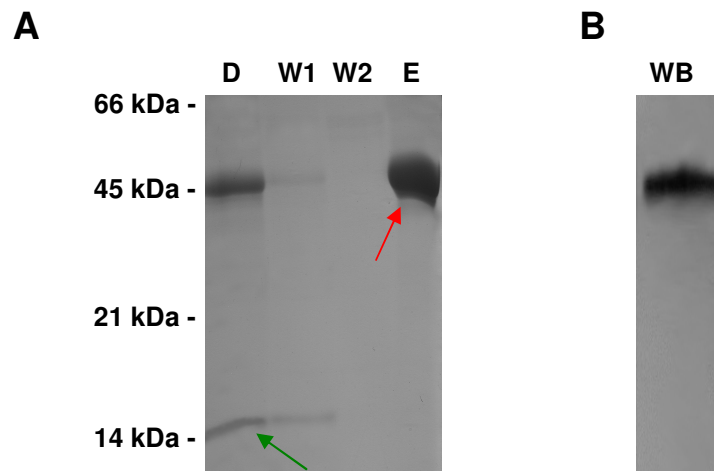


Abb. 3.1.20: Aluminiumhydroxid-Affinitätschromatographie mit denaturiertem Zellextrakt zur Anreicherung von Phosphoproteinen. (A) SDS-PAGE mit den erhaltenen Fraktionen nach Affinitätschromatographie mit den Kontrollproteinen. (B) „Western Blot“ mit der Elutionsfraktion nach der Affinitätschromatographie mit *G. lamblia*-Rohextrakt. D, Durchlauf; W1 & W7, Waschschrte; E, Elution mit Natriumpyrophosphat (D, W1, W7, E zeigen Fraktionen der Chromatographie mit den Kontrollproteinen auf dem SDS-Gel). Grüner Pfeil kennzeichnet das nicht-phosphorylierte Lysozym, roter Pfeil das phosphorylierte Ovalbumin. WB, „Western Blot“ des Eluats nach Chromatographie mit Zellextrakt, immunodekoriert mit $\alpha 14$ -Antiserum (Proteinmengen siehe Kapitel 2.6.2.3).

3.1.9 Nachweise zur Oligomerisierungsfähigkeit des α 14-Giardins

3.1.9.1 Detektion von α 14-Oligomeren bei Verwendung des Sulfo-SBED-Crosslinkers

Das eigentlich zur Fahndung nach potentiellen Interaktionspartnern von α 14 eingesetzte „ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer-Kit“ erbrachte den ersten Hinweis, dass das α 14-Giardin die Fähigkeit zur Oligomerisierung besitzt. Der genaue Reaktionsmechanismus des Crosslinkers ist in Kapitel 2.6.20 beschrieben. Nach Beendigung der Crosslinkerreaktion sollten mögliche Bindepartner des α 14-Giardins mittels „Western Blot“-Analyse (Kap. 2.6.9) detektiert werden können.

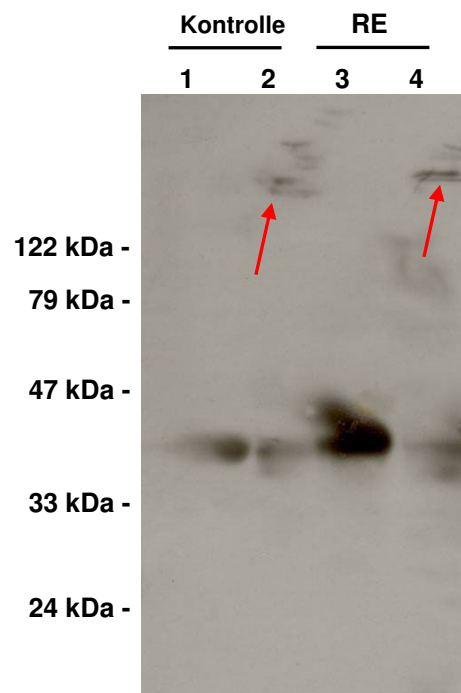


Abb. 3.1.21: „Western Blot“ nach Einsatz des „ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer-Kit“. „Western-Blot“ mit α 14-Sulfo-SBED-Crosslinker vor Inkubation mit Rohextrakt (Spuren 1 und 2) und nach Inkubation mit Rohextrakt (Spuren 3 und 4). Anwesenheit von DTT (Spuren 1 und 3), Abwesenheit von DTT (Spuren 2 und 4). Inkubation mit α 14-Antiserum. Rote Pfeile zeigen potentielle Oligomere.

In Abbildung 3.1.21 ist eine der durchgeführten „Western Blot“-Analyse dargestellt. Dabei diente der Crosslinker, der ausschließlich mit dem α 14 gekoppelt war, als Kontrolle. Dieser sollte sowohl mit und auch ohne Zugabe von DTT zur Probe jeweils ein Signal für α 14 nach Inkubation mit dem α 14-Antiserum zeigen. Bei der Immundekoration mit dem Streptavidin-Antikörper hingegen sollte in Anwesenheit von DTT kein Signal und in Abwesenheit von DTT das α 14-Giardin nachgewiesen werden. Oligomere sollten gar nicht zu sehen sein. Die „Western Blot“-Analyse zeigte jedoch abweichende Ergebnisse. Sowohl der anti- α 14- als auch der Streptavidin-Antikörper zeigten das gleiche Verhalten. Beide Antikörper konnten ein Protein auf der α 14-Höhe sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DTT detektieren (Spur 1). Unter nicht-reduzierten Bedingungen zeigten sich zusätzlich höher molekulare Banden

(Spur 2, roter Pfeil). Das gleiche Bild zeigte sich auch, wenn der $\alpha 14$ -gekoppelte Crosslinker mit *G. lamblia*-Rohextrakt inkubiert und der Ansatz anschließend eine „Western Blot“-Analyse unterzogen wurde (Spuren 3 und 4). Zur Überprüfung, dass das $\alpha 14$ auch das von dem Streptavidin-Antikörper detektierte Protein war, wurde der Blot erneut mit dem $\alpha 14$ -Antiserum inkubiert. Auch hier zeigten sich die gleichen Proteinbanden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass das $\alpha 14$ unter nicht-reduzierten Bedingungen Oligomere bildet (Spuren 2 und 4, rote Pfeile), welche sich schon vor oder während der Inkubation mit dem Crosslinker gebildet hatten.

3.1.9.2 Nachweis der reversiblen Oligomerisierung des $\alpha 14$ -Giardins

Zur Bestätigung, dass das $\alpha 14$ -Giardin, welches neun Cystenreste enthält, unter nicht-reduzierten Bedingungen wirklich in der Lage war, Oligomere auszubilden, wurde ein Nachweis auf intra- und intermolekulare Disulfidbrücken nach ALLORE und BARBER (Kap. 2.6.21) durchgeführt. Diese Methode beruht auf ein signifikantes Laufverhalten eines Proteins in Abhängigkeit seines Redox-Zustands. Lag eine intramolekulare Disulfid-Brücke vor, sollte das oxidierte Monomer schneller laufen als das reduzierte. Bei einer intermolekularen Disulfid-Brücke würden hingegen höhermolekulare Proteinbanden sichtbar werden.

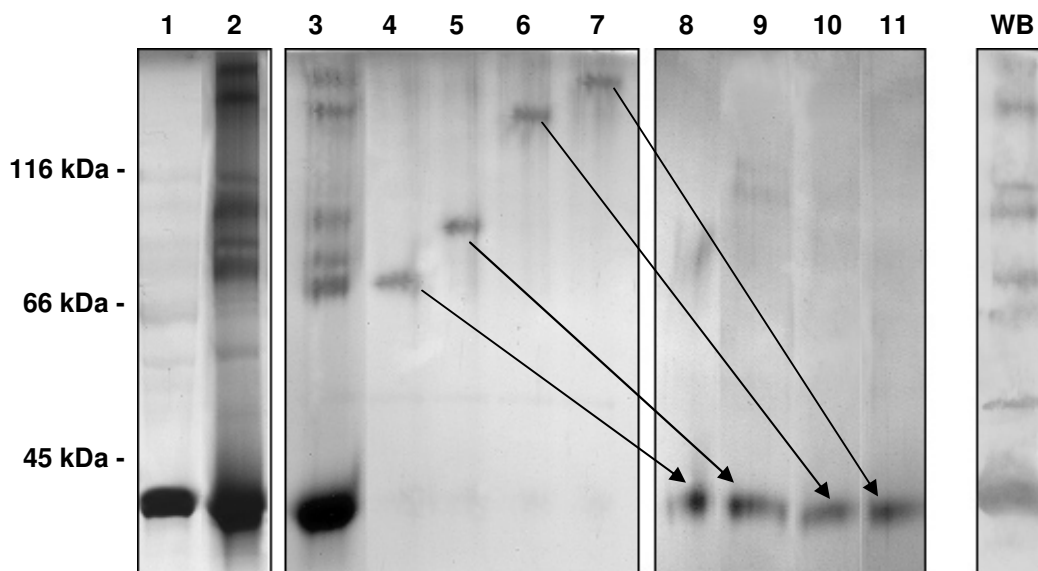


Abb. 3.1.22: Reversible Oligomerisierung des $\alpha 14$ -Giardins nach ALLORE & BARBER (1984). SDS-PAGE des $\alpha 14$ -Giardin in An- und Abwesenheit von DTT. Spur 1, reduziertes $\alpha 14$ (20 μg); Spur 2, nicht-reduziertes $\alpha 14$ (20 μg); Spur 3, Monomer-Bande aus Spur 2 nicht-reduziert; Spuren 4-7, markierte Banden aus Spur 3 nicht-reduziert; Spuren 8-11, markierte Banden von Spur 3 reduziert aufgetragen; WB: „Western Blot“ der Spur 2 (inkubiert mit $\alpha 14$ -Antiserum, Tab. 2.2).

Wie in Abbildung 3.1.22 zu erkennen ist, erschienen nur in Abwesenheit von DTT neben dem Monomer (40,7 kDa) auch höhermolekulare Banden des α 14-Giardins (Spur 2). Deren Laufverhalten blieb auch bei einer Re-Elektrophorese unter denselben Bedingungen gleich (Spur 4-7). Wurde dann das reduzierte Monomer wiederum unter oxidierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, erschienen die potentiellen Oligomere erneut (Spur 3). Ein immunologischer Nachweis bestätigte, dass es sich bei den höhermolekularen Banden um Oligomere des α 14 handelte. Dies bedeutet, dass das α 14-Giardin dazu neigt, intermolekulare Disulfid-Brücken auszubilden, sodass höhermolekulare Aggregate entstehen. Auch eine intermolekulare Disulfid-Brücke konnte mit Hilfe dieses Verfahrens nachgewiesen werden, da das monomere Protein in Abwesenheit von DTT weiter lief als unter reduzierten Bedingungen (Vergleich Spur 1 und 2). Das α 14 besitzt somit mindestens eine intra- und eine intermolekulare Disulfid-Brücke, wobei das Vorhandensein dieser Brücken im nativen Protein noch zu beweisen wäre.

3.1.10 Untersuchungen zur Interaktion von α 14-Giardin mit Glykosaminoglykanen

3.1.10.1 Nachweis einer Heparin-Bindestelle in α 14 mittels Herapinsäule

Verschiedene Annexine sind in der Lage Calcium-abhängig nicht nur mit Phospholipiden, sondern auch mit anderen anionischen Polymeren, wie z.B. Glykosaminoglykanen (GAG), im engeren Sinn Heparin und Heparansulfat, zu interagieren. Diese GAG sind vorwiegend Teile der extrazellulären Matrix oder an Zelloberflächen lokalisiert und nehmen durch die Interaktion mit Proteinen an vielen biologischen Prozessen teil (HILEMAN *et al.*, 1998). Neben z.B. den humanen Annexinen A4, A5 und A6 (ISHITSUKA *et al.*, 1998) zeigten auch die α 1- und α 2-Giardine aus *G. lamblia* dieses Verhalten, wobei α 1 durch sein Vorkommen an der Zelloberfläche vermutlich zur Herstellung des Zell-Wirtskontakts dient (WEILAND *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob das α 14-Giardin auch diese GAG-Bindefähigkeit besitzt, wurden Untersuchungen bezüglich des Calcium-abhängigen Bindeverhaltens von α 14 an Heparin durchgeführt. Dazu erfolgte wie in Kapitel 2.6.2.4 beschrieben eine Affinitätschromatographie des rekombinanten α 14 mittels der Herapinsäule „HiTrap™ Heparin HP Column“ (Amersham Bioscience, Freiburg). Besäße das Protein eine Heparin-Bindestelle, sollte es unter Zugabe von Calcium-Ionen an die Matrix binden und erst durch eine hohe Salzkonzentration verdrängt werden (Kap. 2.6.7). In der SDS-PAGE in Abbildung 3.1.23 ist deutlich zu erkennen, dass in Abwesenheit von Calcium das α 14 schon bei 0,4 M NaCl eluierte, während bei Calcium-Zugabe die Elution erst bei 0,7 bis 0,8 M stattfand. Dieses veränderte Elutionverhalten deutet auf die Existenz einer Heparin-Bindestelle hin.

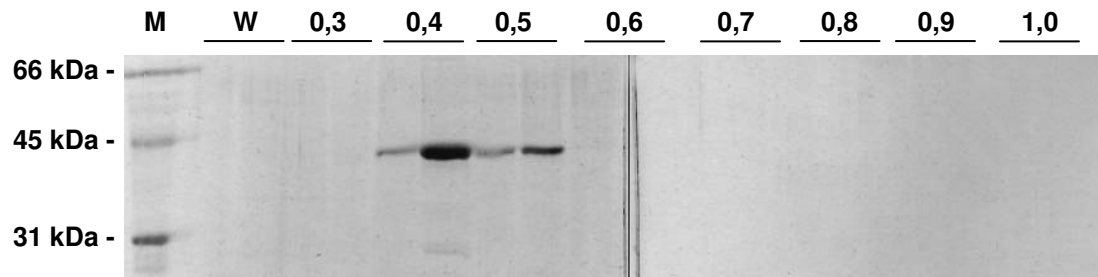
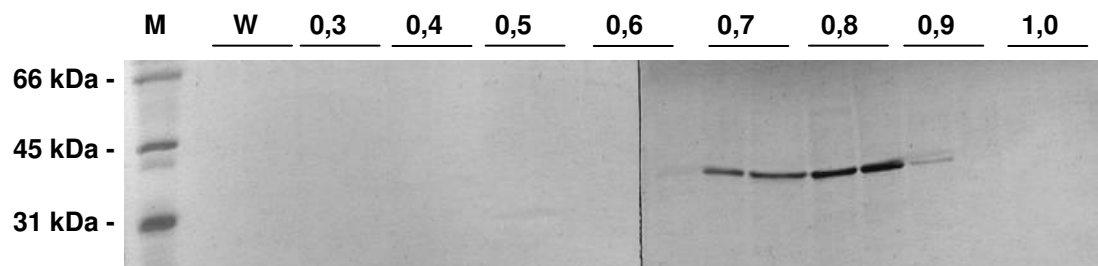
A**B**

Abb. 3.1.23: SDS-PAGE nach Chromatographie an der Heparin-Sephrose. Chromatographie in Abwesenheit von Calcium-Ionen (**A**) oder Anwesenheit von Calcium-Ionen (**B**). M, Protein Standard ("low range"); W, Waschschrift; 0,3 –1, Elutionen mit 0,3-1 M NaCl.

3.1.10.2 Bindestudien zwischen $\alpha 14$ und Heparin-Sephrose mittels verschiedener Zucker

Um festzustellen, ob das $\alpha 14$ noch andere GAG oder Zucker binden kann, wurden Versuche zur Bindespezifität des $\alpha 14$ mit verschiedenen Glykosaminoglykanen und Zuckern durchgeführt (Kap. 2.6.3). Interagiert der jeweilige Zucker mit dem $\alpha 14$, sollte er nach einer gewissen Inkubationszeit die bereits am $\alpha 14$ gekoppelte Heparin-Sephrose verdrängen und deren Platz einnehmen. Ein Zentrifugationsschritt trennte daraufhin das an den löslichen Zuckern gebundene $\alpha 14$ von dem, was an der Sepharose gebunden war. Mittels SDS-PAGE konnte eine erfolgte Verdrängungsreaktion detektiert werden. Die in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzten Zucker waren dabei Heparin, Hyaluronsäure, Chondroitin C und Dextran. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Während Heparin und Hyaluronsäure in gewissen Konzentrationen die Heparin-Sephrose teilweise von der GAG-Bindestelle des $\alpha 14$ verdrängen konnten, zeigten die Inkubation mit Chondroitin C und Dextran keine Auswirkungen.

Tab. 3.1: Inhibition der Bindung zwischen α 14 und der Heparin-Sepharose mittels verschiedener Zucker.

Polysaccharide	Konzentration in mg/ml			
	0,01	0,1	0,5	5
Heparin	-	+	+	+
Hyaluronsäure	+	+	+	+
Chondroitin	-	-	-	-
Dextran	-	-	-	-

+ Verdrängung; - keine Verdrängung

3.1.10.3 Immuncytochemische Untersuchungen zum Sekretionsnachweis des α 14-Giardins

Falls das α 14-Giardin eine Wechselwirkung mit den an der Darmepitheloberfläche befindlichen Glykosaminoglykanen eingeht, ist eine Sekretion des Proteins auf die Flagellenoberfläche Voraussetzung. Um zu überprüfen, ob sich das α 14 auch auf der Zelloberfläche von *G. lamblia* befindet, wurden sowohl lebende als auch fixierte, aber nicht permeabilisierte, Trophozoiten (Abb. 3.1.24) immuncytochemisch mit Hilfe des α 14-Antiserums und eines entsprechenden sekundären Antikörpers untersucht (Kap. 2.6.13). Sowohl das als Negativkontrolle eingesetzte Prä-Immunsersum als auch das α 14-Antiserum zeigten die gleiche Hintergrund-Fluoreszenz. Ein spezifisches α 14-Signal konnte nicht erhalten werden. Somit konnte eine Sekretion des α 14-Giardins in dem Trophozoitenstadium von *G. lamblia* nicht nachgewiesen werden. Allerdings könnte es *in vivo* anders aussehen. Die Bedeutung dieser Bindestelle bleibt infolgedessen offen.

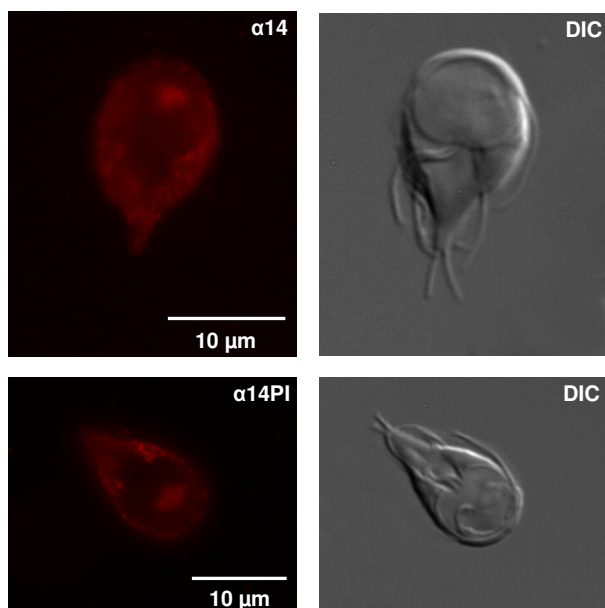


Abb. 3.1.24: Immuncytochemische Lokalisierung des α 14-Giardins an lebenden Trophozoiten. α 14, Markierung mit α 14-Antiserum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; α 14PI, Markierung mit Prä-Immunsersum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

3.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion des α 19-Giardins

Die Primärstruktur des α 19-Giardins weist mehrere spezifische Sequenzmotive auf (Anhang 7.4), die verschiedene biochemische Charakteristika vermuten lassen. Neben der für Annexine bzw. α -Giardine typischen Calcium-Bindestelle und einem giardialen Motiv verfügt das vorhergesagte Protein über eine mögliche Myristoylierungsstelle in der für α 19 einzigartigen N-terminalen Extension. In diesem Teilabschnitt werden auch die Ergebnisse der Untersuchungen, die zum Teil Bestandteil der experimentell von mir selbstständig betreuten Masterarbeit von A. KELLERSMANN waren, aufgeführt.

3.2.1 Expressionsnachweis des α 19-Giardins

Vor der Herstellung eines Plasmidkonstrukts zur heterologen Expression des rekombinanten α 19-Giardins musste zunächst ein Expressionsnachweis des nativen Proteins in *G. lamblia* erbracht werden. Zur Bestätigung wurde eine RT-PCR (Kap. 2.5.9) mit Hilfe eines geeigneten Primerpaares (basierend auf der Gensequenz aus der NCBI-Datenbank, Accessionnr.: AY781315) und cDNA (Kap. 2.5.7) als Matrize durchgeführt. Das nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbare spezifische Amplifikat entsprach der erwarteten Größe von ca. 1300 bp (Abb. 3.2.1). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das α 19-Giardin tatsächlich in *G. lamblia* als funktionelles Protein vorliegt. Die Kontrollen entsprachen den Erwartungen.

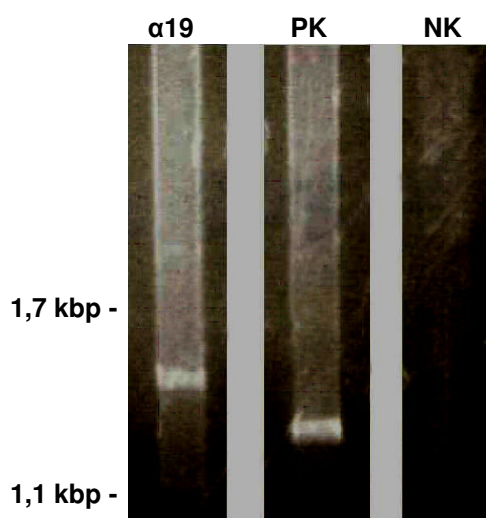


Abb. 3.2.1: RT-PCR zum Nachweis der Transkription des α 19-Giardins. α 19, RT-PCR mit Primerpaar „ α 19 Δ 1-15 vorne/hinten“; PK, RT-PCR mit Primerpaar „ α 14 vorne/hinten“ zur Amplifikation des α 14-Giardins als Positivkontrolle; NK, RT-PCR-Ansatz mit H₂O statt cDNA als Negativkontrolle.

3.2.2 Heterologe Expression und Aufreinigung des rekombinanten $\alpha 19$ -Giardins

Dem Expressionsnachweis des $\alpha 19$ -Giardins in *G. lamblia* schloss sich nun die Klonierung des Plasmidkonstruktes pJC45- $\alpha 19_{\Delta 1-15}$ an (Tab. 2.4), welches für ein N-terminal verkürztes $\alpha 19$ -Giardin ($\alpha 19_{\Delta 1-15}$) codierte (KELLERSMANN, 2007). Das Protein sollte nach Transformation in den Expressionsstamm BL21 (DE3) pAPlacIQ heterolog exprimiert (Kap. 2.5.21) und letztendlich für die Herstellung eines Antikörpers gegen das $\alpha 19$ verwendet werden. Um zu überprüfen, ob das rekombinante $\alpha 19$ in Einschlusskörpern vorlag (Kap. 2.6.1), wurden nach Aufschluss der induzierten Zellen und anschließender Zentrifugation die löslichen Proteine sowie die unlösliche Membranfraktion für eine SDS-PAGE (Kap. 2.6.7) verwendet.

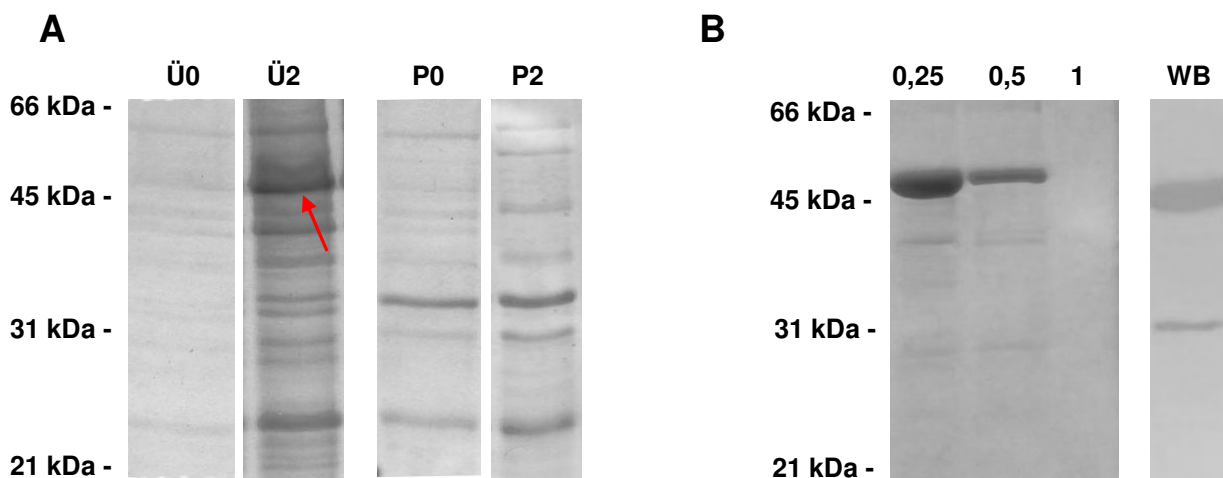


Abb. 3.2.2: SDS-PAGE und „Western Blot“ nach heterologer Expression und Aufreinigung von $\alpha 19_{\Delta 1-15}$. (A) SDS-PAGE nach heterologer Expression von $\alpha 19_{\Delta 1-15}$. Ü0, lösliche Fraktion vor Induktion mit 1 mM IPTG; Ü2, lösliche Fraktion 2 h nach Induktion (je 20 μ l pro Spur), roter Pfeil zeigt exprimiertes Protein; P0, unlösliche Fraktion vor Induktion; P2, unlösliche Fraktion 2 h nach Induktion (je 15 μ l pro Spur). μ l-Angaben beziehen sich auf den Gesamt-Zellextrakt. (B) SDS-Gel mit verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung von $\alpha 19_{\Delta 1-15}$, 0,25-1, Elutionsfraktion mit 0,25-1M Imidazol; WB, „Western Blot“ des aufgereinigten Proteins mit anti-Penta-His-Antikörper (Tab. 2.2). Es wurden je 30 μ l jeder Fraktion aufgetragen.

Das SDS-Gel zeigt eine Anreicherung eines ca. 50 kDa großen Proteins nach Induktion in der löslichen Fraktion (Abb. 3.2.2 A, roter Pfeil), jedoch nicht in der unlöslichen. Die angeschlossene „Western Blot“-Analyse (Kap. 2.6.9) der löslichen Zellfraktion belegte, dass es sich hierbei um das 49,4 kDa große Fusionsprotein handelte, welches aus plasmidcodiertem N-terminalen „His₍₁₀₎-tag“ und rekombinanten $\alpha 19_{\Delta 1-15}$ bestand (Daten nicht gezeigt).

Bei der im Anschluss zur Aufreinigung des rekombinanten $\alpha 19_{\Delta 1-15}$ durchgeführten Metallchelate-Affinitätschromatographie (Kap. 2.6.2.1) eluierte das Protein bei einer Imidazolkonzentration von 0,25-0,5 M. Die Ausbeute der Aufreinigung belief sich auf ca. 0,5 mg/ml Protein in einem Gesamtvolumen von 5 ml. Mit Hilfe von „Western Blot“- (3.2.2 B, WB) und ESI-MS-Analysen (Daten nicht gezeigt) konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem

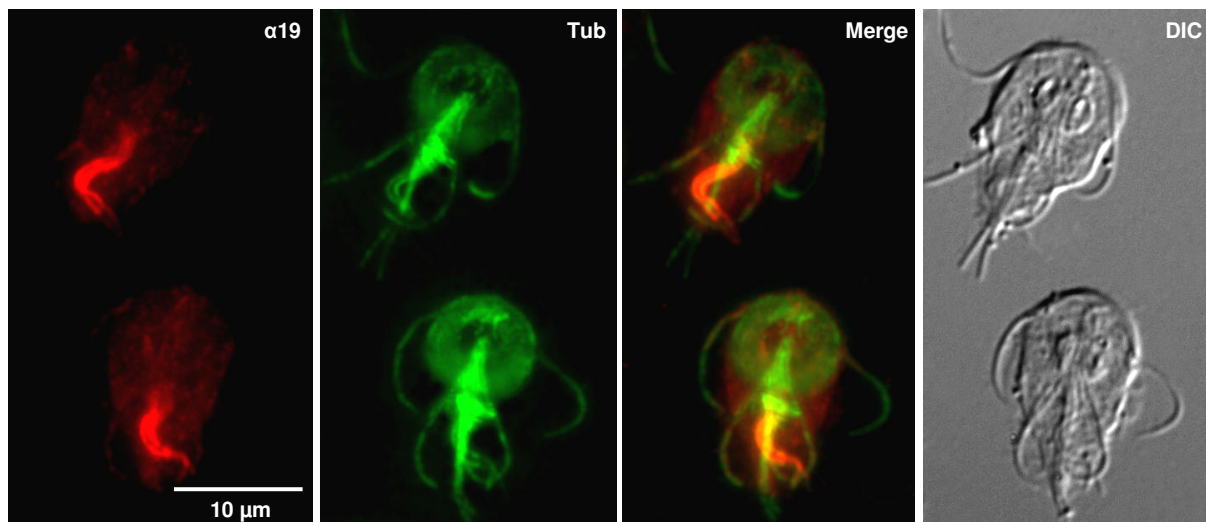
aufgereinigten Protein um das α -Giardin handelte. Folglich konnte das aufgereinigte $\alpha_{19\Delta_{1-15}}$ -Giardin zur Herstellung eines Antikörpers herangezogen werden (Kap. 2.6.11). Das erhaltene α_{19} -Giardin-Antiserum war bis zu einer Verdünnung von 1:100.000 in der Lage, sowohl rekombinantes als auch natives α_{19} -Giardin zu detektieren und zeigte keinerlei Kreuzreaktionen zu anderen α -Giardinen, wie z.B. das α_{14} (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Immuncytochemische Lokalisationsstudien von α_{19} -Giardin in *G. lamblia*

3.2.3.1 Untersuchungen an permeabilisierten Trophozoiten und isolierten Flagellen

Für eine weiterführende funktionelle Charakterisierung des α_{19} -Giardins wurde als nächstes die immuncytochemische Lokalisierung des nativen α_{19} in *G. lamblia* mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt (Kap. 2.6.13). Dazu wurden permeabilisierte und fixierte Trophozoiten mit anti- α_{19} -Antikörpern oder verschiedenen Kontroll-Antiseren (anti-Tubulin als Positiv-, Prä-Immuserum als Negativkontrolle) inkubiert. Anschließend wurde die Position der primären Antikörper mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-tragenden sekundären Antikörpern sichtbar gemacht (Tab. 2.2). Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte eine exklusive Lokalisation des α_{19} -Giardins innerhalb der ventralen Flagellen nachgewiesen werden (Abb. 3.2.3 A). Hier ko-lokalisierte es mit dem aus Mikrotubuli bestehenden Axonem der Flagellen. Die mit Prä-Immuserum inkubierten Zellen zeigten hingegen eine homogene Hintergrund-Fluoreszenz innerhalb der Trophozoiten, sodass von einem spezifischen Signal von dem anti- α_{19} -Antikörper ausgegangen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

A



B

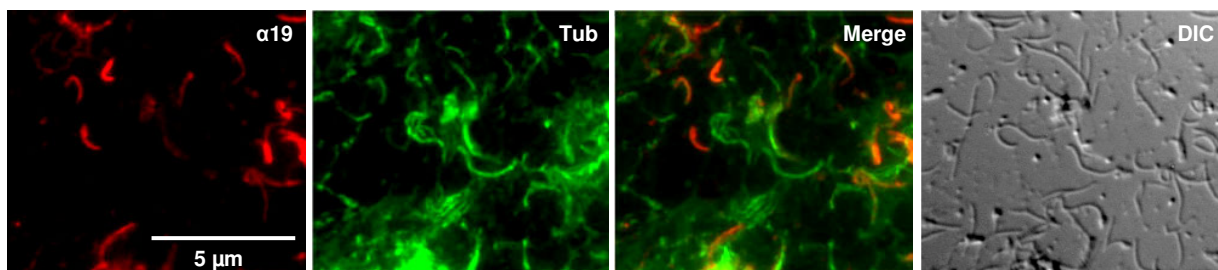


Abb. 3.2.3: Immunocytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 19$ -Giardin und Tubulin in permeabilisierten Trophozoiten (A) und isolierten Flagellen (B). $\alpha 19$, Markierung mit $\alpha 19$ -Antiserum und CY3™-konjugierten sek. Antikörpern; Tub, Markierung mit anti-Tubulin-Antikörpern und CY2™-konjugierten sek. Antikörpern; Merge, Doppelmarkierung mit anti- $\alpha 19$ - und anti-Tubulin-Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

Wenn das $\alpha 19$ -Giardin tatsächlich nur in den ventralen Flagellen lokalisiert ist, müsste eine an isolierten Flagellen (Kap. 2.6.15) durchgeführte immuncytologische Ko-Lokalisierung von $\alpha 19$ und Tubulin die Lokalisation des $\alpha 19$ in einem Teil der Flagellen belegen, wohingegen der anti-Tubulin-Antikörper die Axonema sämtlicher Flagellen markieren müsste. In den bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erhaltenen Bildern (Abbildung 3.2.3 B) zeigten sich zwei unterschiedliche Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale für das $\alpha 19$ und das Tubulin. Bei der Überlagerung beider Antikörpersignale bestätigte die Annahme, dass $\alpha 19$ nicht in allen Flagellen lokalisiert ist, sondern nur bei ca. einem Viertel der gesamten Flagellen auftritt. Dieses entsprach dem Verhältnis von ventralen zu den gesamten Flagellen.

Zum Reinheitsnachweis der Flagellenpräparation wurden die isolierten Flagellen mittels „Western Blots“ auf verschiedene Zellkörper- und Flagellen-spezifische Proteine untersucht (Kap. 2.6.9).

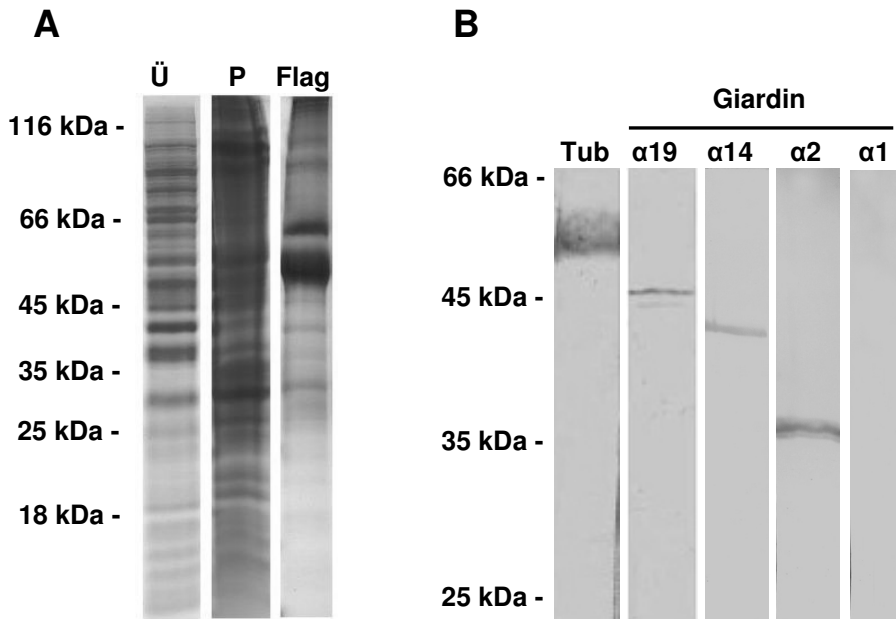


Abb. 3.2.4: Analyse der Flagellenproteine. (A) SDS-PAGE der Flagellenpräparation (Flag) im Vergleich zum Rohextrakt von *G. lamblia* (Ü, lösliche Fraktion; P, unlösliche Fraktion). Je 40 µg Protein pro Spur aufgetragen. (B) „Western-Blot zur Reinheits-Kontrolle der Flagellenpräparation und zum Nachweis des α19-Giardins in den Flagellen. Flagellensuspension wurde mittels „Western Blot“ sowohl auf das Zellkörper-spezifische Protein α1-Giardin als auch gegen die Flagellen-spezifischen Proteine α2- α14- und α19-Giardin untersucht. Je 20 µl Flagellensuspension wurden aufgetragen. Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

Wie auf dem SDS-Gel in Abbildung 3.2.4 A bereits deutlich wird, gleicht das Proteinspektrum der Flagellensuspension weder demjenigen der löslichen noch dem der unlöslichen Zellextraktfraktion, sondern zeigt ein spezifisches Bandenmuster. Die darin enthaltenen Proteine sind zwar in den Extraktfraktionen zu erkennen, jedoch in einer weitaus niedrigeren Konzentration. Dieses spricht für eine spezifische Anreicherung der Flagellen während der Präparation. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde eine immunologische Analyse mit verschiedenen Antikörpern der SDS-PAGE angeschlossen (Abb. 3.2.4 B). Den Erwartungen entsprechend zeigte die Immundekoration mit Zellkörper-charakteristischen Antikörpern wie anti-α1 und anti-Proteasom (Daten nicht gezeigt) keine Reaktion im Blot. Die Flagellen-spezifischen Proteine α2, α14, Tubulin sowie auch das α19 konnten hingegen in der Suspension detektiert werden, wodurch die hohe Reinheit der Flagellenprobe bestätigt wurde.

3.2.3.2 Lokalisationsuntersuchungen an lebenden Trophozoiten

Da das erhaltene Fluoreszenz-Signal bei permeabilisierten Zellen keine Rückschlüsse auf die genaue Lokalisierung in der Flagelle zuließ, stellte sich nun die Frage, ob sich das $\alpha 19$ -Giardin innerhalb der Flagelle oder an deren Außenmembran befand. Der Gedanke an eine Sekretion auf die Oberfläche der Flagellenmembran war wegen des Vorhandenseins eines Integrin-Bindemotivs in der Primärstruktur des $\alpha 19$ -Giardins (Anhang 7.4) nicht abwegig. Aus diesem Grund wurden lebende Trophozoiten mit Antiserum gegen $\alpha 19$ bzw. Prä-Immunsrum behandelt und für eine erneute Fluoreszenz-Mikroskopie (Kap. 2.6.13) verwendet. Wie in Abbildung 3.2.5 zu erkennen ist, unterschieden sich die erhaltenen Signale beider Immunsereen nicht, sodass eine Lokalisation des nativen $\alpha 19$ -Giardins auf der Flagellenoberfläche nicht anzunehmen war.

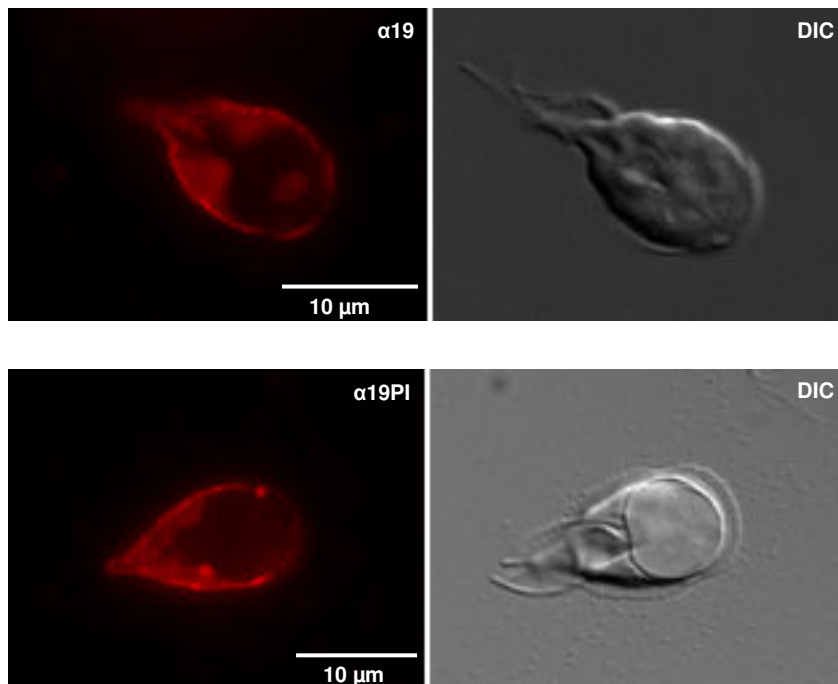


Abb. 3.2.5: Immuncytochemische Lokalisierung des $\alpha 19$ -Giardins an lebenden Trophozoiten. $\alpha 19$, Markierung mit $\alpha 19$ -Antiserum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; $\alpha 19PI$, Markierung mit Prä-Immunsrum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

3.2.3.3 Immuncytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 19$ -Giardin und giardialem Tubulin-Cytoskelett

Die anhand der Gensequenz postulierte Myristoylierungsstelle (Anhang 7.4) macht eine Integration oder Assoziation des $\alpha 19$ an den Innenseiten der Flagellenmembran sehr wahrscheinlich. Zur Überprüfung dieser Annahme und zum Ausschluss einer möglichen Lokalisierungsstelle am Cytoskelett wurde ein immuncytologischer Nachweis mittels Fluoreszenz-Mikroskopie an isolierten Cytoskeletten durchgeführt. Als Positivkontrolle diente hierbei wiederum die Inkubation mit anti-Tubulin-Antikörpern, während die Behandlung mit dem Prä-Immunsereum die Negativkontrolle darstellte. Zur exakten Untersuchung einer potentiellen Interaktion zwischen $\alpha 19$ und dem Axonem der Flagelle wurde eine Ko-Lokalisierungsstudie beider Proteine durchgeführt.

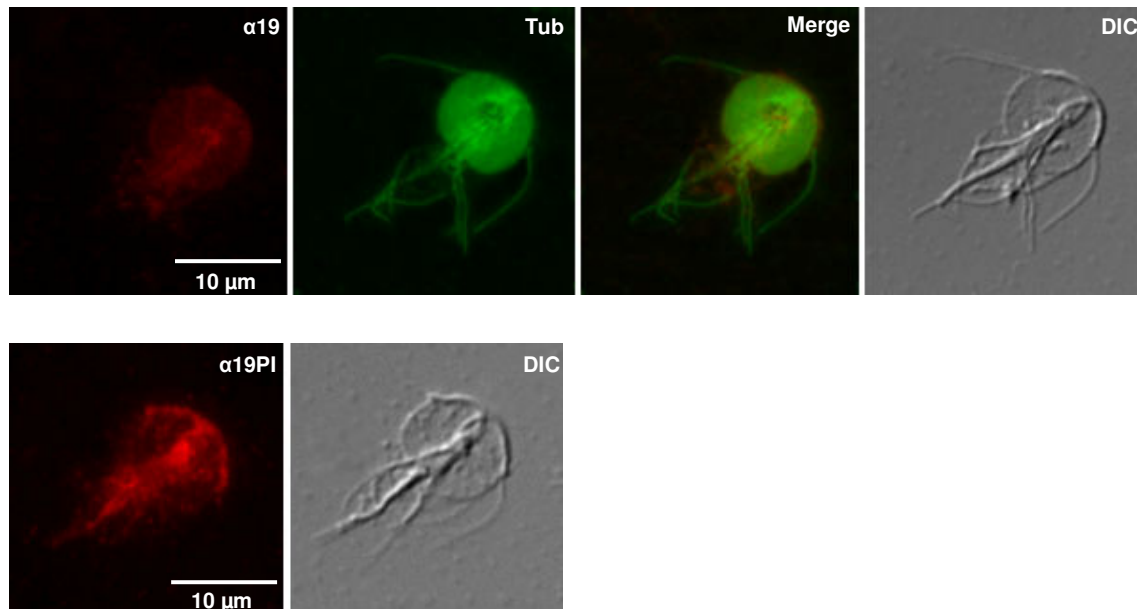


Abb. 3.2.6: Immuncytochemische Ko-Lokalisierung von $\alpha 19$ -Giardin und giardialem Tubulin-Cytoskelett. $\alpha 19$, Markierung mit $\alpha 19$ -Antiserum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; Tub, Markierung mit anti-Tubulin-Antikörpern und CY2TM-konjugierten sek. Antikörpern; Merge, Doppelmarkierung mit anti- $\alpha 19$ - und anti-Tubulin-Antikörpern; $\alpha 19$ PI, Markierung mit Prä-Immunsereum und CY3TM-konjugierten sek. Antikörpern; DIC, Durchlicht; Antikörperkonzentrationen siehe Tab. 2.2.

Sowohl die mit $\alpha 19$ -Antiserum als auch die mit Prä-Immunsereum behandelten Cytoskelette wiesen die gleiche Hintergrund-Fluoreszenz an der ventralen Scheibe auf (Abb. 3.2.6), sodass eine direkte Bindung des $\alpha 19$ an das Axonem eher unwahrscheinlich war.

3.2.4 Phospholipidbindung des $\alpha 19$ -Giardins

Aufgrund der Homologie zwischen α -Giardinen und Annexinen höherer Eukaryonten (FIEDLER & SIMONS, 1995) war zu klären, ob das $\alpha 19$ tatsächlich Annexin-charakteristische Eigenschaften aufweist. Ein Charakteristikum für eine Homologie zu den Annexinen, ist das Vorkommen des Sequenzmotivs (GKATD{38}D) in der zweiten Domäne des $\alpha 19$, welches dem Endonexin-Motiv sehr ähnlich ist. Basierend darauf, dass Annexine eine Calcium-abhängige Assoziation an anionische Phospholipide eingehen und diese reversible Bindung auch an künstlichen Membranen zu beobachten ist (SWAIRJO *et al.*, 1995; WENG *et al.*, 1993), wurde ein Phospholipid-Bindeassay durchgeführt (Kap. 2.6.18). Hierfür wurde rekombinantes $\alpha 19_{\Delta 1-15}$ mit multilamellaren Vesikeln aus Gehirnextraktphospholipiden in An- und Abwesenheit von freiem Calcium inkubiert. Die nach der Zentrifugation pelletierten Lipide sowie die Überstandsfraktionen wurden zur Detektion des $\alpha 19$ einer SDS-PAGE und einer „Western Blot“-Analyse unterzogen (Kap. 2.6.7, 2.6.9). Aufgrund der sich in der N-terminalen Extension befindlichen Acylierungsmotive und einem daraus resultierenden möglichen Einfluss auf die Bindeeigenschaft des $\alpha 19$ -Giardins wurde das verkürzte $\alpha 19_{\Delta 1-15}$ für diesen Versuch eingesetzt.

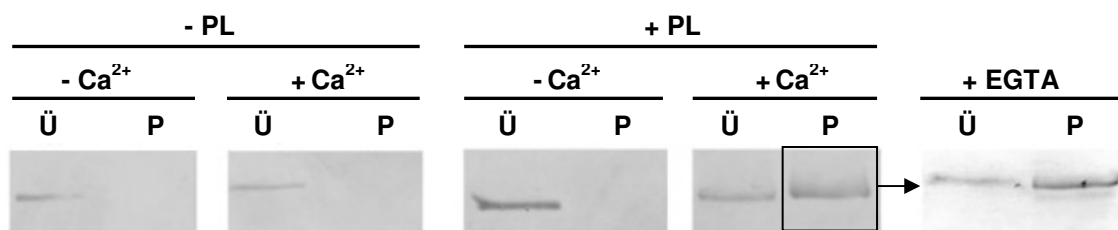


Abb. 3.2.7: Phospholipid-Bindeassay. „Western-Blot“ von $\alpha 19$ nach Inkubation mit Phospholipiden. Ü, löslicher Überstand nach Zentrifugation; P, unlösliches Pellet nach Zentrifugation (Phospholipide); +Ca²⁺/–Ca²⁺, An- und Abwesenheit von 1 mM Calcium-Ionen; +PL/–PL, An- und Abwesenheit von Phospholipiden; EGTA, Extraktion des mit Kästchen gekennzeichneten Pellets mit EGTA.

Der „Western Blot“ in Abbildung 3.2.7 bestätigt die Annexin-homologe Eigenschaft des $\alpha 19$, da nur in Anwesenheit von freien Calcium-Ionen das $\alpha 19$ an die Phospholipide bindet und anschließend mit diesen pelletiert wird. Bei den Kontrollversuchen ohne Zugabe von Phospholipiden oder in Abwesenheit von Calcium hingegen blieb das $\alpha 19$ in Lösung. Zum Nachweis der Reversibilität der Bindung wurden dem entstandenen Pellet (roter Kasten) durch Zugabe von EGTA die Calcium-Ionen entzogen und daraufhin erneut zentrifugiert. Hierbei zeigte sich, dass das gebundene $\alpha 19$ teilweise solubilisiert werden konnte.

3.2.5 Untersuchung zur Membranassoziation des α 19-Giardins

Bezogen auf die Primärstruktur des α 19-Giardins konnten mit Hilfe verschiedener Programme (Myrsitoylator (BOLOGNA *et al.*, in press) und NMT (MAURER *et al.*, 2002)) eine potentielle Myrstoyierungsstelle am N-Terminus des Proteins vorhergesagt werden (Anhang 7.4). Da Fettsäure-Verknüpfungen den Proteinen Interaktionen mit Membranen ermöglichen und die Lokalisierung des α 19 in der Membranfraktion des Zellextraktes bereits nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.2.8 A), wurde nun die Assoziation des α 19 mit der Membran unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. (Kap. 2.6.22). Könnte das α 19 nur unter Einsatz eines Detergenz, nicht aber unter ionischen oder denaturierenden Bedingungen aus der Membran gelöst werden, wäre es ein Hinweis auf eine posttranslationale Lipidmodifikation am α 19-Giardin.

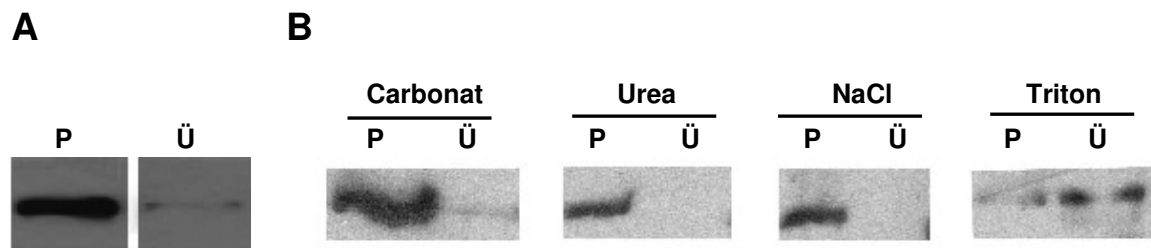


Abb. 3.2.8: Triton-Solubilisierung von α 19. (A) Lokalisation von α 19 mittels α 19-Antiserum im Zellextrakt von *G. lamblia*. (B) Lokalisation von α 19 mittels α 19-Antiserum nach der jeweiligen Extraktion aus der Membranfraktion des Rohextraktes mit Carbonat, Urea, NaCl und 1% Triton. Nachgewiesen *via* „Western-Blot“. Ü, lösliche Fraktion; P, unlösliche Membranfraktion.

„Western-Blot“-Untersuchungen (Abb. 3.2.8 B, Kap. 2.6.9) zeigten, dass sich α 19 nur durch Einsatz des nichtionischen Tensids „Triton X-100“ aus der Membran extrahieren ließ und dann im Überstand detektiert werden konnte. Alle anderen Extraktionen hatten dagegen keinen Einfluss auf die Lokalisation des α 19.

3.2.6 Phosphorylierungsnachweis des α 19-Giardins

Mit Hilfe der Computerprogramme „NetPhos 2.0“ bzw. „NetPhosK 1.0“ nach BLOM *et al.* (1999 bzw. 2004) konnte überprüft werden, ob eine Phosphorylierung eine weitere potentielle posttranslationale Modifikation des α 19 darstellte. Von denen anhand der Primärstruktur vorhergesagten Phosphorylierungsstellen (Abb. 3.2.9, Anhang 7.4) wiesen mehrere Positionen eine Wahrscheinlichkeit von über 90% auf, wobei die Phosphorylierung an den Serinen 180 bzw. 394 als am wahrscheinlichsten galt (Score 0,92).

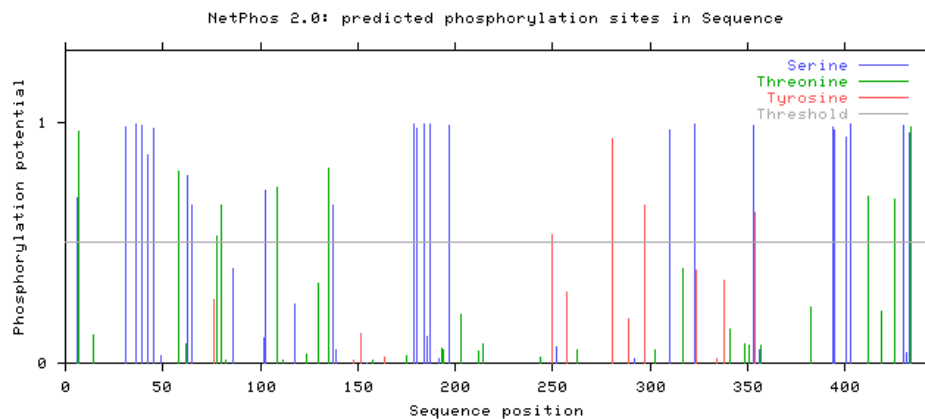


Abbildung 3.2.9: Potentielle Phosphorylierungsstellen des α 19-Giardins. Online-Sequenzanalyse mit „NetPhos 2.0“.

Zur Untersuchung der potentiellen Phosphorylierung von α 19 wurde parallel zum α 14 eine Metallhydroxid-Affinitätschromatographie nach WOLSCHIN *et al.* (2005) durchgeführt (Kap. 2.6.2.3). Auch hier zeigte die „Western Blot“-Analyse (Kap. 2.6.9) des Eluats nach Aufreinigung der phosphorylierten Rohextraktproteine einen Nachweis für ein phosphoryliertes α 19-Giardin in *G. lamblia* (Abb. 3.2.10 WB). Die mitgeführten Kontrollproteine (Lysozym, Ovalbumin) waren die gleichen wie bei der Überprüfung des α 14 (Abb. 3.1.20) und entsprachen somit den Erwartungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet das nicht-phosphorylierte Lysozym, der rote Pfeil das phosphorylierte Ovalbumin.

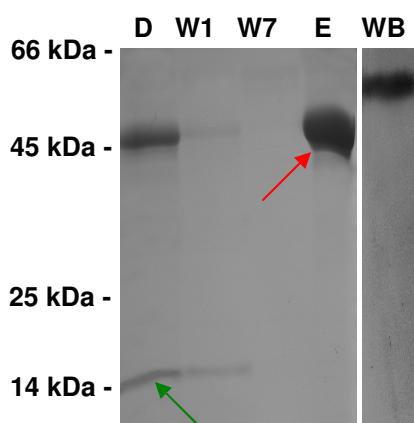


Abb. 3.2.10: Aluminiumhydroxid-Affinitätschromatographie mit denaturiertem Zellextrakt zur Anreicherung von Phosphoproteinen. D, Durchlauf; W1 & W7, Waschschrirte; E, Elution mit Natriumpyrophosphat (D, W1, W7, E zeigen Fraktionen der Chromatographie mit den Kontrollproteinen auf dem SDS-Gel). WB, „Western Blot“ des Eluats nach Chromatographie mit Zellextrakt, immunodekoriert mit α 19-Antiserum (Proteinmengen siehe Kapitel 2.6.2.3).

4. Diskussion

Innerhalb der Annexin-Familie weisen die konservierten Domänen jedes Annexins mehr Ähnlichkeit mit korrespondierenden Domänen anderer Annexine auf (40-60%) als untereinander (25-35%). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die unter Eukaryonten nahezu ubiquitär vertretenen Annexine aus einem gemeinsamen Vorfahren divergiert sind (SEATON, 1996). Da *Giardia lamblia* als einer der ursprünglichsten Eukaryonten gilt, deutet die große Anzahl an Annexinen auf eine fundamentale Rolle dieser Proteine für die Zellfunktionen von Eukaryonten hin (WEILAND *et al.*, 2005). Somit könnten die aus den Untersuchungen an den α -Giardinen gewonnenen Erkenntnisse Rückschlüsse auf eine ursprüngliche Funktion der Annexine ermöglichen. Zusätzlich weist die spezifische Lokalisation der 21 α -Giardine an den verschiedensten Stellen innerhalb der Zelle auf eine funktionelle Diversität der Proteine in dem Organismus hin (WEILAND *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit untersuchten α -Giardine, α 14 und α 19, bekleiden wie schon erwähnt eine phylogenetische Sonderrolle innerhalb der giardialen Annexine. Der erste Teil der Diskussion befasst sich mit den erhaltenen Ergebnissen aus der Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von α 14 und deren Identifizierung. Weiterhin wird die mögliche Funktion des α 14, die aus der Interaktion resultieren könnte, diskutiert. Der zweite Teil beschäftigt sich mit den Resultaten aus den Versuchen zur subzellulären Lokalisierung und biochemischen Charakterisierung des α 19-Giardins und die daraus denkbaren Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung des Proteins innerhalb des Organismus.

Im Ausblick werden abschließend weiterführende Forschungsansätze zur funktionellen Charakterisierung des α 14- und α 19-Giardins vorgestellt.

4.1 Untersuchungen zur Charakterisierung des α 14-Giardins

4.1.1 Subzelluläre Lokalisation des α 14-Giardins

Die von SZKODOWSKA *et al.* (2002) identifizierte subzelluläre Lokalisation des α 14-Giardins in den Flagellen und dem Mediankörper von *G. lamblia* sowie die Assoziation des Proteins an Cytoskelettkomponenten führten zu der Annahme, dass das α 14-Giardin eine Calcium-regulierte strukturelle Rolle in der Bewegung der Trophozoiten spielt.

Um einen tieferen Einblick in die mögliche Funktion des Proteins zu bekommen, wurden erneut immunocytoologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Lokalisation des α 14 in den Flagellen und dem Mediankörper bestätigt. Dabei fiel allerdings auf, dass das Giardin keine einheitliche Verteilung innerhalb der Flagelle aufwies, sondern

sowohl in den proximalen Bereichen als auch den distalen Enden konzentriert vorlag (Kap. 3.1.3.1, Abb. 3.1.3). Bei eingehender Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen erschien das $\alpha 14$ als lokale Verdickungen, die einer Perlenschnur-artige Aufreihung ähnelten. Um eine Aussage zur genaueren subzellulären Lokalisation machen zu können, wurden nun elektronenmikroskopische Untersuchungen angeschlossen. Aufgrund der geringen Dicke der Schnitte waren alle Zellbestandteile und Strukturen der eingebetteten Trophozoiten deutlich zu erkennen. Antikörpermarkierte Bereiche der Probe fielen dabei durch die elektronendichten Goldpartikel auf, die unter dem Mikroskop als schwarze Kügelchen erkennbar waren. Das $\alpha 14$ -Giardin zeigte, wie in Abbildung 3.1.4 A ersichtlich, sowohl eine Assoziation mit den Mikrotubuli des Axonems (Kap. 3.1.3.2) als auch ein Vorkommen in der Nähe der Plasmamembran (Abb. 3.1.4 A+B). Ob eine direkte Vermittlung zwischen der Flagellenmembran und den Mikrotubuli durch das $\alpha 14$ stattfand oder eine indirekte Wechselwirkung vorlag, konnte den Bildern jedoch nicht entnommen werden. Da die Zellen im Lebendzustand eingebettet wurden und somit alle in der Zelle vorhandenen Proteine, folglich auch ein mögliches Linkerprotein, noch präsent waren, konnte mit dieser Methode keine konkrete Aussage über die Interaktionsweise getroffen werden.

Da bereits für andere Annexine eine Beteiligung an der Cytoskelett-Membran-Dynamik nachgewiesen wurde (HAYES *et al.*, 2004; RESCHER & GERKE, 2004), könnte das $\alpha 14$ -Giardin tatsächlich die vermutete Calcium-gesteuerte Mittlerrolle zwischen den mikrotubulären Strukturen der Flagellen und der sie umgebenden Plasmamembran einnehmen. Somit könnte es ausschlaggebend an der Mobilität des Parasiten beteiligt und damit für die Ausbreitung des Darmparasiten im Wirtsdarm mitverantwortlich sein. Dem könnte auch ein generelles Prinzip zugrunde liegen, da manche Cilien und Flagellen anderer eukaryotischer Zellen Calcium-regulierte Proteine enthalten, die wahrscheinlich zur Bewegung beitragen (RIDGLEY *et al.*, 2000; MAYRAN *et al.* 1996; LIU *et al.*, 2003). Auch ist bekannt, dass Calcium eine Schlüsselrolle bei der Flagellenbewegung übernimmt (TAMM, 1994). So veranlasst z.B. ein Calcium-Anstieg bei *Chlamydomonas* eine Veränderung ihrer Morphologie von einer asymmetrischen zu einer symmetrischen Wellenform (HYAMS & BORISY, 1978).

Aufgrund der großen Anzahl der verschiedenen α -Giardine in den Flagellen von *G. lamblia* ($\alpha 2$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 9$ -, $\alpha 10$ -, $\alpha 14$ -, $\alpha 17$ -Giardin) könnten die α -Giardine jedoch auch an anderen Prozessen der Flagellen beteiligt sein, die nicht der reinen Fortbewegung dienen (WEILAND *et al.*, 2005).

4.1.2 Identifizierung potentieller Interaktionspartner des α 14-Giardins

Zur Klärung der Frage, an welche subzelluläre Komponenten das Protein in direkter Weise bindet, war es erforderlich, die Bindepartner von α 14 zu identifizieren. Dieses wurde mit Hilfe einer Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der ein Trophozoiten-Rohextrakt in An- und Abwesenheit von Calcium mit an Sepharose immobilisiertem α 14-Giardin inkubiert wurde (Kap. 3.1.4). Die Zugabe von Calcium war hierbei notwendig, weil viele Annexine durch die Bindung von Calcium-Ionen an der konvexen Seite eine Konformationsänderung erfahren. Sie wird neben der Membranassoziation vermutlich auch durch die Wechselwirkung mit anderen Interaktionspartnern induziert (CONCHA *et al.*, 1993). Dieses Prinzip könnte auch bei den möglichen Interaktionen von α 14 zugrunde liegen. Nach Elution mit einem EGTA- oder NaCl-Puffer wurden die erhaltenen Eluate zunächst mittels SDS-PAGE analysiert (Kap. 3.1.4, Abb. 3.1.5). Das Protein-Bandenmuster unterschied sich in den beiden Versuchsansätzen wesentlich in der Zusammensetzung und Proteinkonzentration. Ein unspezifisches Binden von Proteinen an die Säulenmatrix konnte dabei durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen werden. Zur Identifizierung der möglichen Bindepartner von α 14 wurden die erhaltenen Eluate massenspektroskopisch analysiert, wobei aufgrund der hohen phylogenetischen Verbreitung der Annexine ein Protein mit einem „Mowse Score“ ab 300 erst als ein relevanter „Treffer“ galt. Der sogenannte „Mowse Score“ zeigt die Trefferqualität an und baut sich aus der Anzahl der Peptide, die für ein Protein gefunden wurden, und deren Übereinstimmung mit den Datensätzen auf (PAPPIN *et al.*, 1993). Während im Ansatz ohne Calcium keine signifikanten Treffer erzielt wurden, konnten in Anwesenheit von Calcium mehrere relevante Bindepartner identifiziert werden. Bei den potentiellen Bindungspartnern handelt es sich neben dem α - und β -Tubulin und dem α 7.3-Giardin auch um eine Serin/Threonin-Kinase (Kap. 3.1.5).

Da Tubulin die Hauptkomponente des Flagellen-Axonems darstellt und eine Interaktion von Annexinen mit cytoskelettalen Strukturen bereits bekannt ist (GERKE & MOSS, 2002; RESCHER & GERKE, 2004), könnte eine Interaktion beider Proteine durchaus bestehen. Im Gegensatz dazu kommt das α 7.3-Giardin hauptsächlich an der Plasmamembran der Zellkörper oder im Cytoplasma vor, was eine Wechselwirkung mit dem in den Flagellen lokalisierten α 14 unwahrscheinlich macht (WEILAND *et al.*, 2005). Die Serin/Threonin-Kinase weist C-terminal das katalytische Zentrum einer Kinase und N-terminal eine Ankyrindomäne auf. Diese Ankyrin-Wiederholungen stellen ein typisches Protein-Protein-Interaktionsmotiv dar und könnten eine mögliche Bindung zu α 14 eingehen, sodass eine Phosphorylierung durch die Kinasedomäne stattfinden könnte. Da bereits für mehrere Annexine eine Phosphorylierung beschrieben wurde (GERKE & MOSS, 2002; GERKE *et al.*, 2005), ist diese Wechselwirkung nicht auszuschließen.

4.1.2.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen giardialen Mikrotubuli und dem $\alpha 14$ -Giardin

In der Literatur sind mehrere Annexine bekannt, die Membrandomänen mit Cytoskelettkomponenten verbinden (GERKE & MOSS, 2002; RESCHER & GERKE, 2004), wobei diese Wechselwirkungen meist Calcium-abhängig vollzogen werden (KHANNA *et al.*, 1990). So bindet z.B. das Annexin A2 Calcium-abhängig an F-Aktin und bildet dadurch Lipidmikrodomänen, die wichtig für die Zellkommunikation sind oder stabilisierend auf den Zell-Zellkontakt wirken (FILIPENKO & WAISMAN, 2001; GERKE *et al.*, 2005). Auch die Annexine A1, A5 und A6 gehören zu dieser Aktin-Interaktionsgruppe, wobei das Annexin A1 nicht nur an F-Aktin, sondern auch eine Ko-Lokalisation mit Tubulin aufweist (HAYES *et al.*, 2004; TRAVERSO *et al.*, 1998).

Um herauszufinden, ob und wie Tubulin und $\alpha 14$ -Giardin im Trophozoiten interagieren, wurden zunächst an fixierten und permeabilisierten Trophozoiten immunocytochemische Ko-Lokalisierungsexperimente durchgeführt. Wie in Kapitel 3.1.6.1 beschrieben, wurde bei der Ko-Lokalisierung des $\alpha 14$ -Giardins mit Tubulin erneut deutlich, dass sich das $\alpha 14$ nicht wie das Mikrotubuli-Axomen in der ganzen Flagelle befand, sondern nur in bestimmten Regionen, wie z.B. am distalen Ende des mit Plasmamembran-überzogenen Außenbereichs der Flagelle, detektiert wurde (Abb. 3.1.6 A). Gleiche Ergebnisse konnten auch bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an isolierten Flagellen erzielt werden (Abb. 3.1.6 B).

Ob der festgestellten Ko-Lokalisierung eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen zugrunde lag, sollte nun mit weiteren Versuchen an isolierten Cytoskeletten der Trophozoiten geklärt werden. Durch diese Methode (Kap. 3.1.6.2), bei der die Cytoskelette mit dem daran gebundenen Proteinen von der Plasmamembranhülle befreit werden, konnten vor einigen Jahren Giardine als cytoskelettale Proteine identifiziert werden (HOLBERTON & WARD, 1981; CROSSLEY & HOLBERTON, 1985).

Während der anti-Tubulin-Antikörper alle cytoskelettalen Strukturen deutlich markierte, zeigte die Inkubation mit dem anti- $\alpha 14$ -Antikörper kein signifikantes Fluoreszenzsignal (Abb. 3.1.7). Somit ist eine direkte Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und $\alpha 14$ fragwürdig. Da die verwendete Methode zur Isolierung der Cytoskelette sehr strapaziös für die Zelle ist, könnte jedoch auch der Methodenablauf eine Fehlerquelle darstellen, sodass mögliches, an Mikrotubuli gebundenes $\alpha 14$ schon bei der Durchführung verloren gegangen sein könnte. Allerdings verstärken die Ergebnisse der Ko-Pelletierungsversuche mit polymerisiertem Tubulin von SZKOWOWSKA (2004) den Ausschluss einer direkten Wechselwirkung zwischen $\alpha 14$ mit den Mikrotubuli, da das Protein bei diesem Experiment auch unabhängig von der

Mikrotubuli-Zugabe in Anwesenheit von Calcium präzipitierte. Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass die Wechselwirkung über ein Linkerprotein, wie z.B. ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP), vermittelt wurde, da auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf eine Interaktion mit den Mikrotubuli hindeuteten (Kap. 3.1.3.2, Abb. 3.1.4). Aus diesem Grund wurden die isolierten Cytoskelette vor der Inkubation mit den Antikörpern entweder mit Rohextrakt, rekombinanten $\alpha 14$ oder nacheinander mit beiden überschichtet, um eine Linker-vermittelte Interaktion nachweisen zu können (Kap. 3.1.6.2, Abb. 3.1.8). Sowohl die Überschichtung mit dem rekombinanten Protein als auch die Kombination aus Rohextrakt und Protein zeigten in den immuncytologischen Untersuchungen eine Ausbreitung der Fluoreszenz über das ganze Cytoskelett im Vergleich zum mitgeführten Prä-Immuneserum. Da das Fluoreszenzsignal sich nicht wie erwartet auf die Flagellen beschränkte, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung des rekombinanten Proteins mit dem Cytoskelett handelte, welche das native $\alpha 14$ -Giardin nicht aufweisen würde. Es könnte aber auch gegen ein Linker-vermitteltes und für ein direktes Binden des Proteins an das Cytoskelett sprechen. Dabei könnte die spezifische Lokalisation des $\alpha 14$ -Giardins in der Flagelle von einem zweiten Parameter, wie z.B. einer posttransnationalen Modifikation, beeinflusst werden. Die Frage, ob und wie das $\alpha 14$ -Giardin mit dem Cytoskelett wechselwirkt, konnte somit nicht abschließend geklärt werden.

4.1.2.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem $\alpha 14$ und dem $\alpha 7.3$ -Giardin bzw. der Ser/Thr-Kinase

Für nähere Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob das durch die Affinitätschromatographie identifizierte $\alpha 7.3$ -Giardin oder die Ser/Thr-Kinase als potentielle Bindepartner des $\alpha 14$ in Frage kommen, mussten zunächst polyklonale Antikörper sowohl gegen das $\alpha 7.3$ als auch gegen die Kinasedomäne (STK) Ankyrin-Domäne (Ank) hergestellt werden. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Genfragmente in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert (Kap. 3.1.7.1) und nach der Transformation in einen *E. coli*-Expressionsstamm heterolog exprimiert (Kap. 3.1.7.2). Mit diesen rekombinanten Proteinen konnten anschließend verschiedene Tierspezies zur Herstellung der Antikörper immunisiert werden. Nach Erhalt der Antiseren wurde mittels einer „Far Western“-Analyse die mögliche Interaktion zwischen dem $\alpha 7.3$ -Giardin, der Kinase- und Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase zum $\alpha 14$ -Giardin untersucht (Kap. 3.1.7.3, Abb. 3.1.12). Diese bestätigte für alle drei untersuchten Proteine eine potentielle Wechselwirkung mit $\alpha 14$, währenddessen das als Negativkontrolle verwendete BSA keine Interaktion mit dem Giardin aufwies.

Die parallel zur „Far Western“-Analyse durchgeführten immunocytoologischen Untersuchungen zeigten jedoch ein widersprüchliches Ergebnis in Bezug auf die potentielle Bindung von $\alpha 7.3$ und $\alpha 14$ (Kap. 3.1.7.4). Während die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Ko-Lokalisation der Ser/Thr-Kinase und des $\alpha 14$ in den Flagellen belegte, war das $\alpha 7.3$ -Giardin ausschließlich cytosolisch lokalisiert, und somit eine Interaktion dieser beiden Proteine unwahrscheinlich (Abb. 3.1.13 A-C). Das cytosolische Vorkommen des $\alpha 7.3$ -Giardins wurde schon von WEILAND *et al.*, (2005) beschrieben und konnte somit bestätigt werden. Somit war das falsch-positive Ergebnis der „Far Western“-Analyse wahrscheinlich auf eine unspezifische Wechselwirkung der beiden Proteine zurückzuführen. Auch wenn die jeweiligen Fluoreszenzsignale und somit die Titer der eingesetzten Antikörper generell relativ niedrig waren, konnten doch beide Antikörper gegen die Kinasedomänen eine Lokalisierung dieser in den Flagellen detektieren. Auch eine „Western Blot“-Analyse mit isolierten Flagellen bestätigte das Vorkommen der Ser/Thr-Kinase in den Flagellen (Abb. 3.1.13 D).

Um zu überprüfen, ob das $\alpha 14$ -Giardin möglicherweise mit nur einer Domäne der Ser/Thr-Kinase wechselwirkt, und um weitere Untersuchungen zur möglichen Interaktion zwischen $\alpha 14$ und dem $\alpha 7.3$ -Giardin bzw. β -Tubulin anstellen zu können, wurde das „Yeast-Two-Hybrid“-System zu Hilfe genommen (Kap. 3.1.7.5). Bei dieser Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf genetischer Ebene (FIELDS & SONG, 1989) kann von einem Kontakt zwischen zwei Proteinen ausgegangen werden, wenn ein Wachstum der eingesetzten Hefestämme auf verschiedenen Selektionsmedien nach deren Paarung erfolgte.

Die durchgeführten Paarungsversuche mit den verschiedenen Hefestämme (Kap. 2.7.8, Tab. 2.8) konnten allerdings keine Wechselwirkung von $\alpha 14$ -Giardin sowohl mit dem $\alpha 7.3$ -Giardin als auch mit der Kinase-Domäne der Ser/Thr-Kinase auf genetischer Ebene nachweisen (Kap. 3.1.7.5, Abb. 3.1.14 A). Zwar zeigte das β -Tubulin auch keine Bindung an das $\alpha 14$, dabei ist aber zu berücksichtigen, dass eine Bindung von $\alpha 14$ an die Mikrotubuli der Flagellen trotzdem denkbar ist, da diese nicht allein aus β - sondern auch aus α -Tubulin bestehen. Somit könnte sich die Bindestelle für das $\alpha 14$ am α -Tubulin befinden oder durch das Zusammenspiel beider Tubulin-Untereinheiten erst gebildet werden. Beide Optionen sowie auch ein potentielles Linkerprotein, welches die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen vermitteln könnte, wurden bei diesen Experimenten nicht berücksichtigt. Ebenso könnten eventuell post-translationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen oder Glycosylierungen an den exprimierten Proteinen fehlen, die eine mögliche Bindung veranlassen könnten (GOLEMIS *et al.*, 1999).

Eine Interaktion konnte hingegen bei der Paarung zwischen $\alpha 14$ und der Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase festgestellt werden (Abb. 3.1.14 A+B). Da die auf den speziellen Selektionsmedien gewachsenen Kolonien einen blauen Phänotyp zeigten, konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Wechselwirkung der beiden Proteine die Binde- und die Aktivierungsdomäne einen aktiven GAL4-Transkriptionsfaktor bildeten. Ein falsch positives Ergebnis, welches nach GOLEMIS *et al.* (1999) gelegentlich auftreten kann, konnte mit Hilfe verschiedener Kontrollansätze ausgeschlossen werden. Mittels Immunpräzipitation konnte zusätzlich die für eine mögliche Wechselwirkung vorausgesetzte Expression beider Proteine in Hefe bestätigt werden (Kap. 3.1.7.6, Abb. 3.1.15). Diese Interaktion zwischen der Ankyrin-Domäne und dem $\alpha 14$ ist nicht ungewöhnlich, da das Ankyrinmotiv eines der am häufigsten in der Zelle vorkommenden Protein-Protein-Interaktionsmotive ist. Dabei besitzt das Ankyrinmotiv, welches auch Ankyrin-Repeat genannt wird, eine hochaffine Bindeeigenschaft zu seinem jeweiligen Zielprotein (BINZ *et al.*, 2004). Ankyrindomänen-tragende Proteine kommen in fast allen Spezies intra- und extrazellulär aber auch membrangebunden vor und interagieren über dynamische, nicht-kovalente Bindungen mit Membranproteinen (BORK, 1993). Das Ankyrinmotiv, welches meistens vier- bis sechsmal wiederholt innerhalb der Domäne vorliegt, besteht aus jeweils ca. 33 Aminosäureresten. Dabei bilden eine β -Haarnadelschleife (Turn), gefolgt von zwei antiparallelen α -Helices und einer weiteren Aminosäureschleife (Loop), die mit dem β -Turn des nächsten Repeats verbunden ist, das eigentliche Motiv (BINZ *et al.*, 2004; BORK, 1993). Die eingegangenen Interaktionen werden hierbei vorwiegend von dem β -Turn und der ersten α -Helix vermittelt (SEDWICK & SMERDON, 1999). Das Ankyrinmotiv wurde in mehr als 2000 Proteinen unterschiedlichster Funktion, darunter auch in Cytoskelettproteinen, gefunden und weist somit auf seine funktionelle Wichtigkeit hin (LETUNIC *et al.*, 2001). Möglicherweise findet die Interaktion zwischen dem Ankyrinmotiv und dem $\alpha 14$ -Giardin über die von SZKODOWSKA *et al.* (2002) identifizierten *Giardia*-typischen Motive statt. Nach Binden des $\alpha 14$ an das Motiv könnte möglicherweise eine Phosphorylierung des $\alpha 14$ durch die Kinase-Domäne der Ser/Thr-Kinase erfolgen, was vermutlich eine Konformations- mit anschließender Funktionsänderung des Giardins nach sich ziehen würde.

4.1.3 Nachweis der Phosphorylierung des $\alpha 14$ -Giardins

Die Phosphorylierung ist eine der am häufigsten vorkommenden kovalenten Modifikationen von Proteinen, bei denen eine endständige γ -Phosphorylgruppe von einem Phosphorylgruppdonor, wie z.B. ATP, durch eine Proteinkinase auf einen speziellen Akzeptoraminosäurerest übertragen wird. Durch diese Modifikation wird die Aktivität von Proteinen in Abhängigkeit von thermodynamischen, kinetischen und strukturellen

Veränderungen gesteuert. So sind Kinasen bei den verschiedensten intrazellulären Prozessen wie Zellteilung, Membrantransport oder auch Signaltransduktion beteiligt. Proteinkinasen besitzen eine unterschiedliche Substratspezifität und werden nach ihrem Akzeptoraminosäurerest in Serin/Threonin-, Tyrosin-, Histidin/Arginin/Lysin-, Cystein- oder Aspartat/Glutamat-Kinasen klassifiziert. Die am häufigsten in Eukaryonten vorkommende Proteinkinase ist dabei die Serin-Threonin-Kinase. Diese werden häufig über intrazelluläre Botenstoffe, wie cAMP, Calmodulin, Calcium oder Autophosphorylierung aktiviert und spielen eine Schlüsselrolle in biologischen Regulationsprozessen von eukaryotischen Zellen. Dort setzen sie als Antwort auf innere und äußere Signale weitere Kaskaden in Gang (KIM *et al.*, 2005). Im Genom von *Giardia* konnten 276 putative Proteinkinasen festgestellt werden, die zu 43 von 61 in Eukaryonten vorkommenden ursprünglichen Kinase-Subfamilien zählen. Ca. 70% von ihnen gehören zur verwandten NEK-Kinase-Familie, wohingegen Tyrosin- oder Histidinkinasen nicht gefunden werden konnten (MORRISON *et al.*, 2007). Da die meisten giardialen Kinasen über keine transmembranen Domänen verfügen, sie aber häufig Ankyrinmotive oder „coiled-coil“-Strukturen aufweisen, wird die spezifische Lokalisierung in der Zelle wahrscheinlich von diesen Strukturen übernommen (MORRISON *et al.*, 2007; ELMENDORF *et al.*, 2005). Unter den bereits identifizierten Proteinkinasen in *G. lamblia* befinden sich eine Proteinkinase A (PKA), die als Serin-Threonin-Kinase für die Bewegung und Exzystierung des Parasiten verantwortlich ist (ABEL *et al.*, 2001), sowie zwei extrazellulär regulierte Proteinkinasen (ERK) 1 und 2, die an der Enzystierung beteiligt sind (ELLIS *et al.*, 2003). Auch eine PKB wurde in *Giardia* entdeckt. Diese zählt generell zu einer Untergruppe der Serin-Threonin-Kinasen, die strukturell zu den PKA und PKC gehört, und besitzt eine regulierende Funktion in physiologischen Prozessen vieler Spezies (KIM *et al.*, 2005; MARTE *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass sie bei *G. lamblia* in eine Signalkaskade des Lebenszyklus involviert ist, da sie während der Enzystierung exprimiert wird (KIM *et al.*, 2005).

Unter den durch Phosphorylierung regulierten Proteinen befinden sich auch die Annexine A1, A2, A4, A6 und A7 (GERKE & MOSS, 2002; GERKE *et al.*, 2005). Wie schon erwähnt, führt die Phosphorylierung des N-Terminus von Annexin A1 und A2 durch die „epidermal growth factor“ (EGF)-Rezeptor-Kinase zur erhöhten, proteolytischen Sensibilisierung des Annexins A1 sowie zu einer Veränderung der Calcium-Affinität der Kerndomäne bei Annexin A2 (GERKE & MOSS, 2002; GERKE *et al.*, 2005). SOLITO *et al.* (2006) zeigten hingegen, dass Annexin A1, wenn es von einer MAP- oder PI3-Kinase phosphoryliert wird, mit der Membran interagieren bzw. in diese integriert werden kann.

Um die mögliche Phosphorylierung von $\alpha 14$ nachzuweisen, wurden verschiedene methodische Ansätze durchgeführt (Kap. 3.1.8). Zunächst wurde die allgemeine Kinaseaktivität im Rohextrakt von *G. lamblia* mittels Phosphorylierungsversuchen mit [γ - 32 P]-markiertem ATP bestätigt (Abb. 3.1.17 A). Auch in der durch die Affinitätschromatographie an immobilisiertem $\alpha 14$ -Giardin erhaltenen Elutionsfraktion konnten phosphorylierte Proteine, unter denen sich auch möglicherweise die autophosphorylierte Ser/Thr-Kinase und $\alpha 14$ -Giardin befand, ermittelt werden (Abb. 3.1.17 B). Zur weiteren Untersuchung der möglichen Phosphorylierung des Giardins wurden die α -Giardine aus dem Rohextrakt isoliert und mittels Phosphofärbung im SDS-Gel auf ihre Phosphorylierung untersucht. Auch hier konnte das $\alpha 14$ als phosphoryliertes Protein identifiziert werden (Abb. 3.1.19 B). Jedoch wies auch die mitgeführte Negativkontrolle ein Phosphorylierungssignal auf (Abb. 3.1.19 C). Dieses könnte auf eine zu hohe Konzentration des eingesetzten Proteins oder auf eine unerwartete Phosphorylierung des Chymotrypsins hindeuten. Wäre diese Fluoreszenz auf die Unspezifität des verwendeten Kits zurückzuführen, müssten nicht nur alle Markerspuren leuchten, sondern auch ein Vergleich der Phosphofärbung mit den Coomassie-gefärbten Gelspuren eine Konzentrationsabhängige-Fluoreszenz-Zunahme aufweisen. Dieses war nicht der Fall, denn einige Proteinbanden im Coomassie-Gel waren stark angefärbt, fluoreszierten aber nicht (Abb. 3.1.19 A+B). Somit konnte von einer wenigstens partiell spezifischen Detektion ausgegangen werden.

Zur Bestätigung der Phosphorylierung des $\alpha 14$ wurde zusätzlich eine Metallhydroxid-Affinitätschromatographie nach WOLSCHIN *et al.* (2005) durchgeführt. Diese Methode belegte die Phosphorylierung des $\alpha 14$ -Giardins, da ein unspezifisches Binden des phosphorylierten $\alpha 14$ -Giardins durch die mitgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.1.20 A+B). Die Resultate der verschiedenen Methoden lassen somit die potentielle Phosphorylierung des $\alpha 14$ -Giardins als sehr wahrscheinlich erscheinen.

Obwohl eine Phosphorylierung der Annexine A1 und A2 am N-Terminus bereits bekannt ist (GERKE & MOSS, 2002; GERKE *et al.*, 2005), ist der N-terminale Bereich als mögliche Position für eine Phosphorylierung des $\alpha 14$ -Giardins eher unwahrscheinlich, da sich die mittels „NetPhos 2.0“ und „NetPhosK 1.0“ (BLOM *et al.*, 1999/2004) vorhergesagte, wahrscheinlichste Phosphorylierungsstelle am Threonin 178 befindet (Anhang 7.3). Generell könnte diese Modifikation eine Funktions- oder Konformationsänderung veranlassen, sodass eine Bindung an andere Proteinkomponenten, wie z.B. einem unbekanntem Linkerprotein oder Tubulin, eingeleitet werden könnte.

4.1.4 Oligomierisierungsnachweis des α 14-Giardins

Zellvorgänge, die mit der Veränderung der Zellmorphologie einhergehen, werden von den dynamischen Komponenten des Cytoskeletts vollzogen. Zu diesen gehören die Mikrotubuli und die Aktinfilamente, deren Dynamik durch ihre assoziierten Proteine reguliert wird. Die zahlreichen Mikrotubuli-assoziierte Proteine, die sogenannten MAPs, werden dabei in die hochmolekularen MAPs (200-300 kDa) und die niedermolekularen Tau-Proteine (20-60 kDa) unterteilt. Sie sind wesentlich an den verschiedenen Funktionen der Mikrotubuli beteiligt und können deren Dynamik *in vitro* und *in vivo* entscheidend beeinflussen (DRECHSEL *et al.*, 1992; PRYER *et al.*, 1992; HIROKAWA, 1994; DHAMODHARAN & WADSWORTH, 1995). Dazu gehören viele zelluläre Prozesse wie die Zellkernpositionierung, der Vesikeltransport sowie die Stabilisierung der Zellform und Polarität (KILMARTIN & ADAMS, 1984; KELLOGG *et al.*, 1994). Dabei wird die Aktivität von mehreren MAPs über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert (CASSIMERIS, 1999). So ist z.B. bekannt, dass das ubiquitäre MAP4 zyklisch phosphoryliert und dephosphoryliert wird, wenn die Zellen in die Mitose eintreten bzw. diese wieder verlassen (TOMBES *et al.*, 1991; OOKATA *et al.*, 1997).

Generell werden einige α -Giardine, neben den β -Giardininen, der GASP-180-Familie und verschiedenen „coiled-coil“ Proteinen, zu den MAPs bzw. Cytoskelett-assoziierten Proteinen bei *G. lamblia* gerechnet (ELMENDORF *et al.*, 2005; MORRISON *et al.*, 2007). Es konnten aber keine den MAPs der höheren Eukaryonten entsprechenden Proteine in der Genomdatenbank von *Giardia* identifiziert werden (MCARTHUR *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass in anderen Spezies MAPs über Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Tubulin binden (DREWES *et al.*, 1998) und für das α 14-Giardin eine Cytoskelett-Assoziation (SZKODOWSKA *et al.* 2002) sowie eine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnten, führten zu der Hypothese, dass das α 14-Giardin eine MAP-Funktion in den Flagellen von *Giardia* übernehmen könnte. Dieses könnte eventuell durch Selbst-Assemblierung („self-assembly“) reguliert werden. Der Grund für diese Annahme war die Erkenntnis, dass das α 14-Giardin bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen Perlenschnur-ähnliche Strukturen innerhalb der Flagellen ausbildete (Kap. 3.1.3.1, Abb. 3.1.3), welche auf eine Bildung von α 14-Giardin-Oligomeren zurückzuführen sein könnte. Ein bekanntes Annexin, welches eine MAP-ähnliche Funktion aufweist, ist das Annexin A5. Dieses reguliert den Transport der Proteinkinase C entlang der Mikrotubuli mittels Annexin A5-vermittelter Vesikel (KHEIFETS *et al.*, 2006). Außerdem gehört es zu den Annexinen, die Oligomere bilden können. So formt es ein anti-thrombotisches Oligomer-Netzwerk an der Zelloberfläche, welches die Bindung an Heparansulfat vermittelt (ISHITSUKA *et al.*, 1998; CAPILA *et al.*, 1999/2001). Der erste Hinweis auf die Fähigkeit zur Oligomer-Bildung von α 14 wurde im

Rahmen dieser Arbeit durch den Einsatz des „ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer-Kit“ erhalten. Diese für die Suche nach möglichen Bindepartnern von $\alpha 14$ angewandte Crosslinking-Methode identifizierte in Anwesenheit von DTT ausschließlich $\alpha 14$ selbst, in Abwesenheit von DTT hingegen neben dem Monomer auch $\alpha 14$ -Oligomere (Kap. 3.1.9.1, Abb. 3.1.21). Zusätzlich offenbarte auch eine SDS-PAGE-Analyse nach ALLORE & BARBER (1984) die Tendenz von $\alpha 14$ zur Oligomerbildung (Kap. 3.1.9.2, Abb. 3.1.22). Dabei bildeten die neun Cysteinreste des $\alpha 14$ mindestens eine intra- und eine intermolekulare Disulfidbrücke.

Die Interaktion zwischen $\alpha 14$ -Giardin und den Flagellenmikrotubuli, die entweder über ein noch unbekanntes Linkerprotein oder mittels Selbstorganisation („self-assembly“) stattfindet, könnte über eine Ser/Thr-Kinase-vermittelte Phosphorylierungsreaktion des $\alpha 14$ -Giardins reguliert werden. Dieser Prozess könnte eine wichtige strukturelle Voraussetzung für die Funktion oder die Mobilität der Flagellen sein.

Alternativ zum Einfluss auf die Mobilität könnte das $\alpha 14$ -Giardin auch zur Stabilisierung der Flagellenmembran dienen. Das Genom von *G. lamblia* verfügt über keine Sequenzen für Aktin-assoziierte Proteine, die im allgemeinen die Membran mit den darunter liegenden Mikrotubuli bzw. Mikrofilamenten vernetzen. Aus diesem Grund könnten einige α -Giardine aufgrund ihrer Lokalisation in der Nähe der Plasmamembran diese Funktion übernehmen (MORRISON *et al.*, 2007). Somit könnten die α -Giardine maßgeblich durch die Quervernetzung von Plasmamembranen mit dem Cytoskelett an der Stabilisierung des gesamten Trophozoiten und im Falle des $\alpha 14$ -Giardins an der Festigung der Flagellen beteiligt sein (WEILAND *et al.*, 2005).

4.1.5 Bindung von $\alpha 14$ an Glykosaminoglykane

Proteoglykane, die aus einem Proteinkern und multiplen Glykosaminoglykanen (GAG) bestehen, kommen hauptsächlich in der extrazellulären Matrix, an Zelloberflächen oder in sekretorischen Granula vor (LINDAHL & HÖÖK, 1978). Sie sind in viele biologische Prozesse involviert, wobei die meisten von ihren Funktionen auf die Interaktion zwischen den GAGs und anderen Molekülen zurückzuführen sind (HILEMANN *et al.*, 1998). Die biologischen Aktivitäten der GAGs, wie z.B. Heparin und Heparinsulfat, beruhen dabei auf der Lokalisierung, Stabilisierung und Aktivierung/Inaktivierung von interagierenden Proteinen (LINHARDT *et al.*, 1997). Somit vermittelt die GAG-Protein-Wechselwirkung neben dem Zell-Zell-Kontakt und dem Zellwachstum durch ein gerichtetes Anheften die Infektion der Wirtszellen durch z.B. Viren oder Protozoen (LINHARDT *et al.*, 1997; VAN PUTTEN & PAUL, 1975; KARDAMI *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 1997; SAWITZKY, 1996). Auch fördert das Binden von

Heparin und Heparansulfat im Allgemeinen die Proteinkomplex-Bildung (PLOTNIKOV *et al.*, 2000), z.B. zwischen Ligand und Rezeptor. Erste strukturelle Untersuchungen an Heparinbindenden Proteinen, wie z.B. Vitronectin, ergaben zwei Konsensussequenzen für eine Heparinbindestelle, bestehend aus den basischen Aminosäure-Clustern XBBXBX und XBBBXXBBX (CARDIN & WEINTRAUB, 1989). Dabei steht das „B“ für basische (Arg, Lys, HS) und „X“ für beliebige Aminosäuren. Während das Motiv XBBXBX häufig in β -Faltblättern zu finden ist, kommt das zweite Motiv in α -Helices vor. Durch die Konformationen der Sekundärstruktur werden hierbei die basischen Aminosäuren zu einer Seite angeordnet, wohingegen die beliebigen Aminosäuren zum Proteinkern gerichtet vorliegen. Mittels weiterführenden Studien an GAG-bindenden Proteinen konnten zusätzliche, auf verschiedene Parameter beruhende Erkennungsmotive für eine Bindestelle nachgewiesen werden (SOBEL *et al.*, 1992; MARGALIT *et al.*, 1993; HILEMAN *et al.*, 1998). Welches der GAG von den GAG-bindenden Proteinen bevorzugt wird, liegt dabei an der Wahl der basischen Aminosäure innerhalb des Konsensusmotivs (HILEMAN *et al.*, 1998). Obwohl die Annexine als intrazelluläre Proteine gelten, wurde für mehrere von ihnen eine Beteiligung an extrazellulären Prozessen nachgewiesen, die vorwiegend über Calcium-abhängige Interaktionen mit GAG vermittelt werden. Hierzu gehört neben den Annexinen A1, A2, A4, A6 und B1 auch das A5, welches zusätzlich zu seiner anticoagulativen Wirkung auch durch Bindung an Heparansulfat ein anti-thrombotisches Netzwerk an der Zelloberfläche formt (ALVAREZ-MARTINEZ *et al.*, 1996; KASSAM *et al.*, 1997; ISHITSUKA *et al.*, 1998; CAPILA *et al.*, 1999/2001; WINTER *et al.*, 2006). Kristallstrukturanalysen von Annexin A5 in Komplex mit Heparin-ähnlichen Tetrasacchariden offenbarten zwei Heparinbindestellen mit basischen Aminosäure-Clustern im Molekül, eine Calcium-abhängige an der konvexen Seite (Anhang 7.5, rot und kursiv markiert) und eine Calcium-unabhängige an der konkaven Seite (Anhang 7.5, rot und unterstrichen markiert) des Proteins. Beide Bindestellen werden dabei durch eine vorangehende Konformationsänderung, welche durch eine Calciumbindung induziert wurde, zugänglich gemacht. Somit ist das Calcium für die Heparinbindung essentiell. Nach einem Modell von CAPILA *et al.* (2001) werden beide Bindestellen durch ein einziges Heparinmolekül besetzt. Da der an der konvexen Seite gebundene Heparinteil jedoch *in vivo* die Calcium-abhängige Membranassoziation stören würde, wird das Heparin an dieser Seite von den Phospholipiden ersetzt (ISHITSUKA *et al.*, 1998; TAIT *et al.*, 1989). CAPILA *et al.* (2001) schließt daraus, dass, obwohl die Calcium-abhängige Heparinbindung an der konvexen Seite *in vitro* nachweisbar ist, diese Fähigkeit *in vivo* kaum Bedeutung besitzt.

Nicht nur für Annexine höherer Eukaryonten, sondern auch für zwei Annexine aus *G. lamblia*, dem α 1- und α 2-Giardin, konnte eine GAG-Bindeaktivität nachgewiesen werden (WEILAND *et al.*, 2003). Neben der Calcium-abhängigen Bindung an Heparin und Heparansulfat konnte auch eine Interaktion mit intestinalen Epithelzellen für beide Proteine

festgestellt werden. Da Heparansulfat das im intestinalen Raum am weitesten verbreitete GAG ist (IANELLI *et al.*, 1998), könnte es für die Anheftung von *G. lamblia* während der Lebensstadien, in denen die ventrale Scheibe als Anheftungsstruktur fehlt, verantwortlich sein (WEILAND *et al.*, 2003). Die dafür notwendige Sekretion von $\alpha 1$ an die Zelloberfläche konnte vor allem während der frühen Exzystierungsphase nachgewiesen werden. Somit spielt das $\alpha 1$ -Giardin vermutlich eine bedeutende Rolle im frühen Wirts-Parasiten-Kontakt (WEILAND *et al.*, 2003). Unter der Annahme, dass das in den Flagellen lokalisierte $\alpha 14$ -Giardin eine Heparinbindestelle aufweist und es auf die Flagellen-Membran-Oberfläche sezerniert wird, könnte auch dieses Giardin an der Herstellung des Wirtskontakts beteiligt sein. Aus diesem Grund wurde einerseits die Affinität von $\alpha 14$ zu Heparin mittels einer Heparinsepharose-Säule bestimmt und andererseits untersucht, ob das Protein eine zusätzliche Bindestelle für andere GAG aufweist. Die Affinitätschromatographie bestätigte eine Calcium-abhängige Affinität zu Heparin (Kap. 3.1.10.1, Abb. 3.1.23). Während in Abwesenheit von Calcium das $\alpha 14$ nur schwach an die Matrix band und mit 0,4 M NaCl eluiert werden konnte, konnte in Gegenwart von Calcium eine weitaus stärkere Bindung festgestellt werden (Elution mit 0,7 M NaCl). Weiterführend wurde untersucht, ob das an Heparinsepharose gebundene $\alpha 14$ in Gegenwart verschiedener GAG zu verdrängen war. Eine Verdrängungsreaktion, die sich mit der Desorption des Proteins von der Matrix äußerte, konnte tatsächlich durch Zugabe von Heparin oder Hyaluronsäure erreicht werden (Kap. 3.1.10.2, Tab. 3.1). Das bei dem Versuch teilweise noch an der Sepharose verbliebene $\alpha 14$ lässt auf eine starke Wechselwirkung mit dem Heparin schließen. Chondroitin C und Dextran hingegen hatten keinen Einfluss auf die bestehende $\alpha 14$ -Heparin-Bindung. Somit konnte von einer Bindestelle für Heparin und Hyaluronsäure im $\alpha 14$ ausgegangen werden. Ein Sequenzvergleich („CLUSTAL W“, THOMPSON *et al.*, 1994) mit dem humanen Annexin A5 (NCBI-Accessionnr.: M19384) ergab, dass die für das A5 postulierten Heparin-Bindemotive nur teilweise auch im $\alpha 14$ vorhanden sind (Anhang 7.5, grün markiert). Während das $\alpha 14$ einerseits die Sequenzmotive für die Calcium-abhängige GAG-Bindestelle nur partiell besitzt (Anhang 7.5, grün und kursiv markiert), weist es andererseits eine zusätzliche XBBBXXBX-Konsensussequenz bei den Aminosäuren 63-70 auf (Anhang 7.5, gelb markiert). Dieses für α -helikale Proteine typische Bindemotiv ist auf der konvexen Molekülseite des $\alpha 14$ lokalisiert und somit vermutlich für die Vermittlung der Calcium-abhängigen Bindung an Heparin- und Hyaluronsäure verantwortlich. Des Weiteren sind auch die für die Calcium-unabhängige Interaktion des Annexin A5 verantwortlichen Aminosäurereste im $\alpha 14$ nicht vollständig vorhanden (Anhang 7.5, grün und unterstrichen markiert). Aus diesem Grund konnte vermutlich keine Calcium-unabhängige Bindung nachgewiesen werden. Eine Beteiligung der gekennzeichneten Aminosäurereste an einer Heparinbindung ist sowieso fragwürdig, da diese zum Teil den als Giardin-Motiv bezeichneten Aminosäuren entsprechen (Anhang

7.2). Das Giardin-Motiv, ist den meisten α -Giardinen, wie z.B. $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (NCBI-Accessionnr.: X52485/M34550), gemein, fehlt jedoch in den Annexinen höherer Eukaryonten (z.B. Annexin A5). Es wird angenommen, dass es möglicherweise an der Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen beteiligt ist (SZKODOWSKA *et al.*, 2002) Genaues ist jedoch nicht darüber bekannt.

Ein Widerspruch zu der offensichtlichen GAG-Bindeaktivität von $\alpha 14$ stellt dessen ausschließliche Lokalisierung des $\alpha 14$ -Giardins innerhalb der Flagellen dar. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an lebenden Trophozoiten lassen keine Sekretion an die Membranoberfläche der Flagellen erkennen (Kap. 3.1.10.3, Abb. 3.1.24). Trotzdem ist aber nicht ausgeschlossen, dass die Lokalisation des $\alpha 14$ -Giardins, wie im Falle von $\alpha 1$, Lebenszyklus-abhängig ist. Zwar wurde das $\alpha 1$ -Giardin auch partiell auf der Trophozoitenoberfläche nachgewiesen, die Hauptsekretion des Proteins fand jedoch während der frühen Exzystierung statt (WEILAND *et al.*, 2003). Da das Imitieren des giardialen Lebenszyklus im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, bleibt diese Frage offen. Des Weiteren könnte die Calcium-abhängige GAG-Bindung aber, wie bei Annexin A5, aufgrund der Lage der Heparinbindestelle an der konvexen Molekülseite des $\alpha 14$ die Membran-Assoziation *in vivo* beeinflussen (CAPILA *et al.*, 2001). Somit würde die GAG-Bindung nur *in vitro* erfolgen, *in vivo* hingegen der Membraninteraktion weichen und somit auch eine Sekretion überflüssig machen.

4.2 Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des $\alpha 19$ -Giardins

4.2.1 Expressionsnachweis des $\alpha 19$ -Giardins

In der Gruppe der α -Giardine von *Giardia lamblia* konnten sehr unterschiedliche Expressionsraten festgestellt werden. So zählen innerhalb dieser Gruppe das $\alpha 1$ - und das $\alpha 11$ -Giardin zu den Proteinen mit den höchsten Expressionsraten gefolgt von $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 7.2$, $\alpha 7.3$ und $\alpha 18$ (PALM *et al.*, 2003). Die restlichen von WEILAND *et al.* (2005) untersuchten α -Giardine weisen nur schwache Genexpressionsraten auf. Dabei diente ein β -Giardin, welches eine relativ konstante Genexpression im ganzen Lebenszyklus aufweist, als Vergleich (WEILAND *et al.*, 2005). Neben den verschiedenen Expressionsniveaus zeigt auch die Tatsache, dass eine Überexpression bestimmter α -Giardine lethale Auswirkungen auf den Organismus hat, die Notwendigkeit einer strengen Regulation der α -Giardinbiosynthese in *G. lamblia*. Das einzige unter den 21 α -Giardin-Genen, von dem keine Kenntnisse über die

Synthese des Proteins innerhalb von *G. lamblia* vorlagen, war das α 19-Gen. Der Nachweis der Transkription des codierenden Gens wurde durch eine RT-PCR (Kap. 3.2.1, Abb. 3.2.1) erbracht. Für weiterführende Untersuchungen am α 19-Giardin wurde ein α 19-Plasmidkonstrukt (KELLERSMANN, 2007) hergestellt, nach dessen Transformation in einen *E. coli*-Expressionsstamm die heterologe Expression des α 19-Giardins stattfinden konnte (Kap. 3.2.2, Abb. 3.2.2). Die sich daran anschließende Herstellung eines polyklonalen Antikörpers war ein erster Schritt zur Lokalisation und Charakterisierung von α 19-Giardins.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation des α 19-Giardins in *G. lamblia*

Ein Hinweis auf die Vielfältigkeit der Funktionen der α -Giardine in *G. lamblia* zeigt das spezifische subzelluläre Verteilungsmuster der Proteine in den Trophozoiten (WEILAND *et al.*, 2005). Neben der Assoziation vieler α -Giardine mit der Plasmamembran, interagieren einige α -Giardine auch mit der ventralen Scheibe (α -3, α -5 und α -17) oder sind in den Flagellen lokalisiert (α 2-, α 5-, α 9-, α 10-, α 14-, α 17). Zur Charakterisierung der funktionellen Relevanz des α 19-Giardins waren zunächst Untersuchungen zur Bestimmung der Lokalisation des Proteins notwendig. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzversuche mit Hilfe von anti- α 19- und anti-Tubulin-Antikörpern an den Trophozoiten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten ein ausschließliches Vorkommen des α 19-Giardins im ventralen Flagellenpaar des Trophozoiten, wo es mit den Axonema der Flagellen ko-lokalisierte (Kap. 3.2.3.1, Abb. 3.2.3 A). Auch Versuche an isolierten Flagellen bestätigten diese Lokalisierung (Abb. 3.2.3.B, Abb. 3.2.4). Eine direkte Interaktion zwischen den Mikrotubuli der Axonema und dem α 19-Giardin konnte allerdings durch Untersuchungen an isolierten Cytoskeletten von *G. lamblia* nicht festgestellt werden (Kap. 3.2.3.3, Abb. 3.2.6). Der α 19-Antikörper zeigte nur unspezifische Signale, was ein Vergleich mit dem Prä-Immunsrum belegte. Wenn es sich bei der möglichen Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und dem α 19-Giardin jedoch um eine schwache Bindung handelt, könnte eine Interaktion zwischen Cytoskelett und α 19 dennoch existieren, da diese Bindung während der Cytoskelettisolierung gelöst worden sein könnte. Eine andere Alternative wäre die Interaktion zwischen den beiden Proteinen über ein nicht bekanntes Linkerprotein. Das Vorhandensein einer Glykosylierungsstelle (NDT) und eines Integrin-Motivs (RGD) in der Primärstruktur des α 19 (Anhang 7.4) weist auf eine mögliche extrazelluläre Funktion des Proteins hin. Aus diesem Grund wurden Immunfluoreszenzversuche an lebenden Trophozoiten durchgeführt, um die Sekretion des α 19 auf die Membranoberfläche der ventralen Flagellen zu untersuchen (Kap. 3.2.3.2, Abb. 3.2.5). Es konnte jedoch kein extrazelluläres Vorkommen des α 19-Giardins bestätigt werden. Die Verwendung dieser potentiellen Modifikationsmotive innerhalb des Organismus bleibt somit offen. Es könnte sich dabei eventuell um eine Lebenszyklus-

abhängige Sekretion auf die Oberfläche handeln, wie es vom α 1-Giardin bekannt ist (WEILAND *et al.*, 2003).

Das ventrale Flagellenpaar nimmt aus mehreren Gründen eine Sonderstellung unter den Flagellen ein. Einerseits weist es eine Modifikation zum klassischen $(9 \times 2) + 2$ -Aufbau einer Flagelle auf. So bildet die Flagellenmembran auf der einen Seite eine Art Flosse (fin) aus, wohingegen sich auf der gegenüberliegenden Seite eine zusätzliche „Röhre“ (rod) entlang der Flagelle befindet. Diese ist vermutlich sowohl mit der Membran als auch mit den benachbarten Mikrotubuli des Axonems verbunden. Die genaue Funktion dieser Ultrastruktur ist allerdings noch nicht geklärt. So wird angenommen, dass sie für eine spezialisierte Substratbindung von Bedeutung sein könnte (HOLBERTON 1973, 1974). Andererseits besitzt es auch das größte Funktionsspektrum unter den Flagellen von *G. lamblia*. Das von HOLBERTON (1974) favorisierte „hydrodynamische Modell“ schreibt den ventralen Flagellen eine elementare Funktion bei der Anheftung des Parasiten an das Darmepithel des Wirtes zu. Während die übrigen drei Flagellenpaare des adhären Trophozoiten bewegungslos verweilen, erzeugt das kontinuierliche Schlagen der ventralen Flagellen einen Unterdruck unterhalb der mit dem Darmepithel in Kontakt stehenden ventralen Scheibe. Somit wird es den Trophozoiten ermöglicht, sich an der Darmwand festzusaugen (HOLBERTON, 1974). Ein weiterer Effekt des entstehenden Flüssigkeitsstroms könnte das Hineinspülen von Nährstoffen unter den Parasiten sein, wodurch die Nährstoffaufnahme begünstigt wird (GOSH *et al.*, 2001). Da die Schlagfrequenz der ventralen Flagellen von 5-10 Schlägen pro Sekunde zur Erzeugung des Flüssigkeitsstroms die gleiche wie beim Geradeaus-Schwimmen ist, könnte das α 19-Giardin, neben anderen α -Giardininen des ventralen Flagellenpaares (α 10, α 17), sowohl eine Rolle bei der Fortbewegung des Organismus als auch bei der Anheftung an den Wirt bzw. bei der Nahrungsaufnahme spielen (GOSH *et al.*, 2001). Wahrscheinlich ist dabei der Aspekt der Fortbewegung eher zweitrangig, da an diesem Prozess alle Flagellen beteiligt sind.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die ventralen Flagellen während der Exzystierung in einem sehr frühen Stadium die Zystwand durchdringen, was eine wichtige Rolle bei diesem Prozess vermuten lässt (BUHEL *et al.*, 1987). Dabei könnten die α -Giardine durch ihre Calcium-abhängige Bindung an Membranen und ihre Assoziation an Cytoskelettstrukturen bei der Wiederherstellung dieser flagellaren Strukturen mitwirken (WEILAND *et al.*, 2005). Das α 19-Giardin könnte also speziell bei der Reassemblierung der ventralen Flagellen von Bedeutung sein. Eine durch spezifische Proteine unterstützte Wiederherstellung der ventralen Flagellen wäre unter der Annahme des hydrodynamischen Modells sinnvoll. Damit könnte die Anheftung des Parasiten an das Darmepithel des Wirtes beschleunigt werden.

4.2.3 Nachweis der klassischen Annexin-Eigenschaft

Das klassische biochemische Merkmal der Annexinfamilie ist die Fähigkeit, Calcium-abhängig an biologische und künstliche Phospholipidmembranen zu binden (GERKE & MOSS, 2002). Da aufgrund von Sequenzhomologien die α -Giardine zu den Annexinen gezählt werden, sollten sie diese Eigenschaft mit den Annexinen höherer Eukaryonten gemein haben (MORGAN & FERNANDEZ, 1995 & 1997). Für verschiedene α -Giardine wie z.B. $\alpha 1$ (BAUER *et al.*, 1999) oder $\alpha 14$ (SZKODOWSKA *et al.*, 2002) konnte dieses bereits belegt werden.

Zur Untersuchung, ob das $\alpha 19$ -Giardin dieses charakteristische Annexinverhalten aufweist, wurde ein Phospholipidbindestudie durchgeführt (Kap. 3.2.4, Abb. 3.2.7). Hierzu wurde ein N-terminal verkürztes $\alpha 19$ -Giardin ($\alpha 19_{\Delta 1-15}$) eingesetzt, was den Vergleich zu anderen α -Giardinen bzw. Annexinen vereinfachte, da es einerseits die Beteiligung des Acylmotiv-tragenden N-Terminus an einer möglichen Membranbindung von vornherein ausschloss und andererseits den Verwandtschaftsgrad zu anderen α -Giardinen um 3% erhöhte.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch das $\alpha 19$ -Giardin Calcium-abhängig an Phospholipidmembranen bindet und diese Interaktion durch Entfernen der Calcium-Ionen aufgehoben werden kann. Eine solche Reversibilität der Bindung ist auch bei Annexinen höherer Eukaryonten beobachtet worden (ANDREE *et al.*, 1990; MEERS, 1990). Der Grund für die nur teilweise Resolubilisierung des $\alpha 19$ von der Membran nach Calcium-Entzug, lag vermutlich an der nicht optimalen Versuchsdurchführung. Aufgrund der sichtbaren Reversibilität der Bindung kann auf ein korrekt gefaltetes rekombinantes Protein geschlossen werden, da nur dieses in der Lage sein sollte an Phospholipide zu binden. Solch eine Calcium-abhängige Wechselwirkung zwischen α -Giardin und Membran verändert nicht nur die Membran- sondern auch die Proteinstruktur (LANGEN *et al.*, 1998; SOKOLOV *et al.*, 2000). Diese Konformationsänderungen können wichtig für die biologischen Funktionen der Annexine sein. So ist z.B. der N-Terminus des humanen Annexins A1 nur bei Calcium-Bindung für Interaktionspartner zugänglich (ROSENGARTH & LUECKE, 2003). Da das $\alpha 19$ auch ein typisches Annexinverhalten zeigt, könnte auch dieses Protein eine Calcium-abhängige Konformationsveränderung durchlaufen und dabei weitere für Interaktionen vorgesehene reaktive Gruppen freilegen.

Neben dem Auftreten des Sequenzmotivs GKATD{37}D (Anhang 7.2/7.4) in der zweiten Domäne des $\alpha 19$ -Giardins, welches dem Endonexinmotiv (Kap. 1.5) sehr nahe kommt, belegen auch Sekundärstruktur-Analysen mit Hilfe der Programme „GOR4“ (COMBET *et al.*, 2000) und „Porter Prediction“ (POLLASTRI *et al.*, 2007) die Zugehörigkeit des $\alpha 19$ -Giardins zur Annexinfamilie. Genau wie bei anderen eukaryotischen Annexinen wird für das $\alpha 19$ eine

α -helikale Struktur des Moleküls vorhergesagt. Dabei werden, wie von GERKE & MOSS (1997) beschrieben, die α -Helices der einzelnen Domänen durch kurze Abschnitte aus „random coil“-Strukturen unterbrochen. Auch die für die Annexine charakteristische konvex/konkave-Struktur scheint beim $\alpha 19$ vorzuliegen. Ein Computerprogramm-gestützter Vergleich (Swiss Pdb-Viewer; GUEx & PEITSCH, 1997) mit bekannten Kristallstrukturmodellen anderer Annexine zeigt eine nahe strukturelle Verwandtschaft zum Annexin A4 (ZANOTTI *et al.*, 1998).

Da das $\alpha 19$ -Giardin zur Familie der Annexine zählt, wäre somit die Annahme einer Cytoskelett-Assoziation nicht abwegig. So sind z.B. $\alpha 3$ und $\alpha 17$ an der ventralen Scheibe zu finden (WEILAND *et al.*, 2005). Auch andere Annexine aus höheren Eukaryonten wurden als Cytoskelett-bindende Proteine identifiziert, und es wird vermutet, dass zumindest einige Mitglieder der Familie an der Regulation der Membran-Cytoskelett-Dynamik beteiligt sind (GERKE & MOSS, 2002). So ist bekannt, dass mehrere Annexine, z.B. Annexin A2, in Calcium-regulierter Weise an F-Aktin binden (KHANNA *et al.*, 1990; FILIPENKO & WAISMAN, 2001).

Aufgrund der exklusiven Lokalisierung des $\alpha 19$ in den ventralen Flagellen könnte die vom Protein vermittelte Membran-Cytoskelett-Verbindung einen grundlegenden Einfluss auf die Schlagcharakteristik dieser Flagellen ausüben und somit eine entscheidende Rolle für die Anheftung bzw. Nahrungsaufnahme des Parasiten innehaben.

4.2.4 Untersuchungen zu potentiellen posttranslationalen Modifikation von $\alpha 19$

Fettsäuremodifikationen an Proteinen erhöhen ihre Hydrophobizität und vermitteln über die angehängte Fettsäure eine mögliche Interaktion mit Membranen (ROSKOSKI, 2003). Eine der möglichen Fettsäuremodifikationen ist dabei die N-Myristoylierung, welche vorwiegend als hydrophober „Anker“ für schwache, reversible Protein-Membran-Wechselwirkungen oder das Protein-„Targeting“ zu intrazellulären Membranstrukturen verantwortlich ist. (PEITZSCH & MC LAUGHLIN, 1993; MURRAY *et al.*, 1997). Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte $\alpha 19$ -Giardin besitzt als einziges der 21 α -Giardine eine N-terminale Extension mit einem Erkennungsmotiv (GCXXS) für eine potentielle Myristoylierung. Aus diesem Grund wurde nun mit Hilfe einer Triton X-100 Extraktion nach HOU *et al.* (2005) überprüft, ob die nachgewiesene Lokalisation des $\alpha 19$ -Giardins in der unlöslichen Membranfraktion des Trophozoiten-Rohextraktes (Kap. 3.2.5, Abb. 3.2.8 A) auf eine solche Fettsäuremodifikation zurückzuführen war. Das $\alpha 19$ -Giardin zeigte hierbei das charakteristische Verhalten eines membranständigen Proteins, da es sich nur durch die Behandlung mit Triton X-100, jedoch nicht mit NaCl, Carbonat oder Harnstoff aus der Membranfraktion extrahieren ließ (HOU *et al.*, 2005, Abb. 3.2.8 B). Somit kann diese Eigenschaft als erster Hinweis auf eine mögliche

Lipidmodifikation des α 19-Giardins angesehen werden. Weiterführende Versuche müssen hierbei klären, ob tatsächlich eine N-Myristoylierung am α 19-Giardin vorliegt.

Ein bereits bekanntes Annexin, für das eine Myristoylierung beschrieben wurde, ist das humane Annexin A13 (TURNAY *et al.*, 2005). Dieses Annexin stellt evolutiv gesehen den Ursprung aller Vertebraten-Annexine dar und nimmt aus diesem Grund eine Brückenfunktion zwischen den Vertebraten-Annexinen und den Annexinen niederer Organismen, wie z.B. den Protisten, ein. Annexin A13 kommt in einer myristoylierte Isoform, Annexin A13b, vor, welche wesentlich stabiler ist als die nicht myristoylierte (FERNANDEZ & MORGAN, 2003; MORGAN & FERNANDEZ, 1997). Sie veranlasst z.B. den apikalen Transport in den Epithelzellen oder ist an der Formierung und Anheftung von Transportvesikeln vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur apikalen Membran beteiligt (LECAT *et al.*, 2000; PLANT *et al.*, 2000). Verglichen mit dem Annexin A13 könnte die Myristoylierung des α 19 somit nicht nur für die Membranverankerung sondern für den gerichteten Transport zu den Membranen der ventralen Flagellen verantwortlich sein. Es könnte dabei eine durch die Acylierung hervorgerufene Funktion haben und an dem Transport von bestimmten Vesikeln zu den ventralen Flagellen beteiligt sein. Die bereits bekannten Beteiligungen der Annexine höherer Eukaryonten am vesikulären Transport lassen darauf schließen, dass die α -Giardine generell diese Funktion in *G. lamblia* übernehmen könnten (GERKE & MOSS, 2002).

Eine weitere offene Frage ist, ob die Calcium-abhängige-Membranassoziation der Annexine generell eine unterstützende Wirkung auf die Lipidmodifikations-vermittelte Membranbindung ausübt oder diese im Falle von α 19 sekundär ist. Bei bestehender Myristoylierung könnten die Calcium-Ionen ansonsten auch der Regulierung der Membranverankerung, dem sogenannten „Myristoyl-Ligand-Switch“, dienen. Dieser ist für Calciumbindende-Proteine wie das Recoverin bereits beschrieben worden (RESH, 1999). Dabei wird durch die Bindung von Calcium-Ionen eine Konformationsänderung im Protein bewirkt, sodass die gebundene Myristinsäure mit der Membran interagieren kann.

Ein anderer Mechanismus zur Regulierung der Reversibilität der möglichen N-Myristoylierung könnte auch der „Myristoyl-Electrostatic-Switch“ sein. Ein Beispiel für die Regulation der reversible N-Myristoylierung über diesen Mechanismus stellt das MARCKS-Protein dar, bei dem zusätzlich zur Myristoylierung ein Cluster von basischen Aminosäuren im Protein für die Membranbindung verantwortlich ist (MCLAUGHLIN *et al.*, 1995). Werden nun diese Aminosäuren durch die Proteinkinase C phosphoryliert, führt die vermehrte negative Ladung zur Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkung mit den Lipiden und schlussendlich zur Ablösung des MARCKS-Proteins von der Membran ins Cytosol (THELEN *et al.*, 1991). Dabei induziert die Faltung des Proteins die Entstehung des notwendigen Aminosäureclusters. Mit Hilfe einer Metallhydroxid-Affinitätschromatographie (Kap. 3.2.6)

konnte im Rahmen dieser Arbeit die Phosphorylierung für das α 19-Giardin nachgewiesen werden, wobei verschiedene phosphorylierte und nicht phosphorylierte Proteine zur Kontrolle mitgeführt wurden (Abb. 3.2.10). Somit könnte diese Phosphorylierung die reversible Bindung des myristoylierten α 19-Giardins an die Flagellenmembran vermitteln. Ein Annexin, welches sowohl eine Phosphorylierung als auch eine Myristoylierung aufweist, ist das Annexin A1. Bei diesem Annexin sind beide posttranslationalen Modifikationen für eine Translokation des Proteins vom Cytoplasma zur Zellmembran oder Zelloberfläche

verantwortlich (SOLITO *et al.*, 2006). Somit könnte eine Kombination beider Modifikationen auch beim α 19-Giardin eventuell den gerichteten Transport zu den ventralen Flagellen veranlassen. Alternativ könnte die Phosphorylierung aber auch zu einer Veränderung der Proteineigenschaften des α 19 führen, wie es z.B. bei Annexin A2 der Fall ist (DEORA *et al.*, 2004).

4.3 Ausblick

Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Interaktion zwischen der Ser/Thr-Kinase und dem α 14-Giardin nachgewiesen wurde und dies Rückschlüsse auf die ungefähre Funktion des α 14-Giardins zulässt, wären zur Aufklärung der physiologischen Funktion des α 14 Transfektionsexperimente hilfreich. In diesen könnten die Effekte einer Erniedrigung der α 14-Genexpression mittels „antisense“- oder „RNAi“-Techniken untersucht werden. Auch eine Überexpression des α 14-Giardins durch Einbringen von Plasmidkonstrukten in den Organismus könnte zur Funktionsbestimmung beitragen. Ob die Interaktion mit der Ser/Thr-Kinase einen Einfluss auf die α 14-Funktion ausübt, ließe sich hingegen mit der Ausschaltung bzw. Erhöhung der Kinase-Genexpression klären. Da die Phosphorylierung des α 14-Giardins vermutlich durch die Bindung des Proteins an die Ankyrin-Domäne vermittelt wird, könnte eine Deletion dieser Domäne eine Veränderung der posttranslationalen Modifikation veranlassen. Des Weiteren würden gerichtete Aminosäureaustausche einen tieferen Einblick zulassen, welche Aminosäurereste die Wechselwirkung mit der Ankyrin-Domäne der Kinase vermitteln. So könnte mittels des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems festgestellt werden, ob bei der Veränderung der *Giardia*-spezifischen Motive auf der konkaven Molekülseite eine Bindung an die Ankyrindomäne noch möglich ist.

Da das α 14-Giardin mit Heparin assoziieren kann, könnte es eine extrazelluläre Funktion besitzen und vielleicht an der Vermittlung des Parasit-Wirtskontakt beteiligt sein. Die dafür notwendige Sekretion auf die Membranoberfläche der Trophozoiten von *G. lamblia* konnte

allerdings nicht nachgewiesen werden. Sie könnte jedoch wie beim $\alpha 1$ -Giardin in anderen Lebensstadien auftreten. Ob das $\alpha 14$ innerhalb des Lebenszyklus sekretiert wird, kann durch immunologische Untersuchungen während aller Lebensstadien festgestellt werden.

Sowohl das Vorkommen des $\alpha 19$ -Giardins in der Membranfraktion des *G. lamblia*-Rohextraktes als auch die durchgeführte Triton X-100-Extraktion legen die Vermutung einer möglichen Acylierung des Proteins nahe. Weiterführende Experimenten müssen nun die Existenz der vorhergesagten Myristoylierung des Proteins klären, da sie im positiven Fall sicherlich von entscheidender Bedeutung für die Funktion des nativen $\alpha 19$ sind. Dazu eignen sich z.B. „*in-vivo*“-Myristoylierungs-Studien nach Zugabe der radioaktiv-markierten Fettsäure ins Nährmedium. Durch eine folgende Immunpräzipitation könnte dann das modifizierte $\alpha 19$ -Giardin detektiert werden. Auch andere Nachweismethoden, wie z.B. ein von LODGE *et al.* (1997) beschriebenes Co-Expressionssystem in *E. coli* zur Myristoylierungsimitation, könnte für den Nachweis der Modifikation herangezogen werden. Eine effektive Methode zur Untersuchung der Funktion und Notwendigkeit des $\alpha 19$ -Giardins in *G. lamblia* und zur Überprüfung des Einflusses der möglichen Lipidmodifikation auf die Lokalisierung des Proteins wäre auch die Herstellung „knock-out“-Zellenlinien oder $\alpha 19$ -Mutanten, welche kein Myristoylierungs- bzw. Palmitoylierungsmotiv besitzen. Dadurch könnte möglicherweise die Funktion und die Lokalisation des $\alpha 19$ in den ventralen Flagellen geklärt werden. Für die Identifizierung der potentiellen Bindepartner von $\alpha 19$ könnte eventuell, wie beim $\alpha 14$ -Giardin, eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem $\alpha 19$ -Giardin hilfreich sein. Zusätzlich könnten „Northern-Blot“-Analysen Aussagen über die Expression des $\alpha 19$ -Giardins im Lebenszyklus des Parasiten machen, sodass weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von $\alpha 19$ -Giardin im Bezug auf die einzelnen Lebensstadien von *G. lamblia* gewonnen werden könnten.

5. Zusammenfassung

Der humanpathogene Darmparasit *Giardia lamblia* ist Erreger der *Giardiasis* und verfügt über ein komplexes Cytoskelett, in dem der Proteinfamilie der α -Giardine eine herausragende Bedeutung zukommt (PEATTIE *et al.*, 1989). Von den 21 in *G. lamblia* vorkommenden α -Giardininen, die homolog zu den Annexinen höherer Eukaryonten sind, nehmen zwei aufgrund von einzigartigen Sequenzmotiven eine phylogenetische Sonderrolle ein, das α 14- und das α 19-Giardin (SZKODOWSKA *et al.*, 2002, WEILAND *et al.*, 2005).

Welche Rolle diese beiden α -Giardine tatsächlich im Lebenszyklus von *G. lamblia* einnehmen, ist unbekannt. Um hierüber mehr zu erfahren, sollten im Rahmen in der vorliegenden Arbeit ihre subzelluläre Lokalisation genauer untersucht und eventuelle intrazelluläre Bindepartner, insbesondere im Falle von α 14, identifiziert werden.

Durch immuncytologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde zunächst gezeigt, dass sich das α 14-Giardin nur in den membranumgebenen Bereichen der Flagelle befand, wo es als Perlenschnur-ähnliche Verdickungen in den proximalen Bereichen und den distalen Enden konzentriert vorlag. Zusätzlich konnte sowohl eine Assoziation mit den Mikrotubuli des Axonems als auch eine Lokalisation in der Nähe des zum Cytoplasma weisenden Teils der Plasmamembran nachgewiesen werden. Bei der Fahndung nach direkten Interaktionspartnern des α 14 in *G. lamblia*, welche mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an Sepharose-immobilisiertem α 14-Giardin und anschließender massenspektrometrischer Analyse erfolgte, wurden in Anwesenheit von Calcium mehrere Protein-Kandidaten detektiert. Dabei handelte es sich neben dem α - und β -Tubulin und dem α 7.3-Giardin auch um eine Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr-Kinase). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an permeabilisierten Trophozoiten und isolierten Flagellen bestätigten eine Ko-Lokalisation von Tubulin und dem α 14-Giardin in den erwähnten Bereichen der Flagellen, wohingegen eine direkte Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen durch Ko-Lokalisierungsversuche an isolierten Cytoskeletten allerdings nicht nachgewiesen werden konnte. Für weitere immuncytochemische und genetische Studien mit dem α 7.3-Giardin bzw. der Ser/Thr-Kinase und dem α 14 wurden zunächst Plasmidkonstrukte aus den Genfragmenten des α 7.3, der Kinasedomäne und Ankyrin-Domäne der Ser/Thr-Kinase hergestellt, wobei die letztendlich exprimierten rekombinanten Proteine der Antikörperherstellung dienten. Sowohl „Far Western“-Analysen und immuncytologische Untersuchungen als auch das eingesetzte „Yeast-Two-Hybrid“-System belegten eine Wechselwirkung zwischen der Ser/Thr-Kinase und dem α 14, von der ausschließlich die Ankyrin-Domäne mit dem Protein interagieren konnte. Unter der Annahme einer möglichen Phosphorylierung des α 14 durch die identifizierte Kinase wurden verschiedene Nachweismethoden durchgeführt, welche die Phosphorylierung des α 14-Giardins klar

bestätigten. Zusätzlich konnten sowohl die Fähigkeit der Oligomerisierung als auch die Bindung an Glykosaminoglykane für das α 14-Giardin nachgewiesen werden. Somit könnte das α 14-Giardin eine MAP(Mikrotubuli assoziiertes Protein)-Funktion übernehmen, bei der die Mikrotubuli- α 14-Assoziation über ein noch unbekanntes Linkerprotein oder mittels Selbstorganisation („self-assembly“) stattfindet und über eine Ser/Thr-Kinase vermittelte Phosphorylierung reguliert wird. Dabei könnte dieser Prozess eine wichtige Funktion für die Dynamik oder die Mobilität der Flagellen innehaben.

Da das α 19-Giardin, welches eine einzigartige N-terminale Extension mit einer Konsensussequenz für eine Myristoylierung besitzt, in der Literatur bisher nicht beschrieben war, bestand das Hauptziel der vorliegenden Arbeit in der subzellulären Lokalisation und ersten biochemischen Charakterisierung dieses Proteins in *G. lamblia*.

Nach Bestätigung der Expression des α 19-Giardins mittels RT-PCR wurde für die Antikörperherstellung ein Plasmidkonstrukt (pJC45- α 19 $_{\Delta 1-15}$) kloniert, welches letztendlich für die heterologe Expression des rekombinanten Proteins verwendet wurde. Mit Hilfe des erhaltenen polyklonalen Antikörpers konnte das α 19-Giardin durch Immunfluoreszenzversuche in den ventralen Flagellen der Trophozoiten von *G. lamblia* nachgewiesen werden, wo es mit den Mikrotubuli ko-lokalisierte. Sowohl weitere immuncytologische Untersuchungen an isolierten Flagellen als auch „Western-Blot“-Analysen bestätigten diese Beobachtung. Eine Sekretion an die Flagellenoberfläche sowie eine direkte Assoziation zu dem Flagellenaxonem konnte nicht festgestellt werden. Im weiteren konnte die für Annexine typische Calcium-abhängige Bindung von α 19 an anionische Phospholipide nachgewiesen werden. Das Vorkommen des α 19-Giardins in der Membranfraktion des *G. lamblia*-Rohextraktes sowie die Solubilisierung des Proteins durch Zugabe eines Detergenz gaben die ersten Hinweise auf eine Fettsäuremodifikation des N-Terminus des Proteins. Eine weitere posttranslationale Modifizierung des α 19-Giardins stellte die nachgewiesene Phosphorylierung des Proteins dar. Aufgrund der Lokalisation in den ventralen Flagellen und der potentiellen Acylierung des α 19-Giardins könnte das Protein an membrandynamischen Prozessen innerhalb der ventralen Flagellen beteiligt sein. Dabei könnte es eine Rolle in der Anheftung an das Darmepithel des Wirts und der Nahrungsaufnahme spielen, da diese Aufgaben dem ventralen Flagellenpaar zugeschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abel, E. S., Davids, B. J., Robles, L. D., Loflin, C. E., Gillin, F. D. & Chakrabarti, R. (2001)** Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*, *J. Biol. Chem.* 276, 10320–10329.
- Adam, R. D. (1991)** The biology of *Giardia spp.* *Microbiol. Rev.* 55, 706-732.
- Adam, R. D. (2000)** The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* 30, 475-84.
- Adam, R. D. (2001)** Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447-475.
- Ahn N. G., Teller D. C., Bienkowski M. J., McMullen B. A., Lipkin E. W. & de Haën C. (1988)** Sedimentation equilibrium analysis of five lipocortin-related phospholipase A2 inhibitors from human placenta. Evidence against a mechanistically relevant association between enzyme and inhibitor. *J. Biol. Chem.* 263(35), 18657-63.
- Aley, S. B. & Gillin, F. D. (1995)** Specialized surface adaptations of *Giardia lamblia*. *Infect. Agents. Dis.* 4 (3), 161-166.
- Allore, R. J. & Barber, B. H. (1984)** A recommendation for visualizing disulfide bonding by one-dimensional sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 137, 523–527.
- Alonso, R. A. & Peattie, D.A. (1992)** Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of the alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50(1), 95-104.
- Alvarez-Martinez, M. T., Mani, J. C., Porte, F., Faivre-Sarrailh, C., Liautard, J. P. & Sri Widada, J. (1996)** Characterisation of the interaction between annexin I and profilin. *Eur. J. Biochem.* 238, 777–784.
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T. & Willems, G. M. (1990)** Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 265(9), 4923-8.
- Bauer, B., Engelbrecht, S., Bakker-Grunwald, T. & Scholze, H. (1999)** Functional identification of α 1-giardin as an annexin of *Giardia lamblia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 147-153.
- Bijlmakers, M. J. & Marsh, M. (2003)** The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* 13, 32-42.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G. & Pluckthun, A. (2004)** High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat proteinlibraries. *Nat. Biotechnol.* 22(5), 575-582.
- Birnboim, H. C. & Doly, R. W. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinand plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999)** Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294(5), 1351-1362.
- Blom N., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S. & Brunak S. (2004)** Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4(6),1633-49.

- Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S. & Veuthey, A.-L.** N-terminal Myristoylation Predictions by Ensembles of Neural Networks. *Proteomics*, In Press.
- Bork, P. (1993)** Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17(4), 363-374.
- Boustead, C. M., Brown, R. & Walker, J. H. (1993)** Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver. *Biochem. J.* 291, 601–608.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buchel, L. A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J. & Gobert, J. G. (1987)** In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J. Parasitol.* 73(3), 487-93.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987)** XL1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Campanati L., Troester H., Monteiro-Leal L. H., Spring H., Trendelenburg M. F. & de Souza W. (2003)** Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Histochem. Cell. Biol.* 119(4), 323-31.
- Capila, I., VanderNoot, V. A., Mealy, T. R., Seaton, B. A. & Linhardt, R. J. (1999)** Interaction of heparin with annexin V. *FEBS Lett* 446, 327–330.
- Capila, I., Hernaiz, M. J., Mo, Y. D., Mealy, T. R., Campos, B., Dedman, J. R., Linhardt, R. J. & Seaton, B. A. (2001)** Annexin V–heparin oligosaccharide complex suggests heparin sulfate-mediated assembly on cell surface. *Structure* 9, 57–64.
- Cardin, A. D. & Weintraub, H. J. R. (1989)** Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21–32.
- Carlemalm, E., Garavito, R. M. & Villinger, W. (1982)** Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J. Bacteriol.* 159, 138-144.
- Casey P. J. & Seabra M. C. (1996)** Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 271(10), 5289-92.
- Cassimeris, L. (1999)** Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1), 134-141.
- Chamberlin, M., McGrath, J. & Waskell, L. (1970)** New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature* 228 (268), 227-231.
- Chap, H., Comfurius, P., Bevers, E. M., Fauvel, J., Vicendo, P., Douste-Blazy, L. & Zwaal, R. F. (1988)** Potential anticoagulant activity of lipocortins and other calcium/phospholipid binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150(3), 972-8.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J. & Marks, R. M. (1997)** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Med.* 3, 866–871.
- Chien, C. T. , Bartel, P. L. , Sternglanz, R. & Fields, S. (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(21), 9578-82.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chomczynski, P. (1993)** A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-537.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989)**. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 2172-2175.
- Clark, J. T. & Holberton, D. V. (1988)** Triton-labile antigens in flagella isolated from *Giardia lamblia*. *Parasitol. Res.* 74, 415-423.
- Clos, J. & Brandau, S. (1994)** pJC20 and pJC40-two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr.Purif.* 5, 133-137.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deléage, G. (2000)** NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* 25(3), 147-150.
- Coméra, C., Rothhut, B. & Russo-Marie, F. (1990)** Identification and characterization of phospholipase A2 inhibitory proteins in human mononuclear cells. *Eur. J. Biochem.* 188(1), 139-46.
- Concha, N. O., Head, J. F., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. & Seaton, B. A. (1993)** Rat annexin V crystal structure: Ca(2+)-induced conformational changes. *Science* 261, 1321-1324.
- Creutz, C. E. (1992)** The annexins and exocytosis. *Science* 258, 924-930.
- Crossley, R. & Holberton, D. (1983)** Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* 59, 81-103.
- Crossley R. & Holberton D. (1985)** Assembly of 2.5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeletal microtubules in *Giardia*. *J. Cell. Sci.* 78, 205-31.
- Crossley, R., Marshall, J., Clark, J. T. & Holberton, D. V. (1986)** Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to alpha-tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *J. Cell Sci.* 80, 233-52.
- Dacks, J. B. & Doolittle, W. F. (2002)** Novel syntaxin gene sequences from *Giardia*, *Trypanosoma* and *algae*: implications for the ancient evolution of the eukaryotic endomembrane system. *J. Cell Sci.* 115, 1635-1542.
- Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979)** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6(1), 23-28.
- Demange, P., Voges, D., Benz, J., Liemann, S., Göttig, P., Berendes, R., Burger, A. & Huber R. (1994)** Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation. *Trends Biochem. Sci.* 19, 272-276.
- Deora, A. B., Kreitzer, G., Jacovina, A. T. & Hajjar, K. A. (2004)** An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 279(42), 43411-8.
- Dhamodharan, R. & Wadsworth, P. (1995)** Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* 108(4), 1679-1689.

- Döring, V., Veretout, F., Albrecht, R., Mühlbauer, B., Schlatterer, C., Schleicher, M. & Noegel A. A. (1995)** The *in vivo* role of Annexin VII (synexin): characterization of an annexin VII-deficient *Dictyostelium* mutant indicates an involvement in Ca²⁺-regulated processes. *J. Cell Sci.* 108, 2065-2076.
- Douglas, M., Finkelstein, D. & Batow, R. A. (1979)** Analysis of mitochondrial protein synthesis in yeast: Genetic and biological aspects. *Meth. Enzymol.* 56, 58-66.
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H. & Kirschner & M. W. (1992)** Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 3(10), 1141-1154.
- Drewes G., Ebnet A. & Mandelkow E. (1998)** MAPs, MARKs and microtubule dynamics *Trends Biochem. Sci.* 23, 307-311
- Drust, D. S. & Creutz, C. E. (1988)** Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature.* 331(6151), 88-91.
- Eckmann, L. & Gillin, F. D. (2001)** Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280(1), G1-6.
- Edwards M. R., Schofield P. J., O'Sullivan W. J. & Costello, M. (1992)** Arginine metabolism during culture of *Giardia intestinalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53(1-2), 97-103.
- Ellis, J. G. T., Davila, M. & Chakrabarti, R. (2003)** Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Stage-specific activation and intracellular localization, *J. Biol. Chem.* 278, 1936–1945.
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C. & McCaffery, J. M. (2003)** The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 33, 3-28.
- Elmendorf, H. G., Rohrer, S. C., Khoury, R. S., Bouttenot, R. E. & Nash, T. E. (2005)** Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. *Int. J. Parasitol.* 35(9), 1001-11.
- Emmerlich, V., Santarius, U., Bakker-Grunwald, T. & Scholze, H.(1999)** Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 131-134.
- Erlandsen S. L., Macechko P. T., van Keulen H. & Jarroll E. L. (1996)** Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43(5), 416-29.
- Fan J. B., Korman S. H., Cantor C. R. & Smith C. L. (1991)** *Giardia lamblia*: haploid genome size determined by pulse field gel electrophoresis is less than 12 Mb. *Nucleic. Acids Res.* 19, 1905–1908.
- Farazi, T. A., Waksman, G. & Gordon J. I. (2001)** The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276, 39501-39504.
- Favier-Perron, B., Lewit-Bentley, A. & Russo-Marie, F. (1996)** The high resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochem.* 35, 1740-1744.
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F & Whitehouse, C. M. (1989)** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926), 64-71.

- Fernandez, M. P. & Morgan, R. O. (2003)** Structure, function and evolution of the annexin supergene family. In *Annexins: Biological Importance and Annexin-Related Pathologies* (Bandorowicz-Pikula, J., ed), 21-37, Landes Bioscience, Georgetown
- Ferretti, L. & Sgaramella, V. (1981).** Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 9, 85-93.
- Fiedler, K. & Simons, K. (1995)** Annexin homologues in *Giardia lamblia*. *TIBS* 20, 177-178.
- Fields S. & Song, O. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Filipenko N. R. & Waisman D. M. (2001)** The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J. Biol. Chem.* 276(7), 5310-5.
- Flanagan, P. A. (1992)** *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* 109, 1–22.
- Gerke, V. & Moss, S. E. (1997)** Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1357, 129-154.
- Gerke, V. & Moss, S. E. (2002)** Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 82, 331-371.
- Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. (2005)** Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(6), 449-461.
- Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R. & Samuelson, J. (2001)** How *Giardia* swim and divide. *Infect. Immun.* 69(12), 7866-7872.
- Gillin, D. G., Reiner, D. S. & McCaffery, J. M. (1996)** Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 679-705.
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I. & Law, S. F. (1999)** The yeast two-hybrid system: criteria for detecting physiologically significant protein-protein interactions. *Current Issues Molec. Biol.* 1(1), 31-46.
- Gottig, N., Elias, E. V., Quiroga, R., Nores, M. J., Solari, A. J., Touz, M. C. & Lujan, H. D. (2006)** Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 281, 18156-18166.
- Gribskov, M. & Burgess, R. R. (1983)** Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene* 26, 109-118.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997)** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993)** The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Shirakura, T., Adachi, J., Got, N., Okamoto, K. & Hasegawa, M. (1994)** Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Evol.* 11(1), 65-71.

- Hauptmann, M. (1999)** Heterologe Expression von α -Giardin aus *Giardia lamblia* in *Escherichia coli*. Biochemische Charakterisierung des rekombinanten Proteins. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Hayes M. J., Rescher U., Gerke V. & Moss S. E. (2004)** Annexin-actin interactions. *Traffic*. 5(8), 571-6.
- Hellberg, A., Nowak, N., Leippe, M., Tannich, E. & Bruchhaus, I. (2002)** Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Prot. Express. Purif.* 24, 131-137.
- Hileman, R. E., Fromm, J. R., Weiler, J. M. & Linhardt, R. J. (1998)** Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays* 20, 156–167.
- Hirokawa, N. (1994)** Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6(1), 74-81.
- Holberton, D. V. (1973)** Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell Sci.* 13(1), 11-41.
- Holberton, D. V. (1974)** Attachment of *Giardia*-a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J. Exp. Biol.* 60(1), 207-21.
- Holberton, D. V. (1981)** Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. *J. Cell Sci.* 47, 167-85.
- Holberton, D. V. & Ward, A. P. (1981)** Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J. Cell Sci.* 47, 139-66.
- Hou H., Subramanian K., LaGrassa T. J., Markgraf D., Dietrich L. E., Urban J., Decker, N. & Ungermann C. (2005)** The DHC protein Pfa3 affects vacuole-associated palmitoylation of the fusion factor Vac8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(48), 17366-71.
- Houts, G. E., Miyagi M., Ellis C., Beard, D. & J. W. Beard. (1979)** Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J. Virol.* 29, 517-522.
- Huber, R., Römisch, J. & Paques, E. P. (1990)** The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* 9, 3867-3874.
- Hyams, J. S. & Borisy, G. G. (1978)** Isolated flagellar apparatus of *Chlamydomonas*: characterization of forward swimming and alteration of waveform and reversal of motion by calcium ions in vitro. *J. Cell Sci.* 33, 235-253.
- Ianelli, C. J., DeLellis, R. & Thorley-Lawson, D. A. (1998)** CD48 binds to heparan sulfate on the surface of epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273(36), 23367-75.
- Ishitsuka, R., Kojima, K., Utsumi, H., Ogawa, H. & Matsumoto, I (1998)** Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI. *J. Biol. Chem.* 273, 9935-9941.

- James, P., Haliday, J. & Craig, E. A. (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Kardami, E., Pearson, T.W., Beecroft, R. P. & Fandrigh, R. R. (1992)** Identification of basic fibroblast growth factor-like proteins in African trypanosomes and *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasit.* 51, 171–181.
- Kassam, G., Manro, A., Braat, C. E., Louie, P., Fitzpatrick, S. L. & Waisman, D. M. (1997)** Characterisation of the heparin binding properties of annexin II tetramer. *J. Biol. Chem.* 272, 15093-15100.
- Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. (1986)** Separation of DNA binding from the transcription activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231(4739), 699-704.
- Keister, D. B. (1983)** Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 487-488.
- Kellersmann, A. (2007)** Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von α 19-Giardin aus Trophozoiten von *Giardia lamblia*. Masterarbeit, Universität Osnabrück.
- Kellogg, D., Moritz, M. & Alberts, B. (1994)** The centrosome and cellular organisation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 639-674.
- Khanna, N. C., Helwig, E. D., Ikebuchi, N. W., Fitzpatrick, S., Bajwa, R. & Waisman, D. M. (1990)** Purification and characterization of annexin proteins from bovine lung. *Biochemistry.* 29(20), 4852-62.
- Kheifets, V., Bright, R., Inagaki, K., Schechtman, D. & Mochly-Rosen, D. (2006)** Protein Kinase C δ (δ PKC)-Annexin V Interaction A Required Step in δ PKC Translocation and Function. *J. Biol. Chem.* 281(32), 23218-23226.
- Kielmann, D. (2002)** Klonierung und funktionelle Charakterisierung des C-terminal verkürzten Annexin XXI aus *Giardia lamblia*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Kilmartin, J. V. & Adams, A. E. (1984)** Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* 98(3), 922-933.
- Kim, K. T., Mok, M. T. & Edwards, M. R. (2005)** Protein kinase B from *Giardia intestinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334(2), 333-341.
- Kulda, J. & Nohýnková, E. (1995)** *Giardia* in humans and animals. In: *Parasitic Protozoa* (Kreier, J.P., ed) 2nd Ed., Vol. 10, pp. 225-422, *Academic Press*, San Diego.
- Langen, R., Isas, J. M., Hubbell, W. L. & Haigler, H. T. (1998)** A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95(24), 14060-5.
- Lecat, S., Verkade, P., Thiele, C., Fiedler, K., Simons, K. & Lafont, F. (2000)** Different properties of two isoforms of annexin XIII in MDCK cells. *J. Cell Sci.* 113, 2607–2618.
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N. J., Doekers, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R. R., Ponting, C. P. & Bork, P. (2002)** Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 30(1), 242-244.
- Lindahl, U. & Höök, M. (1978)** Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 385-417.
- Linhardt, R. J. & Toida, T. (1997)** Heparin analogs—development and applications. In *Carbohydrates as Drugs* (eds. Z. B. Witczak and K. A. Nieforth) Marcel Dekker, New York, Chapter 7, 277–341.

- Linke, C. (2000)** Biochemische Charakterisierung von Annexin-homologen Proteinen aus *Giardia lamblia* nach heterologer Expression in *E. coli*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Liu, W., Xu, S., Woda, C., Kim, P., Weinbaum, S. & Satlin, L. M. (2003)** Effect of flow and stretch on the $[Ca^{2+}]_i$ response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 285, 998-1012.
- Lloyd, D. & Wallis, P. (2001)** A *Giardia* feast. *Trends Parasitol.* 17, 115-117.
- Lodge, J. K., Jackson-Machelski, E., Devadas, B., Zupec, M. E., Getman, D. P. Kishore, N., Freeman, S. K., McWherter, C. A., Sikorski, J. A. & Gordon, J. I. (1997)** N-myristoylation of Arf proteins in *Candida albicans*: an in vivo assay for evaluating antifungal inhibitors of myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *Microbiology* 143, 357-366
- Ludwig, A.-K. (2005)** Klonierung und heterologe Expression einer Serin-Threonin-Kinase aus *Giardia lamblia*. Bachelorarbeit, Universität Osnabrück.
- Luecke, H., Chang, B. T., Mailliard, W. S., Schlaepfer, D. D. & Haigler, H. T. (1995)** Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature* 378, 512-515.
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. (1995)** Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J. Biol. Chem.* 270(49), 29307-13.
- Luján, H. D., Mowatt, M. R. & Nash, T. E. (1997)** Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(3), 294-304.
- Lujan, H. D. & Touz, M. C. (2003)** Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol.* 5(7), 427-34.
- Margalit, H., Fischer, N. & Ben-Sasson, S. A. (1993)** Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. *J. Biol. Chem.* 268, 19228-19231.
- Marte, B. M., Downward, J. (1997)** PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 22, 355-358.
- Marti, M. & Hehl, A. B. (2003)** Encystation-specific vesicles in *Giardia*: a primordial Golgi or just another secretory compartment? *Trends Parasitol.* 19(10), 440-6.
- Marti, M., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Köhler, P., & Hehl, A. B. (2003)** The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. *Mol. Biol. Cell* 14, 1433-1447.
- Matsudaira, P. (1987)** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes *J. Biol. Chem.* 262(21), 10035-10038.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B. & Eisenhaber, F. (2002)** N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 317, 541-557.
- Mayran, N., Traverso, V., Maroux, S. & Massey-Harroche, D. (1996)** Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia. *Am. J. Physiol.* 270(5 Pt 1), 863-71.

- McArthur, A. G., Morrison, H. G., Nicxon, J. E., Passamaneck, N. Q., Kim, U., Hinkel, G., Crocker, M. K., Holder, M. E., Farr, R., Reich, C. I., Olsen, G. E., Aley, Adam, R. D., Gillin, F. D. & Sogin, M. L. (2000)** The *Giardia* genome project database. *FEMS Microbiol. Lett.* 189(2), 271-273.
- McLaughlin, S. & Aderem, A. (1995)** The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20(7), 272-6.
- Meers, P. (1990)** Location of tryptophans in membrane-bound annexins. *Biochemistry* 29(13), 3325-30.
- Mehlhorn, H. & Piekarski, G. (2002)** Grundriss der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere. 6. Auflage, Spektrum Verlag/Gustav Fischer.
- Morgan, R. O. & Fernández, M. P. (1995)** Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Evol.* 12(6), 967-979.
- Morgan, R. O. & Fernández, M. P. (1997)** Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 44, 178-188.
- Morgan, R. O., Martin-Almedina, S., Garcia, M., Jhoncon-Kooyip, J. & Fernandez, M.-P. (2006)** Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1238-1249.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J. E., Palm, D., Passamaneck, N. E., Prabhu, A., Reich, C. I., Reiner, D. S., Samuelson, J., Svard, S. G. & Sogin, M. L. (2007)** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317(5846), 1921-6.
- Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B. & McLaughlin, S. (1997)** Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 5, 985-989.
- Nash, T. E. (2002)** Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* 45(3), 585-590.
- Neuhoff, V., Unhold, N., Taube, D. & Erhard, W. (1988)** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focussing gels with clear background and nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nixon, J. E. J., Wang, A., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Loftus, B. J. & Samuelson, J. (2002)** A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *PNAS* 99 (6), 3701-3705.
- Nohria, A., Alonso, R. A. & Peattie, D. A. (1992)** Identification and characterization of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 27-37.
- Nohynkova E., Draber P., Reischig J. & Kulda, J. (2000)** Localization of gamma-tubulin in interphase and mitotic cells of a unicellular eukaryote, *Giardia intestinalis*. *Eur. J. Cell Biol.* 79(6), 438-45.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Sugita, M., Okuyama, A., Murofushi, H., Kitazawa, H., Chari, S., Bulinski, J. C. & Kishimoto, T. (1997)** MAP4 is the in vivo substrate for CDC2 kinase in HeLa cells: identification of an M-phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4. *Biochemistry* 36 (50), 15873-15883.

- Palm, J. E., Weiland, M. E., Griffiths, W. J., Ljungstrom, I. & Svärd, S. G. (2003)** Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J. Infect. Dis.* 187(12), 1849-1859.
- Pappin, D. J., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. (1993)** Rapid identification of proteins by peptidemass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3(6), 327-332.
- Pathuri, P., Nguyen, E. T., Svärd, S. G. & Luecke, H. (2007)** Apo and calcium-bound crystal structures of Alpha-11 giardin, an unusual annexin from *Giardia lamblia*. *J. Mol. Biol.* 368(2), 493-508.
- Peattie, D. A., Alonso, R. A., Hein, A. & Caulfield, J. P. (1989)** Ultrastructural localization of gardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* 109, 2323-2335.
- Peattie, D. A. (1990)** The gardins of *Giardia lamblia*. *Parasitol. Today* 6, 52-56.
- Peitzsch, R. M. & McLaughlin, S. (1993)** Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32, 10436-10443.
- Pepinsky, R. B., Sinclair, L. K., Browning, J. L., Mattaliano, R. J., Smart, J. E., Chow, E. P., Falbel, T., Ribolini, A., Garwin, J. L. & Wallner, B. P. (1986)** Purification and partial sequence analysis of a 37-kDa protein that inhibits phospholipase A2 activity from rat peritoneal exudates. *J. Biol. Chem.* 261(9), 4239-46.
- Plant, P. J., Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., Simons, K. & Rotin, D. (2000)** Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb. *J. Cell Biol.* 149, 1473-1483
- Plotnikov A. N., Hubbard S. R., Schlessinger J. & Mohammadi, M. (2000)** Crystal Structures of Two FGF-FGFR Complexes Reveal the Determinants of Ligand-Receptor Specificity. *Cell* 101, 413-424.
- Pollastri, G., Martin, A. J. M., Mooney, C. & Vullo, A. (2007)** Accurate prediction of protein secondary structure and solvent accessibility by consensus combiners of sequence and structure information. *BMC Bioinformatics* 8, 201.
- Prieß, D. (2005)** Identifizierung von Bindeproteinen von Annexin E1 aus *Giardia lamblia*. Masterarbeit, Universität Osnabrück.
- Pryer, N. K., Walker, R. A., Skeen, V. P., Bourns, B. D., Soboeiro, M. F. & Salmon, E. D. (1992)** Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J. Cell Sci.* 103 (4) 965-976.
- Raynal, P. & Pollard, H. B. (1994)** Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 63-93.
- Regoes A., Zourmpanou D., León-Avila G., van der Giezen M., Tovar J. & Hehl A. B. (2005)** Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J. Biol. Chem.* 280(34), 30557-63.
- Reiner, D. S., Hetsko, M. L., Meszaros, J. G., Sun, C. H., Morrison, H. G., Brunton, L. L. & Gillin, F. D. (2003)** Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 278(4), 2533-40.
- Rescher U. & Gerke V. (2004)** Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J. Cell Sci.* 117, 2631-9.

- Resh, M. D. (1999)** Fatty acylation of proteins; new insights into membrane targeting of myristylated and palmitoylated proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1451, 1-16.
- Ridgley, E., Webster, P., Patton, C. & Ruben, L. (2000)** Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109(2), 195-201.
- Roberts-Thomson, I. C. (1984)** Giardiasis. In: *Tropical and geographical medicine* (Warren, K.S. & Mahmoud, A.A.F., Eds.), 319-325. McGraw-Hill, New York.
- Rosengarth, A. & Luecke, H. (2003)** A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J. Mol. Biol.* 326(5), 1317-25.
- Roskoski, R. (2003)** Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1-7.
- Roth, J., Bendayan, M., Carlemalm, E., Villinger, W. & Garavito, R. M. (1981)** Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatis tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 663-671.
- Russell, A. G., Shutt, T. E., Watkins, R. F. & Gray, M. W. (2005)** An ancient spliceosomal intron in the ribosomal protein L7a gene (*Rpl7a*) of *Giardia lamblia*. *BMC Evolutionary Biology* 5, 45.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. (1987)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Fritsch, E. F. & Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.* 74, 5463-5467.
- Sawitzky, D. (1996)** Protein-glycosaminoglycan interactions: infectiological aspects. *Med. Microbiol. Immunol.* 184, 155-161.
- Schlüter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. & Clos, J. (2000)** Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1491 (1-3), 65-74
- Seaton, B. A. (1996)** Annexins: Molecular Structure to Cellular Funktion. Springer-Verlag New York Inc., New York. 15-29.
- Sedgwick, S. G. & Smerdon, S. J. (1999)** The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* 24(8), 311-6.
- Sobel, M., Soler, D. F., Kermode, J. C. & Harris, R. B. (1992)** Localisation and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 267, 8857-8862.
- Sogin, M. L., Gunderson, J. H., Elwood, H. J., Alonso, R. A. & Peattie, D. A. (1989)** Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243, 75-77.
- Sogin, M. L. (1991)** Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development* 1, 457-463.

- Sokolov, Y., Mailliard, W. S., Tranngo, N., Isas, M., Luecke, H., Haigler, H. T. & Hall, J. E. (2000)** Annexins V and XII alter the properties of planar lipid bilayers seen by conductance probes. *J. Gen. Physiol.* 115(5), 571-82.
- Solito, E., Christian, H. C., Festa, M., Mulla, A., Tierney, T., Flower, R. J. & Buckingham, J. C. (2006)** Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *FASEB J.* 20(9), 1498-500.
- Stefanic, S., Palm, D., Svärd, S. G. & Hehl, A. B. (2006)** Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 281, 7595-7604.
- Studier, F. W. & Moffat, B. A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expressions of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990)** The use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
- Studier, F. W. (1991)** Use of bacteriophage T7 lysozym to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219 (1), 37-44.
- Swairjo, M. A., Concha, N. O., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. & Seaton, B. A. (1995)** Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* 2(11), 968-974.
- Szkodowska, A., Müller, M. C. M., Linke, C. & Scholze, H. (2002)** Annexin XXI (ANX21) of *Giardia lamblia* has sequence motifs uniquely shared by giardial annexins and is specifically localized in the flagella. *J. Biol. Chem.* 277(28), 25703-25706.
- Szkodowska, A. (2004)** Interaktion von Annexin-ähnlichen Proteinen aus *Giardia lamblia* mit künstlichen und zellulären Partnern. Dissertation, Universität Osnabrück.
- Tait, J. F., Gibson, D. F. & Fujikawa, K. (1989)** Phospholipid binding properties of the lipocortin family. *J. Biol. Chem.* 264, 7944-7949.
- Tamm, S. (1994)** Ca²⁺ channels and signalling in cilia and flagella. *Trends Cell Biol.* 4(9), 305-310.
- Thelen M., Rosen A., Nairn A. C. & Aderem A. (1991)** Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 351(6324), 320-2.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson T. J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22), 4673-80.
- Tombes, R. M., Peloquin, J. G. & Borisy, G. G. (1991)** Specific association of an M-phase kinase with isolated mitotic spindles and identification of two of its substrates as MAP4 and MAP1B. *Cell Regul.* 2 (11), 861-874.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M. & Lucocq, J. M. (2003)** Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426(6963), 172-176.
- Towler, D. A., Adams, S. P., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L., & Gordon, J. I. (1987)** Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84, 2708-2712.

- Traverso, V., Morris, J. F., Flower, R. J. & Buckingham, J. (1998)** Lipocortin 1 (annexin 1) in patches associated with the membrane of a lung adenocarcinoma cell line and in the cell cytoplasm. *J. Cell Sci.* 111, 1405-1418.
- Tůmová, P., Hofštetrová, K., Nohýnková, E., Hovorka, O. & Král, J. (2007)** Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma* 116, 65–78.
- Turnay J., Lecona E., Fernández-Lizarbe S., Guzmán-Aránguez A., Fernández M. P., Olmo N. & Lizarbe M. A. (2005)** Structure-function relationship in annexin A13, the founder member of the vertebrate family of annexins. *Biochem. J.* 389(3), 899-911.
- Ungermann, C. & Wickner, W. (1998)** Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion. *EMBO J.* 17(12), 3269-3276.
- van Putten, J. P. & Paul, S. M. (1995)** Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. *EMBO J* 14, 2144–2154.
- Weber, K., Geisler, N., Plessmann, U., Bremerich, A., Lehtreck, K. F. & Melkonian, M. (1993)** SF-assemblin, the structural protein of the 2-nm filaments from striated microtubule associated fibers of algal flagellar roots, forms a segmented coiled coil. *J. Cell. Biol.* 121, 837-845.
- Weiland, M. E.-L., Palm, J. E., Griffiths, W. J., McCaffery, J. M. & Svärd, S.G. (2003)** Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int. J. Parasitol.* 33(12), 1341-1351.
- Weiland, M. E.-L., McArthur, A. G., Morrison, H. G., Sogin, M. L. & Svärd, S.G. (2005)** Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 35, 617-626.
- Welling, S. (2007)** Identifizierung und Charakterisierung Annexin E1-bindender Proteine in *Giardia lamblia*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Weng, X., Luecke, H., Song, I., S., Kang, D., S., Kim, S., H. & Huber, R. (1993)** Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* 2, 448- 458.
- Winter, A., Yusof, A. M., Gao, E., Yan, H.-L. & Hofmann, A. (2006)** Biochemical characterization of annexin B1 from *Cysticercus cellulosae*. *FEBS* 273, 3238–3247
- Wolschin F., Wienkoop, S. & Weckwerth, W. (2005)** Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* 5, 4389-4397.
- Worgall, T. S., Davis-Hayman, S. R., Magana, M. M., Oelkers, P. M., Zapata, F., Juliano, R. A., Osborne, T. F., Nash, T. E. & Deckelbaum, R. J. (2004)** Sterol and fatty acid regulatory pathways in a *Giardia lamblia*-derived promoter: evidence for SREBP as an ancient transcription factor. *J. Lipid Res.* 45(5), 981-988.
- Zanotti, G., Malpeli, G., Gliubich, F., Folli, C., Stoppini, M., Olivi, L., Savoia, A. & Berni, R. (1998)** Structure of the trigonal crystal form of bovine annexin IV. *Biochem. J.* 329(1), 101-6.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S. J. (2000)** Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290, 1761-1765.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
Amax	Anregungswellenlänge
Ampicillin	D- α -Aminobenzylpenicillin
Ank	Ankyrin-Domäne
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchinon
BD	Bindedomäne
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
DIC	Durchlichtaufnahme
DMSO	Dimethylsulfidoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dedesoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)-Butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether) N, N, N-Tetraacetat
Emax	Emissionswellenlänge
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
ESV	enzystierungsspezifische Vakuolen
GAG	Glykosaminoglykan
H ₂ O ^{bidest.}	doppelt destilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
Imidazol	1,3-Diazol
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kDA	Kilodalton
LiAc	Lithiumacetat
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
Merge	Überlagerung zweier Aufnahmen
MOAC	Metallhydroxid-Affinitätschromatographie
Mowse	Molecular Weight Search
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIC	„protease inhibitor cocktail“
PKA /PKB/PKC	Proteinkinase A / B / C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RE	Rohextrakt aus Trophozoiten von <i>G. lamblia</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natrium-(Sodium)-dodecylsulfat
Ser/Thr-Kinase	Serin/Threonin-Kinase
STK	Kinasedomäne
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton X-100	(<i>p-tert</i> -Octylphenoxy)-polyethoxyethanol
Tub	Tubulin bzw. Mikrotubuli-Färbung

üN	über Nacht
VSP	„variable surface proteins“
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galaktopyranosid
α 14	α 14-Giardin
α 19	α 19-Giardin

7.2 Aminosäuresequenzen der giardialen Annexine und des menschlichen Annexin A5

2nd repeat

	100	110	120	130	140	150
α 1-Giardin	VRAQHIRDALSGR-NDHMAFFDVTVILCTPEDWHETVAAYTRMFKKPLVEDFMKDVGRKEDWC					
α 2-Giardin	VRAQHIRDALSGK-NDHMAFFDVTVILCTPEDWHETVAAYTRMFKKPLVEDFMKDVGRKENWC					
α 19-Giardin	LRTELIRESLQ GKATD IEQLTDVVLTLSSESRACEIVQNYDLLYGGSVITDIRH D YNGDKLWQ					
α 14-Giardin	LLCELIRGATK GAGTDEK CLVDVLLTIETHEVREIRQLYYQLYNDSLGDVVRK D CGDKYMWA					
Annexin A5	YDAYELKHALK GAGTNEK VLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYGSLEDDVVG D TSGY- QR					

4th repeat

	250	260	270	280	290	300
α 1-Giardin	LAAYLINCACNDKG- DEKRMRRITG-MM VDKCLGAK HAYK IYGD MGTDI ERCF- D KR--MA					
α 2-Giardin	LAAYLVNCACNDKG- DEKRMRRITG-MM VDKCLAA KYAYK TYGSMKAD VER CF- D KR--MA					
α 19-Giardin	FMAHTALVAGISR D - D ARLTRAAIL-SYEEHPDVPVAVYRELYGV TLED DAIEKTGTGSY ES					
α 14-Giardin	AAAFSMNVAFAG SGSD SNRLNR ITA - M HFRECKG CKYYYK KVY GQAFD-ERC ATE L KGVY G					
Annexin A5	YLAETLYYAMK GAGTD DHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYS MIKGD TS G - YK					

	310
α 1-Giardin	ILRTL WR VK-
α 2-Giardin	ILCTL WR LRE
α 19-Giardin	TLLIL WK IDR
α 14-Giardin	AIKLL WE PVT
Annexin A5	ALLLLCGEDD

— : Endonexinfaltung-Motiv
 — : Giardin-Motiv

7.3 Potentielle Phosphorylierungsstellen des α 14-Giardins

MANKNYQMSTGVTAVVQKVVEACQDESKRLDLIEIARSYPNQLRNMQRTFQAITGTFLDAFLKKHLSKDFESLV
 LMLYKPRAQLLCELIRGATKGAGTDEKCLVDVLLTIETHEVREIRQLYYQLYNDSLGDVVRKDCGDK**Y**MWAKLIN
 AVATGDRI**PRD**T**H**ELEEDLVLVRKAIE**T**KGVKKDEVSTWIRIFATYTRADFRQLHKMYS**AKY**NGD**S**LRAGVEDEF
 QGLDEYAFKLAHDFLYDPCCAAAFSMNVAFAGSGSD**S**NRLNRITAMHFRECKGCKYYYK**KVY**GQAFDERCATE**L**K
 GUYGDAIKLLWEPVTVPLLS**MDDY**Q**Q**SEQHRPMTLE**L**

„NetPhos 2.0“ Phosphorylierungswahrscheinlichkeit > 90%: Ser: 3 Thr: 2 Tyr: 2

„NetPhosK 1.0“ Highest Score: 0.91 an Position T-178

7.6 Hergestellte Plasmidkonstrukte

pET16b- α 7.3

```

1           ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCAT
1           M G H H H H H H H H H H S S G H

61         ATCGAAGGTCGTCATATGATGGCTCGGGCAAAGGCTACCGAGATCAAGGCGCTCATCGAC
21         I E G R H M M A A K A T E I K A L I D

121        GCCAAGGACATGGACGGGCTTGCAGAGGAGCGTCGCCGACTTCGACGATAGGCAGCGCGCC
41        A K D M D G L A R S V A D F D D R Q R A

181        GAGATCTACGCCGATTTCAGGGCGGCCAACGGGAAGACGGCCTCCGAGTACCTCGACGCC
61        E I Y A A F R A A N G K T A S E Y L D A

241        TTGTTCAAGAACGGGGACTACAAGGACCTCATGATGATCGTCCTCGACGACGAGATCGAC
81        L F K N G D Y K D L M M I V L D D E I D

301        GTCCGCTGCAAGCTGATCAAGAAGGCCTTCAAGGGCGGGAACGACGAGAGGTGCCTCACG
101       V R C K L I K K A F K G G N D E R C L T

361        GACACGCTCTTGACGACGACCCCCGAGATCTACGCAAGGGTCAAGGGCAGGTACCACCAG
121       D T L L T T T P E I Y A R V K G R Y H Q

421        CTCTTCGGGGACGACTTCGAGTCCACGCTCAGGAAGGAGATCGGCTCCAAGACCGTCTGG
141       L F G D D F E S T L R K E I G S K T V W

481        GCCCGCATGGTGAACCTCTGGCTTGCCCTTCTGCAGGTCTGCCCGCAACAACGTCCAGGGC
161       A R M V N S W L A F C R S A R N N V Q G

541        GACGCAGAGGCCCTGAAGACCGCGCTGATCGGCGTCAAGCACCCGGACACGGACACGGTC
181       D A E A L K T A L I G V K H P D T D T V

601        ATCCGCTCTCGGCACGACCGTCCCCAGCGAGTGGAAGCAGATCTCCGAGGCGTTCGAG
201       I R L L G T T V P S E W K Q I S E A F E

661        AACATCGCCAAGAAGACGATCGAGCAGGCCCTCATCGAGGCCTACAAGGGCGACGACGAG
221       N I A K K T I E Q A L I E A Y K G D D E

721        CTCGCGCTCTGCTGCTGCAACGCGACGCTCCACTGCCCGCCCGAGGCGCCGCCTACCTC
241       L A L C C C N A T L H C P A R G A A Y L




781        CTGAGCCTGGCCTGCCAGAAGAAGGGCGACACCGACCGCTGCTGCCGCATCACCGGGATG
261       L S L A C Q K K G D T D R C C R I T G M

841        CTCTACGACCAGGCAGAGCAGTGCAAGGTCCTCTACGCCCACTACGGCAACTTAGCCAAG
281       L Y D Q A E Q C K V L Y A H Y G N L A K

901        GACATCCGAGCCACGATGTCCAAGAACCTCGCCGAGGCTGCTGCGTCTCTGGCACGTC
301       D I R A T M S K N L A E A C C V L W H V

961        ATGTAAGGATCCGGCTGCTAA
321       M * G S G C *

```

 Primerteilstück,
 Restriktionsschnittstellen (*NdeI/BamHI*)
 Vektorcodierter Bereich

pET16b-STK

```

1          ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCAT
1          M G H H H H H H H H H S S G H

61      ATCGAAGGTCGTCATATGACTTTGGCGGCAGGAGAGTACAGCATGCTCTTCCTGGCCATG
21      I E G R H M T L A A G E Y S M L F L A M

121     GGAAACGACTACCAGGAGGTCGCTATCAAGAGCTTTGATTGCACGCAGATGGACGATGCA
41      G N D Y Q E V A I K S F D C T Q M D D A

181     CAAGTCTCGGAAATTCACCGCCAGGCCCTACTCCTGAAGTCCGTTAACCATCCGCTGGTA
61      Q V S E I H R Q A L L L K S V N H P L V

241     CTCAAGGTATATGACGTCCAGATGAACATTACGCGCACGCGCCTGCACGTGATCATGGAG
81      L K V Y D V Q M N I T R T R L H V I M E

301     CCCTTCTTCAAGACGCTTCAGAACCTCATCGACGAGTGTGAGAAGGCAGATCGCTCGCTC
101     P F F K T L Q N L I D E C E K A D R S L

361     CTCAACAACATCGTCTGCCAGGTGGCCTACCAGGTCATCAAGGGGCTCCACTATCTCTCC
121     L N N I V C Q V A Y Q V I K G L H Y L S

421     ACCACCAACCATGTCGCGGTCAACGAGCAGGGACAGGAGTTCTCGCAGGACAAGATCTTC
141     T T N H V A V N E Q G Q E F S Q D K I F

481     CACTCGTTTTATCACACCGAACGACATTGTGTTCAACACCTCCGGAGTTGTGAAGCTTATG
161     H S F I T P N D I V F N T S G V V K L M

541     AACATCTTCCCCCTGGAGCATAGGATGCTCTATGAAAAGGGCGACGCCAGCTTCCCGGGG
181     N I F P L E H R M L Y E K G D A S F P G

601     CTCGCCTATGCGTCGCCTGAGTTTCTCAACAGGGAATACACCGAGTGCCCTGCCGATGTG
201     L A Y A S P E F L N R E Y T E C P A D V

661     TGGTCTGCGGGCGCGTGCATTTTCGCCATGGCTATGCGCAGGCCCCCGTTCAACTCTACC
221     W S A G A C I F A M A M R R P P F N S T

721     AACGTGGAGTCCCTAAGGGTGGAGGTGCAAGAAGGAAAGAAGGATGGCCTCGATATCAGC
241     N V E S L R V E V E E G K K D G L D I S




781     TTCAGCCGCGAGCTTGATGACATGCTCCAGCGCATGATGACGCCGGACCAGGGCTACAGG
261     F S R E L D D M L Q R M M T P D Q G Y R

841     CCCACTGCCGGCGATCTCCTCAACGACCCCTCAATCACCGAGGCGGCGTACGAGATCGAA
281     P T A G D L L N D P S I T E A A Y E I E

901     GCGGGCGGCCTGCAAACCCGTGGATGGCAATCGGCTTCTCCAGGCCGATCTCTCAGGCA
301     A G G L Q N P W M A I G F S R P I S Q A

961     GTGGCCCTGTGTCCAACGGATCCGGCTGCTAA
321     V A P V S N G S G C *

```

 Primerteilstück,
 Restriktionsschnittstellen (*NdeI/BamHI*)
 Vektorcodierter Bereich

Publikationen

- **Riekenberg, S., Flockenhaus, B., Vahrman, A., Müller, M. C., Leippe, M., Kieß, M. and Scholze, H. (2004)** The beta-N-acetylhexosaminidase of *Entamoeba histolytica* is composed of two homologous chains and has been localized to cytoplasmic granules. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138(2), 217-225.
- **Saric, M., Vahrman, A., Bakker-Grunwald, T., Bruchhaus, I. and Scholze, H. (2006)** The second cysteine protease inhibitor, EhICP2, has a different localization in trophozoites of *Entamoeba histolytica* than EhICP1 *Parasitol. Res.*, 100, 171-174.
- **Vahrman, A., Saric, M., Scholze, H., and Koebisch, I. (2007)** alpha14-Giardin (annexin E1) is associated with tubulin in trophozoites of *Giardia lamblia* and forms local slubs in the flagella *Parasitol. Res.*, 102(2), 321-326.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Anke Karola Vahrmann
Geburtsdatum: 26. Dezember 1977
Geburtsort: Dinklage

■ Schulische Ausbildung

August 1984 – Juni 1988 Grundschule Holdorf
August 1988 – Juli 1990 Orientierungsstufe Holdorf
September 1990 – Juni 1997 Gymnasium Damme,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

■ Akademische Ausbildung

September 1997 – Juni 2003 Biologiestudium an der Universität Osnabrück mit dem
Abschluss Diplom im Fachbereich Biologie/Chemie,
Abteilung Biochemie, Gesamtnote „sehr gut“ (1,1) mit
Auszeichnung

Seit Oktober 2003 Promotion an der Universität Osnabrück im Fachbereich
Biologie/Chemie, Abteilung Biochemie, in der
Arbeitsgruppe von apl. Prof. Dr. H. Scholze; Thema:
„Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Funktion des α 14- und des α 19-
Giardins in Trophoziten von *Giardia lamblia*“

■ Stipendien

Oktober 2003 – Oktober 2006 Stipendiatin des Graduiertenkollegs Osnabrück 612
„Molekulare Physiologie: Wechselwirkungen zwischen
zellulären Nanostrukturen“

Oktober 2006 – September 2007 Stipendium der Hans Mühlenhoff-Stiftung

April 2007 – September 2007 Stipendium des Frauenförderpools der Universität
Osnabrück

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben, meinen herzlichen Dank aussprechen:

Bedanken möchte ich mich bei apl. Prof. Dr. Henning Scholze für die nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die tolle Betreuung und fachliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Mein Dank gilt auch meiner verstorbenen Doktormutter Prof. Dr. Tilly Bakker-Grunwald für die aufmunternden Worte, Fürsorge und intensiven Diskussionen während dieser Zeit. Sie wird für mich stets ein Vorbild bleiben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Achim Paululat für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit.

Dr. Hans Merzendorfer für die Bereitstellung des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems, Dr. Anja Lorberg für das zur Verfügung stellen verschiedener Hefestämme und Dr. Stefan Walter für die Hilfestellung bei den massenspektroskopischen Analysen meinen herzlichen Dank.

Danke auch an Ilona für ihre geduldige Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen und meinen Korrekturleserinnen für ihre fleißige Lesebereitschaft.

Ein extragroßes „Danke schön“ richtet sich an all meine Kolleginnen und Kollegen des „Amöbenlabors“ für die schöne Zeit, die lustigen Stunden und den Spaß, den wir hatten. Ich werde immer gerne daran zurückdenken. Insbesondere möchte ich mich bei Mirela und Sabine bedanken, die mir fortwährend mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund für den Rückhalt und die Unterstützung in dieser Zeit und meiner Familie, die immer für mich da war.

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Osnabrück noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)