Veränderung der Spectrinkonzentration in von *Eimeria bovis* infizierten Endothelzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Michael Stowasser

aus Gießen

Gießen 2012

Aus dem Institut für Biochemie

unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. E. Beck

des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

und dem Institut für Parasitologie

unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. H. Zahner

des Fachbereiches Tiermedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Herr Professor Dr. E. Beck

Gutachter: Herr Professor Dr. J. Ziebuhr

Tag der Disputation: 23.11.2012

Meiner Familie

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

1 Einleitung 1

2 Zielsetzung der Arbeit 3

3 Literaturübersicht 4

3.1 Apicomplexa 4

3.1.1 Beispiele humanpathogener Apicomplexa 4

3.1.2 Eimeria bovis 6

3.1.3 Lebenszyklus 7

3.1.4 Aufbau von Apicomplexa und Funktionen des Apikalkomplexes 8

3.2 Endothelzellen als Wirtszellen 12

3.3 Spectrin 15

3.3.1 Grundlagen 15

3.3.2 Funktionen von Spectrin 18

3.3.2.1 Erythrozytäres Spectrin 18

3.3.2.2 Beteiligung von Spectrin an Zell-Zell-Verbindungen 19

3.3.2.3 Beteiligung von Spectrin an spezialisierten Membrandomänen und Geweben 20

3.3.2.4 Beteiligung von Spectrin an Sekretion und Exkretion 22

3.3.2.5 Spectrin und weitere Blutzellen 23

3.3.2.6 Modulation von Spectrin in apikomplexen Parasiten 23

4 Material 24

4.1 Verwendete Materialien und Chemikalien 24

4.1.1 Geräte 24

4.1.2 Plastik und Glaswaren 24

4.2 Zellkultur 25

4.2.1 Zusammensetzung des Kulturmediums 25

4.3 Zellgewinnung 26
4.4 Parasiten 26
4.4.1 Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten 26
4.4.2 Exzystierung von *E. bovis*-Sporozoiten 26
4.5 Fluoreszenzfärbung 27
4.5.1 Herstellung von Mountingmedium II 27
4.5.2 Der Spectrinantikörper 27

5 Methodik 28

5.1 Zellkultur 28
5.1.1 Zellgewinnung 28
5.1.2 Haltung 29
5.1.3 Subkultivierung der BUVEC 29
5.1.4 Einfrieren von Zellen und Parasiten 29
5.1.5 Auftauen von BUVEC und *E. bovis*-Sporozoiten 30
5.2 Parasiten 30
5.2.1 Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten 30
5.2.2 Exzystierung von *E. bovis*-Sporozoiten 31
5.2.3 Infektion der Wirtszellen (BUVEC) 32
5.3 Immunfärbung der infizierten BUVEC-Zellen 32
5.4 Daten der Konfokalmikroskopie 33
5.4.1 Aquisition und Bildbearbeitung 33
5.4.2 Messung der Fluoreszenzintensität 33
5.4.3 Statistik 36
5.4.4 Auswertung der Fluoreszenzbilder der Konfokalmikroskopie 36

6 Ergebnisse 38

6.1 In-vitro-Kultur der Zellen 38

6.2 Spectrin 38

6.2.1 Konfokal-mikroskopische Ergebnisse 38

6.2.1.1 Tag 3 p. i. 38

6.2.1.2 Tag 8 p. i. 41

6.2.1.3 Tag 15 p. i. 42

6.2.1.4 Tag 20 p. i. 44

6.2.2 Messung der Spectrinkonzentration 45

7 Diskussion 48

8 Zusammenfassung 53

9 Summary 55

10 Literatur 57

Abbildung 1: Lebenszyklus von *Eimeria bovis* (Johnstone 2000).....8

Abbildung 2: Zellulärer Aufbau von *E. bovis* Sporozoiten und Merozoiten. A: Organellen des Apikalkomplexes (Roberts und Hammond 1970) 9

Abbildung 3: Invasion von apikomplexen Parasiten und Bildung der Parasitophoren Vakuole (aus: Morrissette und Sibley 2002) 10

Abbildung 4: Beispiele für Konfokalaufnahmen in den verschiedenen Infektionsstadien. Die rot dargestellten Zellanteile entsprechen Spectrin, die DNA ist grün dargestellt.....37

Abbildung 5: Darstellung der Spectrinfärbung (rot) und der DNA-Färbung (grün) von mit E. bovis infizierten BUVEC am 3. Tag p. i.. 40

Abbildung 6: Infizierte BUVEC am 8.Tag p. i.. 42

Abbildung 7: Infizierte BUVEC am 15.Tag p. i. 43

Abbildung 8: Mit *E. bovis* inizierte BUVEC am 20. Tag p. i. 45

Abbildung 9: Spectrinkonzentration im Verlauf der ersten Schizogonie von *E. bovis*...47

Tabelle 1: Taxonomische Stellung von *E. bovis* 6

Tabelle 2: Tabellarischer Überblick von Spectrinisoformen und deren Vorkommen beim Menschen 16

Tabelle 3: Spectrin-Gene, Untereinheiten und Heterotetramere (Bennett und Baines 2001) 17

Tabelle 4: Beispiel für eine ausgewertete Tabelle.....35

BUVEC	bovine umbilical vein cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECGM	Endothelial cell growth medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule
ER	endoplasmatisches Retikulum
EVL	ENA/VASP like
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s²)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCL	Salzsäure
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IMC	innerer Membrankomplex
KAHRP	Knob-associated histidine-rich protein
LPS	Lipopolysaccharid
MDBK	Madin-Darby bovine kidney cells
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells
MOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphospatase
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickoxid
p. i.	post infectionem

PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PSA	Puck's saline A-Puffer
PV	parasitophore Vakuole
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RSV	respiratory syncytial virus
Tes	Testin
TNF	Tumor necrosis factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

C.	*Cryptosporidium*
D.	*Drosophila*
E.	*Eimeria*
P.	*Plasmodium*
T.	*Toxoplasma*
X.	*Xenopus*

1 Einleitung

Kokzidiosen sind durch intrazellulär parasitierende Protozoen verursachte Erkrankungen. Sie werden durch Erreger der Gattungen *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Besnoitia* und *Hammondia* (Eckert et al. 1992; Eckert 1998) ausgelöst. Die wichtigste und artenreichste Gruppe ist hierbei die Gattung *Eimeria*. Vertreter der Gattung *Eimeria* parasitieren im Verdauungstrakt, aber auch in anderen Organen und Organsystemen von Vertretern aller Vertebratenklassen und werden fäkal-oral übertragen. Durch Infektionen mit Parasiten der Gattung *Eimeria* entstehen große wirtschaftliche Schäden in Zucht und Haltung. So werden zum Beispiel durch rinderpathogene *Eimeria* weltweit Schäden in Höhe von mehreren 100 Millionen US Dollar (Fitzgerald 1980) verursacht. Die wichtigsten rinderpathogenen Arten sind *Eimeria bovis* und *Eimeria zuenii*. Vorwiegend bei Kälbern und Jungtieren führen Infektionen mit *Eimeria* zu fieberhaften, katarrhalischen oder hämorrhagischen Enteritiden (Bürger 1983), die in schweren, seltenen Fällen zum Tode führen können. Der wirtschaftliche Schaden entsteht jedoch in erster Linie durch weniger auffällige Faktoren wie schlechte Futterverwertung, mangelnde Gewichtszunahme oder Gewichtsverlust und verminderte Milchproduktion. Kokzidieninfektionen treten auch beim Menschen auf. Es handelt sich Infektionen mit Vertretern der Gattungen *Toxoplasma, Cyclospora, Sarcocystis, Cryptosporidium* und *Isospora.* Insbesondere Infektionen mit *Toxoplasma gondii* und *Cryptosporidium* spp. führen bei immundefizienten Patienten zu ernsthaften Krankheitsbildern mit teils letalem Ausgang (Eckert 1998).

Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren in den Dünndarmzotten sind die spezifischen Wirtszellen des Parasiten in vivo. Die infektiösen Stadien, die Sporozoiten, dringen in die Wirtszelle ein und bilden in einem ersten Entwicklungsschritt die Schizonten I aus. Dabei kommt es zu einer massiven Vermehrung des Erregers mit ausgeprägter Volumenzunahme der Wirtszelle. Bis zum Ende der Vermehrung nach etwa 2,5 Wochen werden 10^5 und mehr sogenannte Merozoiten I gebildet, die unter Zerstörung der Wirtszelle freigesetzt werden. In der vorliegenden In-vitro-Studie wurden bovine Endothelzellen aus der Umbilicalvene als Modell-Wirtszellen verwendet.

Nach der Invasion der *E. bovis*-Sporozoiten in die Endothelzellen der Lymphkapillaren des Ileum entwickeln sich in ca. 14 bis 20 Tagen innerhalb einer parasitophoren Vakuole Schizonten mit bis zu 170.000 Merozoiten. Die Schizonten erreichen eine Größe von ca. 400 µm (Grafner und Graubmann 1979). Hierdurch entsteht für die Wirtszelle eine hohe mechanische Belastung. Wodurch diese Belastung für die Wirtszelle tolerabel wird, ist bisher nicht geklärt.

Aus Untersuchungen von Erythrozyten ist bekannt, dass das Spectrinzytoskelett für die hohe Stabilität und Flexibilität verantwortlich ist, welche bei der Passage durch das Kapillarsystem erforderlich ist (Bennett 1990; Grum et al. 1999). Dieser Effekt könnte auch bei *E. bovis* und der Endothelzelle als Wirtszelle eine Rolle spielen. Es stellte sich die Frage, ob der Parasit das Spectrinskelett der Wirtszelle beeinflusst, welche Veränderungen dabei möglicherweise stattfinden und wie sich das Spectrinskelett im Verlauf der Infektion verhält.

Mittels Laser-Konfokal-Mikroskopie konnte eine deutliche Steigerung des intrazellulären Spectrins nachgewiesen und erstmals ein zumindest α/β-Spectrin-ähnliches Molekül von *E. bovis* gefunden werden. Darüber hinaus konnten Veränderungen des Spectrinskeletts während der Infektion beschrieben werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Am Institut für Parasitologie in Giessen wird schon einige Zeit an von *Eimeria bovis* infizierten Endothelzellen gearbeitet. Im Verlauf der Studien stellte sich die Frage, ob und in welcher Weise der Parasit während der Infektion das Zytoskelett der Wirtszellen beeinflusst. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Veränderung des Spectrinzytoskeletts in einer mit *E. bovis* infizierten Endothelzelle (BUVEC).

Hierzu sollen mithilfe der Konfokalmikroskopie und eines spezifischen Antikörpers gegen Spectrin das Spectrinzytoskelett der Wirtszelle dargestellt und quantitative Veränderungen der Spectrinkonzentration innerhalb der Wirtszelle ermittelt werden.

3 Literaturübersicht

3.1 Apicomplexa

Der nach dem Zoologen Theodor Eimer (1843-1898) benannte Parasit *Eimeria bovis* ist ein obligat rinderpathogener (Kogut 1990), intrazellulärer Erreger aus dem Unterstamm der Apicomplexa (Klasse: Coccidea, Ordnung: Eimeriida, Unterordnung: Eimeriina). Zu diesem Unterstamm gehören auch die humanpathogenen Parasiten der Familien *Plasmodium, Toxoplasma, Cyclospora, Cryptosporidium* und andere.

3.1.1 Beispiele humanpathogener Apicomplexa

Humanpathogene Apicomplexa können eine Vielzahl von Krankheiten erzeugen und sind weltweit verbreitet.

Eine sehr wichtige, durch ein Mitglied des Unterstamms Apicomplexa hervorgerufene Erkrankung ist die Malaria. Sie entwickelt sich nach einer Infektion mit Erregern der Gattung *Plasmodium* (Unterordnung *Haemosporina*). Es gibt 4 Arten von Plasmodien, die unterschiedliche Morphologien während der Entwicklung aufweisen und hierdurch sowie durch den unterschiedlichen und spezifischen Krankheitsverlauf differenziert werden können. Bei allen Erregern der Gattung *Plasmodium* kommt es zu einem obligaten Wirtswechsel sowie zu einer sexuellen und asexuellen Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet im Darmtrakt der Stechmückenspezies *Anopheles* statt. Infektiös ist der Stich einer Mücke, wenn sich Sporozoiten in der Speicheldrüse der Mücke befinden und mit dem Speichel in die Blutbahn oder die Lymphbahn des Menschen gelangen. Im Menschen findet dann die asexuelle Vermehrung zunächst in den Hepatozyten der Leber statt. Diese Schizogenie dauert zwischen 6 (*P. falciparum*) und 15 Tagen (*P. malariae*) und führt zur Bildung von 2000 (*P. malariae*) bis 30000 (*P. falciparum*) Merozoiten pro Schizont. Die freigesetzten Merozoiten befallen die Erythrozyten des Wirtes, in denen sich wiederholende Schizogenien stattfinden. Diese dauern nach einer kurzen Initialphase regelmäßig 48 Stunden bei *P. vivax*, *P. ovale* und *P. falciparum* und 72 Stunden bei *P. malariae*. Die hierbei entstehenden Schizonten sind wesentlich kleiner als die ersten und enthalten 6 bis 36 Merozoiten. Beim Platzen der roten Blutkörperchen kommt es zu den typischen, regelmäßigen Fieberschüben. Nach mehreren erythrozytären Schizogenien entwickeln sich einige *Plasmodien* zu den Geschlechtsformen (Mikro- und Makrogamonten) weiter. Die Mediatoren dieser

Weiterentwicklung sind noch nicht abschließend geklärt. Die Mikro- und Makrogamonten werden durch einen erneuten Stich wieder von der Mücke aufgenommen (Eckert 1998).

2004 lebten ca. 3,2 Milliarden Menschen in 107 Staaten und Regionen mit dem Risiko an Malaria zu erkranken. Klinisch fanden sich zwischen 350 und 500 Millionen Erkrankungsfälle, welche vorwiegend durch *P. falciparum* und *P. vivax* verursacht wurden. An der durch *P. falciparum* verursachten Malaria tropica versterben pro Jahr annähernd 2 Millionen Menschen, wobei 2/3 der registrierten Fälle in Afrika auftreten (WHO 2005).

Die zoonotischen Erreger der Gattung *Toxoplasma* führen zur höchsten Durchseuchungsrate mit Apicomplexa in der Bevölkerung, regional und altersabhängig von bis zu über 80% (Eckert 1998). Die von *T. gondii* ausgelöste Toxoplasmose ist auch in den industrialisierten Staaten Mitteleuropas die häufigste Zoonose. Die Seroprävalenz beträgt beispielsweise in der Schweiz bis zu 52%. Die Toxoplasmose verläuft beim Immunkompetenten häufig asymptomatisch und ist dann lediglich an spezifischen Antikörpern im Serum erkennbar. Die Primärinfektion beim Immunsupprimierten verläuft hingegen nicht selten letal oder ist durch Augenschäden, lokale Nekrosen, Meningoenzephalitis, interstitielle Pneumonie, makulopapulöses Exanthem und andere Krankheitszeichen gekennzeichnet. Eine Besonderheit ist die pränatal erworbene Toxoplasmose. Diese spezielle Infektion tritt nur bei Kindern/Föten auf, deren Mütter sich während der Schwangerschaft erstmalig mit *T. gondii* infizieren. Bei einer pränatalen Infektion kommt es in 10% der Fälle zu gravierenden klinischen Verläufen, davon 85% mit Hirnschädigung und 15% mit perinatalem Tod. Auch bei den übrigen 90% besteht ein erhöhtes Risiko für eine Hirn- und Augenschädigung.

Die weiteren humanpathogen Apicomplexa spielen eine untergeordnete Rolle. Am wichtigsten sind hier die Erreger der Gattung *Cryptosporidium*. Sie rufen die Cryptosporidiose hervor, gleichfalls eine Zoonose. Bei Immunkompetenten beträgt die Prävalenz in Europa etwa 2-4%, bei HIV-Infizierten bis zu 20% (Eckert 1998). Ein großes Erregerreservoir findet sich unter den Haustieren. Hier weisen Kälber die höchste Durchseuchung von über 20% bis zu 100% auf. Die Cryptosporidiose ist bei Immunkompetenten eine selbst limitierende Durchfallerkrankung, die folgenlos abheilt. Beim immundefizienten Patienten kommt es zu massiven, choleraartigen und langanhaltenden Durchfällen.

Seltener finden sich Infektionen mit *Cyclospora*, *Sarcocystis* oder *Isospora*, alles ebenfalls Erreger von Durchfallerkrankungen. Vereinzelt wurden auch Infektionen mit *Babesia* beschrieben, Erreger der Babesiose, einer häufig bei Haus- und Wildtieren vorkommenden Zoonose. Sie kann selten durch den Stich von Schildzeckenarten übertragen werden und erzeugt malariaähnliche Symptome.

3.1.2 Eimeria bovis

Vertreter der Gattungen *Cryptosporidium*, *Sarcocystis*, *Cyclospora*, *Isospora* und *Toxoplasma* gehören wie der von uns verwendete Parasit *Eimeria bovis* zu den Eimeriida. Die taxonomische Stellung von *E. bovis* ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Reich	***Protozoa***
Stamm	***Alveolata***
Unterstamm	***Apicomplexa***
Klasse	***Coccidea***
Ordnung	***Eimeriida***
Unterordnung	***Eimeriidae***
Familie	***Eimeria***
Art	***Eimeria bovis***

Tabelle 1: Taxonomische Stellung von *E. bovis*

E. bovis gehört nach Bürger (1983) zu den wichtigsten, europa- und weltweit am häufigsten vorkommenden, Eimerienarten beim Rind. Eine Infektion löst vorwiegend bei Jungtieren eine Kokzidiose (Gründer 2006), eine akute bis chronische, katarrhalische oder hämorrhagische Dickdarmentzündung, aus.

3.1.3 Lebenszyklus

Die Entwicklung von *E. bovis* verläuft nach dem allgemeinen Grundmuster der Gattung *Eimeria* (Long 1978). Als Endprodukt der endogenen Entwicklung werden vom Rind mit dem Fäzes Oozysten ausgeschieden (Abbildung 1). In der Außenwelt entwickeln sich in den Oozysten 4 Sporozysten mit je 2 Sporozoiten. Sie sind das infektiöse, umweltresistente Stadium von *E. bovis* und werden oral über kontaminierte Nahrung oder Wasser aufgenommen. Im Rinderdarm werden die Sporozoiten unter Einfluss von Trypsin und Gallenflüssigkeit freigesetzt (Nyberg und Hammond 1964). Die Sporozoiten invadieren aktiv die Endothelzellen der Lymphkapillaren der Zotten des distalen Dünndarms, wo die erste Schizogonie (asexuelle Reproduktion) stattfindet. *In vitro* ließ sich nachweisen, dass *E. bovis* - Sporozoiten nicht immer in der ersten invadierten Zelle verbleiben, sondern diese auch wieder verlassen und eine neue Wirtszelle aufsuchen können (Behrendt et al. 2004). Es bilden sich im Verlauf von 14 bis 20 Tagen Makroschizonten mit einem Durchmesser von bis zu 430 µm mit bis zu 170.000 Merozoiten von jeweils ca. 12 µm Länge (Grafner und Graubmann 1979). Nach Ablauf der ersten Schizogonie verlassen die Merozoiten den Schizonten und dringen in Epithelzellen des Coecums und Colons ein, wo sie innerhalb von zwei Tagen die zweiten Schizonten mit ca. 30 bis 36 Merozoiten bilden (Hammond et al. 1963). Diese 2. Merozoitengeneration infiltriert Epithelzellen und differenziert sich zu weiblichen (Makrogamont) oder zu männlichen Geschlechtszellen (Mikrogamont) aus. Der Makrogamont durchläuft zunächst keine weiteren Zellteilungen sondern lediglich einen Reifeprozess. Der Mikrogamont durchläuft weitere Zellteilungen, sodass im reifen Mikrogamonten zahlreiche begeißelte Mikrogameten vorliegen. Nach der Reife der Mikrogamonten verlassen die Mikrogameten die Wirtszelle und dringen in Zellen ein, welche einen reifen Makrogamonten enthalten. Nach der Befruchtung durch die Mikrogameten wird eine Zygote gebildet, die durch Ummantelung mit Zytoplasmaanteilen des Makrogamonten zur Oozyste umgeformt wird, welche dann unter Zerstörung der Wirtszelle in das Darmlumen gelangt und mit dem Kot ausgeschieden wird (Hammond et al. 1946; Fernando 1990). Die anschließende Sporulation wird durch Wärme und Feuchtigkeit sowie ausreichend Sauerstoff stimuliert und dauert unter optimalen Bedingungen 2 bis 3 Tage (Ernst und Benz 1986; Graat et al. 1994). Im Wesentlichen bewirken die zahlreichen Makro- und Mikrogamonten und schließlich die Oozysten mit den Wirtszellzerstörungen die

klinischen Symptome. Oozysten (infektiöses Stadium) werden erstmals zwischen dem 18. und 21. Infektionstag im Kot gefunden (Hammond et al. 1963; Daugschies et al. 1986; Rommel 1992).

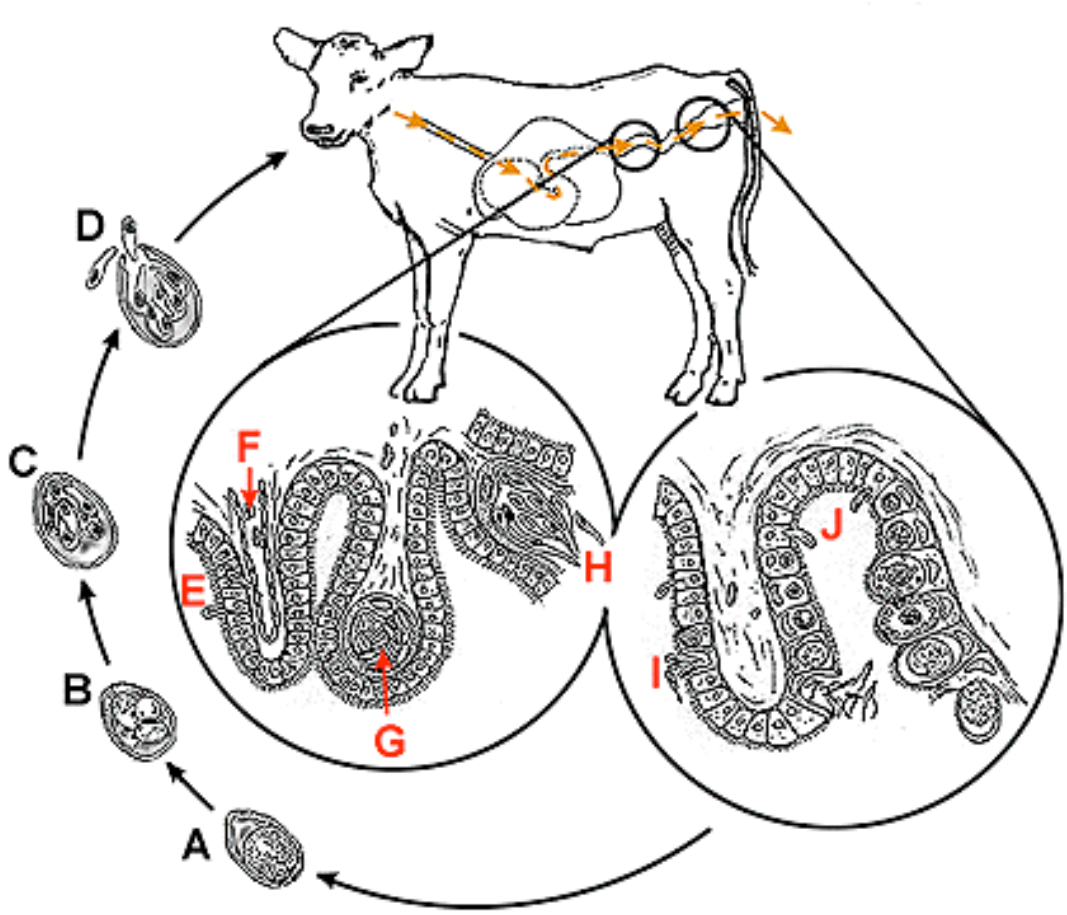

Abbildung 1: Lebenszyklus von *Eimeria bovis* (Johnstone 2000)

A: Oozyste, B/C: sporulierte Oozyste, D: Exzystierung der infektiösen Sporozoiten; E/F: infizierte Endothelzelle in einer Lymphkapillare des Ileum, G: Makroschizont, H: Freisetzung der Merozoiten, I: infizierte Epithelzelle im Coecum und Colon aus denen sich die 2. Merozoitengeneration entwickelt J: Beginn der Gamogonie nach Eindringen der 2. Merozoitengeneration in die Epithelzellen. Ausbildung der männlichen und weiblichen Gamonten und abschließend der Oozysten welche dann wieder ausgeschieden werden.

3.1.4 Aufbau von Apicomplexa und Funktionen des Apikalkomplexes

Eimeria bovis gehört zum Unterstamm der Apicomplexa. Wie alle Eukaryonten besitzen sie einen Zellkern und die üblichen Zellorganellen wie Mitochondrien, Golgi - Apparat, Ribosomen und Endoplasmatisches Retikulum (Roberts und Hammond 1970). Die Besonderheit der Apicomplexa ist ein am apikalen Ende der Zellen gelegener Komplex von Zellorganellen (vgl. Abbildung 2), den nur Sporozoiten und Merozoiten

als motile Stadien besitzen. Er besteht aus Konoid, Polarringkomplex, subpellikulären Mikrotubuli, Mikronemen, Rhoptrien und dichten Granula (Levine 1970; Chobotar und Scholtyseck 1982).

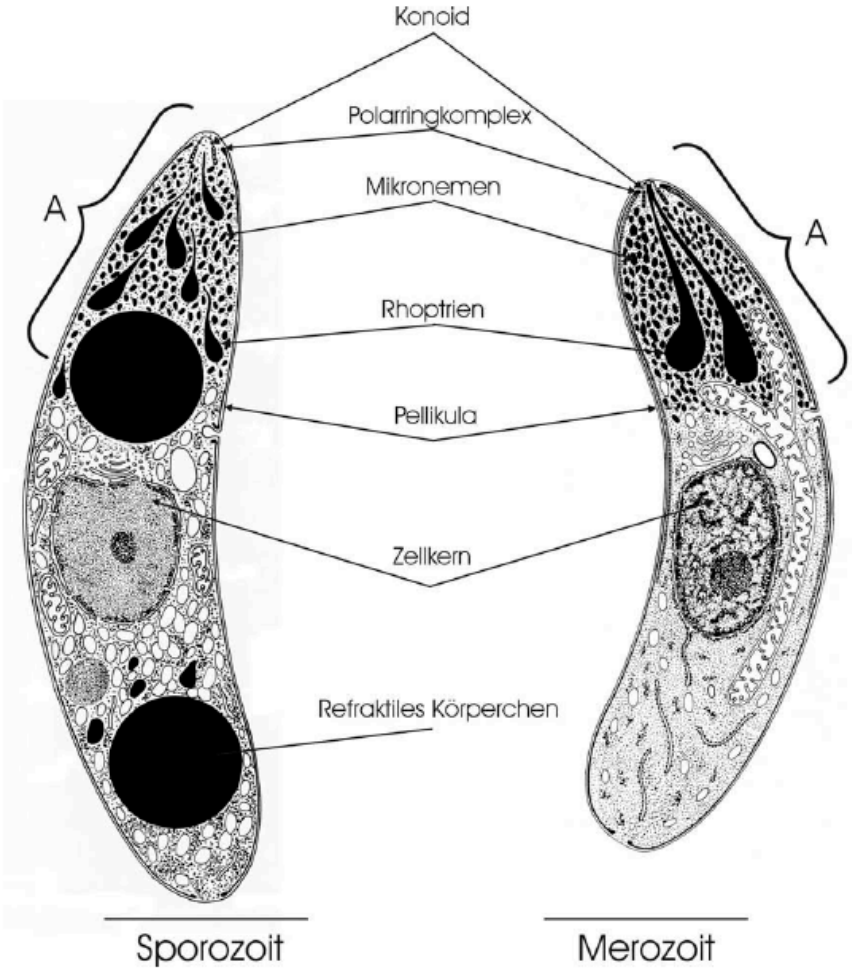

Abbildung 2: Zellulärer Aufbau von *E. bovis* Sporozoiten und Merozoiten. A: Organellen des Apikalkomplexes (Roberts und Hammond 1970)

Apikomplexe Parasiten besitzen keine Flagellen oder Zilien, sie zeichnen sich durch eine besondere Art der Fortbewegung aus, die als gleitende Fortbewegung - *gliding motility* - bezeichnet wird. Hierbei wird die äußere Membran im Verhältnis zum inneren Membrankomplex (s.u.) verschoben. Das Innere des Parasiten muß bei dieser Fortbewegung keine größeren Konformationsänderungen durchmachen. Der Prozess ist energieabhängig und befördert die Zellen zwischen 1 bis 10 μm/s (King 1988). Für diese gleitende Fortbewegung, welche die Invasion ermöglicht, sowie für die

polarisierte Sekretion ist das Zytoskelett verantwortlich (Nichols und Chiappino 1987; Frixione et al. 1996). Die Invasion der Wirtszelle ist ein aktiver Prozess (Ryning und Remington 1978; Dubremetz et al. 1998), der sich von der Endozytose unterscheidet und die gleitende Fortbewegung erfordert.

Bei der Invasion des Parasiten erfolgt zunächst die Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle und die Induktion der parasitophoren Vakuole (PV). Anschliessend schiebt sich der Parasit in die Vakuole. Sekretine, die am apikalen Ende sezerniert werden haften an der äußeren Membran des Parasiten. Sie wandern während der Invasion von apikal nach basal entlang einer wandernden Einschnürung der Parasitenzelle (Abbildung 3).

Abbildung 3: Invasion von apikomplexen Parasiten und Bildung der Parasitophoren Vakuole (aus: Morrissette und Sibley 2002)

Sporozoiten und Merozoiten sind von einer dreischichtigen, als Pellikula bezeichneten Membran umgeben. Diese besteht aus einer äußeren Membran, einem inneren Membrankomplex (IMC), der aus abgeflachten Membranvesikeln besteht, die direkt unter der Plasmamembran des Parasiten liegen (Ogino und Yoneda 1966) und einer dazwischen liegenden, proteinhaltigen Schicht. Diese Schicht scheint für die Beweglichkeit der Zelle sowie für die Invasion in die Wirtszelle mitverantwortlich zu sein (Soldati und Meissner 2004). Nach unterschiedlichen Berichten befindet sich Aktin auf der einen Seite und ein heterotrimerer Myosin A-Komplex auf der anderen Seite des IMC. Es ist noch strittig, welche Proteine innerhalb (Herm-Gotz et al. 2002) und welche außerhalb des IMC liegen (Bergman et al. 2003; Soldati und Meissner 2004). Derzeit wird davon ausgegangen, dass Aktin/Myosin - Motoren innerhalb des Parasiten und Transmembranproteine, die diese Motoren mit einem außerhalb der Zelle liegenden Liganden verbinden, für die gegenläufige Bewegung der Pellikula verantwortlich sind (Morrissette und Sibley 2002).

Beim Invasionsvorgang scheint das Konoid eine mechanische Rolle bei der Penetration der Wirtszelle zu haben (Chobotar und Scholtyseck 1982; Mondragon und Frixione 1996). Es kann abhängig von der Ca^{2+}-Konzentration im Zytoplasma unterschiedliche

Positionen bezüglich des Polarring-Komplexes einnehmen (Roberts und Hammond 1970; Mondragon und Frixione 1996; Monteiro et al. 2001) und auch darüber hinausgestreckt werden. Das Konoid setzt sich aus einer artspezifischen Anzahl spiralig angeordneter, filamentärer Strukturen mit 25-30 nm im Durchmesser zusammen (Chobotar und Scholtyseck 1982) und sieht wie ein abgestumpfter Kegel aus.

Der Polarring-Komplex ist eine ringförmige Verdickung am apikalen Pol des Parasiten. Er wird aus Bestandteilen des IMC sowie subpellikulären Mikrotubuli gebildet (Nichols und Chiappino 1987) und fungiert als Mikrotubuli-Organisierungszentrum (MOC). Die subpellikulären Mikrotubuli erstrecken sich vom Polarring-Komplex bis basal des Zellkerns (Beaudoin und Strome 1973; Chobotar und Scholtyseck 1982; Adams und Todd 1983; Chiappino et al. 1984; Nichols und Chiappino 1987; Bannister und Mitchell 1995) über knapp 2/3 der Länge des Parasiten. Sie verhelfen den Parasiten zu ihrer typischen, langgestreckten Form und zu ihrer apikalen Ausrichtung. Parasiten, deren Mikrotubuli durch medikamentöse Behandlung inaktiviert wurden, waren unbeweglich, unpolar und nicht mehr fähig zur Invasion (Hepler et al. 1966; Stokkermans et al. 1996).

Darüber hinaus besitzen apicomplexe Parasiten noch die apikal lokalisierten, zigarrenförmigen Mikronemen, die keulenförmigen Rhoptrien und die über die ganze Zelle verteilten kugeligen dichten Granula. Jedes dieser Zellorganellen besitzt Proteine, deren Funktion mit der Invasion zusammenhängt und deren Exkretion zeitlich genau abgestimmt ist (Carruthers und Sibley 1997). Eventuell ist eine Ausschüttung von Mikronemenproteinen und Rhoptrienproteinen auch für die Egression des Parasiten aus seiner Wirtszelle erforderlich.

Für die Invasion ist nach einer Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle die Ausrichtung des Parasiten mit dem apikalen Ende zur Wirtszelle nötig. Vermutlich durch Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} - Konzentration in der frühen Phase des Anheftungs- und Invasionsprozesses erfolgt die Ausschüttung des Mikronemeninhalts. Wenn bei der Invasion die Wirtszellplasmamembran eingestülpt wird, entlädt sich der Inhalt der Rhoptrien. Die Entleerung der Rhoptrien endet nach dem vollständigen Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle (Carruthers und Sibley 1997). Nach erfolgter Invasion wird der Inhalt der dichten Granula nach Fusion mit der Plasmamembran des Parasiten ausgeschüttet. Dies geschieht hauptsächlich am apikalen Ende (Leriche und Dubremetz 1990; Lacas-Gervais et al. 2004) des Parasiten. Die durch den beschriebenen Invasionsprozess entstehende parasitophore Vakuole (PV) (Lingelbach und Joiner

1998) besitzt die ungewöhnliche Eigenschaft, nicht mit zytoplasmatischen Vesikeln zu fusionieren. Erstaunlicherweise auch nicht mit jenen, die zeitgleich während des Eindringens des Parasiten in die Wirtszelle aufgenommen wurden (Sibley et al. 1985; Sahr et al. 1993). Dubremetz et al. (1993) beobachteten, dass eine neuentstandene PV glatt und fast vollständig frei von intramembranösen Partikeln ist. Dies deutet darauf hin, dass die für eine vesikuläre Fusion nötigen Protonenpumpen und Oberflächenproteine aus der PV-Membran ausgeschlossen beziehungsweise sehr schnell eliminiert werden.

Die PV ist auch verantwortlich für die sofortige Rekrutierung der Wirtszell-Mitochondrien und des Wirtszell-ER (Porchet-Hennere und Nicolas 1983; Sinai et al. 1997), die eine enge Interaktion mit der Vakuolenmembran eingehen und 4 Stunden nach der Infektion fast 75 % derselben bedecken (Sinai et al. 1997). Es gibt Hinweise, dass *T. gondii* nicht zur *De - novo* - Synthese von Fettsäuren in der Lage ist (Sinai et al. 1997). Somit könnte diese Interaktion eventuell die Möglichkeit eines Lipidtransportes durch das tubulovesikuläre Netzwerk innerhalb der Vakuole hin zum Parasiten bieten.

3.2 Endothelzellen als Wirtszellen

Als Besonderheit vermehrt sich *E. bovis* in der ersten Schizogonie in Endothelzellen. Das Endothel ist eine einschichtige Zellschicht, die als innerste Schicht in allen Gefäßen und nahezu allen Kapillarstromgebieten vorkommt. Zu Beginn, nach seiner Entdeckung 1929, wurde angenommen, dass es sich um eine funktionslose Zellreihe handelt, die lediglich zur Trennung zwischen Lumen und vaskulären Medien dient. Durch anhaltende Studien konnte bewiesen werden, dass die Funktionen des Endothels weit darüber hinausgehen.

Aufgrund der Lokalisation der Endothelzellen kommt ihnen eine wesentliche Rolle in der Gefäßpermeabilität zu. Einerseits, um Zellen an der transendothelialen Passage zu hindern, andererseits, um diese zu ermöglichen. Abhängig vom Organ gibt es unterschiedlichste Dimensionen der Permeabilität, so z.B. die relativ dichte Blut-Hirn-Schranke im Gehirn gegenüber der lockeren Verbindung der Endothelzellen in der Leber, welche das Passieren von Zellen ermöglicht. Eine physiologische Endothelfunktion ist somit eine Voraussetzung einer normalen Organfunktion. Durch Ausschüttung verschiedener Substanzen wie z.B. TNFα oder NO kann z.B. in der

Sepsis die Permeabilität von Blutgefäßen beeinflusst werden (Tsao et al. 2001; Hollenberg et al. 2007). Verantwortlich für Permeabilitätsänderungen sind die „tight junctions“ (Bundgaard 1984), deren Moleküle, die Cadherine, die eigentliche Barrierefunktion übernehmen.

Intaktes Endothel hat eine antithrombotische und antikoagulatorische Wirkung, während die Situation z.B. bei der Entstehung der Atherosklerose verändert ist. Die Endothelzellen in geschädigtem Endothel exprimieren an der Oberfläche Adhäsionsmoleküle, die das Adhärieren von Zellen erleichtern. Zahlreiche Studien haben nachgewiesen, dass Moleküle, wie VCAM-1, ICAM, ELAM sowie auch Selektine, für diese Adhäsion verantwortlich sind (Carlos et al. 1990; Smith et al. 1991; Tsao et al. 1997; Niebauer et al. 1999).

Die Endothelzellen stehen naturgemäß unter beträchtlichem Einfluss biomechanischer Faktoren, wie Flussdruck und Wandbewegungsänderungen. Diese Faktoren spielen sowohl für die Ausrichtung der Zellen als auch für deren Wachstum eine große Rolle. Zusätzlich werden auch die vielschichtigen Funktionen der Endothelzellen wesentlich vom Strömungsverhalten des Blutflusses beeinflusst. Einige Studien konnten zeigen, dass Veränderungen des „shear stress“ sowie des zyklischen Kontraktionsablaufes des Gefäßes die Synthese vasoaktiver Substanzen, wie NO, wesentlich beeinflussen können (Wilson et al. 1993; Awolesi et al. 1994; Millonig et al. 2001). Im vaskulären Endothel konnte speziell in Gebieten mit turbulentem Fluss (Astabgänge, Bifurkationen) ein Netzwerk dendritischer Zellen festgestellt werden, welches bei normalen Flussbedingungen nicht existiert (Millonig et al. 2001; Schwarzacher et al. 2001). Diese Gefäßregionen sind prädisponiert für die Bildung von atherosklerotischen Plaques. Da sich eine ähnliche Menge dendritischer Zellen auch bei entzündlichen/atherosklerotischen Veränderungen von Gefäßwänden in anderen Regionen findet, dürften sie an einer lokalen Umstrukturierung der Endothelzellen beteiligt sein.

Darüber hinaus kommt dem Endothel eine wichtige Funktion bei der Immunantwort zu. Hierbei kann zwischen einer lokalen (z.B. bei einer fokalen Entzündung) und einer systemischen (z.B. bei einer Sepsis) Immunreaktion unterschieden werden.
Bei der systemischen wie auch der lokalen Reaktion der Endothelzellen findet eine Aktivierung des Endothels durch proinflammatorische Mediatoren, wie z.B. TNF, IL-1α und β, LPS, NF-κB, statt. Das aktivierte Endothel exprimiert weitere

proinflammatorische Mediatoren, wie Cytokine, Chemokine und verschiedene Adhäsionsmoleküle (Alison et al. 2002; Alon und Feigelson 2002; Benjamim et al. 2002; Mazanet und Hughes 2002; Pober 2002). Hierdurch werden unter anderem die am Endothel vorbeifließenden Immunzellen aktiviert und rekrutiert, sowie eine Migration dieser Zellen in das umgebende, entzündete Gewebe begünstigt. Hingegen konnte für NO durch Benjamim et al. (2002) nachgewiesen werden, dass bei einer letal verlaufenden Sepsis die NO-Synthese zu einer Verminderung der Leukozytenaktivierung und –migration führt und dadurch die Immunantwort vermindert. Die direkte Infektion von Endothelzellen sowohl durch intrazelluläre Parasiten, wie *T. gondii*, *N. caninum* oder *Trypanosoma cruzi,* als auch durch Bakterien und Viren, wie z.B. *Rickettsia rickettsii* oder Respiratory syncytial virus (RSV) (Mukherjee et al. 2004; Arnold und Konig 2005; Rydkina et al. 2006; Taubert et al. 2006b), führt ebenfalls zu einer vermehrten Exprimierung von proinflammatorischen Mediatoren, wie ICAM-1 (CD54), als direkte Reaktion des Endothels auf die Infektion. Bei der Infektion durch *E. bovis* konnten Taubert et al. (2007) nachweisen, dass vor allem am Beginn der Infektion eine vermehrte Immunantwort am infizierten Endothel im Sinne einer vermehrten Transmigration und Adhäsion von PBMC am infizierten Endothel zu beobachten ist. Auch die PMN-Adhäsion ist am durch *E. bovis* infizierten Endothel über den gesamten Verlauf der Infektion bis zum 14. Tag p. i. vermehrt (Taubert und Hermosilla 2008). Die direkte Reaktion des Endothels wird durch vermehrte Bildung von proinflammatorischen Molekülen wie E-Selectin, P-Selectin VCAM1 und ICAM vermittelt. Insgesamt sind die Immunantworten im infizierten Endothel stark vom jeweiligen Parasiten abhängig (Taubert et al. 2006a). Mit *T. gondii* und *N. caninum* infiziertes Endothel weist eine vermehrte Immunantwort auf, hingegen ist die Immunantwort bei von *E. bovis* infiziertem Endothel eher vermindert.

Eine weitere, wichtige immunologische Beteiligung des Endothels findet auch bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen statt (Kapessidou et al. 2006; Martin et al. 2006; Nicholls et al. 2006). Hierbei scheint vor allem die Aktivierung der Immunantwort durch die an den Zelloberflächen exprimierten Mediatoren eine Rolle zu spielen.

3.3 Spectrin

3.3.1 Grundlagen

Spectrin ist als ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts schon längere Zeit bekannt. Zuerst wurde es als ein Hauptbestandteil der Erythrozytenmembran gefunden (Marchesi und Steers 1968; Fairbanks et al. 1971) und nach der auch als „Ghost“ (lat.: specter) bezeichneten, hämoglobinfreien Erythrozytenmembran benannt (Bennett 1990).

Spectrin und verwandte Proteine kommen in den meisten Geweben von Vertebraten und Avertebraten vor (Bennett und Gilligan 1993). Proteine mit ähnlichen Eigenschaften wurden aber auch schon in primitiven Eukaryonten, wie Acanthamoeba und Trypanosomen (Pollard 1984; Alcina et al. 1988), sowie in den Nuclei verschiedener Pflanzen (De Ruijter et al. 2000) nachgewiesen. In der Literatur finden sich viele Bezeichnungen für Spectrinisoformen in unterschiedlichen Zellen. So wird es in nicht erythrozytären Zellen auch als Gewebespectrin, nicht erythrozytäres Spectrin oder auch Fodrin bezeichnet (Levine und Willard 1983; Leto et al. 1988). Eine japanische Forschungsgruppe bezeichnet das in Nervengeweben vorkommende Protein auch als Calspectrin (Iga et al. 1997).

Spectrin ist ein stäbchenförmiges Protein mit einer Länge von 200 bis 260 nm und 3 bis 6 nm im Durchmesser. Es besteht aus zwei Untereinheiten, die laut einer von Winkelmann und Forget (1993) vorgeschlagenen Nomenklatur für humane Spectrine, basierend auf der Nomenklatur von Ma et al. (1993) und Zimmer et al. (1992), in α- und β-Spectrin unterschieden werden. Die beiden Untereinheiten lagern sich zusammen, sodass das endgültige Protein als ein α/β-Spectrin-Heterodimer entsteht. Insbesondere die β-Spectrine sind sehr variabel, wodurch eine Vielfalt von α/β-Spectrin-Heterodimeren resultiert. Meist finden sich zwei verbundene Spectrin-Heterodimere, das Spectrin-Tetramer. Da das Spectrin-Tetramer die am häufigsten vorkommende oligomere Form ist, wird sie auch als funktionelle Einheit betrachtet (Ji et al. 1980). In Tabelle 2 wird ein Überblick über das Vorkommen der verschiedenen Spectrinisoformen in den unterschiedlichen Geweben gegeben.

Bezeichnung (Synonym)	Vorkommen	Literatur
Alpha I-Spectrin ($\alpha I\Sigma^*$) ; ($alpha_{RBC}$) ; ($alpha_R$)	Ausschließlich in Erythrozyten	(Huebner et al. 1985; Winkelmann und Forget 1993)
Alpha II-Spectrin ($\alpha II\Sigma^*$) ; ($alpha_G$)	Ausschließlich in nicht erythrozytären Zellen	(Huebner et al. 1985; Leto et al. 1988; Bennett und Gilligan 1993; Winkelmann und Forget 1993)
Beta I-Spectrin ($\beta I\Sigma^*$) ; ($beta_R$)	Erythrozyten, Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur, Retina	(Winkelmann et al. 1990a; Winkelmann et al. 1990b; Winkelmann und Forget 1993; Chu et al. 1994)
Beta II-Spectrin ($\beta II\Sigma^*$) ; ($beta_G$)	In fast allen Zellen und Geweben	(Hu et al. 1992; Bennett und Gilligan 1993)
Beta III-Spectrin ($\beta III\Sigma^*$)	Konzentriert im Gehirn, aber auch in vielen anderen Organen wie Leber, Niere, Pankreas, Speicheldrüsen etc.	(Stankewich et al. 1998)
Beta IV-Spectrin ($\beta IV\Sigma^*$)	Initialsegmente von Axonen, Ranvier'sche Schnürringe, zentrales und peripheres Nervensystem	(Berghs et al. 2000)
Beta V-Spectrin ($\beta V\Sigma^*$)	Vorwiegend in den äußeren Segmenten von Photorezeptorzellen und Epithelzellen des Magens, aber auch geringe Expression in vielen anderen Geweben	(Stabach und Morrow 2000)

Tabelle 2: Tabellarischer Überblick von Spectrinisoformen und deren Vorkommen beim Menschen

Das Repertoire an verschiedenen Spectrinen umfasst – bezogen auf Avertebraten - bei den genetisch vollständig erfassten *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* eine α-Untereinheit (Dubreuil et al. 1989), eine β-$G_{(eneral)}$-Untereinheit (Byers et al. 1992; Hammarlund et al. 2000; Moorthy et al. 2000) und eine β-$H_{(eavy)}$-Untereinheit (Dubreuil et al. 1990; Thomas et al. 1997; McKeown et al. 1998). Beim Menschen wurden bisher zwei α-Untereinheiten (Wasenius et al. 1989; Sahr et al. 1990), vier β-Untereinheiten (Winkelmann et al. 1990a; Winkelmann et al. 1990b; Hu et al. 1992; Ma et al. 1993; Mishra et al. 1998; Ohara et al. 1998; Stankewich et al. 1998; Berghs et al. 2000) und eine β-H-Untereinheit nachgewiesen (Stabach und Morrow 2000). Es existieren darüber hinaus noch mehrere β-Spectrin-Isoformen, die noch nicht vollständig bis auf Molekülebene charakterisiert sind, wie z.B. das in der muskulären Endplatte identifizierte β_{NM}-Spectrin (Bloch und Morrow 1989) und das mit dem Golgi-Apparat verbundene β_{Golgi}-Spectrin (Beck et al. 1994). Eine Übersicht über die bekannten Spectrinuntereinheiten beim Menschen, bei *Caenorhabditis elegans* und bei *Drosphila melanogaster*, ihr codierendes Gen und die Lage des Gens auf dem Chromosom ist aus Tabelle 3 zu ersehen.

Caenorhabditis elegans		*Drosophila melanogaster*		*Homo sapiens*		
Subunit	Gene	Subunit	Gene	Subunit	Gene	Chromosome
			Spectrin subunits			
α	*spc-1*	α	*I(3)dre3*	α_1	*SPTA1*	1q21
				α_2	*SPTAN1*	9q33-q34
β	*unc-70/bgs-1*	β	*β-Spec*	β_1	*SPTB*	14q23-q24.2
				β-G/β_2	*SPTBN1*	2p21
				β_3	*SPTBN2*	11q13
				β_4	*betaIV*	19q13.13
β-H	*sma-1*	β-H	*karst*	β-H/β_5	*BSPECV*	15
			Spectrin heterotetramers			
		α/β		α_1/β_1;		
				?α_1/β_2;		
				?α_1/β_3;		
α/β				?α_1/β_4;		
				α_2/β_2;		
				α_2/β_3;		
				α_2/β_4		
α/β-H		α/β-H	α_2/β-H			

Tabelle 3: Spectrin-Gene, Untereinheiten und Heterotetramere (Bennett und Baines 2001)

Beim Rind und der Maus konnten Spectrinisoformen im Hirn nachgewiesen werden, die denen des Menschen entsprechen (Riederer et al. 1988) und damit nahelegen, dass sich Spectrine bei Säugetieren sehr ähneln. In weiteren Untersuchungen konnten Spectrinisoformen beim Rind u.a. auch in der Retina (Wong und Molday 1986), in Erythrozyten (Michalak et al. 1993), Spermatozoen (Yagi und Paranko 1995), in Nierenepitelhelzellen (MDBK) und in embryonalen Trachealfibroblasten (Mangeat und Burridge 1984) nachgewiesen werden.

3.3.2 Funktionen von Spectrin

Zunächst wurde für Spectrin lediglich eine stabilisierende Funktion des Zytoskeletts angenommen. In den Erythrozyten-Ghosts findet sich Spectrin membrangebunden und ist ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts. Gemeinsam mit kurzen Aktinfilamenten bilden 5 bis 6 Spectrintetramere zweidimensionale Polygone (Byers und Branton 1985; Shen et al. 1986; Liu et al. 1987). Die Polygone bilden eine netzartige Struktur unter-/innerhalb der Erythrozytenmembran, berühren diese jedoch nicht. Dies erfolgt über spezielle Membranbindungsproteine, die integralen Membranproteine Ankyrin und Protein 4.1 (Bennett und Gilligan 1993). Zu den Funktionen und zur Verteilung von Spectrin in Endothelzellen, wie in dieser Arbeit behandelt, liegen bisher keine Veröffentlichungen vor.

3.3.2.1 Erythrozytäres Spectrin

Durch seinen speziellen Aufbau besitzt Spectrin die Fähigkeit, Energie aufzunehmen und wieder abzugeben. Dies führt neben der reinen stabilisierenden Funktion des Spectrins auch zur Möglichkeit der Verformung und anschliessender Wiederherstellung der ursprünglichen Form. Diese Eigenschaft ermöglicht es den Erythrozyten, die Kapillargebiete zu passieren, ohne dabei zerstört zu werden, obwohl der Gefäßdurchmesser unter dem Durchmesser der Erythrozyten liegt. Das Spectringerüst ist somit beim Erythrozyten für die Formstabilität als auch für eine gewisse rückstellende Flexibilität verantwortlich (Bennett 1990; Grum et al. 1999).

Am Beispiel einiger Krankheiten kann die Wichtigkeit des Spectrinskeletts für die Funktion der normalen Erythrozyten erkannt werden. Dabei kommt es durch Punktmutationen zu einem Aminosäureaustausch an definierten Stellen der

Aminosäuresequenz. Die Folge sind Form- und Stabilitätsveränderungen der Erythrozyten wie Sphärozytose, Elliptozytose und Pyropoikilozytose und eine daraus folgende hämolytische Anämie durch vorzeitige und vermehrte Elimination der Erythrozyten (Becker et al. 1993; Sahr et al. 1993; Parquet et al. 1994; Perrotta et al. 1994).

In den Erythrozyten, einer sehr einfach aufgebauten Zelle ohne Organellen und Kern, findet sich nur je eine Form von α- und β-Spectrin. Im Gegensatz hierzu wurden in anderen Zellen eine Vielzahl von verschiedenen Spectrinisoformen gefunden, sogar unterschiedliche Spectrinisoformen in einer einzelnen Zelle an spezifischen Stellen (Kordeli 2000). Dies untermauert die frühe Vermutung, dass die verschiedenen Spectrinisoformen in nicht-erythrozytären Zellen nicht nur am Zytoskelett und damit der Zellstabilität beteiligt sind, sondern auch an spezialisierten Zellmembrandomänen und somit z.B. an Mechanismen von Sekretion und Zellverbindungen beteiligt sein könnten (Bennett 1990).

3.3.2.2 Beteiligung von Spectrin an Zell-Zell-Verbindungen

Metazoische Organismen können nur durch funktionierende Zell-Zell-Verbindungen überleben. Dies beginnt schon im Zwei-Zell-Stadium und endet bei den Organen und spezialisierten Geweben der Vertebraten. Eine besondere Rolle bei der Bildung der Zell-Zell-Verbindungen spielen nach Takeichi (1990) Membranproteine aus der Familie der Cadherine, welche beim Zell-Zell-Kontakt mit korrespondierenden Proteinen der anderen Zelle reagieren. Beim Zwei-Zell-Stadium der Maus wurde von Damjanov et al. (1986) und Sobel und Goldstein (1988) im Bereich der Cadherine/Zellkontakte Spectrin in erhöhter Konzentration nachgewiesen. Rotter et al. (2005) fanden darüber hinaus bei Fibroblasten von Ratten und Nierenzellen von Affen (COS-7) Spectrin im Bereich von zwei Aktin-bindenden Proteinen (Tes und EVL), die ebenfalls vorwiegend im Bereich von Zell-Zell-Kontakten vorkommen. Ein ähnliches Ergebnis erhielten Nelson und Veshnock (1987b, a) bei *in vitro* kultivierten Nierenepithelzellen (MDCK). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Spectrin eine Rolle beim Zell-Zell-Kontakt spielt.

In Versuchen mit *D. melanogaster* und *C. elegans* wurden weitere Indizien für die stabilisierende Funktion von Spectrin für die Zell-Zell-Kontakte gefunden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die β-G-Untereinheit von *C. elegans* ab dem Zweizellstadium vermehrt im Bereich von Zell-Zell-Kontakten aufzufinden ist

(Moorthy et al. 2000). Im ausgewachsenen *C. elegans* wie auch in Vertebraten ist β-G-Spectrin besonders reichhaltig in Nervenzellen sowie in Muskelzellen im Bereich des Kontakts mit der extrazellulären Matrix vorhanden. β-H-Spectrin von *D. melanogaster* hingegen findet sich vorwiegend in den apikalen Zellabschnitten von Epithelzellen (de Cuevas et al. 1996; Dubreuil et al. 1997; Thomas et al. 1998). Lee et al. (1993) wiesen z. B. nach, dass die Larven einer α-Spectrin-Null-Mutante von *D. melanogaster*, welche die Embryogenese normal abschliessen und zunächst eine normale Zellpolarität aufbauen konnten, im weiteren Verlauf mehr und mehr Zell-Zell-Kontakte verloren. Dies ist als ein Zeichen für die Wichtigkeit von Spectrin bei der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten zu werten. Fehlendes α-Spectrin führt bei *Drosophila*-Mutanten auch zur Unterbrechung des follikulären Monolayer sowie zur Veränderung der Zellform (Deng et al. 1995; Lee et al. 1997). β-Spectrin-Mutationen scheinen für *D. melanogaster* letal zu verlaufen. Dies verhindert eine genauere Bestimmung der Wirkungen der α/β-Spectrine auf die Stabilität der follikulären Membrane (Dubreuil et al. 2000). Bei *D. melanogaster* konnten Pielage et al. (2005) nachweisen, dass der Verlust von präsynaptischem Spectrin zum Verlust und zur Deorganisation von Membranbindungsproteinen an der motorischen Endplatte sowie zur Retraktion von Axonen führt.

3.3.2.3 Beteiligung von Spectrin an spezialisierten Membrandomänen und Geweben

Spectrin könnte an der Bildung und Aufrechterhaltung von spezialisierten Membrandomänen und Geweben beteiligt sein. Im Verlauf der Untersuchungen an Spectrin wurde beschrieben, dass einzelne Spectrinisoformen spezifisch in bestimmten Zellen und Geweben vorkommen. Dabei finden sich in einer Zelle an unterschiedlichen Orten verschiedene β-Spectrinisoformen. Dies legt nahe, dass verschiedene Spectrine unterschiedliche Aufgaben erfüllen und an der Ausbildung lokal spezialisierter Membrandomänen und Gewebe beteiligt sein dürften (Bennett 1990). An der basolateralen Zellmembran von Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK) als auch an intakten Tubuluszellen (Morrow et al. 1989) lassen sich Detergentien-stabile Proteinkomplexe aus Spectrin, Ankyrin und der Na-K-ATPase nachweisen (Nelson und Hammerton 1989; Nelson et al. 1990). Bei in Flüssigkultur gezüchteten MDCK fehlt diese asymmetrische Verteilung des Spectrins, passend zu den fehlenden Zellkontakten

(Nelson und Veshnock 1987b; Morrow et al. 1989). Woroniecki et al. (2003) untersuchten postischaemische MDCK-Zellen und fanden eine Dissoziation von Spectrin und Ankyrin an der Na-K-ATPase. Dies könnte zu einer Depolarisierung der Na-K-ATPase führen, was mitunter ein Teil einer pathophysiologischen Erklärung eines postischaemischen renalen Nierenversagens sein könnte.

Die Lokalisation von β-H-Spectrin in *D. melanogaster* sowie der Phenotyp von β-H-Spectrin-Mutanten weisen darauf hin, dass β-H-Spectrin bei der Bildung von Epithelien essentiell ist. β-H-Spectrin wird in den meisten Epithelien gefunden und findet sich dort im Bereich der Zonula adherens und am Bürstensaum (Thomas und Kiehart 1994; Lee et al. 1997; Thomas et al. 1998; Zarnescu und Thomas 1999). Bei β-H-Mutanten von *D. melanogaster* finden sich Defekte bei der Entwicklung der Augen und an der Trachea (Thomas et al. 1998).

Wu et al. (2001) fanden Hinweise, dass Spectrin über die Bindung zu Protein 4.1 den Calciumfluss/-transport an der Zellmembran beeinflusst. Die chemisch durch Thapsigargin hervorgerufene Ca^{2+}-Antwort ist bei Zellen, in denen die Spectrin-Protein 4.1 Verbindung unterbrochen ist, deutlich erhöht. Dabei wird die Antwort von Nucleotid-gesteuerten Ca^{2+}-Kanälen nicht beeinflusst.

In Herzmuskelzellen (wie auch in anderen Muskelzellen) wird Spectrin eine stabilisierende Funktion zugeschrieben. Diese müssen ähnlich wie in Erythrozyten hohe Scherkräfte während der Kontraktion sowie auch eine gute Rückstellkraft beinhalten (Baines und Pinder 2005). Darüber hinaus scheint Spectrin gemeinsam mit Ankyrin laut Bennett et al. (2004) auch die Membrankomponenten gegenüber den kontraktilen Zellkomponenten zu organisieren und stabilisieren. Die Gruppe fand α-II-Spectrin sowohl im Bereich der Plasmamembran als auch innerhalb der kontraktilen Fasern im Bereich der Z-Disc.

Eine wichtige Rolle scheint Spectrin auch bei der Stabilisierung von Nervenzellen zu spielen. Mehrere Arbeitsgruppen fanden Spectrin vermehrt im Bereich von Ranvier-Schnürringen und den sogenannten Axon-Initial-Segments in Verbindung mit Ankyrin-G (Berghs et al. 2000; Jenkins und Bennett 2001; Komada und Soriano 2002). An mutierten Mäusen, denen βIV-Spectrin fehlte (Lacas-Gervais et al. 2004; Yang et al. 2004), konnten dramatische Veränderungen der Neuronen- und Axonform gefunden

werden. Die Ranvier-Schnürungen wurden breiter, es fanden sich vesikelgefüllte Membranprotrusionen und eine Dilatation der Axone.

3.3.2.4 Beteiligung von Spectrin an Sekretion und Exkretion

Spectrine scheinen auch an der Sekretion und Exkretion im Bereich des Golgiapparates sowie an der axonalen Endplatte zumindest indirekt beteiligt zu sein. Erste Hinweise fanden Perrin und Aunis (1985) bei chromaffinen Zellen der Nebennierenrinde. Nach Simulation fand sich eine ausgeprägte, Ca^{2+}-abhängige Umverteilung von α-Spectrin. An den gleichen Zellen liess sich durch die Einschleusung eines α-Spectrin-Antikörpers die ebenfalls Ca^{2+}-abhängige Katecholaminfreisetzung verhindern (Perrin et al. 1987).

Von Beck et al. (1994) wurde dann das oben bereits erwähnte β_{Golgi}-Spectrin entdeckt. Es ist eine immunoreaktive Form des β_3-Spectrins, aber bisher noch nicht vollständig charakterisiert. Auch die Funktion des β_{Golgi}-Spectrins ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Es werden Strukturerhaltung, Beteiligung an Vesikelbildung und –transport, Beteiligung an der Selektion von Proteinen, Herstellung einer Verbindung zum mikrotubulären Zytoskelett und die Existenz eines sog. „spectrin-ankyrin adapter-protein trafficking system“ diskutiert (Beck et al. 1994; Devarajan et al. 1997; De Matteis und Morrow 1998; Holleran und Holzbaur 1998; Lippincott-Schwartz 1998; Stankewich et al. 1998).

In Nervenzellen scheint Spectrin an den Axonen und Nervenendigungen an Transport und Ausschüttung von präsynaptischen Vesikeln beteiligt zu sein. Sikorski et al. (2000) konnten bei hippocampalen Neuronen von Ratten an der β-Untereinheit von Hirn-Spectrin eine Bindungsstelle zu Synapsin und zu synaptischen Vesikeln nachweisen. Durch Injektion eines gegen die Bindungsstelle von Spectrin zu Synapsin gerichteten Antikörpers konnten sie die synaptische Neurotransmission verhindern. Sunderland et al. (2000) fanden Hinweise, dass Spectrine im Bereich der motorischen Endplatte indirekt über den spannungsgesteuerten Ca^{2+}-Kanal und einen Transmembran-Proteinkomplex mit Laminin synaptische Vesikel organisieren könnten.

Bei *D. melanogaster* fanden Phillips und Thomas (2006) β–H-Spetrin an der apikalen Membran und seine Beteiligung an der Stabilisierung des Bürstensaums und der Mikrovilli zum Darmlumen. Bei β-H-Spectrin-mutierten *D. melanogaster* geht eine an der apikalen Zellseite und an den Endosomen vorhandene Protonenpumpe verloren.

Eine bei den Mutanten chemisch durch Rab-5 aktivierte Endozytose der Endosomen schlug fehl. Dies deutet darauf hin, dass Spectrin bei der Endozytose von Endosomen beteiligt ist.

Auch beim Frosch erscheint eine Beteiligung von Spectrin am Vesikeltransport sehr wahrscheinlich. Aspengren und Wallin (2004) konnten bei *Xenopus laevis* eine große Konzentration von Spectrin an den Melanosomen nachweisen, welches bei Ausschüttung aus den Melanophoren seine Position gemeinsam mit den Melanosomen wechselt.

3.3.2.5 Spectrin und weitere Blutzellen

Spectrin scheint auch eine Funktion in weiteren Blutzellen zu haben. So findet sich Spectrin beim ruhenden Blutplättchen unterhalb der Plasmamembran und bildet einen Komplex mit α-Adducin und F-Aktin. Bei der Aktivierung der Plättchen remodelliert sich Spectrin und ist im Zentrum der Zelle zu finden. Hierbei löst sich bei einer Phosphorylierung von Adducin die Verbindung zwischen Aktin und Spectrin, Spectrin wird zentralisiert und Aktin kann das Plättchen zur aktiven Form umformen (Barkalow et al. 2003). Dieser Prozess scheint nach Untersuchungen von Tamuro et al. (2005) durch die Rho-Kinase gesteuert zu werden.

Auch bei der Immunantwort schein das Spectrinzytoskelett eine Rolle zu spielen. Bei der Stimulierung von T-Zell-Rezeptoren steigen Spectrinpools gekoppelt mit CD45 aus der Zellmitte an die Zelloberfläche. Dabei unterdrückt βI-Spectrin die Rekrutierung von CD45 und CD3 an der Zelloberfläche und somit die Aktivierung der T-Zelle (Pradhan und Morrow 2002). Die Wirkung von Spectrin wird dabei über Ankyrin vermittelt. Weitere Glykoproteine wie CD43 werden hingegen nicht beeinflusst.

3.3.2.6 Modulation von Spectrin in apikomplexen Parasiten

Die Interaktion von apikomplexen Parasiten und dem Spectrinskelett der Wirtszelle wird aktuell relativ intensiv beforscht. Pei et al. (2005) untersuchten die Bindung zwischen Spectrin und KAHRP (knob-associated histidine-rich protein), einem Plasmodiumprotein, welches mit der Wirtszellmembran interagiert und *in vivo* für die Zytoadherenz notwendig ist. Die Interaktion zwischen KAHRP und Spectrin scheint hierbei für den korrekten Einbau von KAHRP in die Wirtszellmembran verantwortlich zu sein.

Insbesondere das Verlassen der Wirtszelle von *Plasmodium falciparum* scheint mit einer Destabilisierung des Wirtszellzytoskeletts verbunden zu sein. Hanspal et al. (2002) fanden heraus, dass durch die Protease Falcipain-2 eine Proteolyse im Bereich von Protein 4.1 und der Aktin-Spectrin-Bindungsstelle eingeleitet wird, welche den Parasiten das Verlassen der Erythrozyten ermöglicht. Hierzu passende Ergebnisse für weitere Proteasen fanden u.a. Le Bonniec et al. (1999) , Salmon et al. (2001) sowie Aly und Matuschewski (2005).

4 Material

4.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

4.1.1 Geräte

Laminar Air Flow

Konfokales Laser Mikroskop (BioRad, Typ MRC 1024) mit einem Krypton–Ion-Laser (erzeugt Laserstrahlen der Wellenlängen 351 nm, 363 nm, 488nm, 514 nm) gekoppelt an ein Axiovert-135M-Mikroskop der Firma Zeiss

Objektive: Plan NeoFluor 63 x NA 1,25 ; Fluar 40 x NA 1,30

Steuerung, Aufnahme und Bearbeitung der Bilder mit der Software LaserSharp 3.1 von BioRad und Bearbeitung zusätzlich mit dem Programm Confocal Assistant 4.02

Zentrifuge

Brutschrank

Pipetten (Nunc)

Aräometer (IDL), Messbereich: 1 – 1.2 g/ml und 1.2 – 1.4 g/ml

Siebe mit Maschenweiten von 300 µm, 150 µm und 80 µm

4.1.2 Plastik und Glaswaren

Zellkulturflaschen 25 cm², 80 cm^2 oder 175 cm^2 Nunc EasYFlaskTM (Nunc)

4-Well-Platten (Nunc)

Kryoröhrchen (Nunc)

Zentrifugenröhrchen 10 ml (Nunc)

Deckgläser, rund (Menzel-Gläser, ∅ 15 mm)

Mikroskopische Grundplättchen

flache Plastikschalen und Glasplatten

Plastikeimer, 10 l

Zentrifugengefäße 250 ml aus Polypropylen (Herolab LongLife®)

4.2 Zellkultur

ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) mit dem zugehörigen Supplement (PromoCell)

fetales Kälberserum (FCS) (Eurobio)

Medium 199 Earle (GIBCO)

RPMI Medium 1640 (GIBCO)

Penicillin/Streptomycin (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml; Eurobio)

Gentamycin 50 µg/ml (Eurobio)

Trypsin EDTA (0,25 % Trypsin in EDTA, fertige Gebrauchslösung) (Eurobio)

DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma)

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung): NaCl 8 g/l; Na_2HPO_4 1,15 g/l; KCl 0,2 g/l; KH_2PO_4 0,2 g/l;

4.2.1 Zusammensetzung des Kulturmediums

Wir verwendeten für die Zellkultur zwei verschiedene Kulturmedien (im weiteren Kulturmedium 1 oder 2). Direkt nach der Subkultivierung oder bei schlechtem Wachstum der Zellen verwendeten wir eine Mischung aus ECGM mit dem dazugehörigen Supplement (beides PromoCell) und 2 % fetales Kälberserum (FCS) Für das weitere Wachstum setzten wir eine Mischung aus Medium 199 und ECGM (inkl. Supplement) im Verhältniss 50/50 (v/v) ein. Hier wurden ebenfalls 2 % FCS zugesetzt. Beide Medien enthielten außerdem Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml und L-Glutamin 2 mM.

4.3 Zellgewinnung

10 x Puck's saline A Puffer (PSA) (GIBCO),

Collagenase Typ2 (Worthington Biochemical Corp.),

Nicht resorbierbares Nahtmaterial (USP 4/0 und FCP 1.5 S.M./Ag)

Schlauchklemme (Tierärztebadarf J. Lehnecke GmbH)

Mayo-Schere (Tierärztebadarf J. Lehnecke GmbH)

Braunüle (1,3x4,5; Braun)

Kombi-Verschlußkappe (Mediwerl)

4.4 Parasiten

4.4.1 Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten

Stullmisan ® (Essex Pharma, München)

Hemofac ® (HS-Hemo, Ochtrup)

gesättigte Zuckerlösung mit einer Dichte von 1,35 g/cm³

4% und 2% $K_2Cr_2O_7$ - Lösungen (Merck)

Hypochloridlösung 4%

L-Cystein (0,002 M) (Serva, Heidelberg)

$NaHCO_3$ - Lösung (0,2M)

4.4.2 Exzystierung von *E. bovis*-Sporozoiten

Hypochloridlösung (4 % freies Chlor)

60 %ige Percoll-Lösung (Amersham)

L-Cystein (0,002 M) (Serva, Heidelberg)

$NaHCO_3$ (0,2 M)

L-Cystein (0,002 M) (Serva, Heidelberg)

Exzystiermedium1 [0,25 % (w/v) Trypsin (Sigma), 4 % Sodium taurodeoxycholate (Calbiochem, Bad Soden) in *Hank's balanced salt solution* (HBSS) (Sigma)]

Exzystiermedium2 (0,4 % (w/v) Trypsin (Sigma), 8 % (v/v) sterile Rindergalle in HBSS)

4.5 Fluoreszenzfärbung

Methanol reinst (Merck)

Milchpulver, fettarm (Glücksklee) in PBS (3 % w/v)

Rabbit anti-Chicken Spectrin S-1390 (Sigma)

Mouse anti - rabbit IgG FITC (Sigma)

DNA Farbstoff H33342 (Molecular Probes)

Mountingmedium II (siehe 4.5.1)

Mowiol (Einbettmedium, Aventis)

Glycerinlösung (Sigma)

Tris [Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan] (Sigma)

p-Phenylendiamin (Serva)

4.5.1 Herstellung von Mountingmedium II

2,4 g Mowiol, 6 g Glycerinlösung 87 %, 6 ml H_20, 12 ml 0,2 M Tris;

Die Lösung wurde mit HCl auf einen pH von 8,5 gebracht und für 10 Minuten bei 50 – 60° C in Lösung gebracht, ungelöste Reste wurden für 5 Minuten abzentrifugiert (11000 x *g*). Zum Überstand kamen 1,5 mg/ml p-Phenylendiamin (Johnson et al., 1982) und das Gemisch wurde binnen 5 Minuten bei –20° C eingefroren

4.5.2 Der Spectrinantikörper

Der verwendete Spectrinantikörper S-1390 der Firma Sigma wurde in Kaninchen unter der Verwendung von gereinigtem Spectrin aus Hühnererythrozyten entwickelt. Laut firmeneignen Western Blot – Tests werden spezifisch die α- und β-Ketten von Spectrin aus Hühnererythrozyten gebunden. Mehrere Studien haben unter Verwendung dieses Antikörpers bereits Spectrinisoformen, unter anderem in *T. gondii* und in Grünalgen, nachweisen können (Ghazali et al. 1995; Holzinger et al. 1999).

5 Methodik

Die Methoden zu Zellgewinnung und -kultur sowie zur Parasitengewinnung sind Standardmethoden am Institut für Parasitologie der Universität Gießen und wurden auf mündliche und handschriftliche Vorgabe von Herrn Dr. Carlos Hermosilla durchgeführt und beschrieben.

Die Methoden zur Immunfärbung werden am Institut für Tierphysiologie am Uniklinikum Gießen verwendet und wurden mündlich und handschriftlich von Herrn Dr. Jan-Hillern Behrendt, Frau Dr. Ursula Eckstein-Ludwig und Herrn Dr. Elmar Schröpfer vermittelt.

5.1 Zellkultur

5.1.1 Zellgewinnung

Für diese Arbeit wurden primäre Zelllinien verwendet:

Endothelzellen aus der Nabelschnur des Rindes; bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) (Hermosilla et al. 2002). Die Nabelschnüre stammten von per Kaiserschnitt entbundenen Kälbern (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Zerbe, Hannover). Sie wurden innerhalb von 24h nach Entnahme verarbeitet.

Um die Zellen zu gewinnen, wurde ein Ende der Nabelschnur mit einer Klemme verschlossen. Am anderen Ende wurde über eine Braunüle, die mit sterilen Fäden in der Vene fixiert war, eine sterile Collagenase–Mischung (0,025 g Collagenase + 10 ml 10 x PSA + 90 ml H_2O) eingebracht. Je nach Größe der Nabelschnüre variierte die applizierte Menge zwischen 10 und 20 ml. Dann ließ man die Vene 25 Minuten bei 37 ° C ruhen. Um die Endothelzellen mechanisch abzulösen, wurden die Venen anschließend noch vorsichtig geknetet. Die Collagenase-Mischung wurde mit RPMI–Medium aus der Vene gespült und in Flaschen aufgefangen, die mit 1 – 2 ml FCS vorgefüllt waren. Das Ganze wurde auf 50 ml mit RPMI aufgefüllt und dann bei 400 x *g* 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 6 ml ECGM–Komplettmedium in Suspension gebracht und diese Suspension auf maximal 5 Kulturflaschen verteilt. Um die Zellen besser anwachsen zu lassen, wurden die Flaschen mit 1 – 2 ml ECGM befüllt und mindestens 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Jede Kulturflasche wurde nach Zellzugabe mit ECGM auf 5 ml aufgefüllt.

5.1.2 Haltung

Die BUVEC Zellen wurden in einem Brutschrank bei maximaler Luftfeuchtigkeit in einer Atmosphäre aus 5 % CO_2 und 95 % Luft bei 37 ° C gehalten. Zur Kultivierung der Zellen nutzten wir Kulturflaschen (Nunc) mit einer Grundfläche von 25 cm². Um die Experimente durchführen zu können, wurden die Zellen in 4–Well-Platten (Nunc) auf runden Deckgläschen (∅ 15 mm) gezüchtet. Um in den Flaschen und auf den Deckplättchen eine optimale Haftung der Zellen zu gewährleisten, wurde das Kulturmedium mindestens 20 Minuten vor den Zellen in die Gefäße gegeben (Bonfoco et al. 1995; van Engeland et al. 1996; Chen et al. 1997). Nach dem Aussäen wechselten wir das Medium in den Kulturgefäßen mindestens 3 mal pro Woche. Am Tag direkt nach der Aussaat wurde grundsätzlich ein zusätzlicher Mediumwechsel durchgeführt, um nicht anhaftende, apoptotische Zellen und eventuell zurückgebliebene Trypsinreste zu entfernen.

5.1.3 Subkultivierung der BUVEC

Bei geschlossenem Zellmonolayer in den Kulturflaschen wurde entweder eine Subkultivierung der Zellen oder eine Aussaat in die 4-Well-Platten durchgeführt. Dazu musste erst das alte Medium abgenommen werden. Dann wurde die Flasche mit 3 ml PBS gespült. Mit Trypsin EDTA wurden die Zellen abgelöst. Pro Flasche wurden 1,5 ml der Lösung eingesetzt, die maximal 5 Minuten auf den Zellen verblieben. Um den Ablösevorgang zu beschleunigen, wurden die Flaschen leicht auf die Unterlage geklopft. Durch Zugabe von FCS enthaltendem Medium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt. Der Inhalt der Kulturflaschen wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Minuten bei 200 x *g*). Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet mit Kulturmedium1 resuspendiert und auf vier bis sechs neue Flaschen oder auf vier bis fünf 4-Well-Platten mit einliegenden Deckgläschen verteilt. In der Regel wurden fünf Flaschen bzw. vier 4-Well-Platten befüllt. Die Zellen in den Wells wurden genauso weiterversorgt wie in den Kulturflaschen. Pro Well verwendeten wir hier 1 ml Kulturmedium.

5.1.4 Einfrieren von Zellen und Parasiten

Um die Zellen dauerhaft aufzubewahren, wurden die BUVEC in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurde in das Kulturmedium DMSO (Merck) in einer Konzentration

von 7,5 % gegeben. Das nach dem Ablösen der Zellen und Zentrifugieren vorhandene Pellet wurde in DMSO-haltigem Medium (2 ml je Pellet) aufgenommen, resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc) gegeben. Diese wurden erst 30 Minuten im Kühlschrank, dann 2 Stunden bei –25 ° C, dann 1 Stunde bei –80 ° C gelagert und danach in flüssigen Stickstoff überführt. Die Sporozoiten von *E. bovis* wurden genauso behandelt.

5.1.5 Auftauen von BUVEC und *E. bovis*-Sporozoiten

Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 ° C aufgetaut. Sofort danach musste der Inhalt des Kryoröhrchens in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und auf 10 ml mit Kulturmedium1 aufgefüllt werden. Anschließend wurde der Inhalt 5 Minuten mit 200 x *g* zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde wie oben beschrieben resuspendiert und auf drei bis vier Kulturflaschen verteilt. Das Auftauen der Sporozoiten erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

5.2 Parasiten

Der eingesetzte *Eimeria bovis* Stamm wurde 1985 aus einer Feldprobe isoliert und wird durch Passagen in Kälbern erhalten (Fiege et al. 1992).

5.2.1 Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten

Zur Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten wurden gesunde Kälber der Rasse Deutsche Schwarzbunte verwendet. Nach eingehender klinischer Prüfung auf bakterielle Durchfallerreger und parasitische Erreger wurden die Kälber in speziellen Stoffwechselkäfigen aus Edelstahl gehalten. Diese standen in einem gekachelten, desinfizierten Raum, welcher nur über eine Desinfektionsschleuse zu betreten war. Personen, die in Kontakt mit den Rindern kamen, mussten Laborkittel, Gummistiefel, -schürze und -handschuhe tragen und durch eine Wanne mit einer Desinfektionslösung (5 % ige (v/v) p-Chlor-m-Kresol-Lösung (p3-incicoc ®) in Wasser) gehen.

Die 1-2 Wochen alten Kälber wurden anfangs mit Milchaustauscher (Hemofac ®) und einem Antidiarrhoeikum (Stullmisan ®) (in schwarzem Tee suspendiert) gefüttert. Zusätzlich wurde nach 14 Tagen ein Ergänzungsfutter beigefüttert, ab der dritten Woche dann sterilisiertes Heu. Nach der vierten Woche wurden nur noch Heu verfüttert, Milchaustauscher und Antidiarrhoeikum wurden abgesetzt.

Die Kälber wurden in einem Alter von 6-7 Wochen per os mit 70.000 *E. bovis*-Oozysten infiziert. Etwa 18 Tage post infectionem wurden Oozysten mit dem Kot ausgeschieden. Der abgegebene Kot wurde regelmäßig untersucht, und ab 1000 Oozysten pro Gramm Kot gesammelt, ermittelt durch das modifizierte McMaster-Verfahren (Wetzel 1951). Dieser Kot wurde dann über Siebe mit 300 µm, 150 µm und 80 µm Maschenweite mit Leitungswasser gespült. In der letzten Fraktion befanden sich die Oozysten (∅ 26 – 32 µm Rommel 1992). Diese Suspension ließen wir 2 Stunden ruhen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit einer gesättigten Zuckerlösung (Dichte 1,35 g/cm³) bis zu einer Dichte von 1,15 g/cm³ versetzt. Das Sediment wurde in flache Schalen überführt, die randvoll gefüllt und mit aufgelegten Glasscheiben abgedeckt wurden, an denen die flottierenden Oozysten haften blieben. Die Glasscheiben wurden daraufhin abgespült und die abgespülten Oozysten mit einer 4%igen Kaliumdichromatlösung versetzt und eine Woche bei Raumtemperatur gelagert. Um eine gute, zur Sporulation wichtige Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde die Oozystensuspension täglich umgerührt. Die sporulierten Oozysten wurden in frischer 2%iger Kaliumdichromatlösung bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.2 Exzystierung von *E. bovis*-Sporozoiten

Zur Reinigung der Oozystensuspension wurde diese 10 Minuten bei 400 x *g* zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde unter ständigem Rühren in Hypochloridlösung (4 % freies Chlor) aufgenommen, dann auf Eis 20 Minuten inkubiert und anschließend weitere 5 Minuten bei 200 x *g* zentrifugiert. Danach wurde die Lösung mit destilliertem Wasser 1:1 verdünnt und erneut zentrifugiert (400 x *g*, 10 Minuten). Auf einen 60 %igen Percoll-Gradienten (hergestellt aus einer 60 %igen Percoll-Lösung, welche 20 Minuten bei 30.000 x *g* zentrifugiert wird) wurde das entstandene Pellet mit den Oozysten aufgetragen und wieder zentrifugiert (400 x g, 20 Minuten). Die Bande mit den Oozysten befand sich danach im oberen Teil des Gradienten, wurde abgesaugt, auf einen 50 %igen Percollgradienten aufgebracht und erneut zentrifugiert (400 x *g*, 20 Minuten). Die dabei entstandene Oozystenbande wurde aufgenommen und mit mindestens 40 % (v/v) Wasser gemischt.

Für die Exzystierung musste das Oozysten-Sediment zunächst in sterilem L-Cystein (2 mM) und $NaHCO_3$ (0,2 M) resuspendiert und 20 Stunden bei 37 °C in einer 100 %igen CO_2-Atmosphäre inkubiert werden. Zur weiteren Exzystierung wurde die Suspension

wieder zentrifugiert (500 x *g*, 10 Minuten). Um die Sporozoiten zu erhalten, wurden die Oozysten im Exzystiermedium1 30 bis 60 Minuten inkubiert. Im Exzystiermedium2 wurde dann weitere 4 bis 5 Stunden unter stündlicher mikroskopischer Kontrolle inkubiert.

Die entstandene Suspension (Sporozoiten, Sporozysten, Oozysten und Debris) wurde abschließend in sterilem PBS zentrifugiert (200 x *g*, 10 Minuten). Zur Aufbewahrung wurden die Sporozoiten, wie unter 5.1.4 beschrieben, eingefroren und in flüssigem Stickstoff oder bei –80 °C in Kryoröhrchen gelagert.

5.2.3 Infektion der Wirtszellen (BUVEC)

Die Zellen wurden mit 10.000 bis 100.000 Sporozoiten pro Well infiziert. Dazu wurden die gefrorenen Parasiten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit 9 ml Kulturmedium in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (300 x *g*, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Parasitenpellet in Kulturmedium1 resuspendiert. Dabei variierte das Volumen des zugesetzten Mediums je nach Zahl der Parasiten. Nach Möglichkeit wurden 100 µl pro Well gewählt. Anschließend wurden die Wells mit Kulturmedium1 oder 2 auf 1 ml aufgefüllt. Die infizierten Zellen wurden weiter wie die nicht infizierten Zellen behandelt (siehe 5.1.2).

5.3 Immunfärbung der infizierten BUVEC-Zellen

Um Spectrin in den BUVEC und Parasiten anzufärben, wurden die Deckgläschen mit den Zellen in den Wells mit PBS (5 Minuten, 800 µl/Well) gewaschen und anschließend mit Methanol (-20 °C, 1000 µl/Well) auf Eis 15 Minuten zur Fixation und Permeabilisierung gelagert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit PBS (je 5 Minuten, 800 µl/Well) wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 Minuten in einer feuchten Kammer mit Milchpulver in PBS (3 % w/v, 800 µl/Well) abgeblockt. In der gleichen Milchpulverlösung wurden die im Kaninchen gezüchteten Antikörper gegen erythrozytäres α/β-Spectrin von Hühnchen (Sigma) 1:80 aufgenommen, auf die Zellen in den Wells gegeben (250 µl/Well) und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Wells wieder dreimal mit PBS (wie oben beschrieben) gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper, anti-rabbit IgG FITC (Sigma) (verdünnt in PBS 1:120) auf die Zellen aufgetragen (250 µl/Well). Der zweite

Antikörper musste eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer auf die Zellen einwirken. Nach dieser Einwirkzeit wurden die Zellen einmal mit PBS der den DNA Farbstoff 1:450 enthielt für 15 Minuten inkubiert. Nach dem Anfärben wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen und auf ihren Deckgläschen aus den Wells genommen. Mit einem moviolhaltigen Einbettmedium (Mountingmedium II) wurden die Zellen dann auf Objektträgern fixiert und bis zur weiteren Bearbeitung über Nacht bei Dunkelheit getrocknet.

5.4 Daten der Konfokalmikroskopie

5.4.1 Aquisition und Bildbearbeitung

Mit der Laser-Konfokal-Mikroskopie ist es möglich, Schichtaufnahmen von den zu untersuchenden Objekten zu erstellen. Diese Objekte müssen transparent bzw. sehr dünn geschnitten sein, um eine Fluoreszenz des durch Laserbestrahlung angeregten Farbstoffs messen zu können. Die Schnittfolge ist in der Regel von basal nach apikal, die Fluoreszenzintensität wird jedoch an sogenannten Overlays (Summationsbilder) gemessen, in denen bis zu 60 Schnitte enthalten sind.

Zur besseren Darstellung und zur sicheren Identifizierung der Zellen verwendeten wir zwei verschiedene Farbstoffe, FITC für das Spectrin und H33342 für die DNA. FITC hat ein Emissionsmaximum bei ca. 488 nm (grün), das von H33342 liegt bei ca. 430 nm (blau). Das emittierte Licht wurde von zwei getrennten Photomultipliern aufgezeichnet, welche zur besseren Unterscheidung die Farben Rot für das Spectrin und Grün für die DNA zugewiesen bekamen, wie es an den in dieser Arbeit verwendeten Bildern zu sehen ist. Die hier verwendeten Bilder wurden mit dem Programm LaserSharp 3.1 (Bio-Rad) erstellt und mit den Programmen Confocal Assistant (Todd Clark Brelje), Photo Shop 6.0 (Adobe) sowie Powerpoint (Microsoft) bearbeitet. Dabei wurden lediglich Kontrast, Helligkeit und Gamma verändert, welche keinen Einfluss auf die Rohdaten haben. Darüber hinaus wurden den Bildern keine Informationen zugefügt oder entfernt.

5.4.2 Messung der Fluoreszenzintensität

Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte auf einem dem Laser-Konfokal-Mikroskop angeschlossenen Rechner. In einem oder mehreren, vom Untersucher vorgegebenen Arealen wurde vom Messprogramm die Fluoreszenzintensität gemessen und

digitalisiert. Die Fluoreszenzintensität wurde in 255 Helligkeitsstufen gemessen, wobei 0 einem Pixel ohne Fluoreszenz entsprach, 254 einem Pixel mit der höchsten, messbaren Intensität. Fanden sich Pixel im Messbereich, welche eine höhere Fluoreszenzintensität besaßen, wurde ihnen vom Programm ebenfalls der Wert 254 zugewiesen. Diese Daten konnten auf dem PC-Bildschirm visualisiert werden (Schnittbilder in zwei verschiedenen Ebenen, bis zu einem 3D-Objekt), und es konnte eine optische Begutachtung der Messung erfolgen. Darüber hinaus konnte auch eine mathematisch - statistische Auswertung der Daten durchgeführt werden.

Für die Messungen wurden infizierte Zellen in den verschiedenen Infektionsstadien (3, 8, 15 und 20 Tage *post infectionem*), sowie im selben Sichtfeld mindestens 3 nicht infizierte Zellen markiert.

Das Programm gab die Daten je Feld in Zahlenkolonnen aus, wobei jedem Intensitätswert 0 bis 254 eine Anzahl Pixel zugeordnet wurde. Zur Bearbeitung erzeugte das Messprogramm Tabellen (siehe Tab. 4).

In dieser Tabelle war angezeigt, wieviele Pixel pro Intensitätswert gemessen wurden. Um Aussagen über die mögliche Änderung in der Fluoreszenz treffen zu können, wurden von allen Kurven bzw. Tabellen die Mediane gebildet. Hierzu wurden die einzelnen Intensitätswerte mit der Anzahl der ihnen zugeordneten Pixel multipliziert. Diese Ergebnisse wurden schrittweise addiert und daraus der rechnerische Mittelwert gebildet. Als Median verwendeten wir den Tabellenwert (aus der Summenbildung), welcher den rechnerischen Mittelwert als erstes überschritt.

Nummerierun	Cytoskelett	DNA	Nr. x Cytosk.	Summe	
0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
...	...	...	...	...	
...	...	...	...	...	
236	10	0	2360	121507	
237	10	0	2370	***123877***	
238	13	0	3094	***126971***	***Median***
239	6	0	1434	128405	
240	12	0	2880	131285	
...	...	...	...	...	
...	...	...	...	...	
252	16	0	4032	179382	
253	14	0	3542	182924	
254	279	0	70866	253790	
255	0	0	0	253790	
Summe			253790		
Summe - Halbe			126895		

Tabelle 4: Beispiel für eine ausgewertete Tabelle

Unter Nummerierung sind die Intensitätswerte aufgetragen. Unter Zytoskelett sind die Anzahl der gemessenen Pixel pro Intensitätswert aufgetragen. In Spalte 4 (Nr x Cytosk.) sind die multiplizierten Werte pro Intensitätswert zu finden, ganz unten die Gesamtsumme dieser Werte und der rechnerische Mittelwert. In der Summenspalte sind die schrittweise aufsummierten Werte der Spalte 4 aufgetragen. Die beiden Werte um den rechnerischen Mittelwert (hier 126895) sind fett geschrieben. Der Wert, der den rechnerischen Mittelwert als erstes übersteigt, wurde als Median gewertet.

5.4.3 Statistik

Die Messdaten ergaben für jeden Messtag eine rechtsschiefe Verteilung, woraufhin die Werte logarithmisch transformiert und unter freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus – Liebig – Universität Giessen mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet wurden. Als statistisch signifikant stuften wir Werte mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p< 0,05$ ein

5.4.4 Auswertung der Fluoreszenzbilder der Konfokalmikroskopie

Analog zur Lichtmikroskopie konnten die Konfokaldaten auch nach bildmorphologischen Kriterien ausgewertet werden. Die Verteilung von DNA (grün) und Spectrin (rot) ließ sich in den Wirtszellen und den Parasiten erkennen. Die verschiedenen Infektionsstadien sind somit auch in der Konfokalmikroskopie gut zu unterscheiden. So waren die typischen Veränderungen der infizierten Zelle bzw. des Parasiten, wie parasitophore Vakuole (Abb. 4B), Makroschizont (Abb. 4C und D) und intrazellulärer Sporozoit (Abb. 4A) auch in den Fluoreszenzbildern zu erkennen.

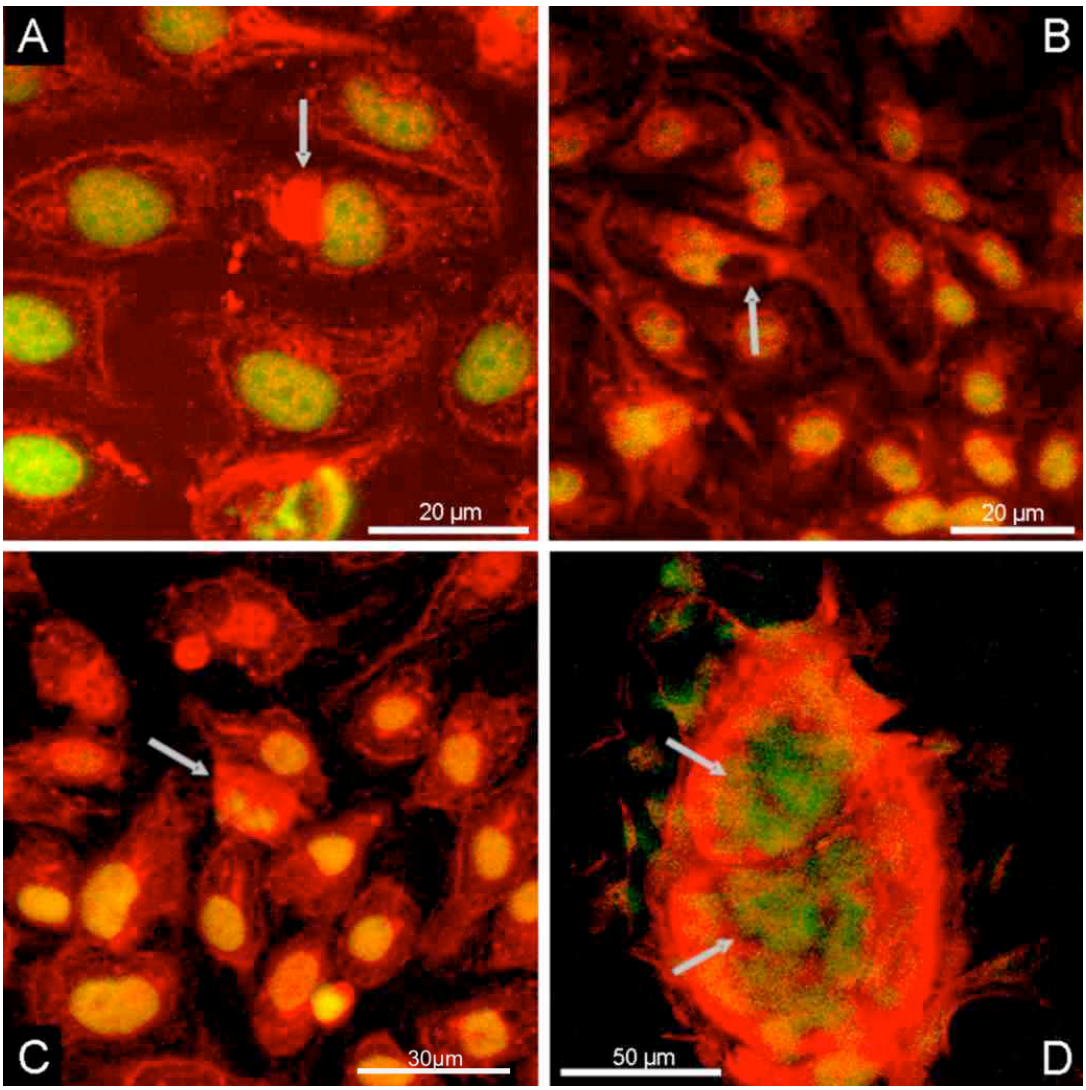

Abbildung 4: Beispiele für Konfokalaufnahmen in den verschiedenen Infektionsstadien. Die rot dargestellten Zellanteile entsprechen Spectrin, die DNA ist grün dargestellt.

A: 3. Tag p. i.: Infizierte BUVEC mit spectrinreichem Sporozoit (Pfeil) neben dem Zellkern (grün).
B: 8. Tag p. i.: Frühschizont mit spectrinfreier PV (Pfeil) in der Wirtszelle.
C: 15. Tag p. i.: Noch rel. kleiner Schizont mit viel Spectrin (Pfeil) neben dem Zellkern der Wirtszelle.
D: 20.Tag p. i.: Makroschizont mit 2 Kammern (Pfeile). Hier zeigt sich noch eine zentrale Verteilung der parasitären DNA (grün) in der im Randbereich sehr spectrinreichen PV.

6 Ergebnisse

6.1 In-vitro-Kultur der Zellen

Bei Einhaltung der entsprechenden Hygienevorschriften konnten die Zellen problemlos kultiviert und subkultiviert werden. Allerdings ließ mit steigender Passagehäufigkeit die Haltbarkeit der Zellen deutlich nach, sodass nur Zellen mit weniger als zwölf Passagen verwendet wurden.

Nachdem die Parasiten in die Zellkultur eingebracht waren, konnte meist innerhalb einer Stunde eine Invasion der BUVEC durch die Sporozoiten beobachtet werden. Die invadierten Sporozoiten veränderten innerhalb der ersten 96 Stunden post infectionem ihre Form und wurden zunächst kürzer als die freien Sporozoiten. Bis zum 5. Tag p. i. konnte eine Formveränderung der Sporozoiten in Richtung einer mehr kugeligen Form beobachtet werden. Am 15. Tag p. i. waren Makroschizonten in den BUVEC zu sehen, wobei noch keine Evasion der Merozoiten stattfand. Am 20. Tag p. i. fanden sich teils gekammerte Makroschizonten von bis zu 450 µm im Durchmesser, in einigen Fällen fanden sich fokal eröffnete PVs mit evadierenden Merozoiten (siehe Abb. 8B und 8D).

6.2 Spectrin

6.2.1 Konfokal-mikroskopische Ergebnisse

6.2.1.1 Tag 3 p. i.

Am 3. Tag p. i. konnten in den infizierten BUVEC die intrazellulären Sporozoiten beobachtet werden (siehe Abb.4A). Im Rahmen der Visualisierung der Parasiten mit dem Konfokalmikroskop fiel auf, dass auch in den Sporozoiten eine Fluoreszenz gemessen werden konnte (siehe Abb. 5B). Um auszuschließen dass es sich bei den aktuell und später untersuchten Merozoiten um ein zufälliges Fluoreszenzphänomen handelte, wurde ein Reihenversuch mit geänderter Anfärbung durchgeführt. Zellproben (infiziert und nicht infiziert) wurden entweder mit den einzelnen Bestandteilen der Anfärbung behandelt oder es wurden einzelne Teilschritte der Färbung ausgelassen. Anschließend wurde die Zellproben gemessen. Hierbei ließ sich nachweisen, dass nur bei korrekter Färbung eine Fluoreszenz im Bereich der Wellenlänge (max. bei 488 nm) des anti-rabbit IgG FITC nachzuweisen ist. Eine Kreuzreaktion des verwendeten, FITC

beladenen, Antikörper mit den Parasiten oder der Wirtszelle ist somit ausgeschlossen. Dies liess den Schluss zu, dass auch der Parasit ein zumindest spectrinähnliches Molekül enthalten muss.

In einzelnen Zellen deutete sich eine zarte, spectrinhaltige Umkapselung des Parasiten an (Abb. 5A), dies dürfte der PV entsprechen. Das Zytoskelett der Wirtszelle wies ansonsten am 3. Tag p. i. eine ähnlich diffuse Spectrinanfärbung auf wie die nicht infizierten BUVEC.

Gut erkennbar war auch in den frühen Infektionsstadien, dass die Sporozoiten teilweise noch mit Zellfragmenten und intakten Sporozoiten kontaminiert waren (siehe Abb. 5D). In den späteren Tagen des Infektionsverlauf konnten diese Kontaminationen seltener beobachtet werden, da sie mit dem Medium abgewaschen wurden.

Der BUVEC-Monolayer bildete in der Regel einen stabilen Rasen in den Wells, der selten akzidentell teilweise abgelöst wurde (siehe Abb. 5C). Gut zu erkennen ist in Abb. 5C die deutliche Fluoreszenz des Spectrins im Monolayer gegenüber dem partiell zellfreien Well.

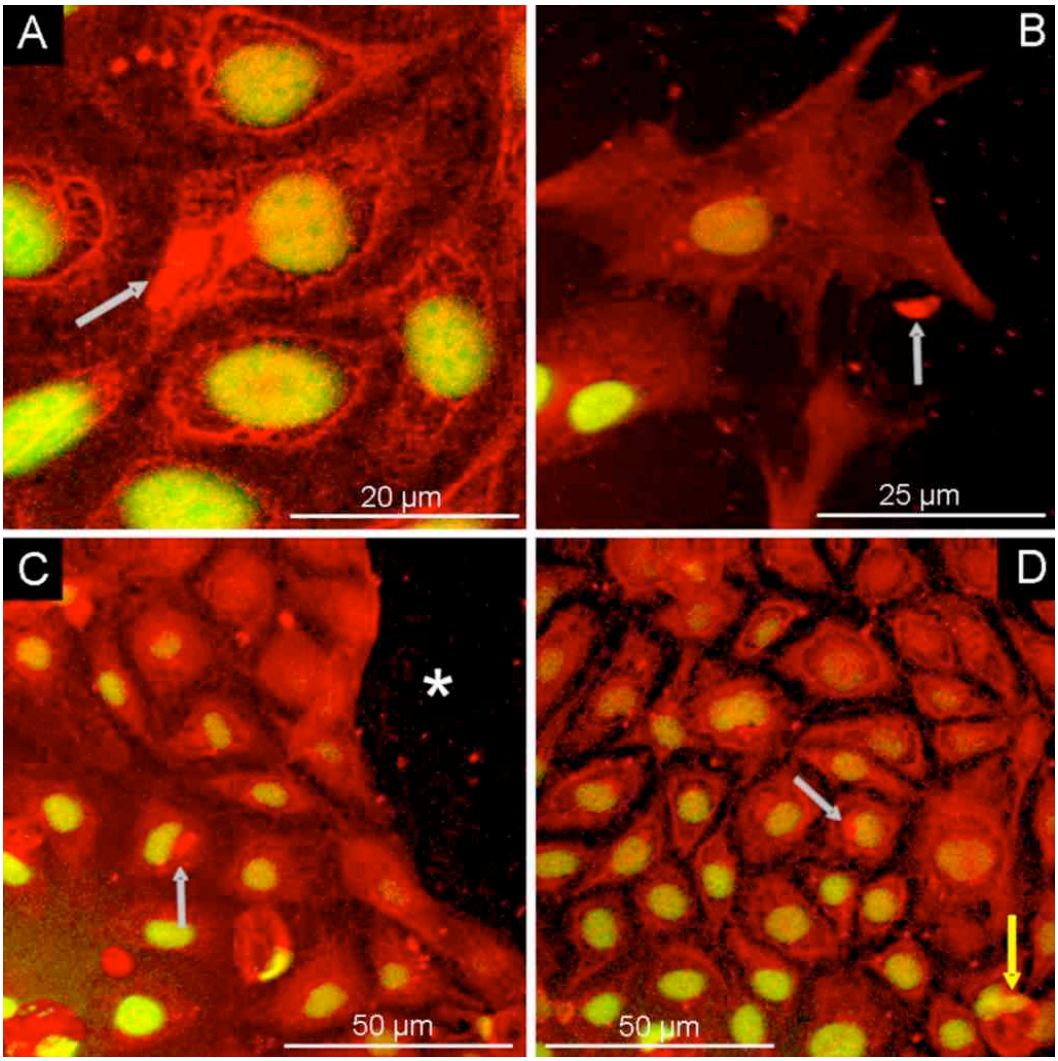

Abbildung 5: Darstellung der Spectrinfärbung (rot) und der DNA-Färbung (grün) von mit E. bovis infizierten BUVEC am 3. Tag p. i..

A: Intrazellulärer Sporozoit mit angedeuteter PV (Pfeil).
B: Extrazellulärer Sporozoit (Pfeil).
C: Intrazellulärer Sporozoit in der Nähe des grün gefärbten Zellkerns (Pfeil), abgelöster Monolayer (Stern).
D: Intrazellulärer Sporozoit (zentral im Bild, grauer Pfeil), intakte Oozyste (gelber Pfeil) aufgrund einer Kontamination der Sporozoiten mit intakten Oozysten.

6.2.1.2 Tag 8 p. i.

Am 8. Tag p. i. war parasitäres Spectrin in der Regel nicht mehr nachzuweisen. An der Stelle des Sporozoiten fand sich eine Aussparung von etwa Sporozoitengröße im Spectrinzytoskelett der BUVEC (siehe Abb. 6A und C). Diese Aussparung war im Konfokalmikroskop meist ohne Spectrin zu erkennen. In einzelnen Zellen ließ sich in der Aussparung jedoch noch der Trophozoit (siehe Abb. 6A) nachweisen. Die infizierte BUVEC selbst hatte im Vergleich zu den umgebenden nicht infizierten Zellen noch keine wesentliche Form- oder Größenveränderung durchgemacht. Auch der gemessene Spectringehalt war nicht signifikant erhöht. Es war zu erkennen, dass die PV eng benachbart zum Zellkern lag und das Spectrinskelett und auch der Kern leicht bedrängt und verformt wurden (siehe Abb. 6B+C).

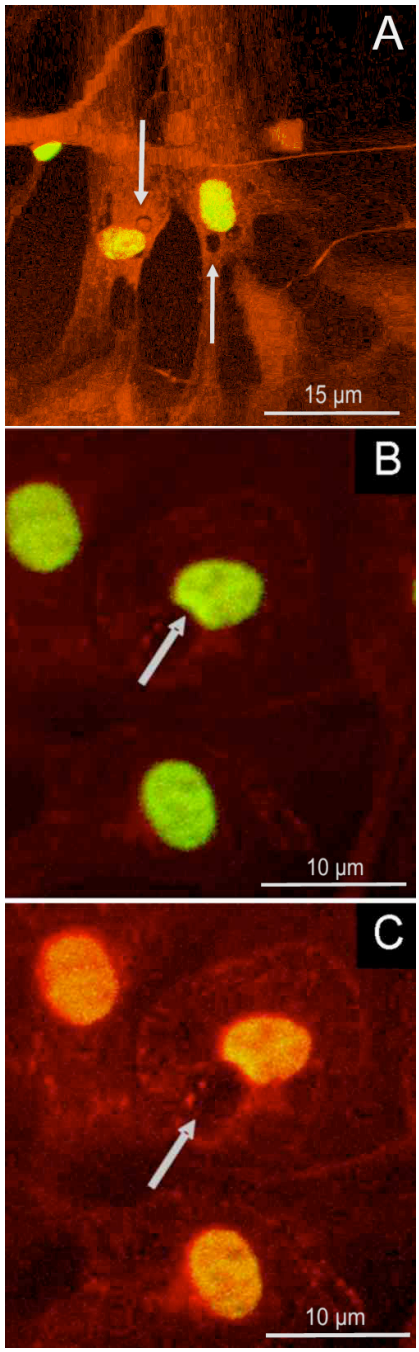

Abbildung 6: Infizierte BUVEC am 8.Tag p. i..

A: Zwei infizierte Zellen; rechts mit spectrinfreier PV (Pfeil nach oben), links noch mit Spectrinsignal des Frühschizonten (Pfeil nach unten).
B und C: Die PV bedrängt den Nukleus, in B an dem herausgearbeiteten DNA-Farbstoff zu erkennen (Pfeil).
C: Infizierte Zelle mit spectrinfreier PV (Pfeil).

6.2.1.3 Tag 15 p. i.

Am 15. Tag p. i. fanden sich bereits Makroschizonten in den befallenen BUVEC. In den Schizonten zeigte sich eine deutliche Spectrinfärbung, die wieder einem Spectringehalt des Parasiten zuzuordenen war. Die Fläche der Schizonten war hierbei sehr variabel,

von soeben mikroskopisch erkennbar bis 100 µm Durchmesser. Die Dicke der Schizonten vervielfachte sich ebenfalls (siehe Abb. 7C), sodass sie weit aus dem Monolayer der nicht infizierten BUVEC herausragten. Im vertikalen Schnitt durch den Monolayer und den Schizonten ist die vielfache Dicke des Schizonten gegenüber den nicht infizierten Zellen zu erkennen. In Abb. 7D lässt sich eine verdickte Spectrinkapsel, die der parasitophoren Vakuole entsprechen könnte, um den Schizont erkennen. Anschließend folgt ein schmales Band, in dem eine verminderte Spectrinkonzentration zu erkennen ist, im noch etwas weiter zentral ist das Spectrin dann wieder konzentriert. Warum diese Schichtung des Spectrins statfindet, konnte nicht geklärt werden.

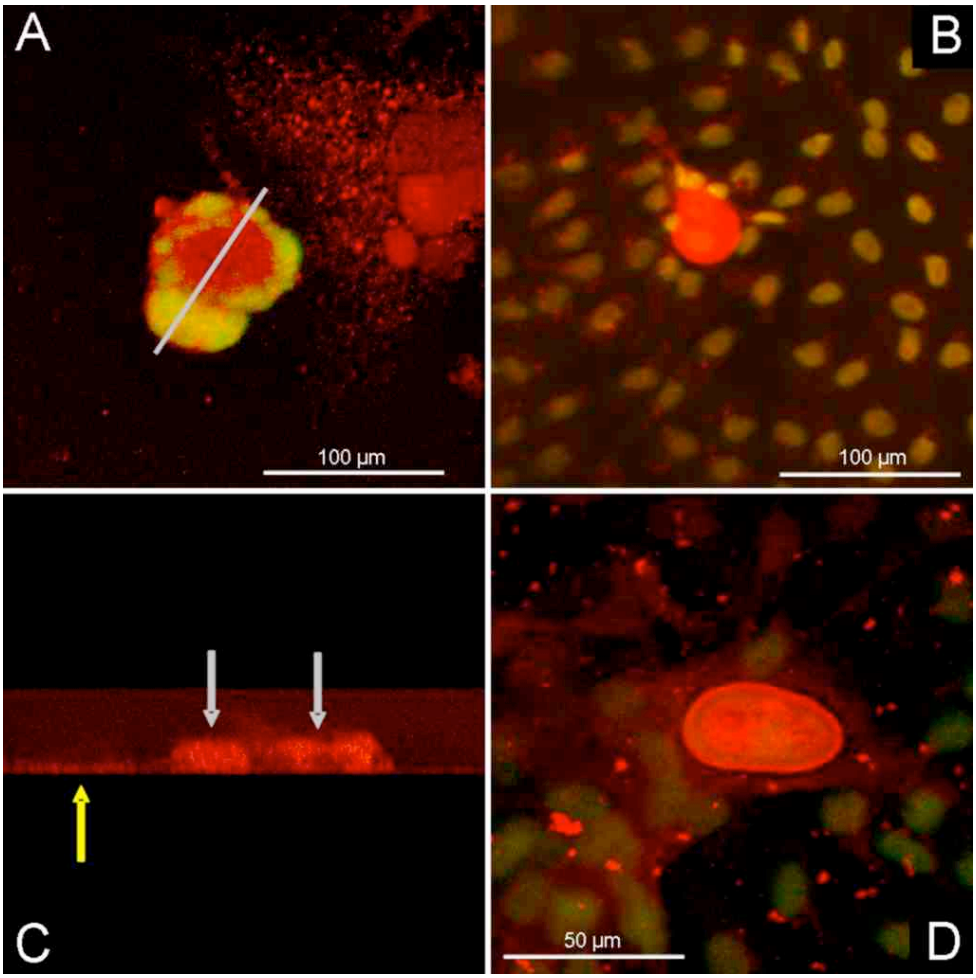

Abbildung 7: Infizierte BUVEC am 15.Tag p. i.

A: Mehrkammriger Schizont zentral im Bild mit angelegter Schnittebene.
B: Einzelner Schizont (zentral im Bild).
C: Horizontaler Schnitt durch einen Monolayer mit zweikammerigem Schizont (graue Pfeile). Der spectrinhaltige Schizont wölbt sich weit aus dem Monolayer (gelber Pfeil) heraus.
D: Makroschizont mit unterschiedlicher „Schichtung“ des Spectrins.

6.2.1.4 Tag 20 p. i.

Am 20. Tag p. i. war die Gesamtzunahme des Spectrins am deutlichsten ausgeprägt. In den Makroschizonten ließ sich das Spectrin teilweise einzelnen Merozoiten zuordnen (siehe Abb 8D), was am 15. Tag p.i. nicht möglich war. Vor Beginn der Evasion ließen sich anhand der DNA-Anfärbung mehrere Zentren in den Schizonten differenzieren, um welche sich die Merozoiten kreisförmig und homogen ausgerichtet anordneten (siehe Abb. 8A). Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei den bereits eröffneten Schizonten diese Zentren nicht mehr. Die Schizonten erreichten am 20. Tag p. i. ihre größte Ausdehnung (bis 250µm), wobei mehr als das 100- bis 500-fache Volumen einer nicht infizierten Zelle erreicht wurde. Beim Egress der Merozoiten wurde die Membran um den Schizonten relativ organisiert, an einer oder wenigen Stellen, lokal unterbrochen, sodass die Merozoiten den Schizonten verlassen konnten (siehe Abb. 8B und D). Es fand keine diffuse Zerstöung der Wirtszelle und der PV, wie z.B. ein Platzen, statt.

Die Anzahl der nicht infizierten Zellen reduzierte sch im Verlauf der Infektion bis zu diesem Infektionsstadium immer weiter und es existierten nur noch einige nicht infizierte Zellen neben den Makroschizonten. Der Monolayer war in diesem späten Infektionsstadium schon sehr verletzlich. Teilweise löste sich der Layer bei geringer Beanspruchung, wie z.B. dem üblichen Waschen beim Färben, subtotal ab (siehe Abb. 8C), teilweise waren nur noch vereinzelt nicht infizierte Zellen auffindbar. Aufgrund der großen Dicke der Schizonten war der verbliebene dünne Monolayer teilweise auf den gewählten Abbildungen/Schnitten nicht erfasst, sodass nur der in einer anderen Wellenlänge angeregte DNA - Farbstoff zu erkennen war (siehe Abb. 8 D).

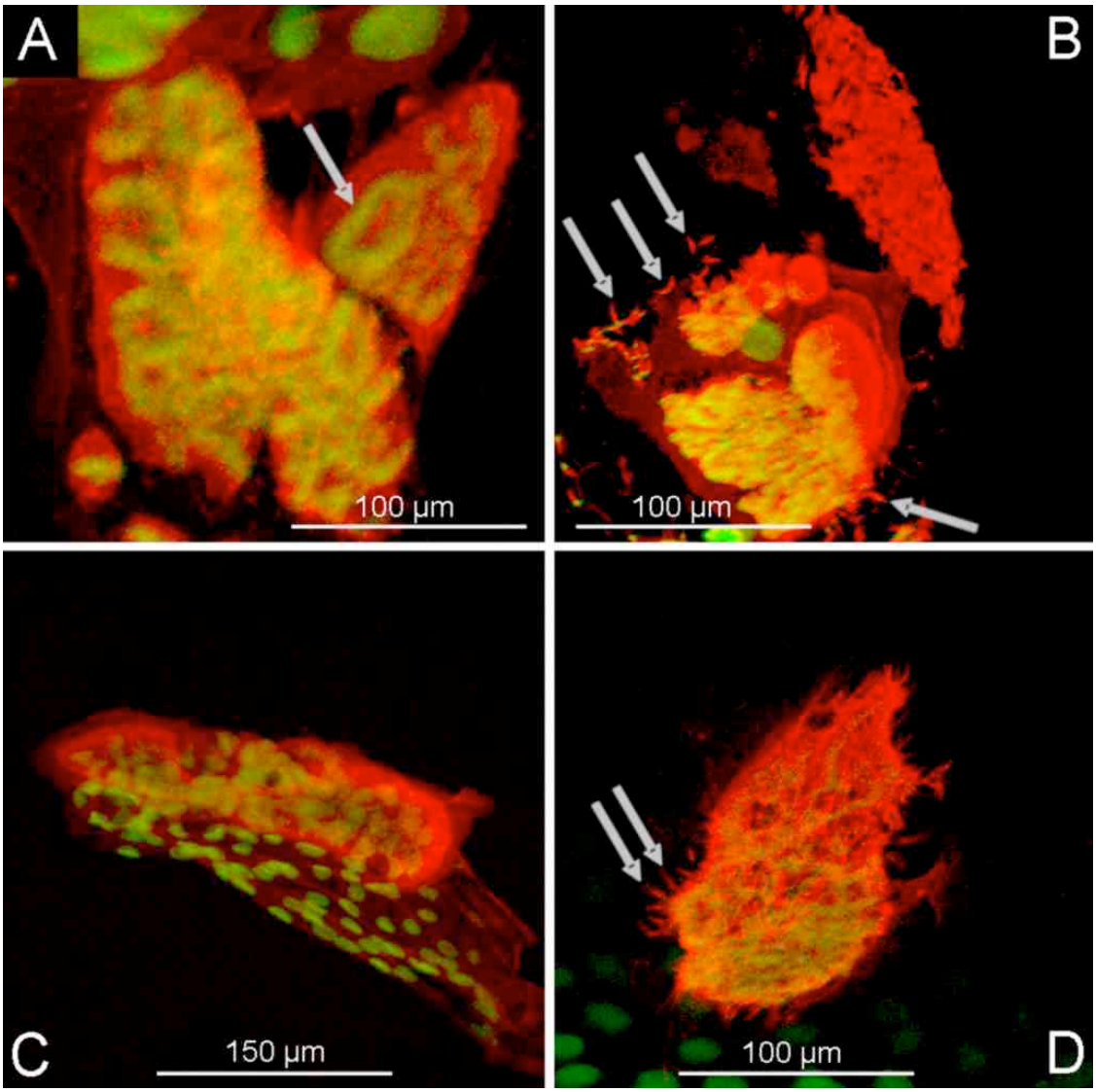

Abbildung 8: Mit *E. bovis* inizierte BUVEC am 20. Tag p. i.

A: 2 Makroschizonten (rot) mit zirkulär angeordneten Merozoiten, erkennbar an den grün angefärbten DNA-Ringen (Pfeil).
B: Mehrere Makroschizonten, der größte Schizont an mehren Stellen eröffnet mit vereinzelt austretenden Merozoiten (Pfeile).
C: Makroschizont mit abgehobenem BUVEC Monolayer (hiervon ist lediglich die grün markierte DNA der Zellen erkennbar).
D: Makroschizont mit vereinzelt austretenden Sporozoiten (Pfeile).

6.2.2 Messung der Spectrinkonzentration

Die Messung mit dem Konfokalmikroskop zeigte im Verlauf bis zum 20. Tag post infectionem eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität. Allerdings dürfte ein Großteil der gemessenen Fluoreszenz den ebenfalls angefärbten und damit spectrinhaltigen Parasiten zuzurechnen sein.

Wie weiter oben bereits beschrieben, wurden Messungen am 3., 8., 15. und 20. Tag post

infectionem durchgeführt. Es wurden immer eine infizierte Zelle und mehrere nicht infizierte Zellen (n = 3 bis 5) im Sichtfeld gemessen. Dabei verteilten sich die Messungen wie folgt:

- 3.Tag p. i. : 17 Messungen
- 8. Tag p. i.: 15 Messungen
- 15. Tag p. i.: 15 Messungen
- 20. Tag p. i.: 15 Messungen

Die Werte für die Fluoreszenzintensitäten, wie in Abbildung 9 angegeben, sind relativ und entsprechen nicht einer reellen Konzentration/Intensität. Dies ist durch die technischen Bedingungen des Konfokalmikroskops zu erklären. Um messbare Daten zu erhalten und nicht das ganze Bild durch die Fluoreszenz der einzelnen Zellen zu überstrahlen, musste teilweise die Empfindlichkeit der Messung herabgeregelt werden. Durch Logarhithmierung wurden die Messwerte zur statistischen Bearbeitung in ein Verhältnis gesetzt. Dadurch ergaben sich für die verschiedenen Messungen vergleichbare Intensitätswerte.

Am 8. Tag konnte eine Abnahme der Spectrinkonzentration in den infizierten Zellen beobachtet werden mit im Verhältnis resultierender (nicht realer) Zunahme des Spectrins in den nicht infizierten Zellen. Dies ließ sich über die nahezu spectrinfreie PV erklären, die in der infizierten Zelle mit im Messfeld lag. Relativ zum Gesamtvolumen der Wirtszelle nimmt deshalb das Spectrin in der infizierten Zelle ab.

Vom 8. zum 15. und zum 20. Tag p. i. ist eine deutliche Zunahme der Spectrinkonzentration in den infizierten Zellen zu erkennen, synchron zu den ebenfalls deutlich zunehmenden parasitären Strukturen. Durch die statistische Aufarbeitung konnte ein Einfluss des Infektionsstadiums auf die Zunahme der intrazellulären Spectrinkonzentration mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von $< 0{,}0001$ (statistisch hochsignifikant) ermittelt werden.

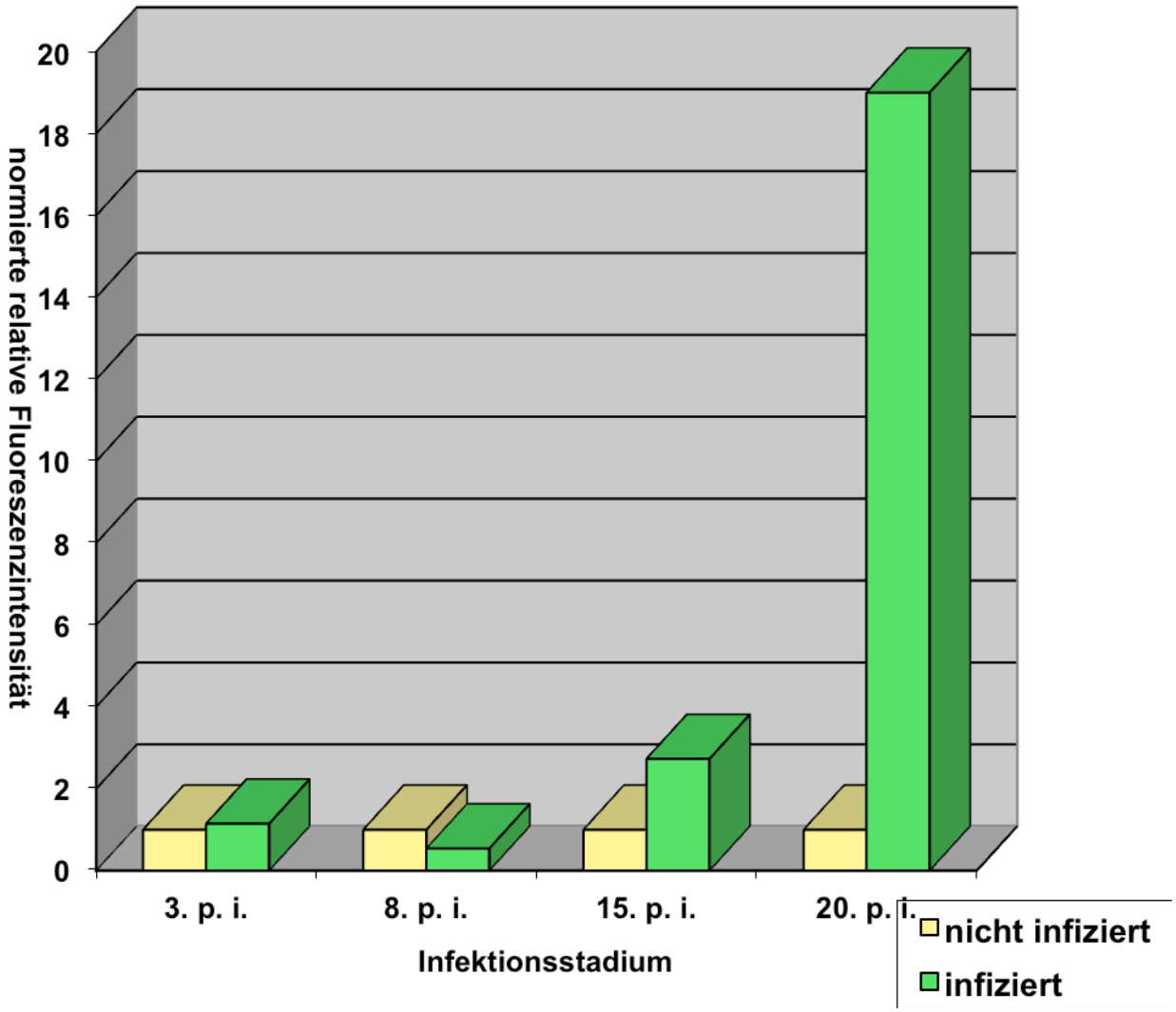

Abbildung 9: Spectrinkonzentration im Verlauf der ersten Schizogonie von *E. bovis*

Es zeigt sich eine leicht erhöhte Spectrinkonzentration in den infizierten Zellen am 3. Tag p. i..
Am 8. Tag p. i. entsteht durch die leere PV ein relativer Rückgang der Spektrinkonzentration in der infizierten Zelle.
Mit Zunahme der Parasiten am 15. und 20. Tag p. i. steigt auch die Spectrinkonzentration in den infizierten Zellen stark an.

7 Diskussion

Apicomplexe Parasiten erzeugen in der Wirtszelle eine parasitophore Vakuole, durch welche sie vom Zytosol der Wirtszelle getrennt sind. Dies birgt für den Parasiten Vorteile und Nachteile – durch die PV ist er beispielsweise von der immunologischen Antwort der Wirtszelle distanziert, er ist jedoch auch von den für die Reproduktion benötigten Proteinen, Aminosäuren, Zellorganellen etc. entfernt. Es liegt nahe, dass der Parasit die Wirtszelle beeinflussen muss, um eine ungestörte Reproduktion zu ermöglichen. Hierzu muss er die Barriere der parasitophoren Vakuole überwinden. Es wurde bereits beschrieben, dass die PV durch parasitäre Proteine stark modifiziert wird (Lingelbach und Joiner 1998; Mordue et al. 1999). Dies könnte unter anderem durch Veränderungen am Zytoskelettbestandteils Spectrin geschehen.

Erstmals konnte in dieser Arbeit ein parasitäres Molekül für *E. bovis* Sporozoiten, Schizonten und Merozoiten nachgewiesen werden, welches anhand dem von uns verwendeten, in Kaninchen produzierten anti-α/β-Spectrin Antikörper, als zumindest spectrinähnlich angesehen werden muss. Ein spectrinähnliches Protein wurde bei den apikomplexen Parasiten bisher lediglich für *P. chabaudi* (Werner et al. 1998), für *P. falciparum* (Forero und Wasserman 2000) und für *T. gondii* (Ghazali et al. 1995) nachgewiesen. Mit der hier angewendeten Methode war es nicht möglich, zwischen parasitärem und wirtszelleigenem Spectrin zu differenzieren. Um insbesondere in den frühen und mittleren Infektionsstadien die Herkunft des von uns gefundenen α-Spectrins zu klären, könnten beispielsweise die Produktion eines spezifischen Antikörpers gegen das parasitäre Spectrin und weitere Konfokalaufnahmen hilfreich sein.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich während der ersten Schizogonie bis zum 20. Tag p. i. eine zunehmende Konzentration von Spectrin in mit *E. bovis* infizierten BUVEC nachweisen (siehe Abb.9). Die Anteile von wirtszelleigenem und parasitärem Spectrin konnten durch die Konfokalmikroskopie nicht getrennt erfasst werden. Da die Parasiten mit im Messfeld lagen, wurden die Werte falsch hoch gemessen. Dies bedeutet, dass die Zunahme der Spectrinkonzentration in infizierten Zellen gegen Ende der Schizogonie vorwiedend parasitär bedingt sein dürfte.

Durch die starke Volumenzunahme der Parasiten im Makroschizonten entsteht ein massiver Druck auf die Wirtszelle. Mithilfe einer Vermehrung des Spectrins könnte die infizierte Zelle beispielsweise eine höhere Stabilität erreichen und damit die Druckverhältnisse kontrollieren. Dies entspräche der Meinung, dass Spectrin für die Stabilität und Flexibilität der Zelle eine wichtige Rolle spielt (Bennett 1990). Bisher wurde diese Funktion von Spectrin vorwiegend im Zusammenhang mit dem Spectringerüst der Erythrozyten beschrieben (Grum et al. 1999). Larsen et al. (2000) konnten beim Spectrinzytoskelett von Kardiomyozyten zeigen, dass eine Volumenzunahme der Zelle im hypoosmotischen Stress nicht zu einer Zerstörung des Spectrinzytoskeletts führt. Mit dem Laser-Konfokal-Mikroskop konnte dabei die strukturelle Unversehrtheit des Zytoskeletts nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten, dass Spectrin zusammen mit Aktin und Desmin ein Netzwerk innerhalb der Zelle bildet, welches an der Regulation des Zellvolumens beteiligt sein könnte. Hermosilla et al. (2008) konnten im Verlauf einer *E. bovis*- Infektion auch für die Zytosklettbestandteile Aktin, Mikrotubuli, Vimentin und intermediäre Filamente eine deutliche Vermehrung sowie eine Reorganisation des Zytoskeletts in den Wirtszellen nachweisen. Auch für andere apicomplexe Parasiten finden sich in der Literatur Nachweise einer Beeinflussung von Zytoskelettbestandteilen. So wird bei *T. gondii* eine Beeinflussung der Wirtszellmikrotubuli beschrieben (Coppens et al. 2006), bei *C. parvum* fand sich eine Akkumulation von Actin rund um die PV (Elliott und Clark 2000; Elliott et al. 2001). Die oben angeführten Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen zu Spectrin überein. Somit dürfte der Parasit über die Vermehrung des Spectrins seiner Wirtszelle indirekt auch eine Kontrolle über das Volumen der Wirtszelle haben.

Ähnlich Vorteile könnte sich der Parasit auch durch eine Kontrolle des Spectrins an den Zell-Zell-Kontakten verschaffen. Die Beteiligung von Spectrin an den Zell-Zell-Kontakten, vorwiegend über Cadherin und weitere Aktin-bindende Proteine, wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Nelson und Veshnock 1987b, a; Moorthy et al. 2000; Rotter et al. 2005). Passende Ergebnisse fanden Nelson und Hammerton (1989) sowie Nelson et al. (1990) bei intakten MDCK- und Tubulusepithelzellen. Dabei war bei Zellen im Monolayer lokal vermehrtes Spectrin im Bereich der Na-K-ATPase der Zell-Zell-Kontakte nachweisbar (Nelson und Veshnock 1986). Im Gegensatz dazu fehlte

diese Verteilung bei in Flüssigkultur gezüchteten Zellen (Nelson und Veshnock 1987b; Morrow et al. 1989), passend zu den fehlenden Zellkontakten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch eine Zunahme des Spectrins eine Vermehrung und Verfestigung der Zell-Zell-Kontakte bewirkt werden könnte. In Bezug auf die hier vorliegende Arbeit kann postuliert werden, dass der durch den Makroschizonten verursachte mechanische Stress abgefangen werden könnte. Die Wirtszelle kann im Zellverband stabilisiert bzw. fixiert werden. Ein Abscheren der infizierten Zellen aus dem Zellverband kann dadurch verhindert werden.

Durch die Vermehrung des intrazellulären Spectrins in der Wirtszelle sind noch weitere Möglichkeiten der Einflussnahmen auf die Wirtszellfunktion durch den Parasiten denkbar. Durch Beeinflussung des am Golgi-Apparat beteiligten β_{Golgi}-Spectrins (Beck et al. 1994; Beck et al. 1997; Devarajan et al. 1997; De Matteis und Morrow 1998; Holleran und Holzbaur 1998; Lippincott-Schwartz 1998; Stankewich et al. 1998; De Matteis und Morrow 2000) könnten sowohl multiple, mitunter für den Parasiten essentielle, Funktionen moduliert werden als auch eine direkte Verbindung des Parasiten zum mikrotubulären Zytoskelett bestehen. Somit wäre ein direkter Einfluss des Parasiten auf die Produktion, die Selektion und den Transport von Proteinen sowie auf die Steuerung eines intrazellulären Transportes des Parasiten denkbar. Allerdings sind die genaueren Funktionen von Spectrin am bzw. im Golgi-Apparat noch nicht zweifelsfrei geklärt, so dass bisher lediglich Spekulationen erhoben werden können.

E. bovis könnte, wie in einigen Studien für *P. falciparum* schon beschrieben (Oh et al. 2000; Pei et al. 2005; Silva et al. 2005), noch weitergehend mit dem Spectrin der Endothelzelle interagieren. Es könnte über eine solche Interaktion zum Beispiel zur gezielten Expression bzw. zur Unterdrückung von spezifischen Membranproteinen kommen, welche die Erkennung der infizierten Zelle durch das Immunsystem des Wirtes verhindern oder zumindest erschweren könnte. Dass Spectrin auf die Expression von Oberflächenproteinen Einfluss hat, wurde bei Jurkat T-Zellen und Lymphozyten bereits gezeigt (Pradhan und Morrow 2002). Die Autoren konnten nachweisen, dass βI-Spectrin über Ankyrin während der Aktivierung der Jurkat T-Zellen die Ansammlung von CD45 und CD3 an der Zelloberfläche unterdrückt. Hermosilla et al. (2006) konnten bei durch *E. bovis* infizierten BUVEC zeigen, dass die direkt nach der Infektion

zunächst stark gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen im Verlauf der Infektion deutlich rückläufig war. Insbesondere bei einer parasitären Infektion im Bereich des Endothels stellt dies eine extrem wichtige Funktion dar, da eine ständige Auseinandersetzung mit den vorbeifließenden Immunzellen stattfindet und damit ein fortwährender Angriff des Immunsystems auf die infizierte Zelle erfolgen würde. Eine verminderte Expression von Oberflächenmolekülen bewirkt somit eine Art „molekulares Mimikry“ der infizierten Wirtszelle, da sie für die vorbeifließenden Immunzellen nicht als infizierte Zelle erkennbar ist. Auch diese Veränderungen könnten durch eine Interaktion des Parasiten mit dem Zytoskelett induziert werden. Ob dies jedoch tatsächlich der Fall ist, ist derzeit noch nicht bekannt.

Es besteht die Möglichkeit, dass der Parasit auch eine, zumindest indirekte, Steuerung der Ca^{2+}-Kanäle, der Na-K-ATPasen und der Protonenpumpen durch die Veränderungen der Spectrinkonzentration bewirken könnte. Passende Ergebnisse konnten in Nierenzellen (Woroniecki et al. 2003), in Nervenzellen (Sunderland et al. 2000) und in Darmepthelien von *D. melanogaster* (Phillips und Thomas 2006) gewonnen werden. So bindet beispielsweise ein Ankyrin-Spectrin-Komplex an die Na-K-ATPase der gesunden Nierenzelle. Nach einer renalen Ischämie kommt es zu einem Verlust des Kontaktes zwischen Spectrin und Ankyrin und damit zu einem Verlust der Polarität der Na-K-ATPase. Dies könnte für den Parasiten eine Steuerungsmöglichkeit der Zellpolarität sein. Die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration scheint Einfluss auf den Egress intrazellulärer Parasiten zu haben. Für *T. gondi* und *N. caninum* konnten mehrere Arbeitsgruppen (Stommel et al. 1997; Black et al. 2000; Behrendt et al. 2008) nachweisen, dass eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration zum frühzeitigen und synchronen Egress intrazellulärer Stadien führt. Ein ähnliches Ergebnis fanden Ellison et al. (2001) für *Sarcocystis neurona.* Dabei führte eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} bei *In-vitro*-Kulturen zu einer synchronen Freisetzung der Merozoiten. Bei *E. bovis* scheint die Induktion des Egresses nach Behrendt et al. (2008) komplexer zu verlaufen. Im Gegensatz zu *N. caninum* und *T. gondi* ließ sich bei *E. bovis* durch Zugabe des Calcium Ionophores A23187 kein gleichzeitiger Egress der Parasiten induzieren. Über eine Steuerung der Ca^{2+}-Kanäle könnte *E. bovis* einen frühzeitigen Egress verhindern oder den regulären Egress der Merozoiten aus den reifen Schizonten

regulieren. Darüber hinaus könnten über eine Steuerung der Signaltransduktion an Ionenkanälen durch *E. bovis* verschiedenste zelluläre Mechanismen beeinflusst werden.

Beim Egress der Merozoiten kommt es zur lokalen Eröffnung des Schizonten und der BUVEC-Zelle. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es hierbei zu einer Unterbrechung des Spectrinsaums der PV um den Schizonten sowie des wirtszelleigenen Spectringerüsts kommt. Mitunter könnte hierfür eine gezielte Lyse der Membranen verantwortlich sein, die durch den Parasiten ausgelöst wird. Dies würde zu Ergebnissen passen, die auch bei *P. falciparum* eine Lyse der Erythrozytenmembran und der parasitophoren Vakuole vermuten lassen (Salmon et al. 2001; Hanspal et al. 2002).

Über welche Mechanismen eine gezielte Lyse der Wirtszelle und der PV durch den Parasiten induziert wird, ist derzeit noch nicht geklärt. Dies könnte sich durch eine gezielte Beeinflussung von Sekretions- und Exkretionsprozessen erklären lassen. Über eine Änderung der Spectrinkonzentration könnte der Parasit hierüber eine lokale Lyse steuern. Eine Beteiligung von Spectrin am Transport und der Ausschüttung von präsynaptischen Vesikeln in Nervenzellen konnten Sikorski et al. (2000) bereits nachweisen. Auch in höherorganisierten Organismen (*D. melanogaster* und *X. laevis*) gibt es Hinweise, dass Spectrin für den Transport von Vesikeln mit verantwortlich ist (Aspengren und Wallin 2004; Phillips und Thomas 2006). Zudem könnte der Parasit den Vesikeltransport nutzen, um Vesikel an der PV andocken zu lassen und zum Beispiel gezielt Proteine und Aminosäuren für seine Reproduktion zu erhalten.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Spectrin des Zytoskeletts von bovinen Endothelzellen nach Infektion mit dem Rinderkokzid Eimeria bovis mittels Laserkonfokalmikroskopie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers vom Kaninchen gegen α/β-Spectrin näher untersucht.

Im Verlauf der Infektion konnte eine deutliche Zunahme der gesamten zellulären Spectrinkonzentration nachgewiesen werden. Ein leichter Anstieg der Spectrinkonzentration fand sich vom 8. auf den 15. Tag post infectionem (p. i.), ein deutlicher Anstieg, parallel zur deutlichen Größenzunahme des Makroschizonten, vom 15. auf den 20. Tag p. i.. Ein Großteil der Spectrinmoleküle fand sich dabei innerhalb der parasitophoren Vakuole (PV). Hierbei könnte es sich um ein in dieser Arbeit erstmals nachgewiesenes, zumindest α-Spectrin-ähnliches, parasitenspezifisches Protein handeln.

Während der *In-vitro*-Untersuchung fiel auf, dass *E. bovis*-Schizonten und –Merozoiten ebenfalls eine Fluoreszenz aufwiesen. Eine direkte oder unspezifische Reaktion des Farbstoffes mit einem anderen Parasiten- oder Wirtszellprotein konnte durch ergänzende Untersuchungen ausgeschlossen werden. Damit konnte eine E. bovis-spezifische α-Spectrinisoform charakterisiert werden. Die Veränderungen des spectrinhaltigen Zytoskeletts der endothelialen Wirtszelle waren im Vergleich zur Zunahme des Spectrins der Parasiten nur gering und mit der Konfokalmikroskopie aufgrund der eingeschränkten Auflösung nicht voneinander zu trennen. Da sich in der Konfokalmikroskopie viel angefärbtes Spectrin im Bereich der PV und der Parasiten fand, muss davon ausgegangen werden, dass der Großteil des gemessenen Spectrins insbesondere in den späten Infektionsstadien vom Parasiten stammt.

Es fanden sich zudem Hinweise, dass E. bovis zum Egress aus der Wirtszelle eine lokale Lyse des Spectrinzytoskeletts bewirken könnte. Am 20. Tag p. i. waren lokale Unterbrechungen des Spectrinzytoskeletts der Wirtszelle und der PV zu beobachten, und es kam zu einem gerichteten Merozoiten-I-Egress aus den befallenen Wirtszellen. Dabei blieb das übrige Spectrinzytoskelett intakt. Eine vollständige oder ungezielte Zerstörung der Wirtszelle im Sinne eines Platzens fand nicht statt. Die genauen

Mechanismen, die der Parasit zur lokalen Lyse einsetzt, blieben in der vorliegenden Studie ungeklärt. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

E. bovis ist verwandt mit humanpathogenen apikomplexen Parasiten wie z. B. Toxoplasma gondii und Cryptosporidium parvum. Aus diesem Grund könnten die hier verwendeten Systeme auch als Modell für weitere Forschungen an diesen zoonotisch relevanten Parasiten dienen.

9 Summary

In the current study the spectrin content as part of the cytoskeleton of bovine endothelial cells was examined after infection with the bovine coccidian parasite *Eimeria bovis* by the use of laser confocal microscopy.

In the course of the intracellular development of *E. bovis* the cellular content of spectrin in infected host cells increased significantly when compared to non-infected controls. A first slight increase was found starting 8 - 15 days post infection (p. i), which coincides with the onset of parasite multiplication and enlargement of infected host cells. A further spectrin increase occurred with the maturation of *E. bovis*-macroschizonts from 15 - 20 days p. i.. The highest concentration of spectrin molecules was observed within the parasitophorus vacuole (PV), whereas changes of the spectrin content of the host cell itself were comparatively low. Correspondingly, specific binding of the anti-spectrin antibody was also observed within the schizont and the merozoits I. Thus it could be shown for the first time that *E. bovis* synthesizes a molecule at least partially identical to alpha spectrin. The occurrence of this material within the PV suggests it is released by the parasite into its environment. Otherwise, the presence of these spectrin-related components in *E. bovis* merozoite stages and schizonts interferes with an exact mesurement of host cell spectrin content and its potentially parasite induced modulation.

However, host cell cytoskeleton spectrin seems to be involved at least in the merozoite egress from the host cell after final maturation of the schizont around day 20 p.i.. There occurred a small, focal rupture of the host cell spectrin layer, possibly facilitating the egress of merozoites from the infected cells. Prior to this rupture the egress of merozoites was limited. The residual portion of the spectrin cytoskeleton remained intact. Whether the parasite *E. bovis* actively induced this local lysis remains unclear. Further research related to the topic of egress mechanism of intracellular apicomplexan parasites from infected host cells are needed.

Other obligate intracellular parasites closely related to *E. bovis,* such as the zoonotic relevant species *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum,* might have evolved similar strategies to survive within infected host cells. Thus, the *E. bovis* – endothelial

cell system employed in the present study could serve as a model system also for these parasites.

10 Literatur

Adams, J. H. and Todd, K. S., Jr. (1983). "Transmission electron microscopy of intracellular sporozoites of Eimeria vermiformis (Apicomplexa, Eucoccidiida) in the mouse." *J Protozool* **30**(1): 114-118.

Alcina, A., Hargreaves, A. J., Avila, J., Hesketh, J. E. and Fresno, M. (1988). "The detection of a spectrin-like protein in Trypanosoma cruzi with a polyclonal antibody." *Cell Biol Int Rep* **12**(11): 979-985.

Alison, M. R., Hunt, T. and Forbes, S. J. (2002). "Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers." *Gut* **50**(3): 290-291.

Alon, R. and Feigelson, S. (2002). "From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts." *Semin Immunol* **14**(2): 93-104.

Aly, A. S. and Matuschewski, K. (2005). "A malarial cysteine protease is necessary for Plasmodium sporozoite egress from oocysts." *J Exp Med* **202**(2): 225-230.

Arnold, R. and Konig, W. (2005). "Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively intercellular adhesion molecule-1 expression." *J Immunol* **174**(11): 7359-7367.

Aspengren, S. and Wallin, M. (2004). "A role for spectrin in dynactin-dependent melanosome transport in Xenopus laevis melanophores." *Pigment Cell Res* **17**(3): 295-301.

Awolesi, M. A., Widmann, M. D., Sessa, W. C. and Sumpio, B. E. (1994). "Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity." *Surgery* **116**(2): 439-444; discussion 444-435.

Baines, A. J. and Pinder, J. C. (2005). "The spectrin-associated cytoskeleton in mammalian heart." *Front Biosci* **10**: 3020-3033.

Bannister, L. H. and Mitchell, G. H. (1995). "The role of the cytoskeleton in Plasmodium falciparum merozoite biology: an electron-microscopic view." *Ann Trop Med Parasitol* **89**(2): 105-111.

Barkalow, K. L., Italiano, J. E., Jr., Chou, D. E., Matsuoka, Y., Bennett, V. and Hartwig, J. H. (2003). "Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation." *J Cell Biol* **161**(3): 557-570.

Beaudoin, R. L. and Strome, C. P. (1973). "Plasmodium lophurae: the ultrastructure of the exoerythrocytic stages." *Exp Parasitol* **34**(3): 313-336.

Beck, K. A., Buchanan, J. A., Malhotra, V. and Nelson, W. J. (1994). "Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex." *J Cell Biol* **127**(3): 707-723.

Beck, K. A., Buchanan, J. A. and Nelson, W. J. (1997). "Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex." *J Cell Sci* **110 (Pt 10)**: 1239-1249.

Becker, P. S., Tse, W. T., Lux, S. E. and Forget, B. G. (1993). "Beta spectrin kissimmee: a spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1." *J Clin Invest* **92**(2): 612-616.

Behrendt, J. H., Clauss, W., Zahner, H. and Hermosilla, C. (2004). "Alternative mechanism of Eimeria bovis sporozoites to invade cells in vitro by breaching the plasma membrane." *J Parasitol* **90**(5): 1163-1165.

Behrendt, J. H., Taubert, A., Zahner, H. and Hermosilla, C. (2008). "Studies on synchronous egress of coccidian parasites (Neospora caninum, Toxoplasma gondii, Eimeria bovis) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187." *Vet Res Commun* **32**(4): 325-332.

Benjamim, C. F., Silva, J. S., Fortes, Z. B., Oliveira, M. A., Ferreira, S. H. and Cunha, F. Q. (2002). "Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils." *Infect Immun* **70**(7): 3602-3610.

Bennett, P. M., Baines, A. J., Lecomte, M. C., Maggs, A. M. and Pinder, J. C. (2004). "Not just a plasma membrane protein: in cardiac muscle cells alpha-II spectrin also shows a close association with myofibrils." *J Muscle Res Cell Motil* **25**(2): 119-126.

Bennett, V. (1990). "Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm." *Physiol Rev* **70**(4): 1029-1065.

Bennett, V. and Baines, A. J. (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." *Physiol Rev* **81**(3): 1353-1392.

Bennett, V. and Gilligan, D. M. (1993). "The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane." *Annu Rev Cell Biol* **9**: 27-66.

Berghs, S., Aggujaro, D., Dirkx, R., Jr., Maksimova, E., Stabach, P., Hermel, J. M., Zhang, J. P., Philbrick, W., Slepnev, V., Ort, T. and Solimena, M. (2000). "betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system." *J Cell Biol* **151**(5): 985-1002.

Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V. and Kappe, S. H. (2003). "Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites." *J Cell Sci* **116**(Pt 1): 39-49.

Black, M. W., Arrizabalaga, G. and Boothroyd, J. C. (2000). "Ionophore-resistant mutants of Toxoplasma gondii reveal host cell permeabilization as an early event in egress." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9399-9408.

Bloch, R. J. and Morrow, J. S. (1989). "An unusual beta-spectrin associated with clustered acetylcholine receptors." *The Journal of cell biology* **108**(2): 481-493.

Bonfoco, E., Ceccatelli, S., Manzo, L. and Nicotera, P. (1995). "Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells." *Experimental cell research* **218**(1): 189-200.

Bundgaard, M. (1984). "The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy." *J Ultrastruct Res* **88**(1): 1-17.

Bürger, H. J. (1983). "Eimeria Infektionen beim Rind." *Berlin München Tierärztliche Wochenschrift*(69): 350-357.

Byers, T. J., Brandin, E., Lue, R. A., Winograd, E. and Branton, D. (1992). "The complete sequence of Drosophila beta-spectrin reveals supra-motifs comprising eight 106-residue segments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6187-6191.

Byers, T. J. and Branton, D. (1985). "Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(18): 6153-6157.

Carlos, T. M., Schwartz, B. R., Kovach, N. L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R. and et al. (1990). "Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells." *Blood* **76**(5): 965-970.

Carruthers, V. B. and Sibley, L. D. (1997). "Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts." *Eur J Cell Biol* **73**(2): 114-123.

Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. and Ingber, D. E. (1997). "Geometric control of cell life and death." *Science* **276**(5317): 1425-1428.

Chiappino, M. L., Nichols, B. A. and O'Connor, G. R. (1984). "Scanning electron microscopy of Toxoplasma gondii: parasite torsion and host-cell responses during invasion." *J Protozool* **31**(2): 288-292.

Chobotar, B. and Scholtyseck, E. (1982). Ultrastructure. *The Biology of the Coccidia*. Long, P. L. Baltimore, University Park Press**:** 101-165.

Chu, Z. L., Wickrema, A., Krantz, S. B. and Winkelmann, J. C. (1994). "Erythroid-specific processing of human beta spectrin I pre-mRNA." *Blood* **84**(6): 1992-1999.

Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C. and Joiner, K. A. (2006). "Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space." *Cell* **125**(2): 261-274.

Damjanov, I., Damjanov, A. and Damsky, C. H. (1986). "Developmentally regulated expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in peri-implantation mouse embryos and extraembryonic membranes." *Dev Biol* **116**(1): 194-202.

Daugschies, A., Akimaru, M. and Burger, H. J. (1986). "[Experimental Eimeria bovis infections in the calf: 1. Parasitologic and clinical findings]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **93**(9): 393-397.

de Cuevas, M., Lee, J. K. and Spradling, A. C. (1996). "alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the Drosophila ovary." *Development* **122**(12): 3959-3968.

De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (1998). "The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation." *Curr Opin Cell Biol* **10**(4): 542-549.

De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (2000). "Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway." *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**: 2331-2343.

De Ruijter, N. C., Ketelaar, T., Blumenthal, S. S., Emons, A. M. and Schel, J. H. (2000). "Spectrin-like proteins in plant nuclei." *Cell Biol Int* **24**(7): 427-438.

Deng, H., Lee, J. K., Goldstein, L. S. and Branton, D. (1995). "Drosophila development requires spectrin network formation." *J Cell Biol* **128**(1-2): 71-79.

Devarajan, P., Stabach, P. R., De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (1997). "Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10711-10716.

Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D. and Joiner, K. A. (1993). "Kinetics and pattern of organelle exocytosis during Toxoplasma gondii/host-cell interaction." *Parasitol Res* **79**(5): 402-408.

Dubremetz, J. F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V. and Fourmaux, M. N. (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." *Int J Parasitol* **28**(7): 1007-1013.

Dubreuil, R. R., Byers, T. J., Sillman, A. L., Bar-Zvi, D., Goldstein, L. S. and Branton, D. (1989). "The complete sequence of Drosophila alpha-spectrin: conservation of structural domains between alpha-spectrins and alpha-actinin." *J Cell Biol* **109**(5): 2197-2205.

Dubreuil, R. R., Byers, T. J., Stewart, C. T. and Kiehart, D. P. (1990). "A beta-spectrin isoform from Drosophila (beta H) is similar in size to vertebrate dystrophin." *J Cell Biol* **111**(5 Pt 1): 1849-1858.

Dubreuil, R. R., Maddux, P. B., Grushko, T. A. and MacVicar, G. R. (1997). "Segregation of two spectrin isoforms: polarized membrane-binding sites direct polarized membrane skeleton assembly." *Mol Biol Cell* **8**(10): 1933-1942.

Dubreuil, R. R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J. and Goldstein, L. S. (2000). "Drosophila beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells." *J Cell Biol* **149**(3): 647-656.

Eckert, J. (1998). Parasitologie. *Medizinische Mikrobiologie*. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. **9:** 585-555.

Eckert, J., Kutzer, E., Rommel, M., Bürger, H. J. and Körting, W. (1992). *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Berlin & Hamburg, Paul Parey Verlag.

Elliott, D. A. and Clark, D. P. (2000). "Cryptosporidium parvum induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface." *Infect Immun* **68**(4): 2315-2322.

Elliott, D. A., Coleman, D. J., Lane, M. A., May, R. C., Machesky, L. M. and Clark, D. P. (2001). "Cryptosporidium parvum infection requires host cell actin polymerization." *Infection and immunity* **69**(9): 5940-5942.

Ellison, S. P., Greiner, E. and Dame, J. B. (2001). "In vitro culture and synchronous release of Sarcocystis neurona merozoites from host cells." *Vet Parasitol* **95**(2-4): 251-261.

Ernst, J. V. and Benz, G. W. (1986). "Intestinal coccidiosis in cattle." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **2**(2): 283-291.

Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." *Biochemistry* **10**(13): 2606-2617.

Fernando, M. A. (1990). Eimeria: Infections of the intestine. *Coccidiosis of man an domestic anmimals*. Long, P. L. Boca Raton, Florida, CRC Press**:** 63-75.

Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H. and Burger, H. J. (1992). "Eimeria bovis in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections." *Parasitology research* **78**(1): 32-38.

Fitzgerald, P. R. (1980). "The economic impact of coccidiosis in domestic animals." *Adv Vet Sci Comp Med* **24**: 121-143.

Forero, C. and Wasserman, M. (2000). "Isolation and identification of actin-binding proteins in Plasmodium falciparum by affinity chromatography." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**(3): 329-337.

Frixione, E., Mondragon, R. and Meza, I. (1996). "Kinematic analysis of Toxoplasma gondii motility." *Cell Motil Cytoskeleton* **34**(2): 152-163.

Ghazali, M., Rodier, M. H., el Moudni, B. E., Babin, P., Fernandez, B. and Jacquemin, J. L. (1995). "Detection and immunolocalization of human erythrocyte spectrin immunoanalogues in Toxoplasma gondii (Protozoan, Parasite)." *J Eukaryot Microbiol* **42**(4): 427-433.

Graat, E. A., Henken, A. M., Ploeger, H. W., Noordhuizen, J. P. and Vertommen, M. H. (1994). "Rate and course of sporulation of oocysts of Eimeria acervulina under different environmental conditions." *Parasitology* **108 (Pt 5)**: 497-502.

Grafner, G. and Graubmann, H. D. (1979). "[Remarks on the pathogenicity of Eimeria species exemplified by cattle coccidiosis]." *Angew Parasitol* **20**(4): 202-209.

Grum, V. L., Li, D., MacDonald, R. I. and Mondragon, A. (1999). "Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility." *Cell* **98**(4): 523-535.

Gründer, H. D. (2006). Kokzidiose. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Dirksen, G., Gründer, H. D. and Stöber, M. Berlin & Hamburg, Paul Parey Verlag. **5:** 607-611.

Hammarlund, M., Davis, W. S. and Jorgensen, E. M. (2000). "Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure." *J Cell Biol* **149**(4): 931-942.

Hammond, D. M., Andersen, F. L. and Miner, M. L. (1963). "The occurrence of a second asexual generation in the life cycle of Eimeria bovis in calves." *J Parasitol* **49**: 428-434.

Hammond, D. M., Bowman, G. W. and et al. (1946). "The endogenous phase of the life cycle of Eimeria bovis." *J Parasitol* **32**: 409-427.

Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A. H. and Mizuno, A. (2002). "Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development." *Blood* **100**(3): 1048-1054.

Hepler, P. K., Huff, C. G. and Sprinz, H. (1966). "The fine structure of the exoerythrocytic stages of Plasmodium fallax." *J Cell Biol* **30**(2): 333-358.

Herm-Gotz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhofer, E., Soldati, T., Manstein, D. J., Geeves, M. A. and Soldati, D. (2002). "Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor." *EMBO J* **21**(9): 2149-2158.

Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S. and Zahner, H. (2002). "Development of Eimeria bovis in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells." *Parasitol Res* **88**(4): 301-307.

Hermosilla, C., Schropfer, E., Stowasser, M., Eckstein-Ludwig, U., Behrendt, J. H. and Zahner, H. (2008). "Cytoskeletal changes in Eimeria bovis-infected host endothelial cells during first merogony." *Vet Res Commun* **32**(7): 521-531.

Hermosilla, C., Zahner, H. and Taubert, A. (2006). "Eimeria bovis modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells." *Int J Parasitol* **36**(4): 423-431.

Hollenberg, S. M., Guglielmi, M. and Parrillo, J. E. (2007). "Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice." *Crit Care* **11**(6): R125.

Holleran, E. A. and Holzbaur, E. L. (1998). "Speculating about spectrin: new insights into the Golgi-associated cytoskeleton." *Trends Cell Biol* **8**(1): 26-29.

Holzinger, A., De Ruijter, N., Emons, A. M. and Lutz-Meindl, U. (1999). "Spectrin-like proteins in green algae (Desmidiaceae)." *Cell biology international* **23**(5): 335-344.

Hu, R. J., Watanabe, M. and Bennett, V. (1992). "Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of beta-spectrin." *J Biol Chem* **267**(26): 18715-18722.

Huebner, K., Palumbo, A. P., Isobe, M., Kozak, C. A., Monaco, S., Rovera, G., Croce, C. M. and Curtis, P. J. (1985). "The alpha-spectrin gene is on chromosome 1 in mouse and man." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(11): 3790-3793.

Iga, M., Inui, M. and Sobue, K. (1997). "Characterization of the interaction between synapsin I and calspectin (brain spectrin or fodrin)." *Biochem Biophys Res Commun* **231**(3): 852-855.

Jenkins, S. M. and Bennett, V. (2001). "Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments." *J Cell Biol* **155**(5): 739-746.

Ji, T. H., Kiehm, D. J. and Middaugh, C. R. (1980). "Presence of spectrin tetramer on the erythrocyte membrane." *J Biol Chem* **255**(7): 2990-2993.

Johnstone, C. (2000). Eimeria bovis - life cycle. *Parasites and parasitic diseases of domestic animals - an online book of text and images.*

Kapessidou, Y., Habran, C., Buonocore, S., Flamand, V., Barvais, L., Goldman, M. and Braun, M. Y. (2006). "The replacement of graft endothelium by recipient-type cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4+ T cells." *Transplantation* **82**(4): 582-591.

King, C. A. (1988). "Cell motility of sporozoan protozoa." *Parasitol Today* **4**(11): 315-319.

Kogut, M. H. (1990). Host specifity of the coccidia. *Coccidiosis of man and domestic animals.* Long, P. L. Boca Raton, Florida, CRC Press**:** 43-62.

Komada, M. and Soriano, P. (2002). "[Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier." *J Cell Biol* **156**(2): 337-348.

Kordeli, E. (2000). "The spectrin-based skeleton at the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction." *Microsc Res Tech* **49**(1): 101-107.

Lacas-Gervais, S., Guo, J., Strenzke, N., Scarfone, E., Kolpe, M., Jahkel, M., De Camilli, P., Moser, T., Rasband, M. N. and Solimena, M. (2004). "BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments." *J Cell Biol* **166**(7): 983-990.

Larsen, T. H., Dalen, H., Boyle, R., Souza, M. M. and Lieberman, M. (2000). "Cytoskeletal involvement during hypo-osmotic swelling and volume regulation in cultured chick cardiac myocytes." *Histochem Cell Biol* **113**(6): 479-488.

Le Bonniec, S., Deregnaucourt, C., Redeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg, D. E. and Schrevel, J. (1999). "Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the Plasmodium falciparum food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton." *J Biol Chem* **274**(20): 14218-14223.

Lee, J. K., Brandin, E., Branton, D. and Goldstein, L. S. (1997). "alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in Drosophila melanogaster." *Development* **124**(2): 353-362.

Lee, J. K., Coyne, R. S., Dubreuil, R. R., Goldstein, L. S. and Branton, D. (1993). "Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of Drosophila melanogaster." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 2): 1797-1809.

Leriche, M. A. and Dubremetz, J. F. (1990). "Exocytosis of Toxoplasma gondii dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion." *Parasitol Res* **76**(7): 559-562.

Leto, T. L., Fortugno-Erikson, D., Barton, D., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Harris, A. S., Morrow, J. S., Marchesi, V. T. and Benz, E. J., Jr. (1988). "Comparison of

nonerythroid alpha-spectrin genes reveals strict homology among diverse species." *Mol Cell Biol* **8**(1): 1-9.

Levine, J. and Willard, M. (1983). "Redistribution of Fodrin (a Component of the Cortical Cytoplasm) Accompanying Capping of Cell-Surface Molecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**(1): 191-195.

Levine, N. D. (1970). "Taxonomy of the Sporozoa." *J Parasitol* **56**: 208-209.

Lingelbach, K. and Joiner, K. A. (1998). "The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells." *J Cell Sci* **111 (Pt 11)**: 1467-1475.

Lippincott-Schwartz, J. (1998). "Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics." *Curr Opin Cell Biol* **10**(1): 52-59.

Liu, S. C., Derick, L. H. and Palek, J. (1987). "Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton." *J Cell Biol* **104**(3): 527-536.

Long, P. L. (1978). The problem of coccidiosis: general considerations. *Avian Coccidiosis*. Long, P. L., Boormann, K. N. and Freeman, B. M. Edinburgh, British poultry science Ltd.**:** 3-28.

Ma, Y., Zimmer, W. E., Riederer, B. M., Bloom, M. L., Barker, J. E., Goodman, S. M. and Goodman, S. R. (1993). "The complete amino acid sequence for brain beta spectrin (beta fodrin): relationship to globin sequences." *Brain Res Mol Brain Res* **18**(1-2): 87-99.

Mangeat, P. H. and Burridge, K. (1984). "Immunoprecipitation of nonerythrocyte spectrin within live cells following microinjection of specific antibodies: relation to cytoskeletal structures." *J Cell Biol* **98**(4): 1363-1377.

Marchesi, V. T. and Steers, E., Jr. (1968). "Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane." *Science* **159**(3811): 203-204.

Martin, L., Guilbeau, C., Bocrie, O., Rageot, D., Rifle, G., Justrabo, E. and Mousson, C. (2006). "Expression of TGFbeta-1 and Type I TGFbeta-receptor on sequential biopsies of renal transplants with chronic allograft nephropathy." *Transplant Proc* **38**(7): 2327-2329.

Mazanet, M. M. and Hughes, C. C. (2002). "B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis." *Journal of immunology* **169**(7): 3581-3588.

McKeown, C., Praitis, V. and Austin, J. (1998). "sma-1 encodes a betaH-spectrin homolog required for Caenorhabditis elegans morphogenesis." *Development* **125**(11): 2087-2098.

Michalak, K., Bobrowska, M. and Sikorski, A. F. (1993). "Interaction of bovine erythrocyte spectrin with aminophospholipid liposomes." *Gen Physiol Biophys* **12**(2): 163-170.

Millonig, G., Niederegger, H., Rabl, W., Hochleitner, B. W., Hoefer, D., Romani, N. and Wick, G. (2001). "Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(4): 503-508.

Mishra, L., Cai, T., Levine, A., Weng, D., Mezey, E., Mishra, B. and Gearhart, J. (1998). "Identification of elf1, a beta-spectrin, in early mouse liver development." *Int J Dev Biol* **42**(2): 221-224.

Mondragon, R. and Frixione, E. (1996). "Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in Toxoplasma gondii tachyzoites." *J Eukaryot Microbiol* **43**(2): 120-127.

Monteiro, V. G., de Melo, E. J., Attias, M. and de Souza, W. (2001). "Morphological changes during conoid extrusion in Toxoplasma gondii tachyzoites treated with calcium ionophore." *J Struct Biol* **136**(3): 181-189.

Moorthy, S., Chen, L. and Bennett, V. (2000). "Caenorhabditis elegans beta-G spectrin is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function." *J Cell Biol* **149**(4): 915-930.

Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L. D. (1999). "Invasion by Toxoplasma gondii establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring." *J Exp Med* **190**(12): 1783-1792.

Morrissette, N. S. and Sibley, L. D. (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(1): 21-38; table of contents.

Morrow, J. S., Cianci, C. D., Ardito, T., Mann, A. S. and Kashgarian, M. (1989). "Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na,K-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells." *J Cell Biol* **108**(2): 455-465.

Mukherjee, S., Huang, H., Petkova, S. B., Albanese, C., Pestell, R. G., Braunstein, V. L., Christ, G. J., Wittner, M., Lisanti, M. P., Berman, J. W., Weiss, L. M. and Tanowitz, H. B. (2004). "Trypanosoma cruzi infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells." *Infect Immun* **72**(9): 5274-5282.

Nelson, W. J. and Hammerton, R. W. (1989). "A membrane-cytoskeletal complex containing Na+,K+-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity." *The Journal of cell biology* **108**(3): 893-902.

Nelson, W. J., Shore, E. M., Wang, A. Z. and Hammerton, R. W. (1990). "Identification of a membrane-cytoskeletal complex containing the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin), ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." *The Journal of cell biology* **110**(2): 349-357.

Nelson, W. J. and Veshnock, P. J. (1986). "Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." *The Journal of cell biology* **103**(5): 1751-1765.

Nelson, W. J. and Veshnock, P. J. (1987a). "Ankyrin binding to (Na+ + K+)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells." *Nature* **328**(6130): 533-536.

Nelson, W. J. and Veshnock, P. J. (1987b). "Modulation of fodrin (membrane skeleton) stability by cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." *J Cell Biol* **104**(6): 1527-1537.

Nicholls, S. M., Banerjee, S., Figueiredo, F. C., Crome, S., Mistry, S., Easty, D. L. and Dick, A. D. (2006). "Differences in leukocyte phenotype and interferon-gamma expression in stroma and endothelium during corneal graft rejection." *Exp Eye Res* **83**(2): 339-347.

Nichols, B. A. and Chiappino, M. L. (1987). "Cytoskeleton of Toxoplasma gondii." *J Protozool* **34**(2): 217-226.

Niebauer, J., Schwarzacher, S. P., Hayase, M., Wang, B., Kernoff, R. S., Cooke, J. P. and Yeung, A. C. (1999). "Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis." *Circulation* **100**(17): 1830-1835.

Nyberg, P. A. and Hammond, D. M. (1964). "Excystation of Eimeria Bovis and Other Species of Bovine Coccidia." *J Protozool* **11**: 474-480.

Ogino, N. and Yoneda, C. (1966). "The fine structure and mode of division of Toxoplasma gondii." *Arch Ophthalmol* **75**(2): 218-227.

Oh, S. S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S. J., LeRoy, P. J., Derick, L. H., Liu, S. and Chishti, A. H. (2000). "Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton." *Mol Biochem Parasitol* **108**(2): 237-247.

Ohara, O., Ohara, R., Yamakawa, H., Nakajima, D. and Nakayama, M. (1998). "Characterization of a new beta-spectrin gene which is predominantly expressed in brain." *Brain Res Mol Brain Res* **57**(2): 181-192.

Parquet, N., Devaux, I., Boulanger, L., Galand, C., Boivin, P., Lecomte, M. C., Dhermy, D. and Garbarz, M. (1994). "Identification of three novel spectrin alpha I/74 mutations in hereditary elliptocytosis: further support for a triple-stranded folding unit model of the spectrin heterodimer contact site." *Blood* **84**(1): 303-308.

Pei, X., An, X., Guo, X., Tarnawski, M., Coppel, R. and Mohandas, N. (2005). "Structural and functional studies of interaction between Plasmodium falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin." *J Biol Chem* **280**(35): 31166-31171.

Perrin, D. and Aunis, D. (1985). "Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells." *Nature* **315**(6020): 589-592.

Perrin, D., Langley, O. K. and Aunis, D. (1987). "Anti-alpha-fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells." *Nature* **326**(6112): 498-501.

Perrotta, S., Miraglia del Giudice, E., Alloisio, N., Sciarratta, G., Pinto, L., Delaunay, J., Cutillo, S. and Iolascon, A. (1994). "Mild elliptocytosis associated with the alpha 34 Arg-->Trp mutation in spectrin Genova (alpha I/74)." *Blood* **83**(11): 3346-3349.

Phillips, M. D. and Thomas, G. H. (2006). "Brush border spectrin is required for early endosome recycling in Drosophila." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1361-1370.

Pielage, J., Fetter, R. D. and Davis, G. W. (2005). "Presynaptic spectrin is essential for synapse stabilization." *Curr Biol* **15**(10): 918-928.

Pober, J. S. (2002). "Endothelial activation: intracellular signaling pathways." *Arthritis Res* **4 Suppl 3**: S109-116.

Pollard, T. D. (1984). "Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from Acanthamoeba that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins." *J Cell Biol* **99**(6): 1970-1980.

Porchet-Hennere, E. and Nicolas, G. (1983). "Are rhoptries of Coccidia really extrusomes?" *J Ultrastruct Res* **84**(2): 194-203.

Pradhan, D. and Morrow, J. (2002). "The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production." *Immunity* **17**(3): 303-315.

Riederer, B. M., Lopresti, L. L., Krebs, K. E., Zagon, I. S. and Goodman, S. R. (1988). "Brain spectrin(240/235) and brain spectrin(240/235E): conservation of structure and location within mammalian neural tissue." *Brain Res Bull* **21**(4): 607-616.

Roberts, W. L. and Hammond, D. M. (1970). "Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four Eimeria species." *J Protozool* **17**(1): 76-86.

Rommel, M. (1992). Protozoen. *Veterinärmedizinische Prasitologie*. Eckert, J., Kutzer, E., Rommel, M. and Bürger, H. J. Berlin & Hamburg, Paul Parey Verlag. **4:** 109-173.

Rotter, B., Bournier, O., Nicolas, G., Dhermy, D. and Lecomte, M. C. (2005). "AlphaII-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts." *Biochem J* **388**(Pt 2): 631-638.

Rydkina, E., Sahni, A., Baggs, R. B., Silverman, D. J. and Sahni, S. K. (2006). "Infection of human endothelial cells with spotted Fever group rickettsiae stimulates cyclooxygenase 2 expression and release of vasoactive prostaglandins." *Infect Immun* **74**(9): 5067-5074.

Ryning, F. W. and Remington, J. S. (1978). "Effect of cytochalasin D on Toxoplasma gondii cell entry." *Infect Immun* **20**(3): 739-743.

Sahr, K. E., Coetzer, T. L., Moy, L. S., Derick, L. H., Chishti, A. H., Jarolim, P., Lorenzo, F., Miraglia del Giudice, E., Iolascon, A., Gallanello, R. and et al. (1993). "Spectrin cagliari. an Ala-->Gly substitution in helix 1 of beta spectrin repeat 17 that severely disrupts the structure and self-association of the erythrocyte spectrin heterodimer." *J Biol Chem* **268**(30): 22656-22662.

Sahr, K. E., Laurila, P., Kotula, L., Scarpa, A. L., Coupal, E., Leto, T. L., Linnenbach, A. J., Winkelmann, J. C., Speicher, D. W., Marchesi, V. T. and et al. (1990). "The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid alpha-spectrin." *J Biol Chem* **265**(8): 4434-4443.

Salmon, B. L., Oksman, A. and Goldberg, D. E. (2001). "Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 271-276.

Schwarzacher, S. P., Tsao, P. S., Ward, M., Hayase, M., Niebauer, J., Cooke, J. P. and Yeung, A. C. (2001). "Effects of stenting on adjacent vascular distensibility and neointima formation: role of nitric oxide." *Vasc Med* **6**(3): 139-144.

Shen, B. W., Josephs, R. and Steck, T. L. (1986). "Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane." *J Cell Biol* **102**(3): 997-1006.

Sibley, L. D., Weidner, E. and Krahenbuhl, J. L. (1985). "Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii." *Nature* **315**(6018): 416-419.

Sikorski, A. F., Sangerman, J., Goodman, S. R. and Critz, S. D. (2000). "Spectrin (betaSpIIsigma1) is an essential component of synaptic transmission." *Brain Res* **852**(1): 161-166.

Silva, M. D., Cooke, B. M., Guillotte, M., Buckingham, D. W., Sauzet, J. P., Le Scanf, C., Contamin, H., David, P., Mercereau-Puijalon, O. and Bonnefoy, S. (2005). "A role for the Plasmodium falciparum RESA protein in resistance against heat shock demonstrated using gene disruption." *Mol Microbiol* **56**(4): 990-1003.

Sinai, A. P., Webster, P. and Joiner, K. A. (1997). "Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction." *J Cell Sci* **110 (Pt 17)**: 2117-2128.

Smith, C. W., Kishimoto, T. K., Abbassi, O., Hughes, B., Rothlein, R., McIntire, L. V., Butcher, E. and Anderson, D. C. (1991). "Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro." *J Clin Invest* **87**(2): 609-618.

Sobel, J. S. and Goldstein, E. G. (1988). "Spectrin synthesis in the preimplantation mouse embryo." *Dev Biol* **128**(2): 284-289.

Soldati, D. and Meissner, M. (2004). "Toxoplasma as a novel system for motility." *Curr Opin Cell Biol* **16**(1): 32-40.

Stabach, P. R. and Morrow, J. S. (2000). "Identification and characterization of beta V spectrin, a mammalian ortholog of Drosophila beta H spectrin." *J Biol Chem* **275**(28): 21385-21395.

Stankewich, M. C., Tse, W. T., Peters, L. L., Ch'ng, Y., John, K. M., Stabach, P. R., Devarajan, P., Morrow, J. S. and Lux, S. E. (1998). "A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14158-14163.

Stokkermans, T. J., Schwartzman, J. D., Keenan, K., Morrissette, N. S., Tilney, L. G. and Roos, D. S. (1996). "Inhibition of Toxoplasma gondii replication by dinitroaniline herbicides." *Exp Parasitol* **84**(3): 355-370.

Stommel, E. W., Ely, K. H., Schwartzman, J. D. and Kasper, L. H. (1997). "Toxoplasma gondii: dithiol-induced Ca2+ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole." *Exp Parasitol* **87**(2): 88-97.

Sunderland, W. J., Son, Y. J., Miner, J. H., Sanes, J. R. and Carlson, S. S. (2000). "The presynaptic calcium channel is part of a transmembrane complex linking a synaptic laminin (alpha4beta2gamma1) with non-erythroid spectrin." *J Neurosci* **20**(3): 1009-1019.

Takeichi, M. (1990). "Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion." *Annu Rev Biochem* **59**: 237-252.

Tamaru, S., Fukuta, T., Kaibuchi, K., Matsuoka, Y., Shiku, H. and Nishikawa, M. (2005). "Rho-kinase induces association of adducin with the cytoskeleton in platelet activation." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(2): 347-351.

Taubert, A. and Hermosilla, C. (2008). "Bovine recombinant IFNgamma induces endothelial cell gene transcription of immunoregulatory molecules and upregulates PMN and PBMC adhesion on bovine endothelial cells." *Veterinary research communications* **32**(1): 35-47.

Taubert, A., Hermosilla, C., Behrendt, J. and Zahner, H. (2006a). "[Reaction of bovine endothelial cells in vitro to coccidia (Eimeria bovis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum) infections as the expression of a non-adaptive immune response]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **119**(7-8): 274-281.

Taubert, A., Zahner, H. and Hermosilla, C. (2006b). "Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites." *Vet Parasitol* **142**(3-4): 214-222.

Taubert, A., Zahner, H. and Hermosilla, C. (2007). "Eimeria bovis infection enhances adhesion of peripheral blood mononuclear cells to and their transmigration through an infected bovine endothelial cell monolayer in vitro." *Parasitology research* **101**(3): 591-598.

Thomas, G. H. and Kiehart, D. P. (1994). "Beta heavy-spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during Drosophila embryogenesis." *Development* **120**(7): 2039-2050.

Thomas, G. H., Newbern, E. C., Korte, C. C., Bales, M. A., Muse, S. V., Clark, A. G. and Kiehart, D. P. (1997). "Intragenic duplication and divergence in the spectrin superfamily of proteins." *Mol Biol Evol* **14**(12): 1285-1295.

Thomas, G. H., Zarnescu, D. C., Juedes, A. E., Bales, M. A., Londergan, A., Korte, C. C. and Kiehart, D. P. (1998). "Drosophila betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye." *Development* **125**(11): 2125-2134.

Tsao, N., Hsu, H. P., Wu, C. M., Liu, C. C. and Lei, H. Y. (2001). "Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis." *J Med Microbiol* **50**(9): 812-821.

Tsao, P. S., Wang, B., Buitrago, R., Shyy, J. Y. and Cooke, J. P. (1997). "Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1." *Circulation* **96**(3): 934-940.

van Engeland, M., Ramaekers, F. C., Schutte, B. and Reutelingsperger, C. P. (1996). "A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture." *Cytometry* **24**(2): 131-139.

Wasenius, V. M., Saraste, M., Salven, P., Eramaa, M., Holm, L. and Lehto, V. P. (1989). "Primary structure of the brain alpha-spectrin." *J Cell Biol* **108**(1): 79-93.

Werner, E. B., Taylor, W. R. and Holder, A. A. (1998). "A Plasmodium chabaudi protein contains a repetitive region with a predicted spectrin-like structure." *Mol Biochem Parasitol* **94**(2): 185-196.

Wetzel, R. (1951). "Verbesserte McMaster-Kammer zum auszählen von Wurmeiern. ." *Tierärztliche Umschau* **6**: 209-210.

WHO (2005) "World malaria report.".

Wilson, E., Mai, Q., Sudhir, K., Weiss, R. H. and Ives, H. E. (1993). "Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF." *J Cell Biol* **123**(3): 741-747.

Winkelmann, J. C., Chang, J. G., Tse, W. T., Scarpa, A. L., Marchesi, V. T. and Forget, B. G. (1990a). "Full-length sequence of the cDNA for human erythroid beta-spectrin." *J Biol Chem* **265**(20): 11827-11832.

Winkelmann, J. C., Costa, F. F., Linzie, B. L. and Forget, B. G. (1990b). "Beta spectrin in human skeletal muscle. Tissue-specific differential processing of 3' beta spectrin pre-mRNA generates a beta spectrin isoform with a unique carboxyl terminus." *J Biol Chem* **265**(33): 20449-20454.

Winkelmann, J. C. and Forget, B. G. (1993). "Erythroid and nonerythroid spectrins." *Blood* **81**(12): 3173-3185.

Wong, S. and Molday, R. S. (1986). "A spectrin-like protein in retinal rod outer segments." *Biochemistry* **25**(20): 6294-6300.

Woroniecki, R., Ferdinand, J. R., Morrow, J. S. and Devarajan, P. (2003). "Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia." *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(2): F358-364.

Wu, S., Sangerman, J., Li, M., Brough, G. H., Goodman, S. R. and Stevens, T. (2001). "Essential control of an endothelial cell ISOC by the spectrin membrane skeleton." *The Journal of cell biology* **154**(6): 1225-1233.

Yagi, A. and Paranko, J. (1995). "Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa." *Anat Rec* **241**(1): 77-87.

Yang, Y., Lacas-Gervais, S., Morest, D. K., Solimena, M. and Rasband, M. N. (2004). "BetaIV spectrins are essential for membrane stability and the molecular organization of nodes of Ranvier." *J Neurosci* **24**(33): 7230-7240.

Zarnescu, D. C. and Thomas, G. H. (1999). "Apical spectrin is essential for epithelial morphogenesis but not apicobasal polarity in Drosophila." *J Cell Biol* **146**(5): 1075-1086.

Zimmer, W. E., Ma, Y., Zagon, I. S. and Goodman, S. R. (1992). "Developmental expression of brain beta-spectrin isoform messenger RNAs." *Brain Res* **594**(1): 75-83.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Professor Zahner für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und –materialien sowie für die konstruktive Kritik und die abschliessende Durchsicht meines Manuskriptes herzlich bedanken.

Herrn Professor Beck gebührt mein Dank für die freundliche Betreuung und Durchsicht meiner Arbeit bezüglich der humanmedizinischen Aspekte.

Meine besondere Dankbarkeit gilt Herrn PD Dr. Carlos Hermosilla, der mich über den gesamten Verlauf meiner Arbeit immer mit großer fachlicher Kompetenz und persönlichem Einsatz bei allen auftretenden Problemen und Fragen unterstützt hat.

Sehr zu danken habe ich auch Frau Dr. Eckstein-Ludwig, Herrn Dr. Behrendt und Herrn Dr. Schröpfer für die Einweisung und Unterstützung bei der Arbeit am Konfokalmikroskop.

Dank gebührt auch den LTAs des Instituts für Parasitologie, die mich freundlich und kompetent bei der Zellzucht, Infektion etc. unterstützt haben.

Vielen Dank an Frau Professor Dr. Anja Taubert, die mich insbesondere in Phasen der Abwesenheit von Herrn Hermosilla unterstützt und dafür gesorgt hat, dass trotz der räumlichen Entfernung der Kontakt zu ihm nicht abgebrochen ist.

Ein Dankeschön an alle Freunde und Kollegen, die mir geholfen haben, Tiefpunkte im Verlauf der Erstellung meiner Arbeit zu überwinden und mich immer wieder aufs Neue motiviert haben.

Besonderer Dank geht auch an meine Eltern, die mir Studium und Promotion überhaupt erst ermöglicht haben und natürlich an meine Frau Sandra, die mir in guten wie in schlechten Zeiten anhaltende Unterstützung zukommen ließ und darüber hinaus mein Manuskript verbessert hat.