

**Biochemische Charakterisierung der Zyklin-abhängigen
Kinase 2/Aktivator-Komplexe des Parasiten
Eimeria tenella sowie deren Nutzung in der
Wirkstoffforschung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

María Luisa Suárez Fernández

geboren am 10.12.1979 in Langreo, Spanien

Mainz, 2012

Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	<i>Accession-Number</i>
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Restriktionsenzym)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAK	<i>CDK-Activating Kinase</i>
cdc	<i>cell-division-cycle</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIP	<i>Calf Intestinal alkaline Phosphatase</i>
Cip	<i>CD-interacting protein</i>
CRK	<i>CDK-related Kinase</i>
cyc	<i>cyclin</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
E-value	<i>Expectation Value</i>
EST	<i>Expressed-Sequence-Tag</i>
Et	<i>Eimeria tenella</i>
Etcyc	<i>Eimeria tenella cyclin</i>
FP	<i>Fluoreszenz Polarisation</i>
gDNA	<i>genomic DNA</i>
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> (Restriktionsenzym)
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IC	<i>Inhibitor Concentration</i>
ICD	<i>Intervet Chemical Database</i>
ID	<i>Identifizier</i>
INK4	<i>Inhibitor of CDK4</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante

K_i	Dissoziationskonstante
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Lsg.	Lösung
MAP-Kinase	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MBP	Maltose Bindungsprotein
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRK	<i>MO15-related Kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PK	<i>Protein Kinase</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RINGO	<i>Rapid Inducer of G2/M progression in Oocytes</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ta	<i>Theileria annulata</i>
Tab.	Tabelle
TAE/TBE Puffer	Tris-Acetat-EDTA/Tris-Borat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tp	<i>Theileria parva</i>
TR-FRET	<i>Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
Tris	Tris(hydroxyethyl)-aminoethan
ü.N.	über Nacht
Umin-1	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktosid
XI	<i>Xenopus laevis</i>

Aminosäuren

A, Ala	Alanin
C, Cys	Cystein
D, Asp	Asparaginsäure
E, Glu	Glutaminsäure
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin
H, His	Histidin
I, Ile	Isoleucin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin
M, Met	Methionin
N, Asn	Asparagin
P, Pro	Prolin
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
S, Ser	Serin
T, Thr	Threonin
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
Y, Tyr	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Parasiten des Stammes <i>Apicomplexa</i>	1
1.2	Human- und tierpathogene <i>Apicomplexa</i>	2
1.3	Kokzidiose beim Huhn	4
1.3.1	<i>Eimeria tenella</i>	5
1.3.2	Behandlung der Kokzidiose.....	7
1.4	Zellzyklus und “ <i>Checkpoints</i> ” als Ansatzpunkt zur Identifizierung von Zielproteinen.....	9
1.4.1	Zyclin-abhängige Kinasen (CDKs).....	10
1.4.2	Zykline.....	15
1.5	CDK-Aktivierung: Bindung des Zyclin-Partners und CDK-Aktivierende Kinase (CAK)-Phosphorylierung	16
1.5.1	Zyclin-unabhängige CDK-Aktivierung.....	18
1.6	CDK-Inhibitoren.....	20
1.6.1	Synthetische Inhibitoren	20
1.7	CDKs der <i>Apicomplexa</i> als Zielproteine für die Entwicklung von Antiparasitika... 24	
1.7.1	EtCRK2: Struktur und Funktion im Lebenszyklus von <i>E. tenella</i>	27
1.8	Kinase-Tests	29
1.8.1	Grundlagen des TR-FRET-Tests	30
1.9	Enzymkinetik.....	33
1.9.1	Linearisierungen der Michaelis-Menten Gleichung	34
1.9.2	Enzymatische Inhibition	34
1.10	Aufgabenstellung.....	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Materialien.....	37
2.1.1	Parasiten.....	37
2.1.2	Geräte.....	37
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	39
2.1.4	Chemikalien.....	41
2.1.5	Kompetente Bakterienstämme, Enzyme, Enzymsets, Peptide und <i>Primer</i>	42
2.1.6	Vektoren	44
2.1.7	Puffer, Medien und Lösungen	45
2.1.8	Chemische Verbindungen.....	48
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	49

2.2.1	Isolierung von <i>E. tenella</i> Sporozysten	49
2.2.2	RNA-Isolierung.....	50
2.2.3	Formaldehyd-Agarose-Gel für RNA-Proben.....	50
2.2.4	cDNA-Herstellung mittels RT-PCR	51
2.2.5	PCR-Amplifikation von Etcyc3 aus cDNA	51
2.2.6	Isolierung des Etcyc3a-Genes	52
2.2.7	Restriktionsverdau des Etcyc3a-Fragmentes und des pMALc2X-Vektors	52
2.2.8	Ligation des Etcyc3a-Fragmentes mit dem pMALc2X-Vektor.....	52
2.2.9	Transformation von <i>E. coli</i> TOP10-Zellen mit dem Expressionsplasmid pMALc2X-Etcyc3a	53
2.2.10	Sequenzierung des Expressionsplasmids pMALc2X-Etcyc3a	54
2.3	Biochemische Methoden.....	54
2.3.1	Expression rekombinanter EtCRK2- und XIRINGO-Proteine	54
2.3.2	Aufschluss der Bakterien mit EtCRK2-His-Protein	55
2.3.3	EtCRK2-Reinigung.....	55
2.3.4	XIRINGO-Reinigung.....	57
2.3.5	Gelfiltration des EtCRK2/XIRINGO-Komplexes	57
2.3.6	Expression der rekombinanten EtCRK2-His- und MBP-EtCYC3a- Proteine.....	58
2.3.7	Reinigung des rekombinanten EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Komplexes.....	58
2.3.8	Proteinbestimmung	59
2.3.9	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.3.10	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer</i> (TR-FRET)-Aktivitätsassay	59
2.3.11	Berechnung der spezifischen EtCRK2-Aktivität.....	61
2.3.12	K_m -Bestimmung für das Co-Substrat (ATP).....	62
2.3.13	<i>In vitro Screening</i> der chemischen Verbindungen.....	62
2.3.14	<i>In vitro</i> IC ₅₀ -Bestimmung der chemischen Verbindungen.....	63
2.3.15	<i>In vitro</i> K _i -Bestimmung der chemischen Verbindungen.....	63
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Expression und Reinigung der rekombinanten EtCRK2	65
3.2.	Expression und Reinigung des rekombinanten MBP-XIRINGO-Proteins	68
3.3.	Gelfiltration des EtCRK2/XIRINGO-Komplexes	72
3.4.	Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO.....	73
3.5.	Klonierung des EtCYC3a-Gens	75
3.5.1.	Isolierung von <i>E. tenella</i> -Sporozysten und Gesamt-RNA-Isolierung aus den Sporozoiten	75
3.5.2.	Etcyc3a-Gen: von seiner Amplifizierung aus cDNA bis zur Transformation in <i>E.</i> <i>coli</i>	76

3.6.	Expression und Co-Reinigung des rekombinaten EtCRK2-His/ MBP-EtCYC3a-Komplexes	77
3.7.	<i>In vitro</i> Aktivierung von EtCRK2 mittels EtCYC3a.....	81
3.8.	Optimierung des TR-FRET-Assays für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2	82
3.8.1.	Bestimmung der optimalen Assay-Reaktionszeit.....	82
3.8.2.	K_m -Bestimmung für das Co-Substrat (ATP)	83
3.8.3.	K_m -Bestimmung für das Fluoreszein-markierte Substrat	84
3.9.	<i>In vitro</i> Charakterisierung von potentiellen Inhibitoren der durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierten EtCRK2 und der durch HsCYCA aktivierten HsCDK2.....	86
3.9.1	<i>In vitro</i> Aktivitätsbestimmung von CDK-Standardinhibitoren auf EtCRK2 und HsCDK2	87
3.9.2.	<i>In vitro</i> Primärscreen einer Substanzbibliothek auf die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2	88
3.9.3.	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Primärscreen-Hits für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2 mittels IC_{50} -Bestimmung	89
3.9.4.	Ermittlung des Inhibitionstyps nach Lineweaver-Burk und Bestimmung der K_i -Werte	91
3.9.5.	<i>In vitro</i> Aktivitätsbestimmung von weiteren Test-Verbindungen auf EtCRK2 und HsCDK2	92
4	Diskussion.....	97
4.1.	<i>In vitro</i> Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO	97
4.2.	EtCYC3a als EtCRK2-Aktivator.....	99
4.3.	Inhibierung der durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierten EtCRK2	102
4.4.	Ausblick.....	104
5	Zusammenfassung.....	107
6	Literaturverzeichnis.....	109

1 Einleitung

Ein wichtiger Bereich der veterinärmedizinischen Wirkstoffforschung sind die Parasitosen von Haus- und Nutztieren. Diese stellen heutzutage immer noch eine große Herausforderung bezüglich Diagnostik, Behandlung und vorbeugendem Schutz von Mensch und Tier dar. In den letzten Jahren konnten noch bestehende Wissenslücken durch den Einsatz immunologischer (wie z.B. monoklonale Antikörper) und gentechnischer Methoden in vielen Bereichen geschlossen werden. Besonders die Klonierung parasitärer Zielproteine in leicht zu kultivierenden Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* erlauben es, diese Proteine molekularbiologisch und proteinchemisch näher zu charakterisieren. Solche Untersuchungen bilden die Voraussetzung für die exakte Diagnostik parasitärer Erkrankungen, die Entwicklung parasitenspezifischer Therapeutika und Impfstoffe sowie für die Aufklärung der Wechselwirkung zwischen Parasit und Wirt auf molekularer Ebene.

1.1 Parasiten des Stammes *Apicomplexa*

Beim Stamm der *Apicomplexa* handelt es sich um eine artenreiche Gruppe einzelliger, meist obligat intrazellulärer Parasiten, dem ernstzunehmende Krankheitserreger des Menschen (*Toxoplasma* sp., *Plasmodium* sp.) und tierpathogene Vertreter wie *Eimeria* sp., *Sarcocystis* sp., *Babesia* sp. und *Theileria* sp. angehören. Apicomplexe Parasiten haben einen typischen, dreiphasigen Entwicklungsgang mit Generationswechsel und können dabei je nach Art in einem oder, infolge eines Wirtswechsels, in mehreren Wirten parasitieren. Durch Sporenbildung können die Parasiten die härtesten Außenbedingungen überleben und werden daher auch Sporozoen oder Sporentierchen genannt [MORRISSETTE & SIBLEY, 2001; MEHLHORN, 2008]. Die systematische Zusammenfassung der *Apicomplexa* ist auf eine morphologische Gemeinsamkeit in der Zellorganisation der infektiösen Stadien aller Arten dieses Stammes zurückzuführen: dem Apikalkomplex. Er besteht aus Conoid, Polringen, präconoidalen Ringen und drei unterschiedlichen Organellen: den Rhoptrien, den dichten Granula ("*dense bodies*" oder "*dense granules*") und den Mikronemata (Abbildung 1.1). Alle drei Organelltypen sind sekretorisch aktiv und sezernieren Enzyme, die beim Eindringen in den Wirt involviert sind [DUBREMETZ, 2007]. Weiterhin besitzen *Apicomplexa*-Parasiten ein komplexes Plastid, das von vier Hüllmembranen umgeben ist, den Apikoplast (Abbildung 1.1) [MARÉCHAL & CESBRON-DELAUW, 2001]. Er ist ein Relikt eines nicht-photosynthetischen Plastids, dessen

evolutionärer Ursprung in der sekundären Endosymbiose liegen könnte [MARÉCHAL & CESBRON-DELAUW, 2001]. Der Apikoplast besitzt sein eigenes Genom, das dem Chloroplastengenom von Dinoflagellaten ähnelt und unerlässlich für das Überleben und vor allem für das Eindringen des Parasiten in den Wirt ist. So finden z.B. essentielle Prozesse, wie die Fettsäuresynthese, im Apikoplast statt. Im Falle eines Verlustes der Apikoplasten-Aktivität ist der Parasit nicht mehr in der Lage, genügend Fettsäuren zu synthetisieren und eine parasitophore Vakuole zu bilden, was das Eindringen in den Wirt grundsätzlich verhindern würde [LIM & MCFADDEN, 2010].

Somit sind der Apikoplast sowie der Apikalkomplex zwei spezifische Organellen, die für das Überleben des Parasiten unerlässlich sind. Aus diesem Grund sind Proteine, die am Aufbau dieser Organellen beteiligt sind, geeignete Zielproteine für die antiparasitische Wirkstoffentwicklung [FICHERA & ROOS, 1997; MARÉCHAL & CESBRON-DELAUW, 2001].

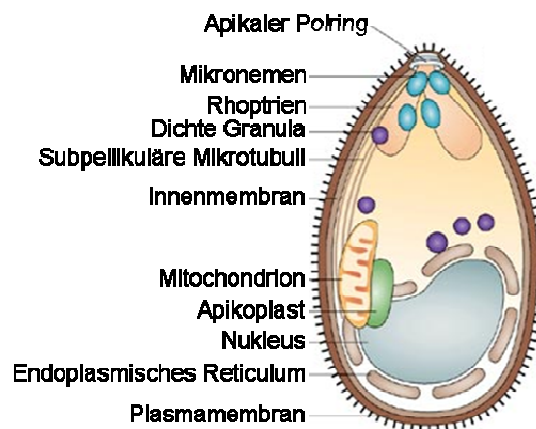


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Merozoiten von *Plasmodium falciparum*. Die Merozoiten stellen die infektiösen Stadien des Malaria-Erregers *P. falciparum* dar. Sie infizieren Erythrozyten und besitzen die wichtigsten Organellen, die charakteristisch für den Stamm *Apicomplexa* sind, z.B. die Mikronemen, die Rhoptrien, den Apikoplast und den Apikalkomplex. Abbildung aus BAUM *et al.*, 2006 (verändert).

1.2 Human- und tierpathogene *Apicomplexa*

Der Stamm *Apicomplexa* (Abbildung 1.2) umfasst Parasiten von wichtiger human- und veterinärmedizinischer Bedeutung. Die bedeutsamsten humanpathogenen *Apicomplexa* gehören zu den Familien: Haemosporidae (*Plasmodium falciparum*) und Eimeriidae (*Toxoplasma gondii* und *Cryptosporidium parvum*) [MEHLHORN, 2008].

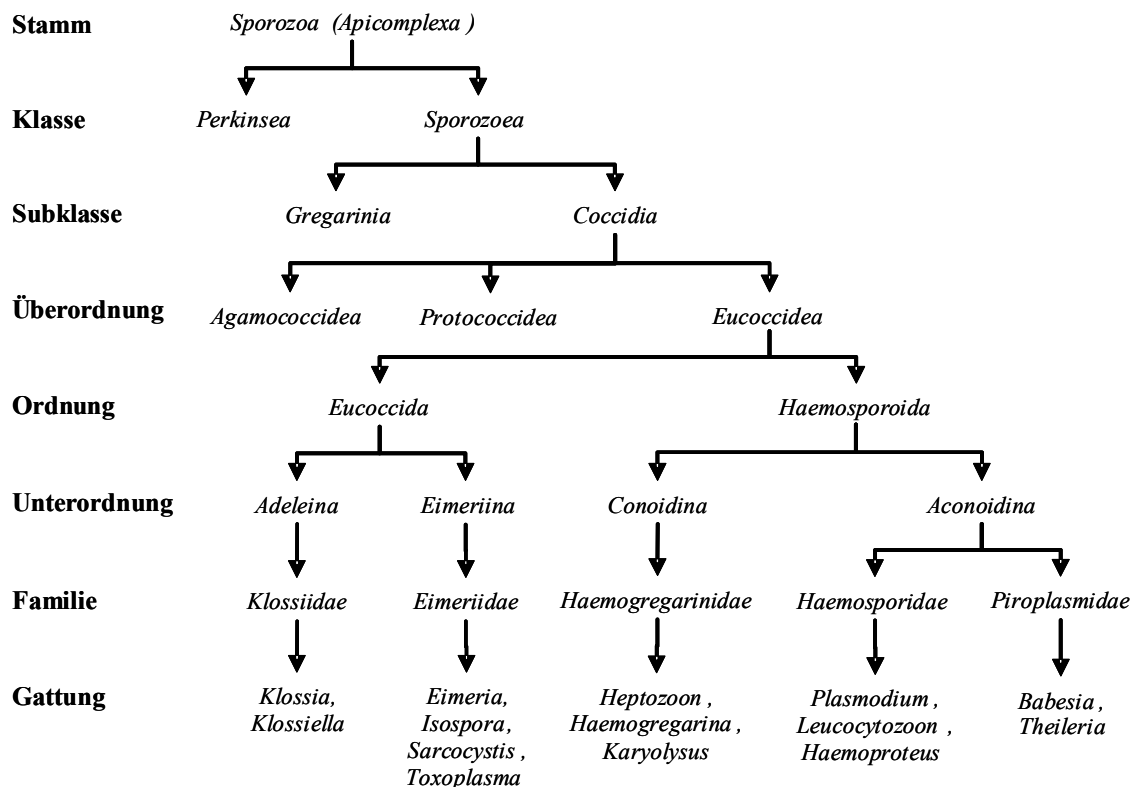


Abbildung 1.2: Ausschnitt aus dem Kladogramm der *Apicomplexa*.

Zu dem Stamm *Apicomplexa* gehören wichtige Humanpathogene wie z.B. *Plasmodium* sp. und *Toxoplasma* sp. aber auch tierpathogene Parasiten wie beispielsweise *Eimeria* sp. und *Theileria* sp. [MEHLHORN, 2008].

Malaria ist eindeutig die wichtigste und gefährlichste Krankheit, die von *Apicomplexa*-Parasiten (*P. falciparum*) hervorgerufen wird [GUERRA *et al.*, 2008]. Sie trifft hauptsächlich die Einwohner von tropischen und subtropischen Entwicklungsländern wie weite Teile Afrikas, Asiens und Südamerikas. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2008 sterben weltweit jährlich eine Million Menschen an Malaria, wovon etwa die Hälfte Kinder unter fünf Jahren sind [DOERIG & MEIJER, 2007; CEUSTERS & SMITH, 2009].

Zu den wichtigen menschlichen *Apicomplexa*-Krankheiten gehören auch die Toxoplasmose (hervorgerufen durch *T. gondii*) und die Kryptosporidiose (verursacht durch *C. parvum*). Beide sind opportunistische Erreger von Krankheiten, die vor allem lebensgefährlich für immunsupprimierte Patienten sind [TZIPORI, 1998; BOOTHROYD, 2009]. Zusätzlich ist Toxoplasmose auch für Schwangere sehr gefährlich, da sie Missbildungen, Blindheit und geistigen Rückstand des Fötus hervorrufen kann [BOOTHROYD, 2009].

Apicomplexa-Parasiten rufen nicht nur menschliche Krankheiten hervor. Hinsichtlich der tierärztlich relevanten Krankheiten, die zu großen ökonomischen Verlusten in der Tierproduktion

führen, sind die drei wichtigsten Erreger *Babesia* spp., *Theileria* spp. und *Eimeria* spp. Babesiose ist eine weltweit verbreitete malaria-ähnliche Krankheit, die durch die Gattung *Babesia* hervorgerufen wird [HOMER *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2008]. Eine der wichtigsten Arten, *Babesia bovis*, ruft das „Zeckenfieber“ in Rindern hervor und ist vor allem in den tropischen und subtropischen Ländern verbreitet [BRAYTON *et al.*, 2007]. Theileriose ist ebenfalls hauptsächlich eine Rinderkrankheit. Die wichtigsten Arten dieser Erreger sind *T. parva*, die das „Ostküsten-Fieber“ und *T. annulata*, welche die „tropische Theileriose“ verursachen [NORVAL *et al.*, 1991].

Die Gattung *Eimeria* ist der Auslöser der Kokzidiose, einer Darmkrankheit, die zu blutigem Durchfall führt. Die weltweit verbreiteten zahlreichen *Eimerien*-Arten können die unterschiedlichsten Wirte infizieren, z.B. Geflügel, Fisch, Schwein, Schaf, Hund, Katze, Meeresschweinchen, Reptilien oder Rind [LUCIUS & LOOS-FRANK, 2008; MEHLHORN, 2008].

1.3 Kokzidiose beim Huhn

Die Kokzidiose beim Huhn ist wirtschaftlich am bedeutsamsten. Sie ist eine der größten Verlustquellen in der weltweiten Geflügelindustrie mit einer geschätzten Verlusthöhe von etwa 3 Milliarden US\$ pro Jahr [DALLOUL & LILLEHOJ, 2006; SHIRLEY *et al.*, 2007; LUCIUS & LOOS-FRANK, 2008]. Die Kokzidiose verursacht einen hämorrhagischen Durchfall (Enteritis) bei kleinen Hühnerküken, der zum Gewichts- und Appetitverlust, Resorptionsstörungen, bakteriellen Sekundärinfektionen (wie z.B. durch *Salmonella* sp.) und häufig zum Tod der Tiere führt [SHIRLEY, 1989; FANATICO, 2006]. Zusätzlich zu der Enteritis sind eine generelle Aktivitätseinschränkung, der Verlust der gelben Farbe in den Schenkeln und blasse Kämmen und Kehllappen zu beobachten [FANATICO, 2006; LUCIUS & LOOS-FRANK, 2008]. Die kritische Ansteckungsphase bei Hühnerküken liegt zwischen der dritten und sechsten Woche nach dem Schlüpfen. Bei einem Ausbruch der Krankheit in einem Gehege beträgt die Sterblichkeitsrate unter den Küken bis zu 80%. Infizierte erwachsene Tiere entwickeln keine Krankheitssymptome und dienen nur als Reservoir für den Parasiten [MEHLHORN, 2008]. Aufgrund des kontinuierlichen und direkten Kontaktes zwischen Tier und Parasit schafft die industrielle Eier- und Hühnerfleischproduktion ideale Bedingungen für die schnelle Vermehrung von Eimerien (siehe Abschnitt 1.3.1).

Es sind zurzeit sieben *Eimeria*-Spezies bekannt, welche die Kokzidiose beim Huhn hervorrufen und ubiquitär verbreitet zu sein scheinen. Zur Unterscheidung dieser Arten werden verschiedene Parameter herangezogen, wie z.B. die Morphologie des Oozysten (Abbildung 1.3), den Teil des Darmes den sie infizieren (z.B. *E. acervulina* infiziert nur das Duodenum) oder die Art und den Schweregrad der Beschwerden, welche sie verursachen [LUCIUS & LOOSFRANK, 2008]. Einer der gefährlichsten Parasiten, die die Kokzidiose in Hühnern verursacht, ist *E. tenella*.



Abbildung 1.3: Sporulierter Oozyst von *E. tenella*.

(Quelle: Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim).

1.3.1 *Eimeria tenella*

Der Lebenszyklus von *E. tenella* beginnt mit der oralen Aufnahme der sporulierten Oozysten, die sich zusammen mit Kot und Futterresten auf dem Boden befinden (Abbildung 1.4). Die Oozysten werden im Darm freigesetzt und besiedeln die Blinddarmzellen. Dort findet die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) statt und Meronten (mehrkernige Zellen) werden gebildet. Diese Phase kann 5-7 Tage dauern. Die Meronten brechen die Blinddarmzellen auf und lassen die Merozoiten frei, was wesentliche Gewebeschäden verursacht und zu den Durchfallssymptomen führt. Diese Merozoiten infizieren wiederum Blinddarmzellen und führen mehrere Vermehrungszyklen durch, bis sie sich intrazellulär zu Mikro- und Makrogametozyten differenzieren. Die Mikrogametozyten brechen die Darmzellen auf und infizieren weitere Darmzellen, in denen sich bereits differenzierte Makrogametozyten befinden, was zur Bildung einer Zygote führt. Aus dieser Zygote in der Darmzelle entwickelt sich ein unsporulierter Oozyst, der mit dem Kot ausgeschieden wird. Unter optimalen Bedingungen (Temperatur: 30°-37°C, Sauerstoff und mindestens 20% Luftfeuchtigkeit) können *E. tenella* Oozysten ihre Sporulation außerhalb des Wirtes in weniger als 20 Stunden vollenden. Die sporulierten Oozysten werden ihrerseits wieder von neuen Wirten aufgenommen und der Zyklus beginnt von neuem [LONG, 1972; MEHLHORN, 2001; KINNAIRD *et al.*, 2004; SHARMAN *et al.*, 2010].

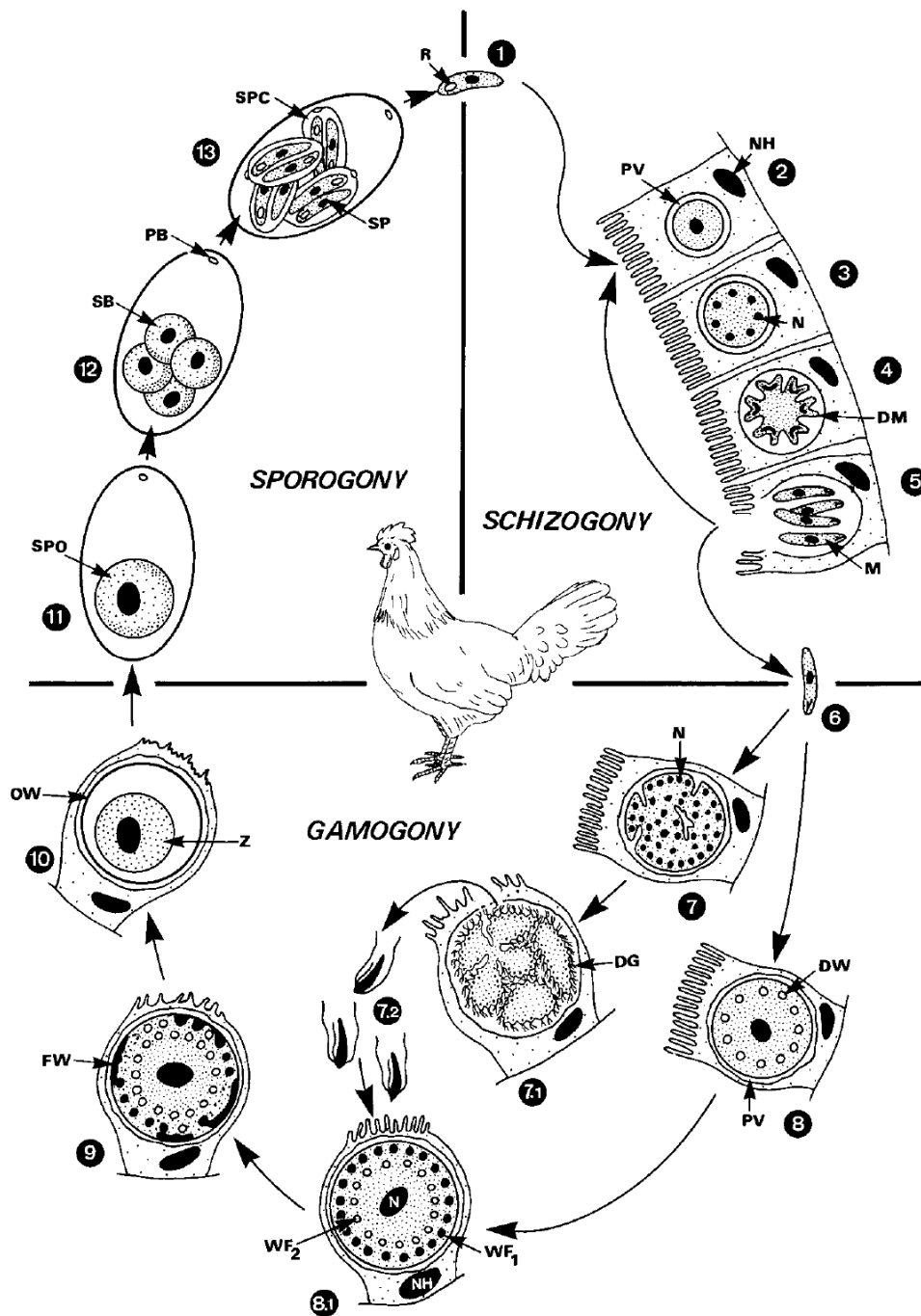


Abbildung 1.4: Lebenszyklus von *Eimeria* spp.

(1) Nach der oralen Aufnahme der sporulierten Oozysten werden die Sporoziten freigesetzt und befallen den Blinddarm. Dort findet die Schizogonie (2 bis 5) sowie die Gamogonie (6 bis 10) statt, bevor sie als unsporulierte Oozysten (10) mit dem Kot ausgeschieden werden. Unter optimalen Bedingungen erfolgt draußen die Sporogonie (11 bis 13) bevor sie vom Wirt wieder aufgenommen werden (1) [MEHLHORN, 2008].

1.3.2 Behandlung der Kokzidiose

Die Oozysten von *Eimeria* spp. sind sehr verbreitet, haben eine sehr hohe Reproduktionsrate und zusätzlich ein großes Überlebenspotential. Daher ist es kaum möglich, Hühner unter *Eimeria*-freien Bedingungen zu halten. Neben prophylaktischen Maßnahmen wurden bisher vor allem synthetische Wirkstoffe und aktive Immunisierung zur Bekämpfung von Kokzidiose eingesetzt. Die Prophylaxe umfasst hygienische Maßnahmen, wie z.B. die Positionierung der Futterbehälter oberhalb des Hühnerrückens, um die Kontamination von Futter mit infiziertem Kot zu vermeiden. Darüberhinaus ist eine niedrige Haltungsdichte und die Trennung von alten und jungen Hühnern sehr wichtig, da hauptsächlich die erwachsenen Hühner als Reservoir für Parasiten dienen [FANATICO, 2006; MEHLHORN, 2008].

Seit ca. 50 Jahren spielen auch synthetische Wirkstoffe eine sehr wichtige Rolle bei der Behandlung und Prophylaxe der Kokzidiose. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden: a) Substanzen mit Wirkung auf den Metabolismus der Parasiten, wie z.B. Amprolium [CHAPMAN, 1989], Sulfonamide [CAMPBELL, 2008; CHAPMAN, 2009], Clopidol [ARAKAWA *et al.*, 1991; XIE *et al.*, 1991], Decoquinat (Deccox®) [WILLIAMS, 2006], Ormetoprim [HASBULLAH *et al.*, 1996], Halofuginon [HUET *et al.*, 2005] und Toltrazuril (Baycox®) [MATHIS *et al.*, 2004; CLAESKENS *et al.*, 2007]; b) Polyether-Ionophore, die einen generellen Einfluß auf den Ionentransport und das osmotische Gleichgewicht von Zellen ausüben und somit zu irreversiblen Schäden in den Parasiten führen. Beispiele hierfür sind Monensin, Lasalozid, Salinomycin, Narasin und Maduramizin [MEHLHORN, 2008; SHARMAN *et al.*, 2010]. Die wirksame Konzentration dieser Therapeutika liegt nahe der letalen Dosis und außerdem kommt es häufig zu einer Resistenzbildung, was den Einsatz - insbesondere zur Prophylaxe - problematisch macht. Um der Resistenzbildung entgegenzuwirken, wird meist mit einem Cocktail aus mehreren Wirkstoffen behandelt oder ein Rotationsprogramm durchgeführt, welches einen regelmäßigen Wechsel des eingesetzten Wirkstoffes vorschreibt [LEE & SMITH, 1981; MEHLHORN, 2008]. Neben der Resistenzentwicklung limitieren außerdem die Gesetzgebung und die wachsende Sorge des Verbrauchers vor Arzneimittelrückständen den Einsatz von Arzneimitteln beim Huhn als Lebensmittel lieferndes Tier. So sollen auf Basis der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 Kokzidiostatika, „Stoffe zur Abtötung oder Wachstumshemmung von Protozoen“, ab dem Jahr 2012 nicht mehr als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden. Die Zulassungen der entsprechenden Präparate wurden auf zehn Jahre begrenzt, so dass die Auswahl an

verfügbaren Wirkstoffen weiter eingeschränkt wird und in absehbarer Zeit alternative Strategien zur Bekämpfung der Kokzidiose verfolgt werden müssen [EU Amtsblatt, 2009].

Um die Resistenzbildung zu adressieren, kann alternativ zu den eingesetzten Wirkstoffen eine aktive oder passive Immunprophylaxe durchgeführt werden, denn *Eimeria*-Infektionen besitzen eine starke immunogene Aktivität. Da die *Eimeria*-freie Hühnerhaltung praktisch unmöglich ist, wird fast jedes Huhn im Laufe seines Lebens infiziert und entwickelt eine entsprechende Immunantwort. Darüber hinaus sorgt der wiederholte Kontakt mit geringen Mengen an *Eimerien* für eine ständige Auffrischung der Immunität und damit für die Aufrechterhaltung der Gesundheit. Sehr verbreitet und effizient ist daher die Nutzung von attenuierten oder Lebendvakzinen gegen die Infektion mit *Eimerien*. Beispiele für Lebendvakzine sind Coccivac® und Nobilis® COX ATM (Intervet/MSD Animal Health) [GIAMBRONE *et al.*, 1984; WILLIAMS, 2002], Immunocox® (Vetch Laboratories Inc.) [WOYENGO *et al.*, 2010], Advent® (Viridus Animal Health) [OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2006] und Supercox® (Wockhard Ltd.) [SUO *et al.*, 2006]. Als Beispiele für attenuierte Vakzine gelten Paracox® (Intervet/Shering-Plough Animal Health) [WILLIAMS *et al.*, 1999; CLAESKENS *et al.*, 2007] und Livacox® (Merrial-Biopharm) [ANWAR *et al.*, 2008]. Allerdings verursachen die Vakzine oft Nebenwirkungen (z.B. verringertes Wachstum der Hühner) und sind durch ihren hohen Herstellungskosten häufig wirtschaftlich uninteressant [MEHLHORN, 2008; SHARMAN *et al.*, 2010].

Die Parasiten weisen eine hohe Resistenzbildungsrate gegen die vorhandenen Wirkstoffe auf und zusätzlich zeigen die Vakzine hohe Produktionskosten und wichtige Nebenwirkungen. Auf Grund dessen ist die Entwicklung von neuen, kostengünstigen und effektiven Coccidiostatika eine dringend notwendige Herausforderung. Auf der Suche nach Zielproteinen in *E. tenella* für die Entwicklung von neuen Medikamenten gegen Kokzidiose, hat sich der Lebenszyklus dieses Parasiten als interessanter Ansatzpunkt herausgestellt. Dies liegt daran, dass Eimerien, ähnlich wie Krebszellen, eine sehr schnelle Zellteilung bei der Schizogonie aufweisen. Die Zellteilung wird durch spezifische Proteine gesteuert: Zyklin-abhängige Kinasen und ihre Aktivatoren, die Zykline [MALUMBRES & BARBACID, 2001]. Bei Krebszellen können diese Proteine mittels Inhibitoren gezielt ausgeschaltet werden, was zur Unterbrechung der Vermehrung der bösartigen Zellen führt. Auch bei Parasiten kann der Lebenszyklus durch Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen unterbrochen werden [NAULA *et al.*, 2006; CANDURI *et al.*, 2007].

1.4 Zellzyklus und “*Checkpoints*” als Ansatzpunkt zur Identifizierung von Zielproteinen

Die einzelligen *Apicomplexa*-Parasiten durchlaufen einen eukaryotischen Zellzyklus. Dabei handelt es sich um eine Abfolge von hoch koordinierten, unidirektionalen Phasen: G1 (*Gap* 1), S (DNA-Synthese), G2 (*Gap* 2) und M (Mitose) (Abbildung 1.5) [ELLEDDGE, 1996; JOHNSON & WALKER, 1999]. Sobald die Zellen ihre Vermehrung unterbrechen, verlassen sie den Zellzyklus und beginnen eine Ruhephase, die „G0“-Phase [MALUMBRES & BARBACID, 2001]. Dieser Zyklus wird durch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependant kinases*, CDKs) gesteuert.

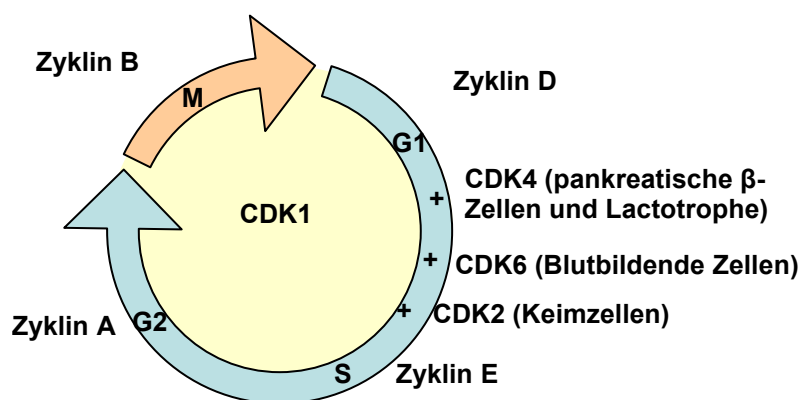


Abbildung 1.5: Schema des eukaryotischen Zellzyklus und die Regulation durch Zyklin-abhängige Kinasen sowie durch Zykline.

Der Zellzyklus gliedert sich in die beiden *Gap*-Phasen G1 und G2, die Synthese-Phase S und die Mitose-Phase M. Reguliert wird dieser Zyklus mit Hilfe von Zyklin-abhängigen Kinasen sowie durch deren Aktivatoren (Zykline). Die CDK-Zyklin-Komplexe steuern die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen. Die Kinasen CDK1, CDK2, CDK4 sowie CDK6 sind essenziell für die Proliferation von spezialisierten Zellen [nach MALUMBRES & BARBACID, 2009].

In der Regel kann die Reihenfolge der Zellzyklus-Abläufe nicht geändert werden, und somit benötigt jede Phase die Vollendung der vorherigen, um fortzuschreiten [ELLEDDGE, 1996; MALUMBRES & BARBACID, 2001]. Des Weiteren führt eine Änderung der zeitlichen Folge dieser Abläufe zu einer schlechteren Vermehrungsfähigkeit in Einzellern und zu einer unkontrollierten Zellvermehrung in mehrzelligen Organismen, die u.a. Krebs auslösen kann [ELLEDDGE, 1996; PAVLETICH, 1999; HASSAN *et al.*, 2001]. Um die richtige Abfolge des Zellzyklus zu gewährleisten, existieren bestimmte Kontrollpunkte (*checkpoints*) in den Zellen. Sie ermöglichen die Kontrolle über kritische Abläufe, die für das Überleben der Zelle (wie z.B. DNA Replikation

oder Segregation von Chromosomen) wichtig sind sowie über die richtige Reihen- und Zeitfolge dieser Abläufe, damit die Zellen mit der höchsten Effizienz ihren Zellzyklus abschließen können. Diese Kontrollmechanismen können in allen eukaryotischen Zellen gefunden werden [KHAN *et al.*, 2002].

1.4.1 Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs)

Die wichtigsten *checkpoint*-Regulatoren des eukaryotischen Zellzyklus sind zweifelsfrei die Zyklin-abhängigen Kinasen. Sie gehören zu den mehr als 1.000 hoch konservierten Proteinkinasen, die sich in allen Eukaryonten befinden [HUNTER, 1987]. Beispielsweise gibt es im menschlichem Genom etwa 500 Proteinkinase-kodierende Gene (2% des gesamten Genoms) (Abbildung 1.6) [MANNING *et al.*, 2002]. CDKs gehören zu der CMGC-Familie (CDKs, *Mitogen activated protein kinases* (MAPs), *Glycogensyntase Kinases* (GSKs), *Casein Kinases* und *Cyclin-like kinases* (Clks)) [KHAN *et al.*, 2002; KINNAIRD *et al.*, 2004; MATTHEWS & GERRITSEN, 2010] und sind Serin/Threonin-Kinasen, die den Transfer einer Phosphatgruppe zu einem Substrat katalysieren. Die Ähnlichkeit verschiedener Kinasen zueinander ist in einem Dendrogramm (Abbildung 1.6) dargestellt.

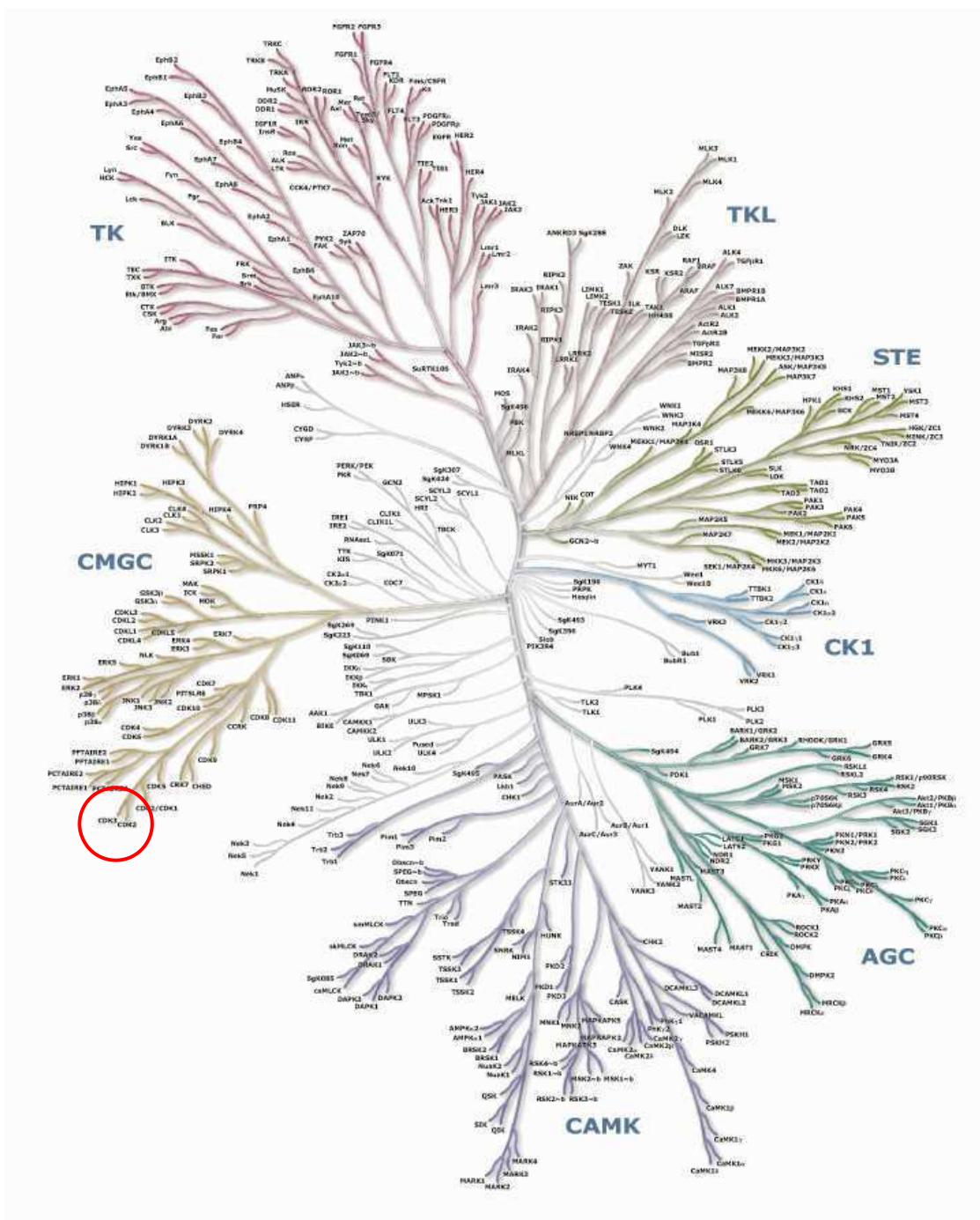


Abbildung 1.6: Dendrogramm des humanen Kinoms.

Familien humaner Kinasen lassen sich in einem Dendrogramm zusammenfassen. Je ähnlicher zwei Kinase Sequenzen zueinander sind, desto dichter liegen sie im Dendrogramm zusammen wie beispielsweise die humane CDK1 und CDK2 der CMGC-Familie (roter Kreis) [nach MANNING *et al.*, 2002].

Bei CDKs unterscheidet man drei charakteristische Domänen (Abbildung 1.7). Die *G-Loop* Domäne beinhaltet die Aminosäurereste T14 und Y15, die durch ihren Phosphorylierungs-Status die CDKs regulieren. Die *C-Loop* Domäne beinhaltet das Zyklin-Bindemotiv „PSTAI-

RE“ und besitzt eine α -helicale Struktur. Die *T-Loop* Domäne, auch Aktivierungs-Loop genannt, ist in der CDK-Aktivierung und Substratbindung involviert. Zwischen dem *C-Loop* und *T-Loop* ist eine hydrophobe tiefe Spalte (*Hinge-Region*) in der sich die ATP-Bindetasche befindet (Abbildungen 1.7 und 1.8) [JEFFREY *et al.*, 1995; MORGAN, 2006].

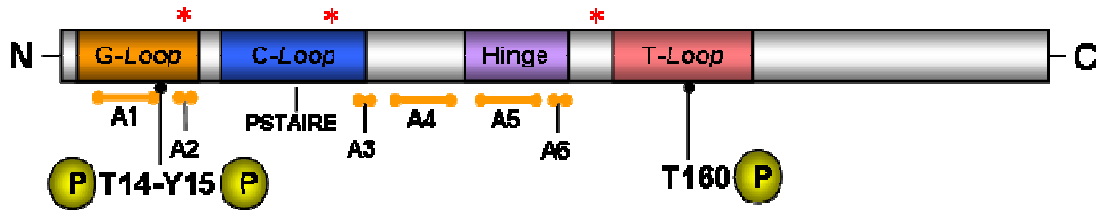


Abbildung 1.7: Charakteristische Sequenzmotive von humanen CDK Proteinen.

Zu den charakteristischen Sequenzmotiven zählen *G-Loop* (orange), *C-Loop* (blau), *Hinge-Region* (violett) und *T-Loop* (Aktivierungs-Loop, rot). Das Zyklin-Bindemotiv (PSTAIRE-Motiv) variiert in der Sequenzabfolge in humanen CDK-Proteinen. Die Aminosäuren des katalytischen Zentrums K32, E50 und D144 (Nummerierung entspricht EtCRK2) sind durch rote „*“ markiert. A1 bis A6 kennzeichnen ATP-Bindungsstellen (orange-farbene Linien). Die Phosphorylierungsstellen T14, Y15 und T160 sind ebenfalls bei humanen CDK Proteinen hoch konserviert [Bild erstellt nach Daten aus RUSSO *et al.*, 1996].

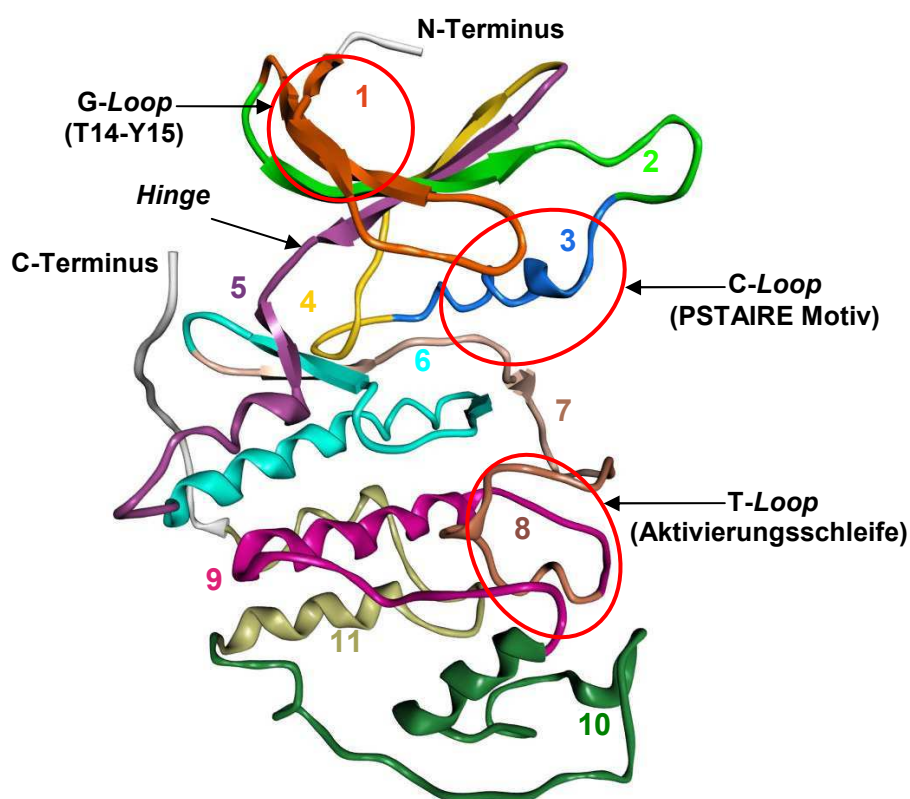


Abbildung 1.8: Struktureller Aufbau von Proteinkinasen.

Farbige Hervorhebung der elf Subdomänen von Proteinkinasen nach HANKS & HUNTER, 1995. Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit, die Proteinkinasen untereinander zeigen, lassen sich alle Proteinkinase-Strukturen in diese elf Subdomänen einteilen. Hier ist als Beispiel die menschliche CDK2 (PDB-Acc.-Nr.: 1JFIN, [JEFFREY *et al.*, 1995]) gezeigt. Die wichtigen CDK-Domänen G-Loop (Subdomäne 1), C-Loop (Subdomäne 3) und T-Loop (Subdomäne 8) sind mit roten Kreisen markiert.

Die Aktivität der CDKs wird durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert. Als Beispiel gilt die subnukleare Lokalisierung ihrer Aktivatoren, der Zykline, die sich meistens bis zur Zellteilung in spezifischen subnuklearen Anhäufungen (*Foci*) im Nukleoplasma befinden (Abbildung 1.9) [ELLEDDGE, 1996; MORGAN, 1997; JOHNSON & WALKER, 1999; PAVLETICH, 1999; KINNAIRD *et al.*, 2001; MALUMBRES & BARBACID, 2001; KHAN *et al.*, 2002].

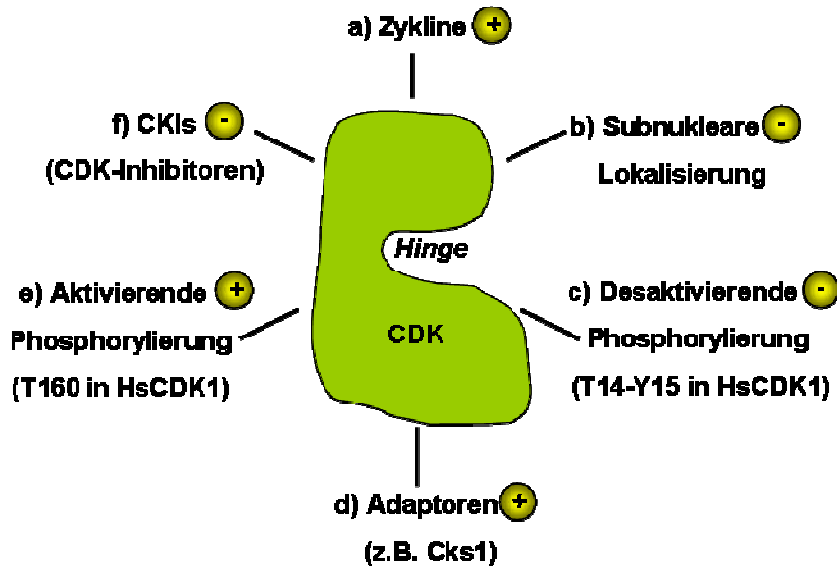


Abbildung 1.9: Mechanismen, welche die CDK-Aktivität regulieren.

CDKs werden durch die folgenden Mechanismen reguliert: a) Assoziation mit ihren regulierenden Partnern (Zyklone); b) subnukleare Lokalisierung; c) desaktivierende Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste in der ATP-Bindetasche (z.B. T14-Y15 in HsCDK1); d) Proteine wie Cks1 (CDK-assoziiertes Protein), die als Adaptoren fungieren und in der Lage sind, CDK-Zyclin-Komplexe mit regulatorischen Komponenten zu verbinden; e) aktivierende Phosphorylierung im T-Loop und f) CDK-Inhibitoren (CKIs), die zu den Cip/Kip und INK4 Familien gehören [MALUMBRES & BARBACID, 2001].

Die Mehrheit der CDKs kontrollieren hauptsächlich den Zellzyklus (Tabelle 1.1) [LE ROCH *et al.*, 2000; VAN HELLEMOND *et al.*, 2000; VAN HELLEMOND & MOTTRAM, 2000]. Es gibt jedoch auch einige CDKs, die in andere zelluläre Prozesse involviert sind wie z.B. in die Kontrolle der Transkription oder der Antwort auf Stress.

CDK	Zyclin-Partner	Substrate	Natürliche Protein-Inhibitoren	Inhibitoren	Zelluläre Funktionen
CDK1	ZYKLIN A und B1-B3	Histon H1 APC Zyclin B Cdc25C	p21cip/WAF1 p27 kip 1 p57 kip2	Olomoucine, Roscovitin Purvalanol A, Kenpaullon Alsterpaullon, Indirubinen Aloisinen, Flavopiridol, Staurosporin	Zellzyklus (G2/M)
CDK2	ZYKLIN A ZYKLIN E	Histon H1 pRb Cdc6 Nukleophosmin	p21cip/WAF1 p27 kip 1 p57 kip2	Olomoucine, Roscovitin Purvalanol A, Kenpaullon Alsterpaullon, Indirubinen Aloisinen, Flavopiridol, Staurosporin	Zellzyklus (G1/S, S, G2) Apoptose
CDK3	ZYKLIN C				Zellzyklus (potentiell)
CDK4	ZYKLIN D1-D3	pRb	p16INK4A; p15INK4B p18INK4C; p19INK4D	Flavopiridol Fascaplysin	Zellzyklus (G1 und G2/M)
CDK5	p35/25 p39 ZYKLIN D1	Tau MAP-2B DARPP-32 Pak1		Olomoucine, Roscovitin Purvalanol A, Kenpaullon Alsterpaullon, Indirubinen Aloisinen, Flavopiridol, Staurosporin	Auswuchs von Neuriten Apoptose Rac <i>signaling</i>
CDK6	ZYKLIN D1-D3	pRb	p15INK4A; p16INK4B p18INK4C; p19INK4D		Zellzyklus (G1)
CDK7	ZYKLIN H	CTD RNA pol II			Zellzyklus Transkription
CDK8	ZYKLIN C	CTD RNA pol II			Transkription
CDK9	ZYKLIN K und T1	CTD RNA pol II		Roscovitin Flavopiridol	Transkription
CDK10	ZYKLIN D3				Zellzyklus (potentiell) Transkription
CDK11	Zyclin L2/Ania 6 Ets 2 Transkriptionsfaktor				<i>Splicing</i> ; Apoptose; Zellzyklus (G2/M) Neuronale Funktionen

Tabelle 1.1: Übersicht über alle menschlichen CDKs, die bisher identifiziert wurden, ihre Zyclin-Partner, Substrate, Inhibitoren und Funktionen [nach MALUMBRES & BARBACID, 2005].

1.4.2 Zykline

Im Jahre 2001 erhielt R. Timothy Hunt (UK) zusammen mit Leland H. Hartwell (USA) und Paul M. Nurse (UK) den Nobel-Preis für Medizin für die Entdeckung der Zykline und CDKs und deren zentraler Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Die 30-90 kDa großen Zykline sind in der Lage, mit Zyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) Komplexe zu bilden sowie deren Kinase-Funktion zu aktivieren. Ihre Konzentration variiert sehr stark und zyklisch während der Zellzyklusprogression (daher der Name „Zykline“). Hinsichtlich ihrer Struktur besitzen alle Zykline eine Zyclin-Box. Diese Region ist etwa 100 Aminosäuren groß und in der Bindung an die CDK involviert [MORGAN, 1997; VAN HELLEMOND *et al.*, 2000; VAN HELLEMOND & MOTTRAM, 2000; KHAN *et al.*, 2002]. Zykline haben eine ähnliche Sekundärstruktur, die aus einem Kernbereich von 10 Helices besteht. Dieser Kernbereich ist in 2 Helixbündeln aus jeweils 5 Helices ($H^1 - H^5$ und $H^{1'} - H^{5'}$) organisiert, wobei die Zyclin-Box nur die ersten 5

Helices umfasst. Außerhalb dieses konservierten Kernbereichs besitzen alle Zykline eine N- und C-terminale Domäne, die jedoch in ihrer Sekundärstruktur stark variieren kann. Sie dient möglicherweise der Stabilisierung und Positionsfixierung der Kernregionen (Abbildung 1.10) [MORGAN, 1997].

Innerhalb des Zellzyklus bleibt die CDK-Konzentration relativ konstant. Die Regulation der Zellzyklusprogression wird hauptsächlich durch bestimmte CDK-Zyclin-Kombinationen und durch verschiedene Konzentrationen an Zyklinen gesteuert [LE ROCH *et al.*, 2000]. Aufgrund dessen ist die Regulation der Konzentration der Zykline extrem wichtig. So wird z.B. in Hefen und Säugetieren die zelluläre Konzentration von fast allen Zyklinen durch folgende Mechanismen kontrolliert: Gentranskription, kontrollierte Proteolyse bei bestimmten Zellzyklusphasen und subzellulärer Lokalisierung [MORGAN, 1997; JOHNSON & WALKER, 1999; VAN HELLEMOND & MOTTRAM, 2000].

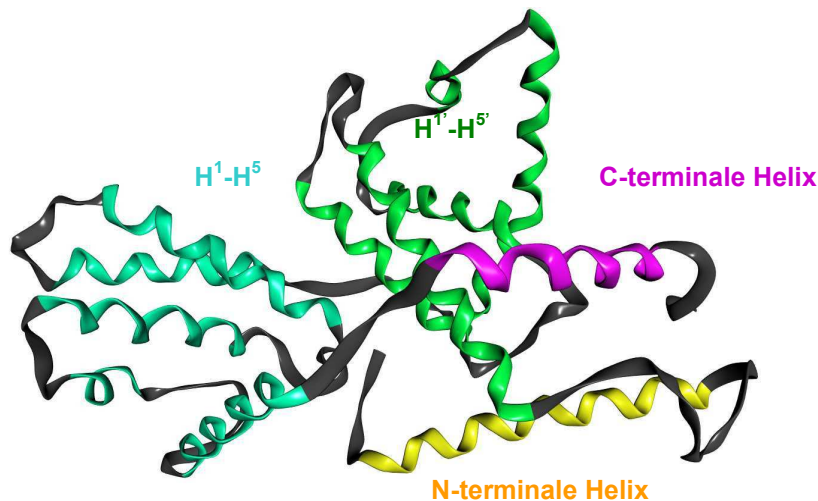


Abbildung 1.10: Dreidimensionale Struktur von Zyklin H.

Dargestellt ist die Tertiärstruktur des humanen Zyklin H-Proteins. Die N-terminale Helix ist in gelb und die C-terminale Helix in violett eingefärbt. Die Helices H¹-H⁵ sind in cyan, die Helices H^{1'}-H^{5'} in grün eingefärbt (PDB-Acc.-Nr.: 1JKW, nach ANDERSEN *et al.*, 1996).

1.5 CDK-Aktivierung: Bindung des Zyklin-Partners und CDK-Aktivierende Kinase (CAK)-Phosphorylierung

Die CDK allein weist meist keine Grundaktivität auf und benötigt für ihre vollständige Aktivierung bestimmte Konformationsänderungen, die in zwei Schritten erfolgen: die Bindung eines Zyklin und die Phosphorylierung durch eine CDK-aktivierende Kinase (CAK). Zuerst

bindet der Zyklin-Partner an die CDK, was zu einer Konformationsänderung der CDK von einer inaktiven zu einer aktiven Form führt. Die Zyklin-Bindung ist zusätzlich verantwortlich für die Substratspezifität der CDK [PAVLETICH, 1999] (Abbildung 1.11).

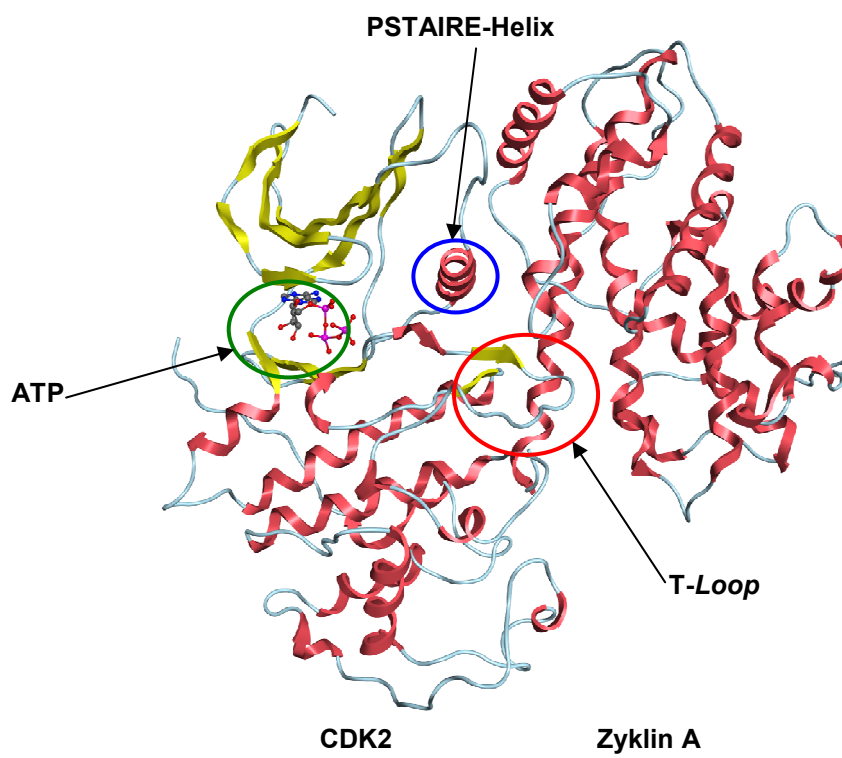


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung des CDK2/Zyklusin A-Komplexes.

CDK2 ist links und Zyklusin A rechts dargestellt. Das ATP ist in *ball-and-stick*-Darstellung in der oberen Mitte der CDK gezeigt (grüner Kreis). Die Bereiche der CDK, die große Konformationsänderungen durchführen, sind die PSTAIRE-Helix (blauer Kreis) und der T-Loop (Aktivierungsloop, roter Kreis) (PDB-Acc.-Nr.: 1FIN, nach Daten aus JEFFREY *et al.*, 1995).

Das Zyklusin bindet in einem Bereich des aktiven Zentrums der CDK und bildet mit der PSTAIRE-Helix, dem T-Loop und Aminosäuren des N- und C-Terminus der CDK einen großen kontinuierlichen Protein-Protein-Komplex (Abbildung 1.11). Dabei ändert sich die Packung der kleinen Helix α L12 und erlaubt damit der PSTAIRE-Helix, sich zu bewegen. Die PSTAIRE-Helix bewegt sich aus dem katalytischen Zentrum der CDK heraus und dreht sich dabei um 90° . Die Struktur und Lage des T-Loops wird ebenfalls verändert, was nun den Zugang zur Substrat- und ATP-Bindetasche erlaubt. In Abbildung 1.12 ist die Bewegung des Aktivierungsloops und der PSTAIRE-Helix beim Übergang zwischen inaktiver und aktiver

CDK2-Struktur deutlich zu erkennen [NICULESCU-DUVAZ *et al.*, 2007; HOLM *et al.*, 2008]. Zusätzlich wird der aktivierende Threonin-Rest des T-Loops zur wasserzugänglichen Protein-oberfläche exponiert.

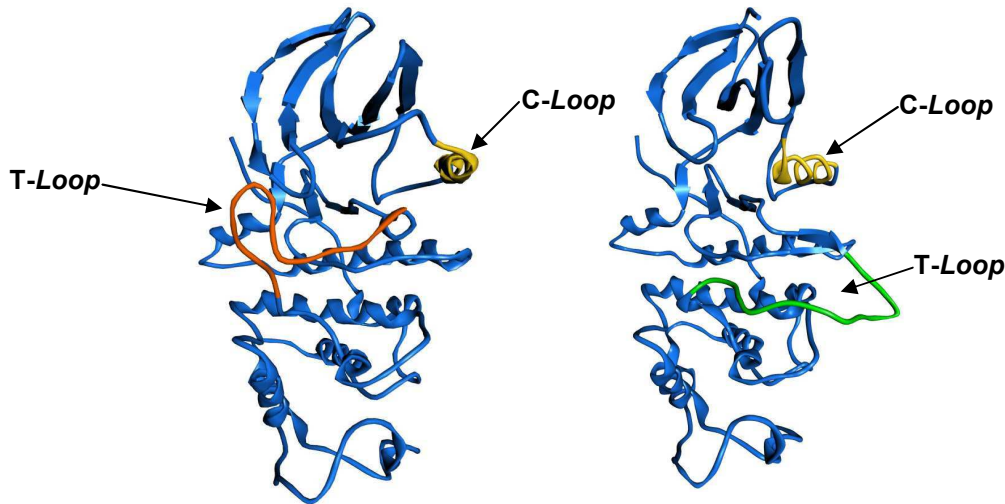


Abbildung 1.12: Vergleich der inaktiven und der aktiven CDK Struktur.

Deutlich zu erkennen ist die Bewegung des Aktivierungs-Loops (rot = inaktiv; grün = aktiv) sowie des C-Loops (gelb) mit dem PSTAIRE Motiv [ENGELS, 2010].

Nun kann die Phosphorylierung an dem Threonin-Rest der CDK durch die CAK stattfinden, was unerlässlich für die vollständige Aktivierung der CDK ist [JEFFREY *et al.*, 1995; RUSSO *et al.*, 1996; MORGAN, 1997]. Dieser Threonin-Rest ist hoch konserviert, da er eine entscheidende Rolle bei der vollständigen Aktivierung der CDKs spielt. Beispiele dafür sind T160 in HsCDK2, T161 in HsCDK1, T172 in HsCDK4, oder T177 in HsCDK6.

Als Beispiel für eine CAK in Säugetierzellen ist die CDK7 zu nennen, die ihrerseits einen Zyklin-Partner (Zyklin H) braucht, um aktiviert zu werden [LE ROCH *et al.*, 2000]. CAKs wurden in vielen Organismen gefunden. In höheren Eukaryonten bestehen CAKs aus einem Komplex von CDK7, ZyklinH und MAT1 [MORGAN, 1997].

1.5.1 Zyklin-unabhängige CDK-Aktivierung

Zusätzlich zu den Zyklinen kennt man weitere Proteine, die CDKs aktivieren können. Ein Beispiel hierfür ist ein Protein aus *Xenopus laevis* namens RINGO (*Rapid Inducer of G2/M progression in Oocytes*) oder auch *Speedy* genannt, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des meiotischen Zellzyklus in *Xenopus*-Oozyten spielt [FERBY *et al.*, 1999;

LENORMAND *et al.*, 1999]. RINGO zeigt auf Sequenzebene keine Homologie zu den Zyklinen, ist aber in der Lage, CDK1 sowie CDK2 vollständig zu aktivieren. Darüber hinaus findet diese Aktivierung unabhängig von einer zusätzlichen Phosphorylierung durch die CAK im T-Loop der CDK statt [DINARINA *et al.*, 2005; NEBREDA, 2006]. Eine schematische Darstellung des RINGO-Aktivierungsmechanismus von CDKs im Vergleich mit Zyklinen wird in Abbildung 1.13 gezeigt.

Alle RINGO-Homologen, die bisher identifiziert wurden, besitzen eine hochkonservierte Kernregion (RINGO-Kern), die eine α -helicale Struktur aufweist. Diese findet man auch bei Zyklinen in der Zyklin-Box. Zusätzlich enthält der RINGO-Kern einen Bereich, der in der CDK-Interaktion involviert ist. Dies könnte der Grund dafür sein, dass sowohl RINGO als auch Zyklone die CDKs aktivieren können, obwohl sie sich in ihrer Primärstruktur nicht ähneln [DINARINA *et al.*, 2005; NEBREDA, 2006].

Wenn der T-Loop der CDK nicht phosphoryliert wird, ist RINGO ein effizienterer Aktivator als ein Zyklin. Vermutlich imitiert darüber hinaus die Bindung von RINGO mindestens zum Teil die Konformationsänderungen, die zur Bewegung des aktivierenden T-Loops führen [DINARINA *et al.*, 2005].

Man kennt noch weitere aktivierende Proteine, die ähnlich wie RINGO, in ihrer Primärstruktur wenig Ähnlichkeit mit Zyklinen besitzen und dennoch CDKs aktivieren können. Ein Beispiel dafür wäre p35, eine regulatorische Untereinheit, die in der Lage ist, CDK5 (exprimiert in post-mitotischen Zellen des Zentralnervensystems und notwendig für neuronale Differenzierung) zu aktivieren. Basierend auf Strukturuntersuchungen erfolgt die Aktivierung von CDK5 durch p35 vermutlich über den gleichen Mechanismus wie bei RINGO [MORGAN, 1997; TSAI *et al.*, 1994; LE ROCH *et al.*, 2000].

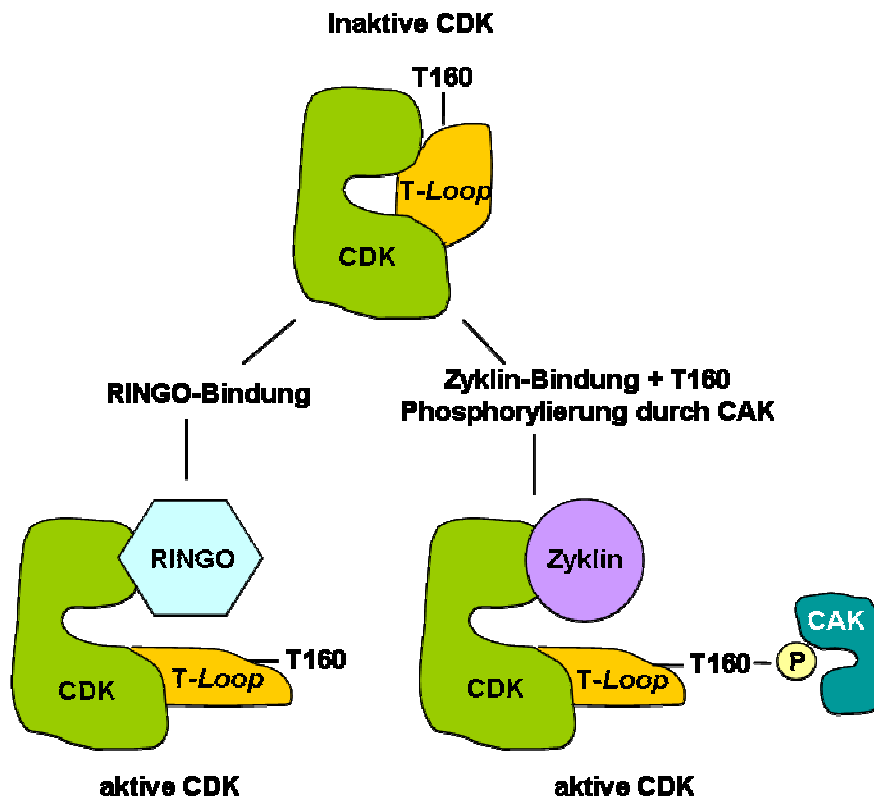


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der CDK-Aktivierung durch RINGO-Proteine und durch Zykline im Vergleich.

Die CDK-Aktivierung durch Zykline benötigt eine Phosphorylierung im Aktivierungsloop (T-Loop). Unabhängig von dieser Phosphorylierung stabilisiert die Bindung von RINGO-Proteinen die aktive Konformation der CDK [nach NEBREDA, 2006].

1.6 CDK-Inhibitoren

Die negative Regulation der CDKs kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erreicht werden. Diese sind die Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste der ATP-Bindetasche (z.B. T14-Y15 in HsCDK1) und die Hemmung durch spezifische Inhibitoren (Cip/Kip- und INK4-Familien und synthetische Inhibitoren) [MORGAN, 1997; MALUMBRES & BARBACID, 2001].

1.6.1 Synthetische Inhibitoren

Proteinkinasen sind in sehr vielen zellulären biochemischen Prozessen involviert. Eine Missregulation der Protein-Phosphorylierung kann Krankheiten, wie z.B. Krebs, proliferative Nierenerkrankungen und neurodegenerative Fehlsteuerungskrankheiten (Alzheimer oder Parkin-

son) hervorrufen [SMITH *et al.*, 2003; SCHANG, 2004; TSAI *et al.*, 2004; NELSON & SHANKLAND, 2006]. Deswegen beschäftigen sich 30-35% von den Wirkstofffindungsprogrammen der Pharmaindustrie mit der Forschung im Bereich der Proteinkinasen [FISCHER *et al.*, 2003]. Insbesondere sind die CDKs wegen ihrer essentiellen Funktion bei der Zellzyklusregulation, neuronalen Zellphysiologie, Schmerz-Signalisierung, Apoptose, Transkription und RNA-*Splicing* sehr interessant [BORGNE & GOLSTEYN, 2003; CRUZ & TSAI, 2004; GARRIGA & GRANA, 2004; LOYER *et al.*, 2005; BORGNE *et al.*, 2006; PAREEK *et al.*, 2006]. Aus diesem Grund wurden viele Forschungsprojekte mit dem Ziel durchgeführt, potente und selektive CDK-Inhibitoren, wie z.B. Flavopiridol oder Roscovitin (beide bereits in klinischen Studien gegen Krebs), zu finden [FISCHER *et al.*, 2003].

Bisher wurden zahlreiche strukturell diverse chemische Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität gegenüber CDKs identifiziert. Die meisten dieser Inhibitoren binden in der ATP-Tasche und hemmen über einen kompetitiven Mechanismus die Kinase-Aktivität. Sie unterscheiden sich allerdings deutlich hinsichtlich ihrer CDK-Spezifität. Es gibt *multiple*-Target-Inhibitoren (PAN-Inhibitoren), wie z.B. das Staurosporin, welches als Proteinkinase-C-Inhibitor entdeckt wurde und in der Lage ist, zahlreiche Proteinkinasen und CDK1-ähnliche Kinasen unspezifisch aber sehr stark zu hemmen. Die Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über bekannte chemische Inhibitoren der menschlichen CDKs. Andere Inhibitoren zeigen eine hohe Spezifität für bestimmte CDKs, wie die Butyrolaktone, die nur CDK1 und CDK2 hemmen. Ebenso kennt man Breitspektrum-CDK-Inhibitoren, wie z.B. das Flavopiridol (auch bekannt als Alvocidib). Dieses semisynthetische Flavon wurde als Antikrebs-Medikament entwickelt und 1996 in klinische Studien aufgenommen (zur Zeit in Phase II) [DAI & GRANT, 2003; HUGHES, 2006; NI *et al.*, 2010]. Flavopiridol hemmt zahlreiche CDKs (CDK1, 2, 4 und 6) bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Zusätzlich kann Flavopiridol die Transkription der CDKs blockieren und Apoptose der Krebszellen induzieren [MALUMBRES & BARBACID, 2001; DAI & GRANT, 2003; HUGHES, 2006].

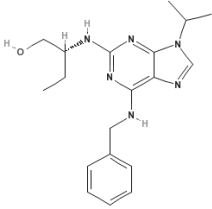
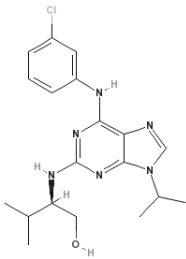
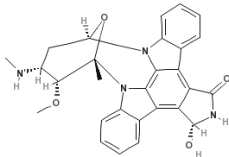
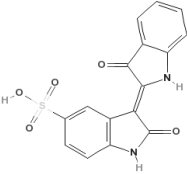
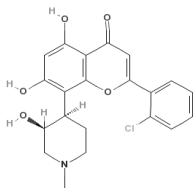
Zu den bekanntesten CDK-Inhibitoren gehört das Roscovitin (auch bekannt als CYC202 oder Seliciclib), das ein breites Wirkspektrum zeigt. Es wurde von Cyclacel Pharmaceuticals, Inc. entwickelt und hat die Phase II bei klinischen Studien gegen Krebs erreicht. Roscovitin wurde auch bei präklinischen Evaluierungen im Tiermodell gegen Alzheimer und Parkinson getestet [MCCLUE *et al.*, 2002; GUZI, 2004].

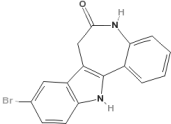
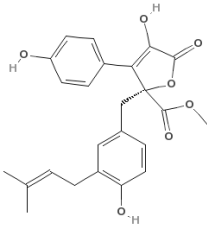
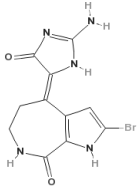
CDK-Inhibitoren können ebenfalls bei Virusinfektionen eingesetzt werden. Da der antivirale Effekt dieser Inhibitoren hierbei nicht direkt auf die Virusproteine wirkt, sondern auf Wirts-

proteine (z.B. CDKs), die essentiell für den Virus sind, können Mutationen in den Virus-Genen die Wirkung der Inhibitoren nicht beeinflussen und somit auch keine Resistenz ausbilden. Roscovitin und Flavopiridol wurden bereits im Mausmodell erfolgreich gegen HIV getestet und waren in der Lage, viele *wild-Typ* und *multidrug*-resistente HIV-Stämme zu hemmen [SCHANG, 2005].

Purvalanol A, Staurosporine, Indirubin-5'Sulfonat, Flavopiridol und 10-Hymenialdisin wurden im Rahmen dieser Arbeit als Standard-CDK-Inhibitoren getestet (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Beispiele von bekannten chemischen Inhibitoren für menschliche CDKs [nach MALUMBRES & BARBACID, 2001].

Chemische Struktur	Name	Familie	Spezifität
	Roscovitin	Purin	CDK1, CDK2, CDK5 >>CDK4
	Purvalanol A	Purin	CDK1, CDK2, CDK5
	UCN-01 (Staurosporin-Derivat)	Alkaloid	CDK1, CDK2, CDK4
	Indirubin-5-sulfonat	Indirubin	CDK1 > CDK5 > CDK2 >> CDK4
	Flavopiridol	Flavonoid	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6

Chemische Struktur	Name	Familie	Spezifität
	Kennpaullon	Paullon	CDK1>CDK2>>CDK4
	Butyrolakton I	Natürliches Produkt	CDK1>CDK2
	10-Hymenialdisin	Natürliches Produkt	CDK1, CDK5>CDK2>>CDK4

1.7 CDKs der *Apicomplexa* als Zielproteine für die Entwicklung von Antiparasitika

Das Verhalten der *Apicomplexa*-Parasiten ist während der Schizogonie (asexuelle Teilung der Parasiten in den Zellen) den Krebszellen sehr ähnlich. Beide teilen sich sehr schnell. Aus diesem Grund können auch Tumorthérapeutika gegen parasitische CDKs verwendet werden, um den parasitischen Zellzyklus zu inhibieren. Dies führt meistens zum Absterben der Parasiten, oder zumindest zur Unterbrechung der Infektion [NAULA *et al.*, 2006; CANDURI *et al.*, 2007]. Verschiedene CDKs, meistens auch *CDK-related kinases* (CRKs) genannt, wurden bereits in Parasiten identifiziert. Beispiele dafür sind in *Plasmodium falciparum* PfPK5, PfPK6, PfCRK1, PfCRK3-5 und PfMRK [DOERIG *et al.*, 2002; GUO & STILLER, 2004; WARD *et al.*, 2004]; in *Theileria annulata* TaCRK2 und TaCRK3 [KINNAIRD *et al.*, 1996; KINNAIRD *et al.*, 2001] und in *Toxoplasma gondii* TgCRK2 [KVAAL *et al.*, 2002]. In *Eimeria tenella* wurde die

EtCRK2 biochemisch charakterisiert [KINNAIRD *et al.*, 2004] und zusätzlich wurden vor kurzem drei neue CRKs: EtCRK1, EtCRK3 und EtMRK (Abbildung 1.14) [ENGELS *et al.*, 2010; ENGELS, 2010] und vier neue Zyklin-ähnliche Proteine: EtCYC1, EtCYC3a, EtCYC3b und EtCYC4 (Abbildung 1.15) [ENGELS, 2010; SUÁREZ FERNÁNDEZ *et al.*, bislang unveröffentlichte Daten] mittels *in silico* Sequenzvergleich identifiziert.

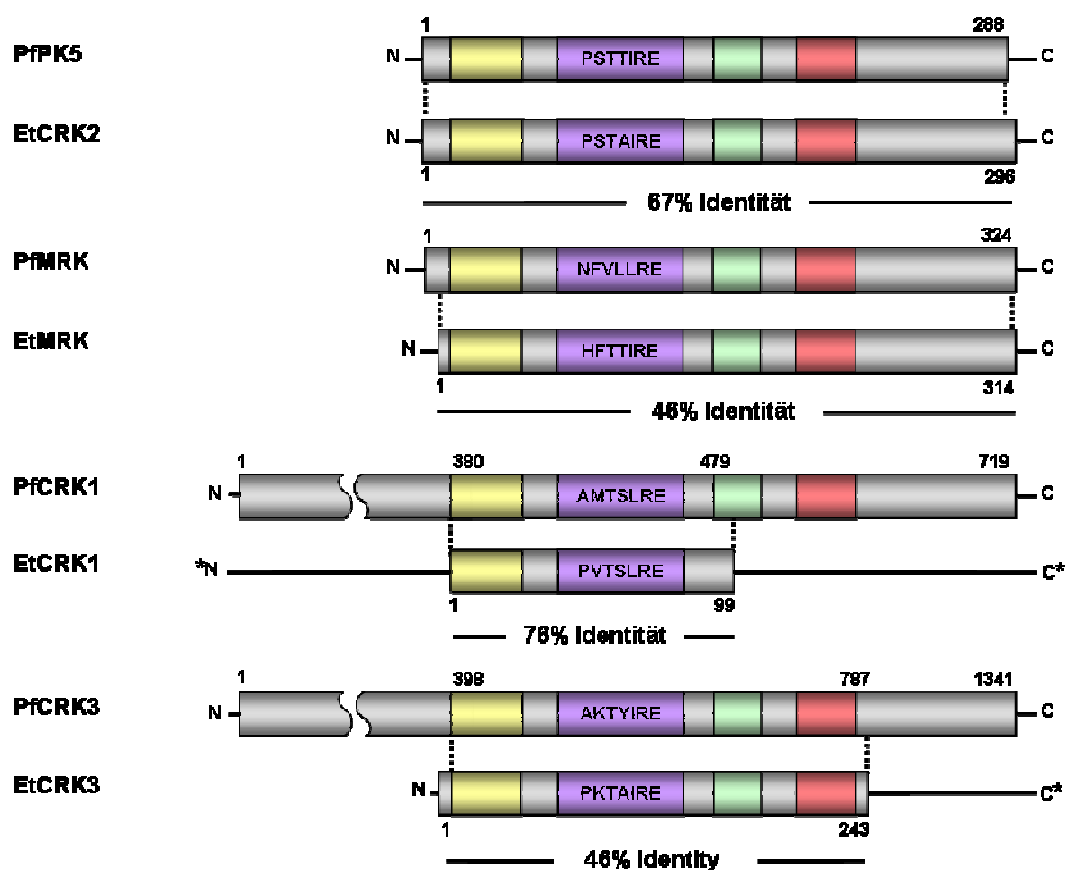


Abbildung 1.14: Sequenzvergleich zwischen CDK-ähnlichen Proteinen von *E. tenella* und *P. falciparum*.

Die Abbildung zeigt die drei vorhergesagte Proteinsequenzen: EtCRK1, EtCRK3, EtMRK und die bereits bekannte EtCRK2. Die CDK-ähnlichen Sequenzen sind jeweils als Paare zu den homologen Sequenzen in *P. falciparum* abgebildet. Die charakteristische Sequenzmotive sind: G-Loop (gelb), Hinge (grün), Aktivierungs-Loop (rot) und Zyklin-Bindemotiv. Dieses Motiv zeigt Variationen in den CDK-ähnlichen Proteinsequenzen (violett). Die unvollständigen Sequenzabschnitte sind mit einem „*“ markiert [ENGELS *et al.*, 2010; ENGELS, 2010].

A

```

EtCYC1 : ----- : -
EtCYC3a : -----MLEASRDCSHEANCRCSNCSCAAVAGGRGSPSRKPLFEVSAADASIVASVASLLQHLGMQNSSEGCCAPCFL : 72
EtCYC3b : -----GGTAEH : 7
EtCYC4 : MATQIVLVPRKLQQRTPSIVDGLTREVEISQRIYGCQLIQKAGILLKLEAVTVASAQTILHRFYRKSLLKFDVRSATAAA : 82

EtCYC1 : --TSPPRGPEGGPREEWPISSHYRCWLESAAVA-----AQQQEVHAAVGRLLALLDAAAAAPSFGELLLLQOYFA : 72
EtCYC3a : SATEPMISMEDYLERLARFFQCSGECFVLALVYID-----RLLQMNH-VMLCPNLNHLRLAVTALMVAVKEADDTFYSN : 145
EtCYC3b : GVCTPGLSVSAYLQRLRLRYFGCSNECFVLALIYID-----RLLQHSSSICLSPLNVHRIILAAVAVAAKFYDDVYYSN : 81
EtCYC4 : AAAAAAAAAAVQQQSLCRVRIASNSATFSLASSGDCSSRSACAFVCHKPMGFLLLLLLQLVATASLLACKLEEDPRRVK : 164

EtCYC1 : LQLLLVFORKGLSNSVLETSCFFHREFFAVSSLAADPR-----LALFACLLLALKATDNARHYTLG- : 134
EtCYC3a : AYYAKVGGPLPQEMNHLEATLLRMLHFRHLHVMPE-----FDKYFKLVLDSPFAATGRPRALGM : 204
EtCYC3b : KHYARVGGVRTPELNLLAQFLSLISPHLSVSPQE-----YNRVRTNVMAAAASASLQQHAI-- : 138
EtCYC4 : SLIDVWHILSKAEDTNKDITLENLDELLEDHSTVRCVCCCCCCCCCAVAAVLLLLLLPRLRDPVQLPDRRESSFAA : 246

EtCYC1 : ----- : -
EtCYC3a : NNNQHQSAAPEVGPNGDGNSSSDAPQLSCTSSSGEALQQQCVNTCCSESSSGSTGCCSGSSQSVSPCTPEASAATKS : 286
EtCYC3b : ----- : -
EtCYC4 : GLPTPAAAAAAAAAAAAAAAAAAGVRAGAVGDLPLRKVHLARARVYGFANPRAPPPHSAVHPRPLQGRHLPHQQALADRL : 328

EtCYC1 : -----DCCCCC----- : 141
EtCYC3a : PPMQREESANSSGGWCSTG-----QLVKRAADDVQSVFAVMCEVEGKDCIVRGPLDSDRSQVSSCGASEAAQF : 355
EtCYC3b : ----- : -
EtCYC4 : GVPQRQVRCCCCCCCCCGCGRVREGLVMVLVLLMGEVLLLVLLMGEVLLLLLRPCALLVELLLLCCCAAATSE : 410
    
```

B

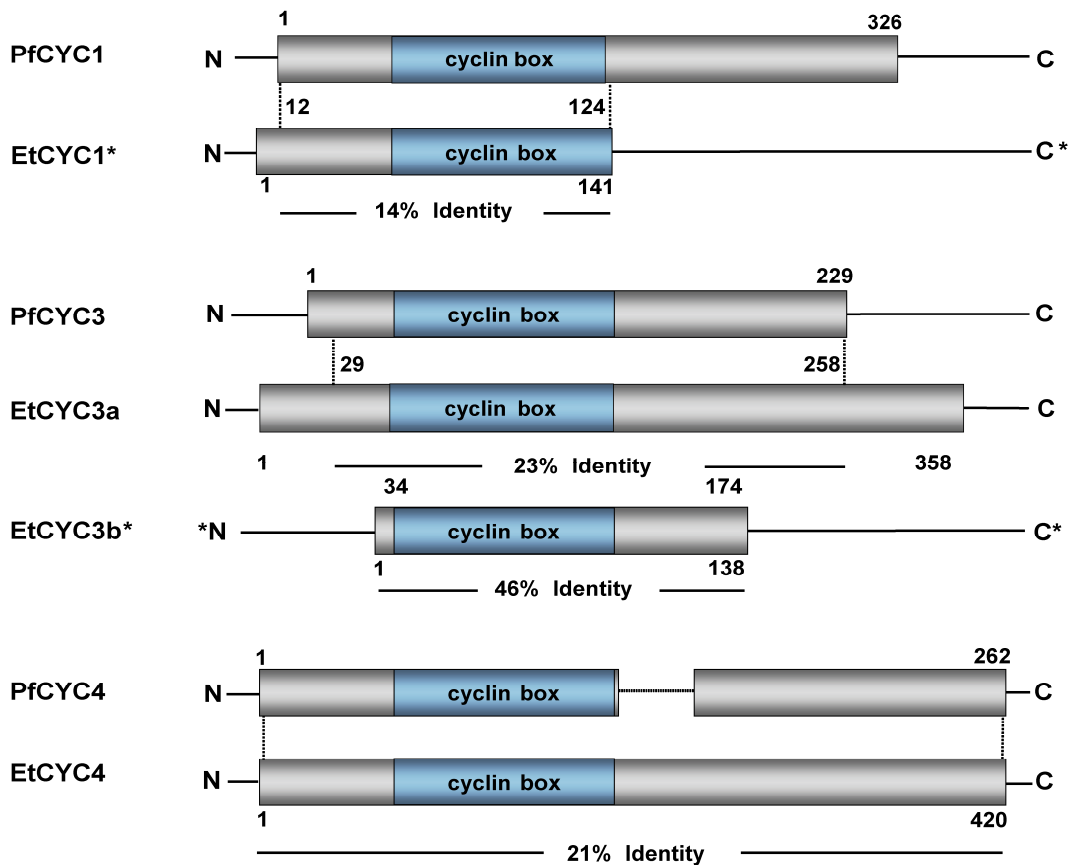


Abbildung 1.15: Sequenzalignment von Zylin-ähnlichen Proteinen von *E. tenella* und Sequenzvergleich zwischen Zyklinen von *E. tenella* und *P. falciparum*.

A) BLAST-Suchen ergaben vier Zyklin-ähnliche Sequenzen in *E. tenella*. Hier dargestellt sind die vorhergesagten Proteinsequenzen. Für die EtCYC1 und die EtCYC3b konnten jedoch nur unvollständige Sequenzen identifiziert werden. Blau unterlegte Aminosäuren sind in vier Sequenzen, gelb unterlegte Aminosäuren in drei Sequenzen sowie grau unterlegte Aminosäuren in zwei Sequenzen konserviert.

B) Die Abbildung zeigt die vier vorhergesagten Proteinsequenzen: EtCYC1, EtCYC3a, EtCYC3b und EtCYC4. Sie sind jeweils als Paare zu ihren homologen Sequenzen in *P. falciparum* dargestellt. Das charakteristische Zyklin-Motiv ist blau markiert. Für EtCYC1 und EtCYC3b (mit einem „*“ markiert) konnten nur unvollständige Proteinsequenzen identifiziert werden [ENGELS, 2010; SUÁREZ FERNÁNDEZ *et al.*, bislang unveröffentlichte Daten].

Viele CRKs wurden bereits als essentielle Proteine im parasitischen Lebenszyklus charakterisiert und darüber hinaus als Zielproteine ausgewählt, um neue Antiparasitika zu entwickeln [DOERIG *et al.*, 2002]. Beispiele dafür sind PfPK5 und PfMRK von *P. falciparum* [MERCKX *et al.*, 2003; PENG *et al.*, 2005]. Auch EtCRK2 wurde bereits mittels des bekannten CDK-Inhibitors Flavopiridol als Zielprotein chemisch validiert [ENGELS *et al.*, 2010].

1.7.1 EtCRK2: Struktur und Funktion im Lebenszyklus von *E. tenella*

EtCRK2 besitzt eine Sequenzidentität zur menschlichen CDK1 und CDK2 von 68%. Ferner zeigt sie die wichtigsten Struktur-Domänen der CDK1/CDK2 Protein-Unterfamilie: die ATP-Bindedomäne (G₁₁EGTYG₁₆), die Zyklin-Bindedomäne (P₄₄STAIRES₅₀), die *Hinge*-Region mit einem konservierten Motiv (₇₉FEFLHQD₈₅) und die Aktivierungsdomäne mit dem konservierten „Y₁₅₈THE₁₆₁“-Motiv, das durch CAK phosphoryliert wird (Nummerierung nach *E. tenella*) (Abbildung 1.16) [KINNAIRD *et al.*, 2004].

Wie auch bei vielen anderen apicomplexen CRKs ist das CAK-Bindemotiv („GDSEIDQ“ in menschlichen CDK1 und CDK2) sehr wenig konserviert. Interessanterweise ist das Dipeptid „₂₂₇WP₂₂₈“, (in menschlichen CDK1 und CDK2), das in allen anderen CRKs außer in denen von *T. gondii* konserviert ist, bei der EtCRK2 und den restlichen bisher in *E. tenella* identifizierten CRKs nicht vorhanden [KINNAIRD *et al.*, 2004].

```

E_tenella : MERYKKLDKIGEGTYGVVYKAQDT-NGNLCALKKIRLEAEDEGIPSTAIRES : 52
H_sapiens : MENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTEGVPSTAIRES : 53

E_tenella : LLKELHHPNIVRLMDVVHTDKRLTLVFEYLDQDLKEVLDDCRPSGLEPQVVKS : 105
H_sapiens : LLKELNHPNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQDLKFFMDASALTGIPLEPLIKS : 106

E_tenella : FLYQLLKGIAAYCHQHRVLHRDLKPNLLISRDTLKLADFGLARAFGIPVRAY : 158
H_sapiens : YLFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKPNLLINTEGAIKLADFGLARAFGVPVRTY : 159

E_tenella : *THEVVTLWYRAPDVLMSGNTYSTPVDIWSIGCIFAEMVNGRBLFPGANNEDQL : 211
H_sapiens : THEVVTLWYRAPEILLGSKYYSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPGDSEIDQL : 212

E_tenella : HRIFKLLGTPSPT--EGLAGLPQWRNNEFKYYPPMKWKYIVPGLSEAGLDLLSQ : 262
H_sapiens : FRIFRTLGTPEVVWPGVTSMPDYKPSFKMARQDFSKVVPELDEDGRSLLSQ : 265

E_tenella : MLTFEASRRISAKTAMQHSYFDDINPKPQGRSGH----- : 296
H_sapiens : MLHYDPNKRISAKAALAHFFFQDVTKVPHLRL----- : 298

```

Abbildung 1.16: Sequenzalignment zwischen EtCRK2 und HsCDK2.

Die Abbildung zeigt ein Sequenzalignment zwischen der CRK2 von *E. tenella* (GenBank Acc.-Nr. AAR91747.1) und der menschlichen CDK2 (GenBank Acc.-Nr. CAA43985.1) [TSAI *et al.*, 1991; KINNAIRD *et al.*, 2004]. Blau unterlegte Aminosäuren geben den höchsten Grad der Konservierung an und grau unterlegte Aminosäuren sind schwächer konserviert. Gelb unterlegte Aminosäuren markieren das ATP-Bindemotiv und violett unterlegte Aminosäuren markieren das PSTAIRE-Motiv der Zyklin-Bindedomäne. Grün eingefärbte Aminosäuren kennzeichnen das konservierte Motiv der *Hinge*-Region, wogegen rot unterlegte Aminosäuren das Aktivierungsmotiv markieren. Der gelb unterlegte rote Stern markiert die hoch konservierten Threonine (T159 in EtCRK2 und T160 in HsCDK2) des Aktivierungsmotives im T-Loop [ENGELS, 2010].

Die essentielle Funktion von EtCRK2 in *E. tenella* wurde durch die mRNA-Expression in allen sexuellen und asexuellen Stadien des Parasitenlebenszyklus nachgewiesen [KINNAIRD *et al.*, 2004].

Die Kinasefunktion von EtCRK2 wurde bereits in der Arbeitsgruppe von Jane H. Kinnaird mittels eines radioaktiven *in vitro* Kinase-Assays untersucht. Die EtCRK2 kann durch humanes Zyklin A aktiviert werden und ist in der Lage, die CDK-Substrate Histon H1 und Kasein in Anwesenheit von ATP zu phosphorylieren. Die durch Zyklin A aktivierte EtCRK2 ist ebenfalls in der Lage, das Retinoblastom-Protein (pRb) zu phosphorylieren [KINNAIRD *et al.*, 2004].

1.8 Kinase-Tests

Proteinkinasen katalysieren den Transfer des γ -Phosphats von ATP zu konservierten Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten. Um die Kinase-Aktivität experimentell zu bestimmen, wurden hauptsächlich Methoden verwendet, die auf einer Quantifizierung des Phosphattransfers über die Bestimmung des phosphorylierten Produkts oder auf der Änderung des ATP/ADP-Verhältnisses basierten. Für die Detektion wurde meist der Radioligand-Bindungs-Test (*radioisotope filtration binding assay*) verwendet. Als Radioligand wird radioaktiv markiertes γ -ATP verwendet. Die Kinase-Aktivität ist direkt proportional zu der Menge an phosphoryliertem Produkt [MA *et al.*, 2008]. Allerdings werden solche Testsysteme nicht konventionell bei der Hochdurchsatz-Testung (*high-throughput screening*: HTS) verwendet. Der Grund dafür sind die radioaktive Strahlung, die großen Mengen an radioaktivem Abfall und der experimentelle Aufwand [MA *et al.*, 2008].

Um Kinase-Inhibitoren im großen Maßstab testen zu können, wurden viele nicht-radioaktive Tests entwickelt, die meist Fluoreszenz als Detektions-Methode verwenden. Allerdings sind diese Tests empfindlich gegenüber Fluoreszenzinterferenz. Entsprechend müssen umfangreiche Hit-Konfirmierungstests (eine chemische Verbindung, die einen vorbestimmten Inhibitionswert trifft oder überschreitet wird als „Hit“ bezeichnet) durchgeführt werden, um die Hits zu validieren und so die Anzahl an falsch positiven Hits zu reduzieren [MA *et al.*, 2008]. Ein Beispiel für ein solches Testsystem ist der nicht-radioaktive TR-FRET (*time-resolved FÖRSTER/Fluorescence Resonance Energy Transfer*) [FÖRSTER, 1948], welcher im Rahmen dieser Arbeit für die Ermittlung der *in vitro*-Aktivierung der EtCRK2 Kinase-Aktivität und für die Inhibitionstests verwendet wurde.

1.8.1 Grundlagen des TR-FRET-Tests

Der FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) basiert auf dem Energietransfer zwischen zwei Farbstoff-Molekülen (Chromophore). Dabei wird die Energie eines angeregten Donorfarbstoffes nicht in Form eines Photons abgegeben, sondern strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen Akzeptorfarbstoff übertragen [FÖRSTER, 1948; STRYER, 1978; CLEGG, 2006]. Donor und Akzeptor sind meist Fluoreszenzfarbstoffe, weshalb oft der Begriff Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer als Synonym verwendet wird. Nur wenn sich diese Moleküle in räumlicher Nähe zueinander befinden (unter 10 nm), kann der Energietransfer von dem angeregten Donor zum Akzeptor stattfinden (Abbildung 1.17 A) [COMLEY, 2006; MINOR, 2006].

Ein erfolgreicher Energietransfer hängt hauptsächlich von der Distanz und Orientierung der beiden Chromophore bzw. Fluorophore (wenn es Fluoreszenzfarbstoffe sind) ab und es muss eine Überlappung des Donor-Emissionspektrums und des Akzeptor-Absorptionsspektrums vorliegen (Abbildung 1.17 B) [FÖRSTER, 1948; STRYER, 1978; CLEGG, 2006]. Die Effizienz des Energietransfers (E_{FRET}) kann Werte zwischen 0-1 annehmen und wird durch die folgende Formel beschrieben:

$$E_{\text{FRET}} = 1/[1 + (R/R_0)^6]$$

wobei R: Abstand zwischen den Fluorophoren und R_0 : FÖRSTER Radius.

Dieser Parameter beschreibt bei welcher Distanz sich die Fluoreszenz des Donors um 50% reduziert. Er ist abhängig von der Wahl des Fluorophors [FÖRSTER, 1948; STRYER, 1978; CLEGG, 2006].

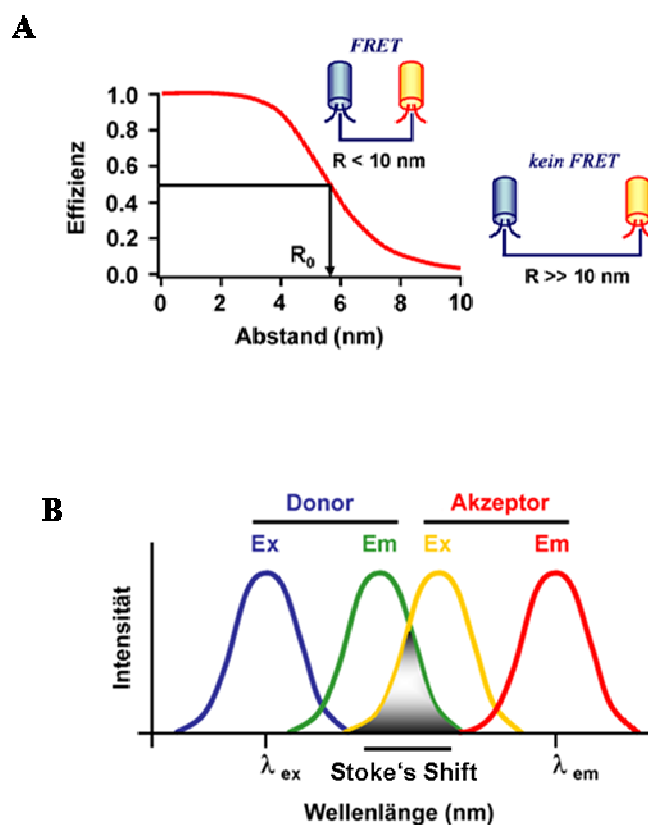


Abbildung 1.17: Die Abbildung zeigt schematisch die Voraussetzungen für einen FÖRSTER-Resonanzenergietransfer.

A) Der Abstand zwischen den Chromophoren muss unter 10 nm sein, damit der FRET stattfinden kann. B) Überlappung der Spektren von Donoremission und Akzeptorabsorption. Die Differenz zwischen Abstrahlungs- und Anregungswellenlängen wird als Stoke's-Differenz (Stoke's *Shift*) bezeichnet [nach MINOR, 2006].

Der zeitaufgelöste FRET (TR-FRET- *time resolved fluorescence resonance energy transfer*) kann eingesetzt werden wenn ein ausreichend stabiler Donor, z.B. langlebige seltene Lanthanoide wie z.B. Terbium oder Europium, zur Verfügung steht. Die sich bildenden Ionen haben eine extrem lange Fluoreszenzlebensdauer von 0,5-3 msec [COMLEY, 2006; MINOR, 2006]. Durch die zeitversetzte (*time resolved*) Messung wird das Hintergrundsignal der Messwerte minimiert, welches durch die Interferenz mit der natürlichen Fluoreszenz von einigen Assay-Komponenten verursacht wird. Dieses Hintergrundsignal ist im Vergleich zu der langlebigen Fluoreszenz der verwendeten Lanthanoide in der Regel kurzlebig [COMLEY, 2006; MINOR, 2006].

Das TR-FRET-Testsystem kann beispielsweise mit der IMAP™-Technologie [Molecular Devices, USA] kombiniert werden, um ein stabiles, antikörperunabhängiges und nicht-radioaktives Testsystem zu bilden [COMLEY, 2006; MINOR, 2006] (Abbildung 1.18). Die IMAP™-Technologie basiert auf der spezifischen, kovalenten und hochaffinen Bindung von Phosphatgruppen an Nanopartikel, die ein trivalentes Metall beinhalten (M^{III}) (Abbildung 1.18). Diese Nanopartikel bilden die IMAP™-Bindungseinheit. Diese Einheit ermöglicht eine räumliche Nähe zwischen langlebigen Lanthanoiden (z.B. Terbium (Tb)) und phosphorylierten Fluorescein-markierten Substraten, welche notwendig für den FRET ist (Abbildung 1.18) [COMLEY, 2006; MINOR, 2006]. Dieses Testsystem ist geeignet, um die Aktivität von Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen zu untersuchen.

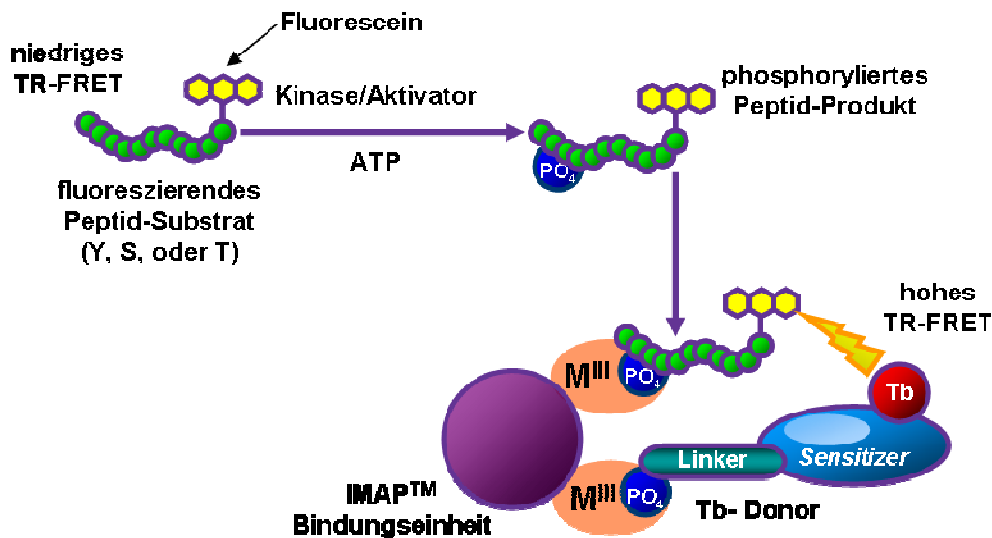


Abbildung 1.18: Schematische Darstellung des IMAP™ TR-FRET-Testsystems.

Nach Phosphorylierung durch eine Kinase werden sowohl das Fluorescein-markierte phosphorylierte Substrat als auch der Terbium-Donor („Tb-Donor“, ein Komplex aus Terbium, phosphoryliertem Linker und *Sensitizer*) durch gleichzeitige Bindung an der selben IMAP™-Einheit in enge räumliche Nähe gebracht. Die IMAP™-Einheit besitzt trivalente Ionen (dargestellt als M^{III}), die eine hohe Affinität für Phosphatgruppen zeigen. Aufgrund der langen Fluoreszenzlebensdauer des Terbiums kann der Energietransfer zwischen dem „Tb-Donor“ und dem Fluorescein des phosphorylierten Substrates zeitversetzt detektiert werden [COMLEY, 2006; MINOR, 2006].

Mit Hilfe des IMAP™-TR-FRET-Testsystems wurde die Kinase-Aktivität der EtCRK2 gemessen und wichtige Inhibitionsparameter zur Charakterisierung bekannter und neu identifizierter EtCRK2-Inhibitoren bestimmt.

1.9 Enzymkinetik

Enzyme sind Proteine die biochemische Reaktionen katalysieren. Für die Katalyse bilden Enzyme einen Komplex mit dem Substrat, was zu einer Senkung der benötigten Aktivierungsenergie der Reaktion führt [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003]. Darüber hinaus wird die Umwandlung von Substrat in Produkt beschleunigt (bis 10^{12} mal schneller als ohne Enzym) [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001]. Enzyme nehmen keinen Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht und gehen unverändert aus der Katalyse hervor [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003]. Die Interaktion mit dem Substrat findet über ihr hochspezifisches aktives Zentrum statt. Bei Bindung des Substrates wird die Konformation des aktiven Zentrums verändert und ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet. Dabei passt sich die Geometrie des aktiven Zentrums des Enzyms dem Substrat an (*induced fit*) [KOSHLAND, 1958, NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003].

Die Enzymkinetik beschreibt den Verlauf von enzymkatalysierten Reaktionen, welcher von der Temperatur, Salzkonzentration, pH-Wert, Enzym-, Substrat- und Produktkonzentration und auch von der Anwesenheit von Aktivatoren oder Inhibitoren abhängig ist [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001]. Um die Reaktionskinetik zu definieren, wurden Modelle und Theorien entwickelt, die auf mathematischen Gleichungen basieren, die den Zusammenhang von Enzym-, Substrat- und Produktkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit beschreiben. Das bekannteste und meist verwendete Reaktionskinetik-Modell ist das von Michaelis-Menten (Gleichung 1.1) [MICHAELIS & MENTEN, 1913; NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003].

$$v = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

Gleichung 1.1: Michaelis-Menten Gleichung.

„ v “ ist die Reaktionsgeschwindigkeit, $[S_0]$ ist die Anfangssubstratkonzentration, „ V_{\max} “ ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_m ist die Michaelis-Menten Konstante [nach MICHAELIS & MENTEN, 1913].

Die Michaelis-Menten Gleichung (auch MM-Gleichung genannt) erklärt den Zusammenhang zwischen der Substratkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Michaeliskonstante K_m ist die Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) erreicht wird, also wo $v = V_{max}/2$. Diese Konstante ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Je kleiner der K_m -Wert ist, desto größer ist die Enzymaffinität für das Substrat [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003]. Die Anfangsgeschwindigkeit einer Reaktion ist linear proportional zur Substratkonzentration bei $[S] < K_m$. Wenn allerdings $[S] > K_m$ ist, wird das Enzym schnell die Sättigung erreichen und die Anfangsgeschwindigkeit gleich V_{max} sein (Gleichung 1.1) [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003].

1.9.1 Linearisierungen der Michaelis-Menten Gleichung

Um die wichtigen kinetischen Parameter V_{max} und K_m für ein Enzym graphisch zu bestimmen, gibt es verschiedene Auftragungen wie z.B. die direkte lineare graphische Darstellung von Eisenthal & Cornish-Bowden [EISENTHAL & CORNISH-BOWDEN, 1974]. Über die Jahre wurden verschiedene Linearisierungsmethoden der MM-Gleichung entwickelt, welche die graphische Bestimmung der Parameter K_m und V_{max} erlaubten. Die bekanntesten und meist verwendeten Linearisierungsmethoden sind die folgenden: Lineweaver-Burk- (auch „doppelt-reziproke Auftragung“ genannt), Eadie-Hofstee-, Hanes-Woolf-, Scatchard- und Hill-Auftragung [LINEWEAVER & BURK, 1934; EADIE, 1942; HOFSTEE, 1959; WILKINSON, 1961; ATKINS & NIMMO, 1975; NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BISSWANGER, 2008].

1.9.2 Enzymatische Inhibition

Die Enzymaktivität kann u.a. durch Aktivatoren oder Inhibitoren reguliert werden (siehe Abschnitt 1.4.1). Als enzymatische Inhibition wird die Hemmung der Aktivität eines Enzyms durch die Bindung eines Liganden (Inhibitor) bezeichnet. Es gibt verschiedene Inhibitionstypen: Je nachdem, ob der Inhibitor kovalent oder nicht-kovalent an dem Enzym bzw. an den Enzym-Substratkomplex bindet, unterscheidet man zwischen einer irreversiblen oder reversiblen Hemmung [NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; BERG *et al.*, 2003]. Bei reversiblen Inhibitoren unterscheidet man drei Hemm-Mechanismen, je nachdem, ob sie mit dem Substrat um eine Bindungsstelle konkurrieren bzw. wo die Bindung stattfindet und bezeichnet diese als kompetitive Inhibitoren (konkurrieren mit dem Substrat), unkompetitive Inhibitoren (konkurrieren

nicht mit dem Substrat und binden an dem Enzymsubstrat-Komplex) und nicht-kompetitive Inhibitoren (konkurrieren nicht mit dem Substrat und können sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substratkomplex binden). Die unterschiedlichen Hemm-Mechanismen werden aus der linearisierten Auftragung der MM-Gleichung ermittelt [SZEDLACSEK *et al.*, 1990; NÚÑEZ DE CASTRO, 2001; MARANGONI, 2002; BISSWANGER, 2008].

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen enzymatischen Parametern wurde für die enzymatische Inhibition die Inhibitionskonstante bzw. Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (K_i) definiert. Es ist eine spezifische Konstante für einen Inhibitor, die seine Affinität zum entsprechenden Enzym beschreibt. Je kleiner der K_i -Wert ist, desto größer ist die Affinität des Inhibitors für das Enzym. Der K_i -Wert wird zusammen mit den Parameter K_m und V_{max} aus der linearisierten Auftragung der MM-Gleichung ermittelt. Die Inhibitionskonstante ist, anders als z.B. der IC_{50} -Wert (InhibitorKonzentration, bei der das Enzym zu 50% gehemmt ist), eine von Versuchsbedingungen unabhängige Konstante [MARANGONI, 2002; BJORNSSON *et al.*, 2003; BISSWANGER, 2008; OGILVIE *et al.*, 2008]. Bei Routine-Testsystemen wird meist der IC_{50} -Wert für die Charakterisierung der Inhibitoren bestimmt, da IC_{50} -Werte einen geringeren experimentellen Aufwand benötigen.

1.10 Aufgabenstellung

In den letzten Jahrzehnten hat die Molekularbiologie enorme Fortschritte in der parasitologischen Wirkstoffforschung ermöglicht. Durch die Klonierung geeigneter parasitärer Zielproteine, wie z.B. der Zyklin-abhängigen Kinase von *Eimeria tenella*, konnten Testsysteme etabliert werden, welche die Identifizierung von Wirkstoffen vereinfachten. Mit Hilfe des bekannten Kinase-Inhibitors Flavopiridol konnte gezeigt werden, dass CDK-Inhibitoren in der Lage sind, die Schizonten-Reifung von *E. tenella* zu hemmen [ENGELS *et al.*, 2010]. Wie bei allen CDKs ist die Aktivität von EtCRK2 abhängig von der Bindung eines Aktivators, der zur Zyklin-Proteinfamilie gehört. Die Aktivierung der EtCRK2 durch ein Zyklin ist essentiell für die Bestimmung ihrer Aktivität bzw. Inhibition *in vitro*. Bioinformatisch wurden bislang die vier Zykline, EtCYC1, EtCYC3a, EtCYC3b und EtCYC4 im *E. tenella* Genom identifiziert [ENGELS, 2010].

Das Ziel dieser Arbeit war es Kinase und Aktivatoren des Parasiten *E. tenella* als Zielproteine für die Wirkstoffentwicklung zu untersuchen und zu testen. Dann sollte der potentielle EtCRK2-Aktivator (XIRINGO) aus *Xenopus laevis* untersucht werden. Hierzu musste ein

nicht-radioaktiver TR-FRET *in vitro* Test für die EtCRK2 etabliert werden. Darüber hinaus sollte das *in silico* identifizierte *E. tenella*-Zyclin EtCYC3a biochemisch charakterisiert werden. Dies beinhaltet die Klonierung, Expression, Reinigung und *in vitro* Testung des genannten Zyklins als Aktivator der EtCRK2.

Weiterhin sollten potentielle Inhibitoren für die EtCRK2 in Hochdurchsatz-Reihenuntersuchungen (HTS) identifiziert werden. Als Pool für Testverbindungen sollte eine Substanzbibliothek dienen, die sich aus Verbindungen von kommerziellen Anbietern zusammensetzt. Dieser Substanz-Pool sollte mit dem TR-FRET Testsystem auf die EtCRK2 im Komplex mit dem neu klonierten Aktivator getestet werden. Die Ergebnisse dieser Tests sollten als Grundlage für die Definition von Leitstrukturen für die weitere Optimierung von EtCRK2 Inhibitoren als Coccidiostatika dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Parasiten

Als Parasitenquelle wurde der *E. tenella* Stamm „Houghton“ (Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim) verwendet. Die Eimerien lagen als $9,6 \cdot 10^5$ sporulierte Oozysten pro Milliliter in 4% Kaliumdichromat-Lösung vor.

2.1.2 Geräte

Folgende Geräte und Materialien wurden von den angegebenen Quellen bezogen und in den beschriebenen Experimenten verwendet:

- Absaugsystem: Vacusafe comfort von Integra Biosciences (Chur, Schweiz)
- ÄKTA FPLCTM System: GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden)
- Brutschrank: INB 200 von Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
- Elektroporationsapparatur: Gene Pulser II, Capacitance Extender Plus und Pulse Controller Plus von Bio-Rad (CA, USA)
- *French Press*: „ICE French Laboratory Press“ von ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
- Gelelektrophoreseapparatur: Power Pac 300 von Bio-Rad (CA, USA) und ComPhor Gelelektrophorese-System Mini und Midi von BIOzym (Oldendorf, Deutschland)
- Geldokumentationsapparatur: Image Documentation & Analysis von

- Raytest (Straubenhardt, Deutschland), Drucker P91 von Mitsubishi Electric (Tokyo, Japan) und Monitor von Hitachi (Tokyo, Japan)
- Metallblockthermostate: Liebisch Labortechnik (Bielefeld, Deutschland)
- Mikroskop: CK2 von Olympus (Tokyo, Japan)
- Mikrowelle: Micromat von Bosch (Gerlingen, Deutschland)
- Magnetrührer: KMO 2 Basic IKAMAG[®] von IKA[®] Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
- Mini-Vortex: MS-1 Vortex Mixer von IKA[®] Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
- Multipipette: Biohit (Helsinki, Finnland)
- pH-Meter: Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
- Photometer: Wallac Victor 2 *multilabel counter* 1420 von Perkin Elmer (Waltham, USA) und TECAN Spectra Fluor Plus von MTX Lab Systems (Virginia, USA)
- Pipetten: Gilson (Middleton, USA)
- Precellys[®]24 Homogenizer: PEQLAB Biotechnology GmbH (Erlangen, Deutschland)
- Protein-Elektrophorese Cell ratur: NuPAGE[®] -Xcell *SureLoc* von Invitrogen Apparatur: (Carlsbad, USA)
- Schüttel-Inkubator für Bakterienkulturen: Console E25 von New Brunswick Scientific GmbH (Edison, USA)

- Sterilbank: HERAsafe von Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
- Thermocycler: PTC-200 und 225 Peltier Thermal Cycler von MJ Research (Waltham, USA)
- Thermomixer: Thermomixer Comfort von Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- UV-Transilluminator: INTAS (Göttingen, Deutschland)
- Vakuumpumpe: ASF Thomas (Memmingen, Deutschland)
- Waage: EL6000 von Mettler Toledo (Zürich, Schweiz)
- Zentrifuge: High-Speed Kühlzentrifuge Avanti J-25, High-Speed Tisch-Kühlzentrifuge Allegra 64R und Microfuge 18 von Beckmann Coulter (Brea, USA); Tischzentrifuge 5415R von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Labofuge 400 von ThermoScientific Heraeus (Waltham, USA)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Folgendes Verbrauchsmaterial wurde in den beschriebenen Experimenten verwendet:

- Amylose Resin-Säulenmaterial: New England Biolabs (Ipswich, USA)
- durchsichtige 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte: Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
- schwarze 384-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte: Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
- Borosilikatglassperlen (Durchmesser: 1mm): Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

- Hiloal 16/60 Superdex 75 Säule: GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden)
- Hiloal 26/60 Superdex 200 Säule: GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden)
- Kryoröhrchen zum Einfrieren von Zellen: Cryogenic Vial 2 ml Corning (New York, USA)
- Ni-NTA (Nitrilotriessigsäure)-Agarose-Säulenmaterial: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Pasteur-Pipetten (Glas): VWR (West Chester, USA)
- Petrischalen für Bakterien: Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
- Pipettenspitzen: Gilson (Middleton, USA)
- NuPAGE® Novex Bis-Tris Pre-Cast Gels (Gradient: 4-12%): Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Reaktionsgefäße: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Reservoirschalen für Multipipette: Matrix (Hudson, USA)
- Serologische Pipetten: Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Thermo Tube (0,2 ml) für PCR: Abgene (Epsom Surrey, UK)
- Vivaspin 20 *centrifugal concentrator* 15 und 50 ml (Partikelgröße: 30.000 Da): Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.4 Chemikalien

Alle verwendeten biochemischen Standardchemikalien (ATP, Agarose, DMSO, Imidazol, IPTG, Maltose) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen und hatten einen Reinheitsgrad von mindestens 90 %.

- *BCA- Protein AssayKit*: Pierce-ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
- dNTP-Lösung (10 mM): New England BioLabs (Ipswich, USA) und Roche (Basel, Schweiz)
- Formaldehyd (36,5-38 % Formalin): Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- *Hank's Balance Salt Solution* (HBBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}): PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
- Kaliumdichromat (0,0167 mol/l): ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
- Natriumhypochlorid (6-14 % aktives Chlor): Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)
- Ungefärbter Protein Standard (10-200 kDa): Fermentas-ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
- NuPAGE® MOPS SDS *Running Buffer* (20-fach konzentriert): Invitrogen (Carlsbad, USA)
- NuPAGE® Sample *Reducing Agent* (10-fach konzentriert): Invitrogen (Carlsbad, USA)
- NuPAGE® *Antioxidant*: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- *PageBlue™ Protein Staining Solution*: Fermentas-ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)

- TAE/TBE-Puffer (10-fach konzentriert): Applichem (Darmstadt, Deutschland)
- TRI Reagent®: Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.5 Kompetente Bakterienstämme, Enzyme, Enzymsets, Peptide und *Primer*

Enzyme, Enzymsets, Peptide und *Primer* wurden von den angeführten Quellen bezogen. Folgende *Escherichia coli*-Bakterienstämme wurden für Transformationen von Ligationsansätzen und zur Proteinexpression verwendet.

- *One Shot*® TOP10 *E. coli*: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- *E. coli* BL21 (DE3): Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Alkalische Phosphatase (CIP); E.C. Nummer: 3.1.3.1: Roche (Basel, Schweiz)
- Benzonase® Nuklease; E.C. Nummer: 3.1.30.2: Novagen-Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Deoxyribonuklease I *Amplification Grade*; E.C. Nummer: 3.1.21.1: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- pMALc2X Expressionsvektor: New England BioLabs (Ipswich, USA)
- FAM-markiertes Histon-H1-Peptidderivat (5FAM-GGGPATPKKA-KKL-COOH) als fluoreszierendes Substrat: Molecular Devices, MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, USA)
- HsCDK2/CYCA (menschliche Zyklin-abhängige Kinase 2/ menschliches Zyklin A); E.C. Nummer: 2.7.1.112: Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA)

- *IMAP™ TR-FRET Screening Express Kit:* Molecular Devices, MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, USA)
- *QIAquick Gel Extraction Kit:* Qiagen (Hilden, Deutschland)
- *Molekulargewicht-Standard-Kit (29-700 kDa):* Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- *Oligonukleotide (Primer):* Scientific Research and Development (SRD) (Oberursel, Deutschland)
- *OneStep RT-PCR-Kit:* Qiagen (Hilden, Deutschland)
- *PCR-Purification Kit:* Qiagen (Hilden, Deutschland)
- *Platinum Taq-Polymerase High Fidelity; E.C. Nummer: 2.7.7.7:* Invitrogen (Carlsbad, USA)
- *Plasmid-Mini/Midi/Maxiprep-Kit:* Qiagen (Hilden, Deutschland)
- *BamHI und Hind III Restriktionsendonukleasen; E.C. Nummer: 3.1.21.4:* New England BioLabs (Beverly, USA) (Restriktion-Roche (Basel, Schweiz))
- *Rinderserumalbumin (BSA) (10 mg/ml); E.C. Nummer: 6.1.1.16:* Pierce-Thermo Scientific (Waltham, USA)
- *RNAseOUT™ (RNA-Inhibitor); E.C. Nummer: 3.1.27.5:* Invitrogen (Carlsbad, USA)
- *RNeasy-Micro/Mini-Kit:* Qiagen (Hilden, Deutschland)
- *Super Script™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit:* Invitrogen (Carlsbad, USA)
- *T4-DNA-Ligase; E.C. Nummer: 6.5.1.1:* New England BioLabs (Ipswich, USA)

2.1.6 Vektoren

Die folgenden Vektoren wurden für Transformationen von Ligationsansätzen und zur Proteinexpression verwendet. Die beiden Expressionsvektoren pQE60-Etcrk2 [KINNAIRD *et al.*, 2004] und pMALc2x-Xlringo [FERBY *et al.*, 1999] wurden jeweils freundlicherweise von Frau Dr. Jane H. Kinnaird (University of Glasgow, UK) und von Dr. Ario de Marco (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Abbildungen 2.1 und 2.2).

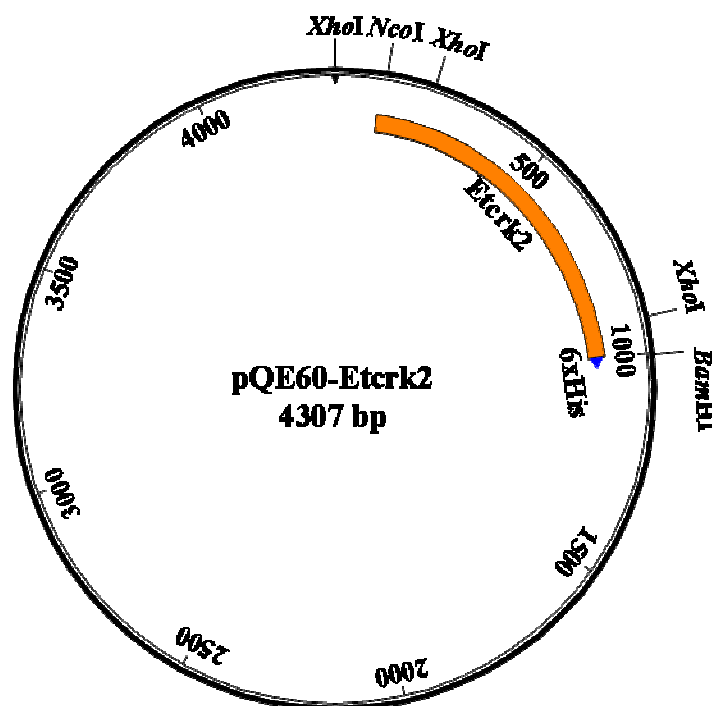


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des pQE60-Vektors mit Etcrk2.

Etcrk2-Gen ist zwischen *NcoI* und *BamHI* innerhalb des Polylinkers vom pQE60-Vektor kloniert. Der His-Tag ist an das C-terminale Ende des EtCRK2-Proteins angefügt.

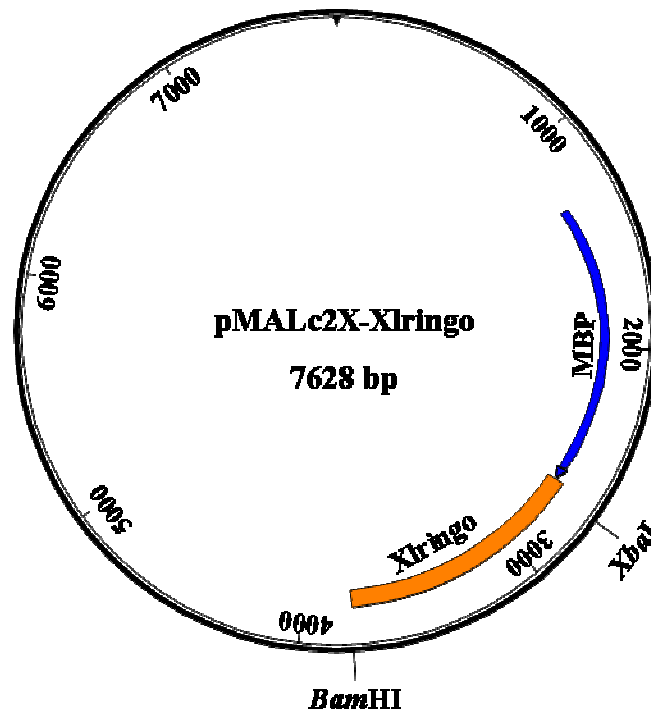


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des pMALc2X-Vektors mit Xlringo.

Xlringo ist zwischen *Bam*HI und *Xba*I innerhalb des Polylinkers vom pMALc2X-Vektor kloniert. Der Maltose-Bindungsprotein (MBP)-Tag ist am N-terminalen Ende des XIRINGO-Proteins gebunden.

2.1.7 Puffer, Medien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Gewicht pro Volumeneinheit. Bei Lösungen, die als vielfach konzentrierte Stammlösung angesetzt wurden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben.

- 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen (Carlsbad, USA):

20 µl DNA
40 µl Auftragspuffer für DNA
140 µl TBE

- Agarose-Gele:

0,5 g Agarose
50 ml TBE Puffer
2 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)

- Auftragspuffer für DNA (5-fach konzentriert), pH 8,3:

 - 50 % Glycerin
 - 10 mM EDTA
 - 0,445 mM Tris
 - 0,1 % Bromphenolblau
 - 0,1 % Xylencyanol

- Auftragspuffer für RNA-Proben, pH 8,0:

 - 50 % Glycerin
 - 1 mM EDTA
 - 0,25 % Bromphenolblau
 - 0,25 % Xylencyanol
 - Ca²⁺- freier Puffer bestehend aus:
 - 96 mM NaCl
 - 2 mM KCl
 - 1 mM MgCl₂
 - 5 mM Hepes

- dNTP-Lösung:

 - 2 mM dATP
 - 2 mM dCTP
 - 2 mM dGTP
 - 2 mM dTTP

- Gelfiltrationspuffer, pH 7,4:

 - 10 mM Tris-HCl
 - 100 mM NaCl

- IMAP™ Reaktionspuffer, pH 7,2:

 - 10 mM Tris-HCl
 - 10 mM MgCl₂
 - 0,05 % NaN₃
 - 0,1 % phosphatfreies BSA

- Formaldehyd-Agarose-Gele:

 - 1,2 g Agarose
 - 10 ml Formaldehyd-Gel Puffer (10-fach konzentriert)
 - ad 100 ml RNase-freies Wasser
 - 1,8 ml Formaldehyd (12,3 M)

- Lambda-DNA/*Hind*III-Marker von Fermentas, ThermoFisher Scientific (Waltham, USA):

 - 100 µl DNA
 - 300 µl TBE
 - 100 µl Auftragspuffer

- *Lysogeny Broth* (LB)-Agar: 10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar-Agar
ad 1000 ml Wasser
- LB-Medium, pH 7,0: 20 g Tryptone
10 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 2000 ml Wasser
- Puffer für EtCRK2 Affinitätschromatographie (EtCRK2- Start-Puffer), pH 7,4: 50 mM Phosphatpuffer
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
- Puffer für EtCRK2 Affinitätschromatographie (EtCRK2-Elutionspuffer), pH 7,4: 50 mM Phosphatpuffer
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
- Puffer für Formaldehyd-Agarose-Gele (10-fach konzentriert), pH 7,0: 50 mM Na-Acetat
10 mM EDTA
0,1 % DEPC
- Puffer für RNA-Proben, pH 7,0: 500 µl Formamid
100 µl 10-fach konzentrierter Puffer für Formaldehyd-Agarose Gele
150 µl Formaldehyd
- Puffer für XIRINGO Affinitätschromatographie (XIRINGO-Start-Puffer), pH 7,4: 50 mM Phosphatpuffer
50 mM NaCl
- Puffer für XIRINGO Affinitätschromatographie (XIRINGO-Elutionspuffer), pH 7,4: 50 mM Phosphatpuffer
50 mM NaCl
10 mM Maltose
- RNase-freies Wasser: 0,1 ml DEPC
ad 100 ml Wasser bzw. Lsg.

- TAE-Puffer (10-fach konzentriert), pH 8,5: 400 mM Tris-Base
200 mM EDTA
20 mM Essigsäure
- TBE-Puffer (10-fach konzentriert), pH 8,3: 890 mM Tris-Base
890 mM Borsäure
200 mM EDTA
- TE-Puffer, pH 8,0: 10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA

2.1.8 Chemische Verbindungen

Alle chemischen Verbindungen wurden als 10 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt.

- Flavopiridol-hydrochlorid-hydrat; Reinheit ≥ 98 % Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Indirubin-5-sulfonat; Reinheit ≥ 98 % Biomol International LP (Exeter, UK)
- 10-Z-Hymenialdisin; Reinheit ≥ 95 % Axxora, LLC (San Diego, USA)
- Purvalanol A; Reinheit ≥ 95 % Axxora, LLC (San Diego, USA)
- Staurosporin; Reinheit ≥ 98 % Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Alsterpaullon; Reinheit ≥ 95 % Axxora, LLC (San Diego, CA)
- BES124764: 1-Phenylsulfanyl-3-[4-[[4-(trifluormethyl)pyrimidin-2-yl]amino]-1-piperidyl]propan-2-ol; Reinheit ≥ 85 % Maybridge (Cornwall, UK)

- BES312351: 7-Amino-8-hydroxy- chinolin-5-sulfonsäure Hydrat; Reinheit ≥ 95 % Bridge Chem PVT. (Mumbai, India)
- BES130131: 2,3-Dichlor-5,8-dihydroxy-6-methyl-naphthalin-1,4-dion; Reinheit ≥ 95 % InterBioScreen (Chernogolovka, Russia)
- BES143551: N,N-Diethyl-2-oxo-1,2-dihydrobenzo[cd]indol-6-sulfonamid; Reinheit ≥ 90 % SPECS (Berlin)
- BES062021: 2-[(3Z)-2-Oxo-3-(4-oxo-2-thioxo-thiazolidin-5-yliden)indolin-1-yl]essigsäure; Reinheit ≥ 95 % Synex Pharma Technologies, (Shanghai, China)
- BES241415: 3-(4-Cyan-3-methyl-1-oxo-5H-pyrido[1,2-a]benzimidazol-2-yl)propansäure; Reinheit ≥ 90 % InterBioScreen (Chernogolovka, Russia)
- BES252034: 2-[(5-Nitro-1H-benzimidazol-2-yl)imino]imidazolidin-4,5-dion; Reinheit ≥ 90 % Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von *E. tenella* Sporozysten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sporulierten Oozysten gehören zum *E. tenella* Stamm „Houghton“ (Intervet Innovation, Schwabenheim). Die Sporozysten wurden aus den sporulierten Oozysten nach folgender Methode isoliert [HOFMANN & RAETHER, 1990]: 200 ml der Oozysten in 4% Kaliumdichromat-Lösung wurden mit 2500 g bei 6°C für 3 min zentrifugiert, in 100 ml Natriumhypochlorit resuspendiert und in dieser Lösung für nicht länger als 10 min durchmischt, bis eine Deformierung der parasitischen Zellmembran zu erkennen war

(dies wurde mikroskopisch kontrolliert). Nach Zentrifugation (2500 g für 3 min bei 6°C), wurden die Oozysten im Überstand mittels einer Vakuum-Pumpe abgesaugt, in Wasser verdünnt und wieder zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mehrmals wiederholt, um die Chloridreste von den Oozysten zu entfernen. Die Oozysten wurden in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) suspendiert und mit Glassperlen (Durchmesser: 1mm) versetzt. Der Aufbruch erfolgte mittels kräftigen Schüttelns (Vortex) der Suspension, bis ein Aufschluß von mindestens 80% der Oozysten mikroskopisch detektiert werden konnte. Die Glassperlen wurden mehrmals mit HBSS-Puffer gewaschen und das Sporozysten-Pellet nach der letzten Zentrifugation in HBSS-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

2.2.2 RNA-Isolierung

Die isolierten Sporozysten in HBSS-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.1) wurden als Aliquots in 2 ml Eppendorf-*Tubes* bei 13.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt, 1 ml TRI Reagent® pro 100 mg Sporozystenpellet zugegeben und kurz auf Eis gelagert. Die Proben wurden unverzüglich mittels „Precellys®24 Homogenizer“ nach Herstellerangaben homogenisiert und der Aufschluss der Sporozysten und Sporozoiten mikroskopisch verifiziert. Die gesamte RNA der Sporozoiten wurde mittels TRI Reagent® nach Herstellerangaben [CHOMCZYNSKI, 1993] isoliert. Die Konzentration der RNA nach der Isolierung wurde mittels Spektrophotometer gemessen. Das Verhältnis zwischen der Absorption bei 260 und 280nm ($A_{260/280}$) wurde verwendet um die Reinheit der RNA zu ermitteln. Für reine RNA ist $A_{260/280} \sim 2$ [SAMBROOK & RUSSELL, 2000]. Anschließend wurden 20 µg der gesamten RNA unverzüglich für Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCRs) verwendet. Parallel dazu wurden 2 µl zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Die restliche RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3 Formaldehyd-Agarose-Gel für RNA-Proben

Um den Zustand der isolierten RNA zu überprüfen wurde die RNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt [LEHRACH *et al.*, 1977; SAMBROOK & RUSSEL, 2000]. Das Agarosegel wurde vorbereitet (siehe Abschnitt 2.1.7), mit RNase-freiem Wasser aufgeköcht (siehe Abschnitt 2.1.7, das Wasser wurde bereits über Nacht mit DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert) und auf 65°C abgekühlt. Danach wurde Formaldehyd zugesetzt und das Gel in eine Gelkammer gegossen. Die Formaldehyd-Behandlung verhindert einen Abbau der

einzelsträngigen RNA durch RNasen. Nach der Polymerisation des Gels wurde dieses mit Formaldehyd-Gel-Puffer beschichtet (siehe Abschnitt 2.1.7), der über Nacht mit DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert wurde. Ein Volumen von 2 µl (1,2 µg/µl) Probe wurde mit 10 µl Puffer für RNA-Proben, 3 µl Auftragspuffer für RNA (siehe Abschnitt 2.1.7) und 0,3 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte für eine Stunde bei konstant 100 Volt. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators (312 nm) wurde Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt und die aufgetrennte RNA konnte so dargestellt werden.

2.2.4 cDNA-Herstellung mittels RT-PCR

Aus der isolierten RNA (siehe Abschnitt 2.2.2) wurde in zwei Schritten cDNA (komplementäre DNA) hergestellt: als erstes übersetzte die Reverse Transkriptase (RT, RNA-abhängige DNA-Polymerase) die RNA in cDNA. Hierfür wurden die oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primer und die Superscript™ II Reverse Transkriptase (im *Super Script™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit* enthalten) nach Herstellerangaben verwendet [BERGER & KIMMEL, 1987; SAMBROOK *et al.*, 1989; COMPTON, 1990]. Desweiteren erfolgte eine Amplifikation der cDNA mittels PCR. Anschließend wurde die so hergestellte cDNA bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5 PCR-Amplifikation von Etcyc3 aus cDNA

Das Etcyc3a Gen wurde *in vitro* mittels PCR [KOTEWICZ, *et al.*, 1985] aus 2 µg *E. tenella* cDNA (siehe Abschnitt 2.2.4) unter Verwendung von „Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity“, 2 mM MgSO₄ und 150 pmol Primer amplifiziert. Die verwendeten Primer besitzen zur Klonierung in den Expressionsvektor jeweils eine Restriktionsschnittstelle: der *Forward Primer* (TAGGATCCATGTTGGAGGCATCCCGAGAC) eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle und der *Reverse Primer* (GGCAAGCTTAGCGCAGTGATGGTTGTG) eine *Hind*III-Schnittstelle (die Erkennungsstelle ist unterstrichen).

Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: im ersten Schritt erfolgte die Denaturierung bei 94°C für 2 min, danach 40 Zyklen mit jeweils 30s Denaturierung bei 94°C; 1 min *Primer-Annealing* bei 62°C und 1 min *Elongation* bei 68°C. Zum Schluss wurde zusätzlich ein *Elongations-Schritt* zur Terminierung für 1 min bei 68°C durchgeführt.

2.2.6 Isolierung des Etcyc3a-Genes

Das amplifizierte Fragment wurde über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.3) [SAMBROOK & RUSSELL, 2000]. Das Agarosegel wurde vorbereitet (siehe Abschnitt 2.1.7), mit TBE-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.7) aufgeköcht, auf 65°C abgekühlt und in die Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit TBE-Puffer beschichtet. 10 µl des amplifizierten Fragments wurden mit 2 µl Puffer für DNA-Proben versetzt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Die Auftrennung und Betrachtung des Gels erfolgte wie im Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Zur Identifizierung der Fragmentlängen der DNA wurde ein „1 Kb Plus DNA Ladder“ (siehe Abschnitt 2.1.7) mit aufgetragen und aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* nach der Methode von VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979 aus dem Agarosegel isoliert. Die Konzentration des PCR-Produktes nach der Isolierung wurde mittels Spektrophotometer bestimmt. Das Verhältnis zwischen der Absorption bei 260 und 280nm ($A_{260/280}$) wurde verwendet um die Reinheit der DNA zu ermitteln. Für reine DNA ist $A_{260/280} \sim 1.8$ [SAMBROOK & RUSSELL, 2000].

2.2.7 Restriktionsverdau des Etcyc3a-Fragmentes und des pMALc2X-Vektors

1 µg des PCR-Produktes und 3 µg des pMALc2X-Vektors wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III bei 37°C für 2 Stunden verdaut [WILSON & YOUNG, 1975; SMITH & WILCOX, 1970]. Danach wurde der Vektor mit 2 *Units* alkalischer Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIP) zusätzlich dephosphoryliert, um eine mögliche Religation des Plasmides zu erschweren. Hierfür wurde die CIP direkt zu dem Restriktionsansatz zugegeben. Der Ansatz wurde zuerst bei 37°C für 30 min inkubiert und danach die Phosphatase für 15 min bei 56°C inaktiviert [SAMBROOK & RUSSEL, 2000]. Anschließend wurden das Etcyc3a-Fragment und der Vektor mit Hilfe des *PCR purification Kit* (ohne Agarosegelelektrophorese-Auftrennung) nach der Methode von VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979 gereinigt.

2.2.8 Ligation des Etcyc3a-Fragmentes mit dem pMALc2X-Vektor

Die Konzentration nach Dephosphorylierung und Reinigung des Etcyc3a-Fragments wurde durch Spektrophotometrie bestimmt und betrug 21 ng/µl. Die Konzentration des pMALc2X-Vektors betrug nach Aufreinigung 137 ng/µl. Anschließend wurden das Etcyc3a-Fragment und der linearisierte Vektor in einem Verhältnis 3:1 über Nacht bei 16°C mittels T4-DNA-

Ligase ligiert [WEISS *et al.*, 1968]. Als Ergebnis wurde der Expressionsvektor pMALc2X-EtCyc3a erhalten (siehe Abbildung 2.3).

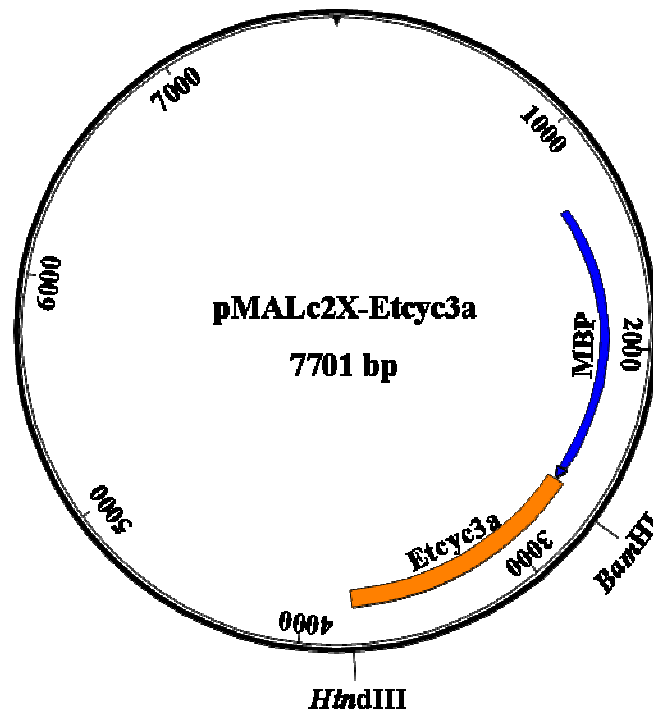


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des pMALc2X-Vektors mit Etcyc3a.

Das Etcyc3a-Gen wurde zwischen die *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstellen der MCS (*multiple cloning site*) des pMALc2X-Vektors kloniert. Der MBP-Tag liegt am N-terminalen Ende des EtCYC3a-Proteins.

2.2.9 Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen mit dem Expressionsplasmid pMALc2X-EtCyc3a

Um das Plasmid zu amplifizieren, wurde es zuerst durch Elektroporation in kompetente *E. coli* TOP10-Zellen eingefügt [DOWER *et al.*, 1988; MERCENIER & CHASSY, 1988]. Dazu wurde ein Aliquot elektrokompeter Zellen (bei -80°C gelagert) auf Eis aufgetaut, mit $2\ \mu\text{l}$ Plasmid vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Mit dem „*Capacitance Extender Plus*“ wurden die Zellen mit dem Plasmid elektroporiert (Spannung: 2 kV, Widerstand: $200\ \Omega$, Kapazität: $25\ \mu\text{F}$). Direkt nach der Elektroporation wurden $200\ \mu\text{l}$ LB-Medium auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator geschüttelt ($300\ \text{Umin}^{-1}$). Das LB-Medium wurde mit deionisiertem Wasser (siehe Abschnitt 2.1.7) angesetzt und anschließend autoklaviert.

Nach 1 h Inkubation wurde die erhaltene Bakteriensuspension auf vier Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten in 4 verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:10) zu je 50 µl ausplattiert [SAMBROOK & RUSSELL, 2000]. Die LB-Agarplatten wurden vorher mit LB-Medium mit Agarose vorbereitet (siehe Abschnitt 2.1.7). Dazu wurde das Medium autoklaviert und, nachdem es auf 50°C abgekühlt war, in Plastikpetrischalen gegossen. Die LB-Agarplatten mit den transformierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Im pMALc2X-Vektor ist das Ampicillin-Resistenzgen inkludiert, welches für die Selektion der Bakterien notwendig ist. Eine Kolonie der *E. coli* BL21 (DE3)-Bakterien mit dem pMALc2X-Etcyc3a-Plasmid wurde aus den LB-Agarplatten entnommen. Die Kolonie wurde in ein Reaktionsgefäß (15 ml) mit 10 ml flüssigen LB-Medium mit Ampicillin (Vorkultur) übergeführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator (300 Umin⁻¹) wachsen gelassen [SAMBROOK & RUSSELL, 2000]. Nach 20 h wurde das pMALc2X-Etcyc3a-Plasmid aus der 10 ml-Vorkultur der transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mittels eines Plasmid-Miniprep-Kits nach der Methode von BIRNBOIM, 1983 aufgereinigt.

2.2.10 Sequenzierung des Expressionsplasmids pMALc2X-Etcyc3a

Nach Amplifizierung des Expressionsplasmids pMALc2X-Etcyc3a in *E. coli* TOP10-Zellen, wurde das Insert durch Sequenzierung verifiziert. Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *Scientific Research and Development GmbH* (SRD) (Oberursel, Deutschland) durchgeführt. Grundlage der Sequenzierung ist die Didesoxynukleotidmethode [SANGER *et al.*, 1977].

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression rekombinanter EtCRK2- und XIRINGO-Proteine

Die Plasmide (pQE60-Etcrk2 und pMALc2X-Xlringo) wurden jeweils von Frau Dr. Jane H. Kinnaid (University of Glasgow, UK) [KINNAID *et al.*, 2004] und von Dr. Ario de Marco (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Deutschland) [FERBY *et al.*, 1999] zur Verfügung gestellt. Als erstes wurden elektrokompetente *E. coli* BL21 (DE3)-Bakterien entweder mit dem pQE60-Etcrk2- oder dem pMALc2X-Xlringo-Plasmid transformiert und auf LB-Agaroseplatten mit Ampicillin ausplattiert (siehe Abschnitt 2.2.9). Eine Kolonie der *E. coli* BL21 (DE3)-Bakterien mit dem pQE60-Etcrk2- bzw. dem pMALc2X-Xlringo-Plasmid

wurde aus den LB-Agarplatten entnommen. Die Kolonien wurden jeweils in ein Reaktionsgefäß (15 ml) mit 10 ml flüssigen LB-Medium mit Ampicillin (Vorkultur) übergeführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator (300 Umin⁻¹) wachsen gelassen [SAMBROOK & RUSSEL, 2000]. Nach 20 h wurden die 10 ml-Vorkulturen der transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen jeweils in 2l flüssiges LB-Medium mit Ampicillin übergeführt. Die Kulturen wurden 3 bis 5 Stunden bei 37°C wachsen gelassen, bis sie eine optische Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von etwa 0,7 erreichten [SAMBROOK & RUSSEL, 2000]. Anschließend wurde die Überexpression der rekombinanten EtCRK2-His- und MBP-XIRINGO-Proteine mittels Zugabe von 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. IPTG fungiert als künstlicher Aktivator des Laktose-Operons in *E. coli* indem es den *lac*-Repressor bindet. Das Gen des zu exprimierenden Proteins befindet sich unter Kontrolle eines Promotors, der ebenfalls von dem *lac*-Repressor inhibiert wird. Die Bindung von IPTG an den *lac*-Repressor erlaubt also die kontinuierliche Expression der von dem Promotor kontrollierten Gene [BANEYX, 1999]. Die getrennte Expression beider Proteine erfolgte über Nacht bei 24°C in einem Schüttelinkubator (100 Umin⁻¹). Durch Zentrifugation bei 9000 g für 40 min bei 4°C erfolgte die Isolierung der *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. Anschließend wurden die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert [SAMBROOK & RUSSEL, 2000].

2.3.2 Aufschluss der Bakterien mit EtCRK2-His-Protein

Der Aufschluss der Bakterien wurde nach der Methode von NAGLAK, 1990 durchgeführt. Zum Aufschluss der Bakterien mit EtCRK2-His-Protein wurde das Zellpellet aufgetaut und in 40 ml EtCRK2-Start-Puffer (siehe 2.1.7) kräftig geschüttelt (Vortex). Nach Zugabe von 25 U/ml Benzonase (siehe 2.1.7) wurden die Zellen mechanisch mittels *French Press* (*French Pressure Cell*) aufgebrochen. Der Zellaufschluss erfolgte mit der *Ratio Selector*-Einstellung: high / 1280 psi (entspricht 20.000 psi für Zellen) und wurde dreimal wiederholt, bis eine deutliche Farbveränderung der Suspension zu beobachten war. Das resultierende Homogenisat wurde bei 10.000 g für 1 h bei 4°C zentrifugiert.

2.3.3 EtCRK2-Reinigung

Alle nachfolgend beschriebenen Reinigungsprozesse wurden auf einem ÄKTA FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) System nach SAMBROOK & RUSSELL, 2000 durchgeführt.

Der klare Überstand (40-50 ml) aus 2.3.2, welcher das EtCRK2-Protein enthält, wurde auf eine selbstgepackte Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Säule (10 ml) gegeben. So konnte der His-Tag der EtCRK2 an die Ni-NTA-Matrix binden und anschließend spezifisch mit Imidazol eluiert werden [HENGEN, 1995; SHEEHAN & O'SULLIVAN, 2003]. Die Auftragung des Protein-Überstandes auf die Säule erfolgte mit einer Flussrate von 1-2 ml/min. Danach wurde die Säule mit 2-3 Säulenvolumina EtCRK2-Start-Puffer gewaschen, der 10 mM Imidazol enthält. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um unspezifische Proteinbindungen zu unterdrücken und um die restlichen Proteine wegzuwaschen, die nicht an die Säule gebunden wurden. Die Elution von EtCRK2-His wurde mittels eines Pufferwechsels zu dem mit 250 mM Imidazol angereicherten EtCRK2-Elutionspuffer (siehe Abschnitt 2.1.7) durchgeführt. Die ÄKTA FPLC-Einheit besitzt einen UV-Detektor, der bei 280 nm Proteine detektiert. Mithilfe des Elutionschromatogramms konnte ermittelt werden, in welchem Elutions-Peak das gewünschte Protein eluiert wurde. Die gesammelten 2 ml-Fractionen mit EtCRK2-Protein wurden bei 4°C gelagert.

Um die Reinheit des EtCRK2-His-Proteins zu erhöhen und um das störende Imidazol zu entfernen, wurde anschließend eine Gelfiltration (auch *size exclusion*-Chromatographie genannt) [PORATH & FLODIN, 1959] durchgeführt. Dazu wurde eine „120 ml Hiload 16/60 Superdex 75“-Säule verwendet [IRVINE, 2001]. Vor der Reinigung der Zielproteine wurde ein Molekulargewicht-Standard-Kit (29-700 kDa) von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) über die Gelfiltrationssäule getrennt, um die Zuordnung des Molekulargewichtes mit den Elutionsfraktionen zu ermöglichen. Der Gelfiltrationspuffer (siehe Abschnitt 2.1.7) wurde für alle *size exclusion*-Chromatographien verwendet. Die EtCRK2-haltigen Fraktionen (6-8 ml) aus der Affinitätschromatographie wurden auf die Gelfiltrationssäule gegeben. Die Auftragung auf die Säule erfolgte mit einer Flussrate von 1-1,5 ml/min. Mit Hilfe des Elutionschromatogramms der Gelfiltrationssäule konnte ermittelt werden, in welchem Elutions-Peak das gewünschte Protein eluiert wurde. Die erhaltenen 2 ml-Fractionen mit EtCRK2 wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

2.3.4 XIRINGO-Reinigung

Der Aufschluß der Bakterien mit MBP-XIRINGO wurde wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben, jedoch mit XIRINGO-Start-Puffer (Phosphatpuffer, siehe 2.1.7), nach SAMBROOK & RUSSELL, 2000 durchgeführt.

Nach der Zugabe von 25 U/ml Benzonase, wurden die Zellen mechanisch mittels *French Press* (*French Pressure Cell*) aufgebrochen und bei 10.000 g zentrifugiert [NAGLAK *et al.*, 1990]. Anschließend wurde das lösliche MBP-XIRINGO-Protein mittels einer selbstgepackten Amylose-Affinitätschromatographie-Säule (23 ml) mit Hilfe des ÄKTA FPLC-Systems (siehe Abschnitt 2.3.3) von dem Überstand gereinigt. Der Auftrag auf die selbstgepackte Säule erfolgte mit einer Flussrate von 1-2 ml/min. Danach wurde die Säule mit 2-3 Säulenvolumina XIRINGO-Start-Puffer gewaschen. Hierdurch wurden ungebundene Proteine entfernt. Für die Elution wurde Maltose benötigt, die mit dem MBP konkurriert [DAVIS *et al.*, 1999; RIGGS, 2000]. Deshalb wurde XIRINGO mit XIRINGO-Elutionspuffer (enthält 10 mM Maltose, siehe Abschnitt 2.1.7) eluiert. Mittels des Elutionschromatogramms der Amylose-Affinitätschromatographie wurde ermittelt, in welchen Elutionsfraktionen das XIRINGO-Protein eluiert wurde. Diese Fraktionen wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

Um die Reinheit des MBP-XIRINGO-Proteins zu erhöhen und um freies MBP zu entfernen, wurde eine Gelfiltration unter Verwendung einer „120 ml Hiload 16/60 Superdex 200“-Säule durchgeführt. Vor der Reinigung der Zielproteine wurde ein Molekulargewicht-Standard-Kit (29-700 kDa) von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) über die Gelfiltrationssäule nach Herstellerangaben getrennt, um die Zuordnung des Molekulargewichtes mit den Elutionsfraktionen zu ermöglichen.

Die Fraktionen der XIRINGO-Affinitätschromatographie wurden auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Auftragung auf die Säule erfolgte mit einer Flußrate von 1-1,5 ml/min. In welchem Elutions-Peak das XIRINGO-Protein eluiert wurde, konnte mittels des Elutionschromatogramms der Gelfiltration bestimmt werden. Die Fraktionen mit dem XIRINGO-Protein wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

2.3.5 Gelfiltration des EtCRK2/XIRINGO-Komplexes

Die EtCRK2-His- und MBP-XIRINGO-Elutionsfraktionen wurden gemischt und bei 4°C für 12 h gelagert, um die Bildung eines Komplexes zwischen beiden Proteinen zu ermöglichen.

Der gebildete Komplex wurde vom Überschuss an EtCRK2-His mittels einer weiteren Gel-filtration unter Verwendung einer „260 ml Hiload 26/60 Superdex 200“-Säule, wie im Ab-schnitt 2.3.4 für XIRINGO beschrieben, getrennt [PORATH & FLODIN, 1959].

2.3.6 Expression der rekombinanten EtCRK2-His- und MBP-EtCYC3a-Proteine

Elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)-Expressionszellen wurden entweder mit dem pQE60-Eterk2- oder dem pMALc2X-Etcyc3a-Plasmid transformiert (siehe Abschnitt 2.2.9). Die transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurden in 2 l LB-Medium mit Ampicillin 3 bis 5 Stunden bei 37°C wachsen gelassen, bis sie einen OD₆₀₀-Wert von etwa 0,7 erreichten. Dann wurde die Überexpression des rekombinanten EtCRK2-His-Proteins mit 0,1 mM IPTG und des MBP-EtCYC3a-Proteins mit 1 mM IPTG induziert. Die getrennte Überexpression von den Proteinen erfolgte bei 24°C über 20 h. Danach wurden die *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit den rekombinanten Proteinen mittels Zentrifugation bei 9000 g für 40 min bei 4°C zentrifugiert und die Zell-Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert [SAMBROOK & RUSSEL, 2000].

2.3.7 Reinigung des rekombinanten EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Komplexes

Nach der Expression wurden die Bakterien dem mit EtCRK2-Protein und diejenigen mit dem EtCYC3a-Protein gemischt und analog der Methode, wie im Abschnitt 2.3.4 beschrieben, aufgeschlossen. Danach wurde das resultierende Homogenisat in einem Schüttler mindestens eine Stunde gemischt und anschließend bei 10.000 g für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand auf eine selbstgepackte 23 ml fassende Amylose-Säule mit XIRINGO-Start-Puffer aufgetragen. Die Reinigung erfolgte analog der XIRINGO-Amylose-Reinigung (siehe Abschnitt 2.3.4) nach SAMBROOK & RUSSELL, 2000. Um freies MBP von dem EtCRK2/EtCYC3a-Komplex abzutrennen, wurde zusätzlich eine Gelfiltration mit einer „Hiload 26/60 Superdex 200“-Säule durchgeführt [PORATH & FLODIN, 1959]. Die Elutionsfraktionen des aktiven Komplexes wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

2.3.8 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der gereinigten Fraktionen wurde mit Hilfe des BCA-Proteintest-Kits von Pierce, Thermo Scientific, (Ort, USA) nach Herstellerangaben ermittelt. Hierfür wurden durchsichtige 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten verwendet. Pro Well wurden 25 µl vier verschiedener Verdünnungen (1:2, 1:5, 1:10 und 1:20) der zu bestimmenden Proben und vom Standard BSA (25-2.000 µg/ml) pipettiert. Zusätzlich wurden 200 µl Working-Solution (50:1 Verdünnung von Reagenz A im Reagenz B, beide im BCA-Kit enthalten) pro Well pipettiert. Die Absorption der Proben wurde nach 30 min Inkubation bei RT mittels eines „SpectraFluor Plus“-Spektrophotometers bei 590 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde durch Vergleich mit der BSA-Kalibriergeraden ermittelt.

2.3.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Reinheitsgrad der Proteine wurde mittels SDS-PAGE geprüft. Hierzu wurde das „NuPAGE®Bis-Tris“-Elektrophorese-System nach Herstellerangaben [KUBO, 1995] verwendet. Die Proben für die SDS-PAGE wurden entsprechend der Proteinkonzentration in bidestilliertem Wasser und Loading-Puffer verdünnt, dazu wurden 2 µl Reduktionsagens gegeben und für 10 Minuten bei 98°C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden 20 µl der Probe in die jeweiligen „NuPAGE®Bis-Tris 4-12% Pre-Cast“-Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte 1 h bei konstant 200 Volt im „NuPAGE®Bis-Tris MOPS SDS“-Puffer. Nach dem Lauf wurden die Gele drei Mal für je 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und mit „PageBlue™ Protein Staining Solution“ mind. 24 h gefärbt. Das Entfärben der Gele erfolgte für mindestens 20 h mit destilliertem Wasser, das von Zeit zu Zeit ausgetauscht wurde. Zur Trocknung der SDS-PAGE Gele wurden diese in einer Trocknungslösung aus 20% Ethanol und 10% Glycerin für mind. 24 h inkubiert. Die Gele wurden anschließend zwischen zwei Cellulosefolien eingespannt und für ca. 3-4 Tage bei RT weiter getrocknet.

2.3.10 Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET)-Aktivitätsassay

Zur Aktivitätsbestimmung der EtCRK2/XIRINGO- und EtCRK2/EtCYC3a-Komplexe und für die Inhibitions-Assays wurde die TR-FRET-Methode verwendet. Das Prinzip dieser Methode wurde bereits im Abschnitt 1.8.1 beschrieben. Die TR-FRET-Assays wurden für die EtCRK2 in Komplex mit XIRINGO und EtCYC3a optimiert. Sie wurden in schwarzen 384-

Well-Flachboden-Mikrotiterplatten mit Hilfe des „*IMAP™ TR-FRET Screening Express Kits*“ von Molecular Devices (Sunnyvale, USA) nach Herstellerangaben [MATHIS, 1995], jedoch mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

Der Assay wurde in *IMAP™* Reaktionspuffer, der 1 mM Dithiothreitol (DTT) enthält durchgeführt. Dazu wurden 100 nM fluoreszierendes Substrat und eine Verdünnungsreihe des EtCRK2/XIRINGO- und des EtCRK2/EtCYC3a-Komplexes (jeweils 0,0025-0,06 µg/µl) und des HsCDK2/CYCA-Komplexes (0,001-0,3 U/ml) pipettiert, um die optimalen Kinase/Aktivator-Komplex-Konzentrationen zu bestimmen. Die folgenden Versuche wurden mit den so ermittelten Konzentrationen (0,05 µg/µl EtCRK2/XIRINGO; 0,05 µg/µl EtCRK2/EtCYC3a und 0,1 U/ml HsCDK2/HsCYCA) durchgeführt. Für IC₅₀-Bestimmungen der potentiellen Inhibitoren wurde eine Verdünnungsreihe der chemischen Verbindungen (0,02-200 µM) in DMSO verwendet.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µM ATP gestartet, unter Lichtausschluss bei RT inkubiert und nach 45 min mit 60 µl *Progressive*-Bindungspuffer (eine im „*IMAP™ TR-FRET Screening Express Kit*“ enthaltene Stopplösung) gestoppt. Der *Progressive*- Bindungspuffer beinhaltet eine 1:900 Verdünnung des *IMAP™ TR-FRET*-Donors (Tb-Donor) und des *IMAP™ Progressive*-Bindungsreagenz (mit *IMAP™*-Bindungseinheit) (siehe 1.8.1).

Der TR-FRET-Assay wurde als Endpunktbestimmung aufgebaut, da die Reaktion mit dem *Progressive*-Bindungspuffer beendet wird. Eine kinetische Messung der Werte ist daher nicht möglich. Für die Bestimmung der Reaktionszeit wurde zuerst eine Pseudokinetik durchgeführt. Hierfür wurden Einzelreaktionen (alle mit den gleichen Assay-Komponenten: 100 nM Fluorescein-markiertes Histon-H1-Peptidderivat, Kinase/Aktivator Komplex (0,05 µg/µl EtCRK2/XIRINGO; 0,05 µg/µl EtCRK2/EtCYC3a; 0,1 U/ml HsCDK2-HsCYCA) und 30 µM ATP) parallel gestartet und alle 5 min mit *Progressive*-Bindungspuffer gestoppt. Die so erhaltenen pseudokinetischen Ergebnisse sind mit denen einer kinetischen Messung vergleichbar. Die TR-FRET-Messung erfolgte 30 Minuten nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe des *Progressive*-Bindungspuffers unter Verwendung des „Wallac Victor 2 Multilabel Counters“ mit folgenden Messparametern:

- emission filter: 490 nm
- second emission filter: 520 nm
- excitation filter: 340 nm

- delay: 500 μs
- window time: 1.400 μs
- *number of repeats*: 1
- *cycle*: 2.000 μs
- *light integrator capacitors*: 1
- *light integrator ref. level*: 21
- *flash energy area*: high
- *flash energy level*: 119
- *no flash absorbance measurement*
- *beam*: normal
- *measurement height*: 3,00 mm

Die TR-FRET-Werte wurden mit Hilfe des „IMAP™ TR-FRET“-Berechnungsmoduls der Fa. Molecular Devices (Sunnyvale, USA, www.moleculardevices.com) aus den gemessenen Rohdaten bei 490 nm und 520 nm berechnet.

Die graphische Auswertung erfolgte mit dem Programm „SigmaPlot 8.0“ (SigmaPlot 2002 für Windows, SPSS Software, Chicago, USA). Die Kurvenanpassung wurde nach dem „vier-Parameter-Sigmoidal-Model“ durchgeführt.

2.3.11 Berechnung der spezifischen EtCRK2-Aktivität

Um die Aktivität des EtCRK2/XIRINGO- bzw. des EtCRK2/EtCYC3a-Komplexes von „TR-FRET-counts“ zu „Units“ ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) umrechnen zu können, wurde die benötigte Menge an Substrat mittels nicht Fluorescein-markiertem Histon-H1 titriert. Hierzu wurde der EtCRK2/Aktivator-Komplex (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/XIRINGO und 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/EtCYC3a), 25 nM Substrat und eine Verdünnungsreihe (2,5 nM – 200 μM) des nicht Fluorescein-markiertem Histon-H1-Peptidderivats verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μM Co-Substrat (ATP) gestartet und nach 45 min Inkubationszeit mit der Zugabe von *Progressive*-Bindungspuffer beendet. Die Auswertung erfolgte wie im Abschnitt 2.3.10

beschrieben. Die Konzentration an Histon-H1-Peptidderivat, welches von der Kinase umgesetzt wurde, konnte aus der Steigung des linearen Bereiches der Kurve bestimmt werden.

Aus der Konzentration an Substrat, an Kinase und der gemessenen Reaktionszeit wurde die spezifische Aktivität als μmol Substrat berechnet, welches pro mg Kinase pro min umgesetzt wurde [PASSONNEAU & LOWRY, 1993].

2.3.12 K_m -Bestimmung für das Co-Substrat (ATP)

Die K_m -Bestimmung für das Co-Substrat (ATP) wurde mit 100 nM Fluorescein-markiertem Histon-H1-Peptidderivat und Kinase/Aktivator Komplex ($0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/XIRINGO; $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/EtCYC3a; $0,1 \text{ U/ml}$ HsCDK2-HsCYCA) durchgeführt [PASSONNEAU & LOWRY, 1993]. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Co-Substrat-Verdünnungsreihe ($0,05$ - $100 \mu\text{M}$) gestartet (siehe Abschnitt 2.3.10). Die graphische Auswertung der Rohdaten erfolgte nach der Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Abschnitt 1.9.1) unter Verwendung des „Michaelis-Menten-Models 250“ mit Hilfe der Software „XLfit Version 4.3.2, Build 11“, in Activity-Base 7.2.1.5 (ID Business Solutions Limited, Surrey, UK).

2.3.13 *In vitro* Screening der chemischen Verbindungen

Für das *Screening* wurden ca. 3500 chemische Verbindungen einer *in house*- Chemikalienbibliothek sowie 139 durch virtuelles *Screening* identifizierte Substanzen bei einer Substanzkonzentration von $30 \mu\text{M}$ *in vitro* getestet. Die Verbindungen wurden in DMSO verdünnt und auf schwarze 384-Well-Mikrotiterplatten verteilt. Das *Screening* wurde mit 100 nM Fluorescein-markiertem Histon-H1-Peptidderivat, $30 \mu\text{M}$ chemischer Verbindung (bei einer Endkonzentration an DMSO im Assay von 2 %) und dem Kinase/Aktivator-Komplex ($0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/XIRINGO; $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/EtCYC3a; $0,1 \text{ U/ml}$ HsCDK2-HsCYCA) durchgeführt [COPELAND, 2005]. Die Substanzen wurden zusammen mit dem Kinase/Aktivator-Komplex ohne das Co-Substrat 20 min bei RT vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von $30 \mu\text{M}$ ATP gestartet (siehe Abschnitt 2.3.10).

Alle Substanzen, welche die Kinase-Aktivität um mindestens 30% inhibierten, wurden für eine weitere Charakterisierung (IC_{50} -Bestimmung) ausgewählt und bekamen den Status „Hit“.

2.3.14 *In vitro* IC₅₀-Bestimmung der chemischen Verbindungen

Für die identifizierten „Hits“ aus 2.3.13 wurden die IC₅₀-Werte bestimmt. Hierzu wurden die Verbindungen in DMSO verdünnt und auf schwarze 394-Well-Mikrotiterplatten verteilt. Pro Well wurden 100 nM Fluorescein-markiertes Histon-H1-Peptidderivat, die chemische Verbindung in DMSO (in 11 Substanzkonzentrationen: 0,02; 0,04; 0,1; 0,2; 0,6; 2; 6; 20; 43; 93; 200 µM) und der Kinase-Komplex (0,05 µg/µl EtCRK2/XIRINGO; 0,05 µg/µl EtCRK2/EtCYC3a; 0,1 U/ml HsCDK2-HsCYCA) verwendet. Die Endkonzentration an DMSO im Assay betrug 2 %. Der Verlauf des Assays und die Aktivitätsmessungen wurden analog zu dem *Screening*, wie im Abschnitt 2.3.13 beschrieben, durchgeführt [COPELAND, 2005].

Die graphische Auswertung der IC₅₀-Werte erfolgte mit Hilfe der Software *XLfit version 4.3.2, Build 11* und dem „4-Parameter-Logistic-Model“ (Model 200).

2.3.15 *In vitro* K_i-Bestimmung der chemischen Verbindungen

Für die Berechnung von K_i-Werten werden häufig kinetische Messungen durchgeführt, um gewährleisten zu können, dass die Messwerte innerhalb des linearen Bereiches der Reaktion liegen. Aufgrund der Komplexität des TR-FRET Systems (enzymatischer Test kombiniert mit einem Bindungstest) und seinem Endpunkt-Bestimmungs-Aufbau (siehe Abschnitt 2.3.10), wäre eine kinetische Messung von allen Hits, bei allen Kombinationen an Inhibitor und Co-Substrat in verschiedenen Konzentrationen unmöglich gewesen. Um dieses Problem zu überwinden, wurde die Zeit, in der die Reaktion linear läuft, durch eine Pseudokinetik bereits in einer Vorversuchsreihe ermittelt (siehe Abschnitt 2.3.10).

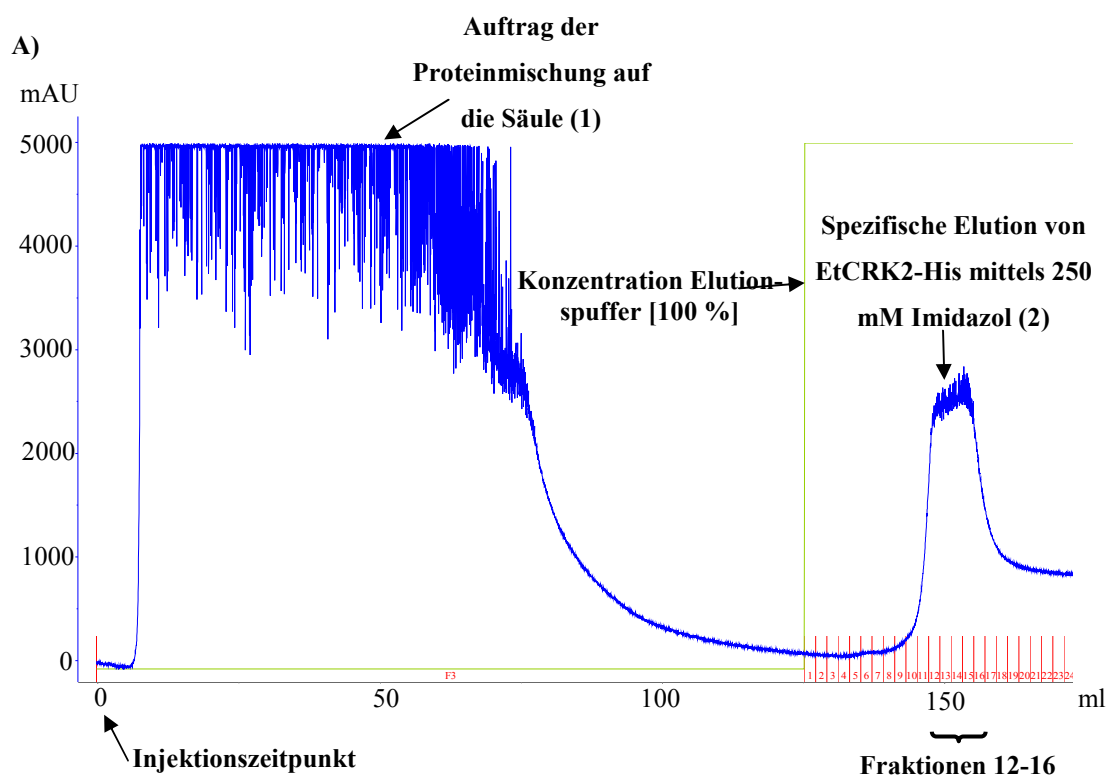
Die K_i-Werte wurden nur für ausgewählte „Hit-Verbindungen“ ermittelt, die einen IC₅₀-Wert ≤ 30 µM und positive HPLC-, NMR- und Löslichkeitsergebnisse zeigten. Die K_i-Bestimmungen wurden durch den TR-FRET-Assay unter Verwendung von verschiedenen ATP- und Substanz-Konzentrationen durchgeführt [COPELAND, 2005]. Die Konzentrationsreihe für die „Hit“-Verbindungen wurde anhand der IC₅₀-Werte (siehe 2.3.14) und die Konzentrationsreihe von ATP anhand der K_m-Werte (siehe 2.3.12) ermittelt. Die Substanzen wurden in DMSO verdünnt und auf schwarze 394-Well-Mikrotiterplatten verteilt. Für die K_i-Bestimmungen wurden 100 nM Fluorescein-markiertes Histon-H1-Peptidderivat, die chemische Verbindung (die verwendeten fünf Konzentrationen der Hit-Verbindungen in DMSO

waren in einem Bereich zwischen 0,001–200 μM) und der Kinase-Komplex (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/XIRINGO; 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtCRK2/EtCYC3a; 0,1 U/ml HsCDK2-HsCYCA) verwendet. Die Endkonzentration an DMSO im Assay betrug 2 %. Die Verbindungen wurden analog zu dem *Screening* und der IC_{50} -Bestimmung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.13). Die Reaktion wurde durch Zugabe von vier verschiedenen Konzentrationen an Co-Substrat (5 μM , 8,5 μM , 10 μM und 15 μM) gestartet. Nach 25 min Inkubationszeit bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe des *Progressive*-Bindungspuffers gestoppt. Die graphische Bestimmung der K_i -Werte erfolgte mittels des „Enzyme Kinetics“-Moduls 1.1 von „SigmaPlot 8.0“ (SigmaPlot 2002 für Windows, SPSS Software, Chicago, USA). Der Inhibitionstyp wurde durch die *fitting*-Statistik für die verschiedenen reversiblen Inhibitionstypen (kompetitiv, unkompetitiv und nicht-kompetitiv, siehe Abschnitt 1.9.2) berechnet. Um das beste Inhibitionsmodell auszuwählen, wurden die *Goodness-of-Fit* Kriterien, die direkte Betrachtung der Datendarstellungen, das Bestimmtheitsmaß (R^2) und das korrigierte Akaike-Informationskriterium (AIC) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung der rekombinanten EtCRK2

Die Konstrukte pQE60-Etcrk2 und pMALc2X-XIringo konnten in *E. coli* BL21 (DE3) Expressionszellen transformiert und EtCRK2 und XIRINGO erfolgreich exprimiert werden. Die Reinigung der EtCRK2 erfolgte mittels Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie. Wie auf dem Elutionschromatogramm der Affinitätschromatographie und der entsprechenden SDS-PAGE zu erkennen ist (siehe Abbildung 3.1 A und B), konnte EtCRK2 mit Imidazol-angereichertem Phosphatpuffer eluiert werden. Eine ausführliche Beschreibung der Expression und Reinigung von EtCRK2 befindet sich in Abschnitt 2.3.1-2.3.3 (Material und Methoden).



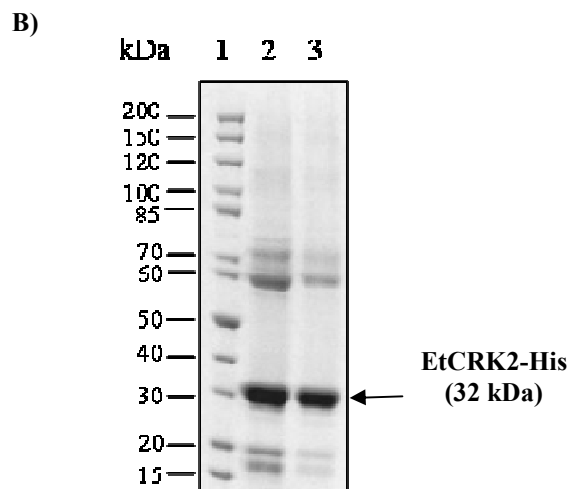


Abbildung 3.1: Elutionschromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von EtCRK2-His.

(A) Auf dem Elutionschromatogramm ist das UV-Spektrum (blaue Linie) der aufgetragenen Proteinmischung (1) und der eluierten EtCRK2 (2) zu erkennen. Nach Auftragung der Proteinmischung auf die Säule (der Injektionspunkt ist als rote Linie markiert) wurde das ungebundene Protein als erstes eluiert (1). Die EtCRK2 wurde in 2ml-Fractionen (rote Linien) durch einen Pufferwechsel (Imidazol-haltiger Phosphatpuffer, grüne Linie) eluiert (2).

(B) Spur 1: Protein-Ladder (10-200 kDa); Spur 2: 5µl Fraktion 13 der EtCRK2-Affinitätschromatographie; Spur 3: 5µl Fraktion 15 der EtCRK2-Affinitätschromatographie.

Wie auf der SDS-PAGE der EtCRK2-Reinigung zu erkennen ist (siehe Abbildung 3.1 B), enthalten die Fraktionen des Elutionspeaks eine Proteinbande von ca. 30 kDa (EtCRK2-His ist 32 kDa groß). Die EtCRK2-enthaltenden Elutionsfraktionen 12-16 wurden gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Um die Reinheit der EtCRK2 zu erhöhen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Da das Imidazol im Phosphatpuffer die Proteinlöslichkeit herabsetzt, wurde für die Gelfiltration ein TRIS-Puffer verwendet. Wie in Abbildung 3.2 A des Elutionschromatogramms der EtCRK2-Gelfiltration zu erkennen ist, konnten zwei Elutionspeaks detektiert werden. Mit Hilfe der entsprechenden SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.2 B) konnte festgestellt werden, dass die EtCRK2 im zweiten Peak eluiert wurde.

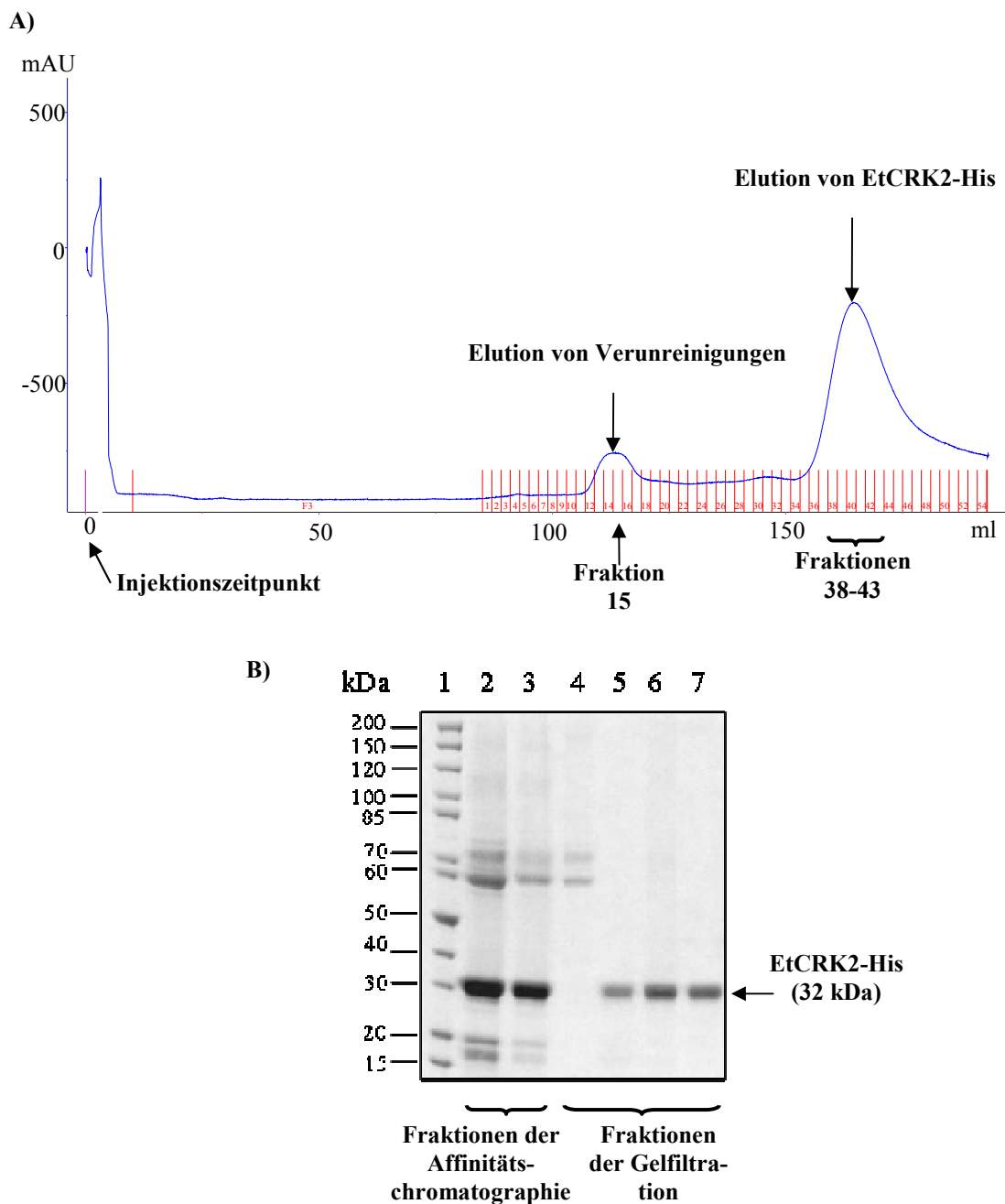


Abbildung 3.2: Elutionschromatogramm der EtCRK2-Gelfiltration und SDS-PAGE der EtCRK2-Affinitätschromatographie und Gelfiltration.

(A) Das UV-Spektrum der Gelfiltration ist als blaue Linie dargestellt. Im ersten Peak wurden Proteine eluiert, die größer als 75 kDa sind (maximaler Trennungsbereich der Säule) und sich im Ausschlussvolumen befinden. Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht (44-17 kDa) werden im zweiten Elutionspeak zwischen 160-170 ml eluiert (EtCRK2-His ist 32 kDa groß). Die 2 ml Fraktionen sind als rote Linien dargestellt.

(B) Spur 1: Protein-Ladder (10-200 kDa); Spur 2: 5 µl Fraktion 13 der EtCRK2-Affinitätschromatographie; Spur 3: 5 µl Fraktion 15 der EtCRK2-Affinitätschromatographie; Spur 4: 10 µl Fraktion 15 der EtCRK2-Gelfiltration (erster Peak); Spur 5: 10 µl Fraktion 38 der EtCRK2-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 6: 10 µl Fraktion 40 der EtCRK2-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 7: 10 µl Fraktion 42 der EtCRK2-Gelfiltration (zweiter Peak).

Die Reinheit von EtCRK2 konnte durch Gelfiltration erhöht werden. Wie in der SDS-PAGE zu erkennen ist (siehe Abbildung 3.2 B), wurden die unspezifisch bindenden Proteine bereits im ersten Elutionspeak eluiert (Spur 4 der SDS-PAGE). Aufgrund ihres kleinen Molekulargewichts von 32 kDa konnte die reine EtCRK2 im zweiten Elutionspeak (siehe Abbildung 3.2 B) eluiert werden. Innerhalb der ersten Stunden nach der Gelfiltration wurde ein sehr schneller Ausfall der EtCRK2 aus dem Tris-Puffer festgestellt. Der Niederschlag war abhängig von der Proteinkonzentration: je höher die EtCRK2-Konzentration, desto schneller fand der Ausfall statt. Um die Löslichkeit der EtCRK2 im Tris-Puffer zu erhöhen, war ein Glycerin-Zusatz von mindestens 30 Vol. % [KINNAIRD *et al.*, 2004] oder der Zusatz von XIRINGO notwendig. Unter diesen Bedingungen konnte die EtCRK2 ohne auszufallen und ihre Aktivität zu verlieren monatelang unter 4°C gelagert werden. Daher wurden die Fraktionen 38-43 des zweiten Elutionspeaks der EtCRK2-Gelfiltration zur Stabilisierung mit XIRINGO gemischt.

3.2. Expression und Reinigung des rekombinanten MBP-XIRINGO-Proteins

Die XIRINGO-Reinigung erfolgte mit Hilfe einer Amylose-Affinitätschromatographie. Wie auf dem Elutionschromatogramm der Affinitätschromatographie und der entsprechenden SDS-PAGE zu erkennen ist (siehe Abbildung 3.3 A und B), konnte XIRINGO mit Maltoseangereichertem Phosphatpuffer eluiert werden. Eine ausführliche Beschreibung der Expression und Reinigung von XIRINGO befindet sich in Abschnitt 2.3.4 (Material und Methoden).

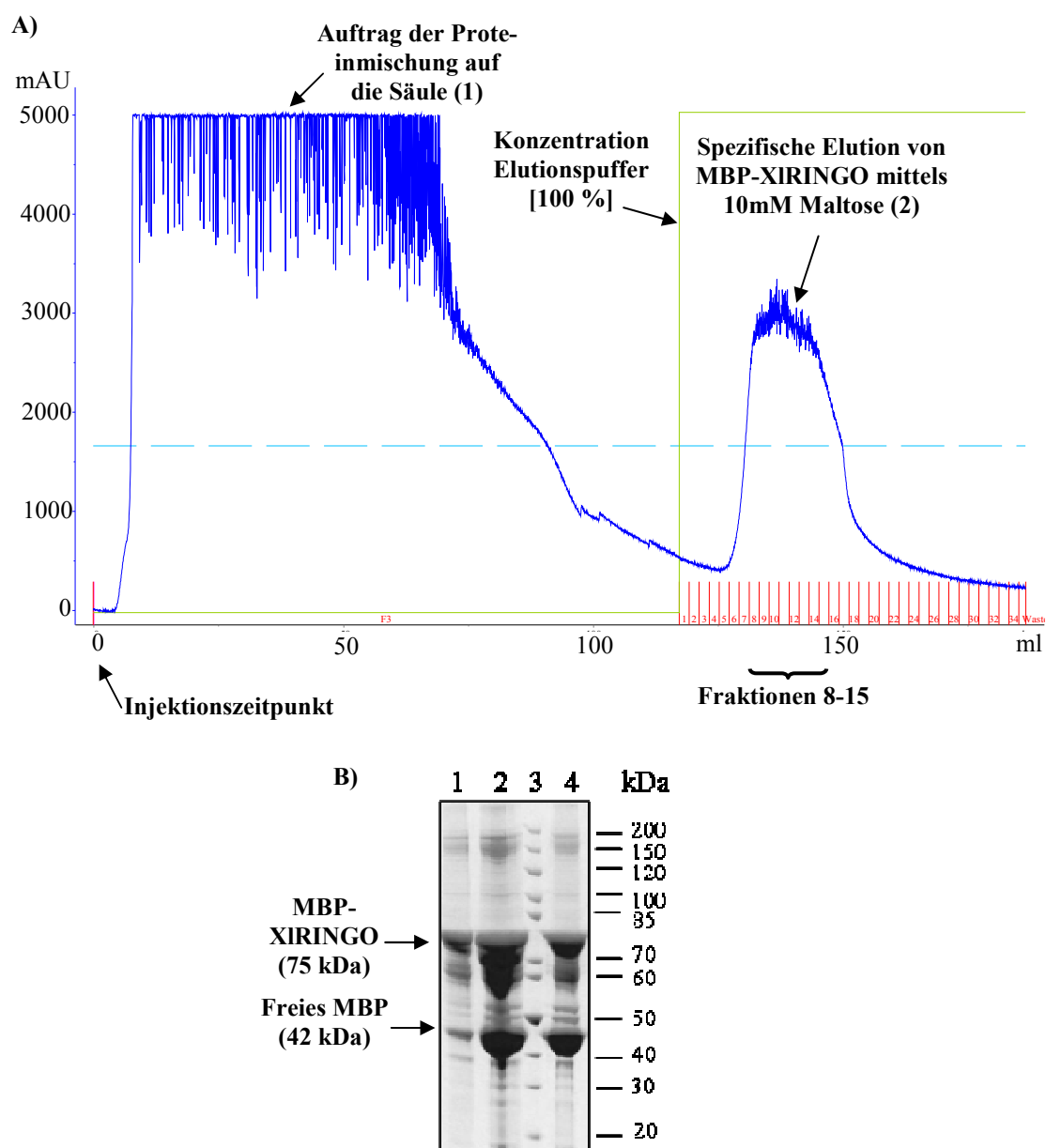


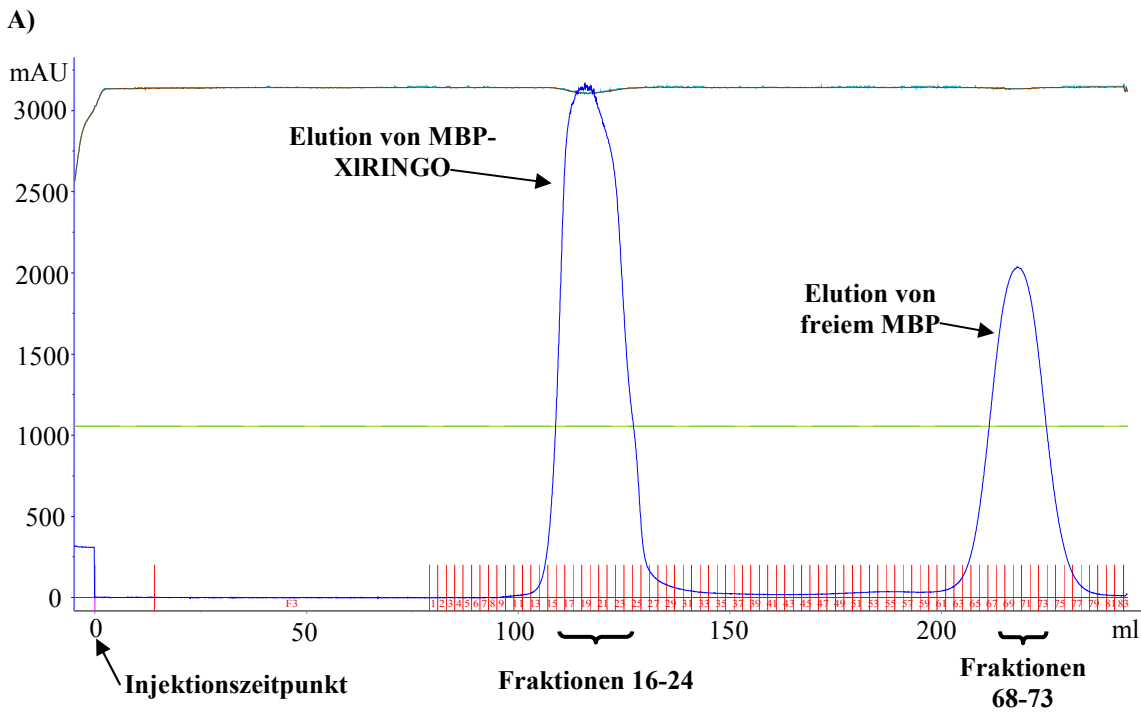
Abbildung 3.3: Elutionschromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von MBP-XIRINGO.

(A) Auf dem Elutionschromatogramm ist das UV-Spektrum (blaue Linie) der aufgetragenen Proteinmischung (1) und des eluierten XIRINGO (2) zu erkennen. Nach Auftragung der Proteinmischung auf die Säule (der Injektionszeitpunkt ist als rote Linie markiert), eluierte zuerst das ungebundene Protein (1). XIRINGO wurde erfolgreich in 2 ml Fraktionen (rote Linien) durch einen Pufferwechsel (Maltose-haltiger Phosphatpuffer, grüne Linie) eluiert (2).

(B) Spur 1: 5 μ l Fraktion 8 der XIRINGO-Affinitätschromatographie; Spur 2: 5 μ l Fraktion 12 der XIRINGO-Affinitätschromatographie; Spur 3: Protein-Ladder (10-200 kDa); Spur 4: 5 μ l Fraktion 15 der XIRINGO-Affinitätschromatographie.

Wie auf der SDS-PAGE der XIRINGO-Reinigung zu erkennen ist (siehe Abbildung 3.3 B), enthalten die Fraktionen des Elutionspeaks eine Proteinbande um 70 kDa (MBP-XIRINGO ist 75 kDa groß). Die MBP-XIRINGO-enthaltenden Elutionsfraktionen 8-15 wurden gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zusammen mit MBP-XIRINGO wurde freies MBP eluiert. Um die Reinheit von MBP-XIRINGO zu erhöhen und das freie MBP abzutrennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Da im Anschluß an die Gelfiltration das MBP-XIRINGO Protein mit EtCRK2 gemischt wurde, erfolgte die Gelfiltration in dem gleichen TRIS-Puffer, der für die EtCRK2-Gelfiltration verwendet wurde. Wie in Abbildung 3.4 A des Elutionschromatogramms der MBP-XIRINGO-Gelfiltration zu sehen ist, konnten zwei Elutionspeaks detektiert werden.



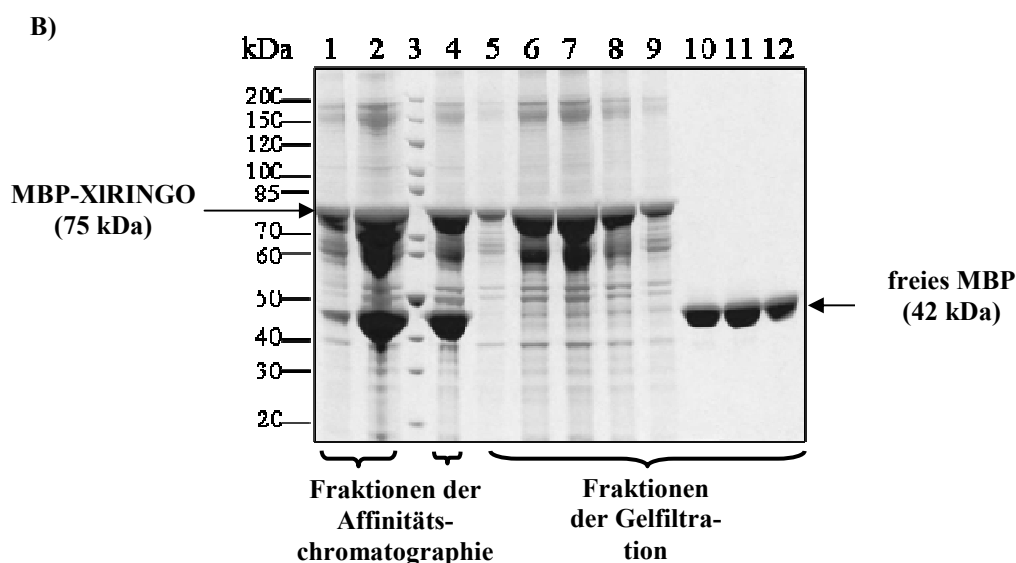


Abbildung 3.4: Elutionschromatogramm der XIRINGO-Gelfiltration und SDS-PAGE der XIRINGO-Affinitätschromatographie und Gelfiltration.

(A) Das UV-Spektrum ist als blaue Linie dargestellt. Im ersten Peak wurden Proteine eluiert, die größer als 200 kDa sind (maximaler Trennungsbereich der Säule) und zum Ausschlussvolumen gehören. Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht (44-17 kDa) werden im zweiten Elutionspeak nach 200 ml eluiert (freies MBP ist 42 kDa groß). Die 2ml Fraktionen sind als rote Linien dargestellt.

(B) Spur 1: 5µl Fraktion 8 der XIRINGO-Affinitätschromatographie; Spur 2: 5µl Fraktion 12 der XIRINGO-Affinitätschromatographie; Spur 3: Protein-Ladder (10-200 kDa); Spur 4: 5µl Fraktion 15 der XIRINGO-Affinitätschromatographie; Spur 5: 10 µl Fraktion 16 der XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 6: 10 µl Fraktion 18 der XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 7: 10 µl Fraktion 20 der XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 8: 10 µl Fraktion 22 der XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 9: 10 µl Fraktion 24 der XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 10: 10 µl Fraktion 68 der XIRINGO-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 11: 10 µl Fraktion 70 der XIRINGO-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 12: 10 µl Fraktion 73 der XIRINGO-Gelfiltration (zweiter Peak). MBP-XIRINGO eluiert bereits im ersten Elutionspeak und freies MBP im zweiten Elutionspeak.

Die Reinheit von MBP-XIRINGO konnte durch Gelfiltration erhöht werden. Wie in der SDS-PAGE zu erkennen ist (siehe Abbildung 3.4 B), wurde das freie MBP im zweiten Elutionspeak eluiert (siehe Spuren 10-12 der SDS-PAGE). MBP-XIRINGO wurde ausschließlich im ersten Elutionspeak der Gelfiltration eluiert (siehe Abbildung 3.4 B, 75 kDa Protein-Bande in den Spuren 5-9).

Zur Stabilisierung der bereits gelfiltrierten EtCRK2-Proteinlösung wurden die Fraktionen 16-24 des ersten Elutionspeaks der XIRINGO-Gelfiltration gepoolt und mit der EtCRK2-Proteinlösung gemischt. MBP-XIRINGO konnte nach der Gelfiltration ohne Zusatz von Kon-

servierungsstoffen, z.B. Glycerin, monatelang bei 4°C gelagert werden. Ein Aktivitätsverlust von XIRINGO wurde nicht beobachtet.

3.3. Gelfiltration des EtCRK2/XIRINGO-Komplexes

Um den Überschuss an EtCRK2 abzutrennen, erfolgte anschließend eine Gelfiltration des EtCRK2/XIRINGO-Komplexes (siehe Abbildung 3.5 A und B).

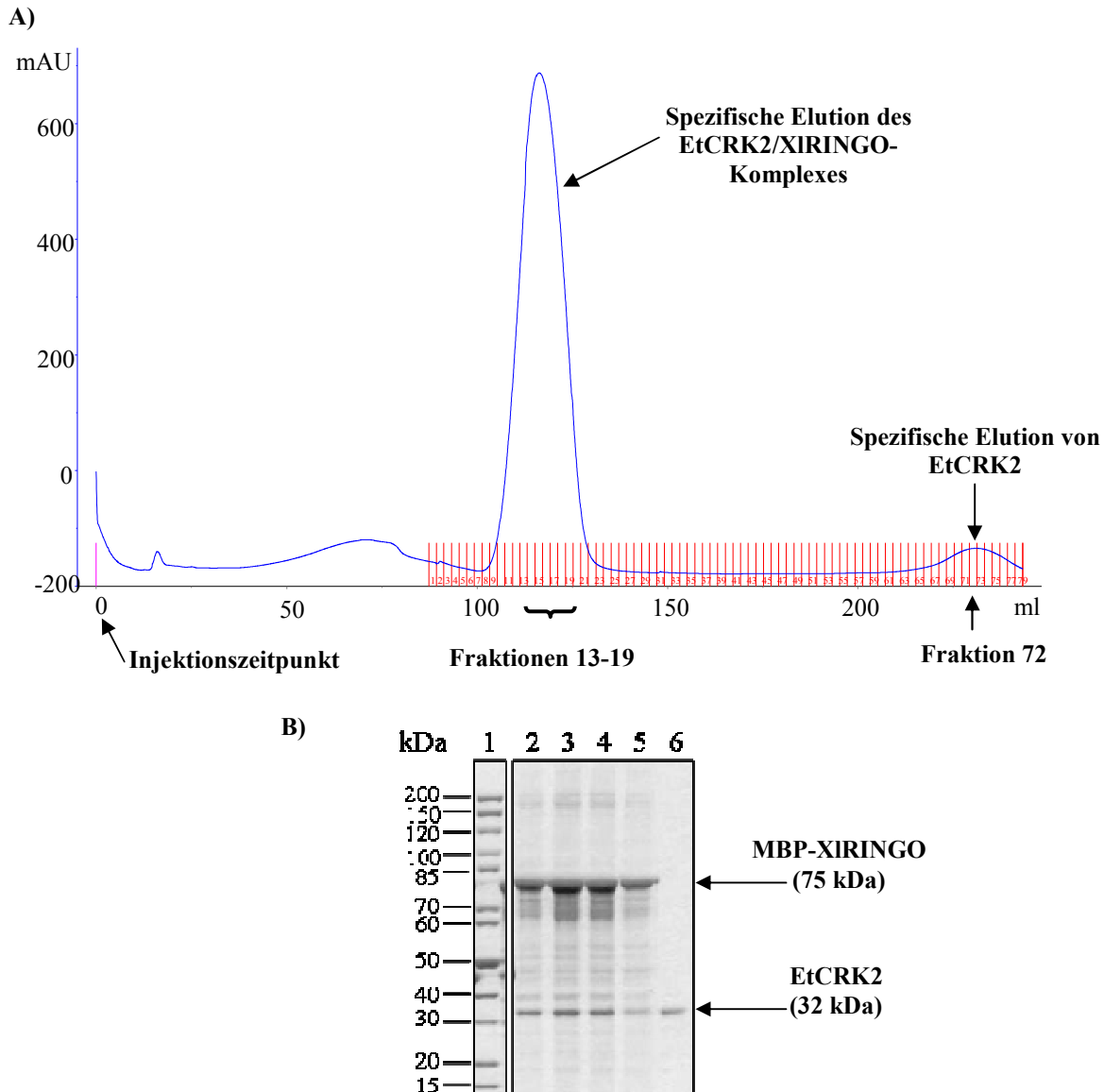


Abbildung 3.5: Elutionschromatogramm und SDS-PAGE der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration.

(A) Das UV-Spektrum ist als blaue Linie dargestellt. Im Vergleich zu der Gelfiltration von XIRINGO eluierten Proteine, welche größer als 200 kDa waren, im ersten Peak (Ausschlussvolumen). Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht (44-17 kDa) werden im zweiten Elutionspeak nach 200 ml eluiert (EtCRK2 ist 32 kDa groß). Der EtCRK2/XIRINGO-Komplex wurde erfolgreich im ersten Peak eluiert. Der EtCRK2-Überschuss wurde

vom EtCRK2/XIRINGO-Komplex abgetrennt und im zweiten Elutionspeak eluiert. Die 2 ml Fraktionen sind als rote Linien dargestellt.

(B) Spur 1: Protein-Ladder (10-200 kDa); Spur 2: 10 µl Fraktion 12 der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 3: 10 µl Fraktion 14 der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 4: 10 µl Fraktion 16 der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 5: 10 µl Fraktion 18 der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration (erster Peak); Spur 6: 15 µl Fraktion 72 der EtCRK2-Gelfiltration (zweiter Peak).

Wie auf der Abbildung des Elutionschromatogramms der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration und der dazugehörigen SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.5 A und B) zu erkennen ist, wurde der EtCRK2/XIRINGO-Komplex erfolgreich im ersten Peak eluiert (siehe SDS-PAGE, 75 kDa Protein-Bande von MBP-XIRINGO und 32 kDa Protein-Bande von EtCRK2 in den Spuren 3-5). Eine Komplexbildung von EtCRK2 und MBP-XIRINGO wurde anhand dieser Ergebnisse bestätigt, da keine weitere EtCRK2-Protein-Bande im ersten Peak der Gelfiltration eluiert werden konnte (siehe SDS-PAGE, Spuren 2-5). Im zweiten Elutionspeak konnte nur eine schwache Protein-Bande für EtCRK2 bei etwa 32 kDa detektiert werden (siehe SDS-PAGE, Spur 6). Der Überschuss an EtCRK2 wurde erfolgreich vom EtCRK2/XIRINGO-Komplex abgetrennt. Ein Überschuss an MBP-XIRINGO wäre schwieriger von dem EtCRK2/XIRINGO-Komplex abzutrennen, da nicht gebundenes MBP-XIRINGO im gleichen Elutionspeak wie der EtCRK2/XIRINGO-Komplex eluierte. Um das Gleichgewicht der Komplexbildung auf die Seite von EtCRK2/XIRINGO zu verlagern, wurde stets ein Überschuss an EtCRK2 eingesetzt.

Die Fraktionen 13-19 des ersten Elutionspeaks der EtCRK2/XIRINGO-Gelfiltration wurden gepoolt und bei 4°C gelagert. Nach der Gelfiltration war der EtCRK2/XIRINGO-Komplex stabil und konnte ohne Zusatz von Stabilisierungsstoffen, wie z. B. Glycerin, auf 1 mg/ml aufkonzentriert werden. Der Komplex konnte für mindestens 4-6 Monate bei 4°C gelagert werden. Durch Zusatz von 50 Vol. % Glycerin war der Komplex ohne Aktivitätsverlust für mindestens ein Jahr bei 4°C stabil.

3.4. Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO

Die Aktivität der durch XIRINGO aktivierten EtCRK2 konnte erfolgreich *in vitro* durch den TR-FRET-Assay bestimmt werden. Aufgrund der Sequenzidentität zwischen EtCRK2 und humanem CDK2 (68%) wurde die Aktivität des HsCDK2/HsCYCA-Komplexes als Positiv-Kontrolle für die vollständige CDK-Aktivierung beim *in vitro* TR-FRET-Assay verwendet.

Die Ergebnisse des EtCRK2-Aktivitätsassays zeigten, dass XIRINGO in der Lage war, die EtCRK2 konzentrationsabhängig zu aktivieren (siehe Abbildung 3.6). Dies zeigte sich in einem etwa 5-fach höheren Fluoreszenzsignal (aus dem Fluoreszein-markierten Histon-H1-Peptidderivat) im Vergleich zum Backgroundsignal, was einer hohen Histon-Phosphorylierungsrate entspricht.

Durch Austitrieren mit nicht Fluoreszein-markiertem Histon-H1 konnte die Aktivität der EtCRK2 erfolgreich von „FRET-counts“ in „Units“ ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) umgerechnet werden (siehe Abschnitt 2.3.11 in Material und Methoden). Nachdem die Konzentration an umgesetztem Substrat pro Minute für $0,0001 \text{ mg}$ EtCRK2 bestimmt wurde ($0,00012 \pm 0,00002 \mu\text{M}/\text{min}$), konnte die spezifische Aktivität pro Milligramm EtCRK2 berechnet werden. Diese betrug $1,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$.

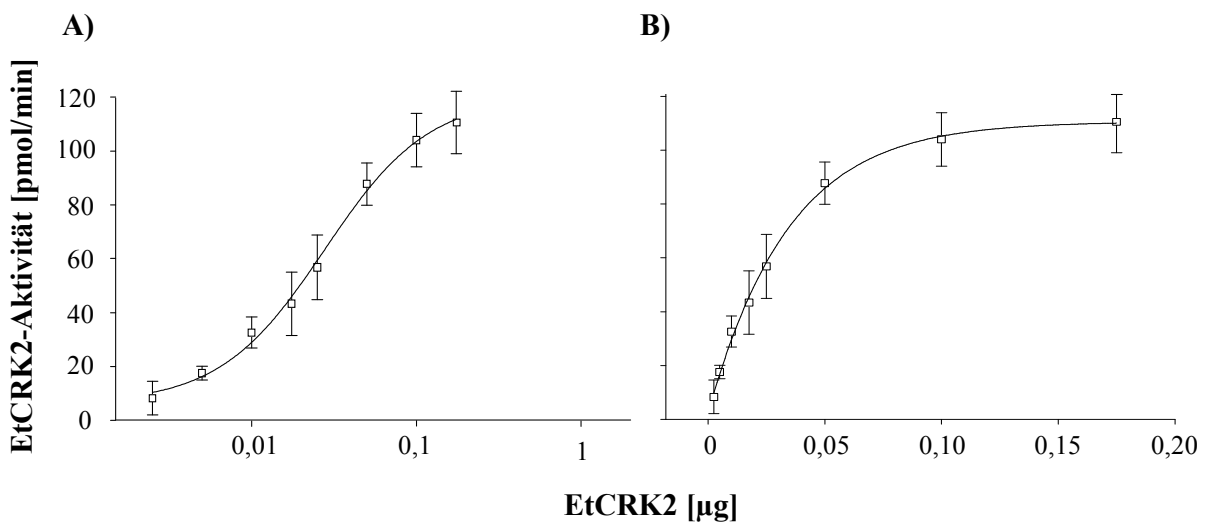


Abbildung 3.6: Spezifische Aktivität der von XIRINGO aktivierten EtCRK2.

A) Halblogarithmische Darstellung; B) Lineare Darstellung.

Ansteigende Konzentrationen an EtCRK2 aktiviert durch XIRINGO (in einem 1:10 Verhältnis) wurden zu 100 nM fluoreszierendem Substrat und $30 \mu\text{M}$ Co-Substrat (ATP) zugegeben. Die Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO wurde mittels TR-FRET-Assay nachgewiesen. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$) \pm Standardabweichung.

3.5. Klonierung des EtCYC3a-Gens

3.5.1. Isolierung von *E. tenella*-Sporozysten und Gesamt-RNA-Isolierung aus den Sporozoiten

Als Quelle für die gesamt-RNA dienten die Sporozoiten des Parasiten *E. tenella*. Mit Hilfe von Glasperlen wurde die externe Oozystenmembran von *E. tenella* aufgebrochen und die enthaltenen Sporozysten und Sporozoiten konnten erfolgreich freigesetzt werden (siehe Abschnitt 2.2.1 in Material und Methoden). Die RNA-Isolierung erfolgte aus gewonnenen freien Sporozoiten (siehe Abschnitt 2.2.2 in Material und Methoden) und ihre Reinheit konnte durch ein Agarosegel (RNase frei) (siehe Abbildung 3.7) bestätigt werden. Zur Vereinfachung des experimentellen Teils wurden 2 Proben parallel vorbereitet. Die Konzentration der gesamten RNA konnte photometrisch bestimmt werden und betrug 0,7 µg/µl (Probe 1) bzw. 1,2 µg/µl (Probe 2). Der Absorptions-Quotient $A_{260/280}$ gab Auskunft über die Reinheit der RNA-Lösungen. Für eine reine RNA sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2 liegen. Der gemessene Wert für beide Proben betrug genau 1,8. Die zu den 28S- und 18S-Untereinheiten der eukaryotischen, Ribosomen gehörenden RNAs konnten durch Gelelektrophorese eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.7). Die RNA-Präparation war somit hinsichtlich Konzentration und Qualität ausreichend für weitere Versuche.

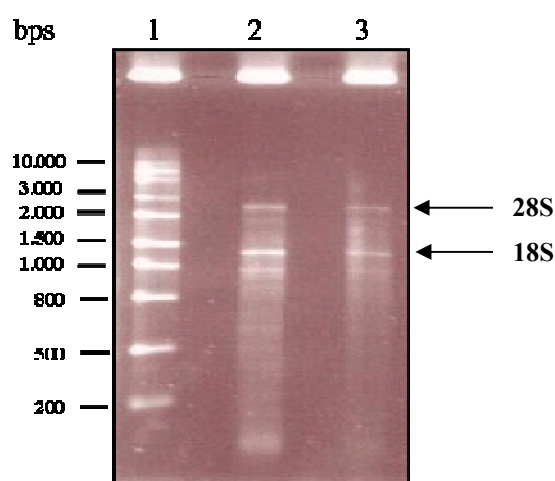


Abbildung 3.7: RNase freies Agarosegel als Nachweis und Kontrolle der isolierten *E. tenella* RNA.

Spur 1: RNA-Marker 0,2-10 kb; Spur 2: RNA Probe 1 (1,4 µg); Spur 3: RNA Probe 2 (2,4 µg). Die zwei Banden der 28S- und 18S-Untereinheiten der eukaryotischen rRNA konnten eindeutig auf dem Agarosegel identifiziert werden.

Danach konnte cDNA aus der Gesamt-RNA durch RT-PCR erfolgreich hergestellt werden. Die Konzentration der cDNA wurde direkt nach der Herstellung photometrisch bestimmt und betrug 969 µg/µl. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und in der PCR für die Klonierung des Etcyc3a-Gens verwendet.

3.5.2. Etcyc3a-Gen: von seiner Amplifizierung aus cDNA bis zur Transformation in *E. coli*

Nach der Herstellung von spezifischen *Primern* konnte das Etcyc3a-Gen mittels PCR erfolgreich aus der cDNA amplifiziert werden (siehe Abschnitt 2.2.5). Wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist, wurde nur ein Fragment bei etwa 900 bps amplifiziert, welches etwa der Größe des Etcyc3a-Gens (1074 bps) entspricht.

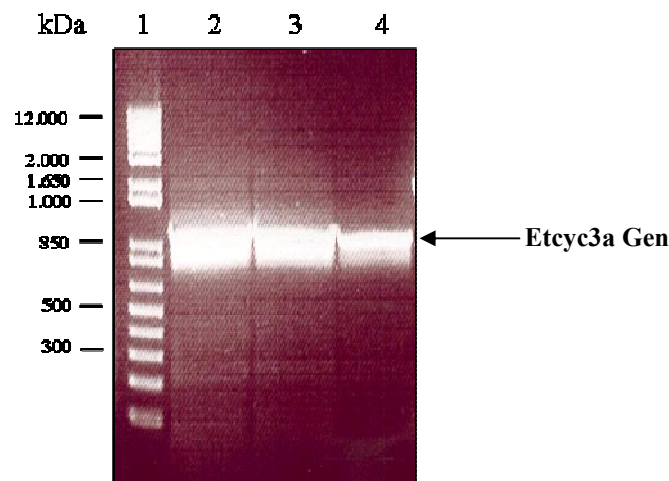


Abbildung 3.8: Agarosegel der PCR-Amplifikate des Etcyc3a Gens.

Spur 1: 1 kb Plus DNA-Marker; Spur 2-4: PCR Amplifikate (25 µl). Die deutliche Bande bei ungefähr 900 bps entspricht dem Etcyc3a Gen (theoretische Größe: 1.074 bps).

Danach erfolgten die Aufreinigung der zum Etcyc3a-Gen zugehörigen Agarosegel-Banden und die Verdauung mit *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktionsenzymen. Der pMALc2X-Vektor konnte mit den gleichen Restriktionsenzymen erfolgreich verdaut werden. Anschließend erfolgte die Ligation des EtCYC3a-Gens mit dem pMALc2X-Vektor und die Transformation dieses Plasmides durch Elektroporation (siehe Abschnitt 2.2.9 in Material und Methoden) in *E. coli* Top10 kompetenten Zellen. Sequenzanalysen bestätigten die Richtigkeit der Etcyc3a-Sequenz.

3.6. Expression und Co-Reinigung des rekombinaten EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Komplexes

Nach vollständiger Klonierung der codierenden Region des Etcyc3a-Gens in dem pMALc2X-Vektor wurden die biochemischen Eigenschaften von EtCYC3a als Kinase-Aktivator charakterisiert. Dazu wurde seine Expression und Co-Reinigung mit EtCRK2 untersucht. Die Expression von MBP-EtCYC3a und EtCRK2-His wurde aufgrund der verschiedenen IPTG-Konzentrationen getrennt durchgeführt, wie in Abschnitt 2.3.7 von Material und Methoden beschrieben ist.

In Vorversuchen konnte MBP-EtCYC3a über eine Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Nach der Reinigung fiel MBP-EtCYC3a sowie EtCRK2-His sehr schnell aus dem Eluat aus (siehe Abschnitt 3.1 und 3.3). Aus diesem Grund wurde eine Co-Reinigungsstrategie für beide Proteine angewendet. Als erstes wurde eine Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie über den His-Tag von EtCRK2 durchgeführt und als zweites eine Amylose-Affinitätschromatographie über den MBP-Tag von EtCYC3a. Die Amylose-Affinitätschromatographie lieferte die besten Co-Reinigungsergebnisse, da durch die Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie viele Verunreinigungen nicht abgetrennt werden konnten. Diese Verunreinigungen besaßen ein ähnliches Molekulargewicht wie der EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Komplex und konnten somit nicht durch eine anschließende Gelfiltration abgetrennt werden. Aufgrund dessen wurde die Co-Reinigung des EtCRK2/EtCYC3a-Komplexes durch eine Amylose-Affinitätschromatographie, wie in Abschnitt 2.3.7 (Material und Methoden) beschrieben ist, durchgeführt. Wie im Elutionschromatogramm der Amylose-Affinitätschromatographie und der entsprechenden SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.9. A und B) zu sehen ist, konnte EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a erfolgreich durch einen mit 10 mM Maltose angereicherten Phosphatpuffer eluiert werden.

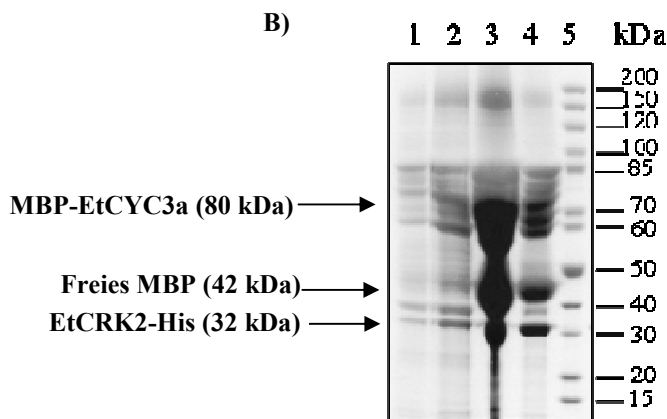
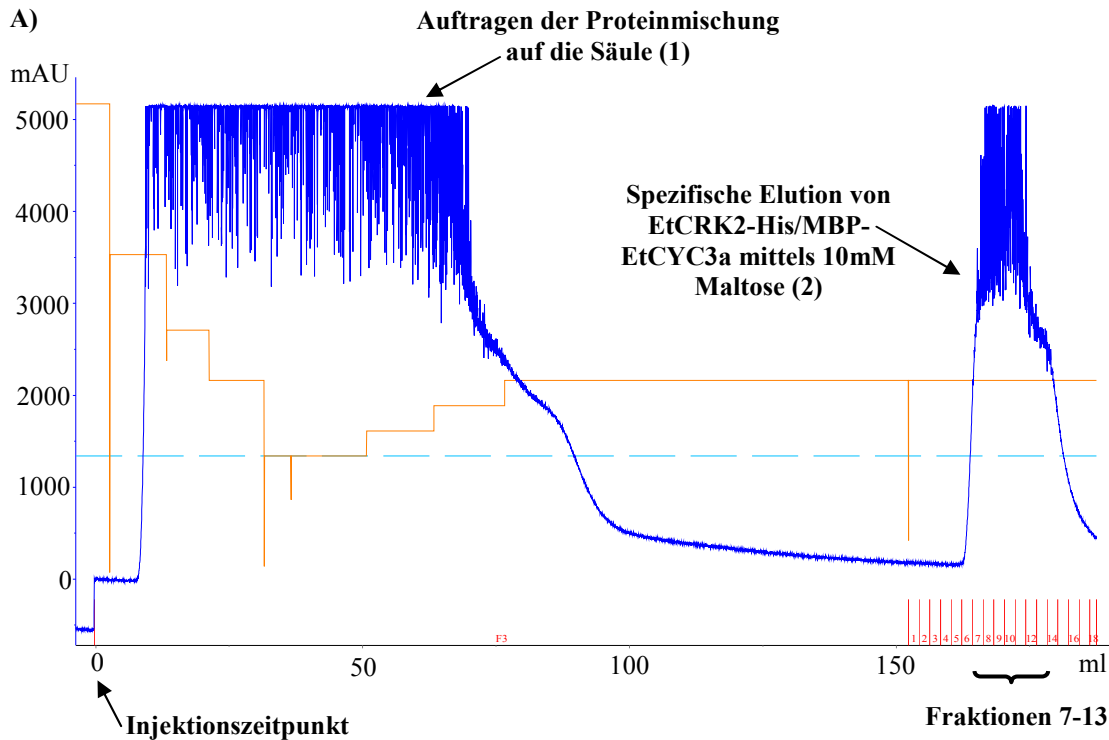


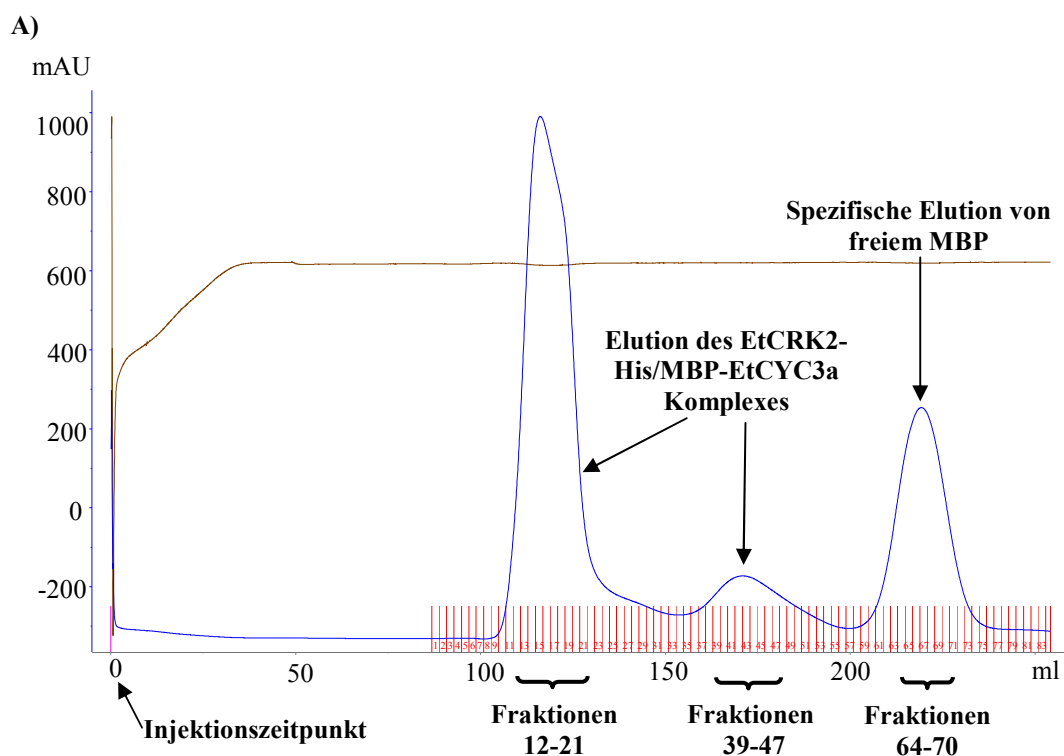
Abbildung 3.9: Elutionschromatogramm und SDS-PAGE der Amylose-Affinitätschromatographie von EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a.

(A) Auf dem Elutionschromatogramm ist das UV-Spektrum (blaue Linie) der aufgetragenen Proteinmischung (1) und des eluierten EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a Komplexes (2) zu erkennen. Nach Auftragung der Proteinmischung auf die Säule (der Injektionspunkt ist als rote Linie markiert) eluierte als erstes das ungebundene Protein (1). Der EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a Komplex wurde erfolgreich in 2 ml Fraktionen (rote Linien) durch einen Pufferwechsel (Maltose-haltiger Phosphatpuffer) eluiert (2).

(B) Spur 1: 5µl Fraktion 7 der EtCRK2/EtCYC3a-Affinitätschromatographie; Spur 2: 5µl Fraktion 9 der EtCRK2/EtCYC3a-Affinitätschromatographie; Spur 3: 5µl Fraktion 11 der EtCRK2/EtCYC3a-Affinitätschromatographie; Spur 4: 5µl Fraktion 13 der EtCRK2/EtCYC3a-Affinitätschromatographie; Spur 5: Protein-Ladder (15-200 kDa).

Die erfolgreiche Co-Reinigung des EtCYC3a und der EtCRK2 und somit ihre Komplexbildung konnte durch die entsprechende SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.9 B, Spuren 1-4) bestätigt werden. In den Fraktionen 7-13 der Affinitätschromatographie konnten die Proteinbanden für MBP-EtCYC3a bei etwa 80 kDa (MBP-EtCYC3a ist 80 kDa groß), die für freies MBP bei etwa 40 kDa (MBP ist 42 kDa groß) und die für EtCRK2 bei etwa 30 kDa (EtCRK2-His ist 32 kDa groß) detektiert werden. Die erfolgreiche Co-Reinigung der EtCRK2 bestätigt, dass sie in der Lage ist, einen stabilen Komplex mit MBP-EtCYC3a zu bilden. Die EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-enthaltenden Elutionsfraktionen 7-13 wurden gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Da neben EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a zusätzlich unspezifische Proteine und freies MBP eluiert wurden, erfolgte anschließend eine Gelfiltration mit dem bereits beschriebenen Gelfiltrationspuffer. Wie in Abbildung 3.10 A des Elutionschromatogramms der EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Gelfiltration zu sehen ist, konnten drei Elutionspeaks detektiert werden. Mit Hilfe der entsprechenden SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.10 B) konnte festgestellt werden, dass der EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a Komplex in dem ersten und zweiten Peak und das freie MBP im dritten Peak erfolgreich abgetrennt wurden.



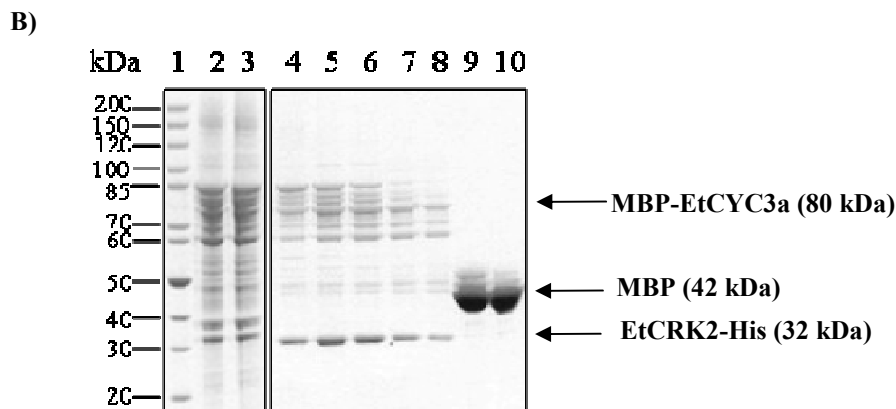


Abbildung 3.10: Elutionschomatogramm und SDS-PAGE der Gelfiltration des EtCRK2/EtCYC3a-Komplexes.

(A) Das UV-Spektrum ist als blaue Linie dargestellt. Im ersten Peak wurden Proteine eluiert, die größer als 200 kDa sind (maximaler Trennungsbereich der Säule) und zum Ausschlussvolumen gehören (nach 110-130 ml Elutionsvolumen). Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht (160-60 kDa) werden im zweiten Elutionspeak nach 160-180 ml und Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht (44-17 kDa) werden im dritten Elutionspeak nach 200 ml eluiert (freies MBP ist 42 kDa groß). Die 2ml Fraktionen sind als rote Linien dargestellt.

(B) Spur 1: 5 µl Protein-Ladder (15-200 kDa; Spur 2: 10 µl Fraktion 18 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (erster Peak); Spur 3: 10 µl Fraktion 19 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (erster Peak); Spur 4: 15 µl Fraktion 39 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 5: 15 µl Fraktion 43 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 6: 15 µl Fraktion 45 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 7: 15 µl Fraktion 49 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 8: 15 µl Fraktion 51 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (zweiter Peak); Spur 9: 15 µl Fraktion 65 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (dritter Peak); Spur 10: 15 µl Fraktion 69 der EtCRK2/EtCYC3a-Gelfiltration (dritter Peak).

Durch die Gelfiltration konnte die Reinheit des EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Komplexes erhöht werden. Wie in der entsprechenden SDS-PAGE zu sehen ist (siehe Abbildung 3.10 B), erfolgte die Trennung des freien MBPs im dritten Elutionspeak (Spuren 9-10 der SDS-PAGE). Die EtCRK2-His zeigte eine hohe Affinität zu dem MBP-EtCYC3a und konnte als EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a Komplex mit 112 kDa Molekulargewicht sowohl im ersten als auch im zweiten Elutionspeak detektiert werden (siehe Abbildung 3.10 B, 80 kDa und 32 kDa Protein-Banden in den Spuren 2-8 der SDS-PAGE). Die Fraktionen 12-21 des ersten Elutionspeaks und die Fraktionen 39-47 des zweiten Elutionspeaks wurden gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Nach der Gelfiltration konnte der EtCRK2-His/MBP-EtCYC3a-Komplex ohne zu präzipitieren bis auf 3 mg/ml aufkonzentriert werden.

Ohne Zusatz von Konservierungsstoffen war der Komplex maximal 1-2 Monate bei 4°C aktiv. Mit einem Glycerin-Zusatz von 50 Vol. % konnte die Lagerungszeit bei 4°C ohne Aktivitätsverlust auf mindestens ein Jahr verlängert werden.

3.7. *In vitro* Aktivierung von EtCRK2 mittels EtCYC3a

Wie bereits beschrieben, bildet die EtCRK2 einen stabilen Komplex mit MBP-EtCYC3a. Um zu überprüfen, ob die Kinase durch das EtCYC3a aktiviert werden konnte, wurde ihre Aktivität *in vitro* mit Hilfe des nicht radioaktiven TR-FRET-Assays getestet. Hiermit konnte zusätzlich ermittelt werden, in welchem Elutionspeak der Gelfiltration sich der aktive EtCRK2/EtCYC3a-Komplex befindet, da dieser sowohl im ersten als auch im zweiten Peak detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 2.3.10 in Material und Methoden). Als Substrat diente Histon-H1, und als Positivkontrolle wurde der EtCRK2/XIRINGO-Komplex im Assay eingesetzt. Die Ergebnisse aus dem TR-FRET-Assay zeigten, dass EtCYC3a in der Lage ist, EtCRK2 vergleichbar zu XIRINGO zu aktivieren (siehe Abbildung 3.11).

Die Berechnung der spezifischen Aktivität der durch EtCYC3a aktivierten EtCRK2 betrug $0,15 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, was etwa ein Zehntel der spezifischen Aktivität der durch XIRINGO aktivierten EtCRK2 entsprach (siehe einen Vergleich von beiden Aktivitäten in der Abbildung 3.11). Diese Ergebnisse zeigten, dass EtCYC3a ein zehnfach niedrigeres Aktivierungspotential besitzt als XIRINGO.

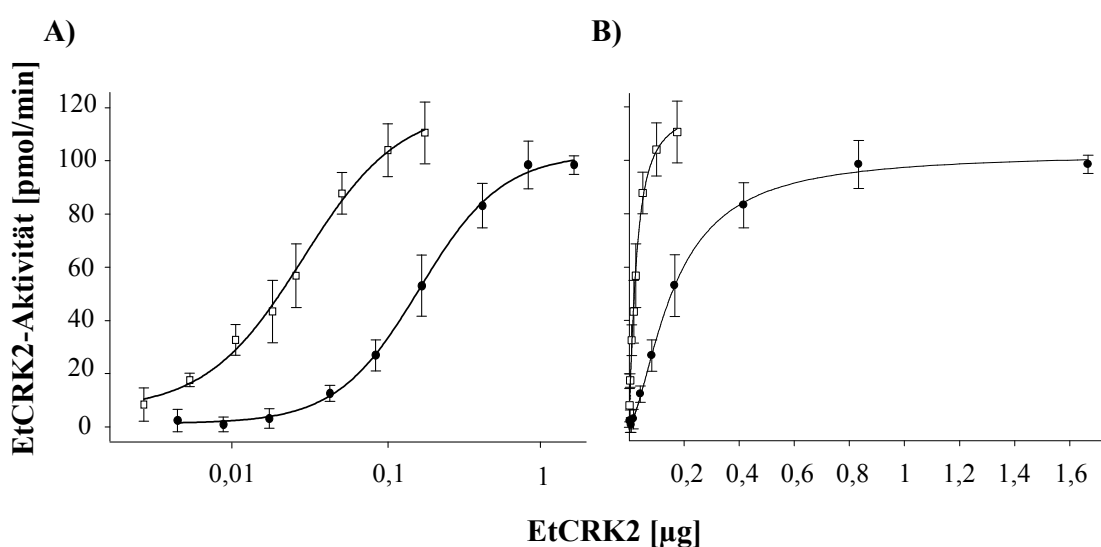


Abbildung 3.11: Vergleich zwischen der spezifischen Aktivität der durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierten EtCRK2.

A) Halblogarithmische Darstellung; B) Lineare Darstellung.

Die gemittelten Messpunkte der durch XIRINGO und EtCYC3a induzierten EtCRK2-Aktivität sind als weiße Vierecke bzw. als schwarze Kreise dargestellt. Obwohl die Aktivität der EtCRK2 durch beide Aktivatoren etwa die gleiche maximale Aktivität erreicht, ist die spezifische Aktivität der durch XIRINGO aktivierten EtCRK2 fast zehnfach höher im Vergleich zu EtCYC3a. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert zwischen mindestens vier verschiedenen Experimenten ($n \geq 4$) \pm Standardabweichung.

Die Ergebnisse des TR-FRET-Assays zeigten, dass sich der aktive EtCRK2/MBP-EtCYC3a-Komplex nur im zweiten Elutionspeak befand. Hingegen war der im ersten Peak eluierte Komplex inaktiv.

3.8. Optimierung des TR-FRET-Assays für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2

Der TR-FRET-Assay wurde bereits in der Literatur für die humane CDK2 beschrieben (LEBAKKEN *et al.*, 2009). Mit Hilfe des IMAP™ TR-FRET *Screening Express* Kits konnten verschiedene Parameter des Assays für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2 angepasst und erfolgreich optimiert werden. Diese Parameter waren: die Reaktionszeit, die EtCRK2/Aktivator-Komplex-Konzentration (sowohl für EtCYC3a als auch für XIRINGO), die Substratkonzentration (Fluoreszein-markiertes Histon-H1) und die Co-Substratkonzentration (ATP). Die Ergebnisse nach Optimierungen der genannten Parameter sind in den folgenden Abschnitten (3.8.1-3.8.3) beschrieben.

3.8.1. Bestimmung der optimalen Assay-Reaktionszeit

Der TR-FRET-Assay ist als Endpunkt-Bestimmung des Fluoreszein-markierten phosphorylierten Substrats konzipiert. Aufgrund der Testbedingungen, unter denen die Reaktion mit dem progressiven Bindungspuffer gestoppt wurde, erfolgte eine pseudokinetische Messung der Fluoreszenz. Hierzu wurde mit Hilfe mehrerer Versuchsansätze das Zeitfenster, in dem die Phosphorylierung des Substrates durch den EtCRK2/Aktivator-Komplex linear verläuft, ermittelt (siehe Abschnitt 2.3.10 in Material und Methoden).

Die so erzielten pseudokinetischen Ergebnisse für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2 waren mit einer kinetischen Messung vergleichbar und zeigten, dass die Reaktionen in einem Zeitfenster von 5-50 min linear verlaufen (siehe Abbildung 3.12).

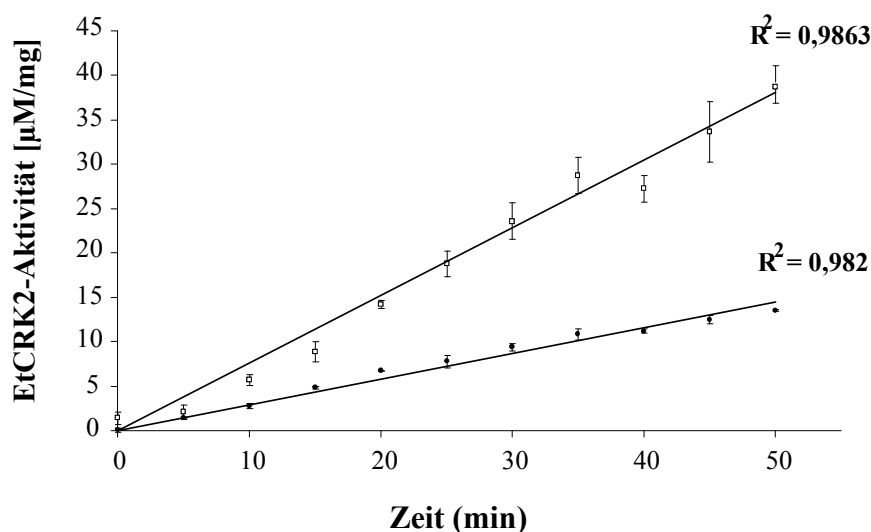


Abbildung 3.12: Vergleich der spezifischen Aktivität von der durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierten EtCRK2.

Gezeigt sind die gemittelten Messpunkte der durch XIRINGO (weiße Vierecke) und EtCYC3a (schwarze Kreise) aktivierten EtCRK2. Die lineare Regression der jeweiligen Messwerte ergab für beide Messungen einen Korrelationskoeffizienten (R^2) von etwa eins, was für eine gute Korrelation der Messwerte spricht. Beide Reaktionen laufen innerhalb von 50 min linear ab. Alle dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Die gezeigten Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung.

3.8.2. K_m -Bestimmung für das Co-Substrat (ATP)

Für die biochemische Charakterisierung der EtCRK2 wurde die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) des Co-Substrates bestimmt. Der K_m -Wert der durch EtCYC3a aktivierten EtCRK2 für das Co-Substrat (ATP) betrug $9,05 \pm 0,76 \mu\text{M}$ und der K_m -Wert der durch XIRINGO aktivierten EtCRK2 betrug $9,39 \pm 1,21 \mu\text{M}$ (siehe Abschnitt 2.3.12 in Material und Methoden und Abbildung 3.13).

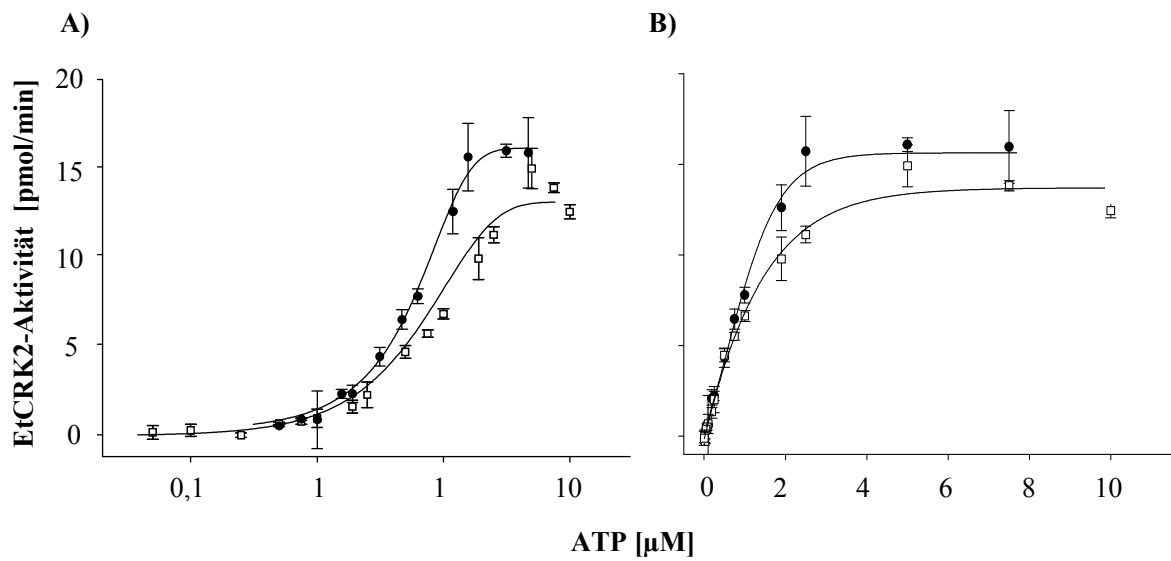


Abbildung 3.13: Vergleich der K_m -Werte des Co-Substrats für die EtCRK2 (aktiviert durch EtCYC3a sowie durch XIRINGO).

A) Halblogarithmische Darstellung; B) Lineare Darstellung.

Gezeigt sind gemittelte Messpunkte der durch XIRINGO (weiße Vierecke) und EtCYC3a (schwarze Kreise) aktivierten EtCRK2. Zunehmende Co-Substratkonzentrationen wurden zu einer konstanten Konzentration an EtCRK2 und Aktivator und Substrat im *in vitro* TR-FRET-Assay zugegeben. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus drei Experimenten ($n = 3$) \pm der Standardabweichung. Der K_m -Wert für das Co-Substrat entspricht $9,05 \pm 0,76 \mu\text{M}$ für die durch EtCYC3a aktivierte EtCRK2 und $9,39 \pm 1,21 \mu\text{M}$ für die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2.

3.8.3. K_m -Bestimmung für das Fluoreszein-markierte Substrat

Für die biochemische Charakterisierung der EtCRK2 wurde die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) des Substrates bestimmt. Der K_m -Wert der durch EtCYC3a aktivierten EtCRK2 zusammen mit dem Fluoreszein-markierten Substrat betrug $2,05 \pm 1,18 \mu\text{M}$ und der durch XIRINGO aktivierte EtCRK2 betrug $1,72 \pm 1,10 \mu\text{M}$ (siehe Abschnitt 2.3.12 in Material und Methoden und Abbildung 3.14).

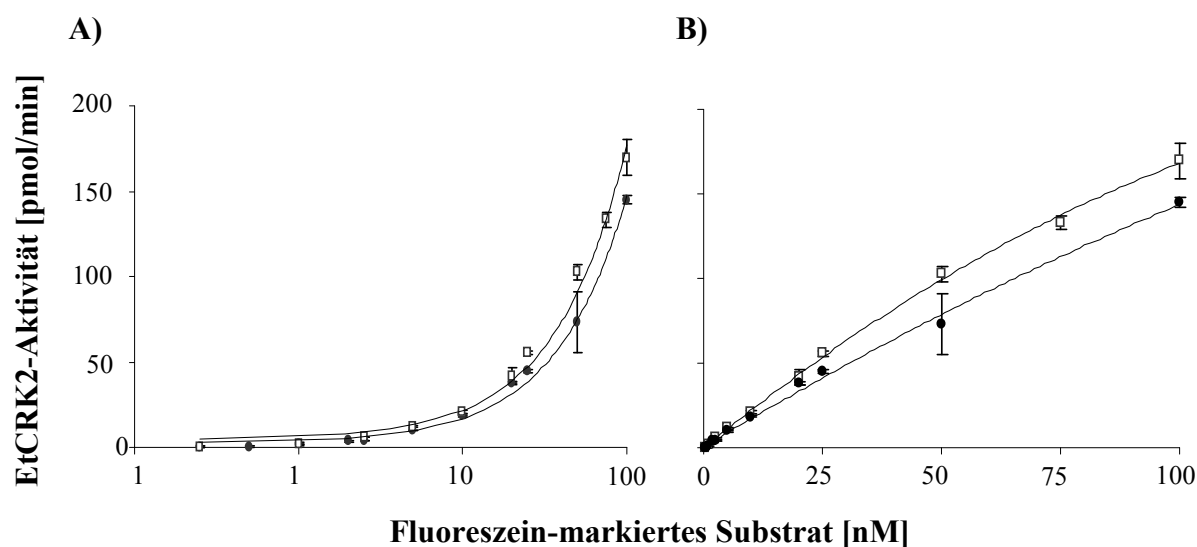


Abbildung 3.14: Vergleich der K_m -Werte des Fluoreszein-markierten Substrats für die EtCRK2 (aktiviert durch EtCYC3a sowie durch XIRINGO).

A) Halblogarithmische Darstellung; B) Lineare Darstellung.

Gezeigt sind gemittelte Messpunkte der durch XIRINGO (weiße Vierecke) und EtCYC3a (schwarze Kreise) aktivierten EtCRK2. Zunehmende Fluoreszein-markierte Substratkonzentrationen wurden zu einer konstanten Konzentration an EtCRK2 und Aktivator und ATP im *in vitro* TR-FRET-Assay zugegeben. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus drei Experimenten ($n = 3$) \pm der Standardabweichung. Der K_m -Wert für das Fluoreszein-markierte Substrat entspricht $2,05 \pm 1,18 \mu\text{M}$ für die durch EtCYC3a aktivierte EtCRK2 und $1,72 \pm 1,10 \mu\text{M}$ für die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2.

In Tabelle 3.1 sind die Werte für die spezifische Aktivität und die K_m -Werte für das Fluoreszein-markierte Substrat und das Co-Substrat (ATP) für die EtCRK2 (aktiviert durch EtCYC3a und XIRINGO) dargestellt.

Tabelle 3.1: Spezifische Aktivität, K_m für ATP und K_m für das Fluoreszein-markierte Substrat für die durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierte EtCRK2.

	EtCRK2/XIRINGO	EtCRK2/EtCYC3a
Spezifische Aktivität / ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$1,29 \pm 0,24$	$0,15 \pm 0,02$
K_m für ATP [μM]	$9,39 \pm 1,21$	$9,05 \pm 0,76$
K_m für Fluoreszein-markiertes Substrat [μM]	$1,72 \pm 1,10$	$2,05 \pm 1,18$

3.9. *In vitro* Charakterisierung von potentiellen Inhibitoren der durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierten EtCRK2 und der durch HsCYCA aktivierten HsCDK2

Für das *in vitro* Screening nach Leitstrukturen zur Entwicklung eines neuen Antikozidiums konnte der nicht-radioaktive TR-FRET-Assay für die EtCRK2 erfolgreich etabliert werden (siehe Abschnitt 3.8). Anschließend erfolgte das Screening nach potentiellen EtCRK2-Inhibitoren mittels *in vitro* Testung bekannter CDK-Inhibitoren und einer kommerziell erhältlichen Substanzbibliothek. Zusätzlich erfolgte die Testung von Hit-Verbindungen, die mittels *in silico* Methoden identifiziert wurden. Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Workflow zur Identifizierung von potentiellen EtCRK2-Inhibitoren ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

Um die Selektivität der Inhibitoren auf die EtCRK2 zu untersuchen, wurden alle Hit-Verbindungen sowie sechs CDK-Standardinhibitoren in einem Sekundär-Assay auf die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 getestet (siehe Tabellen 3.2, 3.3 und 3.4).

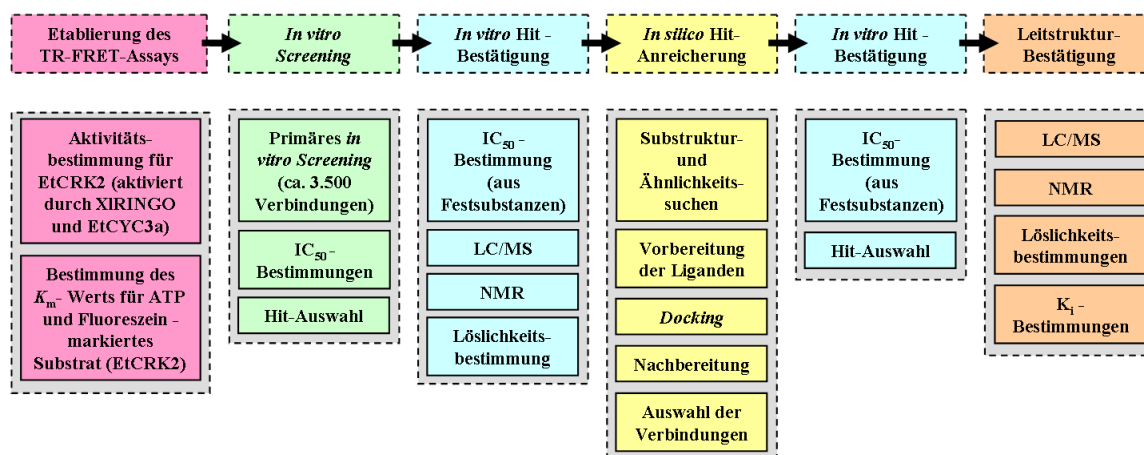


Abbildung 3.15. Workflow zur *in vitro* Identifizierung potentieller EtCRK2-Inhibitoren.

Dargestellt sind die sechs Hauptschritte im Prozess zur Identifizierung von EtCRK2-Inhibitoren. Dieser Prozess ist ein kombinierter Ansatz aus *in silico* sowie *in vitro* Arbeitsschritten. Der Schritt „Hit-Anreicherung“ war ein iterativer zyklischer Prozess und wurde mehrfach *in silico* durchlaufen [ENGELS, 2010].

3.9.1 *In vitro* Aktivitätsbestimmung von CDK-Standardinhibitoren auf EtCRK2 und HsCDK2

Als erstes wurde überprüft ob auch bekannte CDK-Inhibitoren auf der EtCRK2 aktiv sind. Darüber hinaus wurden sechs Standardinhibitoren getestet: Staurosporin [LOSIEWICZ *et al.*, 1994], Indirubin-5'-sulfonat [GRAY *et al.*, 1998], Alsterpaullon [HOESSEL *et al.*, 1999], Purvalanol A [ZAHAREVITZ *et al.*, 1999], Flavopiridol [MEIJER *et al.*, 2000] und 10-Z-Hymenialdisin [RÜEGG & BURGESS, 1989]. In einem Sekundär-Assay wurde auch die HsCDK2 mitgetestet. Die IC_{50} - und K_i -Werte der sechs CDK-Standardinhibitoren sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: IC₅₀- und K_i-Werte bekannter CDK-Standardinhibitoren für EtCRK2 und HsCDK2.

Standard	IC ₅₀ [nM]			K _i [nM]		
	EtCRK2/ XIRINGO	EtCRK2/ EtCYC3a	HsCDK2/ HsCYCA	EtCRK2/ XIRINGO	EtCRK2/ EtCYC3a	HsCDK2/ HsCYCA
Staurosporin	90 ± 10	190 ± 90	3 ± 1	20 ± 10	530 ± 200	1 ± 0
Indirubin-5'-sulfonat	670 ± 180	940 ± 310	230 ± 110	170 ± 30	240 ± 100	80 ± 10
Purvalanol A	800 ± 110	1030 ± 180	140 ± 40	80 ± 10	360 ± 130	40 ± 1
Alsterpaulon	220 ± 60	640 ± 340	160 ± 80	70 ± 2	210 ± 40	60 ± 0
Flavopiridol	40 ± 10	260 ± 70	50 ± 10	10 ± 3	260 ± 20	20 ± 4
10-Z-Hymenialdisin	440 ± 80	930 ± 40	120 ± 20	50 ± 20	190 ± 10	30 ± 1

Die angegebenen IC₅₀- und K_i-Mittelwerte ± der jeweiligen Standardabweichung stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Die IC₅₀- und die K_i-Werte für die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 sind vergleichbar mit Literaturangaben: [a] nach FISCHER & LANE, 2000; [b] nach BAIN *et al.*, 2003; [c] nach HARDCASTLE *et al.*, 2002 und [d] nach LOSIEWICZ *et al.*, 1994.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten IC₅₀- und die K_i-Werte für die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 sind vergleichbar mit Literaturangaben (siehe Tabelle 3.2). Literaturrecherchen nach K_i-Werten für die CDK-Standardinhibitoren ergaben nur den K_i-Wert für Flavopiridol. Dieser betrug 41 nM für die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 [LOSIEWICZ *et al.*, 1994]. Der mittels des TR-FRET-Assays in dieser Arbeit bestimmte K_i-Wert des Flavopiridols für HsCDK2 betrug 20 nM.

3.9.2. *In vitro* Primärscreen einer Substanzbibliothek auf die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2

Eine kommerziell erhältliche Substanzbibliothek aus ca. 3.500 Verbindungen wurde in einem *in vitro* Primärscreen auf die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2 erfolgreich getestet (siehe Abschnitt 2.3.13 in Material und Methoden). 53 Hits (etwa 1,5% der getesteten Verbindun-

gen) zeigten eine Inhibition der Kinase-Aktivität von über 30% bei einer Inhibitor-Konzentration von 30 μ M.

3.9.3. *In vitro* Charakterisierung der Primärscreen-Hits für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2 mittels IC_{50} -Bestimmung

Im Rahmen der „Hit-Konfirmierung“ der Primärscreen-Hits (siehe 3.9.1) erfolgte die *in vitro* Bestimmung der IC_{50} -Werte für die durch XIRINGO und EtCYC3a aktivierte EtCRK2 und für die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 (siehe Abschnitt 2.3.14 in Material und Methoden). Von den 53 Hits aus dem Primärscreen zeigten 23 Verbindungen IC_{50} -Werte unter 100 μ M für die EtCRK2. Zur weiteren Charakterisierung der 23 getesteten Verbindungen wurde eine Wiederholung der Bestimmung der IC_{50} -Werte ausgehend von Festsubstanzen und Löslichkeitsexperimenten, LC/MS- und NMR-Messungen durchgeführt. 14 Substanzen konnten erfolgreich *in vitro* als Hits für EtCRK2 bestätigt werden (siehe Abbildung 3.18). Datenbanksuchen in SciFinder von Chemical Abstracts Service (Columbus, USA) bestätigten, dass die vierzehn Hits zu bisher nicht literaturbekannten CDK-Inhibitoren gehören. Es wurden Substanzfamilien identifiziert, deren Mitglieder zu der gleichen chemischen Strukturklasse gehören, oder die einen gemeinsamen *Scaffold* mit ähnlichen Pharmakophor-Eigenschaften besitzen. Hierfür wurden Cluster gebildet, die auf den *MDL fingerprints* basieren. Aus den 14 Substanzen wurden drei Cluster identifiziert. Diese Cluster repräsentieren Mitglieder der Naphthochinone, der 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ole und der 8-Hydroxychinoline. In Abbildung 3.16 sind beispielhaft die IC_{50} -Kurven für den Inhibitor BES124764 (2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ol) und den CDK-Standardinhibitor 10-Z-Hymenialdisin für die durch XIRINGO und durch EtCYC3a aktivierte EtCRK2 dargestellt.

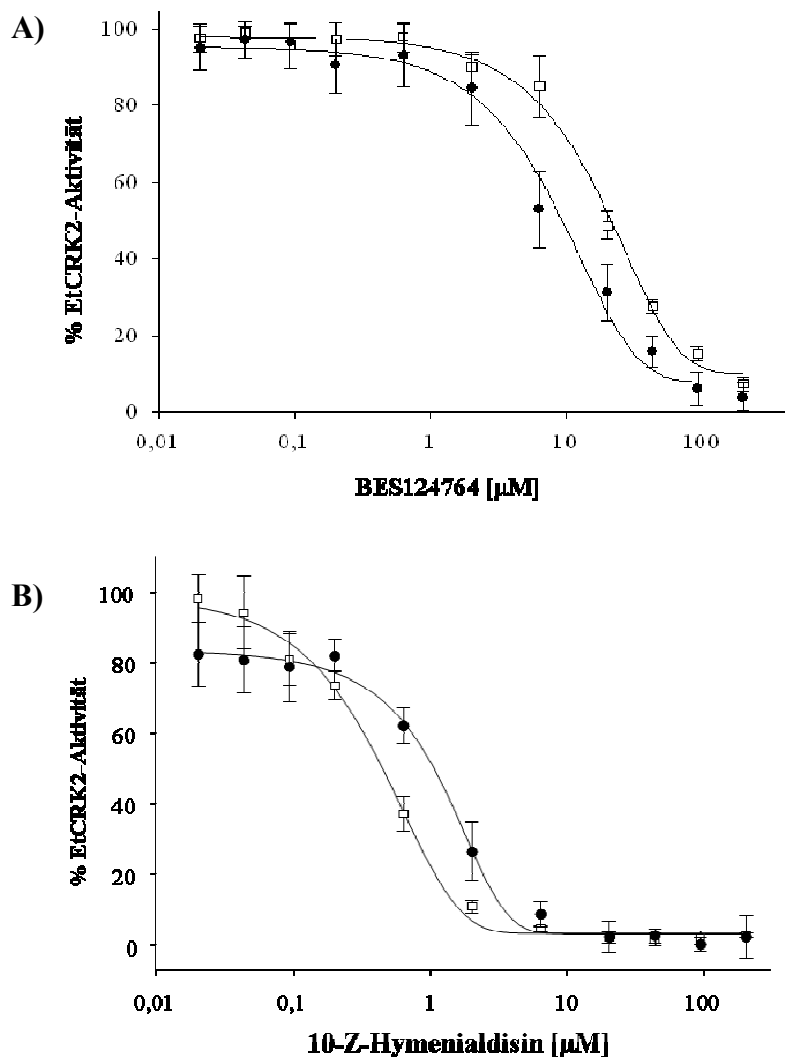


Abbildung 3.16: IC₅₀-Kurven von der Verbindung BES124764 und von einem CDK-Standardinhibitor für die durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierte EtCRK2.

A) IC₅₀-Kurven von BES124764 (2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ol); B) IC₅₀-Kurven von 10-Z-Hymenialdisin.

Weißer Vierecke beschreiben die IC₅₀-Kurve der durch XIRINGO aktivierten EtCRK2 und schwarze Kreise die IC₅₀-Kurve der durch EtCYC3a aktivierten EtCRK2. Elf verschiedene Inhibitorkonzentrationen sind auf der X-Achse dargestellt. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 3 verschiedenen Experimenten ($n \geq 3$) \pm der Standardabweichung. Der IC₅₀-Wert wurde als die Inhibitorkonzentration, bei der die Kinase-Aktivität zur Hälfte inhibiert wird, berechnet. Der IC₅₀-Wert für den EtCRK2/EtCYC3a Komplex für BES124764 beträgt $7,35 \pm 1,82 \mu\text{M}$ und für den EtCRK2/XIRINGO Komplex $18,16 \pm 3,72 \mu\text{M}$. Der IC₅₀-Wert für den EtCRK2/EtCYC3a Komplex für 10-Z-Hymenialdisin beträgt $0,93 \pm 0,04 \mu\text{M}$ und für den EtCRK2/XIRINGO Komplex $0,44 \pm 0,08 \mu\text{M}$.

3.9.4. Ermittlung des Inhibitionstyps nach Lineweaver-Burk und Bestimmung der K_i -Werte

Um den Inhibitionstyp der identifizierten EtCRK2-Inhibitoren zu ermitteln und ihr Inhibitionspotential bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, wurden K_i -Werte bestimmt, da diese im Unterschied zu IC_{50} -Werten eine vergleichbare Konstante darstellen. Zudem erlaubten die ermittelten K_i -Werte für die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 einen Vergleich mit Literaturdaten. Die Lineweaver-Burk Darstellung zeigte hierbei an, ob es sich um eine kompetitive, nicht-kompetitive oder unkompetitive Inhibition handelte. Für die Berechnung von K_i -Werten werden häufig kinetische Messungen durchgeführt, um gewährleisten zu können, dass die Messwerte innerhalb des linearen Bereiches der Reaktion liegen. Daher wurde die Zeit, in der die Reaktion linear läuft, durch eine Pseudokinetik bestimmt (siehe Abschnitt 3.8.1).

Die Hits BES130131 (Naphthochinon) und BES124764 (2-Pyrimidinyl-aminopiperidinpropan-2-ol) wurden als hoch aktive Verbindungen (IC_{50} -Wert unter 20 μM) gegen die EtCRK2 identifiziert. Daher wurden die K_i -Werte von diesen Inhibitoren bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.15 in Material und Methoden). Die gemessenen K_i -Werte im Vergleich mit den entsprechenden IC_{50} -Werten der genannten Hits sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Von den zwei getesteten Inhibitoren zeigte nur BES124764 (2-Pyrimidinyl-aminopiperidinpropan-2-ol) eine hohe Spezifität auf EtCRK2 und war nicht aktiv auf die HsCDK2. Die entsprechenden Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme von BES124764 für die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2 sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

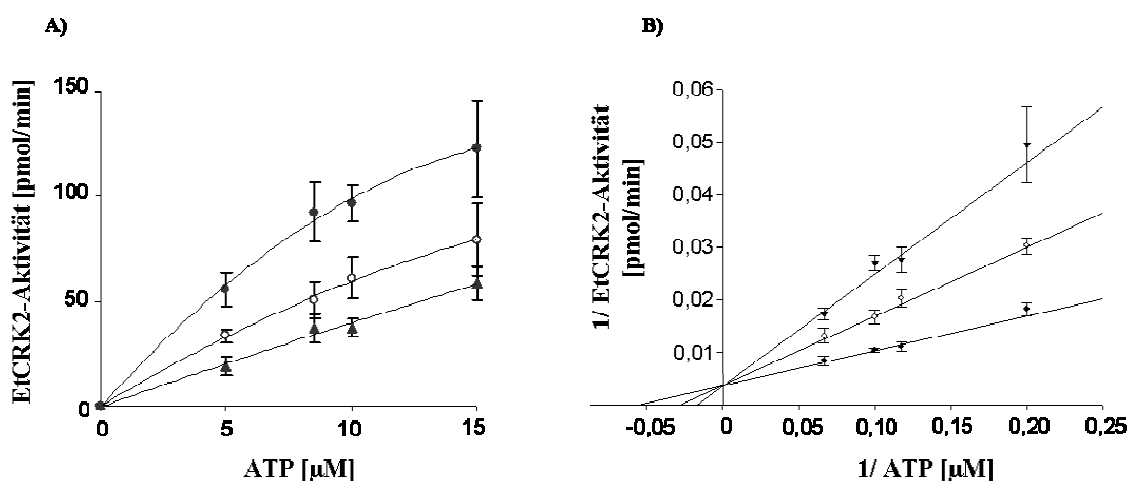


Abbildung 3.17: Michaelis-Menten (A) und Lineweaver-Burk Diagramm (B) des Inhibitors BES124764 für die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2.

Die Inhibitor-Konzentrationen waren: 1 μ M (schwarze Kreise), 5 μ M (weiße Kreise) und 10 μ M (schwarze Dreiecke). Die Co-Substratkonzentrationen waren: 5 μ M, 8,5 μ M, 10 μ M und 15 μ M. Der K_i -Wert für BES124764 betrug $4,33 \pm 0,92 \mu$ M und der Inhibitor zeigte eine ATP-kompetitive Inhibition.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm von BES124764 und von den weiteren getesteten Hits zeigte, dass die EtCRK2 und die HsCDK2 ATP-kompetitiv inhibiert werden. Somit bestätigt sich die durch molekulares *Docking* vorhergesagte Adressierung der ATP-Bindetasche [ENGELS, 2010].

3.9.5. *In vitro* Aktivitätsbestimmung von weiteren Test-Verbindungen auf EtCRK2 und HsCDK2

Es konnten durch *in silico* Hit-Anreicherung weitere potentielle EtCRK2-Inhibitoren aus kommerziellen Verbindungs-Bibliotheken vorhergesagt werden [ENGELS, 2010; ENGELS *et al.*, 2010]. Für die Vorhersage wurden sowohl *in silico* Ähnlichkeitssuchen unter Verwendung der Strukturinformation der 14 bereits identifizierten Hits als auch molekulare *Docking*-Methoden angewandt [ENGELS, 2010; ENGELS *et al.*, 2010]. In Abbildung 3.18 ist der *in silico Workflow* dieser Hit-Anreicherungsprozedur schematisch dargestellt. Mit Hilfe dieser Methode konnten insgesamt 64 Testkandidaten gegen EtCRK2 und HsCDK2 vorgeschlagen werden. Anschließend wurden die IC_{50} -Werte dieser Substanzen *in vitro* im TR-FRET- Assay auf EtCRK2 und HsCDK2 bestimmt. Es konnten fünf Hits mit IC_{50} -Werten unter 100 μ M gegen EtCRK2 und HsCDK2 identifiziert werden. Diese fünf Verbindungen gehören zu den bereits identifizierten 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-olen und 8-Hydroxychinolinen. Zusammen mit den 14 bereits *in vitro* identifizierten Hits wurden insgesamt 19 Hits identifiziert (siehe Abbildung 3.18).

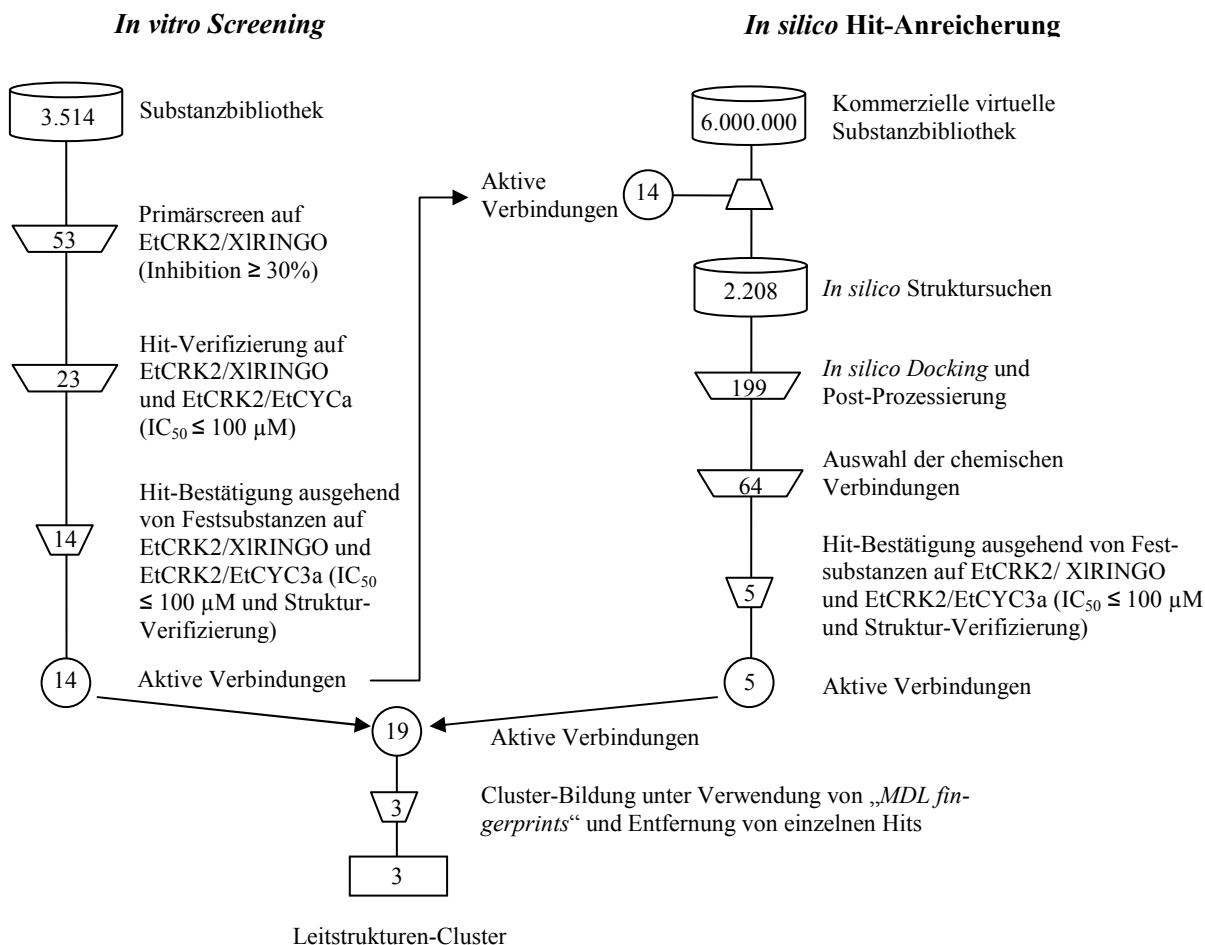
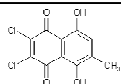
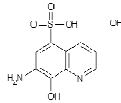
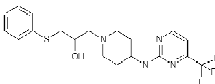


Abbildung 3.18: Filterschritte des *in vitro* Screenings und der *in silico* Hit-Anreicherung.

Insgesamt konnten 19 Inhibitoren der EtCRK2 und der HsCDK2 mit Hilfe des oben gezeigten *Workflows* identifiziert werden. Hiervon gehören 14 Hits zu den bestätigten Inhibitoren nach *in house* Substanzbibliothek und die weiteren fünf Hits gehören zu den *in vitro* bestätigten Inhibitoren nach *in silico* Hit-Anreicherung. Nach Cluster-Bildung unter Verwendung von „MDL fingerprints“ wurden drei Cluster identifiziert und von jedem Cluster die aktivsten Vertreter als Leitstrukturen ausgewählt.

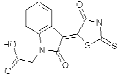
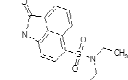
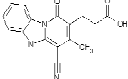
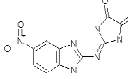
Tabelle 3.3: IC₅₀- und K_i-Werte der drei hoch aktiven Verbindungen aus der *in house* Substanzbibliothek für EtCRK2 und HsCDK2.

Struktur	ID/ Strukturklasse	IC ₅₀ [μM]			K _i [μM]		
		EtCRK2/ XIRINGO	EtCRK2/ EtCYC3a	HsCDK2/ HsCYCA	EtCRK2/ XIRINGO	EtCRK2/ EtCYC3a	HsCDK2/ HsCYCA
	BES130131 Naphthochinon	14,84 ± 8,41	18,08 ± 1,03	14,40 ± 1,52	5,25 ± 0,20	6,87 ± 1,74	3,35 ± 1,06
	BES312351 8-Hydroxychinolin	7,13 ± 2,49	6,50 ± 2,49	5,16 ± 2,85	0,94 ± 0,31	4,67 ± 2,02	0,78 ± 0,61
	BES124764 2-Pyrimidinyl- aminopiperidin- propan-2-ol	18,56 ± 3,72	7,35 ± 1,82	>200	4,33 ± 0,92	3,42 ± 1,08	95,31 ± 19,12

In dieser Tabelle sind die aktivsten Vertreter der drei identifizierten Cluster (Leitstrukturen), ihre chemische Struktur sowie die K_i- und IC₅₀-Werte gegen EtCRK2 und HsCDK2 gezeigt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der IC₅₀- und K_i-Werte ± der jeweiligen Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen (n= 3-6). Die zwei Hits (BES130131 und BES124764) gehören zu den 14 bestätigten Hits nach *in vitro* Testung einer *in house* Substanzbibliothek und der Hit BES312351 (8-Hydroxychinolin) gehört zu den *in vitro* bestätigten Inhibitoren nach *in silico* Hit-Anreicherung (siehe Abbildung 3.18).

Mit Hilfe von molekularen *Docking*-Methoden wurden vier Hits BES062021 (Rhodanin-oxindol), BES143551 (Naphtholactam), BES241415 (Benzimidazol-carbonitril), BES252034 (Benzimidazol) für die durch XIRINGO aktivierte EtCRK2 und für die durch HsCYCA aktivierte HsCRK2 *in vitro* charakterisiert. Die dazugehörigen Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits bei ENGELS, 2010 und ENGELS *et al.*, 2010 publiziert. Weiterhin wurden diese Verbindungen auf die durch EtCYC3a aktivierte EtCRK2 getestet. Die IC₅₀- und K_i-Werte für diese vier Hits für die durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierte EtCRK2 und für die durch HsCYCA aktivierte HsCDK2 sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: IC₅₀- und K_i-Werte der vier mittels molekularen *Docking*-Methoden potentesten identifizierten Inhibitoren für EtCRK2 und HsCDK2.

Struktur	ID/ Strukturklasse	IC ₅₀ [μM]			K _i [μM]		
		EtCRK2/ XIRINGO	EtCRK2/ EtCYC3a	HsCDK2/ HsCYCA	EtCRK2/ XIRINGO	EtCRK2/ EtCYC3a	HsCDK2/ HsCYCA
	BES062021 Rhodanin-oxindol	22,89 – 14,20	>200	25,49 ± 19,37	16,32 ± 9,36	12,94 ± 4,57	16,86 ± 8,28
	BES143551 Naphtolactam	35,91 ± 8,32	5,21 ± 0,27	12,27 ± 7,01	5,80 ± 1,58	5,61 ± 1,12	1,46 ± 0,70
	BES241415 Benzimidazol-carbonitril	60,98 ± 27,30	145,15 ± 73,85	40,82 ± 12,72	83,42 ± 29,14	212,23 ± 73,19	41,19 ± 13,43
	BES252034 Benzimidazol	15,31 ± 3,07	20,18 ± 5,81	34,48 ± 3,23	7,63 ± 1,95	15,19 ± 3,52	8,34 ± 2,33

In dieser Tabelle sind die vier potentesten Inhibitoren, ihre chemische Struktur sowie die K_i- und IC₅₀-Werte gegen EtCRK2 (aktiviert durch EtCYC3a und XIRINGO) und HsCDK2 gezeigt. Mit Hilfe von molekularen *Docking*-Methoden konnte eine neue, nicht in der Literatur bekannte CDK-Inhibitor-Strukturklasse identifiziert werden: die Benzimidazol-carbonitrile [ENGELS, 2010; ENGELS *et al.*, 2010]. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der IC₅₀- und K_i-Werte ± der jeweiligen Standardabweichung, von mindestens drei unabhängigen Versuchen (n= 3-4).

Datenbanksuchen in SciFinder von Chemical Abstracts Service (Columbus, USA) bestätigten, dass die Benzimidazol-carbonitrile zu den bisher nicht in der Literatur beschriebenen CDK-Inhibitor-Strukturklassen gehören und erstmal im Rahmen dieser Arbeit publiziert wurden [ENGELS, 2010; ENGELS *et al.*, 2010]. Die Lineweaver-Burk-Diagramme dieser vier potenten Inhibitoren zeigten, dass die EtCRK2 und die HsCDK2 ATP-kompetitiv inhibiert wurden. Somit bestätigt sich die durch molekulares *Docking* vorhergesagte Adressierung der ATP-Bindetasche [ENGELS, 2010; ENGELS *et al.*, 2010].

4 Diskussion

Die Entwicklung eines Tierarzneimittels, wie zum Beispiel eines neuen Medikamentes gegen Hühner-Kokzidiose, ist ein langer Forschungsprozess, der viele unterschiedliche Stadien umfasst. Diese verschiedenen Stadien sind vergleichbar mit der Arzneimittel-Entwicklung in der Human-Pharmaindustrie. Dazu gehört z.B. die Identifizierung von geeigneten Zielproteinen in Parasiten, die Identifizierung inhibitorischer Substanzen und ihre anschließende Struktur-optimierung.

Die Zyklin-abhängige Kinase EtCRK2 aus dem Parasiten *Eimeria tenella* ist für die Tiergesundheit ein interessantes Zielprotein. Sie spielt eine entscheidende Rolle im Lebenszyklus des Parasiten und wurde bereits als Zielprotein chemisch validiert [ENGELS *et al.*, 2010].

Ziel dieser Dissertation war zum einen die *in vitro* Identifizierung von neuen EtCRK2-Aktivatoren und deren Einsatz in einem nicht-radioaktiven TR-FRET Kinase-Assay. Darüber hinaus sollten mit Hilfe dieses Assays neue Inhibitoren für die EtCRK2 identifiziert werden.

4.1. *In vitro* Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO

Aus der Literatur ist bekannt, dass die EtCRK2 ohne Aktivator über eine sehr niedrige Kinase-Aktivität gegenüber den Substraten Histon H1 und Kasein verfügt [KINNAIRD *et al.*, 2004]. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten *in vitro* TR-FRET-Assays konnte ohne Aktivator keine EtCRK2-Kinase-Aktivität festgestellt werden. Darüber hinaus ist die EtCRK2 als Zyklin-abhängige Kinase nicht in der Lage, ihr Substrat vollständig zu phosphorylieren, wenn sie nicht vorher durch einen passenden Zyklin-Partner aktiviert wurde.

Zu Beginn dieser Arbeit war nur das menschliche Zyklin A als EtCRK2-Aktivator in der Literatur bekannt [KINNAIRD *et al.*, 2004]. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit keine wesentliche Aktivierung der EtCRK2 durch HsCYCA festgestellt werden. Durch Ähnlichkeitssuchen (BLASTX-Algorithmus) unter Verwendung der EtCRK2-Proteinsequenz in einer Kinase-Datenbank von *Apicomplexa*-Parasiten konnten weitere CRKs identifiziert werden. Mittels anschließender Literaturrecherchen in Hinblick auf Aktivatoren dieser CRKs wurden weitere potentielle EtCRK2-Aktivatoren gefunden. Die Recherchen ergaben die Existenz eines Proteins mit dem Namen XIRINGO (*Xenopus laevis* *rapid inducer of G₂/M progression in oocytes*; GenBank: CAB44296.1) [FERBY *et al.*, 1999]. Dieses Protein ist in der Lage, das EtCRK2-Homolog PfPK5 sehr potent zu aktivieren; es wird 20-fach mehr PfCYC1 als

XIRINGO benötigt, um die gleiche Pfk5-Aktivität zu stimulieren [MERCKX *et al.*, 2003]. XIRINGO ist ein bekannter Aktivator von CDKs des Menschen und CRKs von *Apicomplexa*-Parasiten [FERBY *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2005; NEBREDÁ, 2006; CHENG & SOLOMON, 2008].

Obwohl RINGO-Proteine nur in Wirbeltieren gefunden wurden, ist XIRINGO in der Lage, an der Pfk5 von *P. falciparum* zu binden und diese zu aktivieren [MERCKX *et al.*, 2003]. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen EtCRK2 und dem homologen Protein Pfk5 (67%) wurde in dieser Arbeit das Aktivierungsprofil von XIRINGO als EtCRK2-Aktivator mittels des *in vitro* TR-FRET-Assays untersucht.

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung von MBP-XIRINGO mit Hilfe der Amylose-Affinitätschromatographie wurde zusätzlich eine Gelfiltration durchgeführt, um das MBP-XIRINGO vom freien MBP zu trennen. Die Ergebnisse der Gelfiltration und der dazugehörigen SDS-PAGE zeigten, dass MBP-XIRINGO bereits im Ausschlussvolumen eluierte (siehe Abbildung 3.4 A und 3.4. B). Dies ist überraschend, da nach dem Trennungsmuster der verwendeten Säule XIRINGO erst nach 200 ml eluieren sollte. Demnach müsste MBP-XIRINGO sehr große Aggregate bilden (>440 kDa), um im Ausschlussvolumen detektiert zu werden. Eine solche Aggregatbildung wurde in der Literatur bereits bei der Gelfiltration von Speedy/RINGOA2 (ein homologes XIRINGO-Protein im Menschen) beschrieben [CHENG *et al.*, 2005]. Unabhängig vom verwendeten *Tag* (Speedy/RINGOA2 besaß einen GST-*Tag*) ist die Aggregatbildung vermutlich eine Eigenschaft von RINGO-Proteinen.

Die Aktivierung der EtCRK2 durch MBP-XIRINGO wurde mit Hilfe des TR-FRET-Assays untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass MBP-XIRINGO in der Lage ist, EtCRK2 mit einer fünffach erhöhten Kinase-Aktivität zu aktivieren (siehe Abschnitt 3.4, Abbildung 3.6). Obwohl XIRINGO nicht homolog zu den Zyklinen ist, wurde hiermit bestätigt, dass dieses Protein ein guter Aktivator von menschlichen sowie apicomplexen CDKs ist.

Durch die Bindung von XIRINGO an die EtCRK2 werden wichtige Konformationsänderungen der Kinase erwartet, die bisher noch nicht im Detail untersucht wurden. Normalerweise wird eine CDK in zwei Schritten vollständig aktiviert: als erstes durch die Bindung ihres Zyklin-Partners und anschließend durch eine CAK im T-Loop (siehe Abschnitt 1.5). Eine Hypothese war, dass die Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO bereits vollständig ist und dass keine weitere Phosphorylierung im T-Loop notwendig ist. Die Ergebnisse der EtCRK2-Aktivitätsbestimmung mit Hilfe des *in vitro* TR-FRET-Assays unterstützen diese Hypothese. Für die Aktivitätsbestimmung der EtCRK2 wurde die durch HsCYCA vollständig aktivierte

HsCDK2 als Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die EtCRK2-Aktivität vergleichbar mit der einer vollständig aktivierten HsCDK2 ist. Da zwischen EtCRK2 und der menschlichen CDK1 oder auch CDK2 eine hohe Sequenzidentität (68%) besteht, werden ähnliche Aktivierungsmechanismen bei der EtCRK2 erwartet und somit auch die vollständige Aktivierung von EtCRK2 durch XIRINGO. Laut Literatur ist bis heute kein Mechanismus bekannt bei dem XIRINGO oder seine homologen Proteine zur vollständigen Aktivierung einer CDK eine CAK benötigen [KARAIKOU *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2005].

4.2. EtCYC3a als EtCRK2-Aktivator

In *E. tenella* wurden vier neue Zykline *in silico* identifiziert: EtCYC1, EtCYC3a, EtCYC3b und EtCYC4 [ENGELS, 2010]. Allerdings waren nur die Gensequenzen der Etcyc3a- und Etcyc4-Gene vollständig. Die cDNA von Etcyc3a umfasste eine Sequenz von 1074 bp, die für ein Protein mit 358 Aminosäuren und einer vorhergesagten Größe von 38 kDa kodierte. Die Sequenzidentität von EtCYC3a zu *P. falciparum* PfCYC3 betrug 23% [ENGELS, 2010]. Es wurde angenommen, dass EtCYC3a der natürliche Aktivator von EtCRK2 ist. Hingegen schien das Genprodukt EtCYC4 als möglicher Aktivator der EtCRK2 eher unwahrscheinlich. Diese Annahme basierte auf der hohen Sequenzidentität zwischen den *E. tenella*- und *P. falciparum*-Zyklinen. EtCYC3a zeigte die höchste Sequenzidentität zu PfCYC3 und EtCYC4 zu PfCYC4 (21%). PfCYC3 ist in der Lage, das zu EtCRK2 homologe Protein PfPK5 zu aktivieren. PfCYC4 hingegen fungierte nicht als PfPK5-Aktivator. Neben der hohen Sequenzidentität zu EtCYC4 zeigte das PfCYC4-Protein auch Ähnlichkeit zu Ania-6 Typ Zyklinen [MERCKX *et al.*, 2003]. Diese Zykline sind denen ähnlicher, die in die RNA-Verarbeitung involviert sind, als zu Zyklinen, die den Zellzyklus regulieren [NAIRN & GREENGARD, 2001; MERCKX *et al.*, 2003]. Die einzige in der Literatur beschriebene Funktion von PfCYC4 ist eine geringe Histon-H1-Kinase-Aktivität in parasitischen Extrakten [MERCKX *et al.*, 2003]. Weiterhin ist bekannt, dass nur PfCYC1, PfCYC3a und XIRINGO in der Lage sind PfPK5 *in vitro* zu aktivieren, wobei XIRINGO der effizienteste Aktivator von PfPK5 ist (siehe 4.1) [MERCKX *et al.*, 2003].

Aufgrund dieser Ergebnisse ist EtCYC3a ein vielversprechender Kandidat, um die EtCRK2 zu aktivieren. Zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften von EtCYC3a und der möglichen Rolle als EtCRK2-Aktivator im Detail wurde die ganze kodierende Region des Etcyc3a-Gens kloniert und exprimiert. Danach wurde der erhaltene MBP-EtCYC3a/EtCRK2-

Komplex mit Hilfe einer Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt. Durch Gelfiltration wurde das freie MPB vom EtCRK2/EtCYC3a-Komplex getrennt. Interessanterweise wurde der EtCRK2/EtCYC3a-Komplex nicht nur in einem, sondern in zwei getrennten Elutionspeaks eluiert: ein erster Peak im Ausschlussvolumen, in dem Proteine größer als 440 kDa eluieren und ein zweiter Peak nach 150 ml Elutionsvolumen, in dem Proteine mit ca. 100 kDa eluieren (der EtCRK2/MBP-EtCYC3a-Komplex ist 112 kDa groß). Die Funktion von EtCYC3a als EtCRK2-Aktivator aus jedem Elutionspeak wurde mit Hilfe des *in vitro* TR-FRET-Assays untersucht. Nur der EtCRK2/MBP-EtCYC3a-Komplex aus dem zweiten Elutionspeak resultierte in einer aktiven EtCRK2. Der EtCRK2/MBP-EtCYC3a-Komplex aus dem ersten Gelfiltrationspeak (Ausschlussvolumen) zeigte keine Kinase-Aktivität und bildete vermutlich sehr große Aggregate (>440 kDa), vergleichbar mit der Gelfiltration von MBP-XIRINGO. Wahrscheinlich sind diese MBP-EtCYC3a-Aggregate nicht mehr in der Lage, vollständig an die EtCRK2 zu binden, um sie zu aktivieren. Allerdings konnte die EtCRK2 aufgrund der Bindung an MBP-EtCYC3a als Komplex gereinigt werden.

Das im zweiten Gelfiltrationspeak eluierte EtCYC3a zeigte im TR-FRET-Assay, dass es in der Lage ist, die EtCRK2 vergleichbar zu XIRINGO zu aktivieren (siehe Abschnitt 3.5). Die spezifische Aktivität der EtCRK2 wurde nach der in Abschnitt 2.3.11 beschriebenen Methode berechnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die spezifische Aktivität von der durch EtCYC3a aktivierten EtCRK2 ($0,15 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) fast ein Zehntel der spezifischen Aktivität der durch MBP-XIRINGO aktivierten EtCRK2 ($1,29 \pm 0,24 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) beträgt.

Um die Unterschiede in der spezifischen Aktivität der EtCRK2 zu erklären, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Eine Hypothese war, dass EtCYC3a nicht der geeignete Aktivierungspartner für die EtCRK2 ist. Wie bereits im Laufe dieser Arbeit beschrieben, gibt es noch drei weitere Zyklin-ähnliche Proteine (EtCYC1, EtCYC3b und EtCYC4), die *in silico* in *E. tenella* identifiziert wurden [ENGELS *et al.*, 2010]. Auch bei menschlichen bzw. parasitären CDKs sind mehrere Zykline bekannt, die an einer CDK binden und diese aktivieren können. Die höchste Kinase-Aktivität wird durch eine bestimmte Kombination an CDK/Zyklin erreicht. Um sicher zu sein, dass das EtCYC3a-Protein der beste EtCRK2-Aktivator ist, müssten die weiteren *E. tenella*-Zykline ebenfalls *in vitro* kloniert, exprimiert, gereinigt und mit der EtCRK2 getestet werden. Dieses konnte nicht durchgeführt werden, da EtCYC1 und EtCYC3b nicht vollständig in ihrer Proteinsequenz identifiziert wurden.

Die niedrigere spezifische Aktivität der durch EtCYC3a aktivierten EtCRK2 im Vergleich mit der durch XIRINGO aktivierten Kinase könnte auch ein Hinweis auf die Notwendigkeit einer

weiteren Phosphorylierung durch eine CAK an T159 im T-Loop der EtCRK2 sein, um eine vollständige Aktivierung zu erreichen. In der Regel ist die vollständige Aktivierung von CDKs abhängig von einer CAK-Phosphorylierung (siehe Abschnitte 1.5 und 4.2). Beispielsweise verursacht die CAK-Phosphorylierung am T160-Rest der HsCDK2 des HsCDK2/HsCYCA-Komplexes eine 20-fache Erhöhung der Aktivität im Vergleich mit der Aktivität des nicht-phosphorylierten Komplexes [CONNELL-CROWLEY *et al.*, 1993]. Daher wurde als eine weitere Hypothese die Notwendigkeit einer zusätzlichen Phosphorylierung des T-Loops von EtCRK2 durch eine CAK aufgestellt. Um zu überprüfen ob CAK-homologe Proteine in *E. tenella* vorkommen, wurden BLASTX-Recherchen in der Proteindatenbank des Sanger Instituts durchgeführt. Unter Verwendung bekannter CAKs, wie z. B. der HsCDK7 [MORGAN, 1997] oder der PfMRK [LI *et al.*, 1997] als Such-Sequenzen, konnte ein CAK-homologes Protein in *E. tenella* identifiziert werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentität (42%) dieses Proteins mit PfMRK wurde es EtMRK genannt [ENGELS *et al.*, 2010]. Diese Identifizierung unterstützt die zweite Hypothese, in der eine zusätzliche CAK für die vollständige Aktivierung der EtCRK2 benötigt wird.

Laut Literatur verhält sich die PfMRK nicht wie eine gewöhnliche CAK. Sie ist z. B. nicht in der Lage, PfpK5 zu phosphorylieren und es dadurch zu aktivieren [CHEN *et al.*, 2006]. Die PfMRK ist vermutlich nur in der Regulation der Gen-Transkription involviert und phosphoryliert die C-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II [LE ROCH *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2006]. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen EtMRK und PfMRK könnte sich die EtMRK in *E. tenella* nicht als CAK verhalten und damit keine Rolle bei der vollständigen CRK-Aktivierung spielen. Nur durch die *in vitro* Klonierung, Expression, Reinigung und Testung zusammen mit dem EtCRK2/Aktivator-Komplex könnte die tatsächliche Funktion der EtMRK bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit waren die Versuche zur *in vitro* Klonierung des Etmrk-Genes bisher leider erfolglos.

Es gibt also in der Literatur Hinweise, die beide Hypothesen unterstützen. Allerdings müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Grund für die Unterschiede in den spezifischen Aktivitätswerten der durch EtCYC3a und durch XIRINGO aktivierten EtCRK2 zu finden.

4.3. Inhibierung der durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierten EtCRK2

Um neuartige und spezifische Inhibitoren für die EtCRK2 zu identifizieren, wurden *in vitro* Screenings in Kombination mit *in silico* Hit-Anreicherungen durchgeführt. Insgesamt wurden 23 Verbindungen mit IC₅₀-Werten unter 100 µM identifiziert. Vierzehn der 23 Verbindungen wurden durch das *in vitro* Screening und fünf Verbindungen durch *in silico* Hit-Anreicherung [ENGELS *et al.*, 2010] gefunden. Die Benzimidazol-carbonitrile, die mit Hilfe eines parallelen *in silico* Screening gefunden wurden, konnten als neue CDK-Inhibitor-Strukturklasse identifiziert werden (bereits bei ENGELS *et al.*, 2010 publiziert).

Aus den 19 Substanzen wurden drei Cluster identifiziert, deren Mitglieder zu der gleichen chemischen Strukturklasse gehören oder die einen gemeinsamen *Scaffold* mit ähnlichen Pharmakophor-Eigenschaften besitzen. Diese Cluster wurden nach der Strukturklasse des jeweils aktivsten Vertreters benannt und gehören zu den Naphthochinonen (BES130131), den 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-olen (BES124764) und den 8-Hydroxychinolinen (BES312351).

Die drei aktivsten Vertreter von jedem Cluster zeigen IC₅₀-Werte unter 20 µM und ihre Leitstrukturen wurden teilweise bereits als Kinase-Inhibitoren in der Literatur beschrieben [AZIZ *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2011]. Sie sind allerdings bisher nicht als CDK-Inhibitoren in der Literatur bekannt. Die Naphthochinone sind bekannt als Inhibitoren der PKC (Proteinkinase C), der Phosphatidylinositol-3-Kinase, der AKT (auch Proteinkinase B genannt) und der Janus-aktivierten Kinase 2 (JNK) [AZIZ *et al.*, 2008]. Die 8-Hydroxychinoline wurden bereits in der Literatur als Inhibitoren von *Entamoeba histolytica* identifiziert [MELHORN, 2008]. Weiterhin zeigen die Hydroxychinoline Aktivität gegen die *Apicomplexa Toxoplasma* spp. und *Cryptosporidium parvum* und sie sind in der Literatur bekannt für ihre Aktivität gegen Kokzidien, Plasmodien und Theilerien [MELHORN, 2008]. Das wichtigste literaturbekannte Hydroxychinolin ist das Decoquinat (auch "Deccox[®]" genannt), das als Kokzidiostatikum bei Hühner-Kokzidiose gegen Sporoziten und Merozoiten aller Arten von *Eimeria* spp. eingesetzt werden kann. Decoquinat wird auch zusätzlich gegen *Toxoplasma gondii* in Katzen eingesetzt [MELHORN, 2008]. Allerdings sind die biologischen Zielproteine der Hydroxychinoline in *Eimeria* sp., *Toxoplasma* sp. und im Rest der oben genannten Parasiten nicht in der Literatur bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigten, dass die 8-Hydroxychinoline sowohl EtCRK2 als auch die HsCDK2 potent inhibieren können. So kann-

te die EtCRK2 als Zielprotein für die 8-Hydroxychinoline in *Eimeria tenella* identifiziert werden.

Interessanterweise zeigten die IC_{50} - und K_i -Inhibitionswerte für alle Verbindungen fast keinen Unterschied zwischen der durch EtCYC3a oder durch MBP-XIRINGO aktivierten EtCRK2. Nur für die Verbindungen BES062021 (Rhodanin-oxindol) und BES241415 (Benzimidazol-carbonitril), die mit Hilfe eines parallelen *in silico* Screening identifiziert wurden, sind die IC_{50} -Werte sehr unterschiedlich. Der Grund dafür lag vermutlich auf punktuellen Löslichkeitsproblemen, die diese Verbindungen bereits gelegentlich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt haben. Gewöhnlich steuert die Zyklin-Bindung an die CDK ihre Substratspezifität und führt somit zu Unterschieden bei den Inhibitionswerten [CHENG *et al.*, 2005; NEBREDA, 2006]. CDKs, die durch XIRINGO aktiviert werden, sind weniger anfällig, durch die Kinase Myt1 (*myelin transcription factor 1*) und den CDK-Inhibitor Cip1 (*CDK-interacting protein 1*) inhibiert zu werden [KARAIKOU *et al.*, 2001]. Weiterhin ist das „MRAIL“-Motiv eines Zyklins unerlässlich für die Bindung der Inhibitoren Cip1 und Myt1 über ihr „RXL“-Motiv [SCHULMAN *et al.*, 1998; KARAIKOU *et al.*, 2001]. XIRINGO besitzt dieses Motiv nicht und daher können Inhibitoren wie Cip1 und Myt1 nicht an die CDK/RINGO-Komplexe binden, um diese zu inhibieren [ADAMS *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1996]. Wie XIRINGO besitzt EtCYC3a kein „MRAIL“-Motiv. Dies könnte erklären warum vergleichbare IC_{50} - und K_i -Inhibitionswerte der durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierten EtCRK2 gemessen wurden, da beide Zykline offenbar ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Inhibitor-Bindung besitzen.

Für die drei aktivsten Verbindungen aus dem *in vitro* Screening wurden K_i -Werte auf die EtCRK2 und HsCDK2 graphisch bestimmt. Aus der graphischen Darstellung konnte auch der Hemmtyp der Inhibitoren ermittelt werden (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.18). Alle drei Verbindungen zeigten einen ATP-kompetitiven Inhibitions-Mechanismus.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Aminosäure-Reste der ATP-Bindungsstelle innerhalb der CDK-Familie (z.B. 88% zwischen EtCRK2 und HsCDK2) ist es eine sehr anspruchsvolle Aufgabe, spezifische ATP-kompetitive Inhibitoren für EtCRK2 zu finden [ENGELS *et al.*, 2010]. Wie bereits bei Engels *et al.* beschrieben, existiert ein spezifischer Glutamat-Rest (E88) in der EtCRK2-ATP-Bindungsstelle, der in den Homologen HsCDK2 und *Gallus gallus* CDK3 (GgCDK3) gegen ein Lysin (jeweils K89) ausgetauscht ist. Dieser Unterschied in der Ladung der ausgetauschten Aminosäure-Reste könnte bei einer späteren Optimierung der Inhibitoren im Hinblick auf eine EtCRK2-Selektivität adressiert werden. So kann vermieden werden, dass die GgCDK3 in signifikanter Weise inhibiert wird. Von den bisher identifizier-

ten Verbindungen konnte nur BES124764 (2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ol-Cluster) (siehe Tabelle 3.3), die EtCRK2 mit einem IC_{50} -Wert von unter 20 μM spezifisch inhibieren und zeigte auf der HsCDK2 IC_{50} -Werte von über 200 μM (siehe Tabelle 3.1). Auf den ersten Blick scheinen 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ole nicht die typischen Eigenschaften von ATP-kompetitiven Inhibitoren zu besitzen. Durch *in silico Docking*-Analysen konnte ein Modell für den Bindungsmodus der 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ol postuliert werden [ENGELS, 2010]. Die Ergebnisse zeigten, dass die Verbindungen nicht die typischen Pharmakophor-Eigenschaften für eine ATP-Bindungsstelle besitzen. Sie binden nicht über Wasserstoffbrücken an die Reste der *Hinge*-Region und adressieren nicht die Selektivitätstasche E88K [ENGELS *et al.*, 2010]. Dennoch bestätigte die graphische Auswertung der K_i -Bestimmungen im Rahmen dieser Arbeit, dass auch die 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ol ATP-kompetitive Inhibitoren sind. Der Grund für die vorhandene EtCRK2-Selektivität des BES124764-Inhibitors ist nicht bekannt und soll in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

4.4. Ausblick

Zyclin-abhängige Kinasen sind interessante Zielproteine für die Entwicklung eines neuen Antikozidiums. Daher war ein Ziel dieser Arbeit die biologische Funktion der Zyclin-abhängigen Kinase EtCRK2 aus dem Parasit *E. tenella* *in vitro* eingehender zu untersuchen. Die Bindung eines Zyclin-Partners an die EtCRK2 ist ein essentieller Schritt für ihre Aktivierung. Da bisher nur HsCYCA als EtCRK2-Aktivator in der Literatur bekannt war, konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Aktivatoren identifiziert werden: der bekannte CDK-Aktivator XIRINGO und das neue *E. tenella*-Zyclin EtCYC3a. Um die Funktion dieser Proteine als EtCRK2-Aktivatoren zu untersuchen, wurde ein nicht radioaktiver TR-FRET-Assay für die EtCRK2 etabliert und optimiert. Mit Hilfe des TR-FRET-Assays konnten die EtCRK2-Aktivität und weitere wichtige kinetische Parameter bestimmt werden. Zusätzlich wurde dieser Assay zum *in vitro Screening* einer kommerziellen Chemikalienbibliothek auf die EtCRK2 eingesetzt. Aus dem *Screening* konnten fünf neue EtCRK2-Inhibitoren identifiziert werden, die jeweils einer eigenen Strukturklasse angehören. Aufgrund ihrer Inhibitionskonstanten auf EtCRK2 stellen diese Verbindungen vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung eines neuen Antikozidiums dar.

Durch die erfolgreiche Etablierung des TR-FRET-Assays für die EtCRK2 und ihre Aktivatoren stand ein sensitives und robustes Testsystem, das darüber hinaus HTS-fähig ist, zur Verfügung. Dadurch können in Zukunft auch sehr große Substanzbibliotheken getestet werden, um spezifischere und potentere EtCRK2-Inhibitoren zu finden.

Zusätzlich bietet dieser Assay die Möglichkeit, weitere Aktivatoren für EtCRK2 *in vitro* zu testen. Hierzu gehören die *in silico* identifizierten Zyklin-ähnlichen Proteine EtCYC1, EtCYC3b und EtCYC4 aus *E. tenella* [ENGELS, 2010]. Um zu bestätigen, dass die genannten Zykline tatsächlich die EtCRK2 aktivieren können, müssen diese kloniert, exprimiert und *in vitro* mittels des TR-FRET-Assays getestet werden. Hierdurch könnte gezeigt werden, ob neben EtCYC3a noch weitere natürliche potente EtCRK2-Aktivatoren in *E. tenella* existieren. Durch Klonierung und Expression der EtMRK könnte ihre Funktion als mögliche CAK in *E. tenella* geklärt werden. Ihre Funktion als Aktivator des EtCRK2/EtCYC3a-Komplexes kann ebenfalls mit Hilfe des TR-FRET-Assays untersucht werden. Zusätzlich müsste geklärt werden, ob eine Aktivierung der EtCRK2 durch XIRINGO oder durch Zykline aus *E. tenella* mit einer Phosphorylierung des T159-Restes im Aktivierungs-Loop der EtCRK2 verbunden ist. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass XIRINGO die EtCRK2 aktivieren kann, ohne eine notwendige Phosphorylierung im T-Loop.

Falls sich bestätigt, dass die genannten Zykline EtCRK2-Aktivatoren sind, sollten die bisher getesteten Verbindungen auch mit den neuen EtCRK2/Aktivator-Komplexen getestet werden. Des Weiteren sollte die potentielle Spezifität dieser Verbindungen auf einen bestimmten EtCRK2/Aktivator-Komplex untersucht werden.

Hiermit könnte auch gezeigt werden, dass die 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ole spezifische Inhibitoren von der durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierten EtCRK2 sind. Weitere Optimierungs-Zyklen sowie Analysen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) entsprechender Derivate könnten die Spezifität dieser Verbindungen verbessern. Eine Kristallstruktur-Analyse eines dieser Derivate im Komplex mit EtCRK2-Aktivator könnte schließlich den Grund für die Spezifität dieser Substanzklasse auf EtCRK2 klären.

5 Zusammenfassung

Der Stamm der *Apicomplexa* ist eine artenreiche Gruppe, der einzellige, meist obligat intrazelluläre Parasiten angehören, darunter auch erstzunehmende Krankheitserreger wie *Toxoplasma* sp. und *Plasmodium* sp. sowie tierpathogene Vertreter wie *Eimeria* sp. und *Theileria* sp. *Eimeria* sp. verursacht die Kokzidiose beim Huhn. Diese Krankheit bedingt weltweite Verluste in der Geflügelindustrie von etwa 3 Milliarden US\$ pro Jahr [DALLOUL & LILLEHOJ, 2006; SHIRLEY *et al.*, 2007; LUCIUS & LOOS-FRANK, 2008]. Die Parasiten weisen eine hohe Resistenzbildungsrate gegen vorhandene Wirkstoffe auf. Zudem ist der Einsatz von Vakzinen mit Nebenwirkungen verbunden und für hohe Produktionskosten verantwortlich. Daher ist die Entwicklung von neuen, kostengünstigen und effektiven Kokzidiostatika eine dringend notwendige Herausforderung [KINNAIRD *et al.*, 2004].

Auf Grund ihrer essentiellen, regulatorischen Funktion im eukaryotischen Zellzyklus sind Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) validierte Zielproteine [LEHNINGER *et al.*, 2005]. Auch *Eimeria tenella* CDC2-related kinase 2 (EtCRK2) wurde bereits mittels des bekannten CDK-Inhibitors Flavopiridol als Zielprotein chemisch validiert [ENGELS *et al.*, 2010]. Wie bei allen CDKs ist die Aktivität von EtCRK2 abhängig von der Bindung eines Aktivators, der zur Zyklin-Proteinfamilie gehört. Dieser natürliche EtCRK2-Aktivator war jedoch bislang nicht bekannt. Deshalb war ein Teil dieser Arbeit die Identifizierung des natürlichen EtCRK2-Aktivators. Bioinformatische Analysen identifizierten vier *E. tenella* Zyklin-ähnliche Proteine (EtCYC1, EtCYC3a, EtCYC3b und EtCYC4), die nah verwandt zu den *Plasmodium falciparum*-Zyklinen sind [ENGELS *et al.*, 2010; SUÁREZ FERNÁNDEZ *et al.*, bislang unveröffentlichte Daten]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei neue Aktivatoren identifiziert und biochemisch charakterisiert werden: der bekannte CDK-Aktivator XIRINGO und das neue *E. tenella*-Zyklin EtCYC3a. Nachdem der nicht-radioaktive TR-FRET-Assay für die EtCRK2 etabliert und optimiert wurde, konnte die EtCRK2-Aktivität im Komplex mit beiden Aktivatoren und weitere wichtige kinetische Parameter bestimmt werden.

Zusätzlich wurde dieser Assay zum *in vitro* Screening einer kommerziellen Chemikalienbibliothek auf die EtCRK2 eingesetzt, um potentielle Inhibitoren für EtCRK2 zu identifizieren. Dieses *in vitro* Screening gefolgt von einer *in silico* Hit-Anreicherung identifizierte 19 aktive Verbindungen für die durch EtCYC3a und XIRINGO aktivierte EtCRK2. Zudem wurden drei Struktur-Cluster definiert: Naphthoquinone, 8-Hydroxyquinoline und 2-Pyrimidinylaminopiperidin-propan-2-ole.

Die aktivsten Vertreter von jedem Cluster wurden als Leitstrukturen ausgewählt und auf EtCRK2 und HsCDK2 getestet. Aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf EtCRK2 stellen diese Verbindungen viel versprechende Leitstrukturen für die Entwicklung eines neuen Antikokzidiums dar. Hiermit konnte auch gezeigt werden, dass BES124764, der Vertreter des 2-Pyrimidinyl-aminopiperidin-propan-2-ol-Clusters, in der Lage ist, die EtCRK2 selektiv zu inhibieren.

Daher wird BES124764 sowie einige Derivate in den Leitstruktur-Optimierungsprozess für die Auffindung eines neuen Arzneimittelkandidaten gegen Kokzidiose eingehen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams P.D., Sellers W.R. *et al.* (1996). "Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors." *Mol Cell Biol* **16**: 6623-6633.
- Anwar M.I., Akhtar M. *et al.* (2008). "Field evaluation of *Eimeria tenella* (local isolates) gametocytes vaccine and its comparative efficacy with imported live vaccine, LivaCox." *Parasitol Res* **104**: 135-143.
- Arakawa A., Tanaka Y. *et al.* (1991). "Effects of clopidol on sporulation and infectivity of *Eimeria tenella* oocysts." *Vet Parasitol* **38**: 55-60.
- Atkins G.L. and Nimmo I.A. (1975). "A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation." *Biochem J* **149**: 775-777.
- Aziz M.H., Dreckschmidt N.E. *et al.* (2008). "Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* **68**: 9024-9032.
- Bain J., McLauchlan H. *et al.* (2003). "The specificities of protein kinase inhibitors: an update." *Biochem J* **371**: 199-204.
- Baneyx F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* **10**: 411-421.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. *et al.* (2005). *Biochemie*, 5 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Berger S.L. and Kimmel A.R. (1987). "Guide to Molecular Cloning Techniques." *Methods in Enzymology* **152**.

- Bisswanger, H. (2008). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bjornsson T.D., Callaghan J.T. *et al.* (2003). "The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of America (Pharma) perspective." *Drug Metabolism & Disposition* **31**: 815-832.
- Boothroyd J.C. (2009). "Toxoplasma gondii: 25 years and 25 major advances for the field." *Int J Parasitol* **39**: 935-946.
- Borgne A. and Golsteyn R.M. (2003). "The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis." *Prog Cell Cycle Res* **5**: 453-459.
- Borgne A., Versteeg I. *et al.* (2006). "Analysis of cyclin B1 and CDK activity during apoptosis induced by camptothecin treatment." *Oncogene* **25**: 7361-7372.
- Brayton K.A., Lau A.O. *et al.* (2007). "Genome sequence of Babesia bovis and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa." *PLoS Pathog* **3**: 1401-1413.
- Campbell W.C. (2008). "History of the discovery of sulfaquinoxaline as a coccidiostat." *J Parasitol* **94**: 934-945.
- Canduri F., Perez P.C. *et al.* (2007). "Protein kinases as targets for antiparasitic chemotherapy drugs." *Curr Drug Targets* **8**: 389-398.
- Ceusters W. and Smith B. (2009). "Malaria Diagnosis and the Plasmodium Life Cycle: the BFO Perspective." *Nature Precedings*.
- Chapman H.D. (1989). "Chemotherapy of caecal coccidiosis: efficacy of toltrazuril, sulphaquinoxaline/pyrimethamine and amprolium/ethopabate, given in drinking water, against field isolates of Eimeria tenella." *Res Vet Sci* **46**: 419-420.
- Chapman H.D. (2009). "A landmark contribution to poultry science--prophylactic control of coccidiosis in poultry." *Poult Sci* **88**: 813-815.

- Chen J., Saha P. *et al.* (1996). "Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1." *Mol Cell Biol* **16**: 4673-4682.
- Chen Y., Jirage D. *et al.* (2006). "Identification of an effector protein and gain-of-function mutants that activate Pfmrk, a malarial cyclin-dependent protein kinase." *Mol Biochem Parasitol* **149**: 48-57.
- Cheng A., Gerry S. *et al.* (2005). "Biochemical characterization of Cdk2-Speedy/Ringo A2." *BMC Biochem* **6**: 19.
- Cheng A. and Solomon M.J. (2008). "Speedy/Ringo C regulates S and G2 phase progression in human cells." *Cell Cycle* **7**: 3037-3047.
- 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.
- Claeskens M., Verdonck W. *et al.* (2007). "A Field Study Assessing Control of Broiler Coccidiosis by Paracox™ Vaccination or by Toltrazuril (Baycox®) Stand-Alone Treatment." *Parasitology Research* **101; Supplement 1**: 105-112.
- Clegg, R. M. (2006). The history of FRET. In *Reviews in Fluorescence*, pp. 1-46. Berlin: Springer.
- Comley, J. (2006). "TR-FRET based assays- getting better with age." *Drug Discovery World*, Spring 2006: 22-37.
- Compton, T. (1990). Degenerate primers for DNA amplification. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 39-45. San Diego: Academic Press Inc.
- Connell-Crowley L., Solomon M.J. *et al.* (1993). "Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro." *Mol Biol Cell* **4**: 79-92.
- Cook, G. C. & Zumla, A. I. (2008). *Manson's Tropical Diseases*, 22. Auflage, Saunders Ltd.

- Copeland, R. A. (2005). "Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists (Methods of Biochemical Analysis)". John Wiley & Sons.
- Cruz J.C. and Tsai L.H. (2004). "A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease." *Curr Opin Neurobiol* **14**: 390-394.
- Dai Y. and Grant S. (2003). "Cyclin-dependent kinase inhibitors." *Curr Opin Pharmacol* **3**: 362-370.
- Dalloul R.A. and Lillehoj H.S. (2006). "Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development." *Expert Rev Vaccines* **5**: 143-163.
- Das europäische Parlament und der Rat der europäischen Union. (2003). "Verordnung (EG) Nr. 1831/2003." *Official Journal of the European Communities* **268**: 29-43.
- Davis G.D., Elisee C. *et al.* (1999). "New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli." *Biotechnol Bioeng* **65**: 382-388.
- Dinarina A., Perez L.H. *et al.* (2005). "Characterization of a new family of cyclin-dependent kinase activators." *Biochem J* **386**: 349-355.
- Doerig C., Meijer L. *et al.* (2002). "Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa." *Trends Parasitol* **18**: 366-371.
- Doerig C. and Meijer L. (2007). "Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases." *Expert Opin Ther Targets* **11**: 279-290.
- Dower W.J., Miller J.F. *et al.* (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Dubremetz J.F. (2007). "Rhoptries are major players in Toxoplasma gondii invasion and host cell interaction." *Cell Microbiol* **9**: 841-848.

- Eadie G.S. (1942). "The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine." *J Biol Chem* **146**: 85-93.
- Eisenthal R. and Cornish-Bowden A. (1974). "The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters." *Biochem J* **139**: 715-720.
- Elledge S.J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." *Science* **274**: 1664-1672.
- Engels, K. (2010). Bioinformatische Identifizierung und Charakterisierung von Zyklin-abhängigen Kinasen und Zyklinen des Parasiten *Eimeria tenella* und deren Nutzung im rationalen Wirkstoffdesign. Universität Mainz.
- Engels K., Beyer C. *et al.* (2010). "Inhibition of *Eimeria tenella* CDK-related kinase 2: From target identification to lead compounds." *ChemMedChem* **5**: 1259-1271.
- Fanatico, A. (2006). "Parasite Management for Natural and Organic Poultry: Coccidiosis." *NCAT Agriculture Specialist*: 1-11.
- Ferby I., Blazquez M. *et al.* (1999). "A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes." *Genes Dev* **13**: 2177-2189.
- Fichera M.E. and Roos D.S. (1997). "A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites." *Nature* **390**: 407-409.
- Fischer P.M. and Lane D.P. (2000). "Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics." *Curr Med Chem* **7**: 1213-1245.
- Fischer P.M., Endicott J. *et al.* (2003). "Cyclin-dependent kinase inhibitors." *Prog Cell Cycle Res* **5**: 235-248.
- Förster T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Ann Physik* **437**: 55.

- Garriga J. and Grana X. (2004). "Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes." *Gene* **337**: 15-23.
- Giambrone J.J., Johnson L.W. *et al.* (1984). "Development of cell-mediated immunity and resistance to clinical coccidiosis infection in chickens selected for resistance and susceptibility to *Eimeria tenella*." *Poult Sci* **63**: 2162-2166.
- Gray N., Detivaud L. *et al.* (1999). "ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases." *Curr Med Chem* **6**: 859-875.
- Guerra C.A., Gikandi P.W. *et al.* (2008). "The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide." *PLoS Med* **5**: e38.
- Guo Z. and Stiller J.W. (2004). "Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs." *BMC Genomics* **5**: 69.
- Guzi T. (2004). "CYC-202 Cyclacel." *Curr Opin Investig Drugs* **5**: 1311-1318.
- Hardcastle I.R., Golding B.T. *et al.* (2002). "Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 325-348.
- Hasbullah, Itahana H. *et al.* (1996). "Medication of feedlot calves infected with *Eimeria* spp. by a combination of sulfamonomethoxine and ormetoprim." *J Vet Med Sci* **58**: 169-170.
- Hassan P., Fergusson D. *et al.* (2001). "The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*." *Mol Biochem Parasitol* **113**: 189-198.
- Hengen P. (1995). "Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*." *Trends Biochem Sci* **20**: 285-286.
- Hoessel R., Leclerc S. *et al.* (1999). "Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases." *Nat Cell Biol* **1**: 60-67.

- Hofmann J. and Raether W. (1990). "Improved techniques for the in vitro cultivation of *Eimeria tenella* in primary chick kidney cells." *Parasitol Res* **76**: 479-486.
- HOFSTEE B.H. (1959). "Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics." *Nature* **184**: 1296-1298.
- Holm M., Lehmann F. *et al.* (2008). "Medical chemistry and molecular mechanisms of tyrosine kinase inhibitors. The viewpoint of pharmaceutical research." *Pharm Unserer Zeit* **37**: 382-392.
- Homer M.J., Aguilar-Delfin I. *et al.* (2000). "Babesiosis." *Clin Microbiol Rev* **13**: 451-469.
- Huet A.C., Mortier L. *et al.* (2005). "Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA." *Food Addit Contam* **22**: 128-134.
- Hughes A. (2006). "CDK inhibitors in 3D: Problems with the drugs, their development plans or their linkage to disease?" *Gene Therapy and Molecular Biology* **10**: 41-54.
- Hunter T. (1987). "A thousand and one protein kinases." *Cell* **50**: 823-829.
- Irvine G.B. (2001). "Determination of molecular size by size-exclusion chromatography (gel filtration)." *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 5**: Unit.
- Jeffrey P.D., Russo A.A. *et al.* (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." *Nature* **376**: 313-320.
- Johnson D.G. and Walker C.L. (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 295-312.
- Karaiskou A., Perez L.H. *et al.* (2001). "Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins." *J Biol Chem* **276**: 36028-36034.

- Khan F., Tang J. *et al.* (2002). "Cyclin-dependent kinase TPK2 is a critical cell cycle regulator in *Toxoplasma gondii*." *Mol Microbiol* **45**: 321-332.
- Kim S., Jung J.K. *et al.* (2011). "Discovery of piperidinyl aminopyrimidine derivatives as IKK-2 inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 3002-3006.
- Kinnaird J., Logan M. *et al.* (2001). "TaCRK3 encodes a novel *Theileria annulata* protein kinase with motifs characteristic of the family of eukaryotic cyclin dependent kinases: a comparative analysis of its expression with TaCRK2 during the parasite life cycle." *Gene* **279**: 127-135.
- Kinnaird J.H., Logan M. *et al.* (1996). "The isolation and characterization of genomic and cDNA clones coding for a *cdc2*-related kinase (ThCRK2) from the bovine protozoan parasite *Theileria*." *Mol Microbiol* **22**: 293-302.
- Kinnaird J.H., Bumstead J.M. *et al.* (2004). "EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle." *Int J Parasitol* **34**: 683-692.
- Koshland D.E. (1958). "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis." *Proc Natl Acad Sci USA* **44**: 98-104.
- Kotewicz M.L., D'Alessio J.M. *et al.* (1985). "Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*." *Gene* **35**: 249-258.
- Kubo K. (1995). "Effect of incubation of solutions of proteins containing dodecyl sulfate on the cleavage of peptide bonds by boiling." *Anal Biochem* **225**: 351-353.
- Kvaal C.A., Radke J.R. *et al.* (2002). "Isolation of a *Toxoplasma gondii* cyclin by yeast two-hybrid interactive screen." *Mol Biochem Parasitol* **120**: 187-194.
- Le R.K., Sestier C. *et al.* (2000). "Activation of a *Plasmodium falciparum* *cdc2*-related kinase by heterologous p25 and cyclin H. Functional characterization of a *P. falciparum* cyclin homologue." *J Biol Chem* **275**: 8952-8958.

- Lee E.H. and Smith J.D. (1981). "Control of coccidiosis in chickens by clopidol and robenidine rotation." *Can Vet J* **22**: 237-238.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. *et al.* (2005). *Lehninger - Biochemie*, Berlin: Springer.
- Lehrach H., Diamond D. *et al.* (1977). "RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination." *Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- Lenormand J.L., Dellinger R.W. *et al.* (1999). "Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition." *EMBO J* **18**: 1869-1877.
- Li J.L., Robson K.J. *et al.* (1996). "Pfmrk, a MO15-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Gene cloning, sequence, stage-specific expression and chromosome localization." *Eur J Biochem* **241**: 805-813.
- Lim L. and McFadden G.I. (2010). "The evolution, metabolism and functions of the apicoplast." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 749-763.
- Lineweaver H. and Burk D. (1934). "The Determination of Enzyme Dissociation Constants." *JACS* **56**: 658-666.
- Long P.L. (1972). "Observations on the oocyst production and viability of *Eimeria mivati* and *E. tenella* in the chorioallantois of chicken embryos incubated at different temperatures." *Z Parasitenkd* **39**: 27-37.
- Losiewicz M.D., Carlson B.A. *et al.* (1994). "Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275." *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 589-595.
- Loyer P., Trembley J.H. *et al.* (2005). "Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing." *Cell Signal* **17**: 1033-1051.
- Lucius R. & Loos-Frank, B. (2007). *Biologie von Parasiten*, Berlin: Springer.

- Ma H., Deacon S. *et al.* (2008). "The challenge of selecting protein kinase assays for lead discovery optimization." *Expert Opin Drug Discov* **3**: 607-621.
- Malumbres M. and Barbacid M. (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." *Nat Rev Cancer* **1**: 222-231.
- Malumbres M. and Barbacid M. (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." *Trends Biochem Sci* **30**: 630-641.
- Malumbres M. and Barbacid M. (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." *Nat Rev Cancer* **9**: 153-166.
- Manning G., Whyte D.B. *et al.* (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* **298**: 1912-1934.
- Marangoni, A. G. (2002). *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, John Wiley & Sons.
- Marechal E. and Cesbron-Delauw M.F. (2001). "The apicoplast: a new member of the plastid family." *Trends Plant Sci* **6**: 200-205.
- Mathis G. (1995). "Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer." *Clin Chem* **41**: 1391-1397.
- Mathis G.F., Froyman R. *et al.* (2004). "Coccidiosis control by administering toltrazuril in the drinking water for a 2-day period." *Vet Parasitol* **121**: 1-9.
- Matthews, D. J. & Gerritsen, M. E. (2010). *Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy*, Wiley.
- McClue S.J., Blake D. *et al.* (2002). "In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine)." *Int J Cancer* **102**: 463-468.
- Mehlhorn, H. (2001). *Encyclopedic reference of parasitology*, Springer, Berlin.
- Mehlhorn, H. (2008). *Encyclopedia of parasitology*, Springer, Berlin.

- Meijer L., Thunnissen A.M. *et al.* (2000). "Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3beta and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent." *Chem Biol* **7**: 51-63.
- Mercenier A. and Chassy B.M. (1988). "Strategies for the development of bacterial transformation systems." *Biochimie* **70**: 503-517.
- Merckx A., Le R.K. *et al.* (2003). "Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* **278**: 39839-39850.
- Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung." *Biochemische Zeitschrift*: 333-369.
- Minor, L. K. (2006). *Handbook of assay development in drug discovery*, CRC Press.
- Morgan D.O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291.
- Morgan, D. O. (2006). *The cell cycle: Principles and control (Primers in Biology)*. Oxford University Press.
- Morrisette N.S. and Sibley L.D. (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 21-38.
- Naglak T.J., Hettwer D.J. *et al.* (1990). "Chemical permeabilization of cells for intracellular product release." *Bioprocess Technol* **9**: 177-205.
- Nairn A.C. and Greengard P. (2001). "A novel cyclin provides a link between dopamine and RNA processing." *Neuron* **32**: 174-176.
- Naula C., Parsons M. *et al.* (2005). "Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*." *Biochim Biophys Acta* **1754**: 151-159.

- Nebreda A.R. (2006). "CDK activation by non-cyclin proteins." *Curr Opin Cell Biol* **18**: 192-198.
- Nelson P.J. and Shankland S.J. (2006). "Therapeutics in renal disease: the road ahead for anti-proliferative targets." *Nephron Exp Nephrol* **103**: e6-15.
- Ni W., Ji J. *et al.* (2010). "Flavopiridol pharmacogenetics: clinical and functional evidence for the role of SLCO1B1/OATP1B1 in flavopiridol disposition." *PLoS One* **5**: e13792.
- Niculescu-Duvaz D., Whittaker S. *et al.* (2007). "The EGF receptor Hokey-Cokey." *Cancer Cell* **11**: 209-211.
- Norval R.A., Lawrence J.A. *et al.* (1991). "Theileria parva: influence of vector, parasite and host relationships on the epidemiology of theileriosis in southern Africa." *Parasitology* **102 Pt 3**: 347-356.
- Nuñez de Castro, I. (2001). *Enzymología, Piramide*.
- Ogilvie, B. W., Usuki, E., Yerino, P. & Parkinson, A. (2008). *Drug-Drug Interactions*, New York: A. David Rodrigues.
- Oviedo-Rondon E.O., Hume M.E. *et al.* (2006). "Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed Eimeria species, and supplemented with essential oil blends." *Poult Sci* **85**: 854-860.
- Pareek T.K., Keller J. *et al.* (2006). "Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 791-796.
- Passonneau, J. V. & Lowry, O. H. (1993). *Enzymatic Analysis: A Practical Guide (Biological Methods)*. Humana Press.
- Pavletich N.P. (1999). "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors." *J Mol Biol* **287**: 821-828.

- Peng Y., Keenan S.M. *et al.* (2005). "Structural model of the Plasmodium CDK, Pfmrk, a novel target for malaria therapeutics." *J Mol Graph Model* **24**: 72-80.
- Porath J. and Flodin P. (1959). "Gel filtration: a method for desalting and group separation." *Nature* **183**: 1657-1659.
- Riggs P. (2000). "Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein." *Mol Biotechnol* **15**: 51-63.
- Ruegg U.T. and Burgess G.M. (1989). "Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but non-specific inhibitors of protein kinases." *Trends Pharmacol Sci* **10**: 218-220.
- Russo A.A., Jeffrey P.D. *et al.* (1996). "Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation." *Nat Struct Biol* **3**: 696-700.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. *et al.* (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F., Nicklen S. *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** : 5463-5467.
- Schang L.M. (2004). "Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication." *Biochim Biophys Acta* **1697**: 197-209.
- Schang L.M. (2005). "Advances on cyclin-dependent kinases (CDKs) as novel targets for antiviral drugs." *Curr Drug Targets Infect Disord* **5**: 29-37.
- Schulman B.A., Lindstrom D.L. *et al.* (1998). "Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10453-10458.

- Sharman P.A., Smith N.C. *et al.* (2010). "Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis." *Parasite Immunol* **32**: 590-598.
- Sheehan D. and O'Sullivan S. (2004). "Fast protein liquid chromatography." *Methods Mol Biol* **244**: 253-258.
- Shirley M.W. (1989). "Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis of poultry." *Parasite Immunol* **11**: 117-124.
- Shirley M.W., Smith A.L. *et al.* (2007). "Challenges in the successful control of the avian coccidia." *Vaccine* **25**: 5540-5547.
- Smith H.O. and Wilcox K.W. (1970). "A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties." *J Mol Biol* **51**: 379-391.
- Smith P.D., Crocker S.J. *et al.* (2003). "Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13650-13655.
- Stryer L. (1978). "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler." *Annu Rev Biochem* **47**: 819-846.
- Suárez Fernández, M. L., Engels, K., Bender, F., Gassel, M., Marhöfer, R. J., Unden, G., Mottram, J. C. & Selzer, P. M. (on press). High-Throughput Screening with the *Eimeria tenella* CDC2-related kinase2/cyclin complex EtCRK2/EtCYC3a.
- Suo X., Zhang J.X. *et al.* (2006). "The efficacy and economic benefits of Supercox, a live anticoccidial vaccine in a commercial trial in broiler chickens in China." *Vet Parasitol* **142**: 63-70.
- Szedlacsek S.E., Ostafe V. *et al.* (1990). "Progress-curve equations for reversible enzyme-catalysed reactions inhibited by tight-binding inhibitors." *Biochem J* **265**: 647-653.

- Tsai L.H., Harlow E. *et al.* (1991). "Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase." *Nature* **353**: 174-177.
- Tsai L.H., Delalle I. *et al.* (1994). "p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5." *Nature* **371**: 419-423.
- Tsai L.H., Lee M.S. *et al.* (2004). "Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?" *Biochim Biophys Acta* **1697**: 137-142.
- Tzipori S. (1998). "Introduction to Cryptosporidium Parvum." *Advances in Parasitology* **40**: 3-4.
- Van Hellemond J.J., Neuville P. *et al.* (2000). "Isolation of Trypanosoma brucei CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2." *J Biol Chem* **275**: 8315-8323.
- Van Hellemond J.J. and Mottram J.C. (2000). "The CYC3 gene of trypanosoma brucei encodes a cyclin with a short half-life." *Mol Biochem Parasitol* **111**: 275-282.
- Ward P., Equinet L. *et al.* (2004). "Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote." *BMC Genomics* **5**: 79.
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A. *et al.* (1968). "Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4." *J Biol Chem* **243**: 4543-4555.
- Wilkinson G.N. (1961). "Statistical estimations in enzyme kinetics." *Biochem J* **80**: 324-332.
- Williams R.B., Carlyle W.W. *et al.* (1999). "The efficacy and economic benefits of Paracox, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom." *Int J Parasitol* **29**: 341-355.
- Williams R.B. (2002). "Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002)." *Avian Dis* **46**: 775-802.

- Williams R.B. (2006). "Tracing the emergence of drug-resistance in coccidia (*Eimeria* spp.) of commercial broiler flocks medicated with decoquinate for the first time in the United Kingdom." *Vet Parasitol* **135**: 1-14.
- Wilson G.A. and Young F.E. (1975). "Isolation of a sequence-specific endonuclease (BamI) from *Bacillus amyloliquefaciens* H." *J Mol Biol* **97**: 123-125.
- Woyengo T.A., Golian A. *et al.* (2010). "Performance of two 1970s and Ross 308 broiler strains fed drug-free low-protein and recommended-protein diets." *J Appl Poult Res* **19**: 101-111.
- Xie M.Q., Fukata T. *et al.* (1991). "Evaluation of anticoccidial drugs in chicken embryos." *Parasitol Res* **77**: 595-599.
- Zaharevitz D.W., Gussio R. *et al.* (1999). "Discovery and initial characterization of the paulones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases." *Cancer Res* **59**: 2566-2569.