

Aus dem Institut für Virologie, Arbeitsgruppe Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Charakterisierung der
Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase 1,
ein Enzym der Biosynthese von
Glykosylphosphatidylinositolen im
Einzeller *Babesia microti***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Philipp Stahl

aus Leipzig

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 21.11.2016.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Professor Dr. Helmut Schäfer
Referent:	Professor Dr. Ralph T. Schwarz
1. Korreferent:	Professor Dr. Adriana del Rey

Zusammenfassung

Als humane Babesiose bezeichnet man eine durch die Einzeller *Babesia divergens* und *Babesia microti* hervorgerufene Infektionskrankheit. Diese eukaryotischen Parasiten werden durch Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen und verursachen Infektionen und Erkrankungen bei einer Vielzahl von Säugetieren, sowie auch beim Menschen. Neben akuten grippeähnlichen Symptomen sind auch latente Verläufe mit monatelanger a- oder oligosymptomatischer Parasitämie beschrieben worden. Die Diagnose erfolgt durch den Nachweis der intraerythrozytären Parasiten im Blutaussstrich oder im Dicken Tropfen, wobei insbesondere bei geringer Parasitämie die Abgrenzung von einer Malaria sehr schwierig sein kann.

Das Enzym Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase 1 (DPM1) ist ein ubiquitär und evolutionär stark konserviertes Enzym und bildet ein essentielles Substrat (Dolichol-Phosphat-Mannose), was für die Biosynthese von Glykosylphosphatidylinositolen (GPIs) im endoplasmatischen Retikulum (ER) unentbehrlich ist. In dieser Arbeit wurde das Protein DPM1 von *Babesia microti* (*B. microti*) zu dem bislang nur wenige Informationen vorliegen, hinsichtlich seiner evolutionären Konservierung und seiner genetischen Eigenschaften mithilfe molekularbiologischer und bioinformatischer Techniken in systematischen Schritten charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich DPM1 aus *Babesia microti* im Vergleich zu einer Vielzahl anderer Organismen unterscheidet.

Mittels bioinformatischer Analysen von DPM1 aus *Babesia microti*, konnte anhand eines phylogenetischen Stammbaums gezeigt werden, dass es sich *in puncto* Hydrophobizität, vom Vorhandensein von weiteren Hilfsproteinen der DPM-Familie, einer GPI-Verankerung sowie von Signalpeptidspaltungsstellen von DPM1 der verglichenen Organismen unterscheidet. Insbesondere zu DPM1 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) bestehen relevante biochemische Unterschiede. Es konnte dennoch mithilfe molekularbiologischer Klonierungstechniken die funktionelle Komplementation von DPM1 in der DPM1-defizienten-*S. cerevisiae*-Mutante, für die DPM1 essentiell ist, mit parasitischem DPM1 nachgewiesen werden.

Das zeigt die artunabhängige evolutionäre Konservierung dieses Proteins sowie dessen funktionelle Austauschbarkeit.

Abstract

The protozoan parasites *Babesia divergens* and *Babesia microti* are the causative agents of human babesiosis. These eukaryotic parasites are transmitted by *Ixodes* ticks and cause infection and disease in a variety of mammals, also in humans. In addition to acute flu-like symptoms also a latent course of disease with up to several months of a- or oligo symptomatic parasitaemia has been described. Diagnosis is made by demonstrating the intraerythrocytic parasites in blood smears or thick drop, which at low parasitaemia is challenging in discriminating it from malaria parasites.

The enzyme dolichol phosphate mannosyl transferase 1 (DPM1) is an ubiquitous and evolutionarily highly conserved enzyme and forms an essential substrate (dolichol phosphate mannose), which is indispensable for the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols (GPIs) in the endoplasmic reticulum (ER). In this study, the protein DPM1 of *Babesia microti* (*B. microti*), for which little is known so far, was characterized in systematic steps with the aid of relevant bioinformatic databases and molecular biological techniques in terms of its evolutionary conservation and its genetic characteristics.

It could be demonstrated by bioinformatic analysis of DPM1 from *Babesia microti* based on a phylogenetic tree compared to a variety of other organisms, that this protein concerning hydrophobicity, the presence of other auxiliary proteins of the DPM-family, the presence of a GPI-anchor as well as a signal peptide cleavage site differs from DPM1 of the compared organisms. There has been seen relevant biochemical differences particularly from DPM1 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Nonetheless, in this study, using molecular biological techniques, the functional complementation of DPM1 of the DPM1-deficient-*S. cerevisiae*-mutant, for which the DPM1 protein is essential, with parasitic DPM1 could be demonstrated.

This shows the species independent evolutionary conservation of this protein and its functional interchangeability.

Inhaltsverzeichnis

1	<u> </u>	1
1.1	BABESIA MICROTI UND DIE BABESIOSE	1
1.1.1	ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	1
1.1.2	DER LEBENSZYKLUS VON BABESIEN	2
1.1.3	EPIDEMIOLOGIE	4
1.1.4	SYMPTOMATOLOGIE DER BABESIOSE	5
1.1.5	DIAGNOSTIK	6
1.1.6	THERAPIE	8
1.1.7	PRÄVENTION	8
1.2	GLYKOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOLE IN PROTOZOEN	10
1.3	DAS ENZYM DPM1 BEIDER GPI-BIOSYNTHESE	11
1.4	DIE ERZEUGUNG REKOMBINANTER KONDIONAL LETALER DPM1-HEFEMUTANTEN	12
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	15
2	<u> </u>	16
2.1	LABORGERÄTE UND ZUBEHÖR	16
2.2	CHEMIKALIEN	18
2.3	BAKTERIEN UND HEFEN	20
2.4	GLAS- UND PLASTIKWAREN	21
2.5	ENZYME MIT DAZUGEHÖRIGEN PUFFERN	21
2.6	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	22
2.7	KOMMERZIELL ERHÄLTICHE REAKTIONSKITS	23
2.8	PLASMIDE	24
2.9	REKOMBINANTE PLASMIDE	24
2.10	PUFFER, MEDIEN UND GELE	25
2.11	WACHSTUMSMEDIEN FÜR BAKTERIEN	26
2.12	WACHSTUMSMEDIEN FÜR HEFEN	27
3	<u> </u>	30
3.1.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	30
3.1.1.	KULTIVIERUNG VON BABESIA MICROTI	30
3.1.2.	EXTRAKTION VON BABESIA MICROTI AUS INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN	30
3.1.3.	DNA-EXTRAKTION AUS BABESIA MICROTI	31
3.2.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	32

3.2.1.	POLYMERASEKETTENREAKTION	32
3.2.2.	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	33
3.2.3.	EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	34
3.2.4.	RESTRIKTIONSVERDAU	34
3.2.5.	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE	35
3.2.6.	LIGATION VON PCR-FRAGMENTEN MIT DER T4-DNA-LIGASE	36
3.2.7.	ISOLATION VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN IM KLEINEN MAßSTAB	36
3.2.8.	ISOLATION VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN IM GROßEN MAßSTAB	37
3.2.9.	EINFÜHRUNG VON PUNKTMUTATIONEN MITTELS QUICKCHANGE	38
3.2.10.	HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIEN	40
3.2.11.	TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA IN KOMPETENTE BAKTERIEN	40
3.2.12.	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNA UND DNA	41
3.2.13.	DNA-SEQUENZIERUNG	41
3.2.14.	RNA-ISOLIERUNG	41
3.2.15.	SYNTHESE VON CDNA	42
3.2.16.	TRANSFORMATION DER HEFEMUTANTEN MIT DPM1 AUS BABESIA MICROTI	42
3.2.17.	PLASMIDEXTRAKTION AUS HEFEZELLEN	43
3.3.	BIOINFORMATISCHE METHODEN	44
3.3.1.	EINFÜHRUNG	44
3.3.2.	« KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES » (KEGG)	44
3.3.3.	«UNIVERSAL PROTEIN DATABASE» (UNIPROT)	48
3.3.4.	DAS PROGRAMM «PREDICTION OF TRANSMEMBRANE REGIONS AND ORIENTATION» (TMPRED)	49
3.3.5.	DIE DATENBANK SIGNALP	51
3.3.6.	DER «TRANSMEMBRANE TOPOLOGY PREDICTION SERVER» HMMTOP	51
3.3.7.	DAS «GPI-ANCHOR PREDICTOR SYSTEM» PREDGPI	52
3.3.8.	DIE DATENBANK «PROTEIN FAMILIES» (PFAM)	54
3.3.9.	VERWENDETE ORGANISMEN UND IHRE BEDEUTUNG	55
3.3.10.	ERZEUGUNG EINES PHYLOGENETISCHEN STAMMBAUMS MIT «PHYLOGENIE.FR»	57
3.3.11.	ZUSAMMENFASSUNG DER BIOINFORMATISCHEN ANALYSEN	59
4	<u>ERGEBNISSE</u>	60
4.1	BESTIMMUNG DER GENGRENZEN VON DPM1 IN BABESIA MICROTI	60
4.2	ERZEUGUNG EINES REKOMBINANTEN PLASMIDS MIT DPM1 VON BABESIA MICROTI	65

4.3	DPM1 VON BABESIA MICROTIKOMPLEMENTIERT DIE KONDITIONAL LETALE HEFEMUTANTE YPH 499-HIS-GAL-DPM1	66
4.4	RESULTATE DER BIOINFORMATISCHEN ANALYSEN VON DPM1 ANHAND AUSGEWÄHLTER ORGANISMEN	70
4.4.1	ERGEBNISSE DER BIOINFORMATISCHEN UNTERSUCHUNGEN MIT DPM1-ORTHOLOGEN ANHAND EINER VIELZAHL VON ORGANISMEN	70
4.4.2	ZUSAMMENFASSUNG DER DESKRIPTIVEN BIOINFORMATISCHEN UNTERSUCHUNGEN	77
4.4.3	ERSTELLUNG EINES PHYLOGENETISCHEN STAMMBAUMS	79
5	<u>DISKUSSION</u>	84
5.1.	DPM1 VON BABESIA MICROTI UNTERSCHIEDET SICH ANHAND BIOINFORMATISCHER DATEN ERHEBLICH VON SEINEN STAMMITGLIEDERN DER APICOMPLEXA UND KOMPLEMENTIERT EINE DPM1-DEFIZIENTE HEFEMUTANTE VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE	84
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	94
7	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	109
8	<u>ANHANG</u>	111
8.1	SEQUENZIERUNG DES REKOMBINANTEN KONSTRUKTS p426 MET 25-BM-DPM1	111
8.2	SEQUENZIERUNG DES REKOMBINANTEN KONSTRUKTS p426 MET 25-BM-DPM1 AUS YPH 499 TRANSGENEN HEFEZELLEN	112
9	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	113
10	<u>PUBLIKATIONEN</u>	116
11	<u>LEBENS LAUF</u>	117
12	<u>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</u>	118
13	<u>DANKSAGUNG</u>	119
14	<u>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</u>	120

1 Einleitung

1.1 *Babesia microti* und die Babesiose

1.1.1 Allgemeine Einführung

Der eukaryotische Einzeller *Babesia microti* (*B. microti*) ist der Erreger der Babesiose und gehört zum Phylum der Apicomplexa. Die Mitglieder des Phylum Apicomplexa können Krankheiten verursachen, von denen die wichtigste die Malaria ist, die große gesundheitliche Probleme in menschlichen Populationen in tropischen und subtropischen Ländern verursacht. Apicomplexa sind intrazelluläre Parasiten, die durch verschiedene Vektoren übertragen werden und in Abhängigkeit von der Spezies in eine Vielzahl verschiedener Wirtszellen eindringen können, um sich intrazellulär zu vermehren. Babesien werden während der Blutmahlzeit durch Zecken (Abbildung 1) übertragen und gelangen so in den Säugetier-Wirt, in dem Parasiten sich durch ungeschlechtliche Teilung in Erythrozyten multiplizieren (Lantos and Krause 2002). Der Mensch dient Babesien als Zwischenwirt, wohingegen z. B. die Maus einen Endwirt darstellt, in dem die geschlechtliche Vermehrung dieses Protozoon stattfindet (Mehlhorn and Shein 1984).



Abbildung 1: *Ixodes scapularis*, ein Vektor für *Babesia microti*. (WHO, 2016)

Die Babesiose ist schon lange als veterinärmedizinische Krankheit bei Rindern bekannt und führt zu schweren wirtschaftlichen Verlusten bei der Erzeugung tierischer Nahrungsmittel. Babesien sind aber auch humanpathogen, wie seit rund 30 Jahren bekannt ist. In Abhängigkeit von der Präsenz ihrer Wirtstiere verursachen unterschiedliche Babesien-Spezies in unterschiedlichen geographischen Verteilungsgebieten die Babesiose, wie *B. microti* in den USA und *B. divergens* in Europa (Homer et al. 2000). Zusammen mit der Spezies *Theileria* werden Babesien aufgrund ihrer birnenförmigen Morphologie auch als *Piroplasmidae* (Piroplasten)

bezeichnet. Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über humanpathogene und veterinärmedizinisch relevante Protozoen der Apicomplexa.

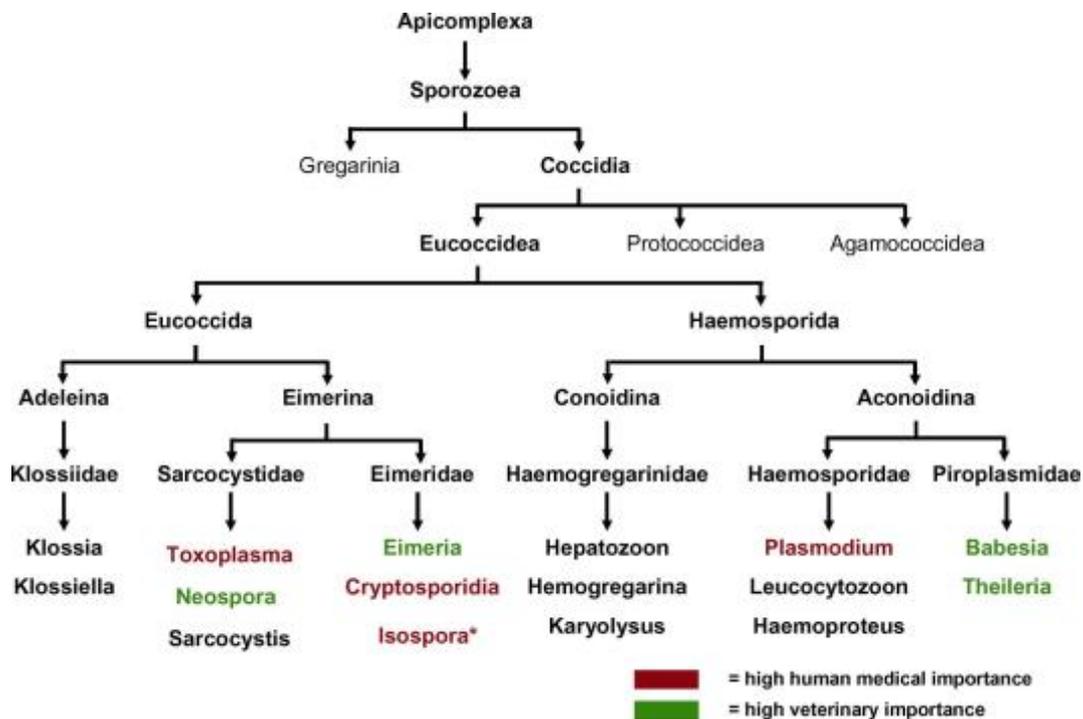


Abbildung 2: Stammbaum der Apicomplexa. In roter Farbe sind Parasiten-Spezies mit humanmedizinischer Bedeutung hervorgehoben. Die in grüner Farbe hervorgehobenen Parasiten sind jene mit überwiegend veterinärmedizinischer Bedeutung (Hans-Peter Beck et al. 2009).

1.1.2 Der Lebenszyklus von Babesien

Das ungeschlechtliche Entwicklungsstadium

Das ungeschlechtliche Entwicklungsstadium von Babesien erfolgt im Wirbeltierwirt. Der während der Blutmahlzeit der Zecke in den Säuger eingebrachte wurmförmige Sporozoit dringt in einen Erythrozyten (roten Blutkörperchen) ein und vermehrt sich durch binäre Teilung im Blut des Wirts. Im Inneren der Erythrozyten differenziert sich der Sporozoit zu einem Wachstumsstadium, dem Trophozoiten, der sich im Weiteren ungeschlechtlich zu einem Merozoiten, der invasiven Form des

Erythrozyten-Zyklus von *Babesia spp.* (Spezies) entwickelt. Dieser Merozoit wird nach der Lyse des infizierten Erythrozyten in die Blutbahn freigegeben und disseminiert im Blutkreislauf des Wirts, um schließlich erneut Erythrozyten zu infizieren. Der sich wiederholende Zyklus der intraerythrozytären Bildung von Merozoiten aus Trophozoiten wird als Merogonie (Schizogonie) bezeichnet. Schließlich können sich Merozoiten zu geschlechtlich determinierten Geschlechtvorläuferzellen, den Gametozyten differenzieren, was als Gamogonie bezeichnet wird. Die Gametozyten, die nach einer Bezeichnung des Entdeckers Robert Koch in Piroplasmen auch „Strahlenkörper“ genannt werden, differenzieren sich zu weiblichen bzw. männlichen Gameten. Bei der nächsten Blutmahlzeit der Zecke werden die Gameten aufgenommen und der Lebenszyklus von *Babesia spp.* schließt sich mit Abschluss der im nächsten Abschnitt beschriebenen sexuellen Entwicklung.

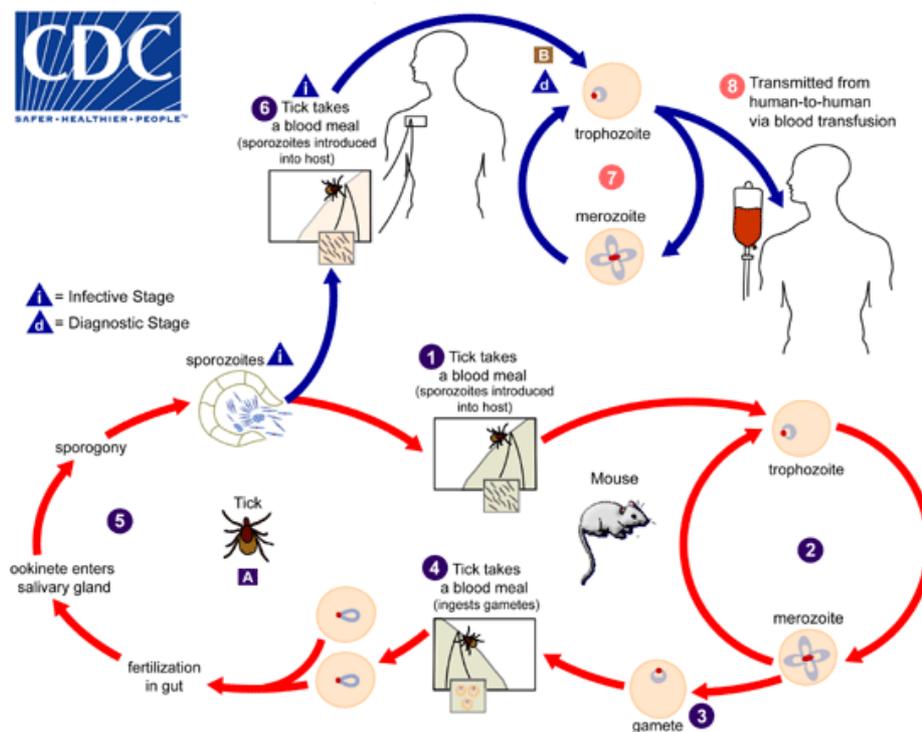


Abbildung 3: Lebenszyklus von *Babesia spp.*
 (CDC, 2015)

Die geschlechtliche Entwicklung

Die sexuelle Entwicklung von Babesien erfolgt im Darm der Zecke nach Aufnahme von Gametozyten während ihrer Blutmahlzeit. Aus diesen Gametozyten entsteht nach der Fusion von zwei morphologisch verschiedenen weiblichen und männlichen Gameten die diploide Zygote.

Nach der ersten Reifeteilung wird der Parasit wieder haploid und im Lauf der Weiterentwicklung entstehen bewegliche, wurmförmige Stadien, die Kineten, aus denen in Zellen der Speicheldrüse der Zecke durch multiple Teilung Sporozoiten (Sporogonie) entstehen. Bei einer Blutmahlzeit werden Sporozoiten in die Blutbahn des Säuger-Wirtes abgegeben und der Lebenszyklus beginnt von vorn (Mehlhorn and Shein 1984).

1.1.3 Epidemiologie

Die Präsenz einer Piroplasmose ist abhängig vom Vorhandensein des Vektors, der Zecke. Aus diesem Grund ist die Parasiten-Übertragung unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. Wetterbedingungen, die je nach Jahreszeit wechseln können unterschiedlich stark ausgeprägt. Die optimalen Lebensbedingungen von *Ixodes ricinus*, dem Vektor der Rinder-Babesiose, übertragen durch *Babesia divergens*, liegt zum Beispiel in Frankreich im Frühjahr von März bis Juni (Aeschlimann 1972; Gilot et al. 1975). Die bovine Babesiose ist eine Parasitose der Rinder und über den gesamten Erdball verbreitet. Sie ist von großer veterinärmedizinischer Bedeutung und vor allem in subtropischen und tropischen Regionen, wie Südamerika und Afrika sowie in Süd- und Osteuropa endemisch. Der Parasit *B. microti* ist vor allem in den USA verbreitet und nutzt vor allem *Ixodes scapularis* als Vektor und Nagetiere als Reservoir.

Humane Infektionen mit *B. divergens* sind im Wesentlichen auf Europa beschränkt und betreffen nur Einzelfälle, so in Frankreich, Spanien und einigen Ländern Nord- und Osteuropas. Auffallend ist, dass die Erkrankung ganz überwiegend bei splenektomierten Personen auftritt und zum Teil tödlich verlaufen kann (Rosner et al. 1984; Gorenflot, Bazin, and Ambroise-Thomas 1987; Browne et al. 2010). Bei normaler Milzfunktion ist nur in seltenen Fällen mit einer produktiven Infektion zu rechnen, sie ist aber nicht

ausgeschlossen. Die geographische Verteilung der humanen Infektionen scheint bei der geringen Anzahl der Infektionen zufällig.

Infektionen mit dem Nager-Parasiten *B. microti* sind wesentlich häufiger als jene mit *B. divergens* und treten bei insgesamt ubiquitärer Verbreitung insbesondere in den USA auf. Bei der Infektion mit *B. microti* ist die Rolle von Immundefizienzen weniger eindeutig, aber als begünstigend anzusehen, insbesondere bei schweren Verläufen (Teutsch et al. 1980). Menschen mit geschwächtem Immunsystem, die mit *B. microti* infiziert sind, weisen ein erhöhtes Risiko für eine persistierende Babesiose mit rezidivierenden Krankheitsschüben auf und benötigen eine konsequente medikamentöse Therapie (Peter J. Krause et al. 2008). Die Hauptverbreitungsgebiete von Infektionen mit *B. microti* in den USA sind im Nordosten einschließlich Rhode Island, Long Island, Nantucket Island und Cape Cod sowie im mittleren Westen und an der Westküste zu finden (E. Vannier and Krause 2009; White et al. 1998; Ruebush et al. 1977; Meldrum et al. 1992; Hatcher et al. 2001). Zudem sind Übertragungen durch Bluttransfusionen und einzelne Fälle einer kongenitalen Transfusion insbesondere in den Endemiegebieten Nordamerikas beschrieben worden (E. Vannier and Krause 2009; Herwaldt et al. 2011). In diesen Endemiegebieten finden sich Durchseuchungsraten mit *B. microti* von bis zu 20 % (Peter J. Krause et al. 2003). In Deutschland und Europa sind humane Babesiosen extrem selten und meist durch *B. divergens* verursacht. Bisher wurde nur über einen einzigen Fall von humaner Babesiose, verursacht durch *B. microti* berichtet (Hildebrandt et al. 2007; Häselbarth et al. 2007). Nicht zu vernachlässigen sind allerdings importierte Fälle von Babesiose mit *B. microti*, wie ein Fallbericht eines im Osten der USA lebenden Patienten aus Frankreich zeigt, bei dem darüber hinaus eine zurückliegende Infektion mit dem Erreger der Lyme-Borreliose (*Borrelia burgdorferi*) diagnostiziert worden ist (Stahl et al., submitted 2016).

1.1.4 Symptomatologie der Babesiose

Nach einer Inkubationszeit, die variabel zwischen einer und vier Wochen liegt (selten erst nach Monaten) entwickelt sich dramatisch das akute Krankheitsbild der Babesiose mit hohem Fieber, Schüttelfrost, Nachtschweiß, Kopfschmerzen, Muskel- und Gliederschmerzen, Übelkeit, Durchfall, Müdigkeit, Hypotonie sowie schwerer

hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und Hämoglobinurie mit folgendem akuten Nierenversagen (Homer et al. 2000; E. G. Vannier et al. 2015; Mayne 2015).

Die durch Parasiten induzierten Stoffwechselveränderungen führen zu einer Hämolyse auch nicht befallener Erythrozyten, sodass die Sauerstofftransportkapazität des Blutes drastisch reduziert ist. In der Folge kann es klinisch zur kompensatorischen Tachypnoe kommen. Durch Agglutination und Adhärenz von infizierten Erythrozyten und Endothelzellen von Kapillaren kommt es darüber hinaus zu Störungen der Mikrozirkulation und zu Schockzuständen, die oft die direkte Todesursache sein können. Die hämolytische Anämie verläuft meist schwer und es kommt zu Ikterus und Nierenversagen mit hoher Letalität von 30 % bis 40 % (White et al. 1998).

Humane Infektionen mit *B. microti* verlaufen insgesamt klinisch weniger schwer als Infektionen mit *B. divergens*, sodass Infektionen mit *B. microti* nicht selten oligo- oder gar asymptomatisch verlaufen können.

1.1.5 Diagnostik

Als wichtigste Hinweise auf eine Babesiose beim Menschen sind Zeckenbisse, die Splenektomie und andere Immundefizite sowie vor allem der vorübergehende Aufenthalt in den bereits genannten endemischen Gebieten zu werten. Die klassische labordiagnostische Maßnahme zur Bestätigung einer akuten Infektion ist ein Blutaussstrich (Abbildung 4) oder der Dicke Tropfen, die nach Fixierung mit Giemsa-Lösung gefärbt werden und die intraerythrozytären Trophozoiten, die sich meist als kleine Ringformen darstellen, anzeigen. Die für Babesien typische tetradenförmige Anordnung, das sogenannte Malteserkreuz, ist häufig nur spärlich vorhanden oder fehlt gänzlich. Die Parasitämie ist im Allgemeinen sehr gering, sodass wiederholte Ausstriche notwendig sein können, bis der erste Parasit identifiziert werden kann. Zudem ist die Diagnose bei infizierten Personen mit sehr niedriger Parasitämie, wie bei asymptomatischen Blutspendern

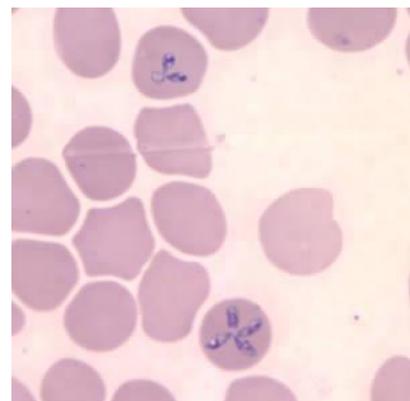


Abbildung 4: Babesien im Blutaussstrich. Klassische Malteserkreuz-Formation mit tetradenförmiger Anordnung der Trophozoiten im Erythrozyten (unten). (CDC, 2015)

in transfusionsassoziierten Fällen, nachdem die Infektion durch Therapie beseitigt wurde sowie für die Unterscheidung zwischen *Plasmodium falciparum* und *Babesia*-Infektion bei Patienten, deren Reisehistorie weder den einen, noch den anderen Parasiten ausschließen kann, sehr herausfordernd und häufig unschlüssig. Darüber hinaus ist eine morphologische Abgrenzung zu mit Plasmodien infizierten Erythrozyten schwierig und aufgrund der Erfahrungslage Referenzlaboren vorbehalten (Lantos and Krause 2002). Zur serologischen Diagnostik steht ein indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest (IFT) zur Verfügung, der Patientenantikörper gegen Babesien nachweist (P. J. Krause et al. 1994). Ein signifikanter Antikörperanstieg ist allerdings erst nach 2 Wochen bis 4 Wochen zu erwarten. Allerdings wurden auch bei diesem Diagnostikverfahren Antigen-Ähnlichkeiten zwischen *Plasmodium*- und Babesien-Parasiten durch serologische Kreuzreaktivität beim IFT demonstriert (James et al. 1987). Molekulare Diagnostiktechniken wie die Polymerasekettenreaktion (PCR), die sehr spezifisch zwischen verschiedenen Spezies diskriminieren kann, sind bei der Diagnose einer Babesiose sehr hilfreich und daher findet die PCR-Diagnostik praktische Anwendung. Mit deren Hilfe kann insbesondere auch eine Differenzierung der Babesien-Spezies und eine Differenzierung von durch Zecken-übertragene Erreger wie *Borrelia burgdorferi* und *Anaplasma phagocytophilum*, anhand des 18S-rRNA-Gens erfolgen (Hojgaard, Lukacik, and Piesman 2014). Zudem kann eine submikroskopische Parasitämie, wie sie häufig bei subakuten oder chronischen Verlaufsformen vorliegt, nachgewiesen werden (Persing et al. 1992). Zum Screening von Blutbanken eignet sich zudem ein Reverse-Transkriptase-PCR Assay zur sensitiveren Detektion und Quantifizierung, wie er für *B. microti* entwickelt wurde (Bloch et al. 2013).

Als Hilfestellung für die Diagnose bei Verdacht auf Babesiose sollten folgende Informationen beachtet werden: Klassische o. g. Symptome und Blutveränderungen, Zeckenbiss in der Patientenanamnese, Aktivitäten im Freien, die denjenigen in die Gefahr eines Zeckenbisses bringen, erhaltene Bluttransfusionen, Reisen oder wohnhaft in Endemiegebieten für *Babesia*-Parasiten (Senanayake et al. 2012).

1.1.6 Therapie

Babesia divergens ist weitgehend resistent gegen Antimalariamittel und Antibiotika. Die Therapie von humanen Infektionen mit *B. microti* beschränkt sich bei sehr leichten Infektionen auf die symptomatische Therapie der Beschwerden. Bei mildem bis moderatem klinischen Verlauf ist eine Therapie mit Atovaquon plus Azithromycin indiziert; bei schweren Verläufen eine Kombination aus Chinin und Clindamycin (P. J. Krause et al. 2000; E. G. Vannier et al. 2015), die sich auch in der Praxis bewährt hat (Stahl et al. submitted, 2016). Bei Beschwerdepersistenz kann aufbauend auf die Kombination von Atovaquon mit Azithromycin, für die unter anderem Therapieversager und Resistenzen beschrieben sind, eine Dreifachkombination bestehend aus Atovaquon, Azithromycin und Doxycyclin wirksam sein und zu einem raschen Rückgang der Parasitämie und der Symptomatik führen (E. Vannier and Krause 2009; Wormser et al. 2010). Zielstruktur dieser Pharmakotherapie ist der Apicoplast des Parasiten, ein nicht photosynthetisch aktives Zellorganell, welches wahrscheinlich durch einen doppelten endosymbiontischen Vorgang mit einer Grünalge entstanden ist. Der Apicoplast enthält DNA, die für essentielle Enzyme der Fettsäurebiosynthese kodiert und ist essentieller Bestandteil des Parasiten, da er bei Inaktivierung zum Tod des Parasiten führt (Hiepe et al. 2005). Aufgrund der Tatsache, dass sich Babesien in bestimmten Endemiegebieten, wie im Nordosten der Vereinigten Staaten, denselben Vektor *Ixodes scapularis* (Hirschzecke) mit Borrelien teilen, ist in diesen Gebieten bei Verdacht auf eine lokal erworbene Infektion oder bei Infektion im Rahmen von Reisen in solche Endemiegebiete eine serologische Untersuchung auf Borreliose angeraten; denn Ko-Infektionen von durch diese Zecke übertragenes Bakterium *Borrelia burgdorferi* und dem Protozoon *Babesia* sind gut beschrieben (P. J. Krause et al. 1996; Homer et al. 2000; Knapp and Rice 2015; Diuk-Wasser, Vannier, and Krause 2016).

1.1.7 Prävention

Die Babesiose kann prinzipiell durch Meiden von Endemiegebieten, in denen Zecken, Hirsche und Mäuse dafür bekannt sind, mit Babesien infiziert zu sein, verhindert werden (E. G. Vannier et al. 2015). Es ist besonders wichtig für Personen mit

Asplenie sowie für andersartig immunsupprimierte Patienten, die in Endemiegebieten leben oder reisen, hohes Gras und Waldgebiete zu vermeiden, in denen Zecken vorkommen, da diese Patienten insbesondere der Gefahr einer schweren Babesiose ausgesetzt sind.

Die bisher einzig sichere Prävention der Erkrankung liegt in der Expositionsprophylaxe durch geeignete Kleidung und durch Ausprühen mit Insektiziden, um Zeckenbisse zu verhindern. Die Verwendung von Schutzkleidung, die mit Diethyltoluamid (DEET), Dimethylphthalat oder Permethrin aufgesprüht oder imprägniert ist, ist für Personen zu empfehlen, die sich in Graslandschaften und Wäldern endemischer Gebiete aufhalten (Finch et al. 2014). Ein Absuchen nach Zecken nach Aufenthalt im Freien sollte stets durchgeführt werden und die Zecken sobald wie möglich entfernt werden (Connally et al. 2009). Die rasche Entfernung der Zecke bei Befall wird am besten durch Verwendung einer Pinzette durchgeführt, um die Mundwerkzeuge der Zecke zu erfassen, ohne den Körper der Zecke zu quetschen. Ansätze im Bereich des Landschaft-Managements, wie etwa regelmäßiges Mähen von Gras, Vernichten von Laubabfällen und Sprühen von Gegenden mit Akariziden, wo eine hohe Dichte von Zecken bekannt ist, können das Risiko einer Infektion verringern.

Das Risiko einer Babesiose und vermutlich auch anderer durch Zecken übertragene Erkrankungen, wie die Borreliose, kann durch Begrenzung der Höhe der Kante zwischen Rasen und Sträuchern auf Privatgrundstücken verringert werden (Dister et al. 1997; Finch et al. 2014). Die Anwendung von Akariziden bei Rotwild, appliziert über dafür vorgesehene Futterstellen, verringert die Anzahl der mit Babesien infizierten Zecken (Fish and Childs 2009). Die generelle Reduktion der Anzahl von Hirschen auf mehreren endemischen Inseln Nordamerikas hat die Zahl von *Ixodes scapularis* und die Häufigkeit der Borreliose bereits verhindern können (Wilson et al. 1988; Kilpatrick, LaBonte, and Stafford 2014). Potenzielle Blutspender, die eine Vorgeschichte einer Babesiose haben, sind dauerhaft von der Blutspende auszuschließen. Bisher gibt es von der «Food and Drug Administration» (FDA) keinen bewährten Test für das systematische Durchsuchen der Blutversorgung nach *B. microti*, aber einige Bundesstaaten der USA haben in Hochendemiegebieten ein Screeningverfahren eingeführt, das die Serologie und die PCR-Methode kombiniert (Leiby 2011; Young et al. 2012; Johnson, Cable, and Leiby 2012; Goodell et al. 2014).

Obwohl Impfstoffe für die veterinärmedizinisch relevanten Erreger *B. bovis* und *Babesia bigemina* (*B. bigemina*) bestehen, ist bisher keine Vakzine gegen die humane Babesiose zugelassen worden (E. G. Vannier et al. 2015).

1.2 Glykosylphosphatidylinositole in Protozoen

In eukaryotischen Zellen sind viele Glykoproteine in der externen Zellmembran über Glykolipide verankert, sogenannte Glykosylphosphatidylinositole (GPIs) bzw. GPI-Anker (Brown and Waneck 1992) (Abbildung 5). GPIs werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und nach mehreren Modifikationsschritten ggf. auch dort an die Carboxylgruppe des Glykoproteins angehängt, um anschließend an die Zelloberfläche transportiert zu werden (Englund 1993). GPI-Anker finden sich sowohl in Säugern als auch in einfachen Eukaryoten, wie in Hefen oder in Protozoen, wie Trypanosomatiden (Gerold et al. 1996; Ferguson 1997), *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) (Gerold, Dieckmann-Schuppert, and Schwarz 1994; Gerold et al. 1999) sowie in *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (Striepen et al. 1997; Striepen, Dubremetz, and Schwarz 1999). Die Anzahl der auf der Säugerzelle exprimierten GPI-Anker (10^5) ist bedeutend geringer als diejenige auf der Oberfläche von Protozoen, wie z. B. *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), wo sich bis zu 10^7 Moleküle pro Zelle finden (Schofield et al. 1994; Ferguson 1997). GPI-Anker können sehr potente Stimulatoren der angeborenen Immunantwort sein, wie z. B. die für *T. cruzi* beschriebene Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (Campos et al. 2001; Oliveira et al. 2004; Medeiros et al. 2007; Caetano et al. 2011) und die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zeigen (Camargo et al. 1997; Almeida et al. 2000) sowie eine mögliche Rolle bei der Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges (Janus-Kinase-Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription) (Stahl, Ruppert, et al. 2014; Stahl, Schwarz, et al. 2014).

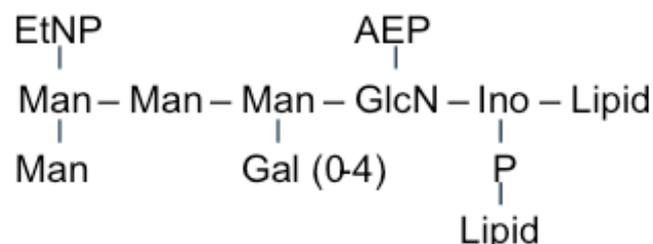


Abbildung 5: Allgemeine Ausgangsstruktur von Glykosylphosphatidylinositol-Ankern.

EtNP = Ethanolaminphosphat, AEP = Aminoethylphosphonat,
 Man = Mannose, Gal = Galaktose, Ino = Inositol, P = Phosphat,
 GLcN = N-Glukosamin

Ergebnisse von Untersuchungen zu GPI-Ankern von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica* zeigen eine Induktion der Apoptose in Herzmuskelzellen (Wenicke et al. 2008). Auch für trypomastigote- und amastigote Lebenszyklusstadien von *T. cruzi* konnte eine Apoptose-Induktion in Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden (Stahl et al. 2013).

1.3 Das Enzym DPM1 bei der GPI-Biosynthese

Einen essentiellen Schritt für die Biosynthese von GPIs im ER katalysiert das ubiquitär vorkommende Enzym Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase 1, auch als Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase 1 (DPM1) bezeichnet. DPM1 katalysiert den Transfer eines Mannoserests von Guanosindiphosphat-Mannose (GDP-Mannose) zu einem Dolicholphosphat und somit die Bildung von Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man), das als Donor für alle bisher bekannten Mannosylierungs-Reaktionen, die Teil des GPI-Biosyntheseweges sind, fungiert (P. Orlean, Albright, and Robbins 1988; Yusuke Maeda and Kinoshita 2008). Es stellt damit ein Schlüsselenzym für die Biosynthese von GPIs dar, wie unter anderem auch für Hefen und den Einzeller *Trypanosoma brucei* gezeigt werden konnte (P. Orlean 1990; Menon, Mayor, and Schwarz 1990). Vergleiche zur Hydrophobizität des C- bzw. N-terminalen Protein-Endes dieses evolutionär stark konservierten Enzyms mit verschiedenen Organismen, zeigen bedeutende Unterschiede. Der Stamm des DPM-Proteins fällt in zwei allgemeine Hauptuntergruppen. Die erste davon besteht ausschließlich aus einem Enzym, DPM1, das eine hydrophobe C-terminale Transmembran-Helix (TMH) aufweist, wie

beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) und *Entamoeba spp.*, wohingegen *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) ein hydrophobes Ende am *N*-Terminus zeigt (Colussi et al. 1997; Tomita et al. 1998; Ilgoutz et al. 1999; Delorenzi et al. 2002; Shams-Eldin et al. 2008). Die zweite große Untergruppe enthält DPM1-Homologe, denen eine TMH fehlt, wie in höheren Organismen, wie *Schizosaccharomyces pombe*, *Homo sapiens* und Säugetieren. Diese Eukaryoten benötigen für die GPI-Biosynthese mindestens zwei weitere Komponenten, nämlich DPM2 und DPM3, die für die stabile Expression von DPM1 im ER erforderlich sind (Y. Maeda et al. 1998; Y. Maeda et al. 2000).

Bisher gibt es immer noch Fragen zur tatsächlichen Gensequenz, Proteinstruktur, Hydrophobizität und Klassifizierung von DPM1 des Einzellers *B. microti*, die bislang noch nicht vollständig geklärt werden konnten.

1.4 Die Erzeugung rekombinanter konditional letaler DPM1-Hefemutanten

Um die Identität eines Gens eines Organismus sicher nachzuweisen, eignet sich unter anderem eine Methode, welche konditional letale Hefemutanten verwendet. Voraussetzung dafür ist, dass das Protein, für das das Gen codiert, ein essentielles Protein für Hefen ist, sodass diese bei Fehlen dieses Gens keinerlei Wachstum zeigen. Im Falle des Gens für das Enzym DPM1 wurden konditional letale Hefemutanten erzeugt, um diese für Komplementations-Experimente zu verwenden (Mazhari-Tabrizi et al. 1996; Mazhari-Tabrizi et al. 1999). In dieser Arbeit wurde mit der vorliegenden konditional letalen DPM1-Hefemutante überprüft, ob *dpm1* aus dem Protozoon *B. microti* das in der *S. cerevisiae*-Hefemutante ausgeschaltete *dpm1*-Gen durch heterologe Komplementierung funktionell ersetzen kann, sodass die Hefemutanten wieder Wachstum zeigen.

Voraussetzung für diese Experimentenreihe ist die Herstellung dieser konditional letalen Hefemutante für *dpm1*. Dafür wurde zunächst mit digitaler Unterstützung am Computer die annotierte Nukleotidsequenz des *dpm1*-Gens für die Hefe *S. cerevisiae* dargestellt. Das Startkodon ist durch das Nukleotid-Triplett ATG zu identifizieren. Im

Weiteren sind Primer herzustellen. Dazu erzeugt man Primer, die am 5'-Ende eine circa 20 bp lange Nukleotidsequenz, einen sogenannten Überhang, enthalten. Diese Nukleotidsequenz liegt circa 200 bp «upstream», das heißt in Richtung des 5'-Endes des Startkodons des *dpm1*-Gens. An diese 20 bp lange Sequenz dieses «sense»-Primers wird die Nukleotidsequenz einer sogenannten Histidin-Galaktose-Promoter-(HIS-GAL-P)-Kassette angehängt, die eine Größe von circa 100 bp hat. Diese Sequenz beinhaltet die Basenfolge für die Aminosäure Histidin sowie für den Galaktose-Promoter. Der «anti-sense»-Primer enthält neben der Startkodon-Sequenz von *dpm1* auch die Basenabfolge von einer weiteren circa 20 bp langen *dpm1*-Sequenz «downstream» des Startkodons in Richtung 3'-Ende. Nach einer erfolgten PCR finden sich Amplifikate, die die Sequenz des 5'-Überhanges vor dem *dpm1*-Gen, der HIS-GAL-P-Kassette sowie neben dem *dpm1*-Startkodon circa 20 bp des *dpm1*-Gens «downstream» aufweisen (Abbildung 6). Dieses PCR-Produkt lässt sich nun in eine haploide Hefe transformieren. Dazu eignet sich besonders der *S. cerevisiae*-Stamm YPH 499. Durch homologe Rekombination lässt sich das PCR-Produkt im Austausch zur originalen Sequenz ersetzen, mit dem Unterschied, dass die erzeugte Hefe vor dem Startkodon von *dpm1* das Gen für Histidin als Selektionsmarker sowie die Gensequenz für den Galaktosepromoter aufweist (Mazhari-Tabrizi et al. 1999). Der Hefestamm YPH 499 ist auxotroph und benötigt sowohl Histidin als auch Uracil im Medium zum Wachstum. In histidin- und uracilfreiem Medium kann der Wildtyp-Stamm daher nicht wachsen. Die erzeugte konditional letale Hefemutante kann allerdings auf histidinfreien Mediumplatten wachsen, da bei erfolgreicher Transformation (erfolgreich hergestellte YPH 499-HIS-GAL-P-*dpm1* konditional letale Mutante) das Gen für diese Aminosäure in der transformierten Sequenz vorhanden ist. Histidin dient hierbei also als Selektionsmarker zur Überprüfung von korrekt transformierten Hefeklonen. In Abwesenheit von Galaktose und Anwesenheit von Glukose kann die erzeugte konditional letale Hefemutante allerdings nicht wachsen, da durch die Anwesenheit von Glukose im Medium der Galaktosepromoter stark reprimiert wird.

Zur Überprüfung, ob das *dpm1*-Gen eines anderen Organismus (im Fall dieser Arbeit *dpm1* von *B. microti*) in der Lage ist, das *dpm1* der Hefemutante zu komplementieren, wird ein entsprechender Shuttle-Vektor (p426 MET 25) ausgewählt und die jeweilige *dpm1*-Sequenz in diesen hinein kloniert. Dieser Shuttle-Vektor trägt unter anderem auch das Gen für Uracil, was als Selektionsmarker für die erfolgreiche Transformation des Vektors in Hefezellen ausgenutzt wird, sodass erfolgreich transformierte YPH 499-Hefezellmutanten auch in uracilfreiem Medium Wachstum aufweisen können. Im Rahmen dieser Dissertation wird der die parasitische *dpm1*-Sequenz tragende Shuttle-Vektor in die konditional letale Hefemutante transformiert, um diese auf ihre Wachstumsfähigkeit auf entsprechenden Medien zu überprüfen.

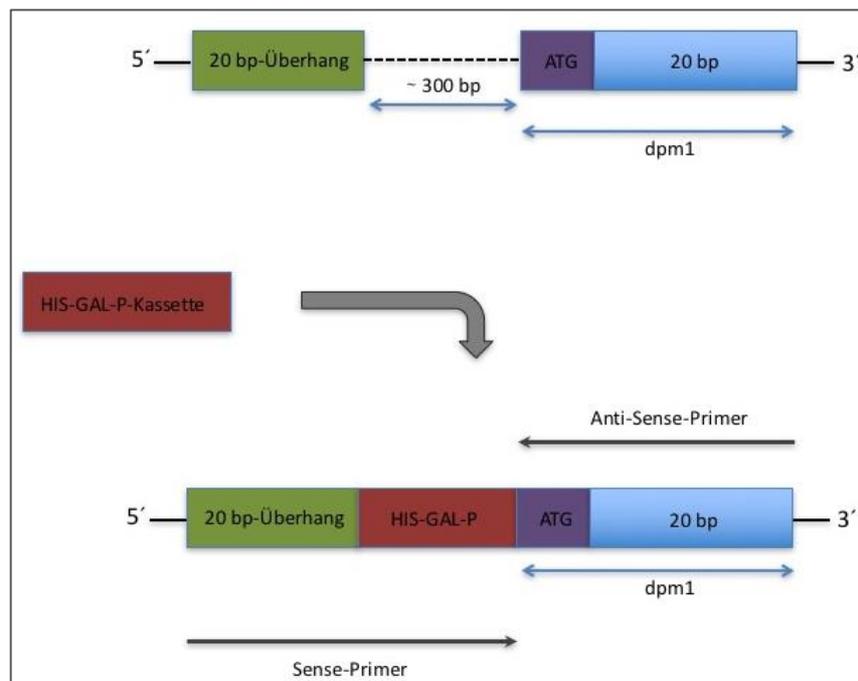


Abbildung 6: Schema zur Herstellung rekombinanter konditional letaler Hefemutanten. Nach der Identifizierung der Basensequenz für das *dpm1*-Gen für *S. cerevisiae* wurden Oligonukleotidprimer hergestellt, die an ihrem 5'-Ende einen Überhang, der circa 300 bp vom Startcodon für *dpm1* entfernt liegt und die Basensequenz für eine HIS-GAL-P-Kassette (Forward-Primer) bzw. an ihrem 3'-Ende das *dpm1*-Startcodon mit circa 20 weiteren Basenpaaren aufweisen (Reverse-Primer). Nach erfolgter PCR konnte das PCR-Produkt mit den dargestellten Sequenzen in die haploide Hefe YPH 499 transformiert werden und durch homologe Rekombination die Wildtyp-Sequenz durch die dargestellte rekombinante Sequenz ersetzt werden.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Zu den Eigenschaften des Enzyms DPM1 von *B. microti* liegen bisher im Vergleich zu anderen eukaryoten Parasiten nur wenige Informationen vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, dieses Protein in systematischen Schritten hinsichtlich seiner evolutionären Konservierung und genetischen Eigenschaften zu analysieren und zu charakterisieren.

Zur bisher annotierten Gensequenz gibt es kontroverse Informationen, so dass nach gezielter Analyse und Auswertung ein aktualisierter Einblick in die Beschaffenheit des Gens für das Enzym DPM1 von *B. microti* gegeben werden soll.

In einem weiteren Teil dieser Promotionsarbeit sollte die Konservierung von DPM1 systematisch unter Zuhilfenahme einer Vielzahl von Organismen bioinformatisch analysiert und mit DPM1 von *B. microti* in Zusammenhang gesetzt werden. Dabei wird unter anderem die Hydrophobizitätsskala aller DPM-Enzyme der ausgewählten Organismen analysiert und mit den Ergebnissen von *B. microti* in den Kontext gebracht. Ziel dieser Aufgabe war die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums, aus dem hervorgeht, welche Organismen sich in Bezug auf DPM1 gleichen und welche phylogenetisch eher fremd zueinander sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen genaue Rückschlüsse auf die Konservierung dieses Enzyms in der ausgewählten Vielzahl von Organismen zulassen, den Ursprung dieses Enzyms näher beleuchten und schließlich eine Art Klassifizierung für dieses einzigartige Enzym zulassen.

In einem dritten Teil sollte ein zu *S. cerevisiae* passendes Plasmid erzeugt werden, das das Gen für das Protein DPM1 von *B. microti* enthält. Schließlich soll mittels heterologer Komplementierung überprüft werden, ob DPM1 vom Einzeller *B. microti* das für *S. cerevisiae* essentielle DPM1 in *dpm1*-defizienten-Mutanten von *S. cerevisiae* funktionell zu ersetzen vermag.

In der Gesamtschau sollen die Überprüfung der korrekten Annotierung des *dpm1*-Gens, die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums und die Komplementierungsexperimente von *dpm1* in Hefen einen Einblick in die Natur, Struktur und Funktion dieses Enzyms der ausgewählten Organismen, aber insbesondere von *B. microti* bringen.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Zubehör

Materialien und Geräte	Firma
37 °C-/ CO ₂ -Zellkulturschrank	Heraeus
Analysewaage	Sartorius
Brutschrank	Thermo Scientific
Elektrophoresesystem	Minigel-Twin, Biometra
Eppendorf-Zentrifugen	Heraeus
Heizblock	Roth
Magnetrührer	IKA
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Mikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss
Mikroskop Laborlux S	Leitz
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss
Mikrowelle	Sharp
Nanodrop 3300	Thermo Scientific
Objektträger	Menzel
PCR-Maschine	Biometra
Petrischalen 10 cm Durchmesser für Agar (unbeschichtet)	Greiner und Sarstedt
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo
Pipetten	Gilson und Eppendorf
Plasmodipur Säulen	Europroxima
Reagenzglasschüttler Reax 2000	Heidolph
Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Eppendorf und Greiner

Materialien und Geräte	Firma
Schüttelinkubator	IKA
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Spritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 60 ml	BD
Sterilfilter (0,22 µm)	Sarstedt
Software Nanotrop ND-1000 V3.3.0)	Thermo Scientific
Software TINA 2.0	Raytest
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

2.2 Chemikalien

Substanz	Firma
Acrylamid	Bio-Rad
Adenin	Roth
Agar	Roth
Agarose	Life Technologies
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar	BD
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Merck
Hefeextrakt	Roth
Galaktose	Merck
Giemsa-Lösung	Merck
Glukose	Roth
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies
L-Histidin	Roth
L-Leucin	Roth

Substanz	Firma
L-Lysin	Roth
L-Tryptophan	Roth
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumzitat	Sigma-Aldrich
Pepton	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Raffinose	Roth
Tris	Roth
Tris-Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Trypton	Roth
Uracil	Roth

2.3 Bakterien und Hefen

Bakterien

<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stamm XL1-Blue	Stratagene
--	------------

Hefezellen

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Stamm YPH 499 (Wildtyp)	AG Parasitologie Dr. H. Shams-Eldin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Stamm YPH 499 (Rekombinante Kond. letale Mutante, defizient für <i>dpm1</i>)	AG Parasitologie (Mazhari-Tabrizi et al. 1999)

2.4 Glas- und Plastikwaren

Plastikwaren wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Costar (Cambridge), Eppendorf (Hamburg) und Saarestedt (Nümbrecht) bezogen und sind im folgenden Text nicht besonders erwähnt. Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert und, falls erforderlich unter sterilen Bedingungen verwendet.

2.5 Enzyme mit dazugehörigen Puffern

Bezeichnung	Firma
Antarctic Alkalische Phosphatase; 10x Antarctic Phosphatase-Puffer	NEB
DpnI-Endonuklease	Stratagene
BAMHI-HF-Endonuklease	NEB
HINDIII-HF-Endonuklease	NEB
EcoRI-HF-Endonuklease	NEB
Pfu-Ultra II Fusion HS Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Fermentas
Restriktionsendonukleasen mit zugehörigen Puffern (nicht näher bezeichnet)	Fermentas, NEB
Reverse Transkriptase mit zugehörigem Puffer	Sigma Aldrich
RNAase	Biozym
T4-DNA-Ligase; 10x T4-Ligase-Puffer	Fermentas

2.6 Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Sequenz 5' ⇒ 3'
DPM1_ATG	ATGTATAGTGTAATTCTGCCTACGGTT
DPM1_stop	TTAATCGCGATTACTCAATTTTGA
DPM1_B	TTTTGGCCGAAATTAACAGAT
DPM1_C	GTCCAGGTGAAATTTACAAATTTT
DPM1_D	CCATACTATATGATGGTTTATATATATTGGG
DPM1_E	CAGTTGTAGAATTCAATATTAACACCATA
DPM1_F	TTACCTTAAATGGCGCAATAATATCATC
DPM1_H	TCTTCTGATTATGCCCCCTACAAAGTT
DPM1_I	GATGATATTATGTGCATTTAAGGTAA
DPM1_J	AATTTTAGCAATTGTCCGTAAAAATTT
polyT	TTTTTTTTTTTTTTTT
ATG-Bam	CAGGGATCCATGTATAGTGTAATTCTGCCTAC
STP-Hind	TCGAAGCTTTCATATTGAACATACAATTTTAGCAATTGTCCGTAAAAATTTG
ATG-Xho	CAGCTCGAGATGTATAGTGTAATTCTGCCTAC
STP-BglIII	TCGAGATCTTCATATTGAACATACAATTTTAGCAATTGTCCGTAAAAATTTG

2.7 Kommerziell erhältliche Reaktionskits

Bezeichnung	Firma
DNA-Extraktionskit	Qiagen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Nucleospin Blood QuickPure DNA Extraction Kit	Macherey-Nagel
PeqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab
PeqGold Total RNA Kit	PeqLab
QiAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
SuperScript III Reverse Transcriptase	Thermo Fischer
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit und Puffer Set	Zymo Research

2.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
p426 MET 25	Bakterieller Expressionsvektor	Dr. H. Shams-Eldin, Marburg (Mumberg, Müller, and Funk 1994).

2.9 Rekombinante Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
p426 MET 25 – BM- <i>dpm1</i>	Kodiert für das Enzym DPM1 von <i>Babesia microti</i>	Eigene Herstellung, Bestandteil dieser Promotionsarbeit.

2.10 Puffer, Medien und Gele

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit entionisiertem Wasser der Millipore-Anlage Milli-Q (Millipore) hergestellt. Die Anlage filtert Wasser über einen Molekulfiter mit einer Porengröße von 0,22 µm. Der pH-Wert einzelner Lösungen wurde mit Hilfe des pH-Meters Seven Easy eingestellt. Bei Bedarf wurden einzelne Lösungen über 0,2 µm-Filter steril filtriert.

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Hefetransformation: Puffer 1	1 ml 1M LiAc, 1ml TE Puffer (10x), 8 ml H ₂ O
Hefetransformation: Puffer 2	1 ml 1M LiAc, 1ml TE Puffer (10x), PEG 4000 ad 10 ml
1x TBE-Puffer	100 ml 5x TBE-Puffer ad 1000 ml H ₂ O _{dest}
10x TBE-Puffer	54 g Tris-Base 27,5 ml Essigsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml H ₂ O _{dest}
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	0,20 g/l KH ₂ PO ₄ 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,20 g/l KCl 8,00 g/l NaCl ad 1 l H ₂ O _{dest}

2.11 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Medium

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	5 g/l
MgSO ₄ /MgCl ₂ 1M	2 ml/l
NaOH 10M	400 µl

Einstellen des pH-Werts auf 7,5. Nachdem der pH-Wert eingestellt wurde, erfolgt die Zugabe von 20 g Agar/l für Agarplatten.

Erst nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von Antibiotika (Ampicillin 1:1000, Stock: 100 mg/ml) in das bereits abgekühlte Medium.

LBG-Medium

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	5 g/l
Glukose	2 g/l
MgSO ₄ / MgCl ₂ 1 M	2 ml/l
NaOH 10 M	400 µl

Einstellen des pH-Werts auf 7,5. Nachdem der pH-Wert eingestellt wurde, erfolgt die Zugabe von 20 g Agar/l für Agarplatten.

Erst nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von Antibiotika (Ampicillin 1:1000, Stock: 100 mg/ml) in das bereits abgekühlte Medium.

2.12 Wachstumsmedien für Hefen

YPGR-Medium

Hefeextrakt 10 g

(Vollmedium)

Pepton 20 g

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 500 ml und daraufhin autoklavieren.

Hinzugabe folgender Inhaltsstoffe:

Galaktose 40 g

Raffinose 20 g

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 500 ml und daraufhin autoklavieren. Nach dem Autoklavieren wurden beide Lösungen unter sterilen Bedingungen vereint.

SD-Medium

Glukose 20 g

Agar 20 g

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 900 ml und daraufhin autoklavieren.

Nach dem Abkühlen Hinzugabe folgender Ingredienzien.

1,7 g YNB

5 g (NH₄)SO₄

2 ml Adenin (2 mg/ml)

3 ml Lysin (10 mg/ml)

3 ml Leucin (10 mg/ml)

2 ml Tryptophan (10 mg/ml)

2 ml Histidin (10 mg/ml)

10 ml Uracil (10 mg/ml)

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 100 ml und steril filtrieren.

SD-Medium (-His-Ura)

Glukose	20 g
Agar	20 g

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 900 ml und daraufhin autoklavieren. Nach dem Abkühlen Hinzugabe folgender Ingredienzien.

1,7 g	YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
5 g	(NH ₄)SO ₄
2 ml	Adenin (2 mg/ml)
3 ml	Lysin (10 mg/ml)
3 ml	Leucin (10 mg/ml)
2 ml	Tryptophan (10 mg/ml)

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 100 ml und steril filtrieren.

SGR-Medium

Galaktose	40 g
Raffinose	20 g
Agar	20 g

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 900 ml und daraufhin autoklavieren. Nach dem Abkühlen Hinzugabe folgender Ingredienzien.

1,7 g YNB
5 g (NH₄)SO₄
2 ml Adenin (2 mg/ml)
3 ml Lysin (10 mg/ml)
3 ml Leucin (10 mg/ml)
2 ml Tryptophan (10 mg/ml)
2 ml Histidin (10 mg/ml)
10 ml Uracil (10 mg/ml)

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 100 ml und steril filtrieren.

SGR-Medium (-His-Ura)

Galaktose	40 g
Raffinose	20 g
Agar	20 g

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 900 ml und daraufhin autoklavieren.

Nach dem Abkühlen Hinzugabe folgender Ingredienzien.

1,7 g YNB
5 g (NH₄)SO₄
2 ml Adenin (2 mg/ml)
3 ml Lysin (10 mg/ml)
3 ml Leucin (10 mg/ml)
2 ml Tryptophan (10 mg/ml)

Auffüllen mit *Aqua bidest ad* 100 ml und steril filtrieren.

3 Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

Mit allen Medien und Medienzusätzen wurde unter sterilen Bedingungen (sterile Arbeitsbank) umgegangen. Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte in einer mit wasserdampfgesättigten 5 %-igen CO₂-Atmosphäre bei 24 °C in einem Inkubationsschüttler in 50 ml-Reaktionsgefäßen.

Für die Kultivierung von Hefezellen wurde YPGR-Medium (Vollmedium) verwendet. Die Kultivierung der «knock-out»-Mutanten fand unter bewusst restriktiven Bedingungen statt. *E. coli* wurde in LB-Medium, supplementiert mit 1 % Ampicillin, kultiviert.

3.1.1. Kultivierung von *Babesia microti*

Die Parasitenkultivierung von *B. microti* fand im Partnerlabor von Prof. Dr. E. Cornillot, Universität Montpellier, Frankreich statt und wurde in der Mongolischen Rennmaus (*Meriones unguiculatus*) nach nationalen (französischen) und internationalen Richtlinien durchgeführt (Cornillot et al. 2013). Dazu wurden die Tiere mit 100 ml Blut von zuvor infizierten Tieren inokuliert und die Parasitämie durch Blutabnahme aus der Schwanzspitze mit nachfolgendem Blutausschmear und Anfärbung mittels Giemsa-Färbung alle drei bis vier Tage überwacht.

3.1.2. Extraktion von *Babesia microti* aus infizierten Erythrozyten

Bei einer Parasitämie von 15 % bis 20 % wurden die oben beschriebenen Tiere getötet und das Blut durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze abgenommen. Das abgenommene Blut wurde sofort in PBS gewaschen. Der Buffycoat wurde vorsichtig verworfen und weiße Blutzellbestandteile wurden durch Filtration auf Plasmodipur-Säulen entfernt. Die Zelldichte wurde mit einem Hämozytometer gemessen und die Parasitämie durch Lichtmikroskopie von giemsaefärbten

Blutausstrichen bestimmt. Während des Umgangs mit diesen Parasiten unter Sicherheitsstufe-2-(S2)-Bedingungen wurden stets eine Maske, zwei übereinander gezogene Lagen Handschuhe sowie ein Kittel getragen.

3.1.3. DNA-Extraktion aus *Babesia microti*

Die DNA von *B. microti* für die folgenden PCR-Analysen wurde direkt aus 100 ml der infizierten roten Blutkörperchen der Tiere unter Verwendung des Nucleospin-Blood-Quickpur-Extraktion-Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung des im Folgenden beschriebenen Geräts Nanodrop 3300 gemessen.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine effiziente Methode, um DNA zu amplifizieren (Saiki et al. 1985; Mullis and Faloona 1987). Dabei werden zunächst DNA-Doppelstränge durch thermische Denaturierung voneinander getrennt. Während des Abkühlens lagern sich DNA-Primer an die Template-DNA an, die anschließend durch das Enzym DNA-Polymerase verlängert werden. Wiederholtes Erhitzen und Abkühlen führt zu einer exponentiellen Amplifikation, wobei die Position der beiden DNA-Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) die zu amplifizierende Sequenz bestimmt. Zur Amplifikation der DNA wurde für alle PCR-Reaktionen dieser Promotionsarbeit die Phusion-Polymerase verwendet, da diese Polymerase sowohl eine hohe Fehlergenauigkeit, als auch Geschwindigkeit aufweist.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz beinhaltet folgende Komponenten:

Phu Polymerase (2,5 U/μl)	1 μl
Phu Reaktionspuffer (10x)	5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	1,25 μl
Template-DNA	100 ng
Oligonukleotid-Primer	je 100 pmol
ddH ₂ O	<i>ad</i> 50 μl

Die typischen PCR-Parameter sind im Folgenden aufgeführt.

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95 °C	2 min	30x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	55 °C - 64 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min pro 1 kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Nach der Denaturierung der DNA (95 °C) und Absenkung der Temperatur (55 °C - 64 °C) erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide (Primer). Durch Erwärmen der Proben auf 72 °C wird die Elongation eingeleitet. Dabei beträgt die Geschwindigkeit der Phusion-Polymerase 10 s/kb bis 15 s/kb. Die Amplifikation der DNA-Fragmente wird durch mehrfaches Durchlaufen dieser Schritte (30 Zyklen) erreicht. Nach einem um 10 min verlängerten letzten Elongationsschritt wird die PCR-Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C beendet. Zur Überprüfung der Größe und Reinheit des PCR-Produkts wurde dieses per Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2) analysiert. Das PCR-Produkt wurde entweder direkt oder nach Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande aus dem Agarose-Gel und sich anschließender Isolation aus dem Gelfragment (3.2.3) für Klonierungsexperimente verwendet.

3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mittels Agarose-Gelelektrophorese im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Zur Analyse von DNA wurde ein Gel verwendet, das eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in 1x TBE-Puffer aufwies. Die DNA-Proben wurden vor dem Beladen der Geltaschen mit 6x konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt und im Gel bei 5 V/cm für circa 90 min aufgetrennt. Es wurde ein, je nach zu erwartender DNA-Fragmentgröße geeigneter DNA-Marker, am häufigsten ein 1 kb-DNA-Marker verwendet. Zum Anfärben der DNA wurde das Gel für circa 30 min in 1x TBE-Puffer mit 0,00003 % (v/v) Ethidiumbromid geschwenkt. Die DNA-Banden konnten so unter UV-Licht bei 360 nm visualisiert werden.

3.2.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA wie unter 3.2.2 beschrieben aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Daraufhin wurden die DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht bei 360 nm sichtbar gemacht und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem «Gel Extraction Kit» (Qiagen) oder dem PeqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit (Peqlab) aus den ausgeschnittenen Agarosegelstücken extrahiert und in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

3.2.4. Restriktionsverdau

Zum Einbringen von DNA-Abschnitten in ein Plasmid mittels Ligation, bedarf es zunächst den Verdau von Vektor (Plasmid) und dem in diesem Fall als Insert bezeichnete DNA-Fragment mit geeigneten sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. In dieser Arbeit wurden dabei Enzyme verwendet, die überhängende 3'-Enden («sticky ends») erzeugen, über die im Folgenden eine Ligation stattfinden kann. Für die Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren wurden diese wie zuvor beschrieben (3.2.2) mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert (3.2.3) und schließlich mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Der Zielvektor wurde entsprechend mit denselben Enzymen zum Verdau behandelt. Die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma NEB oder Fermentas.

Für den Verdau von PCR-Fragmenten wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

Restriktionsenzym	je 1 µl
Reaktionspuffer (10x)	5 µl
PCR-Fragment	0,5 µg
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für den Verdau von vektorieller DNA wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

Restriktionsenzym	je 1 μ l
Reaktionspuffer (10x)	2 μ l
PCR-Fragment	2 μ g
ddH ₂ O	<i>ad</i> 20 μ l

Die Inkubationszeiten und -temperaturen orientierten sich an den Herstellerangaben. Die Reaktionsansätze wurden aber in aller Regel für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zum Entfernen von Restriktionsenzymen und Puffer für darauffolgende Schritte wurden die Ansätze im Anschluss an den Verdau mittels des «PCR Purification Kits» der Firma Qiagen nach Herstellerangaben gereinigt.

3.2.5. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Vor dem Einbringen von DNA-Fragmenten in einen Expressionsvektor mittels einer Ligation, besteht die Notwendigkeit, die durch den Restriktionsverdau entstandenen 5`-Phosphatgruppen der vektoriellen DNA (Plasmid-DNA) zu entfernen, um eine Selbstligation des Vektors mit seinen beiden Enden in jedem Fall zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Antarctic®-Phosphatase verwendet.

Dabei bestand ein 22 μ l-Ansatz aus 19 μ l linearisiertem Vektor, 1 μ l Antarctic-Phosphatase (2,5 U) und 2 μ l 10x Antarctic-Puffer. Nach der Inkubation bei 37 °C für 60 min wurde die Phosphatase bei 65 °C für 15 min wieder inaktiviert. Um wiederum Enzyme und Puffer für nachfolgende Schritte zu entfernen, wurden die Ansätze mit dem «PCR Purification Kit» (Qiagen) erneut aufgereinigt.

3.2.6. Ligation von PCR-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase

Zur kovalenten Verknüpfung doppelsträngiger DNA-Fragmente wurde die T4-Ligase verwendet. Für die Ligationsreaktion wurde ein Insert-Vektor-Verhältnis von 3:1 gewählt. Die Konzentration von Vektor und Insert wurde nach Restriktionsverdau und Dephosphorylierung durch Messung der Absorption am Nanodrop-Gerät ermittelt (3.2.13).

Ein repräsentativer Ligationsansatz enthielt folgende Zusammensetzung:

T4-Ligase	2 U
T4-Ligationspuffer (10x)	3 µl
Insert-DNA	~150 ng
Vektor-DNA	~50 ng
ddH ₂ O	ad 30 µl

Die Reaktionsansätze wurden bei 16 °C Übernacht im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in chemisch kompetente XL1-blue *Escherichia coli* transformiert und auf Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

3.2.7. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab

Für die Plasmidpräparation in kleinem Maßstab, die sogenannte Mini-Präp, die im Anschluss an eine Ligation erfolgte, wurden chemisch kompetente *E. coli* des Stammes XL1-blue mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert und auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kolonien auf den Platten gesichtet und von dieser Platte selektiert, indem einzelne Kolonien mit der Spitze einer 200 µl-Pipettenspitze vorsichtig von der Platte aufgenommen wurden. Die gepickten Kolonien (Klone) wurden in ein 15 ml-Reaktionsgefäß aus Glas mit 2 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und für 16 Stunden bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler bei 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Übernachtskultur bei 1600 g für 10 min pelletiert.

Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmide aus den jeweiligen Ansätzen mittels des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I (Peqlab) nach Herstellerangaben und wurde zur Sequenzierung verwendet (3.2.13.). Eine Konzentrationsbestimmung der Plasmide wurde, wie unter Punkt 3.2.12. beschrieben durch Messung der Absorption bei 260 nm durchgeführt.

3.2.8. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien im großen Maßstab

Für die Plasmidpräparation im großen Maßstab, sogenannte Maxi-Präp wurden Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* des Stammes XL1-blue transformiert und auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kolonien auf den Platten gesichtet und von dieser Platte selektiert, indem einzelne Kolonien mit der Spitze einer 200 µl-Pipettenspitze vorsichtig von der Platte aufgenommen wurden. Die gepickten Kolonien (Klone) oder 1 ml einer 2 ml Übertagkultur wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und für 16 Stunden bei 37 °C vorzugsweise über Nacht auf dem Schüttler bei 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Zellsuspension bei 6000 g für 15 min zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Bakterienzentrifugat mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und zur Sequenzierung verwendet (3.2.13.). Eine Konzentrationsbestimmung der Plasmide wurde, wie unter Punkt 3.2.12 beschrieben durch Messung der Absorption bei 260 nm durchgeführt.

3.2.9. Einführung von Punktmutationen mittels Quickchange

Eine Methode zur Einführung von Punktmutationen einzelner Codons in doppelsträngige DNA erfolgte mit Hilfe der Quickchange-Mutagenese (Costa et al. 1996; Fisher and Pei 1997). Bei diesem Verfahren wird eine Mutation durch Primer inseriert, bei denen das gewünschten Ziel-Codon in 3`- und 5`-Richtung mit einer Länge von je 12 bp – 15 bp flankiert wird, die zur Ausgangs-DNA komplementär sind. In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um bei der Klonierung entstandene Mutationen im *dpm1*-Gen von *B. microti* zu korrigieren. Für die Quickchange-Mutagenese werden zwei Primer verwendet, die vollständig zueinander komplementär sind und dieselbe Stelle des kodierenden sowie des nicht-kodierenden Stranges binden. Es erfolgte im ersten Schritt eine PCR-Reaktion, bei der beide Stränge des zu mutierenden Plasmids vollständig repliziert werden. Aus diesem Grund ist es essentiell, eine Polymerase mit hoher Fehlergenauigkeit einzusetzen, wie z. B. die hier verwendete Pfu-Polymerase (Stratagene).

Reaktionsansatz

Pfu Polymerase (2,5 U/μl)	1 μl
Pfu Reaktionspuffer (10x)	5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	2 μl
Template-DNA (Plasmid)	200 ng
Oligonukleotid-Primer	je 100 pmol
ddH ₂ O	ad 50 μl

PCR-Parameter und Programm

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95 °C 1 min	
Denaturierung	95 °C 30 sec	16x
Hybridisierung	55 °C 1 min	
Elongation	68 °C 10 min	
4 °C	∞	

Im Gegensatz zu den ursprünglich in die Reaktion eingesetzten Parentalsträngen (Elternstränge) (Plasmid) sind die neu entstandenen (replizierten) Plasmid-Stränge allerdings nicht vollständig geschlossen, da 3`- und 5`-Ende durch die Polymerase nicht verknüpft werden können.

Durch Paarung der Parentalstränge und der neu synthetisierten Stränge miteinander oder untereinander entstehen zum Abschluss dieser PCR-Reaktion folgende Kombinationsmöglichkeiten doppelsträngiger DNA: Doppelstränge, die nur die parentalen Stränge enthalten, Doppelstränge, die eine Mischung aus neu synthetisierten und parentalen Strängen aufweisen oder Doppelstränge, die nur aus neu synthetisierten DNA-Strängen bestehen.

Die letztgenannte Paarung entspricht dem gewünschten Plasmid, da nur hier im kodierenden und nicht-kodierenden Strang die durch die Oligonukleotidprimer eingeführte Mutation enthalten ist. Um ebendiese neu synthetisierten DNA-Doppelstränge spezifisch zu selektieren, wird ein Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease DpnI, die aus *Diplococcus pneumoniae* isoliert wurde durchgeführt. DpnI verdaut nur methylierte oder hemi-methylierte DNA. Die DNA der Parentalstränge wurde aus *E. coli* isoliert, weshalb sie natürlicherweise methyliert ist. Diese methylierten Enden dienen als Erkennungstelle für DpnI. Folglich können nur DNA-Doppelstränge, die diese methylierten Parentalstränge enthalten, verdaut werden, während die doppelsträngige DNA, die nur aus neu synthetisierten Strängen besteht vom Verdau geschützt ist.

Reaktionsansatz

DpnI	10 U
Puffer Tango™ (10x)	6 µl
PCR-Ansatz	50 µl

Der Verdau mit DpnI erfolgte für 1 h bis 2 h bei 37 °C. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 80 °C für circa 20 min inaktiviert.

Daraufhin wurde der PCR-Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* des Stammes XL1-blue transformiert (3.2.11) und anschließend auf Agar-Platten, die LB und Ampicillin enthielten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformation in *E. coli* dient dazu, die gewünschten Plasmide zu amplifizieren. Darüber hinaus werden die noch in den Plasmiden vorhandenen Lücken (nicht geschlossene DNA-Doppelstränge, der durch die o. g. PCR neu entstandenen Stränge) in den Plasmiden durch *E. coli* geschlossen. Der Erfolg der Mutagenese wird im Anschluss durch Selektion einzelner Klone auf der Platte mit anschließender Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (3.2.7) und folgender Sequenzierung (3.2.13.) der Plasmide überprüft.

3.2.10. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde der *E. coli*-Stamm XL1-blue verwendet. Dazu wurden 3 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotika mit den entsprechenden Bakterien inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotika mit 0,5 ml dieser Übernacht-Kultur angeimpft, bei 24 °C und 225 rpm auf dem Schüttler bis zu einer OD 600 von 0,2 bis 0,5 inkubiert und im Anschluss mittels des «Z-competent *E. coli* Transform Kits» (Zymo Research) chemisch kompetent gemacht. Die kompetenten Bakterien wurden in 100 µL-Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.11. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Zur Einführung von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien wurde in dieser Arbeit die Hitzeschock-Methode verwendet (Cohen, Chang, and Hsu 1972). Dazu wurden 50 µl auf Eis aufgetaute chemisch kompetente XL1-blue *E. coli*-Zellen mit 0,2 µg bis 0,5 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl bis 20 µl eines Ligationsansatzes hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für exakt 45 Sekunden. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit auf 37 °C vorgewärmten LB-Medium versehen und für

1 h bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl der Zellsuspension auf eine mit Selektionsmarker versetzte LB-Agar-Platte aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.12. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde mit dem Spektrometer Nanodrop (Software: ND-1000-V3.3.0) photometrisch bei 260 nm bestimmt. Der Quotient aus den Absorptionswerten von 260 nm/280 nm bestimmte die Reinheit der DNA. Dabei galt ein Wert zwischen 1,8 – 2,0 als optimal.

3.2.13. DNA-Sequenzierung

Zur Bestätigung der Einführung von Punktmutationen bzw. zur Überprüfung der korrekten DNA-Sequenzen ist es notwendig, alle Proben zu sequenzieren. Die DNA wurde hierzu von der Firma Seqlab Sequence Laboratories (Göttingen) mit Hilfe der Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger, Nicklen, and Coulson 1992). Als Vorbereitung zur Sequenzierung wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 2 pmol des entsprechenden Sequenzier-Primers vermischt und mit H₂O auf ein Volumen von 7 µl aufgefüllt. Weitere noch für die Reaktion erforderliche Reagenzien wurden von der Firma Seqlab hinzugefügt (Endvolumen 10 µl). Die Richtigkeit der Probensequenz wurde mit Hilfe von NCBI-Blast, NCBI-Align-Two Sequences und mit dem Vektorprogramm CloneChart überprüft.

3.2.14. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Parasiten von *Babesia microti* erfolgte mithilfe des peqGold Total RNA Kits nach Herstellerangaben. Zur Elution der RNA wurde 50 µL RNase-freies Wasser verwendet und die erhaltene RNA entweder direkt für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.2.15. Synthese von cDNA

Zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wurde die reverse Transkription mit Hilfe des SuperScript III Reverse Transcriptase Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro 20 µl Ansatz wurden 8 µl RNA eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.2.16. Transformation der Hefemutanten mit *dpm1* aus *Babesia microti*

Die Transformation der Hefezellen wurde mittels der Lithium-Acetat-(LiAc)-Methode durchgeführt (Ito et al. 1983). Nach dem Vorbereiten der unter 2.10 aufgeführten Puffer 1 und Puffer 2 wurden die zuvor im Brutschrank gezüchteten Hefezellen in einem 50 ml-Zentrifugationsgefäß bei 700 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen, verworfen und das zurückbleibende Zell-Pellet in 1 ml Puffer 1 resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml-Zentrifugationsgefäß überführt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1600 g für 1 min. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Hefezell-Pellet wurde erneut in 1 ml Puffer 1 resuspendiert und bei 1600 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, verworfen, ein weiteres Mal in Puffer 1 resuspendiert und erneut bei 1600 g für 1 min zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Zellpellet in 500 µl Puffer 1 resuspendiert und auf Eis gestellt. Diese Hefezellen sind an dieser Stelle kompetent für eine Transformation mit Plasmid-DNA. Zu diesem Zeitpunkt wurde Lachssperma aufgetaut und für 10 min aufgeköcht. Parallel dazu erfolgte das Auftauen der für die Transformation zu verwendenden Plasmide.

Der Transformationsansatz beinhaltete folgende Ingredienzien und wurde in einem 1,5 ml-Zentrifugationsgefäß vorbereitet:

- 5 µl Lachssperma
- 3 µl Plasmid-DNA
- 300 µl Puffer 2
- 100 µl Kompetente Hefezellen (zuvor auf Eis gelagert)

Dieser Transformationsansatz wurde vorsichtig aufgewirbelt (gevortext) und bei 30 °C für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 42 °C unter leichtem Schütteln. Die Zellen wurden nach diesem Inkubationsschritt sofort für 3 min auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1600 g für 1 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet in 300 ml H₂O resuspendiert.

Aus diesem Ansatz wurden 150 µl jeweils auf Petrischalen mit folgendem Nährboden (Agar) ausgestrichen:

SGR^{-His-Ura} und SD^{-His-Ura} [Plasmid mit Insert (SC-*dpm1*; BM-*dpm1*)]

SGR^{-His-Ura} und SD^{-His-Ura} (leeres p426 MET 25-Plasmid ohne Insert)

Die Petrischalen wurden anschließend mit Parafilm versiegelt und bei 26 °C in einem Schüttel-Inkubator für 4 Tage bis 6 Tage, je nach individueller Proliferation, inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf Wachstum überprüft.

3.2.17. Plasmidextraktion aus Hefezellen

Nachdem die Hefezellen für die entsprechend oben aufgeführten Zeiträume inkubiert worden sind, wurden die Zentrifugationsröhrchen (50 ml) mit Hefezellen für 5 min bei 4°C bei 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Hefezellen mit 1 ml ddH₂O resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1600 g für 1 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 220 ml YPGR-Medium aufgenommen und resuspendiert und bei 50 °C für 20 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach folgte die DNA-Extraktion mittels Mini-Präp (3.2.7.).

3.3. Bioinformatische Methoden

3.3.1. Einführung

Zur Klärung der evolutionären Konservierung und genetischen Eigenschaften des Proteins DPM1 von *Babesia microti* wurde in systematischen Schritten mithilfe bioinformatischer Methoden dieses Protein und das dafür codierende Gen analysiert und charakterisiert. Dazu wurde die Expression von DPM1 in einer Vielzahl von eukaryoten Organismen, wie Kinetoplasten, Apicomplexa, Hefen, Pilze, *Ciliata*, aber auch Pflanzen und schließlich dem Menschen untersucht. Im Zentrum dieser Untersuchungen, die sich bioinformatischen Datenbanken bediente, stand die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums der unter Hinzunahme dieser Vielzahl von Organismen anhand des Enzyms DPM1 erstellt wurde, um in Erfahrung zu bringen, welche Organismen sich in Bezug auf DPM1 gleichen und welche phylogenetisch eher fremd zueinander sind. Darüber hinaus wurde nach der An- oder Abwesenheit der Hydrophobizität an der C-terminalen oder N-terminalen Proteinregion, von Signalpeptiden, dem Vorhandensein von GPI-Verankerungen sowie nach der Präsenz oder der Abwesenheit von DPM2 und DPM3 innerhalb dieser Vielfalt von Organismen gesucht. Die Strategie und Systematik, die dieser Untersuchung zugrunde liegt, wird im Folgenden erläutert. Diese Analysen wurden mit allen unter 3.3.9 gelisteten Organismen durchgeführt. Für diese Untersuchung bedarf es eines Personalcomputers (PCs) oder eines Macintosh mit einer Internetverbindung. Die Auswahl des Internetbrowsers ist in diesem Fall unerheblich.

3.3.2. «Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes» (KEGG)

Die Datenbank «Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes» (KEGG; (<http://www.kegg.jp/> oder <http://www.genome.jp/kegg/>) ist eine integrierte Datenbank-Ressource für die biologische Interpretation von Genomsequenzen. Sie dient zum Verständnis und zur Anwendung von Dienstprogrammen des biologischen Systems, wie der einzelnen Zelle, des Organismus und des Ökosystems auf Basis der molekularen Analyse insbesondere von großen Datensätzen, die durch Genom-Sequenzierungen erzeugt worden sind (Kanehisa et al. 2014).

Dabei werden molekulare Funktionen von Genen und Proteinen in Gruppen zusammengefasst und miteinander verknüpft und in der Datenbank «KEGG Orthology» (KO) gespeichert. Zur Zeit sind mehr als 4000 komplette Genome in KO annotiert, die als Referenz-Datensätze, zur Rekonstruktion von «Gene-Pathways» und zur Integration und Arbeit an anderen molekularen Netzwerken verwendet werden können (Kanehisa et al. 2016).

In dieser Arbeit wurde KEGG verwendet, um zum einen die bekannten Genome sämtlicher Organismen in Erfahrung zu bringen und zum anderen um Informationen zum Protein DPM1 zu erhalten. Dazu wurde mit folgendem Arbeitsablauf die Analyse auf entsprechenden Datenbanken durchgeführt.

Einen Überblick über die vollständigen Genome bekannter Organismen liefert:

«KEGG Organisms»: http://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html

Zur Suche von Proteinen in der KO-Datenbank eignete sich die folgende Seite:

«KEGG Orthology» (KO) Datenbank: <http://www.genome.jp/kegg/ko.html>

Auf dieser Startseite von KO wurde der Suchbegriff „DPM1“ eingegeben, der für DPM1 die Eintragsnummer K00721 ergab.

http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K00721

Diese Seite stellt alle Informationen zu DPM1, wie zum Beispiel den Enzym-Code (EC:2.4.1.83) zur Verfügung und beinhaltet alle Organismen, für die dieses Protein bereits beschrieben und genetisch geklärt ist (Abschnitt «Genes»). Einen Überblick über diese Seite gibt Abbildung 7, die einen Screenshot darstellt. Im Abschnitt «Genes» sind Organismus-Kürzel mit der darauffolgenden Zuordnungsnummer von DPM1 zu diesem Organismus versehen. Das Klassifikationsschema für diese Kürzel findet sich auf bereits oben genannter Seite:

«KEGG Organisms»: http://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html

KEGG ORTHOLOGY: K00721	
Entry	K00721 KO
Name	DPM1
Definition	dolichol-phosphate mannosyltransferase [EC:2.4.1.83]
Pathway	ko00510 N-Glycan biosynthesis
Disease	H00118 Congenital disorders of glycosylation (CDG) type I
Brite	KEGG Orthology (KO) [BR:ko00001] Metabolism Glycan biosynthesis and metabolism 00510 N-Glycan biosynthesis K00721 DPM1; dolichol-phosphate mannosyltransferase Enzymes [BR:ko01000] 2. Transferases 2.4 Glycosyltransferases 2.4.1 Hexosyltransferases 2.4.1.83 dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase K00721 DPM1; dolichol-phosphate mannosyltransferase Glycosyltransferases [BR:iko01003] N-Glycan biosynthesis Del-P-Man biosynthesis K00721 DPM1; dolichol-phosphate mannosyltransferase BRITE hierarchy
Other DBs	RN: R01009 COG: COG0463 GO: 0004582 CAZy: GT2
Genes	BBA: 8813(DPM1) PTR: 745025(DPM1) PPS: 100977673(DPM1) GGO: 101135435(DPM1) PON: 100447907(DPM1) NLE: 100598596(DPM1) MCC: 701283(DPM1) MCF: 102135525(DPM1) RRO: 104662375(DPM1) CJC: 100413774(DPM1) » show all Taxonomy KOALA UniProt
Reference	PMID:3053713
Authors	Orlean P, Albright C, Robbins PW
Title	Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein.
Journal	J Biol Chem 263:17499-507 (1988)

Abbildung 7: Proteinsuche auf der KEGG-Datenbank nach DPM1.
Anhand der Entry-Nummer (K00721) für *dpm1* listet diese Seite neben weiteren Erläuterungen zu diesem Gen alle bislang bekannten Organismen auf, für die dieses Gen bereits identifiziert worden ist.

Aus dieser Liste mit Organismen lässt sich das Taxonomie-Kürzel des entsprechenden Organismus entnehmen und in der Liste der «Genes» von DPM1 aufschlüsseln. Bei Auswahl der Organismen, hier am Beispiel für *Babesia bovis* gezeigt, öffnet sich eine Seite mit allen relevanten Information zu DPM1 des ausgewählten Organismus (Abbildung 8). Neben allgemeinen Informationen, wie zum Beispiel der UniProt-Code (A7AQ39), die diese Seite bietet, waren für die Analysen dieser Promotionsarbeit die aufgeführten Aminosäuresequenzen von besonderem Interesse, da diese Information die essentielle Basis für alle folgenden Analysen darstellte.

KEGG Babesia bovis: BBOV_III011210	
Entry	BBOV_III011210 CDS T01085 Help
Gene name	17.m07965
Definition	(RefSeq) glycosyl transferase
KO	K00721 dolichol-phosphate mannosyltransferase [EC:2.4.1.83]
Organism	bbo Babesia bovis
Pathway	bbo00510 N-Glycan biosynthesis bbo01100 Metabolic pathways
Brite	KEGG Orthology (KO) [BR:bbo00001] Metabolism Glycan biosynthesis and metabolism 00510 N-Glycan biosynthesis BBOV_III011210 (17.m07965) Enzymes [BR:bbo01000] 2. Transferases 2.4 Glycosyltransferases 2.4.1 Hexosyltransferases 2.4.1.83 dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase BBOV_III011210 (17.m07965) Glycosyltransferases [BR:bbo01003] N-Glycan biosynthesis Dol-P-Man biosynthesis BBOV_III011210 (17.m07965) BRITE hierarchy
SSDB	Ortholog Paralog GFIT
Motif	Pfam: Glycos_transf_2 Glyco_tranf_2_3 Glyco_transf_21 Glyco_tranf_2_2 Glyco_trans_2_3 Glyco_tranf_2_4 Motif
Other DBs	NCBI-ProteinID: XP_001612241 NCBI-GI: 156089669 NCBI-GeneID: 5480501 UniProt: A7A039
Position	3
AA seq	253 aa AA seq DB search MADVNVGISVILATYNERDNIAYITYMIIDALRTPQVEYELLVDDNSPDGTVVEYRHMQ QLYPTVQLKLLQRPGKMGSGSAYMDGLAHTKHDFILILDADLSHHPKYIPEMIRLQRTGN YDIVTGTRYATGGGASGWSLYRILISKTANTLTHMLLRPTMDMTGSRFLYRRSLFEKVL KEVESKGYMFQIEIAARSEKHYKARIAEVPFIIFLERIYGESKLGELMLCNSKFTGFGEVL GFLKGLLRLLANSL

Abbildung 8: Betrachtung des Gens *dpm1* von *Babesia bovis* auf der KEGG-Datenbank. Auf dieser Seite finden sich neben der Definition des Gens dieses Organismus alle weiteren relevanten Informationen, wie Aminosäuresequenz, UniProt-Code und weitere Klassifikationsnummern anderer Datenbanken.

3.3.3. «Universal Protein Database» (UniProt)

Die Datenbank «Universal Protein Database» (UniProt, <http://www.uniprot.org>) ist derzeit die größte bioinformatische Datenbank für Proteine aller Lebewesen und Viren. Sie enthält Informationen über die Funktion und Struktur von Proteinen sowie Verweise (Links) zu anderen themenrelevanten Netzwerken und Datenbanken (Magrane and Consortium 2011; UniProt Consortium 2015). Zur Analyse des Proteins DPM1 wurde der Server UniProt auch für einen sogenannten «Protein-Blast-Search» verwendet. Dafür wurde die Aminosäuresequenz von DPM1 anhand des Beispiels für die DPM1-Sequenz des Parasiten *Babesia bovis* auf folgender Seite eingegeben (Abbildung 9).

UniProt «Blast-Search»: <http://www.uniprot.org/blast/>

Abbildung 9: Proteinsuchfunktion auf der «UniProt Blast-Search»-Seite. Auf dieser Datenbank wurde die Aminosäuresequenz von DPM1 von *B. bovis* eingefügt und schließlich nach Homologien aller bisher bekannten Aminosäuresequenzen von sämtlichen Organismen gesucht.

Der «Blast-Search» dient vor allem dazu, Homologien der Aminosäuresequenz von DPM1 eines Organismus zu anderen Organismen zu erfassen. Die Rate an Übereinstimmung (Sequenzhomologien) bestimmte im weiteren Vorgehen die Auswahl weiterer Organismen in die weiterführende Analyse und zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaums.

Für die Arbeiten an diesem Stammbaum zu DPM1 war für die jeweilige Proteinkodierung von DPM1 des jeweiligen Organismus der «UniProt-Code» essentiell, da dieser Standard für die schnelle und gezielte Beschreibung und Suche von Proteinen ist. Aus diesem Grund ist der «UniProt-Code» stets bei Angabe von Proteinen eines Organismus angegeben worden.

3.3.4. Das Programm «Prediction of Transmembrane Regions and Orientation» (TMpred)

Das Programm TMpred macht basierend auf der Aminosäuresequenz eines Proteins eine Vorhersage von Transmembranregionen und deren Ausrichtung. Der Algorithmus basiert auf der statistischen Analyse von TMbase, einer Datenbank von natürlich vorkommenden Transmembranproteinen. Die Vorhersage wird unter Verwendung einer Kombination von mehreren gewichteten Matrizen für die finale Wertung gemacht (Hofmann 1993). Für die Analyse, ob DPM1 eine hydrophobe *N*-terminale oder hydrophobe *C*-terminale Region in den jeweiligen Organismen aufweist, wurde die Aminosäuresequenz von DPM1 zu den jeweils korrelierenden Organismen, wie zuvor beschrieben, aus der KEGG-Datenbank erfasst und auf der TMpred-Seite eingespeist. Dazu wurde folgende Seite aufgerufen und die Daten exemplarisch anhand von *Babesia bovis* eingegeben (Abbildung 10):

TMpred: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Die Informationen, die diese Seite zur Verfügung stellt, sind Daten zu möglichen Transmembranhelices, Informationen darüber, ob Außen- und Innenhelices miteinander korrespondieren sowie Hypothesen zur Topologie der Transmembrandomäne (z. B. *N*-terminal oder *C*-terminal).

Diese Informationen sind wichtig für die Kategorisierung und Charakterisierung von DPM1 der jeweiligen Organismen und stellen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis in der Gesamtschau dieses Proteins und seiner evolutionären Entwicklung bzw. Konservierung dar.

TMpred

Prediction of Transmembrane Regions and Orientation

The TMpred program makes a prediction of membrane-spanning regions and their orientation. The algorithm is based on the statistical analysis of TMbase, a database of naturally occurring transmembrane proteins. The prediction is made using a combination of several weight-matrices for scoring.

- **K. Hofmann & W. Stoffel (1993)**
TMbase - A database of membrane spanning proteins segments
 Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166

For further information see the [TMbase](#) documentation.

- Usage: Paste your sequence in one of the supported **formats** into the sequence field below and press the "Run TMpred" button.
Make sure that the format button (next to the sequence field) shows the correct format
 Choose the minimal and maximal length of the hydrophobic part of the transmembrane helix

Output format	<input type="text" value="html"/> <input type="text" value="minimum 17"/> <input type="text" value="maximum 33"/>
Query title (optional)	<input type="text" value="Babesia bovis"/>
Input sequence format	<input type="text" value="Plain Text"/>
Query sequence: or ID or AC or GI (see above for valid formats)	<pre>MADVVNGISVILATYNERDNIAYITYMIDALRTQPVEYELLVDDNSPDGTVEVYRHMQ QLYPTVQLKLLQRPQKMGSGAYMDGLAHTKHDFILILDADLSHHPKYIPEMIRLQRTGN YDIVTGTRYATGGGASGWSLYRILISKANTLTHMLLRPTMTDMTGSFRLYRRSLFEKVL KEVESKGYMFQIEIAARSEKHYKARIAEVPIFLERIYGESKLGELWLCNSKFTGFGEVL GFLKGLRLAWSL</pre>

Abbildung 10: Eingabe der Aminosäuresequenz von DPM1 von *B. bovis* in die TMpred-Datenbank. Der TMpred-Server macht auf Grundlage der Aminosäuresequenz eine Vorhersage über die Transmembranregionen und deren topologischen Ausrichtung.

3.3.5. Die Datenbank SignalP

Die Datenbank SignalP 4.1 ist eine Ressource des Zentrums für biologische Sequenzanalyse (CBS) der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>). Der Server von SignalP prognostiziert das Vorhandensein und die Lage der Signalpeptidspaltungsstellen in den Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen, wie grampositive und gramnegative Prokaryoten sowie von Eukaryoten (Nielsen et al. 1997a). Das Verfahren beinhaltet eine Vorhersage von Spaltstellen und eine Vorhersage vom Vorhandensein von Signalpeptiden basierend auf einer Kombination mehrerer künstlicher neuraler Netzwerke (Nielsen et al. 1997b). Dabei kann es zwischen Signalpeptiden und Transmembranregionen unterscheiden (Bendtsen et al. 2004; Petersen et al. 2011).

SignalP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

3.3.6. Der «Transmembrane Topology Prediction Server» HMMTOP

HMMTOP ist ein automatischer Server zur Vorhersage von Transmembranhelices und der Topologie von Proteinen. Dieses Werkzeug erlaubt sowohl die Prognose der Lokalisierung von spiralförmigen Transmembransegmenten, als auch die Topologie von Transmembranproteinen, die dem Benutzer erlaubt, die Vorhersagegenauigkeit und Interpretation experimenteller Ergebnisse, wie Insertionen, zu erhöhen (Tusnády and Simon 2001). Der HMMTOP-Server bedient sich dabei dem «Hidden-Markov-Modell» (HMM). Demnach wurden fünf Strukturteile in Membranproteinen definiert: Membranhelix (h), innerer und äußerer Helix-Schwanz (i und o) sowie die Innen- und Außenschleife (I und O). Zwei miteinander verbundene Schwänze bilden eine kurze Schleife mit der Membran, während die Schwanz-Schleife-Schwanz-Sequenz, eine lange Schleife im Zytosol oder extra-zytosolisch bildet. Die Topologie wird durch Partitionieren von Aminosäuresequenzen bestimmt, die so angeordnet sind, dass das Produkt der relativen Häufigkeit von Aminosäuren in diesen Strukturteilen entlang der Sequenz maximal ist. Diese Aufgabe kann durch das Hidden-Markov-Modell gelöst

werden, mit dem biologische Einschränkungen durch die intrinsische Architektur des HMM berücksichtigt werden (Tusnády and Simon 1998).

Zur Analyse der jeweiligen speziesspezifischen Aminosäuresequenz von DPM1 wurde nachfolgend aufgeführte Seite des HMMTOP-Servers aufgerufen und die Aminosäuresequenz in die dafür vorgesehene Textregion eingefügt.

HMMTOP: <http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>

Mithilfe dieses Werkzeugs lassen sich Unterschiede der organismusspezifischen DPM1-Proteine anhand der Lokalisation (Topologie) des *N*-Terminus (innerhalb oder außerhalb der Membran), die Anzahl der Transmembranhelices sowie die Lokalisation der Transmembranhelices herausarbeiten und mit DPM1 anderer Organismen vergleichen.

3.3.7. Das «GPI-anchor predictor System» PredGPI

Eukaryotische Proteine, die mit der extrazellulären Seite der Plasmamembran assoziiert sind, tragen einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker, der nach einer proteolytischen Spaltung circa 20-30 Aminosäuren «upstream» vom *C*-Terminus, an der sogenannten Omega-Stelle, mit dem *C*-Terminus verknüpft ist (Peter Orlean and Menon 2007). Wissenschaftliche Rechenmethoden wurden entwickelt, um Proteine zu unterscheiden, die ebendiese posttranslationale Modifikation, ausgehend von ihren Aminosäuresequenzen erfassen. Der Server PredGPI ist ein solches Vorhersagesystem für GPI-verankerte Proteine. Es basiert auf einer Support-Vektor-Maschine (SVM) zur Diskriminierung des Verankerungssignals und auf dem Hidden-Markov-Modell für die Vorhersage der wahrscheinlichsten Stelle, an dem die proteolytische Abspaltung an der o. g. Omega-Stelle vorgenommen wird (Pierleoni, Martelli, and Casadio 2008).

PredGPI
GPI-anchor Predictor

Home
Prediction
Datasets
Proteomes
Info

PredGPI predictor

Choose the omega-site prediction model

General model (recommended)
 Conservative model

Submit sequence(s) in FASTA format:

Sequences must be at least 40 residues long.
Paste the complete aminoacidic sequence(s):

```
>MADVVNGISVILATYNERDNIAYITYMIDALRTQPVEYELLVDONSPDGTVEVYRHMQ
QLYPTVQLKLRPGKMSLGSAYMDGLAHTKDFILDADLSHPKYIPEMIRLQRTGN
YDIVTGTTRYATGGGAGWBLRYLISKANTLTHMLLRPTMTDMTGSFRLYRSLFEKVL
KEVESKDYMFQIEIARSEKHYKARIAEVPIFLERIVGESKLGELWLCNSKFTGFGEVL
GFLKQLRLAWSL
```

Or upload a file:

If you want to receive the results via e-mail, please fill in this field and click on Download:

Please submit a maximum of 500 sequences per time.

Abbildung 11: Die Datenbank PredGPI. Eingabe der Aminosäuresequenz von DPM1 von *B. bovis* zur Analyse einer möglichen GPI-Verankerung.

Um eine Vorhersage über eine GPI-Verankerung sowie der Schnittstelle (Omega-Stelle) der proteolytischen Spaltung treffen zu können, wurde die Aminosäuresequenz der spezienspezifischen DPM1-Proteine auf die Seite des PredGPI-Systems eingespeist (Abbildung 11).

PredGPI : <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/gpipe/index.htm>

Mit diesem System lässt sich die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von GPI-Ankern des jeweiligen DPM1-Proteins sowie die Position der Omega-Stelle bestimmen.

3.3.8. Die Datenbank «Protein Families» (Pfam)

Die Pfam-Datenbank ist eine große Sammlung von Proteinfamilien, die sowohl durch multiple Sequenz-Alignments, als auch mithilfe des Hidden-Markov-Modells dargestellt wird (Bateman et al. 2002). Proteine bestehen im Allgemeinen aus einem oder mehreren Funktionsbereichen, die als Domänen bezeichnet werden. Verschiedene Kombinationen von Domänen führen zu einer diversen Vielfalt von Proteinen, die in der Natur zu finden sind. Die Identifizierung von Domänen, die innerhalb dieser Proteine auftreten, kann Einblicke in ihre Funktion zur Verfügung stellen. Pfam erzeugt auch auf höherer Ebene Gruppierungen verwandter Einträge, die als Clans bezeichnet werden. Ein Clan ist eine Sammlung von Pfam-Einträgen, die mit der Ähnlichkeit in der Sequenz, der Struktur oder per HMM in Beziehung stehen (Finn et al. 2016). Die Daten für jeden Eintrag basieren auf den eingangs erwähnten UniProt-Referenzen. Zur Analyse der jeweiligen organismusspezifischen DPM1-Aminosäuresequenzen wurden diese in der unten aufgeführten Datenbank eingefügt.

Pfam-Datenbank: <http://pfam.sanger.ac.uk/>

Mithilfe von Pfam lässt sich das jeweilige Protein des ausgewählten Organismus im Gesamtkontext einer Klassifikation in eine Proteinfamilie einordnen sowie in einen bestimmten Protein-Clan eingruppiert. Die Information, die dieser Server zur Verfügung stellt, ist im Prinzip eine Evaluation der zuvor durchgeführten Ergebnisse und soll die bereits gewonnenen Informationen über die Struktur und Funktion sowie das Vorhandensein von GPI-Ankern und etwaiger Transmembranhelices bestätigen.

3.3.9. Verwendete Organismen und ihre Bedeutung

<i>Trypanosoma cruzi</i>	Erreger der Chagaskrankheit
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit
<i>Leishmania infantum</i>	Erreger der viszeralen und der kutanen Leishmaniose
<i>Leishmania major</i>	Erreger der kutanen Leishmaniose
<i>Leishmania mexicana</i>	Erreger der diffuskutanen Leishmaniose
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hefeart, die für die Produktion von Kefir eingesetzt wird
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bäckerhefe bzw. Bierhefe
<i>Ustilago maydis</i>	Maisbeulenbrand, parasitischer Brandpilz
<i>Perkinsus marinus</i>	Parasitischer Protozoon, der Austern befällt
<i>Proterospongia rosetta</i>	Kragengeißeltierchen
<i>Monosiga brevicollis</i>	Kragengeißeltierchen
<i>Giardia lamblia</i>	Parasitischer Erreger der Giardiasis
<i>Babesia bovis</i>	Parasitischer Erreger der Babesiose
<i>Theileria orientalis</i>	Parasitischer Erreger mit veterinärmedizinischer Bedeutung
<i>Theileria parva</i>	Parasitischer Erreger des Küstenfiebers beim Rind
<i>Theileria annulata</i>	Parasitischer Erreger mit veterinärmedizinischer Bedeutung
<i>Babesia microti</i>	Parasitischer Erreger der Babesiose
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Parasitischer Erreger der Kryptosporidiose
<i>Cryptosporidium muris</i>	Parasitischer Erreger der Kryptosporidiose der Maus
<i>Neospora caninum</i>	Parasitischer Erreger von Infektionskrankheiten bei Haus- und Wildtieren
<i>Toxoplasma gondii</i>	Parasitischer Erreger der Toxoplasmose
<i>Plasmodium falciparum</i>	Parasitischer Erreger der <i>Malaria tropica</i>

<i>Plasmodium knowlesi</i>	Parasitischer Erreger der Malaria
<i>Plasmodium vivax</i>	Parasitischer Erreger der <i>Malaria tertiana</i>
<i>Plasmodium cynomolgi</i>	Parasitischer Erreger der veterinärmedizinisch relevanten Malaria
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Parasitischer Erreger der veterinärmedizinisch relevanten Malaria
<i>Plasmodium berghei</i>	Parasitischer Erreger der veterinärmedizinisch relevanten Malaria
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	Parasitischer Erreger der veterinärmedizinisch relevanten Malaria
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spalthefe
<i>Pneumocystis murina</i>	Pilzart, die Mäuse infiziert
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Dimorphe Hefe-Art
<i>Candida albicans</i>	Erreger der Candidose
<i>Candida dubliniensis</i>	Opportunistischer Hefepilz
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Pilz aus der Familie <i>Saccharomycetaceae</i>
<i>Fusarium graminearum</i>	Pilz aus der Gruppe der Ascomyceten
<i>Penicillium digitatum</i>	Schimmelpilzart
<i>Emericella nidulans</i>	Gießkannenschimmel
<i>Aspergillus flavus</i>	Schimmelpilz und Erreger der Aspergillose
<i>Aspergillus niger</i>	Schimmelpilz und Erreger der Aspergillose
<i>Drosophila melanogaster</i>	Taufliege
<i>Danio rerio</i>	Zebraquappe (Fischart)
<i>Xenopus tropicalis</i>	Krallenfrosch
<i>Homo sapiens</i>	Mensch
<i>Mus musculus</i>	Hausmaus
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acker-Schmalwand (Schotenkresse oder Gänserauke)
<i>Oryza sativa japonica</i>	Rundkornreis (Klebereis)
<i>Zea mays</i>	Mais

<i>Sorghum bicolor</i>	Mohrenhirse
<i>Phytophthora infestans</i>	Kartoffelmehltau (Art der Eipilze)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Art der Schleimpilze
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Wimperntierchen
<i>Paramecium tetraurelia</i>	Pantoffeltierchen
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Einzellige Grünalgenart

3.3.10. Erzeugung eines phylogenetischen Stammbaums mit «Phylogenie.fr»

Die Seite Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr>) bietet eine einfach anzuwendende Möglichkeit, phylogenetische Zusammenhänge zwischen molekularen Sequenzen zu analysieren und zu rekonstruieren. Mithilfe dieses Servers ist es möglich, einen robusten phylogenetischen Stammbaum aus einem Datensatz von Aminosäuresequenzen zu erzeugen. Dabei bedient sich Phylogeny.fr bei der Erstellung solcher Stammbäume verschiedener bioinformatischer Programme, die es zum einen als Plattform selbst unterhält und zum anderen Programme anderer Plattformen miteinander verbindet (Dereeper et al. 2008). Diese Plattform wurde vom «Laboratoire d'Informatique de Robotique et de Microélectronique de Montpellier» (LIRMM) und vom «Information Génomique et Structurale» (IGS) entwickelt und unter anderem mit Mitteln des «Centre National de la Recherche Scientifique» (CNRS), Frankreich zur Verfügung gestellt. Bei der Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums für diese Dissertationsarbeit wurde die «One-Click»-Methode verwendet. Dabei sind die DPM1-Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Organismen im FASTA-Format einzugeben, um die phylogenetische Analyse zu starten. Das Analyse-System des Phylogenie.fr-Servers bedient sich dabei bioinformatischer Standardprogramme, wie MUSCLE 3.7, Gblocks 0.91b, PhyML 3.0 und TreeDyn 198.3 (Edgar 2004; Chevenet et al. 2006; Guindon et al. 2010).

Aminosäuresequenzen von DPM1 der jeweiligen Organismen wurden auf der untenstehenden Seite eingespeist und die Konstruktion des phylogenetischen Stammbaums gestartet (Abbildung 12).

«One-click»-Methode: http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/simple_phylogeny.cgi

Am Ende der Analyse, die bis zu 15 min in Anspruch nehmen kann, präsentiert das Programm ein Bild des phylogenetischen Stammbaums in Publikationsqualität.

Méthodes
et
Algorithmes
pour la
Bio-informatique
LIRMM

Home Phylogeny Analysis Blast: Sequence Explorer Online Programs Your Workspace Documentation Downloads Contacts

Please fill this survey (<5mn)

"One Click" Mode

Alignment MUSCLE → Curation Gblocks → Phylogeny PhyML → Tree Rendering TreeDyn

1. Overview 2. Data & Settings

Name of the analysis (optional):

Upload your set of sequences in FASTA, EMBL or NEXUS format from a file:
 Keine Datei ausgewählt

Or paste it here (load example of sequences)

Maximum number of sequences is 200 for proteins and 200 for nucleic acids.
 Maximum length of sequences is 2000 for proteins and 6000 for nucleic acids.

▶ Names association

Use the Gblocks program to eliminate poorly aligned positions and divergent regions

To receive the results by e-mail, enter your address(es):

Do not attach result files

Abbildung 12: Seite der «One-Click»-Methode der Phylogenie-Datenbank. Durch Einfügen der Aminosäuresequenzen aller Organismen (weißes leeres Feld), deren Vergleich und phylogenetische Anordnung zu einem Stammbaum gewünscht sind, werden in das dafür vorgesehene Feld im FASTA-Format eingefügt. Das Programm führt dann mit verschiedenen Rechenschritten und mit unterschiedlichen Methoden eine Voraussage über die phylogenetischen Ursprünge der eingegebenen Organismen in Form eines Stammbaums aus.

3.3.11. Zusammenfassung der bioinformatischen Analysen

Im Fokus der oben beschriebenen Analysen mit allen unter 3.3.9 gelisteten Organismen stehen vor allem das Vorhandensein einer hydrophoben C-terminalen oder einer hydrophoben N-terminalen Proteinregion, von Signalpeptiden, von GPI-Verankerungen sowie die Präsenz oder die Abwesenheit weiterer Proteine aus der Familie der Mannosyltransferasen, wie DPM2 oder DPM3. Diese Informationen sollen bei der o. g. Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums Aufschluss darüber geben, inwiefern das Protein DPM1 in unterschiedlichen Organismen evolutionär konserviert ist oder welche Unterschiede bestehen. Der vollständige Arbeitsablauf der zuvor genannten Analysen mit den ausgewählten Organismen ist in Abbildung 13 skizziert:

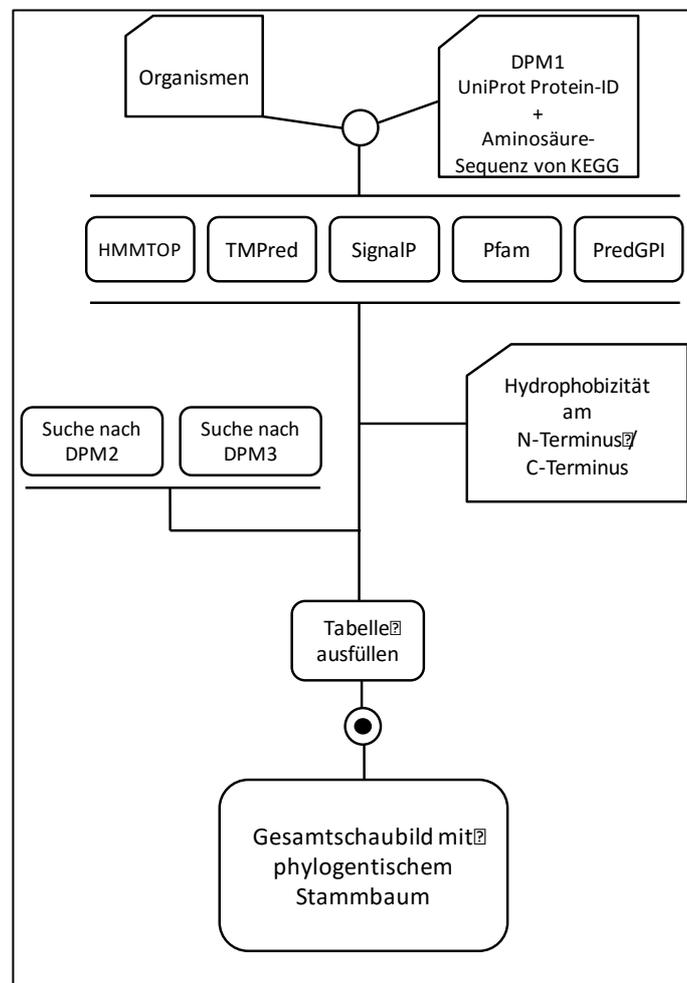


Abbildung 13: Zusammenfassender Arbeitsablauf der bioinformatischen Analysen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Gengrenzen von DPM1 in *Babesia microti*

Das Protein DPM1 ist für viele Organismen gut beschrieben und das Gen für dieses Protein molekularbiologisch gut charakterisiert (Colussi et al. 1997; Y. Maeda et al. 2000; Yusuke Maeda and Kinoshita 2008; Shams-Eldin et al. 2008; Cardoso et al. 2013; Juchimiuk, Kruszewska, and Palamarczyk 2015). Für den parasitischen Einzeller *Babesia microti* gibt es in Bezug auf die annotierte Gensequenz allerdings Zweifel an der publizierten Länge dieses Gens (Cornillot et al. 2012). Aus diesem Grund sollte die tatsächliche Länge der Sequenz dieses Gens anhand molekularbiologischer Methoden überprüft werden. Die Fragestellung lautete demnach, ob die annotierte Gensequenz sowie die Länge des Gens der GPI-Biosynthese DPM1 des Apicomplexa *B. microti* korrekt ist.

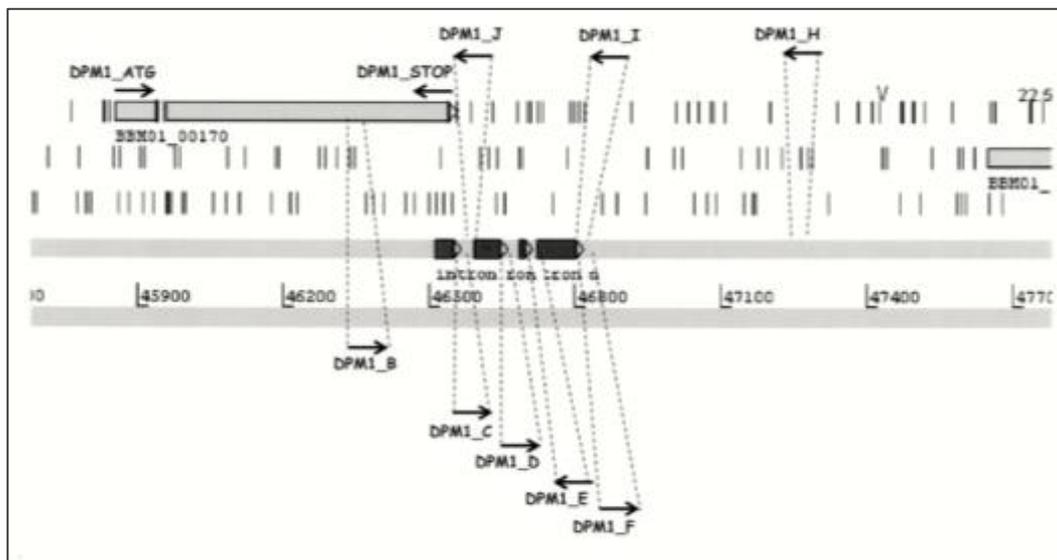


Abbildung 14: Annotiertes *dpm1*-Gen von *Babesia microti* sowie Schema des Primer-Designs zur Bestimmung der tatsächlichen Gensequenzlänge. Die dargestellten Primer, wie z. B. DPM1_B oder DPM1_H sind frei innerhalb der Nukleotidsequenz dieser DNA-Region gewählt.

Dazu wurde mithilfe eines Programms («DNA-Plotter») (Carver et al. 2009) das bislang bekannte Genom von *B. microti* dargestellt und der Abschnitt für das Gen *dpm1* aufgesucht. Dem Stopp-Codon von *dpm1* folgen mit Unterbrechungen einige «Introns». Für den Bereich nach dem Stopp-Codon von *dpm1*, also hinter dem Gen, wurden Primer erzeugt, die das *dpm1*-Gen im Bereich der annotierten «Intron-Region» flankieren (Abbildung 14).

Abbildung 14 zeigt das annotierte *dpm1*-Gen, die «Introns» und die Anordnung der erstellten Primer sowohl im bereits annotierten Bereich, als auch in der bislang als «Intron-Bereich» bezeichneten Genregion. In einem ersten Schritt wurde die Funktionsfähigkeit aller dargestellten Primer mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA (gDNA), also DNA, die zuvor aus *B. microti*-Parasiten extrahiert worden ist, überprüft und bestätigt. Als Positivkontrolle der PCR diente hier das Gen für die *B. microti*-spezifische Laktatdehydrogenase (LDH), einem konstitutiv exprimierten Gen für ein Enzym des anaeroben Stoffwechsels. Mit diesem essentiellen Versuchsschritt, der zur Optimierung der PCR-Parameter, wie Temperatur, Zyklen-Länge und Zyklen-Anzahl diente, konnten die Konditionen für die Primer und der PCR der genomischen DNA von *B. microti* untersucht und optimiert- sowie für die darauffolgende Reverse-Transkriptase-(RT)-PCR übernommen werden.

In einem zweiten Schritt wurde mit, aus *B. microti* isolierter RNA eine RT-PCR durchgeführt. Die Verwendung von parasitischer RNA begründet sich darin, dass in RNA keine «Introns», sondern ausschließlich «Exons» enthalten sind, die für das Protein DPM1 kodieren. Eine RT-PCR amplifiziert messenger RNA (mRNA) und transkribiert diese gleichzeitig in DNA. Diese DNA wird copy DNA (cDNA) genannt, da diese cDNA keine Introns enthält, sondern lediglich sog. «Exons». Bei der RT-PCR wurde zum einen ein Poly-TTT-Primer, der an den bei der Transkription im Parasiten erzeugten Poly-AAA-Schwanz der mRNA bindet, und zum anderen die in Abbildung 14 gezeigten spezifischen Primer, die innerhalb der DNA-Sequenz des Gens bzw. der vermuteten Sequenzen liegen, verwendet.

Die verwendeten frei gewählten Primer (Abbildung 14) klären bei der RT-PCR darüber auf, ob das tatsächliche Gen so lang ist, wie das angegebene Stopp-Kodon oder eine größere Länge im Bereich der frei gewählten Primer-Abschnitte aufweist, da mRNA nur «Exons» enthält auf deren Grundlage die Proteinbiosynthese stattfindet, wohingegen auf genomischer DNA auch «Introns» zu finden sind, die nicht für ein Protein kodieren

Die erzeugte cDNA wurde anschließend mittels klassischer PCR erneut mit den spezifischen Primern der hypothetischen Sequenzen des *dpm1*-Gens amplifiziert. Im gleichen PCR-Ansatz wurde zum Vergleich genomische DNA mit den gleichen Primer-Paaren, wie beim cDNA-Ansatz amplifiziert. Dabei wurden sowohl Negativkontrollen (ohne cDNA und gDNA), als auch Positivkontrollen (LDH-Gen) aufgetragen. Anschließend wurden die zueinander gehörigen Primer-Paare auf einem Elektrophoresegel nebeneinander aufgetragen.

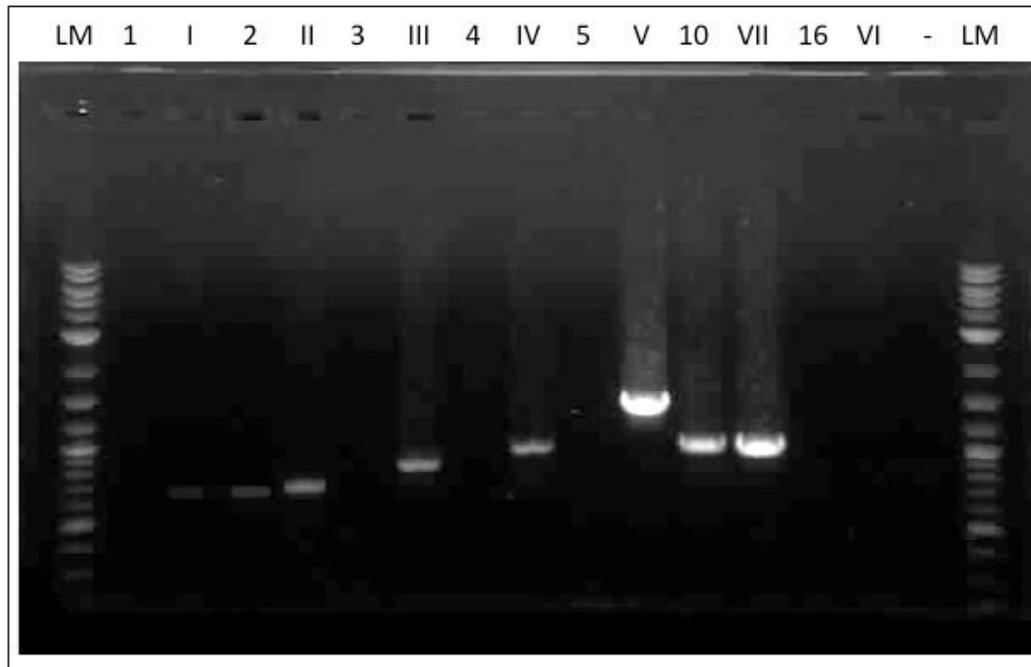


Abbildung 15: Elektrophoresegel der PCR von copy DNA (cDNA) und genomischer DNA (gDNA) mit korrespondierenden Primern.

Nr.	cDNA/gDNA	PCR mit verw. Primer	Ergebnis
1.	= cDNA Poly T,	ATG+ STOP	Keine Bande
I.	= gDNA,	ATG+ STOP	Bande
2.	= cDNA Poly T,	ATG + J	Bande
II.	= gDNA,	ATG + J	Bande
3.	= cDNA Poly T,	ATG + E	Keine Bande
III.	= gDNA,	ATG + E	Bande
4.	= cDNA Poly T,	ATG + I	Keine Bande
IV.	= gDNA,	ATG + I	Bande
5.	= cDNA Poly T,	ATG + H	Keine Bande
V.	= gDNA,	ATG + H	Bande
10.	= cDNA PolyT,	K+ (LDH Primer)	Bande
VII.=	= gDNA	K+ (LDH Primer)	Bande
16.	= cDNA Poly T	K- ATG + STOP (ohne DNA)	Keine Bande
VI.	= gDNA	K- ATG + STOP (ohne DNA)	Keine Bande

Die Ergebnisse (Abbildung 15) zeigen neben allen korrekten Positiv- und Negativkontrollen ein größeres Transkript als annotiert, nämlich ein Transkript, das eine Länge bis zum Primer J aufweist. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Gensequenzlänge von *dpm1* von *B. microti* größer ist, als bisher publiziert. Bei der erweiterten Sequenz handelt es sich um 18 Aminosäuren, die in Abbildung 16 hervorgehoben sind. Das korrigierte Modell der Gensequenz von DPM1 von *B. microti* ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt. Farblich ist hervorgehoben, um welchen Bereich sich auf Grundlage der zuvor beschriebenen Analysen und Versuche die Gensequenzlänge von *dpm1* erweitert hat. Das bislang annotierte Ende von *dpm1* scheint nicht korrekt zu sein, sodass demnach das Stopp-Codon weiter «downstream» der Sequenz liegt.

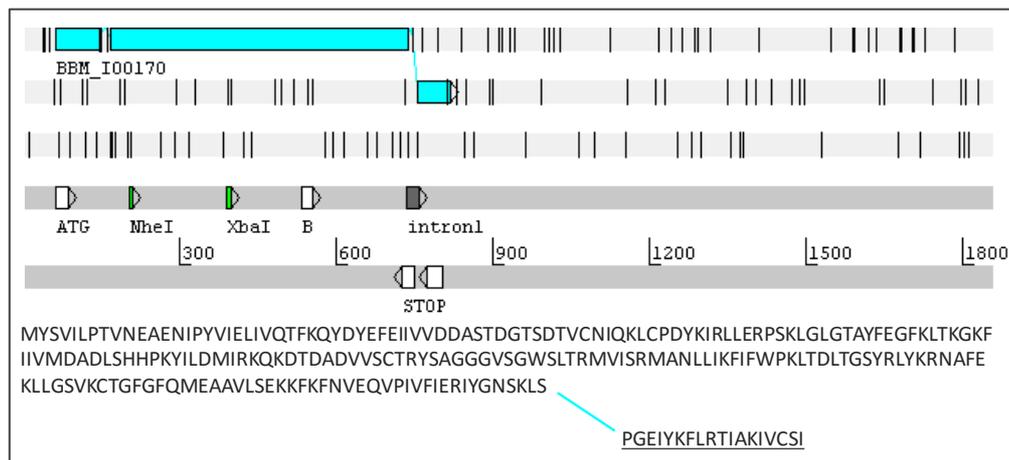


Abbildung 16: Hypothetische erweiterte Gensequenzlänge von *dpm1* von *Babesia microti*.

Der farblich hervorgehobene Abschnitt «downstream» des ursprünglich angenommenen Stopp-Codons ist, um die Gensequenzlänge, die zwischen dem vermeintlichen Stopp-Kodon und dem Primer J liegt, erweitert worden (Vgl. Abbildung 14). Untenstehend ist die Aminosäuresequenz von DPM1 von *B. microti* abgebildet. Es handelt sich um 18 Aminosäuren (unterstrichen) um die die ursprüngliche Aminosäuresequenz erweitert wurde.

4.2 Erzeugung eines rekombinanten Plasmids mit DPM1 von *Babesia microti*

Das korrigierte Gen für das Protein DPM1 von *Babesia microti* wurde mit den im Abschnitt Methoden beschriebenen molekularbiologischen Techniken in den Hefe-Shuttle-Vektor p426 MET 25, der den Selektionsmarker Uracil (ura3⁺) aufweist, inseriert (Christianson et al. 1992; Mumberg, Müller, and Funk 1994). Dazu wurden DNA aus *B. microti* und der Vektor mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut (3.2.4.) und anschließend das *B. microti-dpm1*-Fragment, wie in Abschnitt 3.2.6. beschrieben ligiert. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 17. Die korrekte Ausrichtung sowie eine von verändernden Mutationen freie Aminosäuresequenz wurden mittels DNA-Sequenzierung mit anschließendem Sequenzvergleich sichergestellt. Es fanden sich dabei drei sogenannte stille Mutationen («silent mutations») von Basen, die keinen Einfluss auf den Proteincode hatten (Anhang, 8.1).

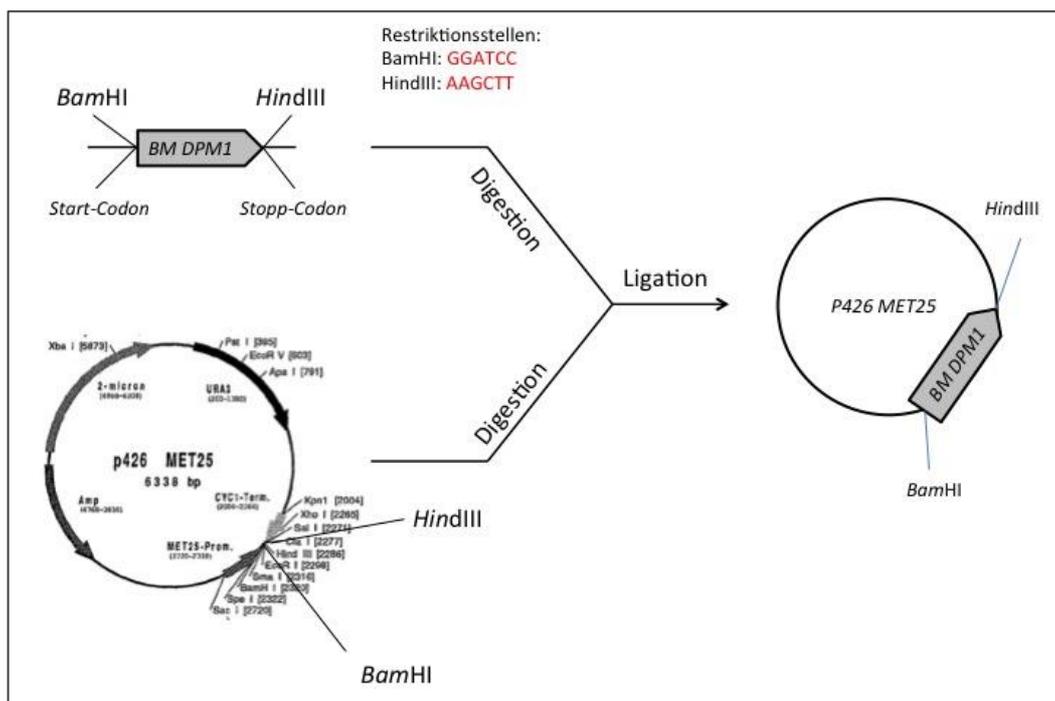


Abbildung 17: Klonkarte mit der Strategie für die Ligation von *dpm1* von *B. microti* in den Hefevektor p426 MET 25.

4.3 DPM1 von *Babesia microti* komplementiert die konditional letale Hefemutante YPH 499-HIS-GAL-*dpm1*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt ein leistungsfähiges Modellsystem zum Studium der Molekularbiologie eukaryotischer Zellen dar. Heterologe Komplementation von konditional letalen Hefemutanten wurden erfolgreich eingesetzt, um funktionelle Homologe aus verschiedenen Spezies zu isolieren. Aufgrund der hohen evolutionären Konservierung der Genfunktion in Zellen verschiedener eukaryotischer Spezies, sind viele der bekannten essentiellen Gene von Hefen potentielle Kandidaten für die heterologe Komplementation, die konditional letaler Mutanten des Zielgens bedürfen. Zur Erzeugung solch konditional letaler Mutanten kann man sich unter anderem, dem bekannten Verfahren zum Ersetzen des natürlichen Promotors mit dem stringent regulierten Glukose-reprimierten GAL1-Promoter bedienen, der sehr stark durch Glukose reprimiert aber durch Galaktose induziert wird (Johnston and Davis 1984). Diese sind auf Galaktose-Medium lebensfähig und stoppen ihr Wachstum in Medium, das Glukose als einzige Kohlenhydratquelle enthält, wenn der GAL1-Promotor ausgeschaltet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die konditional letale Mutante des für *S. cerevisiae* essentiellen Gens *dpm1* (YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1*), die mithilfe des «Chromosomal Promoter Replacement» (CPR) erzeugt worden ist, verwendet (P. Orlean, Albright, and Robbins 1988; Mazhari-Tabrizi et al. 1996). Dabei wurde, wie unter 1.4 erläutert, vor das Startkodon des *dpm1*-Gens von *S. cerevisiae* durch homologe Rekombination eine HIS-GAL-P-Kassette eingefügt. Der Hefestamm YPH 499 benötigt zum Wachstum Histidin und Uracil. In histidinfreiem Medium vermag dieser homozygote Hefestamm nicht zu wachsen. Die Gründe zur Verwendung des Galaktose-Promotors liegen, wie bereits näher beschrieben, in der Möglichkeit durch einfachen Mediumwechsel, die konditional letale Hefemutante wachsen zu lassen, bzw. im Rahmen der Komplementationsstudien deren Wachstum zu unterdrücken.

Im weiteren Verlauf wurden die jeweiligen im vorherigen Schritt erzeugten Plasmidkonstrukte in die konditional letale *S. cerevisiae*-Mutante YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1*, wie im Abschnitt Methoden (3.2.17) beschrieben, mittels der LiAc-Methode transformiert, auf verschiedenen Medien ausgestrichen und auf ihr Wachstum hin untersucht (Ito et al. 1983; Mazhari-Tabrizi et al. 1999).

Die Expression des endogenen Gens für *dpm1* der YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1*-Hefemutante kann sehr einfach durch Wechsel des Mediums abgeschaltet werden. Dazu werden diese Hefemutanten von galaktosehaltigem Voll-Medium (YPGR), in welchem der GAL1-Promoter nicht reprimiert wird und die Aminosäure Uracil zur Verfügung steht, in glukosehaltiges Medium (SD-Medium mit 5 % Glukose) ohne Galaktose überführt. Der GAL1-Promoter der Hefemutante wird sehr effizient durch Glukose im Medium reprimiert aber stark durch galaktosehaltiges Medium (SGR-Medium) induziert. Die Hefemutante YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1* ist nicht in der Lage, den funktionellen Verlust von *dpm1*, der durch glukosehaltiges Medium erzeugt wird, zu kompensieren und wächst daher nicht in SD-Medium (nicht gezeigt). Die Hefemutante wächst allerdings auf SGR-Medium mit Uracil und ohne Histidin, da der GAL1-Promoter der konditional letalen Hefemutante, der sich vor dem *dpm1*-Gen befindet, abgelesen wird und somit das endogene *dpm1* von *S. cerevisiae* abgelesen werden kann (nicht gezeigt). In Abwesenheit von Galaktose, kann, wie erwähnt, die YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1*-Hefemutante in SD-Medium nicht wachsen, da der GAL1-Promoter der konditional letalen Hefemutante nicht funktionell ist und somit auch nicht das nach diesem Promoter liegende für *S. cerevisiae* essentielle *dpm1*-Gen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen im Rahmen einer Transformationskontrolle, dass die Transformation der konditional letalen *S. cerevisiae*-Mutante YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1* mit leerem p426 MET25-Vektor und folgendem Ausstreichen auf glukosefreiem, aber galaktosehaltigem Medium ohne Uracil und ohne Histidin erfolgreich war und Wachstum zeigt (Abbildung 18 A).

Die Hefemutante mit leerem Vektor p426 MET 25 zeigt auf glukosehaltigem Medium ohne Uracil und ohne Histidin kein Wachstum, da die im Medium befindliche Glukose den Galaktose-Promoter des Plasmids reprimiert und das endogene essentielle Gen *dpm1* nicht abgelesen werden kann (Abbildung 18 B). Darüber hinaus zeigt sich, dass die YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1*-Hefemutante nach Transformation sowohl mit dem p426 MET 25-Plasmid mit dem SC-*dpm1*-Gen (p426 MET 25-SC-*dpm1*), als auch mit dem p426 MET 25-Plasmid mit dem BM-*dpm1*-Gen (p426 MET 25-BM-*dpm1*) auf galaktosehaltigem und glukosefreiem Medium ohne Uracil und ohne Histidin wächst (Abbildung 18 C & E). Der Versuchsansatz mit dem p426 MET-SC-*dpm1*-Plasmid dient als Transformationskontrolle. Insbesondere die Fähigkeit der transformierten Hefemutante, auf Glukose-Medium in Abwesenheit von Galaktose ohne Uracil und ohne Histidin zu wachsen, war zentrales Kriterium dieses Experiments und es konnte die korrekte sowohl homologe, als auch heterologe Komplementierung der konditional letalen *S. cerevisiae*-Mutante YPH 499-HIS-GAL1-*dpm1* mit DPM1 von sowohl *S. cerevisiae*, als auch von *B. microti* bestätigt werden (Abbildung 18 D & F). Nicht erfolgreich komplementierte Hefen können auf diesem galaktosefreien Medium nicht wachsen, wie der Ansatz mit leerem Vektor zeigte (Abbildung 18 B).

Durch Plasmidextraktion der mit dem Vektor p426 MET 25-BM-*dpm1* transformierten Hefezellen (3.2.17.) und anschließender Sequenzierung der DNA mit Primern, die spezifisch das *dpm1*-Gen von *B. microti* flankieren (3.2.13.), konnte die korrekte Transformation der Hefezellmutanten mit o. g. Plasmid nachgewiesen- und somit sichergestellt werden, dass die funktionell komplementierten Hefezellen auf dem Restriktionsmedium (SD) (Abbildung 18 F) ganz sicher das p426 MET 25-BM-*dpm1*-Plasmid trugen (Anhang, 8.2).

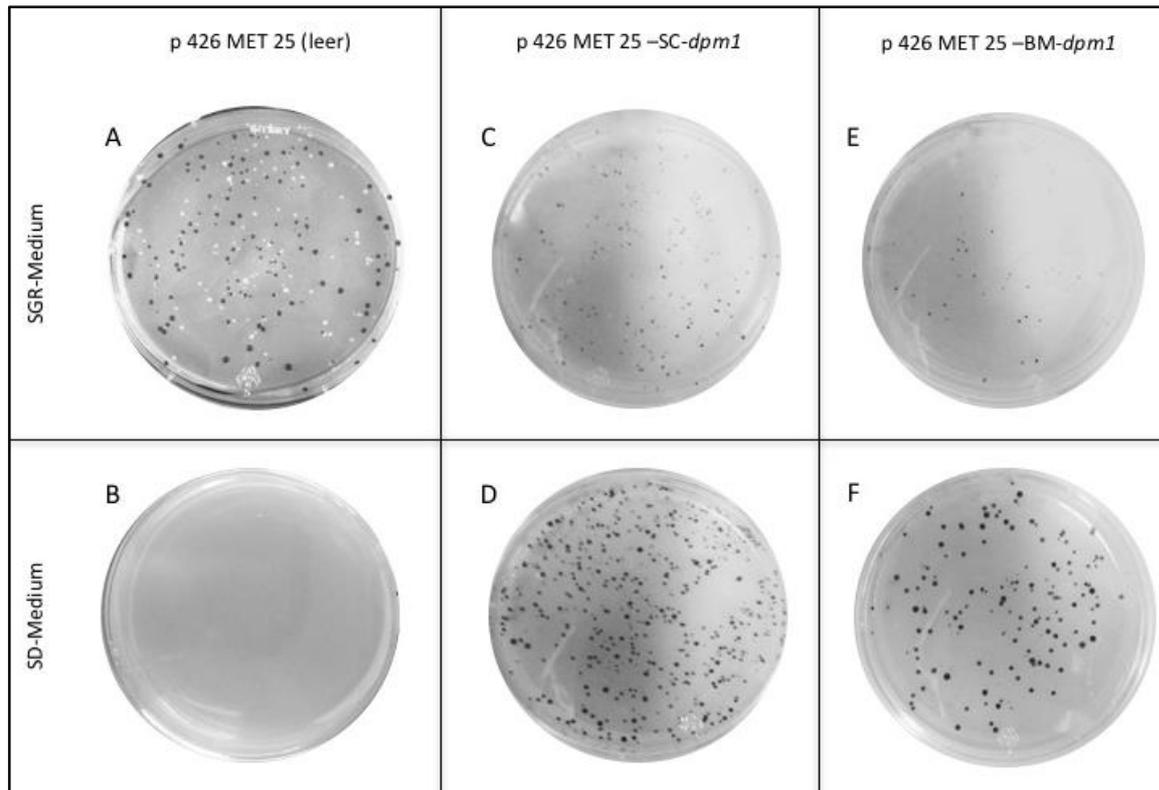


Abbildung 18: Transformation der konditional letalen *S. cerevisiae*-Mutante YPH 499-HIS-GAL-*dpm1* mit Plasmiden mit dem Hefe-*dpm1*-Gen bzw. mit dem *B. microti-dpm1*-Gen. Die konditional letale *S. cerevisiae*-Mutante YPH 499-HIS-GAL-*dpm1* wurde mit dem leeren Plasmid p426 MET 25 (A), dem p426 MET 25-Plasmid mit dem SC-*dpm1*-Gen (C) oder dem p426 MET 25-Plasmid mit dem BM-*dpm1*-Gen (E) transformiert und auf selektiven Mediumplatten mit Raffinose und Galaktose (SGR) ohne Uracil und ohne Histidin ausplattiert und bei 24 °C für 3 Tage bis 5 Tage inkubiert. Es zeigte sich auf allen drei Platten Wachstum. Darüber hinaus wurde die konditional letale *S. cerevisiae*-Mutante YPH 499-HIS-GAL-*dpm1* mit dem leeren Plasmid p426 MET 25 (B), dem p426 MET 25-Plasmid mit dem SC-*dpm1*-Gen (D) oder dem p426 MET 25-Plasmid mit dem BM-*dpm1*-Gen (F) transformiert und auf selektiven Mediumplatten mit Glukose (SD) ohne Uracil und ohne Histidin ausplattiert und bei 24 °C für 3 Tage bis 5 Tage inkubiert. Die mit dem leeren p426 MET 25-Plasmid transformierte Hefemutante zeigt auf glukosehaltigem Nährboden kein Wachstum (B). Es zeigte sich jedoch ein Wachstum der Hefemutante, was für eine erfolgreiche funktionelle Komplementation spricht sowohl mit dem SC-*dpm1*-Gen (D), als auch mit dem BM-*dpm1*-Gen (F). Diese Versuchsreihe wurde zweimal mit gleichen beschriebenen Ergebnissen durchgeführt.

4.4 Resultate der bioinformatischen Analysen von DPM1 anhand ausgewählter Organismen

Die im Methoden-Teil beschriebene systematische Untersuchung des Proteins sowie des Gens *dpm1* sollte für eine Vielzahl von Organismen, vom Protozoon bis zum Säugetier, anhand folgender Kriterien analysiert werden: Aminosäuresequenz des DPM1-Proteins des jeweiligen Organismus, Lokalisation der Hydrophobizität (C- oder N-terminale Transmembranhelix), das Vorhandensein eines Signalpeptids, einer GPI-Verankerung sowie eines zweiten und dritten Proteins der DPM-Familie (DPM2 bzw. DPM3). Ziel dieser Analyse war es, einen Überblick über die Eigenschaften von DPM1 aus der DPM-Familie zwischen verschiedenen Spezies zu bekommen. Ein weiteres Bestreben war es, neuartige Hinweise auf Homologien bzw. Heterologien dieses Proteins im Vergleich mit unterschiedlichen Organismen zu erhalten. Die erzeugten Ergebnisse werden in Form eines phylogenetischen Stammbaums und einer mit diesem korrespondierenden Tabelle gezeigt (Abbildung 26).

4.4.1 Ergebnisse der bioinformatischen Untersuchungen mit DPM1-Orthologen anhand einer Vielzahl von Organismen

Die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse von DPM1-Orthologen, das heißt von Genen mit gemeinsamen Vorfahren, wie sie im Methoden-Teil (3.3.) dieser Arbeit dargelegt sind, ist Bestandteil dieses Kapitels. Alle im Methoden-Teil unter 3.3.9 gelisteten Organismen haben hinsichtlich des Proteins DPM1, dessen Hydrophobizität und Topologie sowie das Vorhandensein weiterer Enzyme, wie DPM2 und DPM3 diese Untersuchungen durchlaufen, können aber aus Platzgründen und Redundanzen sowie aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht im Detail gezeigt werden. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle die deskriptiven bioinformatischen Ergebnisse anhand des Protozoon *Babesia microti* gezeigt. Nur für *B. microti* wurden diese Untersuchungen mit der in dieser Arbeit modifizierten Aminosäuresequenz (4.1) durchgeführt. Bei Bedarf stehen die Daten der anderen Organismen in elektronischer Form jederzeit zur Verfügung. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Resultate aller ausgewählten Organismen dieser Analysen zeigt die Tabelle in Abbildung 26.

«NCBI-Blast» und UniProt-Analyse

Des Weiteren konnte diese Aminosäuresequenz von *B. microti* mit einem sogenannten «BLAST-Search» auf der «Website» von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) oder, wie beschrieben, auf dem Server der UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/blast/>) nach Eingabe der Sequenz analysiert werden. Am Beispiel der UniProt-Datenbank zeigte sich eine Übereinstimmung mit einem Protein von *B. microti*, das den UniProt-Code I7J7W8 aufwies. Weitere aufgeführte Organismen zeigten Sequenzhomologien mit der Glykosyltransferase DPM1, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der Proteinsequenz von *B. microti* um das DPM1-Protein handelt. Dieser «Protein-Blast» war im Weiteren hilfreich dafür, andere Organismen für diese bioinformatischen Analysen auszuwählen, da weitere Organismen auf der UniProt-Datenbank anhand von Sequenzhomologien angezeigt werden (Vgl. 3.3.2 und 3.3.3.).

TMpred-Analyse

TMpred ist eine Vorhersage-Software für Transmembrandomänen und deren Ausrichtung basierend auf der Aminosäuresequenz eines Proteins durch die Identifizierung von Alphahelices, die hydrophobe Reste in der Peripherie präsentieren. Diese Domänen sind sehr häufig bei integralen Membranproteinen. So wurde die Proteinsequenz von DPM1 von *B. microti* in diese Seite eingegeben (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) und die Analyse gestartet. Anhand der systemeigenen Rechenmodelle schlägt das Programm eine Hypothese über die Anwesenheit von außen- oder innengelegenen Transmembranhelices vor sowie zur Topologie einer möglichen Transmembrandomäne (z. B. N-terminal oder C-terminal). Die Analyse der in 3.3.9. gelisteten Organismen ergab mehrheitlich ein Fehlen einer Transmembranhelix, ausgenommen der Mehrzahl der *Plasmodium spp.*, die einen hydrophoben N-Terminus aufweisen sowie Vertreter der *Kinetoplastida* und Hefepilze, die ein hydrophobes C-terminale Ende besitzen. Bei der Analyse von DPM1 von *B. microti* ist, wie Abbildung 20 zeigt das hypothetische Modell ein außerhalb der Membran gelegener N-Terminus eines löslichen Proteins und demnach keine hydrophobe Transmembranregion zu finden. Signifikante Domänen haben eine

Hydrophobizität auf der Hydrophobizitätsskala von über 800. Diese Informationen sind ein wichtiger Charakterisierungs-Baustein von DPM1 von *B. microti*.

Das zeigt sich insbesondere in der Zusammenschau der Ergebnisse mit den jeweiligen anderen Organismen bezüglich der evolutionären Weiterentwicklung oder Konservierung von DPM1.

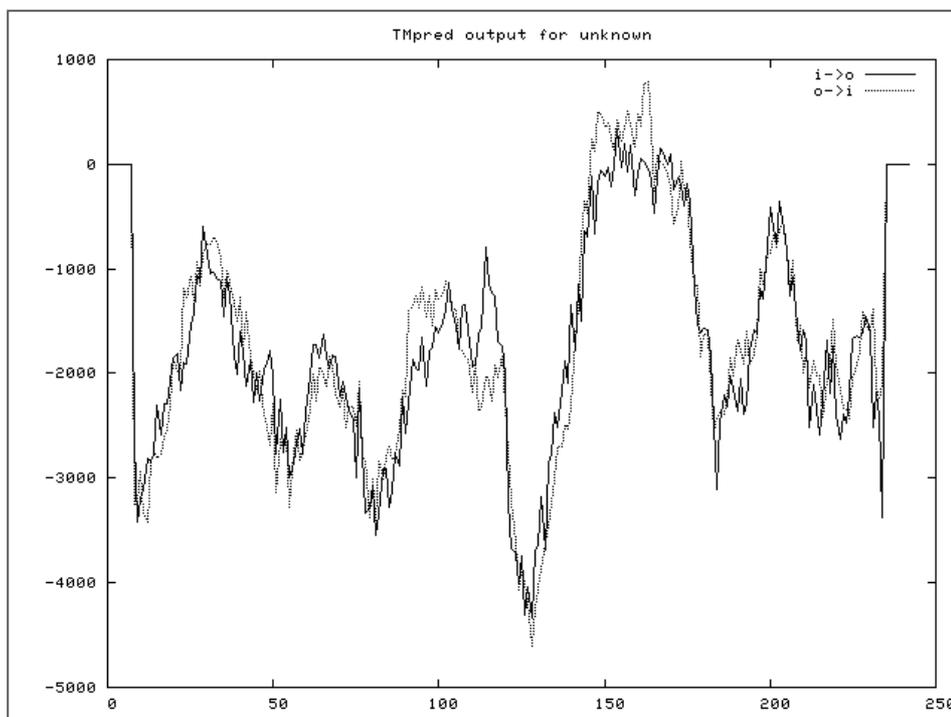


Abbildung 20: Ergebnis der Transmembranhelix-Analyse durch den Server TMpred. Die Analyse von DPM1 von *B. microti* kommt zum Ergebnis, dass das hypothetische Modell dieses Enzyms am ehesten ein außerhalb der Membran gelegener *N*-Terminus ist und keine hydrophobe Region identifiziert werden kann.

SignalP-Analyse

Zur Analyse des Vorhandenseins und der Lage der Signalpeptidspaltungsstellen in den Aminosäuresequenzen von DPM1 von *B. microti* wurde im weiteren Verlauf die Datenbank SignalP 4.1, eine Ressource des Zentrums für biologische Sequenzanalyse (CBS) der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) aufgesucht. Dabei wird das Signalpeptid von einer kleinen hydrophoben Alpha-helix am *N*-Terminus am Ende des Proteins charakterisiert. Die Analyse der in 3.3.9. gelisteten Organismen ergab nur für Vertreter der *Plasmodium spp.* eine Signalpeptidspaltungsstelle.

Für DPM1 von *B. microti* prognostiziert der Server keinerlei Signalpeptidspaltungsstellen in dieser Aminosäuresequenz (Abbildung 21).

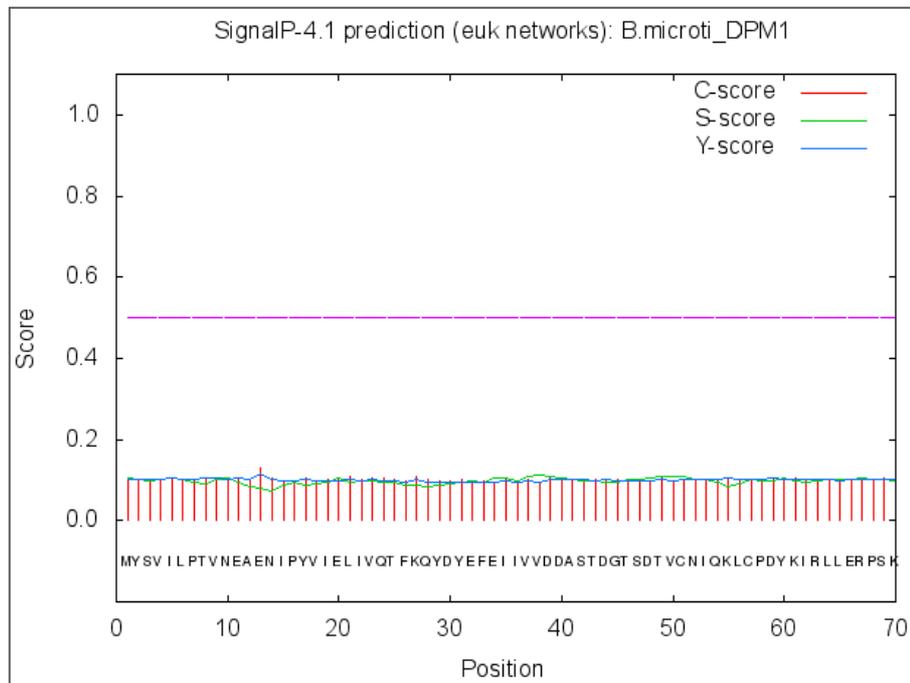


Abbildung 21: Analyse möglicher Signalpeptidspaltungsstellen durch SignalP. Dieses Voraussagemodel über ein Signalpeptid kommt bei der Analyse von DPM1 aus *Babesia microti* zu dem Ergebnis, dass dieses Protozoon keine Signalpeptidspaltungsstellen aufweist.

PredGPI-Analyse

Eukaryotische Proteine, die mit der extrazellulären Seite der Plasmamembran assoziiert sind, tragen einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker, der nach einer proteolytischen Spaltung circa 20-30 Aminosäuren «upstream» vom C-Terminus, an der sogenannten Omega-Stelle, mit dem C-Terminus verknüpft ist (Peter Orlean and Menon 2007). Der Server PredGPI ist ein Vorhersagesystem für GPI-verankerte Proteine und trifft eine Vorhersage über die wahrscheinlichste Stelle, an dem die proteolytische Abspaltung an der Omega-Stelle vorgenommen wird. Das Ergebnis der Analyse der auf diesem Server (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/gpipe/pred.htm>) eingespeisten Aminosäuresequenz von DPM1 von *B. microti* zeigt Abbildung 22. Das Rechenmodell kommt bei dieser Analyse zum Ergebnis, dass die wahrscheinlichste

Position der Omega-Stelle an Position 151 der Aminosäuresequenz liegt. Die Spezifität dieser Analyse liegt bei 16 %. Das Gesamtergebnis dieser Untersuchung kommt zum Schluss, dass das DPM1-Protein von *B. microti* ein nicht über GPIs-verankertes Protein ist. Bei der Analyse der anderen Organismen (3.3.9.) konnte ebenfalls bei keinem Organismus eine GPI-Verankerung festgestellt werden.

Prediction Results			
Prediction accuracy summary:			
Highly probable			0
Probable			0
Weakly probable			0
Not GPI-anchored			1
Proteins predicted			
Protein name	omega-site position	Specificity	Protein sequence
MYSVILPTVNEAENIPYVIELIVQTFKQYD	151	16.0%	KIRLLERPSKLGGLGTAYFEGFKLTRGKF IIVMDADLSHHPKYILDMIRKQKDTDAD VVSCTRYASAGGGVSGWSLTRMVISRMAN LLIKFIFWPKLTDLTGSYRLYKRNAFEK LLGSVKCTGFGFQMEAAVLSEKKFKFNV EQVPIVFIERFGNSKLSPEIYKFLR TIAKIVCSI

Abbildung 22: Ergebnisse der Vorhersage über die Position einer GPI-Verankerung. Das Vorhersagemodell kommt zu dem Ergebnis, dass die Omega-Stelle am wahrscheinlichsten an der Position 151 der Aminosäuresequenz liegt. Die Spezifität dieser Analyse wird mit 16 % angegeben. In der Gesamtschau kommt dieses Programm auf Grundlage seines Rechenmodells zum Ergebnis, dass das DPM1-Protein von *B. microti* am ehesten ein nicht GPI-verankertes Protein ist.

HMMTOP-Analyse

Mithilfe des Servers HMMTOP lässt sich, als eine weitere Methode neben der Analyse-Methodik des Servers TMpred, eine Vorhersage über Transmembranhelices sowie über die Topologie von Proteinen treffen. Dieses Werkzeug erlaubt sowohl die Prognose der Lokalisierung von spiralförmigen Transmembransegmenten, als auch die Topologie von Transmembranproteinen. Die Untersuchung nach Eingabe der Aminosäuresequenzen von DPM1 aller ausgewählten Organismen (3.3.9.) ergab nur für Organismen mit hydrophobem *N*- oder *C*-Terminus ein positives Signal für eine

Transmembranhelix. Diese Organismen waren Vertreter der *Plasmodium spp.* sowie Vertreter der *Kinetoplastida* und Hefepilze. Letztgenannte Vertreter haben einen außerhalb der Membran gelegenen *N*-Terminus, wie auch *B. microti* (Abbildung 23), aber eine C-terminale Transmembranhelix. Die Untersuchung von DPM1 von *B. microti* mithilfe des HMMTOP-Servers (<http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>) zeigt, dass keine Transmembranhelices nachweisbar sind und dass der *N*-Terminus dieses Proteins außerhalb der Membran liegt (Abbildung 23).

```

Protein: noname
Length: 236
N-terminus: OUT
Number of transmembrane helices: 0
Transmembrane helices:

Total entropy of the model: 17.0178
Entropy of the best path: 17.0177

The best path:

  seq MYSVILPTVN EAENIPYVIE LIVQTFKQYD YEFEIIVVDD ASTDGTSDTV 50
  pred 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

  seq CNIQKLCPDY KIRLLERPSK LGLGTAYFEG FKLTKGKFII VMDADLSHHP 100
  pred 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

  seq KYILDMIRKQ KDTDADVVC TRYSSAGGGVS GWSLTRMVIS RMANLLIKFI 150
  pred 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

  seq FWPKLTDLTG SYRLYKRNAF EKLLGSVKCT GFGFQMEAAV LSEKKFKFNV 200
  pred 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

  seq EQVPIVFIER IYGNSKLSPG EIYKFLRTIA KIVCSI 236
  pred 0000000000 0000000000 0000000000 000000

```

Abbildung 23: : Ergebnisse der Analysen über eine Transmembranhelix von *B. microti*-DPM1 mithilfe des Servers HMMTOP. Die Untersuchung dieses Vorhersagesystems nach Eingabe der Aminosäuresequenz von DPM1 von *B. microti* zeigt, dass keinerlei Transmembranhelices nachweisbar sind und mit den Ergebnissen der TMpred-Analyse übereinstimmend, dass die *N*-terminale Region dieses Proteins außerhalb der Membran liegt.

Pfam-Analyse

Mithilfe der Datenbank Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) lässt sich DPM1 der ausgewählten Organismen in einen Gesamtkontext einer Klassifikation in eine Proteinfamilie einordnen sowie in einen bestimmten Protein-Clan eingruppiieren.

Die Information, die dieser Server zur Verfügung stellt, ist eine Evaluation der zuvor durchgeführten Analysen und bestätigt die bereits gewonnene Information über die Struktur und Funktion dieses Proteins aller ausgewählten Organismen. Für *B. microti* sind dies im Besonderen das Fehlen sowohl von GPI-Ankern und Signalpeptidspaltungsstellen als auch von Transmembranhelices (Abbildung 24). Für alle unter 3.3.9. gelisteten Organismen bestätigt Pfam, dass alle DPM1-Proteine eine Glykosyltransferase-Aktivität aufweisen.

This is the summary of UniProt entry [I2J7WB_BABMI](#) ([I2J7WB](#)).

Description:	Chromosome 1, complete genome (ECO:0000313 EMBL:CCF72504.1)
Source organism:	Babesia microti strain RI (NCBI taxonomy ID 11339685)
Length:	221 amino acids
Reference proteome:	X

Please note: when we start each new Pfam data release, we take a copy of the UniProt sequence database. This snapshot of UniProt forms the basis of the overview that you see here. It is important to note that, although some UniProt entries may be removed after a Pfam release, these entries will not be removed from Pfam until the next Pfam data release.

Pfam domains

This image shows the arrangement of the Pfam domains that we found on this sequence. Clicking on a domain will take you to the page describing that Pfam entry. The table below gives the domain boundaries for each of the domains. [Less...](#)

E-values are based on searching the Pfam-A family against UniProtKB [2015_08](#) using hmmsearch.



Source	Domain	Start	End	Gathering threshold (bits)		Score (bits)		E-value	
				Sequence	Domain	Sequence	Domain	Sequence	Domain
Pfam	Glycos transf 2	3	174	22.30	22.30	118.40	118.20	7.6e-31	9e-31

Abbildung 24: Zusammenfassung der Pfam-Analysen anhand des «UniProt-Codes» für DPM1 von *Babesia microti*.

4.4.2 Zusammenfassung der deskriptiven bioinformatischen Untersuchungen

Viele der untersuchten Organismen (3.3.9.) verhalten sich hinsichtlich der Hydrophobizität an der *N*- oder *C*-terminalen Region des DPM1-Proteins sowie vom Vorhandensein einer GPI-Verankerung oder eines Signalpeptids, wie die hier präsentierten Ergebnisse von *B. microti*. Darüber hinaus zeigen die meisten Mitglieder der *Plasmodium spp.* (*P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgie*, *P. chabaudi* und *P. berghei*) eine hydrophobe *N*-terminale Domäne, die sich bei keinem anderen Organismus findet. Vertreter der Hefepilze, wie z. B. *S. cerevisiae* sowie alle ausgewählten Vertreter der *Kinetoplastida*, wie z. B. *T. cruzi* oder *L. major* weisen auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen eine Transmembrandomäne am *C*-terminalen Ende auf. Keines der untersuchten Organismen zeigte ein positives Signal für eine GPI-Verankerung (PredGPI), wohingegen fünf Organismen, die

Vertreter der o. g. *Plasmodium spp.*, ein positives Signal für SignalP aufweisen. Die genannten *Plasmodium spp.* sowie Vertreter der *Kinetoplastida* und Hefepilze zeigten positive Signale bei TMPred und HMMTOP. Auf Grundlage dieser Analysen lassen sich drei wesentliche Organisationstypen der Protein-Domänen von DPM1 unterscheiden (Abbildung 25).

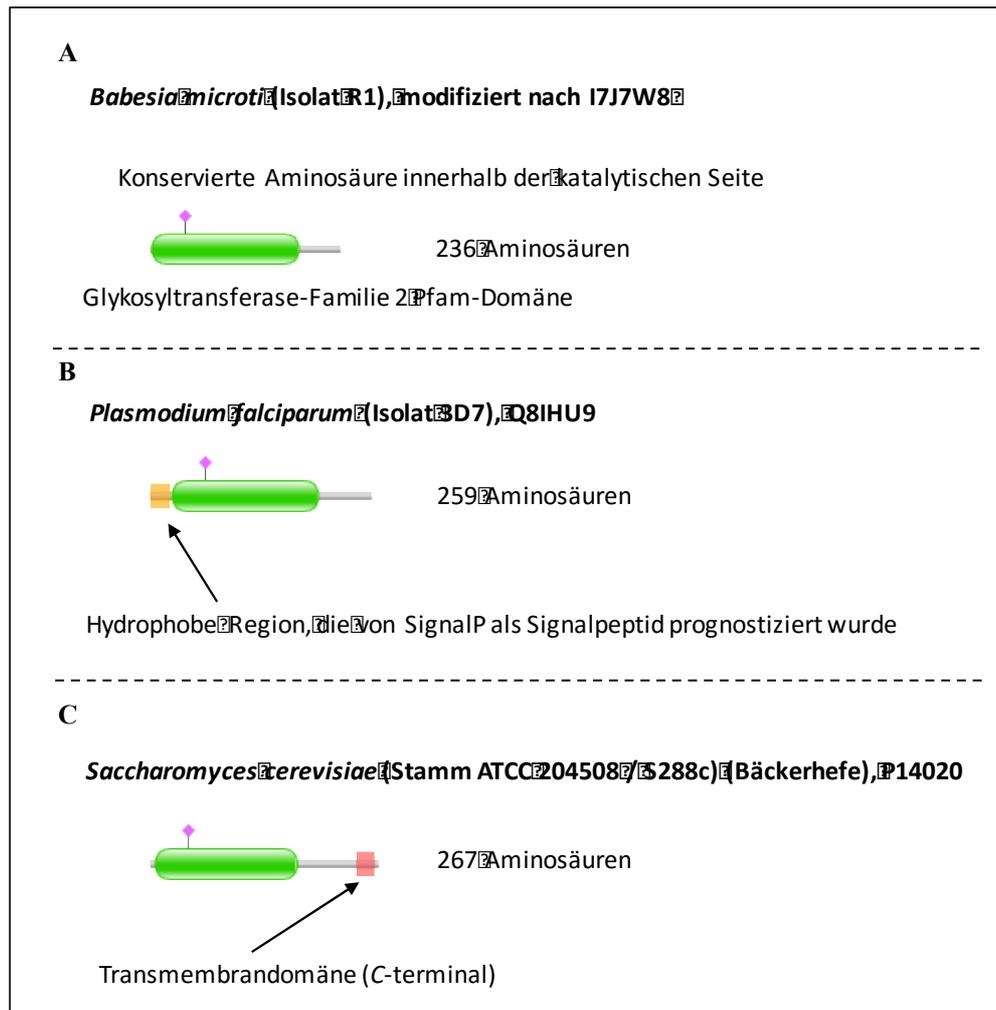


Abbildung 25: DPM1 lässt sich in drei wesentliche Organisations-Typen einteilen. (A) *B. microti* als Vertreter der meisten ausgewählten Organismen zeigt keinerlei GPI-Verankerung, Signalpeptidspaltungsstelle und hydrophobe Transmembrandomäne. (B) *P. falciparum*, als einer der Vertreter der *Plasmodium spp.* weist eine hydrophobe Sequenz am N-terminalen Ende sowie ein Signalpeptid auf. (C) *S. cerevisiae* als Vertreter der Hefepilze sowie exemplarisch für die Klasse der *Kinetoplastida* weist eine C-terminale Transmembrandomäne, aber ein Fehlen eines Signalpeptids auf.

4.4.3 Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums

Zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Expression von DPM1 in einer Vielzahl von Organismen, einschließlich Eukaryoten, wie Kinetoplastida, Apicomplexa, Hefen, Pilze, *Ciliophora*, Pflanzen und Säugetieren sowie zum besseren Überblick, wurden die Ergebnisse der Analysen in Form eines phylogenetischen Stammbaums anhand des Proteins DPM1 zusammengetragen. Dabei war vor allem die jeweilige Aminosäuresequenz von DPM1 im jeweiligen Organismus für die bioinformatische Analyse und der darauf aufbauenden Erstellung dieses Stammbaums wichtig. Die in diesem Stammbaum aufgeführten Organismen wurden darüber hinaus auf das Vorhandensein oder Fehlen von DPM1, DPM2 und DPM3 sowie auf den Grad der Hydrophobizität an der *N*- oder *C*-terminalen Region des DPM1-Proteins untersucht. Dieser phylogenetische Stammbaum der anhand der Aminosäuresequenz von DPM1 erstellt wurde, unterscheidet sich hinsichtlich der Anordnung der Organismen von evolutionsgeschichtlichen Stammbäumen und bildet somit nur die Beziehung der Organismen anhand der Charakteristiken von DPM1 ab.

Der erzeugte phylogenetische Stammbaum (Abbildung 26) zeigt deutlich zwei große Äste. Ein oberer Ast umfasst insbesondere Organismen, die zum Stamm der *Kinetoplastida* sowie zu Hefepilzen gehören. Der untere Ast schließt vor allem Apicomplexa und Schimmelpilze sowie weitere Organismen, wie Pflanzen oder Säuger ein. Die genannten Organismen lassen sich anhand der Äste und der weiteren Verzweigungen gut gegeneinander abgrenzen und sind vor allem auf Grundlage ihrer Sequenzhomologie von DPM1 angeordnet. Auffällig sind die Organismen, die zwischen den Hefepilzen des oberen Astes und den dem unteren Ast zugehörigen Apicomplexa zu finden sind (*Perkinsus marinus*, *Proterospongia rosetta*, *Monosiga brevicollis* und *Giardia lamblia*). *Perkinsus marinus* ist als parasitisches Protozoon, das Austern befällt, zwischen den Hefepilzen und den Geißeltierchen *Proterospongia rosetta*, *Monosiga brevicollis* klassifiziert worden. Das diesen Organismen sehr ähnliche humanpathologisch relevante Protozoon *Giardia lamblia* wurde auf Grundlage seiner DPM1-Aminosäuresequenz dem unteren Ast zugeordnet und ist als einziges Protozoon dieses unteren Astes kein apicomplexer Parasit. Darüber hinaus zeigt sich bei diesem Erreger eine ganz eigenständige Verzweigung innerhalb

des unteren Astes, die ihn von den anderen Organismen dieses Astes trennt und zu einem besonderen Organismus mit Alleinstellungsmerkmal macht. Diese eigenständige Verzweigung findet sich nur noch bei der einzelligen Grünalgenart *Chlamydomonas reinhardtii*, die sich ganz unten im unteren Ast stehend von fast allen weiter obenstehenden Organismen mit ihrer Einzelverästelung abgrenzt.

Des Weiteren ist auffällig, dass sich innerhalb der Klassifizierung der Apicomplexa des unteren Astes die *Piroplasmidae* (*Theileria spp.* und *Babesia spp.*) als eigenständige Verzweigung von allen anderen im unteren Ast genannten Organismen abgrenzen. Dies ist insbesondere augenfällig, da diese ebenso zu den Apicomplexa gehören wie *Cryptosporium spp.*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium spp.*. Dennoch sind *Theileria spp.* und *Babesia spp.* phylogenetisch betrachtet nicht zusammen mit allen anderen Apicomplexa, sondern gesondert verzweigt eingeordnet worden, obgleich sie evolutionsgeschichtlich den Plasmodien sehr nah sind. Die Anordnung in diesem Stammbaum ist am ehesten aufgrund der Präsenz des hydrophoben *N*-Terminus in Plasmodien zurückzuführen, der bei den Vertretern der *Piroplasmidae* fehlt. Die Protozoen der *Cryptosporium spp.* zeigen in einem weiteren Grad der Verzweigung eine ähnliche Tendenz. Interessanterweise fällt bei erneuter Betrachtung der *Piroplasmidae*, auf deren Vertreter der *Babesia spp.* der Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit liegt, auf, dass sich *Babesia bovis* von *Babesia microti* hinsichtlich des DPM1-Proteins phylogenetisch stärker voneinander unterscheiden als *Babesia bovis* von den *Theileria spp.*, die hinsichtlich der Sequenzhomologien von DPM1 eine stärkere Übereinstimmung zu zeigen scheinen.

Die Analyse der Transmembrandomänen (TMD) zeigt die Tabelle neben dem Stammbaum, die sich in Bezug auf die Anwesenheit einer hydrophoben *C*-terminalen Region bzw. eines hydrophoben *N*-Terminus mit der groben Unterteilung des Stammbaums in zwei große Äste deckt. Während alle zum oberen Ast gehörenden Organismen einen hydrophoben *C*-Terminus aufweisen, ist die Verteilung eines hydrophoben *N*-Terminus im unteren Ast sehr heterogen. Der *C*-Terminus den ausnahmslos alle zum oberen Ast gehörenden Organismen (*Kinetoplastida* und Hefepilze) aufweisen, geht auf ein Gen zurück, was sich in Bezug auf seinen Ursprung von jenem des unteren Asts dieses Stammbaums unterscheidet, da es für ein Membran-verankertes Protein kodiert. Bei den Vertretern des unteren Asts zeigen nur

die Parasiten der *Plasmodium spp.*, die zu den Apicomplexa gehören, die hydrophobe N-terminale Region, wohingegen alle anderen Organismen, die ebenfalls zu den Apicomplexa gehören, weder eine hydrophobe N-terminale noch eine hydrophobe C-terminale Region besitzen. Allerdings sind hier zwei interessante Ausnahmen zu beobachten. Sowohl für *Plasmodium vivax* als auch für *Plasmodium yoeli yoeli* lässt sich nach bioinformatischer Analyse im Gegensatz zu allen anderen Plasmodien kein hydrophober N-Terminus identifizieren. Bei diesen Parasiten sollte allerdings das annotierte Genmodell, wie in dieser Arbeit für *B. microti* durchgeführt (4.1), experimentell validiert werden.

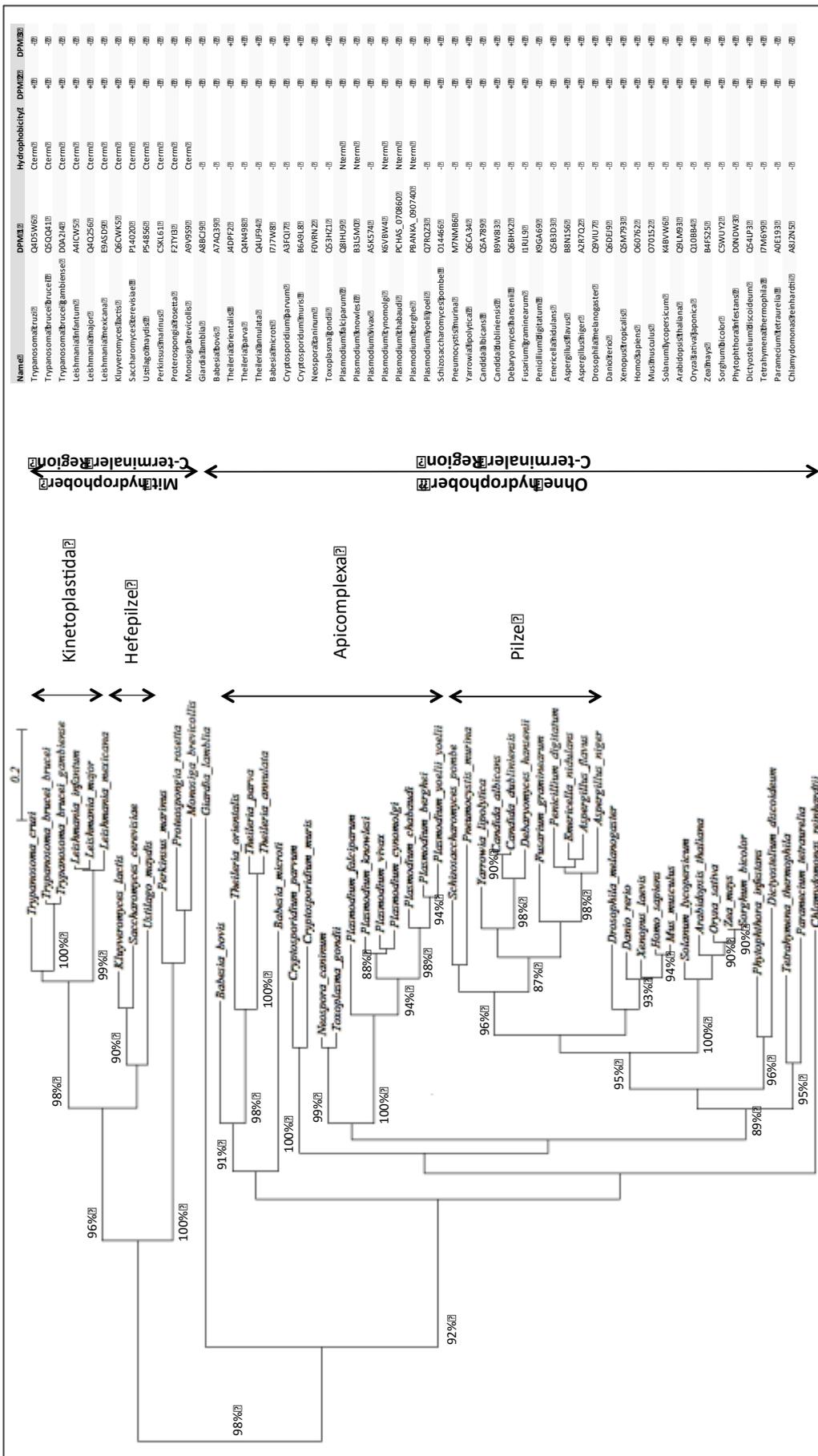
Des Weiteren zeigt die Auswertung die vollständige Anwesenheit von DPM1 in allen Organismen beider Äste. Das Protein DPM2 zeigt sich bei einer Mehrheit der untersuchten Organismen im oberen Ast, insbesondere bei allen Trypanosomen und *S. cerevisiae*, wohingegen eine vollständige Abwesenheit von DPM3 in diesem Ast auffällt, welches wiederum mehrheitlich bis auf einige Ausnahmen bei Organismen des unteren Astes exprimiert ist. Die Verteilung der Expression von DPM3 ist insbesondere bei den zu den Apicomplexa gehörenden Parasiten interessant und augenfällig. Bei allen Plasmodien zeigt sich ein fehlendes DPM3-Protein, wohingegen es bei *Toxoplasma gondii* und bei Kryptosporidien vorhanden ist. Auffällig ist, dass sich innerhalb der Klassifizierung der *Piroplasmidae* (*Theileria spp.* und *Babesia spp.*) Unterschiede hinsichtlich des Vorhandenseins von DPM3 zeigen. Alle hier aufgeführten Theilerien verfügen über DPM3, wohingegen weder *Babesia bovis* noch *Babesia microti* dieses Protein exprimieren. Die An- oder Abwesenheit von DPM2 im unteren Ast ist ebenfalls heterogen. Während keine der aufgeführten Apicomplexa dieses Protein aufweisen, zeigen sich bei einem Großteil der Schimmelpilze und weiteren ausgewählten Organismen, wie *Homo sapiens*, *Xenopus tropicalis* oder *Mus musculus*, eine Expression von DPM2. Darüber hinaus zeigen nur Organismen des unteren Astes neben DPM1 auch ein Vorhandensein von sowohl DPM2 als auch DPM3. Das trifft nur auf Organismen zu, die zu den Schimmelpilzen gehören, wie *Candida dubliniensis*, *Aspergillus flavus et niger* sowie auf die überwiegende Mehrzahl der ausgewählten höheren Organismen. Hierbei ist auffällig, dass die Spezies *Candida albicans* im Gegensatz zu *Candida dubliniensis* allerdings weder DPM2 noch DPM3 aufweist und sich diese beiden Organismen demnach hinsichtlich

der Eigenschaften der DPM-Familie stark unterscheiden. Diese Ergebnisse sind allerdings nur eingeschränkt zu verwerten, da die Proteine DPM2 und DPM3 sehr klein sind und deshalb abhängig von der Spezies, der Größe und der Sequenzhomologie an die Grenze der Detektionskapazität bioinformatischer Methoden stoßen und somit trotz negativer Resultate vorhanden sein können.

Darüber hinaus konnte herausgearbeitet werden, dass weder in den Organismen des oberen Astes, die einen hydrophoben C-Terminus aufweisen, noch in jenen ausgewählten Organismen des unteren Astes, die einen hydrophoben N-Terminus besitzen die Expression von DPM3 vorhanden ist. Allerdings zeigt sich im Gegensatz zu Organismen mit hydrophobem N-Terminus des unteren Astes, die bereits erwähnte Koexistenz von DPM2 in Organismen mit hydrophober C-terminaler Region im oberen Ast.

Diese Eigenschaft ist allerdings nicht bei allen Organismen mit dieser Eigenschaft der Hydrophobizität deckungsgleich, sondern trifft nur auf Organismen der Kinetoplasten sowie auf die Hefepilze *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae* zu.

Insgesamt zeigt Abbildung 26 ein auf den ersten Blick heterogen anmutendes Muster bezüglich der Verteilung von DPM1, DPM2 und DPM3 sowie der Eigenschaften der Hydrophobizität. Eine genauere Analyse verrät allerdings, zumindest auf die angesprochenen Eigenschaften ein Verteilungsmuster, welches weitere Fragen aufwirft und in Zukunft genauerer Hinterfragung bedarf.



Name	DPM1	Hydrophobizität	DPM2	DPM3
Trypanosoma cruzi	Q45V69	C-term	-	-
Trypanosoma brucei brucei	Q5Q411	C-term	-	-
Trypanosoma brucei gambiense	D6Z180	C-term	-	-
Leishmania infantum	A4ICW50	C-term	-	-
Leishmania major	Q4Q2560	C-term	-	-
Leishmania mexicana	EJASD90	C-term	-	-
Kluyveromyces fragilis	Q6CW550	C-term	-	-
Saccharomyces cerevisiae	P14020	C-term	-	-
Ustilago maydis	P54856	C-term	-	-
Perkinsus marinus	CSM1610	C-term	-	-
Proteromonas sp.	F27183	C-term	-	-
Monosiga brevicollis	A9V9590	C-term	-	-
Gardinia	A68C90	-	-	-
Babesia bovis	A7AQ390	-	-	-
Theileria orientalis	ADPF22	-	-	-
Theileria parva	Q4M980	-	-	-
Theileria annulata	Q4U940	-	-	-
Babesia microti	I77W80	-	-	-
Cryptosporidium parvum	A3FQ70	-	-	-
Cryptosporidium muris	B6A9180	-	-	-
Neospora caninum	FWRN20	-	-	-
Toxoplasma gondii	Q531420	-	-	-
Plasmodium falciparum	Q8IH90	N-term	-	-
Plasmodium knowlesi	B15M00	N-term	-	-
Plasmodium vivax	ASK5740	N-term	-	-
Plasmodium cynomolgi	NSV8W40	N-term	-	-
Plasmodium abjectum	PC1AS_0708600	N-term	-	-
Plasmodium berghei	PRANKA_0907400	N-term	-	-
Plasmodium yoelii yoelii	Q7RQZ30	-	-	-
Schizosaccharomyces pombe	O144650	-	-	-
Neurospora crassa	M7MM860	-	-	-
Yarrowia lipolytica	Q6C340	-	-	-
Candida albicans	Q5A7950	-	-	-
Candida glabrata	B9W830	-	-	-
Candida lusitanae	Q6BK20	-	-	-
Debaryomyces hansenii	U1RL90	-	-	-
Fusarium graminearum	KG6A690	-	-	-
Penicillium digitatum	Q5B3D30	-	-	-
Emicella nidulans	B8N1560	-	-	-
Aspergillus fumigatus	A2F7Q20	-	-	-
Aspergillus niger	Q9U170	-	-	-
Drosophila melanogaster	Q6DE90	-	-	-
Drosophila	Q5N7330	-	-	-
Xenopus laevis	Q67620	-	-	-
Homio sapiens	O701520	-	-	-
Mus musculus	M4BV660	-	-	-
Solomon Myricaria	Q10MB30	-	-	-
Arabidopsis thaliana	Q10BB40	-	-	-
Oryzalis japonica	B4F5250	-	-	-
Zea mays	CSWU20	-	-	-
Sorghum bicolor	DM0W90	-	-	-
Phytophthora infestans	Q541P30	-	-	-
Dichytelium discoidum	I7M6990	-	-	-
Tetrahymena thermophila	A0E1930	-	-	-
Paramecium aurelia	A82N50	-	-	-
Chlamydomonas reinhardtii		-	-	-

Abbildung 26: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Eukaryoten anhand der Aminosäuresequenz des Proteins DPM1. Phylogenetische Anordnung der in «phylogenie.fr» eingegebenen Aminosäuresequenzen der ausgewählten Organismen. Korrespondierende Tabelle mit Klassifizierung der Organismen nach Vorhandensein von DPM1, DPM2 und DPM3 sowie nach Hydrophobizität der C- bzw. N-terminalen Region.

5 Diskussion

5.1. DPM1 von *Babesia microti* unterscheidet sich anhand bioinformatischer Daten erheblich von seinen Stammmitgliedern der Apicomplexa und komplementiert eine DPM1-defiziente Hefemutante von *Saccharomyces cerevisiae*

Die in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse zum Enzym DPM1 des Einzellers *Babesia microti* sind sehr interessant, vielschichtig und mitunter auf den ersten Blick kontrovers. Es konnte gezeigt werden, dass die bislang bekannte Basensequenz des Gens für dieses essentielle Enzym der GPI-Biosynthese nicht ausreichend charakterisiert war. Die hier beschriebenen Untersuchungen im Rahmen dieses Promotionsprojekts kamen zu dem Ergebnis, dass die annotierte Gensequenz länger ist als bislang beschrieben (Cornillot et al. 2012). Das bestätigen die hier durchgeführten molekularbiologischen Analysen. Dieser Befund ist nicht unbedingt verwunderlich, da innerhalb verschiedener Stämme von *B. microti* mithilfe von Sequenzanalysen des Genoms von *B. microti* sowie Genom-Vergleiche gezeigt wurde, dass große Genveränderungen und Umlagerungen («rearrangements») in Genomen von Apicoplasten während der Evolution von Piroplasten aufgetreten sind (Hikosaka et al. 2012; Cornillot et al. 2013; Garg et al. 2014). Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Gensequenz von DPM1 aus *B. microti* können einen sehr nützlichen Beitrag dazu leisten, dieses Enzym genauer zu charakterisieren und die zukünftige Arbeit mit dem für dieses Protein kodierende Gen fruchtbarer und erkenntnisreicher machen.

Darüber hinaus konnte nach ausführlicher bioinformatischer Recherche gezeigt werden, dass das Protein DPM1 einerseits viele Gemeinsamkeiten innerhalb unterschiedlichster aber auch artverwandter Organismen aufweist, andererseits aber auch, dass große Unterschiede in der biochemischen Struktur und Eigenschaft dieses Enzym zwischen einer Vielzahl von untersuchten Organismen bestehen. Diese Unterschiede betreffen in erster Linie die Hydrophobizität der C- oder N-terminalen Region sowie die Signalpeptidspaltungsstellen und Anheftungsstellen der GPI-Verankerung.

Zudem zeigten sich bei einigen Organismen gleichzeitig vorkommende akzessorische Proteine der DPM-Familie, wie DPM2 und DPM3. Schließlich geht aus dem erstellten phylogenetischen Stammbaum hervor, dass sich DPM1 von *B. microti* erheblich vom DPM1-Protein von *S. cerevisiae* unterscheidet. Umso bemerkenswerter ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass nach den Untersuchungen in dieser Arbeit das Gen *dpm1* von *B. microti* in Experimenten mit konditional letalen *S. cerevisiae*-Mutanten für *dpm1*, was essentiell in Hefezellen ist, in der Lage war, das Hefeprotein durch das parasitische Protein zu komplementieren, das heißt, erfolgreich funktionell zu ersetzen. Dieser Befund wurde verifiziert durch das Wachstum der Hefezellen auf glukosehaltigem Medium, das frei von Uracil und Histidin war. Glukose hemmt den Galaktosepromoter der konditional letalen Hefemutanten, so dass ein versehentliches Wachstum der Hefemutanten ausgeschlossen ist. Durch dieses Medium wird in dieser konditional letalen Hefemutante, wie gewünscht, die Translation von endogenem (hefeeigenem) DPM1 verhindert. Durch eine korrekte Transformation des p426 MET 25-BM-*dpm1*-Plasmids in die Hefemutanten und einer konsekutiven Komplementation des Hefe-DPM1 durch parasitisches DPM1 zeigte sich auf dieser Mediumplatte das erfolgreiche Wachstum der komplementierten Hefen. Das Wachstum dieser funktionell komplementierten Hefemutanten unter diesen Bedingungen beweist eine korrekte Transformation und schließlich den Ersatz von Hefe-DPM1 durch DPM1 von *B. microti*. Obgleich sich die Aminosäuresequenzen bzw. Proteinsequenzen des DPM1 dieser beiden Organismen relevant unterscheiden, reicht die Homologie dieser Enzyme zueinander aus, um die DPM1-Defizienz der Hefemutanten funktionell durch parasitisches DPM1 zu ersetzen. Analog zu diesem Ergebnis zeigt sich bei diesem Experiment mit *dpm1* aus exogenem *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem p426 MET 25-SC-*dpm1*-Plasmid ebenfalls eine erfolgreiche Komplementation, was nicht verwunderlich ist, da es sich um das genetisch identische Gen der Kontroll-Hefe handelt, aber bei diesem Experiment einen der wichtigsten Kontrollaspekte darstellte. Eine wesentliche Kontrolle ist darüber hinaus die Transformation durch das leere Plasmid (p426 MET 25) in die Hefemutanten und die Prüfung des Wachstums auf galaktosehaltigem Medium (SGR) sowie auf glukosehaltigem Medium (SD).

Diese Hefemutante zeigt auf SGR-Medium ohne Histidin und Uracil kein Wachstum, da für dieses neben Histidin auch Uracil nötig ist. Für alle in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurde stets histidinfreies Medium verwendet, um das Wachstum von Wildtyp-YPH 499-Hefezellen (keine konditional letalen Mutanten) zu verhindern und stets sicherzustellen, dass sich nur Hefemutanten, die den HIS-GAL-Promoter aufweisen auf den jeweiligen wachstumspermissiven Platten befinden. Wachstum von Hefezellen zeigte sich bei den Beobachtungen in dieser Arbeit nach Transformation mit leerem Plasmid (p426 MET 25) auf SGR-Medium ohne Histidin und Uracil (Abbildung 18 A), wie im übrigen auch die Ansätze der sowohl mit dem p426 MET 25-SC-*dpm1*-Plasmid (Abbildung 18 C) als auch dem p426 MET 25-BM-*dpm1*-Plasmid (Abbildung 18 E) transformierten Hefemutanten. Diese Beobachtung lässt sich nur durch erfolgreiche Transformation des p426 MET 25-Plasmids erklären, welches das Uracil-Gen trägt; denn in uracilfreiem Medium zeigt der Hefestamm YPH 499 kein Wachstum. Allerdings sagt diese Aussage streng genommen noch nichts über eine erfolgreiche Komplementation mit entweder dem p426 MET 25-SC-*dpm1*-Plasmid oder dem p426 MET 25-BM-*dpm1*-Plasmid aus, da neben der Tatsache, dass Uracil in Form des Uracil-Gens auf dem Plasmid bereitgestellt wird, die Galaktose im Medium den Galaktose-Promoter der konditional letalen Hefemutanten aktiviert und so endogenes *dpm1* von *S. cerevisiae* abgelesen werden kann. Die wichtige Kontrolle bei dieser Versuchsreihe war die Transformation der Hefemutante mit leerem p426 MET 25-Plasmid und daraufhin die Überprüfung des Wachstums auf SD-Medium (Glukose-Medium) ohne Uracil und ohne Histidin. Den Ergebnissen dieser Arbeit nach, zeigte sich auf diesem glukosehaltigem Medium kein Wachstum (Abb. 18 B), da zwar Uracil in Form des Uracil-Gens auf dem Plasmid zum Wachstum zur Verfügung steht, aber die Glukose des Mediums den Galaktose-Promoter der konditional letalen Hefemutante hemmt. Da das *dpm1*-Gen ein zum Wachstum von *S. cerevisiae* essentielles Gen ist, findet sich auf dieser Platte kein erfolgreiches Wachstum von Hefezellen. Anders verhält es sich bei der erfolgreichen Komplementation mit exogenem DPM1 in Form dieses Hefezyms (Abb. 18 D) oder eines Parasitenzyms (Abb. 18 F) und sukzessivem Wachstum und folgendem funktionellen Ersatz dieser Hefemutanten mit DPM1.

Der Galaktose-Promoter der Mutante wird zwar einerseits durch glukosehaltiges Medium gehemmt, aber die erfolgreiche Transformation von sowohl dem p426 MET 25-SC-*dpm1*-Plasmid als auch dem p426 MET 25-BM-*dpm1*-Plasmid ersetzten die *dpm1*-Defizienz der Hefemutante durch homologe bzw. heterologe Komplementation, sodass die Hefen unabhängig von Uracil und Galaktose im Medium Wachstum aufweisen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse der bioinformatischen Analysen zeigen, dass der Einzeller *Babesia microti* weder über einen hydrophoben N- noch über einen hydrophoben C-Terminus verfügt, wie zum Beispiel die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Darüber hinaus zeigt sich, dass diese Hefe über ein weiteres Hilfsprotein der DPM-Familie, DPM2, verfügt, was ebenso wie DPM3 beim Einzeller *B. microti* fehlt. Diese Befunde lassen zunächst einmal vermuten, dass übereinstimmend mit den Angaben von Shams-Eldin und Kollegen, die ähnliche Untersuchungen am Erreger der *Malaria tropica*, *Plasmodium falciparum*, durchgeführt haben (Shams-Eldin et al. 2008), eine heterologe Komplementation von *S. cerevisiae-dpm1* mit *B. microti-dpm1* nicht möglich sei. Dies kann vor allem darin begründet sein, dass davon auszugehen ist, dass unterschiedliche speziesspezifischen Gene für das jeweilige DPM1-Protein kodieren und dass im Falle einiger Spezies (Vgl. Abbildung 26) weitere Proteine der DPM-Familie, wie DPM2 und DPM3, an der GPI-Biosynthese sowie an der Synthese von Vorläufern von lipidverankerten Oligosacchariden beteiligt sind (Herscovics and Orlean 1993; Kornfeld and Kornfeld 1985).

Komplementationsexperimente von *dpm1* aus *S. cerevisiae* wurden darüber hinaus von Mazhari-Tabrizi et al. für den Kinetoplasten *Trypanosoma brucei brucei* (*T. brucei brucei*) beschrieben (Mazhari-Tabrizi et al. 1996). In seiner Arbeit konnte der Autor zeigen, dass die homologe Komplementation von *dpm1* innerhalb zweier verschiedener Organismen erfolgreich durchgeführt werden konnte. Wie die Abbildung 26 zeigt, gehören die DPM1-Enzyme von *T. brucei brucei* und *S. cerevisiae* innerhalb ein und denselben phylogenetischen Ast, da beide Spezies ein hydrophobes C-terminales Ende sowie das Vorhandensein von DPM2 aufweisen. Das erklärt sehr gut die von jenen Autoren gezeigte Komplementierung, da davon auszugehen ist, dass das Gen für *dpm1* beider Organismen evolutionsgeschichtlich auf ein gemeinsames Vorläufergen zurückgeht.

Ein Blick in die Tabelle von Abbildung 26 lässt zunächst anhand der soeben geschilderten Hypothese und anhand der oben genannten Ergebnisse von Shams-Eldin et al. und seiner Ergebnisse zu *P. falciparum* vermuten (Shams-Eldin et al. 2008), dass eine Komplementation von *dpm1* aus *S. cerevisiae* mit *dpm1* aus *B. microti* nicht funktional ist. Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es zu einer erfolgreichen Komplementierung der konditional letalen Hefemutanten durch das DPM1 von *B. microti* gekommen ist und die erfolgreich komplementierten Hefemutanten Wachstum aufwiesen (Abbildung 18). Die Frage, die sich nach Darlegung dieser durchaus unerwarteten Ergebnisse stellt ist, ob das Gen für das Protein DPM1 im Protozoon *Babesia microti* zu einer einzigartigen Klasse innerhalb der Enzym-Gruppe der Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferasen gehört und ob die bislang beschriebenen Charakteristika, wie Hydrophobizität, weitere Enzyme der DPM-Familie sowie Signalpeptid und GPI-Verankerung, die auch in dieser Arbeit herausgearbeitet worden sind, nicht ausreichen, um das Protein hinreichend zu beschreiben. Möglicherweise haben die genannten Eigenschaften nur geringen Einfluss auf die funktionelle Komplementation, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sodass weitere noch bisher unbekannte Parameter eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, die die heterologe Komplementation von Hefe-*dpm1* mit *dpm1* aus *B. microti* erklären könnte. Im Weiteren wäre es durchaus interessant zu überprüfen, ob das *dpm1*-Gen weiterer Vertreter der systematischen Einteilung der Apicomplexa bzw. der *Piroplasmidae*, wie *Toxoplasma gondii*, *Babesia divergens*, *Theileria spp.* sowie *Cryptosporidium spp.*, das *dpm1*-Gen von *S. cerevisiae* zu komplementieren vermögen.

Die bisher bekannten DPM-Synthase-Sequenzen können grob in zwei Klassen eingeteilt werden. Eine Klasse weist eine hydrophobe COOH-terminale Domäne auf, wie jene für *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis* und *Trypanosoma brucei*, die allgemein als Klasse der Bäckerhefen bezeichnet wird. In der anderen Klasse, auch als humane Klasse des DPM1-Enzyms bezeichnet, fehlt die hydrophobe COOH-terminale Domäne, wie im menschlichen DPM1 oder in jenem von *Schizosaccharomyces pombe* (*Sz. pombe*).

In diesem Zusammenhang konnten Colussi und Kollegen in der Spaltheefe *Sz. pombe* zeigen, dass unterschiedliche *dpm1*-Homologe verschiedener Organismen, wie humanes und *S. cerevisiae-dpm1* in der Lage waren, letale Mutationen von *dpm1* in *Sz. Pombe*-Mutanten erfolgreich heterolog zu komplementieren, sodass diese Mutanten mit artfremdem DPM1-Enzym wieder Wachstum aufwiesen (Colussi et al. 1997). Dieser Befund ist sehr interessant, da bereits in dieser Arbeit von Colussi et al. gezeigt werden konnte, dass *dpm1* aus unterschiedlichen Klassen, sowohl aus der humanen, aber vor allem auch aus der Klasse der Bäckerhefen die *Sz. pombe*-Mutante komplementieren konnten. Eine eindeutige Herleitung und Erklärung auf Basis dieser o. g. Klassifikation ist damit nicht sicher möglich, da, wie erwähnt, DPM1 von *S. cerevisiae* aus der Klasse der Bäckerhefen stammt und im Gegensatz zu *Sz. pombe* einen hydrophoben C-Terminus aufweist. Der Befund von Colussi et al. ist durchaus auf die Ergebnisse in dieser Dissertationsarbeit zu übertragen, da auch hier gezeigt werden konnte, dass bislang noch nicht klassifiziertes DPM1 von *B. microti* mit fehlender hydrophober C-terminaler Region DPM1 aus der Klasse der Bäckerhefen komplementieren konnte, die wie erwähnt einen hydrophoben C-Terminus aufweisen. Das bedeutet, dass obgleich eine bioinformatische Klassifikation anhand der Sequenzen für das jeweilige speziesspezifische DPM1-Protein möglich ist und sehr gut eine phylogenetische Anordnung anhand eines Stammbaums basierend auf Sequenzhomologien dieses Enzym abgebildet werden kann, daraus kein verlässlicher Schluss über ein funktionelles Komplementierungs-Vermögens auf molekularbiologischer Ebene zu ziehen ist.

Obwohl berechtigte Zweifel an der Verlässlichkeit bioinformatisch erhaltener Ergebnisse zu Proteineigenschaften bestehen, wie die Ergebnisse von Colussi und Kollegen und die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit aufwerfen, zeigt ein anderes Beispiel, dass sowohl mit der Kombination aus Bioinformatik und experimenteller Techniken, als auch mit der alleinigen Analyse mittels bioinformatischen Techniken die Identifikation des vollständigen Satzes von GPI-verankerten Proteinen (GPI-Proteom) in einem Organismus gelingen kann. Für das GPI-verankerte Proteom von Merozoiten von *P. falciparum* wurde die Kombination aus experimentellen und bioinformatischen Analysen verwendet (Gilson et al. 2006), wohingegen jenes Proteom von *P. vivax* mit Vorhersageprogrammen und

Homologie-Suchen, wie jene, die auch in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestimmt worden ist (Carlton et al. 2008). Die verwendeten *in silico* Analysen, die auch in dieser Arbeit einen nicht unbeträchtlichen Teil ausmachten (Eisenhaber, Bork, and Eisenhaber 1999; Pierleoni, Martelli, and Casadio 2008; Petersen et al. 2011), zielten darauf ab, die Präsenz spezifischer *N*- oder *C*-terminaler Regionen zu bestimmen und die Erkennungsmotive der GPI-Anker-Transamidase sowie die Lokalisation dieser Motive zu identifizieren (Fankhauser and Mäser 2005; Poisson et al. 2007; Aurrecochea et al. 2009).

Schließlich ist in dieser Arbeit nicht eindeutig zu klären gewesen, zu welcher Klasse von DPM1-Enzymen jenes vom Einzeller *B. microti* gehört; zur Klasse der Bäckerhefen oder zur Klasse der humanen DPM1-Enzyme, falls es sich überhaupt in eine dieser beiden Klassifikationsstufen einordnen lässt oder einer eigenständigen Gruppe angehört. Auf funktioneller Ebene scheinen sich jedoch beide Enzyme, jeweils aus *S. cerevisiae* und *B. microti*, nicht oder nur vernachlässigbar gering zu unterscheiden, sondern verhalten sich funktionell eher homolog zueinander.

In den meisten Bakterien kodieren zwei Gene für das Protein DPM1; entweder für ein lösliches Protein oder für ein Protein mit hydrophobem *C*-terminalen Ende. Die bioinformatischen Ergebnisse der untersuchten Eukaryoten führen schließlich zur Hypothese, dass Eukaryoten nur das eine oder andere Gen im Zuge ihrer evolutionären Entwicklung behalten haben. Diese Differenzierung fand vermutlich sehr früh in der evolutionsgeschichtlichen Entwicklung statt. Die Differenzierung von Hefepilzen und Schimmelpilzen korreliert vermutlich mit einer sehr frühen Verzweigung. Hefepilze zeigen ein *C*-terminales Ende, welches bei Schimmelpilzen gänzlich fehlt (Abbildung 26). Die Unterscheidung von *Plasmodium spp.* hinsichtlich des Vorhandenseins einer hydrophoben *N*-terminalen Domäne innerhalb des unteren Asts, dessen Vertreter ansonsten keinerlei Hydrophobizität aufweisen (Abbildung 26), geht am ehesten auf eine moderne kürzlich zurückliegende evolutionäre Entwicklung zurück. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist sicher, dass beide Gene in einem frühen gemeinsamen Vorfahren, wie noch immer in Bakterien, präsent gewesen sein müssen und dass sich ausgehend von diesen bei der evolutionären Weiterentwicklung der Organismen beide Gene kodierend für ein unterschiedliches DPM1-Protein getrennt haben. Das kann im Rahmen der evolutionären Entwicklung auch das Fehlen oder Vorhandensein eines oder

weiterer akzessorischer Proteine für die Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase, wie DPM2 und DPM3, erklären, deren Präsenz neben der biochemisch relevanten Hydrophobizität des C- oder N-terminalen Endes des Proteins, für die Funktionalität dieses Proteins möglicherweise sehr wichtig ist. Es ist indes nicht auszuschließen, dass sich mehr als nur zwei Gene für DPM1 aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben, wie sich ebenfalls auf Grundlage der Abbildung 26 mutmaßen lässt.

In einer Arbeit von Cornillot und Kollegen konnte bereits durch phylogenetische Analysen *B. microti* in eine neue Linie der Parasiten innerhalb der Apicomplexa eingruppiert werden, die sich von *B. bovis* und *Theileria spp.* unterscheidet (Cornillot et al. 2012). Diese Erkenntnisse konnten durch die phylogenetische Anordnung von *B. microti* in Bezug auf DPM1 auch in dieser Arbeit gewonnen werden, da dieser Parasit aus phylogenetischer Sicht innerhalb der *Babesia spp.* eine Sonderrolle einnimmt (Abbildung 26). Jüngste Bemühungen, die Vielfalt, Pathogenität und den Metabolismus von *B. microti* sowie neue Marker und Ziele für die Diagnose und Therapie menschlicher Babesiose zu identifizieren, haben zur Fertigstellung der ersten genomischen Sequenz eines klinischen Stamms von *B. microti* namens R1 geführt (Stahl et al., submitted 2016). Es konnte gezeigt werden, dass das Genom von *B. microti* kleiner als 7 Mbp ist und somit das kleinste Kerngenom der Apicomplexa ausmacht (Cornillot et al. 2012). Anschließend «Whole-Genome-Mapping»-Untersuchungen vom selben Autor der zuvor genannten Studie zeigen, dass die Genome der zwei *B. microti*-Stämme, R1 und Grey, jeweils aus vier Kern-Chromosomen und einem linearen mitochondrialen Genom bestehen und dass beide Stämme eine hohe Konservierung in den Chromosomen mit Ausnahme der Telomer-Regionen, in denen große Unterschiede vorhanden sind, zeigten (Cornillot et al. 2013).

Die Fähigkeit von *B. microti* in Erythrozyten einzudringen und sich intraerythrozytär zu multiplizieren sowie das Fehlen wirksamer Instrumente für groß angelegte Screenings von Blut auf Infektion mit *B. microti* von asymptomatischen Spendern, machen diesen Parasiten zu einem großen Risiko für die nationale Blutversorgung, insbesondere der USA (Leiby 2011; Young et al. 2012). Dementsprechend wird *B. microti* jetzt als der am häufigsten berichtete transfusionsbedingte Krankheitserreger in den Vereinigten Staaten von Amerika bezeichnet (Institute of Medicine (US) Committee on Lyme Disease and Other Tick-

Borne Diseases: The State of the Science 2011), und die Zahl der dokumentierten Fälle von erworbenen Infektionen durch Transfusion hat im Laufe der Jahre erheblich zugenommen (Johnson et al. 2009; Herwaldt et al. 2011).

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass das Enzym DPM1 von *B. microti* sich nach bioinformatischer Analyse auf biochemischer Ebene von DPM1 von *S. cerevisiae* unterscheidet. Nichtsdestotrotz zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sehr anschaulich eine funktionelle Homologie beider Proteine, da konditional letale Hefemutanten nach erfolgreicher Transformation mit *B. microti-dpm1* heterolog komplementiert werden konnten.

Eine wichtige Rolle spielt der Unterschied von *B. microti*-DPM1 zu DPM1 in Säugetieren. Mit Blick auf weitere Untersuchung ist es sicherlich interessant zu überprüfen inwieweit *B. microti-dpm1* in der Lage ist, Säugetier-Zellen, die defizient für *dpm1* sind, zu komplementieren, wie es für Hefezellen bereits von Tomita und Kollegen versucht wurde zu zeigen (Tomita et al. 1998). Beide Proteine, sowohl *B. microti*-DPM1 als auch Säugetier-DPM1 zeigen nach Analyse keinen hydrophoben C-Terminus (Abbildung 26). Allerdings ist z. B. in *Homo sapiens* DPM2 und DPM3 vorhanden.

Sollte sich die Klasse der DPM-Familie zwischen *Babesia microti* und *Homo sapiens* unterscheiden, wie es bereits für andere Proteine der GPI-Biosynthese für diagnostische Zwecke gezeigt werden konnte (Cornillot et al. 2016), so wäre es möglich, die Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase dieses Parasiten als pharmakologisches Ziel für die Inhibierung des Parasitenwachstums auszunutzen und diese therapeutische Strategie zur Behandlung von Infektionen auf weitere humanpathogene eukaryotische Erreger auszuweiten. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass das Protein DPM1 in *Babesia microti* ebenfalls essentiell für das Wachstum ist, wie für *Saccharomyces cerevisiae*, was bislang noch nicht bestätigt werden konnte. Darüber hinaus ist es durchaus interessant, weitere Folgeschritte der GPI-Biosynthese nach der ersten Mannosylierungsreaktion durch DPM1 in *B. microti*, zu betrachten. Watanabe und Kollegen zeigten, dass der zweite Schritt der GPI-Biosynthese, eine De-N-Acetylierungsreaktion, die durch das Enzym GPI 12 ausgeführt wird, in *S. cerevisiae* ebenfalls essentiell für das Hefewachstum ist (Watanabe et al. 1999). Gleichartige Experimente wurden von Chang et al. für den

Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei*, durchgeführt und bestätigten die essentielle Rolle des Enzyms für diesen zweiten Schritt der GPI-Biosynthese (Chang et al. 2002). Die Rolle dieses Enzyms bei *B. microti* ist bislang allerdings nicht untersucht worden, kann aber, wie angedeutet ebenfalls ein wichtiges pharmakologisches Ziel darstellen, sofern sich das humane Pendant dieses Enzyms vom parasitären unterscheidet, sodass eine mögliche pharmakologische Therapiestrategie die humane GPI-Biosynthese nicht nachteilig beeinflusst. Für den Erreger der Chagaskrankheit, *Trypanosoma cruzi* konnten in diesem Kontext Komplementationsexperimente, die analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten sind, mit weiteren Genen für Enzyme der GPI-Biosynthese, wie GPI 10 oder dem bereits erwähnten GPI 12, im Hefepilz *S. cerevisiae* erfolgreich durchgeführt werden (Cardoso et al. 2013). Präparate, die als pharmakologischen Angriffspunkt diese Enzyme der GPI-Biosynthese in *T. cruzi* haben, wurde bislang allerdings noch nicht entwickelt. Darüber hinaus zeigten Experimente von Ilgoutz und Kollegen in einem weiteren Vertreter der *Kinetoplastida*, *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*), gleich mehrere essentielle, aber frei lösliche Enzyme der GPI-Biosynthese in diesem Erreger der Leishmaniose (Ilgoutz et al. 1999).

Die potente Wirksamkeit von bereits erwähnten Medikamenten und Kombinationen wie Atovaquon mit Azithromycin oder Clindamycin und Chinin (P. J. Krause et al. 2000) gegen *B. microti* demonstriert, dass der Apicoplast dieses Einzellers eine wesentliche Rolle beim intraerythrozytären Lebenszyklus des Parasiten spielt (Aboulaila et al. 2012). Obwohl die Babesiose-Therapie, die aus o. g. Chemotherapeutika besteht, als allgemein wirksam gilt, können unerwünschte Ereignisse, Therapieversagen und Krankheits-Rückfall bei einigen Patienten auftreten.

Die Identifikation neuer selektiver Therapiestrukturen, die wichtige und vor allem essentielle Funktionen für diesen Parasiten darstellen, wie möglicherweise die Enzyme der GPI-Biosynthese, allen voran das Enzym DPM1, können dabei helfen, weitere wirksame und sichere Therapien für die Behandlung der humanen Babesiose zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

Aboulaila, Mahmoud, Tserendorj Munkhjargal, Thillaiampalam Sivakumar, Akio Ueno, Yuki Nakano, Miki Yokoyama, Takeshi Yoshinari, et al. 2012. “Apicoplast-Targeting Antibacterials Inhibit the Growth of Babesia Parasites.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (6): 3196–3206. doi:10.1128/AAC.05488-11.

Aeschlimann, A. 1972. “[Ixodes ricinus, Linnaeus, 1758 (Ixodoidea: Ixodidae). Preliminary study of the biology of the species in Switzerland].” *Acta Tropica* 29 (4): 321–40.

Almeida, I C, M M Camargo, D O Procópio, L S Silva, A Mehlert, L R Travassos, R T Gazzinelli, and M A Ferguson. 2000. “Highly Purified Glycosylphosphatidylinositols from Trypanosoma Cruzi Are Potent Proinflammatory Agents.” *The EMBO Journal* 19 (7): 1476–85. doi:10.1093/emboj/19.7.1476.

Aurrecoechea, Cristina, John Brestelli, Brian P. Brunk, Jennifer Dommer, Steve Fischer, Bindu Gajria, Xin Gao, et al. 2009. “PlasmoDB: A Functional Genomic Database for Malaria Parasites.” *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D539–43. doi:10.1093/nar/gkn814.

Bateman, Alex, Ewan Birney, Lorenzo Cerruti, Richard Durbin, Laurence Etwiler, Sean R. Eddy, Sam Griffiths-Jones, Kevin L. Howe, Mhairi Marshall, and Erik L. L. Sonnhammer. 2002. “The Pfam Protein Families Database.” *Nucleic Acids Research* 30 (1): 276–80.

Bendtsen, Jannick Dyrlov, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne, and Søren Brunak. 2004. “Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0.” *Journal of Molecular Biology* 340 (4): 783–95. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028.

Bloch, Evan M., Tzong-Hae Lee, Peter J. Krause, Sam R. Telford, Lani Montalvo, Daniel Chafets, Sahar Usmani-Brown, Timothy J. Lepore, and Michael P. Busch. 2013. “Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Sensitive Detection and Quantitation of Babesia Microti Infection.” *Transfusion* 53 (10): 2299–2306. doi:10.1111/trf.12098.

Brown, D, and G L Wanek. 1992. “Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored

Membrane Proteins.” *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 3 (4): 895–906.

Browne, Sarah, Yvonne Ryan, Matthew Goodyer, and Oonagh Gilligan. 2010. “Fatal Babesiosis in an Asplenic Patient.” *British Journal of Haematology* 148 (4): 494. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07829.x.

Caetano, Braulia C, Bianca B Carmo, Mariane B Melo, Anna Cerny, Sara L dos Santos, Daniella C Bartholomeu, Douglas T Golenbock, and Ricardo T Gazzinelli. 2011. “Requirement of UNC93B1 Reveals a Critical Role for TLR7 in Host Resistance to Primary Infection with *Trypanosoma Cruzi*.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (4): 1903–11. doi:10.4049/jimmunol.1003911.

Camargo, M M, I C Almeida, M E Pereira, M A Ferguson, L R Travassos, and R T Gazzinelli. 1997. “Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-like Glycoproteins Isolated from *Trypanosoma Cruzi* Trypomastigotes Initiate the Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Macrophages.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (12): 5890–5901.

Campos, M A, I C Almeida, O Takeuchi, S Akira, E P Valente, D O Procópio, L R Travassos, J A Smith, D T Golenbock, and R T Gazzinelli. 2001. “Activation of Toll-like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (1): 416–23.

Cardoso, Mariana S., Caroline Junqueira, Ricardo C. Trigueiro, Hosam Shams-Eldin, Cristiana S. Macedo, Patrícia R. Araújo, Dawidson A. Gomes, et al. 2013. “Identification and Functional Analysis of *Trypanosoma Cruzi* Genes That Encode Proteins of the Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Pathway.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (8): e2369. doi:10.1371/journal.pntd.0002369.

Carlton, Jane M., John H. Adams, Joana C. Silva, Shelby L. Bidwell, Hernan Lorenzi, Elisabet Caler, Jonathan Crabtree, et al. 2008. “Comparative Genomics of the Neglected Human Malaria Parasite *Plasmodium Vivax*.” *Nature* 455 (7214): 757–63. doi:10.1038/nature07327.

Carver, Tim, Nick Thomson, Alan Bleasby, Matthew Berriman, and Julian Parkhill. 2009. “DNAPlotter: Circular and Linear Interactive Genome Visualization.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (1): 119–20. doi:10.1093/bioinformatics/btn578.

Chang, Tunhan, Kenneth G. Milne, Maria Lucia Sampaio Güther, Terry K. Smith,

and Michael A. J. Ferguson. 2002. "Cloning of Trypanosoma Brucei and Leishmania Major Genes Encoding the GlcNAc-Phosphatidylinositol de-N-Acetylase of Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis That Is Essential to the African Sleeping Sickness Parasite." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 50176–82. doi:10.1074/jbc.M208374200.

Chevenet, François, Christine Brun, Anne-Laure Bañuls, Bernard Jacq, and Richard Christen. 2006. "TreeDyn: Towards Dynamic Graphics and Annotations for Analyses of Trees." *BMC Bioinformatics* 7: 439. doi:10.1186/1471-2105-7-439.

Christianson, T. W., R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter. 1992. "Multifunctional Yeast High-Copy-Number Shuttle Vectors." *Gene* 110 (1): 119–22.

Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu. 1972. "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of Escherichia Coli by R-Factor DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (8): 2110–14.

Colussi, P. A., C. H. Taron, J. C. Mack, and P. Orlean. 1997. "Human and Saccharomyces Cerevisiae Dolichol Phosphate Mannose Synthases Represent Two Classes of the Enzyme, but Both Function in Schizosaccharomyces Pombe." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15): 7873–78.

Connally, Neeta P., Amanda J. Durante, Kimberly M. Yousey-Hindes, James I. Meek, Randall S. Nelson, and Robert Heimer. 2009. "Peridomestic Lyme Disease Prevention: Results of a Population-Based Case-Control Study." *American Journal of Preventive Medicine* 37 (3): 201–6. doi:10.1016/j.amepre.2009.04.026.

Cornillot, Emmanuel, Amina Dassouli, Aprajita Garg, Niseema Pachikara, Sylvie Randazzo, Delphine Depoix, Bernard Carcy, et al. 2013. "Whole Genome Mapping and Re-Organization of the Nuclear and Mitochondrial Genomes of Babesia Microti Isolates." *PloS One* 8 (9): e72657. doi:10.1371/journal.pone.0072657.

Cornillot, Emmanuel, Amina Dassouli, Niseema Pachikara, Lauren Lawres, Isaline Renard, Celia Francois, Sylvie Randazzo, et al. 2016. "A Targeted Immunomic Approach Identifies Diagnostic Antigens in the Human Pathogen Babesia Microti." *Transfusion*, May. doi:10.1111/trf.13640.

Cornillot, Emmanuel, Kamel Hadj-Kaddour, Amina Dassouli, Benjamin Noel,

Vincent Ranwez, Benoît Vacherie, Yoann Augagneur, et al. 2012. “Sequencing of the Smallest Apicomplexan Genome from the Human Pathogen *Babesia Microti*.” *Nucleic Acids Research* 40 (18): 9102–14. doi:10.1093/nar/gks700.

Costa, G. L., J. C. Bauer, B. McGowan, M. Angert, and M. P. Weiner. 1996. “Site-Directed Mutagenesis Using a Rapid PCR-Based Method.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 57: 239–48. doi:10.1385/0-89603-332-5:239.

Delorenzi, Mauro, Adrienne Sexton, Hosam Shams-Eldin, Ralph T. Schwarz, Terry Speed, and Louis Schofield. 2002. “Genes for Glycosylphosphatidylinositol Toxin Biosynthesis in *Plasmodium Falciparum*.” *Infection and Immunity* 70 (8): 4510–22.

Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.-F. Dufayard, et al. 2008. “Phylogeny.fr: Robust Phylogenetic Analysis for the Non-Specialist.” *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server issue): W465–69. doi:10.1093/nar/gkn180.

Dister, S. W., D. Fish, S. M. Bros, D. H. Frank, and B. L. Wood. 1997. “Landscape Characterization of Peridomestic Risk for Lyme Disease Using Satellite Imagery.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57 (6): 687–92.

Diuk-Wasser, Maria A., Edouard Vannier, and Peter J. Krause. 2016. “Coinfection by Ixodes Tick-Borne Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences.” *Trends in Parasitology* 32 (1): 30–42. doi:10.1016/j.pt.2015.09.008.

Edgar, Robert C. 2004. “MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput.” *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–97. doi:10.1093/nar/gkh340.

Eisenhaber, B., P. Bork, and F. Eisenhaber. 1999. “Prediction of Potential GPI-Modification Sites in Proprotein Sequences.” *Journal of Molecular Biology* 292 (3): 741–58. doi:10.1006/jmbi.1999.3069.

Englund, P. T. 1993. “The Structure and Biosynthesis of Glycosyl Phosphatidylinositol Protein Anchors.” *Annual Review of Biochemistry* 62: 121–38. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.001005.

Fankhauser, Niklaus, and Pascal Mäser. 2005. “Identification of GPI Anchor Attachment Signals by a Kohonen Self-Organizing Map.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 21 (9): 1846–52. doi:10.1093/bioinformatics/bti299.

Ferguson, M. A. 1997. “The Surface Glycoconjugates of Trypanosomatid Parasites.”

Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 352 (1359): 1295–1302. doi:10.1098/rstb.1997.0113.

Finch, Casey, Mohammed Salim Al-Damluji, Peter J. Krause, Linda Niccolai, Tanner Steeves, Corrine Folsom O’Keefe, and Maria A. Diuk-Wasser. 2014. “Integrated Assessment of Behavioral and Environmental Risk Factors for Lyme Disease Infection on Block Island, Rhode Island.” *PloS One* 9 (1): e84758. doi:10.1371/journal.pone.0084758.

Finn, Robert D., Penelope Coggill, Ruth Y. Eberhardt, Sean R. Eddy, Jaina Mistry, Alex L. Mitchell, Simon C. Potter, et al. 2016. “The Pfam Protein Families Database: Towards a More Sustainable Future.” *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D279–85. doi:10.1093/nar/gkv1344.

Fish, Durland, and James E. Childs. 2009. “Community-Based Prevention of Lyme Disease and Other Tick-Borne Diseases through Topical Application of Acaricide to White-Tailed Deer: Background and Rationale.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 9 (4): 357–64. doi:10.1089/vbz.2009.0022.

Fisher, C. L., and G. K. Pei. 1997. “Modification of a PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Method.” *BioTechniques* 23 (4): 570–71, 574.

Garg, Aprajita, Anna Stein, William Zhao, Ankit Dwivedi, Roger Frutos, Emmanuel Cornillot, and Choukri Ben Mamoun. 2014. “Sequence and Annotation of the Apicoplast Genome of the Human Pathogen *Babesia Microti*.” *PloS One* 9 (10): e107939. doi:10.1371/journal.pone.0107939.

Gerold, P., A. Dieckmann-Schuppert, and R. T. Schwarz. 1994. “Glycosylphosphatidylinositols Synthesized by Asexual Erythrocytic Stages of the Malarial Parasite, *Plasmodium Falciparum*. Candidates for Plasmodial Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchor Precursors and Pathogenicity Factors.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (4): 2597–2606.

Gerold, P., N. Jung, N. Azzouz, N. Freiberg, S. Kobe, and R. T. Schwarz. 1999. “Biosynthesis of Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium Falciparum* in a Cell-Free Incubation System: Inositol Acylation Is Needed for Mannosylation of Glycosylphosphatidylinositols.” *The Biochemical Journal* 344 Pt 3 (December): 731–38.

Gerold, P., B. Striepen, B. Reitter, H. Geyer, R. Geyer, E. Reinwald, H. J. Risse, and

R. T. Schwarz. 1996. "Glycosyl-Phosphatidylinositols of *Trypanosoma Congolense*: Two Common Precursors but a New Protein-Anchor." *Journal of Molecular Biology* 261 (2): 181–94. doi:10.1006/jmbi.1996.0451.

Gilot, B., G. Pautou, E. Moncada, and G. Ain. 1975. "[Ecological study of *Ixodes ricinus* (Linné, 1758) (Acarina, Ixodoides) in southeastern France]." *Acta Tropica* 32 (3): 232–58.

Gilson, Paul R., Thomas Nebl, Damjan Vukcevic, Robert L. Moritz, Tobias Sargeant, Terence P. Speed, Louis Schofield, and Brendan S. Crabb. 2006. "Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (7): 1286–99. doi:10.1074/mcp.M600035-MCP200.

Goodell, Alex J., Evan M. Bloch, Peter J. Krause, and Brian Custer. 2014. "Costs, Consequences, and Cost-Effectiveness of Strategies for *Babesia Microti* Donor Screening of the US Blood Supply." *Transfusion* 54 (9): 2245–57. doi:10.1111/trf.12805.

Gorenflot, A., C. Bazin, and P. Ambroise-Thomas. 1987. "[Human babesiosis. Treatment of severe forms]." *Presse Médicale (Paris, France: 1983)* 16 (22): 1099.

Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology* 59 (3): 307–21. doi:10.1093/sysbio/syq010.

Häselbarth, Katja, Astrid M. Tenter, Volker Brade, Gerhard Krieger, and Klaus-Peter Hunfeld. 2007. "First Case of Human Babesiosis in Germany - Clinical Presentation and Molecular Characterisation of the Pathogen." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 297 (3): 197–204. doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.002.

Hatcher, J. C., P. D. Greenberg, J. Antique, and V. E. Jimenez-Lucho. 2001. "Severe Babesiosis in Long Island: Review of 34 Cases and Their Complications." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 (8): 1117–25. doi:10.1086/319742.

Herscovics, A., and P. Orlean. 1993. "Glycoprotein Biosynthesis in Yeast." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental*

Biology 7 (6): 540–50.

Herwaldt, Barbara L., Jeanne V. Linden, Elizabeth Bosserman, Carolyn Young, Danuta Olkowska, and Marianna Wilson. 2011. “Transfusion-Associated Babesiosis in the United States: A Description of Cases.” *Annals of Internal Medicine* 155 (8): 509–19. doi:10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00362.

Hiepe, Theodor, Richard Lucius, Bruno Gottstein, Horst Aspöck, Herbert Auer, and Hans Briegel. 2005. *Allgemeine Parasitologie: Mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung*. 1., Aufl. Stuttgart: MVS Medizinverlage Stuttgart.

Hikosaka, Kenji, Naotoshi Tsuji, Yoh-Ichi Watanabe, Hiroe Kishine, Toshihiro Horii, Ikuo Igarashi, Kiyoshi Kita, and Kazuyuki Tanabe. 2012. “Novel Type of Linear Mitochondrial Genomes with Dual Flip-Flop Inversion System in Apicomplexan Parasites, *Babesia Microti* and *Babesia Rodhaini*.” *BMC Genomics* 13: 622. doi:10.1186/1471-2164-13-622.

Hildebrandt, A., K.-P. Hunfeld, M. Baier, A. Krumbholz, S. Sachse, T. Lorenzen, M. Kiehntopf, H.-J. Fricke, and E. Straube. 2007. “First Confirmed Autochthonous Case of Human *Babesia Microti* Infection in Europe.” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26 (8): 595–601. doi:10.1007/s10096-007-0333-1.

Hofmann. 1993. “TMbase - A Database of Membrane Spanning Proteins Segments.” *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374 (166). <http://www.ch.embnet.org/documentation/mfc-35.pdf>.

Hojgaard, Andrias, Gary Lukacik, and Joseph Piesman. 2014. “Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*, with Two Different Multiplex PCR Assays.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (3): 349–51. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.12.001.

Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford, P. J. Krause, and D. H. Persing. 2000. “Babesiosis.” *Clinical Microbiology Reviews* 13 (3): 451–69.

Ilgoutz, S. C., J. L. Zawadzki, J. E. Ralton, and M. J. McConville. 1999. “Evidence That Free GPI Glycolipids Are Essential for Growth of *Leishmania mexicana*.” *The EMBO Journal* 18 (10): 2746–55. doi:10.1093/emboj/18.10.2746.

Institute of Medicine (US) Committee on Lyme Disease and Other Tick-Borne Diseases: The State of the Science. 2011. *Critical Needs and Gaps in Understanding*

Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes: Workshop Report. The National Academies Collection: Reports Funded by National Institutes of Health. Washington (DC): National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57020/>.

Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations." *Journal of Bacteriology* 153 (1): 163–68.

James, M. A., S. Montenegro-James, C. Fajfar-Whetstone, F. Montealegre, J. Erickson, and M. Ristic. 1987. "Antigenic Relationship between Plasmodium Falciparum and Babesia Bovis: Reactivity with Antibodies to Culture-Derived Soluble Exoantigens." *The Journal of Protozoology* 34 (3): 328–32.

Johnson, Stephanie T., Ritchard G. Cable, and David A. Leiby. 2012. "Lookback Investigations of Babesia Microti-Seropositive Blood Donors: Seven-Year Experience in a Babesia-Endemic Area." *Transfusion* 52 (7): 1509–16. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03345.x.

Johnson, Stephanie T., Ritchard G. Cable, Laura Tonnetti, Bryan Spencer, Jorge Rios, and David A. Leiby. 2009. "Seroprevalence of Babesia Microti in Blood Donors from Babesia-Endemic Areas of the Northeastern United States: 2000 through 2007." *Transfusion* 49 (12): 2574–82. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02430.x.

Johnston, M., and R. W. Davis. 1984. "Sequences That Regulate the Divergent GAL1-GAL10 Promoter in Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular and Cellular Biology* 4 (8): 1440–48.

Juchimiuk, Mateusz, Joanna Kruszewska, and Grażyna Palamarczyk. 2015. "Dolichol Phosphate Mannose Synthase from the Pathogenic Yeast Candida Albicans Is a Multimeric Enzyme." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1850 (11): 2265–75. doi:10.1016/j.bbagen.2015.08.012.

Kanehisa, Minoru, Susumu Goto, Yoko Sato, Masayuki Kawashima, Miho Furumichi, and Mao Tanabe. 2014. "Data, Information, Knowledge and Principle: Back to Metabolism in KEGG." *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D199–205. doi:10.1093/nar/gkt1076.

Kanehisa, Minoru, Yoko Sato, Masayuki Kawashima, Miho Furumichi, and Mao Tanabe. 2016. "KEGG as a Reference Resource for Gene and Protein Annotation." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D457–62. doi:10.1093/nar/gkv1070.

Kilpatrick, Howard J., Andrew M. LaBonte, and Kirby C. Stafford. 2014. "The Relationship between Deer Density, Tick Abundance, and Human Cases of Lyme Disease in a Residential Community." *Journal of Medical Entomology* 51 (4): 777–84.

Knapp, Kristen L., and Nancy A. Rice. 2015. "Human Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in the United States." *Journal of Parasitology Research* 2015: 587131. doi:10.1155/2015/587131.

Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. "Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides." *Annual Review of Biochemistry* 54: 631–64. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215.

Krause, Peter J., Benjamin E. Gewurz, David Hill, Francisco M. Marty, Edouard Vannier, Ivo M. Foppa, Richard R. Furman, et al. 2008. "Persistent and Relapsing Babesiosis in Immunocompromised Patients." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 (3): 370–76. doi:10.1086/525852.

Krause, Peter J., Kathleen McKay, Joseph Gadbow, Diane Christianson, Linda Closter, Timothy Lepore, Sam R. Telford, et al. 2003. "Increasing Health Burden of Human Babesiosis in Endemic Sites." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68 (4): 431–36.

Krause, P. J., T. Lepore, V. K. Sikand, J. Gadbow, G. Burke, S. R. Telford, P. Brassard, et al. 2000. "Atovaquone and Azithromycin for the Treatment of Babesiosis." *The New England Journal of Medicine* 343 (20): 1454–58. doi:10.1056/NEJM200011163432004.

Krause, P. J., S. R. Telford, R. Ryan, P. A. Conrad, M. Wilson, J. W. Thomford, and A. Spielman. 1994. "Diagnosis of Babesiosis: Evaluation of a Serologic Test for the Detection of *Babesia microti* Antibody." *The Journal of Infectious Diseases* 169 (4): 923–26.

Krause, P. J., S. R. Telford, A. Spielman, V. Sikand, R. Ryan, D. Christianson, G. Burke, et al. 1996. "Concurrent Lyme Disease and Babesiosis. Evidence for Increased Severity and Duration of Illness." *JAMA* 275 (21): 1657–60.

Lantos, Paul M., and Peter J. Krause. 2002. "Babesiosis: Similar to Malaria but Different." *Pediatric Annals* 31 (3): 192–97.

Leiby, David A. 2011. "Transfusion-Transmitted *Babesia* Spp.: Bull's-Eye on

Babesia Microti.” *Clinical Microbiology Reviews* 24 (1): 14–28. doi:10.1128/CMR.00022-10.

Maeda, Y., S. Tanaka, J. Hino, K. Kangawa, and T. Kinoshita. 2000. “Human Dolichol-Phosphate-Mannose Synthase Consists of Three Subunits, DPM1, DPM2 and DPM3.” *The EMBO Journal* 19 (11): 2475–82. doi:10.1093/emboj/19.11.2475.

Maeda, Y., S. Tomita, R. Watanabe, K. Ohishi, and T. Kinoshita. 1998. “DPM2 Regulates Biosynthesis of Dolichol Phosphate-Mannose in Mammalian Cells: Correct Subcellular Localization and Stabilization of DPM1, and Binding of Dolichol Phosphate.” *The EMBO Journal* 17 (17): 4920–29. doi:10.1093/emboj/17.17.4920.

Maeda, Yusuke, and Taroh Kinoshita. 2008. “Dolichol-Phosphate Mannose Synthase: Structure, Function and Regulation.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1780 (6): 861–68. doi:10.1016/j.bbagen.2008.03.005.

Magrane, Michele, and Uniprot Consortium. 2011. “UniProt Knowledgebase: A Hub of Integrated Protein Data.” *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* 2011: bar009. doi:10.1093/database/bar009.

Mayne, Peter J. 2015. “Clinical Determinants of Lyme Borreliosis, Babesiosis, Bartonellosis, Anaplasmosis, and Ehrlichiosis in an Australian Cohort.” *International Journal of General Medicine* 8: 15–26. doi:10.2147/IJGM.S75825.

Mazhari-Tabrizi, R., M. Blank, D. Mumberg, M. Funk, R. T. Schwarz, and V. Eckert. 1999. “Chromosomal Promoter Replacement in *Saccharomyces Cerevisiae*: Construction of Conditional Lethal Strains for the Cloning of Glycosyltransferases from Various Organisms.” *Glycoconjugate Journal* 16 (11): 673–79.

Mazhari-Tabrizi, R., V. Eckert, M. Blank, R. Müller, D. Mumberg, M. Funk, and R. T. Schwarz. 1996. “Cloning and Functional Expression of Glycosyltransferases from Parasitic Protozoans by Heterologous Complementation in Yeast: The Dolichol Phosphate Mannose Synthase from *Trypanosoma Brucei Brucei*.” *The Biochemical Journal* 316 (Pt 3) (June): 853–58.

Medeiros, Monica M, Jaqueline R Peixoto, Ana-Carolina Oliveira, Larissa Cardilo-Reis, Vera L G Koatz, Luc Van Kaer, José O Previato, Lúcia Mendonça-Previato, Alberto Nobrega, and Maria Bellio. 2007. “Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Dependent Proinflammatory and Immunomodulatory Properties of the Glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma Cruzi*.” *Journal of Leukocyte Biology* 82 (3): 488–96.

doi:10.1189/jlb.0706478.

Mehlhorn, H., and E. Shein. 1984. "The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages." *Advances in Parasitology* 23: 37–103.

Meldrum, S. C., G. S. Birkhead, D. J. White, J. L. Benach, and D. L. Morse. 1992. "Human Babesiosis in New York State: An Epidemiological Description of 136 Cases." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 15 (6): 1019–23.

Menon, A. K., S. Mayor, and R. T. Schwarz. 1990. "Biosynthesis of Glycosyl-Phosphatidylinositol Lipids in *Trypanosoma Brucei*: Involvement of Mannosyl-Phosphoryldolichol as the Mannose Donor." *The EMBO Journal* 9 (13): 4249–58.

Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987. "Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction." *Methods in Enzymology* 155: 335–50.

Mumberg, D., R. Müller, and M. Funk. 1994. "Regulatable Promoters of *Saccharomyces Cerevisiae*: Comparison of Transcriptional Activity and Their Use for Heterologous Expression." *Nucleic Acids Research* 22 (25): 5767–68.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997a. "Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of Their Cleavage Sites." *Protein Engineering* 10 (1): 1–6.

———. 1997b. "A Neural Network Method for Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of Their Cleavage Sites." *International Journal of Neural Systems* 8 (5-6): 581–99.

Oliveira, Ana-Carolina, Jaqueline R Peixoto, Luciana B de Arruda, Marco A Campos, Ricardo T Gazzinelli, Douglas T Golenbock, Shizuo Akira, et al. 2004. "Expression of Functional TLR4 Confers Proinflammatory Responsiveness to *Trypanosoma Cruzi* Glycoinositolphospholipids and Higher Resistance to Infection with T. *Cruzi*." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (9): 5688–96.

Orlean, P. 1990. "Dolichol Phosphate Mannose Synthase Is Required in Vivo for Glycosyl Phosphatidylinositol Membrane Anchoring, O Mannosylation, and N Glycosylation of Protein in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 10 (11): 5796–5805.

Orlean, P., C. Albright, and P. W. Robbins. 1988. "Cloning and Sequencing of the Yeast Gene for Dolichol Phosphate Mannose Synthase, an Essential Protein." *The*

Journal of Biological Chemistry 263 (33): 17499–507.

Orlean, Peter, and Anant K. Menon. 2007. “Thematic Review Series: Lipid Posttranslational Modifications. GPI Anchoring of Protein in Yeast and Mammalian Cells, or: How We Learned to Stop Worrying and Love Glycophospholipids.” *Journal of Lipid Research* 48 (5): 993–1011. doi:10.1194/jlr.R700002-JLR200.

Persing, D. H., D. Mathiesen, W. F. Marshall, S. R. Telford, A. Spielman, J. W. Thomford, and P. A. Conrad. 1992. “Detection of *Babesia Microti* by Polymerase Chain Reaction.” *Journal of Clinical Microbiology* 30 (8): 2097–2103.

Petersen, Thomas Nordahl, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, and Henrik Nielsen. 2011. “SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions.” *Nature Methods* 8 (10): 785–86. doi:10.1038/nmeth.1701.

Pierleoni, Andrea, Pier Luigi Martelli, and Rita Casadio. 2008. “PredGPI: A GPI-Anchor Predictor.” *BMC Bioinformatics* 9: 392. doi:10.1186/1471-2105-9-392.

Poisson, Guylaine, Cedric Chauve, Xin Chen, and Anne Bergeron. 2007. “FragAnchor: A Large-Scale Predictor of Glycosylphosphatidylinositol Anchors in Eukaryote Protein Sequences by Qualitative Scoring.” *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 5 (2): 121–30. doi:10.1016/S1672-0229(07)60022-9.

Rosner, F., M. H. Zarrabi, J. L. Benach, and G. S. Habicht. 1984. “Babesiosis in Splenectomized Adults. Review of 22 Reported Cases.” *The American Journal of Medicine* 76 (4): 696–701.

Ruebush, T. K., D. D. Juranek, E. S. Chisholm, P. C. Snow, G. R. Healy, and A. J. Sulzer. 1977. “Human Babesiosis on Nantucket Island. Evidence for Self-Limited and Subclinical Infections.” *The New England Journal of Medicine* 297 (15): 825–27. doi:10.1056/NEJM197710132971511.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. “Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia.” *Science (New York, N.Y.)* 230 (4732): 1350–54.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1992. “DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. 1977.” *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 104–8.

Schofield, L., P. Gerold, R. T. Schwarz, and S. Tachado. 1994. “Signal Transduction in Host Cells Mediated by Glycosylphosphatidylinositols of the Parasitic

Protozoa, or Why Do the Parasitic Protozoa Have so Many GPI Molecules?” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 27 (2): 249–54.

Senanayake, Sanjaya N., Andrea Paparini, Maya Latimer, Kerrie Andriolo, Alexandre J. Dasilva, Heather Wilson, Maniphet V. Xayavong, Peter J. Collignon, Phillip Jeans, and Peter J. Irwin. 2012. “First Report of Human Babesiosis in Australia.” *The Medical Journal of Australia* 196 (5): 350–52.

Shams-Eldin, Hosam, Cristiana Santos de Macedo, Sebastian Niehus, Caroline Dorn, Jürgen Kimmel, Nahid Azzouz, and Ralph T. Schwarz. 2008. “Plasmodium Falciparum Dolichol Phosphate Mannose Synthase Represents a Novel Clade.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370 (3): 388–93. doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.033.

Stahl, Philipp, Volker Ruppert, Thomas Meyer, Jörg Schmidt, Marco A. Campos, Ricardo T. Gazzinelli, Bernhard Maisch, Ralph T. Schwarz, and Françoise Debierre-Grockiego. 2013. “Trypomastigotes and Amastigotes of Trypanosoma Cruzi Induce Apoptosis and STAT3 Activation in Cardiomyocytes in Vitro.” *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 18 (6): 653–63. doi:10.1007/s10495-013-0822-x.

Stahl, Philipp, Volker Ruppert, Ralph T. Schwarz, and Thomas Meyer. 2014. “Trypanosoma Cruzi Evades the Protective Role of Interferon-Gamma-Signaling in Parasite-Infected Cells.” *PloS One* 9 (10): e110512. doi:10.1371/journal.pone.0110512.

Stahl, Philipp, Ralph T. Schwarz, Françoise Debierre-Grockiego, and Thomas Meyer. 2014. “Trypanosoma Cruzi Parasites Fight for Control of the JAK-STAT Pathway by Disarming Their Host.” *JAK-STAT* 3 (4): e1012964. doi:10.1080/21623996.2015.1012964.

Stahl, Philipp, Poinsignon, Yves, Pouedras, Pascal, Ciubotaru, Vasilica, Krause, Peter J, Ben Mamoun, Choukri and Cornillot, Emmanuel. 2016.

„A case of human babesiosis in France in an immunocompetent patient: A case report and molecular analysis of the *Babesia microti* R1 strain.“ *Lancet Infectious Diseases*, *submitted*, August 2016

Striepen, B., J. F. Dubremetz, and R. T. Schwarz. 1999. "Glucosylation of Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchors: Identification of Uridine Diphosphate-Glucose as the Direct Donor for Side Chain Modification in *Toxoplasma Gondii* Using Carbohydrate Analogues." *Biochemistry* 38 (5): 1478–87. doi:10.1021/bi981884q.

Striepen, B., C. F. Zinecker, J. B. Damm, P. A. Melgers, G. J. Gerwig, M. Koolen, J. F. Vliegthart, J. F. Dubremetz, and R. T. Schwarz. 1997. "Molecular Structure of the 'Low Molecular Weight Antigen' of *Toxoplasma Gondii*: A Glucose Alpha 1-4 N-Acetylgalactosamine Makes Free Glycosyl-Phosphatidylinositols Highly Immunogenic." *Journal of Molecular Biology* 266 (4): 797–813. doi:10.1006/jmbi.1996.0806.

Teutsch, S. M., P. Etkind, E. L. Burwell, K. Sato, M. M. Dana, P. R. Fleishman, and D. D. Juranek. 1980. "Babesiosis in Post-Splenectomy Hosts." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29 (5): 738–41.

Tomita, S., N. Inoue, Y. Maeda, K. Ohishi, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1998. "A Homologue of *Saccharomyces Cerevisiae* Dpm1p Is Not Sufficient for Synthesis of Dolichol-Phosphate-Mannose in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (15): 9249–54.

Tusnády, G. E., and I. Simon. 1998. "Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Application to Topology Prediction." *Journal of Molecular Biology* 283 (2): 489–506. doi:10.1006/jmbi.1998.2107.

———. 2001. "The HMMTOP Transmembrane Topology Prediction Server." *Bioinformatics (Oxford, England)* 17 (9): 849–50.

UniProt Consortium. 2015. "UniProt: A Hub for Protein Information." *Nucleic Acids Research* 43 (Database issue): D204–12. doi:10.1093/nar/gku989.

Vannier, Edouard G., Maria A. Diuk-Wasser, Choukri Ben Mamoun, and Peter J. Krause. 2015. "Babesiosis." *Infectious Disease Clinics of North America* 29 (2): 357–70. doi:10.1016/j.idc.2015.02.008.

Vannier, Edouard, and Peter J. Krause. 2009. "Update on Babesiosis." *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009: 984568. doi:10.1155/2009/984568.

Watanabe, R., K. Ohishi, Y. Maeda, N. Nakamura, and T. Kinoshita. 1999.

“Mammalian PIG-L and Its Yeast Homologue Gpi12p Are N-Acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-Acetylases Essential in Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis.” *The Biochemical Journal* 339 (Pt 1) (April): 185–92.

Wennicke, Kathrin, Françoise Debierre-Grockiego, Dominic Wichmann, Norbert W Brattig, Sabine Pankuweit, Bernhard Maisch, Ralph T Schwarz, and Volker Ruppert. 2008. “Glycosylphosphatidylinositol-Induced Cardiac Myocyte Death Might Contribute to the Fatal Outcome of Plasmodium Falciparum Malaria.” *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 13 (7): 857–66. doi:10.1007/s10495-008-0217-6.

White, D. J., J. Talarico, H. G. Chang, G. S. Birkhead, T. Heimberger, and D. L. Morse. 1998. “Human Babesiosis in New York State: Review of 139 Hospitalized Cases and Analysis of Prognostic Factors.” *Archives of Internal Medicine* 158 (19): 2149–54.

Wilson, M. L., S. R. Telford, J. Piesman, and A. Spielman. 1988. “Reduced Abundance of Immature Ixodes Dammini (Acari: Ixodidae) Following Elimination of Deer.” *Journal of Medical Entomology* 25 (4): 224–28.

Wormser, Gary P., Aakanksha Prasad, Ellen Neuhaus, Samit Joshi, John Nowakowski, John Nelson, Abraham Mittleman, Maria Aguerro-Rosenfeld, Jeffrey Topal, and Peter J. Krause. 2010. “Emergence of Resistance to Azithromycin-Atovaquone in Immunocompromised Patients with Babesia Microti Infection.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 (3): 381–86. doi:10.1086/649859.

Young, Carolyn, Anjulika Chawla, Victor Berardi, James Padbury, Gail Skowron, Peter J. Krause, and Babesia Testing Investigational Containment Study Group. 2012. “Preventing Transfusion-Transmitted Babesiosis: Preliminary Experience of the First Laboratory-Based Blood Donor Screening Program.” *Transfusion* 52 (7): 1523–29. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03612.x.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Ixodes scapularis</i> , ein Vektor für <i>Babesia microti</i> .	1
Abb. 2: Stammbaum der Apicomplexa.	2
Abb. 3: Lebenszyklus von <i>Babesia</i> spp..	3
Abb. 4: Babesien im Blutaussstrich.	6
Abb. 5: Allgemeine Ausgangsstruktur von Glykosylphosphatidylinositol-Ankern. §	11
Abb. 6: Schema zur Herstellung konditional letaler Hefemutanten. §	14
Abb. 7: Proteinsuche auf der KEGG-Datenbank nach <i>DPM1</i> .	46
Abb. 8: Betrachtung des Gens <i>dpm1</i> von <i>Babesia bovis</i> auf der KEGG-Datenbank.	47
Abb. 9: Proteinsuchfunktion auf der «UniProt Blast-Search»-Seite.	48
Abb. 10: Eingabe der Aminosäuresequenz von <i>DPM1</i> von <i>B. bovis</i> in die TMpred-Datenbank.	50
Abb.11: Die Datenbank PredGPI.	53
Abb. 12: Seite der «One-Click»-Methode der Phylogenie-Datenbank.	58
Abb. 13: Zusammenfassender Arbeitsablauf der bioinformatischen Analysen. §	59
Abb. 14: Annotiertes <i>dpm1</i> -Gen von <i>Babesia microti</i> sowie Schema des Primer-Designs zur Bestimmung der tatsächlichen Gensequenzlänge. §	60
Abb. 15: Elektrophoresegel der PCR von <i>copy DNA</i> (<i>cDNA</i>) und <i>genomischer DNA</i> (<i>gDNA</i>) mit korrespondierenden Primern.	63
Abb. 16: Hypothetische erweiterte Gensequenzlänge von <i>dpm1</i> von <i>Babesia microti</i> . §	64
Abb. 17: Klonkarte mit der Strategie für die Ligation von <i>dpm1</i> von <i>B. microti</i> in den Hefevektor <i>p426 MET 25</i> .	65

<i>Abb. 18: Transformation der konditional letalen S. cerevisiae-Mutante YPH 499-HIS-GAL-dpm1 mit Plasmiden mit dem Hefe-dpm1-Gen bzw. mit dem Babesia microti-dpm1-Gen.</i>	69
<i>Abb. 19: Proteinsequenz von DPM1 von Babesia microti. §</i>	71
<i>Abb. 20: Ergebnis der Transmembranhelix-Analyse durch den Server TMPred.</i>	73
<i>Abb. 21: Analyse möglicher Signalpeptidspaltungsstellen durch SignalP.</i>	74
<i>Abb. 22: Ergebnisse der Vorhersage über die Position einer GPI-Verankerung.</i>	75
<i>Abb. 23: Ergebnisse der Analysen über eine Transmembranhelix von B. microti-DPM1 mithilfe des Servers HMMTOP.</i>	76
<i>Abb. 24: Zusammenfassung der Pfam-Analysen anhand des «UniProt-Codes» für DPM1 von Babesia microti.</i>	77
<i>Abb. 25: DPM1 lässt sich in drei wesentliche Organisations-Typen einteilen. §</i>	78
<i>Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Eukaryoten anhand der Aminosäuresequenz des Proteins DPM1.</i>	83

§ Abbildungen erstellt von Philipp Stahl (2012-2016)

8 Anhang

8.1 Sequenzierung des rekombinanten Konstrukts p426 MET 25-BM-dpm1

NCBI Blast, 31.01.2014

Query: BM DPM1 WT
Subject: p426 MET 25, Klon 1 vom 30.01.2014

```

Query 1   ATGTATAGTGTAATTCTGCCTACGGTTAACGAAGCCGAAAACATTCCATACGTAATTGAA 60
          |||
Sbjct 33   ATGTATAGTGTAATTCTGCCTACGGTTAACGAAGCCGAAAACATTCCATACGTAATTGAA 92

Query 61  TTAATTGTACAAACATTTAAACAATATGATTATGAATTCGAGATAATTGTGGTAGATGAT 120
          |||
Sbjct 93  TTAATTGTACAAACATTTAAACAATATGATTATGAATTCGAGATAATTGTGGTAGATGAT 152

Query 121 GCTAGCACCGATGGTACCAGCGATACAGTTTGCAATATTCAAAAATTATGCCAGATTAT 180
          |||
Sbjct 153 GCTAGCACCGATGGTACCAGCGATACAGTTTGCAATATTCAAAAATTATGCCAGATTAT 212

Query 181 AAAATCAGACTTTTGGAGAGGCCAAGTAAATTAGGTCTTGGCACTGCATATTTTGAAGGA 240
          |||
Sbjct 213 AAAATCAGACTTTTGGAGAGGCCAAGTAAATTAGGTCTTGGCACTGCATATTTTGAAGGA 272

Query 241 TTCAAATTGACCAAGGGGAAATTCATCATTTGTTATGGACCCGACTTATCACATCACCT 300
          |||
Sbjct 273 TTCAAATTGACCAAGGGGAAATTCATCATTTGTTATGGACCCGACTTATCACATCACCT 332

Query 301 AAATACATTCTAGATATGATCAGAAAACAGAAGGATACTGATGCAGATGTTGTTAGTTGC 360
          |||
Sbjct 333 AAATACATTCTAGATATGATCAGAAAACAGAAGGATACTGATGCAGATGTTGTTAGTTGC 392

Query 361 ACCAGATATTCGCGAGGAGGTGGCGTATCCGGTTGGTCTTTAACTCGAATGGTAATATCC 420
          |||
Sbjct 393 ACCAGATATTCGCGAGGAGGTGGCGTATCCGGTTGGTCTTTAACTCGAATGGTAATATCC 452

Query 421 CGTATGGCCAATTTGCTAATCAAATTTATATTTTGGCCGAAATTAACAGATTTAACAGGA 480
          |||
Sbjct 453 CGTATGGCCAATTTGCTAATCAAATTTATATTTTGGCCGAAATTAACAGATTTAACAGGA 512

Query 481 TCTTACAGGTTGTATAAGAGGAATGCATTTGAGAAATTGCTTGGCTCCGTTAAATGCACT 540
          |||
Sbjct 513 TCTTACAGGTTGTATAAGAGGAATGCATTTGAGAAATTGCTTGGCTCCGTTAAATGCACT 572

Query 541 GGCTTTGGATTTCAAATGGAAGCGGCTGTATTATCTGAAAAGAAATTCAGTTTAACTG 600
          |||
Sbjct 573 GGCTTTGGATTTCAAATGGAAGCGGCTGTATTATCTGAAAAGAAATTCAGTTTAACTG 632

Query 601 GAACAAGTGCCAATTTGTTTTATTGAGAGGATTTACGGTAATTCAAAATTGAGTCCAGGT 660
          |||
Sbjct 633 GAACAAGTGCCAATTTGTTTTATTGAGAGGATTTACGGTAATTCAAAATTGAGTCCAGGT 692

Query 661 GAAATTTACAAATTTTACGGACAATTGCTAAAATTGTATGTTCAATATGA 711
          |||
Sbjct 693 GAAATTTACAAATTTTACGGACAATTGCTAAAATTGTATGTTCAATATGA 743

```

8.2 Sequenzierung des rekombinanten Konstrukts p426 MET 25-BM-*dpm1* aus YPH 499 transgenen Hefezellen

NCBI Blast, 06.10.2014

Query: BM DPM1 WT

Subject: p426 MET 25-BM-*dpm1* in YPH 499 Hefezellen, Klon 2 vom 22.09.2014

```

Query 1   ATGTATAGTGTAATTCTGCCTACGGTTAACGAAGCCGAAAAACATTCCATACGTAATTGAA 60
          |||
Sbjct 41   ATGTATAGTGTAATTCTGCCTACGGTTAACGAAGCCGAAAAACATTCCATACGTAATTGAA 100

Query 61   TTAATTGTACAAACATTTAAACAATATGATTATGAATTCGAGATAATTGTGGTAGATGAT 120
          |||
Sbjct 101  TTAATTGTACAAACATTTAAACAATATGATTATGAATTCGAGATAATTGTGGTAGATGAT 160

Query 121  GCTAGCACCGATGGTACCAGCGATACAGTTTGCAATATTCAAAAATTATGCCAGATTAT 180
          |||
Sbjct 161  GCTAGCACCGATGGTACCAGCGATACAGTTTGCAATATTCAAAAATTATGCCAGATTAT 220

Query 181  AAAATCAGACTTTTGGAGAGGCCAAGTAAATTAGGTCTTGGCACTGCATATTTGAAGGA 240
          |||
Sbjct 221  AAAATCAGACTTTTGGAGAGGCCAAGTAAATTAGGTCTTGGCACTGCATATTTGAAGGA 280

Query 241  TTCAAATTGACCAAGGGGAAATTCATCATTGTTATGGACGCCGACTTATCACATCACCT 300
          |||
Sbjct 281  TTCAAATTGACCAAGGGGAAATTCATCATTGTTATGGACGCCGACTTATCACATCACCT 340

Query 301  AAATACATTTCTAGATATGATCAGAAAACAGAAGGATACTGATGCAGATGTTGTTAGTTGC 360
          |||
Sbjct 341  AAATACATTTCTAGATATGATCAGAAAACAGAAGGATACTGATGCAGATGTTGTTAGTTGC 400

Query 361  ACCAGATATTTCCGCAGGAGGTGGCGTATCCGGTTGGTCTTTAACTCGAATGGTAATATCC 420
          |||
Sbjct 401  ACCAGATATTTCCGCAGGAGGTGGCGTATCCGGTTGGTCTTTAACTCGAATGGTAATATCC 460

Query 421  CGTATGGCCAATTTGCTAATCAAATTTATATTTTGGCCGAAATTAACAGATTTAACAGGA 480
          |||
Sbjct 461  CGTATGGCCAATTTGCTAATCAAATTTATATTTTGGCCGAAATTAACAGATTTAACAGGA 520

Query 481  TCTTACAGGTTGTATAAGAGGAATGCATTTGAGAAATTGCTTGGCTCCGTTAAATGCACT 540
          |||
Sbjct 521  TCTTACAGGTTGTATAAGAGGAATGCATTCGAGAAATTGCTTGGCTCCGTTAAATGCACT 580

Query 541  GGCTTTGGATTTCAAATGGAAGCGGCTGTATTATCTGAAAAGAAATTCAGTTTAACTG 600
          |||
Sbjct 581  GGCTTTGGATTTCAAATGGAAGCGGCTGTATTATCTGAAAAGAAATTCAGTTTAACTG 640

Query 601  GAACAAGTGCCAATTTGTTTTTATTGAGAGGATTTACGGTAATTCAAAATTGAGTCCAGGT 660
          |||
Sbjct 641  GAACAAGTGCCAATCGTTTTTATTGAGAGGATTTACGGTAATTCAAAATTGAGTCCAGGT 700

Query 661  GAAATTTACAAATTTTTACGGACAATTGCTAAAATTGTATGTTCAATATGA 711
          |||
Sbjct 701  GAAATTTACAAATTTTTACGGACAATTGCTAAAATTGTATGTTCAATATGA 751

```

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>B. bigemini</i>	<i>Babesia bigemini</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>B. divergens</i>	<i>Babesia divergens</i>
<i>B. microti</i>	<i>Babesia microti</i>
bp	Basenpaare
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliensis</i>	<i>Candida dubliensis</i>
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxy-Terminus
CPR	«Chromosomal Promoter Replacement»
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Ct	«Cycle Treshold»
DPM1	Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
g	Gramm
<i>G. lamblia</i>	<i>Giardia lamblia</i>
G-force (g)	Gravitationskraft

GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HCl	Hydrogenchlorid
IFT	Indirekter Immunfluoreszenz-Test
Ig	Immunglobulin
IHA	Indirekter Hämagglutinations-Assay
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Meter
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	«messenger RNA»
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₂	Aminoternale-Domäne
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p.m.</i>	<i>post mortem</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>

<i>P. chabaudi</i>	<i>Plasmodium chabaudi</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. yoelii yoelii</i>	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	«Real-Time»-Quantitative-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Selektives Dextran
SGR	Selektive Galaktose-Raffinose
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
<i>Sz. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. brucei brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TE	TRIS und EDTA
TMD	Transmembrandomäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YNB	«Yeast Nitrogen Base»
YPH	«Yeast Protocols Handbook»
µl	Mikroliter

10 Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit fanden Eingang in das untenstehende Manuskript:

Philipp Stahl, Yves Poinsignon, Pascal Pouedras, Vasilica Ciubotaru, Brinda Emu, Peter J Krause, Choukri Ben Mamoun Title and Emmanuel Cornillot : „Case report and clinical source of the Babesia microti R1 reference strain.“ *Submitted* September 2016

11 Lebenslauf

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online- Veröffentlichung.

12 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer im Studiengang Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg waren folgende Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aigner, Bartsch, Basler, Bals, Bauer S., Bauer U., Baumann, Becker, Bette, Brehm, Bien, Burchert, Cetin, Cherkasov, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Eberhardt, Eickmann, Donner-Banzhoff, Fendrich, Feuser, Fritz, Garten, Geks, Glorius, Görg, Greulich, Grundmann, Grzeschik, Gress, Grimm, Hasilik, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Hundt, Kann, Kircher, Klose, Koolmann, Koczulla, Leonhardt, Lill, Loeffler, Lohoff, Maisch, Maisner, Mandrek, Meyer, Moll, Moosdorf, Mutters, Neumüller, Nimphius, Olbert, Oliver, Oertel, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Röper, Ruchholtz, Sekundo, Schäfer, Schwarz, Steinfeldt, Steiniger, Stiewe, Suske, Tackenberg, Timmesfeld, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann, Wiegand, Wrocklage, Wulff, Zwiorek

13 Danksagung

Großer Dank geht an Prof. Dr. Ralph T. Schwarz für die Betreuung, Hilfestellung und Beratung bei dieser Dissertationsarbeit. Besonders bedanke ich mich für die Möglichkeiten des deutsch-französischen Wissenschaftsaustauschs, die ich durch ihn im Rahmen dieser medizinischen Dissertation in der AG Parasitologie wahrnehmen konnte sowie für das große Vertrauen in meine Fähigkeiten, meine Eigenständigkeit und mein Durchhaltevermögen. Seine Erfahrung und Professionalität sowie sein hohes Maß an Verantwortung, Loyalität und Menschlichkeit zeichnen ihn als Betreuer sehr aus.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Emmanuel Cornillot, der mich im Rahmen einer sehr fruchtbaren Kooperation bei dieser Arbeit betreut, beraten und motiviert hat. Der Gedankenaustausch sowie die hervorragende Kooperation machten es so viel einfacher an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Ich danke ihm für die vielen Hilfestellungen und die Erweiterung meines Wissens zur Bioinformatik und weiteren molekularbiologischen Techniken.

Mein außerordentlicher Dank geht an Virginie Bres, Kamel Hadj, Brice Murciano aus der AG Cornillot, die mit ihrer freundschaftlichen und hilfsbereiten Art auf französischer Seite diesem Projekt stets Vortrieb gewährten. Ein besonderer Dank gilt meinem Freund und Kollegen Akira Hattesoht für die sorgfältige Lektüre dieser Arbeit und seine wertvollen Hinweise, die zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Hosam Shams-Eldin und Jörg Schmidt verdienen einen außerordentlichen Dank für die Beratung, Hilfestellung und Motivation, die für das Gelingen dieses Promotionsprojekts erheblich beitrugen.

Großer Dank gebührt meinen Eltern André und Iris Stahl für all das, was ich ohne sie nicht geschafft hätte.

Es besteht für mich kein Zweifel daran, dass mein Promotionsvorhaben nicht ohne die Unterstützung eines liebenswerten und zugleich starken Lebenspartners an meiner Seite erfolgreich zustande gekommen wäre. Ich möchte Josephine Ritter, meiner Partnerin und Mutter unserer Kinder Frieda und Karl für die letzten zweieinhalb Jahre, in denen ich an diesem Vorhaben gearbeitet habe danken, die ich nicht ohne ihren Glauben an mich und meine Fähigkeiten erfolgreich zu Ende gebracht hätte.

14 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Charakterisierung der Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase 1, ein Enzym der Biosynthese von Glykosylphosphatidylinositolen im Einzeller *Babesia microti* im Institut für Virologie unter Leitung meines Betreuers und Leiters der AG Parasitologie Herrn Prof. Dr. Ralph T. Schwarz mit Unterstützung durch Prof. Dr. E. Cornillot, Universität Montpellier, Frankreich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan «Lancet Infectious Diseases» zur Veröffentlichung eingereicht.

Marburg, den 27. Juli 2016

Philipp Stahl

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen und die Angebote der Philipps-Universität zur Plagiatserkennung (Plagiatsoftware zu beziehen über das Hochschulrechenzentrum) sind mir bekannt.

Marburg, den 27. Juli 2016

Prof. Dr. R. T. Schwarz