

**Antigene des Rinderkokzids *Eimeria bovis*
auf der Oberfläche
infizierter Zellen *in vitro***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ahmed Badawy

Aus dem Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**Antigene des Rinderkokzids *Eimeria bovis* auf
der Oberfläche infizierter Zellen *in vitro***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Ahmed Badawy
Tierarzt aus Sharkia, Ägypten

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zahner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Lämmler

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2004

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
1	EINLEITUNG 1
2	LITERATURÜBERSICHT 2
2.1	Kokzidieninfektionen bei Rindern 2
2.1.1	Epidemiologie und Erregereigenschaften 2
2.1.2	Entwicklungszyklus von <i>E. bovis</i> 2
2.1.3	Pathogenese und Klinik von <i>E. bovis</i> -Infektionen 3
2.2	Morphologische Charakteristika der Apicomplexa 4
2.2.1	Morphologie der <i>E. bovis</i> -Merozoiten der ersten Generation 6
2.2.2	<i>E. bovis</i> -Schizonten der ersten Generation <i>in vitro</i> 7
2.3	Immunreaktionen bei <i>Eimeria</i>-Infektionen 7
2.3.1	Humorale Immunreaktionen bei <i>Eimeria</i> -Infektionen 7
2.3.2	Zellvermittelte Immunität bei <i>Eimeria</i> -Infektionen 8
2.3.3	Mögliche Evasionsstrategien im Verlauf der ersten <i>E. bovis</i> -Schizogonie 12
2.4	Bisher beschriebene Antigene von <i>E. bovis</i> 13
2.5	Parasitenspezifische Antigene auf der Wirtszelloberfläche bei Apicomplexa 16
3	MATERIAL UND METHODEN 21
3.1	Tiere 21
3.1.1	Kälber 21
3.1.1.1	Stallung und Desinfektion 21
3.1.1.2	Maßnahmen bei Ankunft der Kälber im Stall 21
3.1.1.3	Fütterung der Kälber 22
3.1.2	Ratten 22
3.2	Parasiten 22
3.2.1	Stammbeschreibung (<i>E. bovis</i>) 22
3.2.2	Infektion von Kälbern mit <i>E. bovis</i> 22
3.2.3	Gewinnung von <i>E. bovis</i> -Oozysten 23
3.2.4	Gewinnung von <i>E. bovis</i> -Sporozoiten durch Gradientenzentrifugation 24

3.2.5	Gewinnung von <i>E. bovis</i> -Merozoiten I	26
3.2.6	Immunisierung der LEWIS-Ratten mit <i>E. bovis</i> -Merozoiten	27
3.3	Zellkultur	27
3.3.1	Zelllinien	28
3.3.1.1	Bovine Umbilikalvenenendothelzellen (BUVEC)	28
3.3.1.1.1	Gewinnung sowie Kultivierung von BUVEC	28
3.3.1.2	Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGC)	29
3.3.1.3	Bovine Milzlymphendothelzellen (BSLEC)	30
3.3.1.4	Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)-Zellen	30
3.3.1.5	African Green Monkey Kidney Cells (VERO)	30
3.3.2	Infektion der Zellen	30
3.3.2.1	Infektion von Zellen auf Objektträgern mit abnehmbaren Kammern und in Zellkulturflaschen	30
3.3.3	Kryokonservierung von Zellen sowie Merozoiten und Sporozoiten von <i>E. bovis</i>	31
3.4	Methoden zur Charakterisierung der Oberflächenantigene der Schizonten-infizierten Zellen	32
3.4.1	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	32
3.4.1.1	Präparation der Wirtszellen für den IIFT	34
3.4.1.2	Präparation der <i>E. bovis</i> -Sporozoiten und –Merozoiten I für den IIFT	34
3.4.1.3	Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT)	35
3.4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	35
3.4.2.1	Rasterelektronenmikroskopie	35
3.4.2.2	Immunelektronenmikroskopie	36
3.4.2.2.1	Präembedding-Methode	36
3.4.2.2.2	Postembedding-Methode	37
3.4.3	Behandlung der Oberflächenantigene auf <i>E. bovis</i> -Schizonten tragenden BFGC mit Salzen, Detergentien und Enzymen	39
3.4.3.1	Natriumchlorid (1 M)-Behandlung	40
3.4.3.2	Phospholipase C-Behandlung	40
3.4.3.3	Proteinase K-Behandlung	40
3.4.3.4	CHAPS-Behandlung	40
3.4.3.5	Triton X-100-Behandlung	41
3.4.3.6	Triton X-114-Behandlung	41

3.4.3.7	Triton X-405-Behandlung	41
3.4.4	Affinitätsreinigung des Rinder-Infektionsserums (gewonnen 45 Tage p. i. aus mit <i>E. bovis</i> -infizierten Kälbern) an <i>E. bovis</i> -Schizonten-tragenden BFGC	42
3.4.5	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)	43
3.4.6	Natrium-Dodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	43
3.4.7	Westernblot	45
3.4.8	PVDF-Folien-Färbung	45
3.4.9	Comassie-Färbung	45
3.4.10	Immunfärbung	46
3.4.11	Bestimmung der relativen Molekulargewichte	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Etablierung von <i>in vitro</i>-Systemen zur Entwicklung von <i>E. bovis</i>-Schizonten I	48
4.2	Rasterelektronische Darstellung <i>E. bovis</i>-infizierter Zellen	50
4.3	Nachweis immunreaktiver Komponenten auf der Oberfläche <i>E. bovis</i>-infizierter Zellen mit Seren infizierter Rinder	52
4.3.1	Methodische Untersuchungen	52
4.3.2	Darstellung immunreaktiver Oberflächenstrukturen auf verschiedenen infizierten Zelltypen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Parasiten mittels des Poolserums postpatenter Rinder	52
4.3.2.1	Im IIFT nachweisbare Oberflächenantigene	52
4.3.2.2	Immunelektronenmikroskopisch nachweisbare Oberflächenantigene auf Schizonten I enthaltenden BFGC	56
4.3.3	Nachweis von Oberflächenantigenen auf <i>E. bovis</i> -Schizonten I enthaltenden BFGC in Abhängigkeit von Status der Serumspender	57
4.3.4	Reaktion Schizonten I enthaltender Zellen mit Hyperimmunseren aus Ratten gegen <i>E. bovis</i> -Merozoiten I	58
4.4	Beeinflussbarkeit der Oberflächenantigenität <i>E. bovis</i>-Schizonten I tragender Zellen durch Behandlung mit Salzen, Detergentien und Enzymen	59

4.5	Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Rindern an <i>E. bovis</i>-Schizonten I tragenden BFGC und Reaktivität der gereinigten Antikörper	63
4.5.1	Affinitätsreinigung	63
4.5.2	Reaktivität affinitätsgereinigter Antikörper im IIFT	64
4.5.3	Reaktivität affinitätsgereinigter Antikörper mit <i>E. bovis</i> -Merozoiten I in der Immunelektronenmikroskopie	67
4.5.4	Reaktivität der affinitätsgereinigten Antikörper im Immunoblot	68
5	DISKUSSION	70
6	ZUSAMMENFASSUNG	79
7	SUMMARY	81
8	LITERATURVERZEICHNIS	83

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AMA-1	Apical membrane antigen-1
Aqua dest.	Aqua destillata
BFGC	Bovine Fetale Gastrointestinalzellen
BSA	Bovines Serumalbumin
BSLEC	Bovine Lymphendothelzellen aus der Milz
BUVEC	Bovine Umbilikalvenenendothelzellen
CD	Cluster of Differentiation (Bezeichnung für Differenzierungsantigen)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	(3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane sulfonate)
CT-Zellen	Zytotoxische T-Zellen
D	Dichte
DBL-Domains	Duffy binding like –Domainen
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EMA-1	<i>T. equi</i> merozoite antigen-1
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H/H ⁺⁺	HBSS mit Calcium und Magnesium
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HMW	High Molecular Weight
HSP	Heat Shock Protein
ICAM 1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgG/AP	IgG/Alkalische Phosphatase
IgM	Immunglobulin M
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest

IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KDa	Kilodalton
L	Liter
Lnn.	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
MAK	Monoklonale (r) Antikörper
MDBK	Madin-Darby-Bovine-Kidney
MESA	Merozoite-infected Erythrocyte Surface Antigen
MF	Migrationsfaktor
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC	Mikronemen
MLN	Mesenterial Lymphknoten
MPS	Mononukleäres phagozytierendes System
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSP	Merozoite Surface Protein
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NO	Nitric oxide (Stickoxid)
OPG	Oozysten pro Gramm Kot
p. i.	post infectionem
PAGA	Paraformaldehyd/Glutaraldehyd
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-E	PBS für Elektronenmikroskopie
PC	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECAM 1	Platelets Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PFEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PFEMP2	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 2
PSA-Puffer	Puck's saline A buffer
PVM	Parasitophorous Vacuole Membran
PVDF-Folie	Immobilon [®] P Transfer-Membran

Rd-0	Präinfektionsserum vom Rind
RAP-1	Rhoptry Associated Protein-1
Rd-Inf	Rinder-Infektionssera
RESA	Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen
ROI	Intermediäre Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SICA	Schizont-infected Cell Agglutination
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethyldiamin
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-TBS	Tween-TBS
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volume/Volume
VESA 1	Variant Erythrocyte Surface Antigen 1
Vergr.	Vergrößerung
VERO	African Green Monkey Kidney Cells
w/v	Weight/Volume

1 EINLEITUNG

Eimeria bovis (ZÜBLIN, 1908) ist ein protozoärer, intrazellulär lebender Darmparasit des Rindes (Stamm: Apicomplexa; Klasse: Sporozoea; Ordnung: Eimeriina). Es ist eine der pathogensten Arten der Gattung und wesentlicher Erreger der Kokzidiose der Kälber (BÜRGER, 1983; ERNST und BENZ, 1986). *E. bovis*-Infektionen können in schweren Fällen zwar zum Tod führen, doch sind es wie bei den anderen Kokzidioseerregern in erster Linie weniger auffällige Faktoren, die für den Tierhalter zu wirtschaftlichen Einbußen führen, wie schlechte Futterwertung und mangelnde Gewichtszunahmen (GRÄFNER et al., 1985). FITZGERALD (1980) bezifferte die jährlichen Verluste bei Rindern und Büffeln durch Kokzidien weltweit auf 723 Millionen US \$.

Trotz aller Schäden herrscht aber gewöhnlich bei den *Eimeria*-Infektionen des Rindes ein enzootisches Gleichgewicht auf der Basis einer schützenden Immunität vor. Im Falle von *E. bovis* z. B. zeigen Kälber nach schweren Erstinfektionen oder wiederholten moderaten Infektionen eine ausgeprägte belastbare Immunität (FIEGE et al., 1992 u. a.).

E. bovis zeigt wie einige weitere *Eimeria*-Arten bei Wiederkäuern einen außergewöhnlichen Entwicklungszyklus, indem die wesentliche Vermehrung im Wirt im Verlauf der ersten von 2 Schizogonien erfolgt. Dabei werden innerhalb von 2½ Wochen sogenannte „Makroschizonten“ mit über 100.000 Merozoiten gebildet (HAMMOND et al., 1964). Die im Vergleich zu anderen Kokzidien-Arten lange Persistenz der 1. Schizonten von *E. bovis* wirkt in Anbetracht bereits in der Präpatenz einsetzender starker humoraler und zellulärer Immunreaktionen (FIEGE et al., 1992; HERMOSILLA et al., 1999 u. a.) Fragen nach den Evasionsstrategien des Parasiten auf. Andererseits sind nach allen bisherigen Studien Schizonten I aber auch das Hauptzielstadium protektiver Immunreaktionen bei Reinfektionen immuner Tiere (zusammenfassend bei SHI, 2000), d. h. diese Stadien von *E. bovis* müßten durchaus immunologisch erfaßt werden können.

In beiden Zusammenhängen ist es von hohem Interesse, daß sich auf der Oberfläche von *in vitro* mit *E. bovis* infizierten Zellen mit reifen Schizonten I immunreaktives Material nachweisen läßt, das Antikörper aus immunen Kälbern bindet (ZAHNER und HERMOSILLA, pers. Mittlg.). In der vorliegenden Arbeit sollte daher dieses Material dargestellt und näher charakterisiert werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Kokzidieninfektionen bei Rindern

2.1.1 Epidemiologie und Erregereigenschaften

Bei der bovinen Kokzidiose handelt es sich um eine akute bis chronische, katarrhalische oder hämorrhagische Darmentzündung, die durch Protozoen der Gattung *Eimeria* aus dem Stamm der Apicomplexa verursacht wird (GRÜNDER, 1978; BÜRGER, 1983). Sie sind weltweit verbreitet, überall wo Rinder gehalten werden, und befallen in erster Linie Jungtiere. Vermehrtes Auftreten klinischer Erscheinungen ist beim Umstallen zu größeren Kälbergruppen (PAVLASEK et al., 1984; ELLER, 1991), unter den Haltungsbedingungen der USA in den sogenannten „Feed-lots“ (FITZGERALD, 1975; FOX, 1978) im Sinne einer „Crowding disease“ sowie bei erstsömmrigen Kälbern durch *E. alabamensis* als Weideinfektionen etwa 14 Tage nach dem Austrieb zu beobachten (GRÄFNER et al., 1982; SVENSSON et al., 1993). Regionale Unterschiede wurden oftmals aufgezeigt (NIILO, 1970; ERNST und BENZ, 1986).

Beim Rind sind weltweit 21 verschiedene *Eimeria*-Arten benannt; davon gelten derzeit 15 Arten als eigenständig (PELLERDY, 1974). In Mitteleuropa wurden bisher 13 Spezies nachgewiesen (SAHLINGER, 1977). Die häufigsten weltweit beim Rind vorkommenden Arten sind nach WEINANDY (1989): *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* und *E. aubernensis*. Nach LEVINE und IVENS (1970) sind für das Rind *E. bovis* und *E. zuernii* die pathogensten Arten.

2.1.2 Entwicklungszyklus von *E. bovis*

Die Entwicklung von *E. bovis* verläuft nach einem allgemeinen Grundmuster der Gattung *Eimeria* (LONG, 1978), wobei eine strenge Wirts- und Organspezifität zu beobachten ist. Der Lebenszyklus von *E. bovis* umfasst damit drei Phasen (Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie) und läuft obligatorisch zum Teil exogen (Sporogonie) und zum Teil endogen im Wirtstier (Schizogonie und Gamogonie) ab.

Mit den Fäzes gelangen die Oozysten, die einen Sporonten enthalten, in die Außenwelt. Dort sporulieren sie in wenigen Tagen unter Bildung von acht Sporozoiten. Diese Sporulation der Oozysten in der Außenwelt wird durch Feuchtigkeit und höhere Temperaturen bis 25 - 28 °C

sowie ausreichend Sauerstoff stimuliert und dauert unter optimalen Bedingungen 2 - 3 Tage (ERNST und BENZ, 1986; GRAAT et al., 1994).

Nach der oralen Aufnahme von sporulierten Oozysten werden im Rinderdünndarm unter Einfluß von Trypsin bei pH 7,5 - 8,5 und unter Einwirkung von Galle aus den Oozysten und Sporozysten die Sporozoiten freigesetzt (NYBERG und HAMMOND, 1965). Diese freien Sporozoiten invadieren aktiv die Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren des hinteren Dünndarmes, bevorzugt im terminalen Ileum, und entwickeln sich dort zu 1. Schizonten, die wegen ihrer Größe (bis 435 µm) auch als Makroschizonten bezeichnet werden. Diese sind makroskopisch als weiße Pünktchen durch die Darmmukosa sichtbar und enthalten 14 – 18 Tage p. i. durchschnittlich ca. 120.000 Merozoiten der ersten Generation (HAMMOND et al., 1946). Die Merozoiten der ersten Generation entwickeln sich nach der ihrer Freisetzung in den Epithelzellen von Zäkum und Kolon zu ca. 10 µm großen 2. Schizonten (HAMMOND et al., 1963), die nur jeweils 30 - 36 Merozoiten der zweiten Generation enthalten (HAMMOND et al., 1963; SUPPERER, 1971 ; SUPPERER, 1973; ROMMEL, 2000). Aus diesen Merozoiten entstehen die geschlechtlichen Stadien: Mikro-, Makrogamonten und schließlich Mikro-, Makrogametozyten, aus denen nach einer Syngamie letztlich die Oozysten entstehen, die 18. bis 21. Tag p. i. erstmals in den Fäzes nachweisbar sind.

2.1.3 Pathogenese und Klinik von *E. bovis*-Infektionen

Als eigentlich pathogene Stadien, die für die klinischen Symptome verantwortlich sind, gelten die Gamonten und Oozysten (HAMMOND et al., 1946; BARKER, 1993). Die Gamonten entwickeln sich in den Epithelzellen der Lieberkühn'schen Krypten des Zäkums und des proximalen Kolons (HAMMOND et al., 1946). Im Laufe der Gamontenreifung und der Entwicklung der Oozysten kommt es zur Erweiterung der Drüsen und zu einer subepithelialen, zellulären Infiltration. Die Submukosa wird infolge erweiterter Lymph- und Blutgefäße ödematös. Epithelien heben sich im folgenden großflächig ab, und auf der nackten Lamina propria finden sich diphtheroide Membranen aus Blut, Fibrin, Granulozyten, Oozysten und Zellreste. Das subepitheliale Gewebe wird zerstört, einschließlich der sich darin befindlichen Blutgefäße, und es kommt zu starken Hämorrhagien. Infolge einer Störung der Prostaglandinsynthese und -abgabe kommt es zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der Blutstillung (ROMMEL, 2000). Alle diese Dickdarmveränderungen führen zu Resorptionsstörungen, die sich in verminderter Plasmakonzentration an Natrium- und Chlor-Ionen bemerkbar machen und zu Wasserverlust mit dem Kot und Dehydratation führen (STOCKDALE und YALES, 1978; STOCKDALE und SHEARD, 1982; DAUGSCHIES et

al., 1986). Der Albumingehalt im Blut ist im Zuge schwerer Erkrankung stark reduziert (FITZGERALD und MANSFIELD, 1972).

Tiere die an einer klinischen manifesten Kokzidiose erkrankt sind, zeigen nach DAUGSCHIES et al. (1986) folgende Erscheinungen: die Tiere leiden an einer Diarrhöe infolge einer katarrhalisch, diphtheroid-nekrotischen Enteritis. Sie zeigen einen Anstieg der Körpertemperatur und Inappetenz bei gesteigertem Trinkbedürfnis. Im weiteren Verlauf der Erkrankung setzen die Tiere wässrig-roten Kot ab, dem Blutkoagula in Form von Darmausgüssen beigemischt sein können, und der unter starkem Pressen in kleinsten Portionen bei abgehobenem Schwanz und aufgekrümmtem Rücken abgegeben wird. Infolge der starken Dehydratation sind eingesunkene Augäpfel, verminderter Hautturgor und eine lederartige Hautbeschaffenheit zu beobachten. Gelegentlich können auch zentralnervöse Störungen bei einer *E. bovis*-Infektion auftreten, wobei als Symptome Schreckhaftigkeit, tetanische Krämpfe, Nystagmus, Opisthotonus und Ruderbewegungen beschrieben wurden (NIILO, 1970; ISLER et al., 1987). Blaße Schleimhäute zeigen eine zunehmende Anämie an. Nach FOX (1978) ist das Rind in diesem geschwächten Stadium häufig anfällig für Sekundärinfektionen. Todesfälle sind besonders bei Jungtieren nicht selten. Eine Kokzidiose-Rekonvaleszenz verläuft oftmals zögerlich (DAUGSCHIES et al., 1986).

2.2 Morphologische Charakteristika der Apicomplexa

Alle Organismen, die zum Stamm Apicomplexa angehören, sind intrazelluläre Parasiten und verfügen über die für Eukaryotenzellen typischen Strukturen und Organellen, wie Nukleus, Nukleolus, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Ribosomen und endoplasmatisches Retikulum (ROBERTS und HAMMOND, 1970). Die äußere Umgrenzung der Sporoziten und Merozoiten wird von einer dreischichtigen Membran, der sogenannten Pellikula gebildet. Der Stamm Apicomplexa, zu dem *E. bovis* gehört, erhielt seinen Namen aufgrund einer strukturellen Besonderheit, nämlich des Vorhandenseins eines sogenannten apikalen Komplexes. Der apikale Komplex setzt sich aus Polarringen, subpellikulären Mikrotubuli, Konoid, Rhoptrien, Mikronemen, Dichten Granula und Mikroporen zusammen (LEVINE, 1973; CHOBOTAR und SCHOLTYSECK, 1982). Rhoptrien und Mikronemen sind auf die invasiven Stadien des Stammes Apicomplexa, die Sporoziten und Merozoiten, beschränkt (CHOBOTAR und SCHOLTYSECK, 1982).

Rhoptrien bei apikomplexen Parasiten sind keulenförmige oder tropfenförmige, längliche oder gedrungene Gebilde. Es kommen immer mindestens zwei Rhoptrien vor; generell sind

sie paarig angelegt. Mikronemen (JACOBS, 1967) sind strangförmige Organellen mit einem rundem Querschnitt. Weiterhin wurden in den invasiven Stadien sogenannte „Dichte Granula“ beschrieben und dem apikalen Komplex zugeordnet (CHOBOTAR und SCHOLTYSECK, 1982).

Rhoptrien sezernieren u. a. proteolytische Enzyme, die beim Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle eine Rolle spielen könnten (SCHOLTYSECK und MEHLHORN, 1970; PERKINS, 1992; DUBREMETZ, 1993). Rhoptrienprodukte, die im Rahmen der Zellinvasion sezerniert werden, scheinen eine Lyse der Wirtszellplasmamembran zu induzieren, aber vorwiegend scheint der Rhoptrieninhalt an der Bildung der parasitophoren Vakuole beteiligt sein, indem in der Membran der parasitophoren Vakuole ein Hybrid aus Wirtszell- und Parasitenbestandteilen entsteht (SAM-YELLOWE, 1996). Die Eigenschaften dieser Hybridmembran sollen eine Fusion der parasitophoren Vakuole mit den Lysosomen der Wirtszelle verhindern, da Lysosomen nur mit Organellen und anderen Strukturen fusionieren können, deren Membranen ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen wie die der Lysosomen (JOINER, 1991; LINGELBACH, 2001).

Auch den Mikronemen wird eine sekretorische Funktion zugeschrieben, wobei die Mikronemenprodukte als Andockmoleküle an die Wirtszelle fungieren und an der Bewegung der Parasiten auf der Wirtszellmembran, dem sogenannten „gliding“ beteiligt sind (DUBREMETZ, 1993; DUBREMETZ, 1998; SOLDATI et al., 2001; TOMLEY et al., 2001). Zu den Proteinen aus Mikronemen liegen derzeit weitestgehende Befunde für *Toxoplasma gondii* und *Eimeria tenella* vor (TOMLEY et al., 1991; KAWAZOE et al., 1992; TOMLEY et al., 1996; FOURMAUX et al., 1996; CARRUTHERS et al., 1999; BROWN et al., 2000; BRYDGES et al., 2000; SOLDATI et al., 2001; TOMLEY et al., 2001). Neun (MIC1 - MIC8, AMA-I) bzw. 7 (MIC1 – MIC7) Mikronemenproteinen wurden bisher auf molekularer Ebene charakterisiert. Zusätzlich erfolgte dies bei *Cryptosporidium parvum* (3 Proteine), *Neospora caninum* (2 Proteine), Plasmodien (5 Proteine), *Sarcocystis muris* (2 Proteine) und *Theileria parva* (1 Protein) (zusammenfassend bei TOMLEY und SOLDATI, 2001). Teilsequenzen dieser Polypeptide sind homolog zu konservierten Strukturen anderer Proteine mit adhäsiven Eigenschaften. Bei *T. gondii* existiert darüber hinaus eine Familie von 5 Transmembranproteinen aus Mikronemen, die mehrfach EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domänen enthalten und offensichtlich mit anderen Mikronemenkomponenten funktionelle Komplexe bilden (MEISSNER et al., 2002).

Dichte Granula (Dichte Körperchen) sind kugelige Strukturen im Apikalkomplex, meist dicht vor dem Kern gelegen (SCHOLTYSECK, 1979). Sie werden nach der Invasion der Wirtszelle in die parasitophore Vakuole durch Exozytose freigesetzt (DASZAK et al., 1993; DUBREMETZ et al., 1998) und mit ihren Proteinen in deren Wand und das tubulo-retikuläre Netzwerk in der parasitophoren Vakuole integriert (SIBLEY et al., 1986; DUBREMETZ et al., 1998). Wie sich u. a. für das RESA-Antigen (ring infected-erythrocyte surface antigen) von *P. falciparum*, das in infizierten Erythrozyten assoziiert mit Spektrin unter der Zellmembran liegt (vgl. MEHLHORN, 2000) zeigte, können Dichte-Granula-Proteine auch durch das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert werden. Daß Proteine aus Dichten Granula allerdings auch eine Funktion bei der Zellinvasion haben, ergibt sich aus Untersuchungen von CHA et al. (2001), nach denen MAK gegen Dichte-Granula-Komponenten von *T. gondii* *in vitro* und *in vivo* das Eindringen von Tachyzoiten in Wirtszellen beeinträchtigten. Einzelheiten zu den Proteinen aus dem Organell liegen hauptsächlich für *T. gondii* vor. In den Dichten Granula dieses Parasiten finden sich NTPasen sowie 7 definierte Proteine (DGI - DG7), die teils (DG7) in allen Stadien, teils nur in den endogenen extraintestinalen Stadien der Parasiten (DGI - DG6), teils in allen Stadien außer Sporozoiten (DG3) exprimiert werden (FERGUSON et al. 1999a, 1999b).

2.2.1 Morphologie der *E. bovis*-Merozoiten der ersten Generation

Die Makroschizonten von *E. bovis* enthalten jeweils bis zu 120.000 Merozoiten (HAMMOND et al., 1946). Die Merozoiten sind schlanke, etwas gebogene, fadenförmige, ca. 13 µm lange und in ihrem mittleren Abschnitt ca. 1,4 µm dicke Stadien (SHEFFIELD und HAMMOND, 1966). Sie besitzen einen Polring und zwei präkonoidale Ringe. Die Rhoptrien sind keulenförmig und besitzen ein homogenen elektronendichten Inhalt. *E. bovis*-Merozoiten I sind im vorderen Bereich dicht mit Mikronemen bepackt. Zwischen den Mikronemen befinden sich zahlreiche Ribosomen. Eine Mikropore findet sich anterior des Nukleus. Merozoiten besitzen Mitochondrien, welche in der Nähe der Amylopektingranula liegen und deren Innenmembran fingerförmige Ausstülpungen aufweisen. Dichte Granula sind vorhanden, auch wenn sie in den bisherigen morphologischen Arbeiten zu *E. bovis* nicht erwähnt sind. Im Verlauf der ersten *E. bovis*-Schizogonie werden zwei Typen von Merozoiten gebildet, die morphologische Unterschiede aufweisen (SPEER, 1988). Die Typ I-Merozoiten sind relativ lang (13,2 µm), haben einen relativ weit hinten lokalisierten Nukleus und ein konisch geformtes Vorderende. Dagegen sind Merozoiten vom Typ II relativ kurz (5,9 µm) und spindelförmig, enthalten nur wenige Amylopektingranula und Mikronemen und zeigen

einen zentral liegenden Nukleus. Ihr Vorderende ist eher kuppelförmig und sie zeichnen sich durch eine geringere Motilität aus. Für diese Dichotomie existiert keine plausible Erklärung.

2.2.2 *E. bovis*-Schizonten der ersten Generation *in vitro*

E. bovis kann *in vitro* ausschließlich in bovinen Zellen die Entwicklung zum ersten Schizonten abschließen, so in fetalen Nabelschnur- und anderen Endothelzellen oder Zellen aus dem fetalen Magendarmtrakt, wobei sich in der Effizienz allerdings deutliche Unterschiede ergeben; ab 8 – 10 Tage p. i. bis 25 Tage p. i. konnten reife Schizonten der ersten Generation von <30 µm bis 435 µm Größe nachgewiesen werden (vgl. HAMMOND et al., 1946; HAMMOND und FAYER, 1968; HAMMOND et al., 1969; REDUKER und SPEER, 1987; HERMOSILLA et al., 2002). Nach HERMOSILLA et al. (2002) erfolgt in nicht-bovinen Zellen keine Entwicklung, obwohl die Sporozoiten eindringen und z. B. in Endothelzellen aus der Nabelschnur vom Schwein und vom Menschen >25 Tage überleben. Auch in den verschiedenen bovinen Zellen werden deutliche Unterschiede in der Entwicklung von *E. bovis* beobachtet, besonders im Hinblick auf die Zeitspanne bis zur Reifung der Schizonten I und die erreichbare Größe der Schizonten. Große Makroschizonten von > 240 µm Durchmesser werden nur in Gastrointestinalzellen aus bovinen Feten (BFGC) beobachtet, während sie in Endothelzellen aus bovinen Umbilikalvenen (BUVEC) und Endothelzellen aus bovinen Milzlymphgefäßen (BSLEC) mit im Durchschnitt 90 µm deutlich kleiner bleiben. Die langsamste und größtenmäßig schwächste Schizontenentwicklung wurde im Rahmen der untersuchten Zelltypen in bovinen Nierenepithelzellen (MDBK) beobachtet. Zu einer rasch ablaufenden Schizogonie innerhalb von 16 Tagen kommt es nur im BUVEC- und BFGC-System.

2.3 Immunreaktionen bei *Eimeria*-Infektionen

2.3.1 Humorale Immunreaktionen bei *Eimeria*-Infektionen

Nach einer Primärinfektion mit *Eimeria* spp. sind spezifische Antikörper in Blut, Galle, Darm (ROSE et al., 1984b), in der Milch (FIEGE et al., 1992) sowie bei Hühnern in Eidotter (WALLACH et al., 1995) nachweisbar. Bei Mäusen wurde die höchste Anzahl IgA-positiver- und IgG-positiver-B-Zellen nach einer Primärinfektion mit *E. falciformis* 11 - 13 Tage p. i. in der Darmmukosa und 11 Tage p. i. in Mesenteriallymphknoten beobachtet (NASH und SPEER, 1988). Bei Ratten traten nach einer *E. nieschulzi*-Infektion die maximalen Konzentrationen an spezifischen IgM und IgG im Serum 8 - 12 bzw. 20 - 30 Tage p. i. auf. Spezifisches IgA wurde in Darm und Galle, aber nicht im Serum nachgewiesen (ROSE et al.,

1984b; SMITH et al., 1995). Übereinstimmung bezüglich der Kinetik der Immunglobulinklassen im Serum von Ratten und Hühnern nach einer zwei- oder dreifachen *Eimeria*-Infektion fanden mehrere Autoren (ROSE und MOCKETT, 1983; ROSE et al., 1984b; TREES et al., 1985; RHALEM et al., 1993): ein kurzer Anstieg von IgM-Antikörpern, gefolgt von dem Erscheinen der IgG-Antikörper, die später ihren Höchstwert erreichen und danach wieder absinken.

Schon 1965 wiesen ANDERSEN et al. spezifische Antikörper gegen *E. bovis*-Merozoiten der ersten Generation im Serum experimentell infizierter Kälber nach. Die Antikörper waren ab dem 7. - 12. Tag p. i. aufzeigbar und blieben trotz fallender Tendenz über einen Zeitraum von 100 Tagen nachweisbar. SAATARA OZ et al. (1986) konnten bei ebenfalls experimentell mit *E. bovis* und *E. zuernii* infizierten Kälbern spezifische Antikörper etwa ab der 2. Woche p. i. nachweisen. HUGHES et al. (1989b) untersuchten die humorale und zelluläre Immunantworten von Kälbern, die mit 35.000 bis 40.000 Oozysten von *E. bovis* infiziert worden waren. Spezifische Serum-IgG-Antikörper gegen Merozoiten und Sporozoiten erreichten Maximalwerte zwischen 10 und 20 Tagen nach der Infektion und sanken, zeitlich zusammen mit der Oozystenausscheidung, zwischen dem 17. Tag und 20. Tag. Antikörper gegen Sporozoiten-Antigen fielen bis zum 40. Tag p. i. auf Basiswerte ab, während Anti-Merozoiten-Antikörpertiter für die Dauer der Untersuchung von 40 Tagen erhöht blieben. Kolostral aufgenommene spezifische Antikörper gegen *E. bovis*-Merozoiten I hatten weder einen statistisch signifikanten Einfluß auf die Summe der späteren Oozystenausscheidung verschiedener *Eimeria*-Arten, noch auf den Zeitpunkt der ersten Oozystenausscheidung von *E. bovis* und *E. ellipsoidalis* bei Kälbern (FABER et al., 2002). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Autoren bei verschiedenen *Eimeria*-Infektionen (KLESZIUS, 1977; WAKELIN und ROSE, 1990; ROMMEL, 2000), nach denen sowohl eine experimentell induzierte Immunität gegen eine Primärinfektion mit Eimerien als auch eine sich nach Erstinfektion entwickelnde schützende Immunität gegen Belastungsinfektionen in erster Linie T-Zell-abhängig sind.

2.3.2 Zellvermittelte Immunität bei *Eimeria*-Infektionen

Eimeria-Infektionen induzieren generell spezifische zelluläre Immunreaktionen (zusammenfassend bei ZAHNER et al., 1994). Im Fall von *E. bovis* beobachteten HUGHES et al. (1989b) für die Stimulierbarkeit peripherer Lymphozyten mit Oozystenantigen einen Anstieg rasch nach der *E. bovis*-Infektion, ein Maximum um den 20. Tag p. i., aber auch 40 Tage p. i. war die Proliferation der peripheren Lymphozyten gegenüber Kontrollen noch

deutlich gesteigert. Allerdings liegen hierzu differierende Ergebnisse vor. Nach HERMOSILLA et al. (1999) ist eine maximale Stimulierbarkeit der Lymphozyten 12 Tage p. i., d. h. in der Präpatenz gegeben. 28 Tage p. i. lagen die Werte dagegen wieder im Kontrollbereich. Immerhin reagierten aber Lymphozyten aus den regionalen Lymphknoten noch stark auf eine Stimulation mit *E. bovis*-Antigen. In der Gesamtbewertung der Daten von HUGHES et al. (1989b) und HERMOSILLA et al. (1999) muß möglicherweise berücksichtigt werden, daß im ersten Fall Oozystenantigen, im zweiten Fall Merozoitenantigen eingesetzt wurde.

Primärinfektionen mit *Eimeria* spp. scheinen vor allem von Th-Zellen beeinflußt zu werden. Eine Depletion der CD4⁺-T-Zellen mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern (MAK) führte bei der Primärinfektion von Mäusen mit *E. vermiformis* oder *E. pragensis* zu erhöhter Empfänglichkeit (ROSE et al., 1988, 1992). Mäuse, denen genetisch bedingt CD4⁺-T-Zellen fehlten, schieden nach einer *E. vermiformis*-Infektion erheblich mehr Oozysten als intakte Kontrolltiere aus, während sich bei Mäusen, denen CD8⁺-Zellen fehlten, kein signifikanter Unterschied in der Oozystenauscheidung ergab (SMITH und HAYDAY, 1998). Auch Hühner, die mit MAK gegen CD4⁺-Zellen behandelt worden waren, produzierten nach einer *E. tenella*-Infektion signifikant mehr Oozysten als Kontrolltiere (TROUT und LILLEHOJ, 1996). Weiterhin wurde eine Proliferation der CD4⁺-Zellen in der Darmmukosa von Hühnern nach einer Primärinfektion mit *E. maxima* (ROTHWELL et al., 1995), *E. tenella* (VERVELDE et al., 1996) und von Mäusen mit *E. papillata* (SCHITO et al., 1998) sowie im peripheren Blut vom Kälbern mit *E. bovis* (HERMOSILLA et al., 1999) beobachtet. Im Verlauf einer *E. bovis*-Primärinfektion kam es auch zu Veränderungen in der Relation der verschiedenen T-Lymphozyten. So lag 35 Tage p. i. der CD4⁺-T-Zellanteil bei den infizierten Tiere in allen untersuchten Mesenteriallymphknoten über dem der Kontrolltiere; im Einzelfall bestanden signifikante Unterschiede den Lnn. caecales und Lnn. colici (HERMOSILLA et al., 1999). Untersuchungen, die die unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen innerhalb der Darmmukosa im Verlauf einer *Eimeria*-Erstinfektion berücksichtigten, zeigten spezifische Veränderungen auf. Nach Ansicht von ROSE et al. (1996) spielen bei der Maus gerade TCR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen der Darmschleimhaut eine entscheidende Rolle bei der Termination und Kontrolle einer *E. vermiformis*-Primärinfektion, während TCR $\alpha\beta$ ⁺-Zellen eher eine regulatorische Funktion bei der Immunantwort haben. Über eine lokale Steigerung der Anzahl von TCR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen in der Darmschleimhaut nach einer Primärinfektion von Mäusen mit *E. vermiformis* und *E. papillata* berichten FINDLY et al. (1993) bzw. SCHITO et al. (1998). Bei

Hühnern liegen ähnliche Befunde nach Infektionen mit *E. acervulina* (LILLEHOJ, 1994) und *E. maxima* (ROTHWELL et al., 1995) vor. Interessanterweise konnten jedoch bei Ratten nach *E. separata*-Primär- und-Belastungsinfektionen keine signifikante Veränderungen im Anteil der TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen in der Zäkummukosa nachgewiesen werden (SHI et al., 2001b). Deutlich war allerdings, daß in den Ratten nach einer Primärinfektion CD4⁺-T-Zellen in der Darmschleimhaut überwogen, während der Anteil der CD8⁺-T-Zellen nach der Belastungsinfektion zunahm. Basierend auf diesen Befunden spekulieren SHI et al. (2001b), daß hauptsächlich CD4⁺-T-Zellen in der Darmmukosa eine *E. separata*-Primärinfektion bei Ratten kontrollieren, die Immunität gegen Belastungsinfektionen aber wahrscheinlich überwiegend durch CD8⁺- und TCR $\alpha\beta^+$ -T-Zellen vermittelt wird. Diese Ansicht wird auch im Bezug auf andere Eimerien-Infektionen im Prinzip von mehreren Autoren geteilt (TROUT und LILLEHOJ, 1995 und 1996).

Hinsichtlich der Rolle von NK-Zellen bei *Eimeria*-Primärinfektionen sind die bisher publizierten Befunde nicht ohne Widerspruch. Bei Hühnern zeigte sich die NK-Zellen-Aktivität sowohl in der Milz als auch im Darm nach einer Primärinfektion mit *E. acervulina* oder *E. maxima* während der Frühphase der Infektion reduziert, jedoch ca. eine Woche nach der Infektion wieder normalisiert oder leicht erhöht (LILLEHOJ, 1989). Eine Primärinfektion mit *E. vermiformis* verursachte einen Anstieg der NK-Zellen-Aktivität in der Milz und in mesenterialen Lymphknoten von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Eine Depletion von NK-Zellen durch Antikörper hatte allerdings keinen signifikanten Einfluß auf die Oozystenproduktion und die Patenz bei einer *E. vermiformis*-Infektion (SMITH et al., 1994). Dagegen inhibieren NK-Zellen aber offensichtlich durch die Freisetzung von IFN- γ die Oozystenproduktion von *E. papillata* nach einer Primärinfektion von Mäusen (SCHITO und BARTA, 1997), so daß NK-Zellen sozusagen eine erste Barriere gegen die Infektion bilden könnten (SHI et al. 2001b).

Daneben dürften in den frühen Phasen nach einer Infektion die Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS) eine Kontrollfunktion haben. Makrophagen infiltrierten die Zäkummukosa von Hühnern nach einer Primärinfektion mit *E. acervulina* (TROUT und LILLEHOJ, 1993) oder *E. tenella* (VERVELDE et al., 1996) und enthielten Sporoziten. Auch bezüglich des Aktivierungszustand der Makrophagen und der Sezernierung von Makrophagen-Zytokinen im Verlauf einer *Eimeria*-Infektion liegen erste Daten vor. Makrophagen, die von Hühnern während und nach der Primärinfektion mit *E. maxima* oder *E. tenella* isoliert wurden, produzierten *in vitro* nach der Stimulation mit Lipopolysacchariden

(LPS) mehr IL-1 und TNF- α als Zellen nicht infizierter Kontrolltiere (BYRNES et al., 1993). Es ist daher möglich, daß Makrophagen nicht nur als Effektorzellen gegen Eimerien eine Rolle spielen, sondern über die Freisetzung von Zytokinen auch als Modulatoren der Immunreaktionen wirken.

Unabhängig von der Herkunft von Zytokinen liegen aussagekräftige Befunde zu ihrer direkten und indirekten Wirkung auf Eimerien vor. Bereits sehr früh konnte gezeigt werden, daß periphere Blutlymphozyten (PBL), die aus einem gegen *E. bovis* immunen Tier stammen, nach Stimulation mit *E. bovis*-Antigen IFN- γ produzieren (HUGHES et al., 1988). Weiterhin ließ sich in aus Zäkummukosa und Tonsillen *E. tenella*-infizierter Hühner isolierten Lymphozyten, jedoch nicht in Lymphozyten aus nicht infizierten Hühnern durch Stimulation mit Oozystenantigen eine IFN- γ -Produktion induzieren (PROWSE und PALLISTER, 1989). Eine Depletion von endogenem IFN- γ führte bei *E. vermiformis*-infizierten BALB/c-Mäusen (ROSE et al., 1989) sowie NIH- und C57BL/6-Mäusen (ROSE et al., 1991) zu einer Verlängerung der Patenz und einer erhöhten Oozystenproduktion nach einer Primärinfektion, hatte aber keinen Einfluß auf Belastungsinfektionen. Außerdem wurden von IFN- γ -Knockout-Mäusen nach einer Infektion mit *E. vermiformis* (SMITH und HAYDAY, 1998) oder *E. papillata* (SCHITO und BARTA, 1997) signifikant mehr Oozysten ausgeschieden als von Kontrollen.

Die TNF- α -Konzentration wurde über den Verlauf einer *E. vermiformis*-Infektion in Darmextrakten der Wirte verfolgt (OVINGTON et al., 1995). Bei den resistenten BALB/c-Mäusen wurde eine leichte Zunahme der TNF- α -Konzentration ab dem 2. Tag p. i. beobachtet, die zu zwischen den Tagen 6 - 10 p. i. gleichbleibend hohen Werten führte. Dagegen waren die TNF- α -Konzentrationen im Darm von empfänglichen C57BL/6-Mäusen erst am Tag 10 p. i. erhöht, erreichten aber nicht die Werte der resistenten BALB/c-Mäuse.

Der eigentliche zytotoxische Effekt von IFN- γ und TNF- α gegen *Eimeria* spp. beruht auf der Fähigkeit der Zytokine, die Produktion von zytotoxischen intermediären Sauerstoffradikalen (ROI) oder Stickoxiden (NO) zu induzieren (DING et al., 1988; LIEW et al., 1990; OVINGTON et al., 1990; BEKHTI et al., 1992). ROI sind sehr reaktiv und in der Lage H-Atome von Membran-Lipiden, -Proteinen oder -Kohlenhydraten aufzunehmen, mit der Folge sogenannter „oxidativer Schäden“ an der Zellmembran. HUGHES et al. (1989a) konnten mit Hilfe von H₂O₂ aber auch von O₂ *E. bovis*-Sporozoit abtöten.

Auf der anderen Seite, ist die Induktion von NO nach OVERTON und SMITH (1992) die Ursache für die inhibierende Wirkung von IFN- γ gegen *Eimeria*-Arten *in vitro*. Makrophagen, die durch IFN- γ aktiviert wurden, können über die Synthese von ROI die intra- und extrazellulären Stadien von Eimerien abtöten (OVERTON et al., 1995). Bisher gibt es allerdings noch keine Beweise dafür, daß Makrophagen zum Abtöten der Parasiten während einer *Eimeria*-Primärinfektion nach Stimulation mit IFN- γ oder TNF- α NO synthetisieren. Immerhin wurden aber im Plasma von Hühnern nach der Primärinfektion mit *E. tenella* (ALLEN, 1997a) und *E. maxima* (ALLEN, 1997b) erhöhte NO-Konzentrationen beobachtet. Die Transkription verschiedener Zytokin-Gene und des iNOS-Gens im Zäkum und in mesenterialen Lymphknoten (MLN) wurde nach einer *E. separata*-Primär- sowie einer Belastungsinfektion mittels RT-PCR bei Ratten erfaßt. IFN γ -mRNA wurde im MLN 72 h p. i. und im Zäkum sowohl naiver als auch immunisierter Ratten 48 h und 72 h p. i. im Vergleich zu nicht infizierten Tieren stark erhöhten Mengen nachgewiesen. Weiterhin konnte im Zäkum aller infizierter Ratten gegenüber den Kontrolltieren eine stark vermehrte iNOS-mRNA nachgewiesen werden (SHI et al., 2001a). Diese Befunde sprechen für eine erhöhte NO-Synthese im Verlauf einer *E. separata*-Infektion bei Ratten.

In der Immunität gegen Belastungsinfektionen spielen wahrscheinlich besonders zytotoxische CD8⁺ T-Zellen die entscheidende Rolle. Hierfür sprechen sowohl Befunde beim Huhn als auch bei Nagern mit *Eimeria*-Infektionen (TROUT und LILLEHOJ, 1995, 1996; ROSE et al., 1988, 1992). Definitiv bewiesen wurde dies allerdings nicht.

2.3.3 Mögliche Evasionsstrategien im Verlauf der ersten *E. bovis*-Schizogonie

Die äußerst lange Persistenz des *E. bovis*-Makroschizonten in der Wirtszelle, setzt eine erfolgreiche Evasionsstrategie des Parasiten voraus, die mehrere Ebenen betreffen muß. So muß *E. bovis* für das Überleben seiner Wirtszelle Sorge tragen, d. h., daß zumindest gewährleistet sein muß, daß die befallene lymphatische Endothelzelle als Wirtszelle den Zeitraum, den der Schizont für die Reifung braucht, überhaupt überlebt; sie darf nicht apoptotisch werden. Einige Parasiten aus dem Stamm der Apicomplexa, wie *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Cryptosporidium parvum*, können die Apoptosefähigkeit ihrer Wirtszelle effizient reduzieren (LÜDER et al., 2001; HEUSSLER et al., 2001). In der Mehrzahl der bei Parasiten untersuchten Fälle geschah dies über gesteigerte HSP65-Expression oder NF- κ B-Aktivierung (HEUSSLER et al., 2001; LÜDER et al., 2001).

Darüber hinaus könnte *E. bovis* als intrazellulärer Parasit die MHC I-Expression der Wirtszelle beeinträchtigen und somit effizient zytotoxischen Aktivitäten von CD8⁺-Zellen entgehen, da das Erkennen infizierter Zellen in Verbindung mit MHC-I-Molekülen abläuft. Solche Effekte sind für eine Reihe viraler und intrazellulärer bakterieller Erreger (ANDERSSON et al., 1985; HILL et al., 1994; KIRVESKARI et al., 1999), aber auch für Leishmanien (DE SOUZA LEAO et al., 1995), Theilerien (OLIVER und WILLIAMS, 1996) und *T. gondii* (LÜDER et al., 1998) nachgewiesen.

Von Bedeutung ist möglicherweise auch, daß *E. bovis*-Schizonten I-enthaltende Wirtszellen auf ihrer Oberfläche aus dem Merozoiten stammendes Material tragen (siehe Einleitung). Die Funktion dieser Parasitenmoleküle ist völlig ungeklärt. Der genaue Zeitpunkt des Auftretens dieser Moleküle, ihr Syntheseort u. a. sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

2.4 Bisher beschriebene Antigene von *E. bovis*

Wie andere Eimerien, besitzt *E. bovis* art-, stamm- sowie stadienspezifische Antigene, von denen anzunehmen ist, daß sie in unterschiedlicher Weise an der Induktion einer Immunität beteiligt sind oder eventuell im Rahmen von Evasionsstrategien zum Tragen kommen.

Sowohl Merozoiten I als auch Sporozoiten verfügen über zahlreiche Proteine im Bereich von 15 kDa bis 215 kDa (REDUKER und SPEER, 1986b); spezifisch für Merozoiten I waren Proteine mit Molekulargewichten von 15 kDa, 17 kDa, 39 kDa, 152 kDa und 180 kDa; spezifisch für Sporozoiten waren Proteine mit Molekulargewichten von 12 kDa, 45 kDa und drei Proteine von > 125 kDa. Zusätzlich waren in Sporozoiten drei sehr intensiv anfärbbare Proteinbanden von 20 kDa, 28 kDa und 32 kDa nachweisbar, die nicht oder nur sehr schwach bei Merozoiten auftraten. Im Immunoblot mit Sera experimentell mit *E. bovis* infizierter Kälber reagierten zahlreiche Merozoitenantigene im Bereich von 18 kDa bis 215 kDa, wobei eine sehr intensive Immunmarkierung von 152 kDa- und 182 kDa-Merozoitenantigenen sowie verschiedenen Sporozoitenantigenen mit Molekulargewichten von 28 kDa bis 152 kDa zu beobachten war. Neben stadienspezifischen Antigenen konnten vier Antigene mit Molekulargewichten von 58 kDa, 70 kDa, 83 kDa und 98 kDa nachgewiesen werden, die sowohl bei Sporozoiten als auch bei Merozoiten I auftraten. In autoradiographischen Untersuchungen nach Markierung von Oberflächenproteinen mit ¹²⁵J erwiesen sich nur wenige Proteine als markiert: bei Merozoiten I betraf es mehrere Banden im Bereich von 15 kDa bis 18 kDa, bei Sporozoiten wurden drei Oberflächenproteine mit Molekulargewichten von 28 kDa, 77 kDa und 183 kDa markiert.

Bei weiteren Untersuchungen zur Markierung von Oberflächenproteinen von Merozoiten I mit ^{125}J wurde ein Protein mit dem Molekulargewicht 71-72 kDa markiert (ROBERTSON et al., 1988). Außer seiner Lokalisation auf der Oberfläche von *E. bovis*-Merozoiten ist nichts zu diesem Molekül bekannt.

CLARK et al. (1996) isolierten aus Merozoiten I das *E. bovis*-Homolog zu dem bereits in zahlreichen eukaryontischen Zellen beschriebenen hsp90. Interessanterweise stellten CLARK et al. (1996) fest, daß die Expression von HSP90 in *E. bovis* im Verlauf der Entwicklung der Parasiten unterschiedlich reguliert ist: HSP90 wurde nur in Merozoiten I sowie in vollständig sporulierten Oozysten nachgewiesen, jedoch weder in unsporulierten noch in sporulierenden Oozysten. Die Autoren spekulieren deshalb, daß HSP90 eine Rolle während der Entwicklung von *E. bovis* in der Wirtszelle spielen könnte. Abgeleitet von Ergebnissen für HSP90 bei *Plasmodium falciparum* zogen CLARK et al. (1996) außerdem in Betracht, daß *E. bovis*-HSP90 an der Bildung der parasitophoren Vakuole beteiligt sein könnte.

Mit Hilfe zweier gegen *E. bovis*-Sporozoitenantigene gerichteter MAK konnten WHITMIRE et al. (1988) ein Oberflächenprotein, das sogenannte P20, nachweisen. Aufgrund einer homogenen Oberflächenfluoreszenz von lebenden *E. bovis*-Sporozoiten im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) nach Reaktion mit diesen MAK schlossen sie, daß P20 im gesamten Plasmalemma exprimiert wird. Bei Azeton-fixierten *E. bovis*-Sporozoiten trat dagegen im IIFT eine ausschließlich apikale Fluoreszenzreaktion auf. WHITMIRE et al. (1988) vermuten, daß P20 in Rhoptrien und Mikronemen synthetisiert und anschließend zum apikalen Bereich transportiert wird, von wo aus eine Sekretion mit anschließender Einlagerung ins Plasmalemma stattfindet. P20 ist ein stadienspezifisches Antigen, denn es war in heranreifenden sowie reifen Schizonten nicht mehr oder nur schwach nachweisbar; in freien Merozoiten I und II trat es nicht auf. P20 wird offensichtlich nur während der beginnenden Schizogonie in die parasitophore Vakuole abgegeben (WHITMIRE et al. 1988; SPEER und WHITMIRE, 1989). Monoklonale Antikörper gegen P20 hinderten *in vitro* bis zu 70% der Sporozoiten an der Invasion von Madin-Darby-Bovine-Kidney (MDBK)-Zellen.

WHITMIRE et al. (1989) beschrieben sechs Oberflächenproteine mit Molekulargewichten von 20 kDa (P20) bis ca. 110 kDa auf *E. bovis*-Sporozoiten, womit diese Ergebnisse von denen der Gruppe REDUKER und SPEER (1986b) abwichen. Eventuelle Unterschiede in den Kulturbedingungen sollten sich hier nicht ausgewirkt haben (vgl. REDUKER und SPEER,

1986a). Im Immunoblot mit Sera experimentell mit *E. bovis*-infizierter Rinder reagierte nur das P20; P20 ist daher allem Anschein nach das immundominante Oberflächenprotein.

Nach HEISE (1997) ist aber mindestens bei *E. bovis*-Merozoiten I das Muster der Oberflächenkomponenten vielfältiger: nach SDS-PAGE oberflächenbiotinylierter Merozoiten I konnten Polypeptide von 116, 110, 66, 50, 46, und 42 kDa dargestellt werden.

HEISE et al. (1999b) beobachteten auf der Oberfläche von Merozoiten I, Sporozoiten sowie in den Merozoiten-Rhoptrien phosphorylcholinhaltige (PC) Epitope; PC-Epitope konnten weiterhin in *in vitro*-Kulturen direkt nach der Invasion der Wirtszelle kappenförmig am posterioren Pol des *E. bovis*-Sporozoiten nachgewiesen werden. PC-Epitope wurden bei zahlreichen Polypeptiden von Helminthen beschrieben (MAIZELS und SELKIRK, 1988) und scheinen als Immunmodulatoren bei der B- und T-Zellproliferation eine wichtige Rolle zu spielen (LAL et al., 1990; HARNETT und HARNETT, 1993). PC-Epitope wurden bisher sehr selten in Protozoa beobachtet und nur in Rhoptrien von *T. gondii* nachgewiesen (FOUSSARD et al., 1990).

ABRAHAMSEN et al. (1994b) entwickelten einen MAK gerichtet gegen *E. bovis*-Sporozoiten. Die vom MAK erkannten Antigene (23 kDa - 28 kDa) sollen Bestandteile der Refraktilen Körperchen von *E. bovis*-Sporozoiten sein, die im Laufe der ersten Schizogonie in die parasitophore Vakuole und das Wirtszellzytoplasma abgegeben werden. ABRAHAMSEN et al. (1994a) setzten diesen MAK zum Screening einer cDNA-Bank aus sporulierten *E. bovis*-Oozysten ein und konnten einen als Eb-9.1 bezeichneten Klon isolieren. Beim anschließenden Screening dieser Bank mit Eb-9.1 konnten zwei Klone, Eb-20 und Eb-25, identifiziert werden. Die Homologierecherche ergab auf Proteinebene eine bis 62%ige Identität mit einem *E. tenella*-Sporozoitenantigen (LIBERATOR et al., 1989; MILLER et al., 1989). Eb-25/50-mRNA war in teilweise und vollständig sporulierten Oozysten sowie in freien Sporozoiten nachweisbar, sowie während der gesamten Schizogonie, jedoch nicht mehr in den Merozoiten I. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Morphogenese der Parasiten, da „Refraktile Körperchen“ zwar in Sporozoiten, jedoch nicht mehr in Merozoiten auftreten (ABRAHAMSEN et al., 1994a).

Nach SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen beschreiben HEISE et al. (1999a) weiterhin kohlenhydrathaltige Antigene bei Merozoiten I, darunter Antigene von > 200, 180, 135, 110, 83 kDa, im Bereich von 80 - 77 kDa und bei 67 kDa. Glykosylierte Antigene befinden sich auf der Oberfläche, in den Rhoptrien sowie in den Mikronemen von *E. bovis*-

Merozoiten I. Außerdem zeigte die Studie zwei 135 bzw. 180 kDa-Antigene, die sich in Merozoiten I auf ultrastruktureller Ebene eindeutig Mikronemen zuordnen ließen; in freien *E. bovis*-Sporozoiten und Gamonten sowie bei anderen Apicomplexa konnten diese Antigene nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde noch ein ebenfalls in den Mikronemen von *E. bovis*-Merozoiten I vorhandenes Antigen (>200 kDa) demonstriert. Es befand sich zum Zeitpunkt der Invasion auch auf der Oberfläche von freien Sporozoiten, wurde bei der Invasion auf die Wirtszelloberfläche sezerniert und fand sich später innerhalb der parasitophoren Vakuole.

Weitere Antigene von Merozoiten I, 135 kDa- und 200 kDa-Moleküle der Amylopektingranula, reagierten mit einem MAK gegen *E. bovis*-Merozoiten I und auch hier sind PC-Epitope zu vermuten, denn nach einer Behandlung der *E. bovis*-Merozoiten I mit Phospholipase C wurden diese Antigene nicht mehr erkannt (HEISE et al., 1999c).

2.5 Parasitenspezifische Antigene auf der Wirtszelloberfläche bei Apicomplexa

Das Auftreten parasitenspezifischer Komponenten auf der Oberfläche infizierter Zellen, wie es die Vorversuche zu dieser Studie bei *E. bovis* vermuten ließen, ist ein Phänomen, das in der Vergangenheit bei einzelnen Vertretern der Apicomplexa bereits beschrieben und zumindest teilweise analysiert wurde. Es ist bekannt bei Plasmodien, d. h. bei Vertretern der Unterordnung Haemosporina der Unterklasse Coccidia sowie bei Babesiidae und Theileriidae, Familien aus der Unterklasse Piroplasmia. Ihr Auftreten bei *E. bovis*, d. h. einer Art aus der Unterklasse Eimeriina wäre jedoch ein Novum.

Struktur und Funktion solcher Komponenten werden zwar zunehmend beleuchtet bei Plasmodien, sind aber in anderen Fällen weitgehend unklar. Über die Transportmodalitäten, unter denen die Komponenten aus der parasitophoren Vakuole über das Zytoplasma der Wirtszelle an deren Oberfläche kommen, existieren lediglich bei Plasmodien Erkenntnisse.

Schon im Jahre 1979 konnten SCHMIDT-ULLRICH et al. zwei *Plasmodium falciparum*-Glykoproteine mit Molekulargewichten von 65 kDa und 90 kDa auf mit einem Schizonten befallenen Erythrozyten darstellen. Wiederholte Immunisierungen von Affen mit dem *P. falciparum*-65 kDa-Protein bewirkten einen Schutz gegen eine *P. knowlesi*-Infektion. Ein anderes *P. knowlesi*-spezifisches Oberflächenprotein auf Erythrozyten, das sogenannte 74 kDa-Antigen, wurde von SCHMIDT-ULLRICH et al. (1983) aufgereinigt, charakterisiert und für Immunisierungsstudien verwendet. Das aufgereinigte 74 kDa-Antigen induzierte eine

protektive Immunität gegenüber einer ansonsten tödlich verlaufenden *P. knowlesi*-Infektion bei empfänglichen Rhesusaffen.

HOLDER und FREEMANN (1981) konnten bei *P. yoelii* mittels eines MAK ein 230 kDa-Antigen auf der Oberfläche mit Schizonten befallener Erythrozyten nachweisen. Mit diesem Protein immunisierte Mäuse waren vor einer *P. yoelii*-Primärinfektion geschützt (HOLDER und FREEMANN, 1981). DAVID et al. (1984) setzten einen MAK (13C11) gegen das 230 kDa-Antigen ein, um die Expression dieses Glykoproteins in der Spätphase der Schizogonie genauer zu untersuchen. Ihre Resultate zeigten, daß das 230 kDa-Glykoprotein ein Hauptbestandteil der Parasitenoberfläche ist, das in erster Linie in unreifen Schizontenstadien exprimiert wird. Anschließend wird dieses Protein in Spätphase der Schizontenreifung zu verschiedenen Polypeptiden (75 kDa, 57 kDa, 50 kDa und 43 kDa) verarbeitet, die auf der Merozoitenoberfläche mit dem MAK immunpräzipitiert konnten.

PERRIN und DAYAL (1982) konnten spezifische Antigene auf Schizonten-infizierten Erythrozyten und zugleich protektive Antigene von *P. falciparum* identifizieren. Sie konnten mindestens drei Oberflächenantigenen mit Molekulargewichten von > 200 kDa, 82 kDa und 41 kDa eine schützende Funktion zuordnen. Zwei davon, das 200 kDa- und das 82 kDa-Antigen, werden besonders stark gegen Ende der Schizontenreifung und auch bei der Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten freigesetzt. Ein anderes stadienspezifisches Antigen von *P. falciparum*, RESA/Pf 155, das auf der Zellmembran infizierter Erythrozyten nachgewiesen werden kann, ist durch die Studien von BROWN et al. (1985) als Produkt der Ringformen und Schizontenstadien näher charakterisiert worden. Als damit verwandte Antigene konnten weitere Polypeptide mit Molekulargewichten von 150 kDa und 130 kDa nachgewiesen werden (UNI et al., 1987). Beide Autorengruppen spekulierten über eine rasche Synthese von RESA-Antigenen während der Schizogonie, die dann auf die Erythrozytenmembran gelangen. Einige Jahre später konnten AIKAWA et al. (1990) das RESA/Pf 155-Antigen in „Dichten Granula“ von *P. falciparum*-Merozoiten nachweisen. Nach FOLEY et al. (1990 und 1991) kann das RESA-Protein durch Detergentien wie Triton X-100 nicht aus der Erythrozytenmembran gelöst werden. Die Autoren vermuteten eine enge Bindung des Moleküls mit dem Spektrin des Zytoskeletts der infizierten Erythrozyten und diskutierten, daß sich damit die physikalischen Eigenschaften der befallenen Erythrozytenmembran ändern und sich damit die Überlebenszeit der Erythrozyten in der peripheren Blutzirkulation verlängern könnte. RESA-Antigen als Impfantigen wurde gegen *P. falciparum* eingesetzt (GENTON

und CORRADIN, 2002) und führte bei Kindern in Papua-Neuguinea zu einer Reduktion der Parasitämie.

HOWARD et al. (1983) beschrieben zwei Proteine mit Molekulargewichten von 200 kDa und 350 kDa auf mit *P. knowlesi* infizierten Erythrozyten und bezeichneten sie als SICA (schizont-infected cell agglutination)-Proteine. Das dazu homologe Protein von *P. falciparum* ist PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (LEECH et al. 1984). Beide Proteine sind nur schwer löslich mit nicht-ionischen Detergentien, so daß für eine Extraktion der Proteine aus der Erythrozytenmembran SDS benötigt wurde (ALEY et al., 1984). PfEMP1 gehört einer hochvariablen *P. falciparum*-Protein-Familie, den *Var*-Proteinen an, für die 50 – 150 Gene einer Multigenfamilie kodieren (SU et al., 1995), und die in den Ringstadien, in denen die Organellen noch nicht ausgebildet sind, aufeinanderfolgend synthetisiert werden (SCHERF et al., 1998). PfEMP1 findet sich in Protuberanzen der Erythrozytenmembran („Knobs“), die durch Zusammenlagerungen eines anderen Parasitenproteins, dem Knob-associated histidine rich Protein (KAHRP) entstehen (CRABB et al., 1997). Durch ihre Variabilität und ihre adhäsiven Eigenschaften an Endothelien sind die PfEMP1-Proteine wichtig in der Immunevasionsstrategie der Parasiten (vgl. CRAIG und SCHERF, 2001) bzw. der Pathogenese der Malaria (MAGOWAN et al. 1988 u. a.). PfEMP1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Sequestration von befallenen Erythrozyten in peripheren Blutgefäßen (HOWARD und GILLADOGA, 1989). Das Antigen bindet an das Adhäsionsmolekül ICAM 1, das auf Endothelzellen exprimiert wird (ROBERTS et al., 1992). BARUCH et al. (1996) konnten zeigen, daß das PfEMP1 ein Rezeptor nicht nur für ICAM 1, sondern auch für CD36 und das Thrombospondin ist. RANJAN und CHITNIS (1999) diskutieren eine Beteiligung der sog. DLB-Domäne der PfEMP1-Antigene bei der Zellinvasion sowie die Rolle, die die Moleküle in Anbetracht der gesteigerten Adhärenz befallener Erythrozyten in der Malariapathogenese spielen. CHEN et al. (2000) konnten die Liste der PfEMP1-Liganden auf das Plättchen-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM 1/CD31), das Blutgruppen A-Antigen, IgM und P-Selektin auf Gefäßendothelien erweitern. ROWE et al. (2002) zeigten, daß andere *Var*-Gen-kodierte Proteine von *P. falciparum* bei der diaplazentären Übertragung des Parasiten eine Rolle spielen, indem sie an das Chondroitinsulfat A in der Plazenta binden.

COPPEL et al. (1986) und HOWARD et al. (1987) beschrieben als weiteres Oberflächenprotein auf *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten ein 250 kDa - 300 kDa Protein (MESA-Antigen), das heute als das PfEMP2 bekannt ist. Es ist ein Phosphoprotein, zum

großen Teil unlöslich in Triton X-100 und wird erst bei Ringformen bis zur Spätphase der Schizogonie synthetisiert.

In der Zusammenschau wurden inzwischen mindestens 7 weitere Genfamilien, die für Proteine, die auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten zu finden sind, kodieren (CRAIG und SCHERF, 2001), allerdings in vielen Fällen ohne daß den Molekülen eine Funktion zugeordnet werden kann.

Auch im Falle von Babesien, explizit bei *Babesia bovis* treten auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten antigene Parasitenproteine auf. Ähnlich den „Knobs“ bei *P. falciparum*-infizierten Zellen (s. o.) finden sie sich in Protuberantien auf der Erythrozytenoberfläche (AIKAWA et al., 1985; ALLRED et al., 1993). Da sich auch für die Oberflächenantigenität *B. bovis*-infizierter Erythrozyten eine klonale Variation zeigen ließ, wurde eine ähnliche Situation wie bei PfEMP1 vermutet (ALLRED et al., 1994). Untersuchungen von ALLRED et al. (1994) und O' CONNOR et al. (1997) zeigten in diesem Zusammenhang 2 hochmolekulare Komponenten von 118 kDa und 113 kDa auf der Zelloberfläche auf. Sie formen ein heterodimeres, als VESA1 (variant erythrocyte surface antigen 1) bezeichnetes Protein (O' CONNOR et al., 1997), von dem inzwischen bekannt ist, daß es von einer polymorphen Multigen-Familie kodiert wird (ALLRED et al., 2000), die die Autoren mit *ves* bezeichnen. Nach Isolierung und Charakterisierung des für VESA1 kodierenden Gens (ALLRED et al., 2000) besitzt das Molekül keine erkennbare Signalsequenz. Im Molekül findet sich ein vorausgesagtes Transmembransegment und eine Cystein-Lysin-reiche Domäne. Zwar adhärieren *B. bovis*-infizierte Zellen wie *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten an Endothelien unter Mitwirkung von VESA1 (O' CONNOR und ALLRED, 2000), doch sind die verantwortlichen Domänen auf den Protein nicht klar (ALLRED et al., 2000).

Das Spektrum der Babesien-Antigene auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten dürfte allerdings über die VESA-Antigene hinausgehen. Diesen Schluß legen zumindest Studien von SHOMPOLE et al. (1994, 1995) nahe, in denen 7 verschiedene Proteine im großen Bereich von 38 – 240 kDa als auf der Wirtszelloberfläche lokalisiert identifiziert wurden. Auffälligerweise findet sich bei *B. bigemina* mit RAP-1 (rhoptry-associated protein 1) auch ein Molekül aus den Rhoptrien auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten (VIDOTTO et al., 1995).

Berichte über parasitäre Antigene auf der Oberfläche von Theilerien-infizierten Zellen betreffen beide Wirtszelltypen, d. h. Lymphoblastoidzellen oder andere mononukleäre Zellen sowie Erythrozyten.

SCHIELS et al. (1989) nannten als parasitäre Antigene auf der Oberfläche *Theileria annulata*-infizierter Lymphoblastoidzellen 3 Moleküle von 20 kDa, 58 kDa und 99 kDa, konnten aber nicht ausschließen, daß das Spektrum größer war. In einer neueren Studie (PRESTON et al., 1998) ließen sich auf *T. annulata*-infizierten mononukleären Zellen mittels mehrerer MAK 2 verschiedene Antigene nachweisen, von denen eines ausschließlich bei virulenten Erregerstämmen zu beobachten war.

Untersuchungen zu *Theileria*-befallenen Erythrozyten liegen für *Babesia equi* vor, einem Erreger, der inzwischen zur Gattung *Theileria* gezählt wird (vgl. ROMMEL, 2000). KNOWLES et al. (1997) beschrieben zwei 34 kDa bzw. 30 kDa große, als EMA-1 (equi merozoite antigen 1) bzw. EMA-2 bezeichneten Moleküle, die untereinander hohe Homologien und auf DNA-Ebene deutliche (>30%) Homologien zu bekannten DNA-Sequenzen von verschiedenen Theilerien aufwiesen.

In keinem Fall konnten von den Autoren Funktionen zugeordnet werden. Interessant ist jedoch, daß einer der von PRESTON et al. (1998) verwendeten MAK im Beisein von Komplement infizierte Zellen lysiert (PRESTON et al., 1986).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

3.1.1 Kälber

Für die Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten wurden drei männliche Kälber der Rasse Deutsch Schwarzbunte eingesetzt. Alle Kälber wurden beim Kauf klinisch untersucht und 5 Wochen kokzidienfrei aufgezogen.

3.1.1.1 Stallung und Desinfektion

Um akzidentelle Kokzidieninfektionen zu vermeiden, wurden die Kälber im institutseigenen Stall untergebracht und aufgezogen. Zwei getrennte Stockwerke standen für die kokzidienfreie Aufzucht bzw. für die Haltung infizierter Tiere zur Verfügung. Die Wände und Böden der Räumlichkeiten für die Aufzucht waren gekachelte. Sie verfügten über eine eigene Lüftungsanlage und waren nur über eine Desinfektionsschleuse zugänglich.

Alle Kälber wurden einzeln in Stoffwechsellkäfige aus Edelstahl gestellt. Diese Käfige wurden vor ihrem Gebrauch in einem Hochdruck-Dampfsterilisator sterilisiert und bei Gebrauch jeden Tag sorgfältig mit heißem Wasser gereinigt. Dreimal pro Woche erfolgte eine zusätzliche Reinigung mit Heißdampf (150° C, 135 bar, Kärcher). Die Räumlichkeiten wurden zweimal wöchentlich mit dem gleichen Gerät gereinigt und mit 5%iger (v/v) P-Chlorm-Kresol-Lösung und Perchlorethylen in Wasser (P-3-incicoc[®]; H. Wilhelm Schaumann GmbH, Feuchtwangen) desinfiziert. Personen, die den Stall betraten, hatten eine spezielle Schutzkleidung (Gummistiefel, Kittel, Schürze und Gummihandschuhe) anzulegen und mußten vor dem Eintreten in den Stall eine Desinfektionswanne mit P-3incicoc[®] passieren.

3.1.1.2 Maßnahmen bei Ankunft der Kälber im Stall

Bei der Ankunft wurden alle Kälber nochmals klinisch sowie bakteriologisch und virologisch untersucht (letzte Untersuchungen wurden in dankenswerterweise von Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen, durchgeführt). Zusätzlich, wurde jedes Versuchstier einer prophylaktischen Behandlung mit Toltrazuril (20 mg/kg Kgw., Baycox[®], Bayer AG) per os unterzogen und mit einer Vitaminmischung AD3E (5 ml Vitamin

AD3E-50[®]: 50.000 Einheiten Vitamin A Palmitat, 25.000 Einheiten Cholekalzipherol [Vitamin D3] und 20 mg α -MD3 Tokopherol [Vitamin E] i. m.) versorgt.

Weiterhin erfolgten in den ersten drei Tagen der Aufstallung rektale Kotentnahmen zur Überprüfung auf einen Befall mit Endoparasiten. Diese koproskopische Untersuchungen wurden später dreimal wöchentlich vorgenommen. Darüber hinaus wurde bei den Kälbern dreimal wöchentlich die Körpertemperatur bestimmt.

3.1.1.3 Fütterung der Kälber

Die Kälber wurden am Anfang zweimal täglich mit Milchaustauscher (200 g/Mahlzeit, RCG, Münster) gefüttert. Ab der zweiten Woche wurde zusätzlich pelletiertes Ergänzungsfutter (Raiffeisen Warenzentrale Rhein Main eG Werk, Wiesbaden) *ad libitum* gegeben. Die Kälber bekamen ab der dritten Woche sterilisiertes Heu (105° C, 1.2 bar, 180 min) *ad libitum*. Die Ration an Milchaustauscher wurde wöchentlich um 50 g erhöht. Nach vier Wochen wurde der Milchaustauscher abgesetzt.

3.1.2 Ratten

Sieben Wochen alte, männliche LEWIS Ratten wurden von Harlan/Winkelmann Ltd. (Borchen) gekauft. Die LEWIS Ratten wurden in einem klimatisierten Raum bei 22° C und einer relativen Feuchtigkeit von 50% in Makrolonkäfigen mit Sägemehl als Einstreu gehalten. Trinkwasser und Futter (pelletiert, Typ 1324, Altromin, Lage) standen ihnen *ad libitum* zur Verfügung.

3.2 Parasiten

3.2.1 Stammbeschreibung (*E. bovis*)

Bei den im Rahmen dieser Studie eingesetzten *E. bovis* handelt es sich um den Stamm H, ein vor einigen Jahren in Norddeutschland (Raum Hannover) gewonnenes Feldisolat (FIEGE et al., 1992). Für die Erhaltung des Stammes wurden regelmäßig Passagen in Kälbern durchgeführt.

3.2.2 Infektion von Kälbern mit *E. bovis*

Kälber zur Oozystengewinnung wurden im Alter von ca. 7 Wochen mit je 70.000 sporulierten Oozysten von *E. bovis* per os infiziert. Weiterhin wurden Kälber zur Gewinnung von *E. bovis*-

Immunsereen zusätzlich am 30. Tag p. i. mit 70.000 sporulierten *E. bovis*-Oozysten per os reinfiziert. Zur Gewinnung der Sera (Poolsera) aus den mit *E. bovis*-reinfizierten Kälbern erfolgten an den Tagen 0, 7, 18, 29 und 45 nach der Erstinfektion Blutentnahmen durch Punktion der Vena jugularis. Das Blut wurde bei Raumtemperatur 4 h oder über Nacht im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Anschließend wurde das Blut zentrifugiert (15.000 x g, 10 min). Nach diesem Zentrifugationsschritt wurden die Sera gesammelt und bis zur Verwendung bei - 20° C aufbewahrt.

3.2.3 Gewinnung von *E. bovis*-Oozysten

Die Isolierung von unsporulierten *E. bovis*-Oozysten aus dem Kot infizierter Kälber erfolgte nach der von JACKSON et al. (1964) beschriebenen Methode. Die Fäzes der Kälber wurden dazu ab einem OPG (Oozysten pro Gramm Kot)-Wert von > 1000 gesammelt.

Zur Gewinnung der Oozysten wurde der Kot mit Leitungswasser durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 300 µm gewaschen. Die daraus resultierende Kotsuspension wurde nacheinander über zwei weitere Siebe mit Maschenweiten von 150 µm und 80 µm passagiert. Die Sedimentation der in der zuletzt gewonnenen Kotsuspension vorhandenen Oozysten erfolgte in 10-l-Eimern über einen Zeitraum von zwei Stunden. Das nach zwei Stunden erhaltene Sediment wurde zur Flotation mit einer gesättigten Zuckerlösung (D = 1,35) versetzt, bis eine Dichte von 1,15 erreicht wurde. Für die Flotation der Oozysten wurden flache Schalen (Höhe 8 cm) verwendet, wobei Glasplatten auf die mit dem Flotationsgemisch randvoll gefüllten Schalen blasenfrei aufgelegt wurden. Nach Ablauf der Flotationszeit von zwei Stunden wurden die Glasplatten vorsichtig abgehoben, die an der Glasplattenunterseite anhaftenden, flotierten Oozysten mit Wasser abgewaschen und mit dem gleichen Volumen einer 4%igen (w/v) Kaliumdichromatlösung versetzt.

Die Oozystensuspension in der 4%igen Kaliumdichromatlösung verblieb eine Woche lang bis zum Abschluß der Sporulation bei Raumtemperatur in offenen Schalen, wobei eine ausreichende Sauerstoffzufuhr gewährleistet sein mußte. Diese wurde durch ein zweimal tägliches, vorsichtiges Aufrühren der Oozystensuspension oder durch das Einblasen von Luft mit Hilfe eines Pipettierballs, sichergestellt. Die sporulierten *E. bovis*-Oozysten wurden anschließend in einer 2%igen Kaliumdichromatlösung bei 4° C in Zellkulturflaschen aufbewahrt, wobei die Flaschen nicht dicht verschlossen sein durften, um den Zutritt von Sauerstoff zu ermöglichen.

3.2.4 Gewinnung von *E. bovis*-Sporozoitien durch Gradientenzentrifugation

Lösungen und Reagenzien:

Percoll (Sigma, Deisenhofen)

1,5 M NaCl (Merck, Darmstadt)-Lösung

0,15 M NaCl (Merck)-Lösung

4%ige Natriumhypochloritlösung (Fluka, Buchs/Schweiz)

Inkubationsmedium

0,02 M Cysteinhydrochlorid (Serva, Heidelberg)-Lösung + 0,2 M Natriumbikarbonat (Merck)-Lösung

Exzystiermedium (steril) (HIBBERT und HAMMOND, 1968)

0,4% (w/v) Trypsin (Sigma)

8% (v/v) Rindergalle (aus dem örtlichen Schlachthof)

in HBSS (Hank`s balanced salt solution; Gibco, Eggenstein)

Einfriermedium (steril)

2,5% (v/v) FCS (fetal calf serum) (Biochrom KG, Berlin)

1% (v/v) Glutamin (200 mM, Gibco)

10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck)

in RPMI 1640-Medium (Gibco)

Herstellung der Percoll-Gradienten

Lösung 1: 9 Teile Percoll + 1 Teil 1,5 M NaCl-Lösung

Lösung 2: 0,15 M NaCl-Lösung

Zur Herstellung einer 60%igen und 50%igen Percoll-Lösung wurden Lösung 1 und Lösung 2 wie folgt vermischt:

60%ige Percoll-Lösung: 6 Teile Lösung 1 + 4 Teile Lösung 2

50%ige Percoll-Lösung: 5 Teile Lösung 1 + 5 Teile Lösung 2

Jeweils 10 ml der so hergestellten Percoll-Lösungen wurden in 10 ml-Beckmann-Zentrifugenröhrchen gefüllt und anschließend in einer Beckmann J 2-21 Zentrifuge (Rotor JA 20.1) 20 min bei 4 ° C mit 30.000 x g zentrifugiert; im Laufe dieser Zentrifugation baute sich ein kontinuierlicher Gradient auf.

Durchführung

Zur Sporozoitengewinnung wurden die sporulierten *E. bovis*-Oozysten zunächst 10 min mit 400 x g abzentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in einer 4%igen Natriumhypochloritlösung erfolgte eine mindestens 20minütige Behandlung der Oozysten unter Rühren im Eisbad. Dieser Schritt geschah im Eisbad, um die Konzentration an aktivem Chlor möglichst konstant zu halten. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 300 x g des Gemischs aus Oozystensuspension und Natriumhypochlorit befanden sich die Oozysten im Überstand, der vorsichtig abgesaugt, 1 : 1 mit Wasser verdünnt und 5 min mit 400 x g zentrifugiert wurde. Das Sediment aus Oozysten wurde auf einen 60%-Percoll-Gradienten aufgetragen und 20 min mit 400 x g zentrifugiert. Die Bande mit Oozysten wurde abgesaugt, auf einen 50%-Percoll-Gradienten aufgetragen und erneut 20 min mit 400 x g zentrifugiert. Die danach erhaltene Percoll-Oozystensuspension wurde mit mindestens 40% (v/v) Wasser gemischt und 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in einer sterilen 0,02 M Cysteinhydrochlorid/0,2 M Natriumbikarbonat-Lösung resuspendiert und in einer Zellkulturflasche in 100%iger CO₂-Atmosphäre (NYBERG et al., 1968) bei 37° C 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Oozysten abzentrifugiert (10 min, 500 x g) und im sogenannten Exzystiermedium suspendiert. Die Exzystierung erfolgte in 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37° C unter stündlicher mikroskopischer Kontrolle. Die Exzystierung der Sporozoiten fand in der Regel im Verlauf von vier bis fünf Stunden statt. Gewöhnlich wurden bei einer Exzystierungsrate von ca. 50% die Oozystensuspension mit 300 x g, 10 min abzentrifugiert und das Pellet in steriles HBSS überführt, da ein langer Verbleib der freigewordenen Sporozoiten im Exzystiermedium sich nachteilig auf ihre Vitalität auswirkte. In HBSS konnte die Exzystierung dann unter den oben genannten Inkubationsbedingungen zum Abschluß gebracht werden.

Durch eine Zentrifugation von 10 min bei 400 x g wurden die isolierten Sporozoiten gewonnen. Soweit die Sporozoiten für *in vitro*-Versuche bestimmt waren, wurden sie entweder direkt verwendet oder in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen und nach kurzer Vorkühlung (4° C, 0,5 - 1 h) bei -80° C aufbewahrt.

3.2.5 Gewinnung von *E. bovis*-Merozoiten I

Zellkulturmedium:

Iscove`s Modified Dulbecco Medium (IMDM) (Sigma)

10% FCS (Biochrom)

2 mM Glutamin (Gibco)

0,22% NaHCO₃ (Merck)

50 IU/ml Penicillin (Sigma)

5 mg/ml Streptomycin (Sigma)

Lösungen:

PBS (phosphate buffered saline): 7,2 g NaCl; 3,08 g Na₂HPO₄ x H₂O; 0,354 g KH₂PO₄;

Aqua dest. ad 1000 ml (pH 7,4)

Als Voraussetzung für die geplanten *in vitro*-Studien mit *E. bovis* wurden für unterschiedliche Zwecke Systeme mit verschiedenen Wirtszellen etabliert (HERMOSILLA et al., 2002). Die mengenmäßige Produktion von *E. bovis*-Merozoiten I wurde in bovinen fetalen Gastrointestinalzellen (BFGC) durchgeführt.

Durchführung

Zu diesem Zweck wurden BFGC (siehe 3.3.1.2) in IMDM-Medium mit 10% FCS bei 37° C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ in Zellkulturflaschen (25 cm², Nunc, Wiesbaden) bebrütet, bis sie einen geschlossenen Zellmonolayer gebildet hatten. Anschließend wurden diese Zellkulturen mit einer Infektionsdosis von $7,5 \times 10^5$ *E. bovis*-Sporozoiten infiziert. Das IMDM-Medium mit 10% FCS wurde bis zum 12. Tag p. i. alle zwei Tage gewechselt, danach wurde nur noch FCS-freies IMDM-Medium verwendet. Im BFGC-System traten bereits ab Tag 14 p. i. freie Merozoiten I aus Makroschizonten aus. Für die Merozoiten-Ernte wurde die gesamte überstehende Merozoiten-Suspension aus den Zellkulturflaschen abgenommen, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Nunc) pipettiert und 1 min mit 200 x g zentrifugiert. Durch diese kurze Zentrifugation erfolgte eine Trennung der Merozoiten von Wirtszellresten und anderem Debris. Der vorsichtig abpipettierte Überstand enthielt die Merozoiten, welche durch erneute Zentrifugation (200 x g, 25 min) pelletiert wurden. Das Pellet der Zentrifugation enthielt neben Wirtszellresten noch ca. 30% der aus den Makroschizonten freigesetzten Merozoiten. Es wurde in 20 ml PBS resuspendiert und erneut für 1 min bei 200 x g zentrifugiert. Der

Überstand dieser Zentrifugation enthielt die zweite Charge an Merozoiten, die wiederum bei 200 x g (25 min) pelletiert werden konnte. Die Merozoiten-Pellets wurden in 1 – 2 ml PBS resuspendiert und die Parasitenzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt. Bei Verwendung der Merozoiten im IIFT wurden die Merozoiten sofort weiterverarbeitet. Merozoiten, die für spätere Analysen vorgesehen waren, wurden eingefroren und bei -80° C gelagert.

3.2.6 Immunisierung der LEWIS-Ratten mit *E. bovis*-Merozoiten

Für die Immunisierung wurden Ratten ausgewählt, weil für diese, im Gegensatz zu Kaninchen, eine kokzidienfreie Haltung gewährleistet werden kann.

Für die Grundimmunisierung der 12 Wochen alten männlichen LEWIS-Ratten wurden 1 – 2 x 10⁶ *E. bovis*-Merozoiten in 0,5 ml PBS intraperitoneal injiziert (Tag 0). An den Tagen 7, 21 und 45 wurden die Ratten mit der gleichen Menge an Merozoiten I geboostert. Am 7. und 14. Tag nach der letzten Immunisierung wurde durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus im medialen Augenwinkel mit einer Pasteurpipette Blut entnommen (Entnahmenvolumen: 1 – 1,5 ml). Das nach Gerinnung (1 h, RT) gewonnene Rattenserum wurde bei -20° C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.3 Zellkultur

Für die Untersuchung von Oberflächenantigenen auf mit *E. bovis*-infizierten Wirtszellen im Verlauf der ersten Schizogonie kamen Wirtszellen bovinen und nicht bovinen Ursprungs zur Verwendung. Vom Rind stammten primäre Endothelzellen aus Umbilikalvenen (BUVEC), Lymphgefäßen der Milz (BSLEC), sowie eine permanente fetale Gastrointestinalzelllinie (BFGC) und die permanente Nierenzelllinie Madin-Darby (MDBK). Weiterhin fanden als Wirtszellen nicht bovinen Ursprungs die permanenten African Green Monkey-Kidney (VERO)-Zellen Verwendung.

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37° C, 5% CO₂-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.3.1 Zelllinien

3.3.1.1 Bovine Umbilikalvenenendothelzellen (BUVEC)

3.3.1.1.1 Gewinnung sowie Kultivierung von BUVEC

Lösungen und Reagenzien:

H/H⁺⁺-Puffer (pH 7,4) (steril)

50 ml Hank's balanced salt solution (HBSS, Seromed, Berlin)

450 ml Aqua dest.

3 g Hepes (Sigma)

5 - 10 Tropfen 1 M NaOH zur pH-Einstellung

0,025%ige Kollagenase-Lösung (steril)

0,025 g Kollagenase Typ II (Worthington Biochemical Corp.)

100 ml PSA-Puffer (Puck's saline A buffer, Gibco)

Kulturmedien:

Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, Promocell)

12 ml ECGM-Supplement (Promocell)

Modifiziertes ECGM (steril)

280 ml 199 Medium (Sigma)

120 ml ECGM (Promocell)

8 ml FCS (Biochrom)

50 IU/ml Penicillin

5 mg/ml Streptomycin

Accutase-Puffer (PAA, Stadt)

Durchführung

Nabelschnüre von durch *Sectio caesarea* gewonnenen Kälbern (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Zerbe, Klinik für Geburtshilfe der Tierärztlichen Hochschule Hannover) wurden in sterilem H/H⁺⁺-Puffer bei 4° C bis zur Versendung für 1 – 2 Tage gelagert.

Die Gewinnung der Endothelzellen aus der Umbilikalvene erfolgt nach der Methode von JAFFE et al. (1973). Unter der Sterilbank wurde die Nabelschnur aus dem Gefäß entnommen und mit einer sterilen Mullkompressen abgetupft. Die Umbilikalvene wurde aus dem Hautschlauch der Nabelschnur mit Hilfe von Schere und Pinzette vorsichtig herauspräpariert. Eine kurze Braunüle (Braun, Melsungen) wurde in die freie Umbilikalvene eingeführt und mit Hilfe eines Nähfadens (S. M. I. AG, Hünningen, Belgien) an diese festgebunden. Anschließend wurde eine Spritze mit 20 ml H/H⁺⁺ an die befestigte Braunüle gelegt und die Umbilikalvene gründlich durchgespült. Nach dieser Spülung wurde am anderen Ende der Vene eine Klemme angelegt und dicht verschlossen. Danach wurde die Vene mit 0,025%iger Kollagenase-Lösung (vorgewärmt im Wasserbad bei 37° C) gefüllt und 20 min bei 37° C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Während der Inkubation wurde 1 ml FCS (Gibco) pro Umbilikalvene in einem 50-ml Röhrchen vorgelegt. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Umbilikalvene vorsichtig massiert, die Klemme entfernt und die Kollagenase-Lösung mittels einer Spritze mit 20 ml 199-Medium aus der Vene in das 50-ml Röhrchen ausgewaschen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die durch Kollagenaseverdauung aus dem Zellverband gelösten Endothelzellen wurden durch Zentrifugation (400 x g, 10 min) pelletiert, in 5 ml ECGM-Medium resuspendiert, in 5 Zellkulturflaschen (25 cm², Nunc) überführt und unter den bereits beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Vermehrung der BUVEC erfolgte in diesen 5 Flaschen mit ECGM-Medium, bis die Zellen 80 - 100% konfluent waren. Dann wurden sie nach einmaligem Spülen der Zellkulturflaschen in Accutase-Puffer (PAA laboratories GmbH, Pasching, Austria) und unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle 2 - 5 min (37° C) auf einer Wärmeplatte inkubiert. Die optimale Einwirkzeit war gegeben, wenn die Mehrzahl der BUVEC-Zellen sich vom Flaschenboden gelöst hatte und abgerundet in dem Accutase-Puffer schwamm.

Das Aussäen der Zellen auf andere Flaschen (für eine weitere Vermehrung der BUVEC-Isolate) oder auf Objektträger mit abnehmbaren Kammern (Chamberslides, Nunc) für die Infektionsversuche erfolgte nach einer Verdünnung von 1 : 2 bis 1 : 6 in modifiziertem ECGM-Medium.

3.3.1.2 Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGC)

waren ursprünglich aus der Dün- und Dickdarmschleimhaut 4 – 6 Monate alter Rinderfeten isoliert worden (HERMOSILLA et al., 2002). Sie wurden in substituiertem Iscove's Modifiziertem Dulbecco Medium (Sigma) und 10% FKS kultiviert.

Kulturmedium:

IMDM-Medium (Sigma)
2 mM Glutamin (Sigma)
0,22% NaHCO₃ (Merck)
50 IU/ml Penicillin (Sigma)
5 mg/ml Streptomycin
10% FCS (Biochrom)

3.3.1.3 Bovine Milzlymphendothelzellen (BSLEC)

BSLEC (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. T. PREISSNER, Biochemisches Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen) waren aus Lymphgefäßen der Milz von Rindern isoliert worden. Die Kultivierung der BSLEC erfolgte wie unter 3.3.1.1.1 für BUVEC beschrieben.

3.3.1.4 Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)-Zellen

stammten von der European Collection of Cell Cultures (ECACC 90050801) und wurden in substituiertem RPMI 1640-Medium (Gibco) kultiviert.

3.3.1.5 African Green Monkey Kidney Cells (VERO)

wurden von ECACC unter ECACC 84113001 gekauft und wie MDBK-Zellen kultiviert. Die verwendeten Medien setzten sich wie folgt zusammen:

Kulturmedium für MDBK und VERO:

RPMI 1640-Medium (Gibco)
50 IU/ml Penicillin (Sigma)
5 mg/ml Streptomycin (Sigma)
5 - 10% FCS (Biochrom)

3.3.2 Infektion der Zellen

3.3.2.1 Infektion von Zellen auf Objektträgern mit abnehmbaren Kammern und in Zellkulturflaschen

Die verschiedenen Zelllinien wurden sowohl auf Objektträgern mit 8 Kammern (Nunc LabtekTM Tissue Culture Chamber SlidesTM-Gefäße, Nunc) als auch in Zellkulturflaschen

(25 cm²; Nunc) bis zum geschlossenen Zellrasen geführt. Für die Infektion wurden frische oder kryokonservierte *E. bovis*-Sporozoitien eingesetzt.

Pro einzelner Kammer des Chamber Slides wurden 10.000 *E. bovis*-Sporozoitien aufgetropft, pro Zellkulturflasche wurden $7,5 \times 10^5$ *E. bovis*-Sporozoitien inokuliert.

In beiden *in vitro*-Systemen wurden die Medien alle zwei Tage gewechselt.

3.3.3 Kryokonservierung von Zellen sowie Merozoiten und Sporozoitien von *E. bovis*

Lösungen und Reagenzien:

Versenpuffer (steril)

8 g NaCl (Merck)

0,2 g KCL (Merck)

1,45 g NaHPO₄ (Merck) x 2 H₂O

0,2 g KH₂PO₄ (Merck)

0,2 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Merck)

Aqua dest. ad 1000 ml

Gepufferte Trypsinlösung (pH 7.2)(steril)

8 g NaCl (Merck)

0,38 g KCl (Merck)

0,125 g Na₂HPO₄ (Merck) x 2 H₂O

1 g Glukose (Sigma)

3 g Tris (hydroxymethyl) aminomethan (ICN Biochemicals, Inc.)

HCl (Merck) (für Einstellung auf pH 7,2)

2,5 g Trypsin (Sigma)

Aqua dest. ad 1000 ml

Trypsin-Versenpuffer (steril)

12,5 ml gepufferte Trypsinlösung

50 ml Versenpuffer

Medien:

Einfriermedium

4 ml Kulturmedium

0,5 ml FCS (Biochrom)

0,5 ml DMSO (Merck)

0,1 ml Glutamin (Sigma)

Durchführung

Die für die Kryokonservierung vorgesehenen Zellen oder Parasiten wurden auf Vitalität und eventuelle bakterielle Kontamination lichtmikroskopisch untersucht.

Zellen in Zellkulturflaschen wurden 2 min mit Versenpuffer gespült, anschließend in 2 ml Trypsin-Versenpuffer/pro Flasche bei 37° C, 5% CO₂-Atmosphäre und unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle inkubiert. Sobald die Zellen sich vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden sie in 10 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert und einmal bei 400 x g 10 min gewaschen. Das Medium wurde vollständig dekantiert und das Zellpellet nach dem Aufklopfen mit dem eiskalten Einfriermedium versetzt.

Merozoiten- und Sporozoiten von *E. bovis* wurden vor dem Einfrieren meist auf eine Konzentration von 10⁸ Parasiten pro ml Einfriermedium eingestellt. Die Einfriergefäße (Nunc) mit der Zell- oder Parasitensuspension lagerten 30 - 60 min bei 4° C, um dann in einer Tiefkühltruhe auf -80° C herunterzukühlen.

Für das Auftauen der Proben wurden die Kryogefäße in einem Wasserbad bei 37° C so lange geschwenkt, bis die Zell- bzw. Parasiten-Suspension gerade aufgetaut war. Das Verdünnen des Einfriermediums erfolgte durch sofortiges Verbringen der aufgetauten Zellsuspension (1 ml) in ein mit 9 ml Medium vorgefülltes 12-ml Röhrchen (Nunc). Danach folgte eine Zentrifugation (400 x g, 10 min), das Pellet wurde aufgeklopft, mit Medium resuspendiert und in den anstehenden Versuchen weiterbearbeitet.

3.4 Methoden zur Charakterisierung der Oberflächenantigene der Schizonten-infizierten Zellen

3.4.1 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Lösungen und Reagenzien:

PBS-Stammpuffer

85 g NaCl (Merck)

12,8 g Na₂HPO₄ 2 x H₂O

1,56 g NaH₂PO₄ 1 x H₂O

Aqua dest. ad 1000 ml

PBS-Gebrauchspuffer (pH 7,4)

100 ml PBS-Stammpuffer

Aqua dest. ad 1000 ml

Paraformaldehyd, 10%ige Stammlösung

2,0 g Paraformaldehyd (Sigma) wurden in 17 ml Aqua dest. bei 45 - 60° C gelöst, nach Zugabe von 2 – 3 Tropfen 1 M NaOH (Merck) auf RT abgekühlt und mit Aqua dest. bis 20 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend filtriert und bei 4°C gelagert.

Glutaraldehyd-Lösung 0,25%

1 ml Glutaraldehyd-Lösung 25% (v/v) (Sigma)

ad 100 ml PBS

Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Lösung (PAGA)

40 ml Paraformaldehyd-Stammlösung

ad 100 ml Glutaraldehyd 0,25%

Evans-Blue-Lösung

0,05% (w/v) Evans Blue (Serva, Heidelberg) in PBS-Gebrauchslösung

Karbonat-Bikarbonatpuffer

4,2 g NaHCO₃ (Merck)

5,3 g NaCO₂ (Merck)

ad 100 ml Aqua dest.

Anti-Fading-Einbettmittel

100 mg p-Phenylendiamin (Sigma) in 10 ml PBS-Gebrauchslösung gelöst, gemischt mit 90 ml Glycerin (Sigma) und mit Karbonat-Bikarbonatpuffer auf pH 8,0 eingestellt (modifiziert nach JOHNSON und NOGUEIRA-ARAÚJO, 1981)

BSA/PBS

2% Bovines Serumalbumin (BSA, Roth, Karlsruhe) in PBS-Gebrauchslösung

Sera :

- 1- Rinder-Präinfektionssera (Rd-0) und- Infektionssera (Rd-Inf) aus infizierten und nach 30 Tagen reinfizierten Rindern (7, 18, 29 und 45 Tage nach der ersten Infektion), jeweils Poolsera von 3 Tieren; 1 : 100 in 2% BSA/PBS verdünnt

- 2- Präimmun- und Immunsere aus immunisierten LEWIS Ratten, jeweils Poolsera von 5 Tieren; 1 : 100 in 2% BSA/PBS verdünnt
- 3- Affinitätsgereinigte Antikörper (3.4.4); 1 : 5 in 2% BSA/PBS

Konjugate:

- 1- FITC conjugated Rabbit Anti-bovine IgG (Sigma); 1 : 20 in Evans-Blue-Lösung verdünnt
- 2- FITC conjugated Goat Anti-Rat IgG (Sigma); 1 : 20 in Evans-Blue-Lösung verdünnt

3.4.1.1 Präparation der Wirtszellen für den IIFT

Zum Nachweis der parasitenspezifischen *E. bovis*-Antigene auf der Wirtszelloberfläche wurden BFGC-, BUVEC-, BSLEC-, MDBK- und VERO-Zellen mit Sporozoiten infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (5., 6., 7., 8., 12. und 15. Tage p. i.) untersucht.

Dazu wurden zu den genannten Zeitpunkten die infizierten Zellen, die auf 8-Kammer-Objektträgern wuchsen, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in PAGA-Lösung 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger luftgetrocknet und anschließend sofort für Immunfluoreszenztests verwendet oder bei -80° C für spätere Studien gelagert. Weiterhin wurden infizierte BFGC in Zellkulturflaschen mittels eines Zellschabers (Nunc) mechanisch vom Flaschenboden abgeschabt und in PBS resuspendiert. Danach wurden die so erhaltenen Zellen dreimal in PBS-Gebrauchslösung gewaschen (400 x g, 10 min) und zum Schluß in PAGA-Lösung für 10 min fixiert. Nach dieser Fixierung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und auf mit poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet.

3.4.1.2 Präparation der *E. bovis*-Sporozoiten und -Merozoiten I für den IIFT

Sowohl die Sporozoiten (vgl. 3.2.4) als auch die aus infizierten BFGC isolierten Merozoiten I (vgl. 3.2.5) von *E. bovis* dienten als Antigene. Die lebende Parasitenstadien wurden jeweils dreimal in PBS gewaschen und bei 400 x g 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die so gewaschenen Parasiten in PAGA oder Methanol für 10 min bei Raumtemperatur fixiert, auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger getropft und luftgetrocknet. Die Objektträger wurden teils bis zum IIFT-Versuch bei -80 ° C gelagert.

3.4.1.3 Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT)

Vor Verwendung der fixierten Objektträger mußten freie Aldehydgruppen durch eine 15minütige Inkubation mit 10 mM Lysin (Sigma) in PBS blockiert werden.

Die verdünnten Seren wurden aufgetropft und mit den Antigenen 30 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 10 min) in PBS und Lufttrocknen wurde das 1 : 10 in Evans-Blue-Lösung verdünnte Konjugat aufgetragen. Nach einer Reaktionszeit von ebenfalls 30 min (37° C, feuchte Kammer), dreimaligem Waschen mit PBS und Lufttrocknung wurden die Objektträger mit dem anti-fading-Einbettmedium versehen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die mikroskopische Untersuchung der Präparate erfolgte unter Aufsicht an einem DIAPLAN-UV-Mikroskop (Leitz, Wetzlar).

3.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollten die morphologischen Merkmale der *E. bovis*-infizierten Zellen dargestellt (Rasterelektronenmikroskopie) und die Bindungsorte der verschiedenen Seren mit *E. bovis*-Antigenen auf ultrastruktureller Ebene erfaßt werden (Immunelektronenmikroskopie).

3.4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Lösungen und Reagenzien:

PBS für die Elektronenmikroskopie (PBS-E): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄; Aqua dest. ad 1000 ml (pH 7,4)

1,5%iges Glutaraldehyd (Stammlösung 25%, Serva) in HBSS (Hank`s balanced salt solution; Gibco, Eggenstein)

Cacodylatpuffer 1 M (pH 7,2): 107 g Dimethylarsinsäure (Merck) gelöst in 400 ml Aqua dest, mit 0,4 M HCl auf pH 7,2 eingestellt; anschließend auf 500 ml mit Aqua dest aufgefüllt
1%iges Osmiumtetroxid (Roth, Karlsruhe) in 0,166 M Cacodylatpuffer

50% Ethanol (20 min)

70% Ethanol (20 min)

80% Ethanol (20 min)

96% Ethanol (20 min)

100% Ethanol

Aqua dest.

Durchführung

BUVEC wurden auf Glass-Coverslips (10 mm Durchmesser, Nunc) angezüchtet und wie beschrieben mit Sporozoiten von *E. bovis* infiziert (vgl. 3.3.2.1). Zehn min, 15 min, 30 min, 1 Tag, 3 Tage, 5 Tage, 8 Tage, 15 Tage p. i. wurden die infizierten Monolayer mit PBS-E dreimal abgespült und mit 1,5%iger Glutaraldehydlösung in HBSS 1 h bei 4° C fixiert. Die fixierten Zellen wurden dann dreimal mit HBSS gespült und in 1% Osmiumtetroxid in 0,166 M Cacodylatpuffer nachfixiert. Nach drei weiteren Waschungen in Aqua dest. (jeweils 20 min bei 4° C) wurden die fixierten Zellen nach Standardverfahren in ansteigenden Ethanolreihen dehydriert und einer „critical-point-Trocknung“ mit CO₂ unterzogen. Anschließend wurden die Präparate nach Standardverfahren mit Gold gespottet (siehe DYKSTRA, 1993) und mit einem Rasterelektronenmikroskop (Philips PSEM 500) untersucht.

3.4.2.2 Immunelektronenmikroskopie

3.4.2.2.1 Präembedding-Methode

Mit diesem Verfahren sollte die im IIFT nachgewiesene Reaktion des Rinder-Infektionsserums mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragerder BFGC 15 Tage p. i. kontrolliert werden.

Lösungen, Reagenzien und Material:

Fixans: 4ml der 10%igen Paraformaldehydlösung; 310 µl 8%iges Glutaraldehyd (Polyscience, St. Goar); 1 ml 1M Cacodylatpuffer; Aqua dest. ad 10 ml (pH 7,4)

Lysinpuffer: 0,01% (w/v) Lysin in PBS-E

PBS-E: Siehe 3.4.2.1

Rinderseren: Rd-0, Rd-Inf (vgl. 3.4.1)

anti-Rind-IgG-Goldkonjugat aus Kaninchen (4 nm Partikelgröße; Dianova, Hamburg)

50% Aceton (Roth, Karlsruhe)

70% Aceton

80% Aceton

96% Aceton

100% Aceton

2%iges Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer

Araldit (Serva, Heidelberg)

Durchführung

Nach mechanischer Abschabung der *E. bovis*-tragenden BFGC (15 Tage p. i.) von der Unterlage wurden die Zellen dreimal mit PBS-E gewaschen und mit 400 x g 10 min pelletiert. Nach der Zentrifugation wurden der Überstand abgenommen, das Zellpellet in Fixans resuspendiert und 10 min fixiert. Danach erfolgten eine weitere Zentrifugation (400 x g, 10 min) und eine Inkubation des Zellpellets in Lysinpuffer für 15 min bei Raumtemperatur, um die freien Aldehydgruppen zu blockieren. Nach einer Zentrifugation (3500 U/min, 5 min; Eppendorffzentrifuge) wurde die Blockierlösung verworfen, das Pellet in 100 µl der 1 : 100 verdünnten Testseren resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBS-E gewaschen (3500 U/min, 5 min), danach in Goldkonjugat (1 : 50 in PBS-E) resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend erneut dreimal in PBS-E gewaschen (3500 U/min, 5 min) und nochmals 12 h dem Fixans ausgesetzt. Die Einbettung erfolgte nach der Fixierung (1,5 h) mit Osmiumtetroxid und darauffolgender Dehydrierung in einer aussteigenden Acetonreihe in Araldit nach Standardmethoden (siehe DYKSTRA, 1993).

3.4.2.2.2 Postembedding-Methode

Affinitätsgereinigte Antikörper des Rinder-Infektionsserums (Rd-Inf) sollten auf Schnitten von fixierten *E. bovis*-Merozoiten I getestet werden, um auf ultrastruktureller Ebene die Lokalisation der erfaßten Antigene zu klären.

Lösungen, Reagenzien und Material:

Paraformaldehydlösung 10% (vgl. 3.4.1)

Lysinpuffer 1 : 10 mM Lysin enthaltender 0,1 M Cacodylatpuffer

Fixans (vgl. 3.4.2.2.1)

1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) (vgl. 3.4.2.1)

0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4)

3,5%iger Agar (Sigma) in Aqua dest.

LR-White (London Resin Company, Surrey, England)

Initiator: Benzoinmethylether (Aldrich Chemie, Steinheim/Albuch)

50% Ethanol

70% Ethanol

80% Ethanol

96% Ethanol

100% Ethanol

Gelatinekapseln (Pohl und Boskamp, Hohenlockstedt)

PBS-E: Siehe 3.4.2.1

Lysinpuffer 2: 0,01% (w/v) Lysin in PBS-E

PBS-E/BSA/Tween: 0,2% BSA-C (azetyliertes Albumin; Biotrend, Köln); 0,1% Tween 20 (Roth, Karlsruhe) in PBS-E

Parafilm[®] (American Company, Greenwich, USA)

Formovar[®] beschichtete Nickelnetze (Serva, Heidelberg)

Affinitätsgereinigte Antikörper (vgl. 3.4.4, 1 : 50)

anti-Rind-IgG-Goldkonjugat aus dem Kaninchen (Partikelgröße: 4 nm; Dianova, Hamburg)

Uranylacetatlösung: 4% Uranylacetat in 5% Ethanol

Bleicitrat nach REYNOLDS (1963): 1,33 g Pb(NO₃)₂; 1,76 g Na-Citrat in 30 ml Aqua dest. gelöst (30 min schütteln); Zugabe von 8 ml N NaOH (pH 12)

Fixierung der *E. bovis*- Merozoiten I

Für die Postembedding-Methode wurden ganze Merozoiten I dreimal in PBS-E gewaschen (400 xg, 10 min) und 2 h im Fixans bei Raumtemperatur fixiert.

Einbettung

Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer verblieben die Proben zur Blockierung freier Aldehydgruppen 30 min im Lysinpuffer 1. Anschließend wurden die Schizonten dreimal 10 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Merozoitenpellet in 37 - 40° C warmem Agar aufgenommen, welcher nach dem Erstarren in Blöckchen von ca. 2 mm Kantenlänge geschnitten wurde. Die Dehydrierung erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur (siehe DYKSTRA, 1993).

Die Merozoiten I wurden anschließend mit dem Kunstharz LR-White infiltriert, indem sie für jeweils 30 min in einem in der LR-White-Konzentration ansteigendem Kunstharz/Ethanolgemisch mit 0,5% Initiator inkubierten. Die Kunstharzkonzentrationen betragen 25%, 50% und 75% (v/v). Danach konnten die Agarblöckchen in reines LR-White mit 0,5% Initiator überführt werden, welches nach 30 min zweimal nach je 1 h, nach 12 h sowie nach weiteren 2 h gewechselt wurde. Für die Endeinbettung wurde die Suspension in

Gelatinekapseln verbracht und für einen Zeitraum von drei Tagen unter UV-Licht bei 4° C gehalten.

Durchführung der Immunreaktion

Von den in Kunstharz eingebetteten Merozoiten I wurden Ultradünnschnitte angefertigt und auf Nickelnetze aufgenommen. Für die folgenden Inkubationsschritte flotierten die Netze mit den Schnitten nach unten auf Tropfen der einzelnen Reagenzien. Die einzelnen Schritte wurden in mit Parafilm® ausgekleideten Petrischalen bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst flotierten die Netze 20 min auf dem Lysinpuffer 2. Die sich anschließenden Waschschritte waren zwei jeweils 10 min dauernde Inkubationen auf PBS-E und eine Inkubation auf PBS-E/BSA/Tween. Danach erfolgten die Inkubation mit dem zu testenden affinitätsgereinigten Antikörper für 2 h und wiederum drei Waschschritte, jedoch diesmal zuerst einmal auf PBS-E/BSA/Tween und danach zweimal auf PBS-E. Die Inkubationszeit mit dem Gold-Konjugat (1 : 10 in PBS-E) betrug 1 h. Die abschließenden Waschungen erfolgten zweimal für 10 min auf PBS-E und einmal für 5 min auf Aqua dest. Nach Kontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat (5 min) und mit Bleicitrat (2 min) wurden die Präparate im Transmissionselektronenmikroskop (LEO 906) untersucht.

3.4.3 Behandlung der Oberflächenantigene auf *E. bovis*-Schizonten tragenden BFGC mit Salzen, Detergentien und Enzymen

Um eine nähere Charakterisierung der parasitenspezifischen Antigene auf der Oberfläche der Wirtszellmembran zu durchführen, wurden mit *E. bovis*-infizierten BFGC am Tag 15 p. i. wie folgt behandelt:

Zunächst wurde von den Zellkulturflaschen (25 cm²; Nunc) mit dem infizierten BFGC-Monolayer das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Nunc) mechanisch abgeschabt. Die so abgelösten Zellen wurden anschließend dreimal in PBS gewaschen und abzentrifugiert (400 x g, 10 min). Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in unterschiedlichen Substanzen, die zur Charakterisierung der parasitenspezifischen Oberflächenantigene auf der Wirtszellmembran dienen sollten, suspendiert. Nach der Behandlung erfolgten erneut ein dreimaliges Waschen (400 x g, 10 min), eine zehnminütige Fixierung in PAGA. Die Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen, anschließend auf mit 0.1% Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger getropft, luftgetrocknet und im IIFT getestet (vgl. 3.4.1.3).

3.4.3.1 Natriumchlorid (1 M)-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

Natriumchlorid-Lösung (NaCl 1 M, Roth, Mannheim)

PBS-Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Das Pellet wurde in 1 M NaCl resuspendiert und 30 und 60 min bei 4° C inkubiert (modifiziert nach THOMAS und McNAMEE, 1990).

3.4.3.2 Phospholipase C-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

Phospholipase C (Boehringer-Mannheim, Mannheim)

PBS Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Das Zellpellet wurde mit Phospholipase C (1 mg/ml in PBS) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.3.3 Proteinase K-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

Proteinase K (Nr. 33752; Boehringer-Mannheim)

Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 0,1, 0,2 und 0,4 mg/ml in PBS verdünnt

PBS Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Das Zellpellet wurde in 1 ml Proteinase K-Lösung (0,1, 0,2 und 0,4 mg/ml) resuspendiert und anschließend bei 37° C im Wasserbad 30 min, 1 und 2 h inkubiert.

3.4.3.4 CHAPS-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

CHAPS (3-[3-Cholamidopryl-Dimethylammonio]-1-Propansulfonat) (Sigma)

Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 1mM, 10 mM und 100 mM in PBS verdünnt

PBS Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Zellpellets wurden in 1 ml CHAPS-Lösung resuspendiert und bei 37° C im Wasserbad bis 2 h inkubiert (modifiziert nach SCHWARTZMAN und PFEFFERKORN, 1989; TAYLOR et al., 1990; HALONEN und WEIDNER, 1994).

3.4.3.5 Triton X-100-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

Triton X-100 (Sigma) Lösungen: 1 µl/ml, 5 µl/ml, 10 µl/ml in PBS verdünnt
PBS Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Die Behandlung des Zellpellets mit Triton X-100 erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bereits für CHAPS beschrieben (vgl. 3.4.3.4).

3.4.3.6 Triton X-114-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

Triton X-114 (Sigma) Lösungen: 1 µl/ml, 5 µl/ml, 10 µl/ml in PBS verdünnt
PBS Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Die Behandlung des Zellpellets mit Triton X-114 wurde wie bei CHAPS durchgeführt (vgl. 3.4.3.4).

3.4.3.7 Triton X-405-Behandlung

Lösungen und Reagenzien:

Triton X-405 (Sigma) Lösungen: 1 µl/ml, 5 µl/ml, 10 µl/ml in PBS verdünnt
PBS Gebrauchslösung (vgl. 3.4.1)

Die Behandlung des Zellpellets mit Triton X-405 wurde wie bei CHAPS durchgeführt (vgl. 3.4.3.4).

3.4.4 Affinitätsreinigung des Rinder-Infektionsserums (gewonnen 45 Tage p. i. aus mit *E. bovis*-infizierten Kälbern) an *E. bovis*-Schizonten-tragenden BFGC

Lösungen und Reagenzien:

PBS (1 x): 7,2 g NaCl; 3,08 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 0,354 g KH₂PO₄; Aqua dest. ad 1000 ml; (pH 7,4)

Fixationsmittel: 3% Formaldehydlösung (in H₂O)

Elutionslösung: 100 mM Glyzin, mit HCl auf pH 2,3 eingestellt

Tris-HCl: 1 M Tris(hydroxymethyl) aminomethan, mit HCl auf pH 8.0 eingestellt

Rinder-Präinfektionssera (Rd-0) und- Infektionssera (Rd-Inf; 45 Tage p. i.)

E. bovis-Schizonten tragende BFGC 15 Tage p. i.

Bovines Serumalbumin (BSA; Sigma): 20% in Aqua dest.

Der Inhalt von fünf 25 cm²-Zellkulturflaschen mit *E. bovis*-Schizonten infizierten BFGC (15 Tage p. i.; jeweils mit $7,5 \times 10^5$ *E. bovis*-Sporozoitien infiziert) wurden mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und anschließend dreimal mit PBS in 10 ml-Röhrchen gewaschen (400 x g, 10 min). Die gewaschenen Zellen wurden für einen Tag bei 4° C in Formaldehydlösung fixiert. Nach erneuertem dreimaligen Waschen in PBS wurden die Zellen in 2 ml-Röhrchen (Nunc) überführt und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen (3500 Upm, 5 min, Eppendorffzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Rinder-Infektionssera (Rd-Inf; 45 Tage p. i.) resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation folgten eine weitere Zentrifugation und ein viermaliges Waschen mit PBS (3500 Upm, 5 min). Nach der letzten Waschung wurde das Pellet mit 300 µl Elutionslösung vermischt und bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (3500 Upm, 5 min) und die sich im Überstand befindenden spezifischen Antikörper durch die Zugabe von 45 µl Tris-HCl neutralisiert. Die so gewonnenen affinitätsgereinigten Antikörper wurden danach mit 35 µl BSA-Lösung versetzt und bis zu ihrer Verwendung bei -20° C gelagert.

Als Kontrolle wurde das gleiche Verfahren, jedoch mit Rinder-Präinfektionssera (Rd-0), parallel durchgeführt.

3.4.5 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Lösungen und Reagenzien:

Farblösung: Farbreagenz für Protein Assay (BIO-RAD, München), 1 : 5 mit Aqua dest. verdünnt

PBS (vgl. 3.4.1)

Bovines Serumalbumin (BSA; Sigma)

Nach Verdünnung des Farbreagenz für den Proteinassay mit Aqua dest. (1 : 5) wurden 250 µl dieser verdünnten Farbreagenzlösung pro Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Nunc) aufgetragen. Anschließend wurden 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung hinzugefügt. Zur Erstellung der Eichkurve wurden jeweils 10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl und 90 µl einer Eichlösung (0,1 mg BSA/ml PBS) zur verdünnten Farbreagenzlösung gegeben. Um den Proteingehalt der Probe zu bestimmen, wurden dann die Farbreaktionen der Eichlösungen mit den Farbreaktionen der zu bestimmenden Probe optisch verglichen.

3.4.6 Natrium-Dodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Lösungen und Reagenzien:

PBS (vgl. 3.4.1)

Sammelgel-Puffer (Lösung A): 6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 4 ml 10%ige Natrium-dodecylsulfat(SDS)-Lösung; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt; Aqua dest. ad 100 ml

Trenngel-Puffer (Lösung B): 18,17 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 4 ml 10%ige Natrium-dodecylsulfat (SDS)-Lösung; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt; Aqua dest. ad 100 ml

Acrylamid-Stammlösung (Lösung C): 30 g Acrylamid (Sigma); 0,8 g N,N-Methylen-bis-acrylamid (Sigma); Aqua dest. ad 100 ml

Amoniumpersulfat-Lösung (Lösung D): 0,1 g Amoniumpersulfat; 1 ml Aqua dest.

Tetramethyldiamin [(TEMED); Serva, Heidelberg]

Elektrodenpuffer (fünffach konzentriert): 15,15 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 72,05 g Glycin; 5 g SDS; Aqua dest. ad 1000 ml

Probenpuffer (reduzierend; fünffach konzentriert): 3,75 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 10 g SDS (Serva); 25 ml 2-Mercaptoethanol (BIO-RAD); 35 ml Glyzerin (Merck); 25 mg Bromphenolblau; auf pH 6,8 mit HCl eingestellt; Aqua dest. ad 100 ml

Molekulargewichtsmarker: HMW (High Molecular Weight)-Marker (10 kDa – 220 kDa) (Invitrogen, Karlsruhe)

Als Antigen dienten neben mit *E. bovis*-Schizonten infizierten BFGC (15 Tage p. i.) nicht infizierte BFGC und *E. bovis*-Merozoiten I. Die in der SDS-PAGE aufzutrennenden Antigenproben wurden zunächst im Eisbad ca. hundertmal jeweils 1 s bei 20 kHz mit Ultraschall (Branson-Sonifier B 12, Danburg) behandelt, mit ¼ des Volumens an fünffach konzentriertem Probenpuffer versetzt, im Wasserbad 10 min gekocht und anschließend bei -20° C bis zu ihrem Gebrauch aufbewahrt.

Zur Trennung der Antigengemische wurde die SDS-PAGE nach der von LÄMMLI (1970) beschriebenen Methode unter Verwendung einer Mini-Protean-Elektrophorese-Einheit (BIO-RAD, München) durchgeführt.

Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die Glasplatten mit den Abstandhaltern in die Halterung eingespannt und im Gießstand fixiert. Für die Herstellung der 7,5%igen, 10%igen und 12,5%igen Trenngele wurden folgende Mischungen hergestellt:

Acrylamidkonzentration	Lösung C (ml)	Lösung B (ml)	Aqua dest (ml)
7,5%	7,5	7,5	15
10%	10	7,5	12,5
12,5%	12,5	7,5	10

Die Mischungen wurden anschließend mit 50 µl Lösung D und 30 µl TEMED versetzt und in die Gelkammer gefüllt. Um eine gleichmäßige Grenzfläche zwischen dem Trenngel und dem Sammelgel zu erhalten, wurde die Trenngellösung unmittelbar nach dem Einfüllen mit 70%igem Ethanol überschichtet. Nach dem Einsetzen der Gele in die Trennkammer und dem Auffüllen der Kammer mit Elektrodenpuffer konnten die Antigenproben aufgetragen und der Trennvorgang zunächst bei 100 V Spannung und 60 mA Stromstärke gestartet werden. Nachdem die Bromphenolblau-Front die Trenngelschicht erreicht hatte, wurde die Stromspannung auf 130 V erhöht. Die SDS-PAGE wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front am unteren Rand des Trenngels angelangt war.

3.4.7 Westernblot

Lösungen und Reagenzien:

Transferpuffer: 3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol; Aqua dest. ad 1000 ml

PVDF-Folie (Immobilon[®] P Transfer Membran; Millipore, Eschborn)

Filterpapier GB 003 (Schleicher und Schüll; Dassel)

Der Transfer der in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran erfolgte mittels einer Mini-Trans-Blot-Zelle mit Kühlelement (BIO-RAD) nach einer von BURNETTE (1981) als Westernblot beschriebenen Methode. Nach Beendigung der Elektrophorese (siehe 3.4.6) wurde das Gel im Transferpuffer wenige Minuten äquilibriert. Eine auf Gelgröße zugeschnittene und nach Eintauchen in Methanol benetzbare Transfer-Membran wurde auf das Gel gelegt. Damit dieses luftblasenfrei erfolgen konnte, wurde der Vorgang unter Transferpuffer durchgeführt. Danach wurden Gel und Membran zwischen mit Transferpuffer angefeuchtetes Filterpapier und Schaumstoff gelegt und in die Halterung der Transferkammer geklemmt. Der Transfer erfolgte über einem Zeitraum von 1 h bei einer Spannung von 100 V.

3.4.8 PVDF-Folien-Färbung

Lösungen und Reagenzien:

Färbelösung: 0,05 g Ponceau S (Serva); 0,5 ml Eisessig; Aqua dest. ad 500 ml

Diese reversible Anfärbung von Proteinen erlaubt die Lokalisation von Marker- und Antigenbanden und ermöglicht das genaue Schneiden der Membran zur Isolierung von Fraktionen. Nach dem Transfer wurde die Membran bis zum Sichtbarwerden der einzelnen Proteinbanden in der Färbelösung geschwenkt. Die ausgeschnittenen Membranstücke wurden zum Entfärben für ca. 10 min in Aqua dest verbracht.

3.4.9 Comassie-Färbung

Lösungen und Reagenzien:

Comassie-Blau-Färbelösung (0,05%): 0,5 g Comassie Blue R (Serva); 500 ml Methanol (Merck); 100 ml Essigsäure; Aqua dest. ad 1000 ml

Entfärberlösung: 450 ml Methanol (Merck); 100 Essigsäure; Aqua dest. ad 1000 ml

Für die Anfärbung der einzelnen Markerstreifen wurden die Membranstreifen bis zum Sichtbarwerden der Banden in der Comassie-Färbelösung geschwenkt (etwa 30 min). Die ausgeschnittenen Membranstreifen wurden zum Entfärben in der Entfärberlösung gewaschen.

3.4.10 Immunfärbung

Lösungen und Reagenzien:

TBS: 12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 9,0 g NaCl; Aqua dest. ad 1000 ml (pH 7,5)

T-TBS: 0,1% Tween 20 in TBS

Sera: Präimmun (Rd-0)- und Infektions-Rinderseren (Rd-Inf) aus mit *E. bovis*-infizierten Kälbern (45 Tag p. i.; 1 : 6000) sowie affinitätsgereinigte Antikörper (vgl. 3.4.4, 1 : 200)

Konjugat: anti-Rind IgG/AP aus dem Kaninchen (Sigma), 1:30.000

Nachweispuffer: 12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 5,84 g NaCl; 10,16 g MgCl₂; Aqua dest. ad 1000 ml (pH 9,5)

Substratlösung: 200 µl NBT/BCIP Stammlösung (Roche, Mannheim); Nachweispuffer ad 10 ml

Der Teil der Immobilon[®]P-Membran, der für die Immunreaktion bestimmt war, wurde zum Blockieren wenigstens 1 h in der T-TBS-Lösung inkubiert und anschließend mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4° C in dem zu testenden Serum geschwenkt. Die Folienstreifen wurden nach der Inkubation dreimal in T-TBS gewaschen und anschließend 1 h in der Konjugatlösung bewegt. Es folgten drei Waschschrte in T-TBS, einer in TBS und einer in Nachweispuffer, bevor die Immunkomplexe durch die Zugabe der Substratlösung angefärbt wurden. Danach wurden die Membranstreifen gewässert und zwischen Filterpapier getrocknet. Alle obengenannten Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

3.4.11 Bestimmung der relativen Molekulargewichte

Die relativen Molekulargewichte der in der SDS-PAGE aufgetrennten Moleküle wurden durch den Vergleich ihrer Migrationsfaktoren (MF) mit denen der Molekulargewichtsmarker bestimmt. Der MF errechnete sich aus folgendem Quotienten:

$$\frac{\text{Laufstrecke des Proteins (obere Trenngelkante bis Bande)}}{\text{Gesamtlaufstrecke der Probe (obere Trenngelkante bis Lauffront)}}$$

Mit den MF der Markerproteine ergab sich eine Eichkurve, in der durch den errechneten MF des fraglichen Moleküls dessen relatives Molekulargewicht abgeschätzt werden konnte.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung von *in vitro*-Systemen zur Entwicklung von *E. bovis*-Schizonten I

Zur Überprüfung auf Eignung als Wirtszellen für *E. bovis* kamen BFGC, BUVEC, BSLEC, MDBK und VERO-Zellen zum Einsatz. Sporozoiten invadierten alle Zelltypen, ohne daß bei Verwendung identischer Sporozoitensuspensionen wesentliche quantitative Unterschiede zu beobachten waren. 1 h nach Aufbringen der Sporozoiten waren die meisten Sporozoiten eingedrungen, doch konnten freie Sporozoiten noch nach 12 h beobachtet werden.

In VERO-Zellen kam es zu keiner Schizogonie. Vielmehr persistierten die eingedrungenen Sporozoiten ohne erkennbare Weiterentwicklung in sehr großen, 15 - 20 µm im Durchmesser erreichenden parasitophoren Vakuolen über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen.

In den übrigen Wirtszellen setzte eine erkennbare Weiterentwicklung der Parasiten in Form von Teilungen nach 4 Tagen (BFGC), 6 Tagen (BUVEC), 6 - 7 Tagen (BSLEC) und 8 - 10 Tagen (MDBK) ein. Bis zum 14. Tag p. i. glich sich die Schizontenbildung in den verschiedenen Zelltypen. Danach wuchsen die Schizonten in BFGC schneller als in den übrigen Zellen. Das Wachstum von Schizonten hielt bis 31 Tage (BFGC) und 20 Tage (BUVEC, BSLEC, MDBK) an. Die finale Größe der Schizonten unterschied sich zwischen den verschiedenen Wirtszelltypen. Die größten Schizonten (Durchmesser bis zu 250 x 85 µm) mit den meisten Merozoiten entwickelten sich in BFGC, die im Durchschnitt kleinsten Schizonten wurden in MDBK gefunden. Auch im gleichen Wirtszelltyp entwickelten sich die Schizonten nicht alle gleichmäßig. Bei starken Infektionen wurden teils in einer Zelle Schizonten verschiedener Reifgrade beobachtet (Abb.1). Dabei traten solche mit zahlreichen, deutlich erkennbaren Merozoiten neben unreif erscheinenden auf.

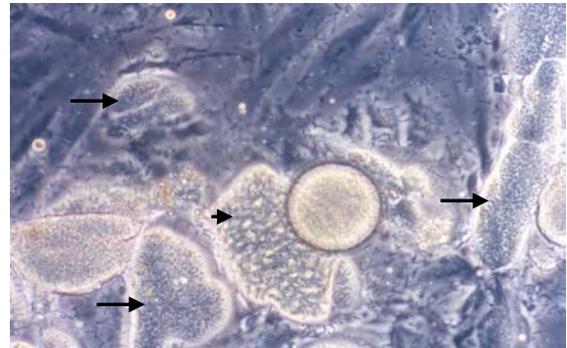
Von entscheidendem Einfluß für den Infektionserfolg war offensichtlich die Qualität der Sporozoiten. Gute Befallsraten von $\geq 80\%$ in BFGC setzten die Verwendung frisch isolierter Sporozoiten voraus. Bei kryokonservierten Infektionsstadien war gewöhnlich ein deutlich geringerer Anteil der Wirtszellen befallen.

Auf der Basis dieser Untersuchungen wurden für die weiteren Studien außer in Sonderfällen BFGC als Wirtszellen ausgewählt. Als geeignete Infektionsdosis für 25 cm²-Kulturflaschen

stellten sich etwa 750.000 Sporozoiten heraus. Damit waren Befallsraten von 80 - 90% zu erzielen.

Die Kultivierungsergebnisse bei den verschiedenen Wirtszelltypen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Abb. 1: Schizonten unterschiedlicher Reifegrade in BFGC 15 Tage p. i. (unreifer Schizont → ; reifer Schizont ➔)(Phasenkontrast, Vergr. 274 x).



Tab. 1: Entwicklung von *E. bovis* in verschiedenen Wirtszellen

Wirtszelle	BFGC	BUVEC	BSLEC	MDBK	VERO
Ursprung	Rind	Rind	Rind	Rind	Grüne Meerkatze
Ursprungsorgan	Gastrointestinuum (fetal)	Umbilikalvene	Milz (Lymphgefäße)	Nieren	Nieren
Zelltyp	unbekannt	Endothelzellen	Endothelzellen	Epithelzellen	Epithelzellen
Entwicklung zum Schizonten I	sehr gut	gut	schlecht	schlecht	Keine
Beginn der Parasitenteilung	4 Tage p. i.	6 Tage p. i.	6 - 7 Tage p. i.	8 - 10 Tage p. i.	-
Schizontenreifung	in etwa 11 - 14 Tage p. i.	14 Tage p. i.	14 Tage p. i.	20 Tage p. i.	-
Schizontengröße (maximal)	250 x 85 µm	92 x 80 µm	78 x 60 µm	73 x 61 µm	-
Freisetzung der Merozoiten I	ab 14 Tage p. i.	ab 20 Tage p.i.	ab 20 Tage p. i.	ab 25 Tage p. i.	-
Eignung zur mengenmäßigen Produktion von Merozoiten I	Sehr gut	gut	schlecht	schlecht	-

BFGC: Bovine Fetale Gastrointestinalzellen

BUVEC: Bovine Umbilikalvenen-Endothelzellen

BSLEC: Bovine Milzlymphendothelzellen

MDBK: Madin-Darby Bovine Kidney-Zellen

VERO: African green Monkey Kidney Cells

4.2 Rasterelektronische Darstellung *E. bovis*-infizierter Zellen

In rasterelektronenmikroskopischen Studien sollten die mit der Schizontenentwicklung verbundenen Vergrößerungen der Wirtszelle und eventuelle Veränderungen der Oberflächenstrukturen der Zellen erfasst werden. Um eine möglichst homogene Wirtzellpopulation zu haben, wurden BUVEC eingesetzt.

Die Invasion einer Wirtszelle durch einen Sporozoiten erfolgte über den apikalen Pol des Parasiten. Abbildung 2a zeigt den engen Kontakt zwischen Sporozoiten und Wirtszelle, der entsteht, ehe der Sporozoit eindringt. In der infizierten flachen Endothelzelle ist der Sporozoit an der Ausbuchtung der Wirtszellwand deutlich zu erkennen (Abb. 2b). Der Parasit stellt sich wesentlich prominenter dar als der Zellkern der Wirtszelle. Diese Phase hielt ohne deutliche Veränderungen an, bis um den 7. Tag p. i. mit der Proliferationsphase des Parasiten eine Umfangsvermehrung der infizierten Zelle einsetzte, die nach 15 Tagen in einer Größe von 92 x 80 µm resultierte.

Das Erscheinungsbild der infizierten Zellen im Rasterelektronenmikroskop war zu diesem Zeitpunkt nicht einheitlich. In vielen Fällen stellten sie sich mit relativ glatt erscheinender Oberfläche dar, eng im Verband mit den nicht infizierten Zellen liegend (Abb. 2c). Die Oberfläche konnte blasenartige Auftreibungen und Einziehungen aufweisen, wie es die Abbildung demonstriert. In anderen Fällen waren die infizierten Zellen eher kugelförmig und erhoben sich deutlich über den umliegenden Monolayer. Auch bei diesen Zellen zeigten sich knötchen- oder blasenartig erscheinende Ausbuchtungen, die verhältnismäßig groß und zahlreich sein konnten (Abb. 2d). Auffallend war bei mehreren solcher Zellen das Auftreten oberflächlicher villus- oder manchmal haarförmiger Strukturen mit geschätzten Längen von bis 2 - 3 µm (Abb. 2e). Wie in zufällig eröffneten Schizonten zu erkennen (Abb. 2f), waren die Schizonten-haltigen Zellen prall mit streng gerichtet liegenden Merozoiten gefüllt.

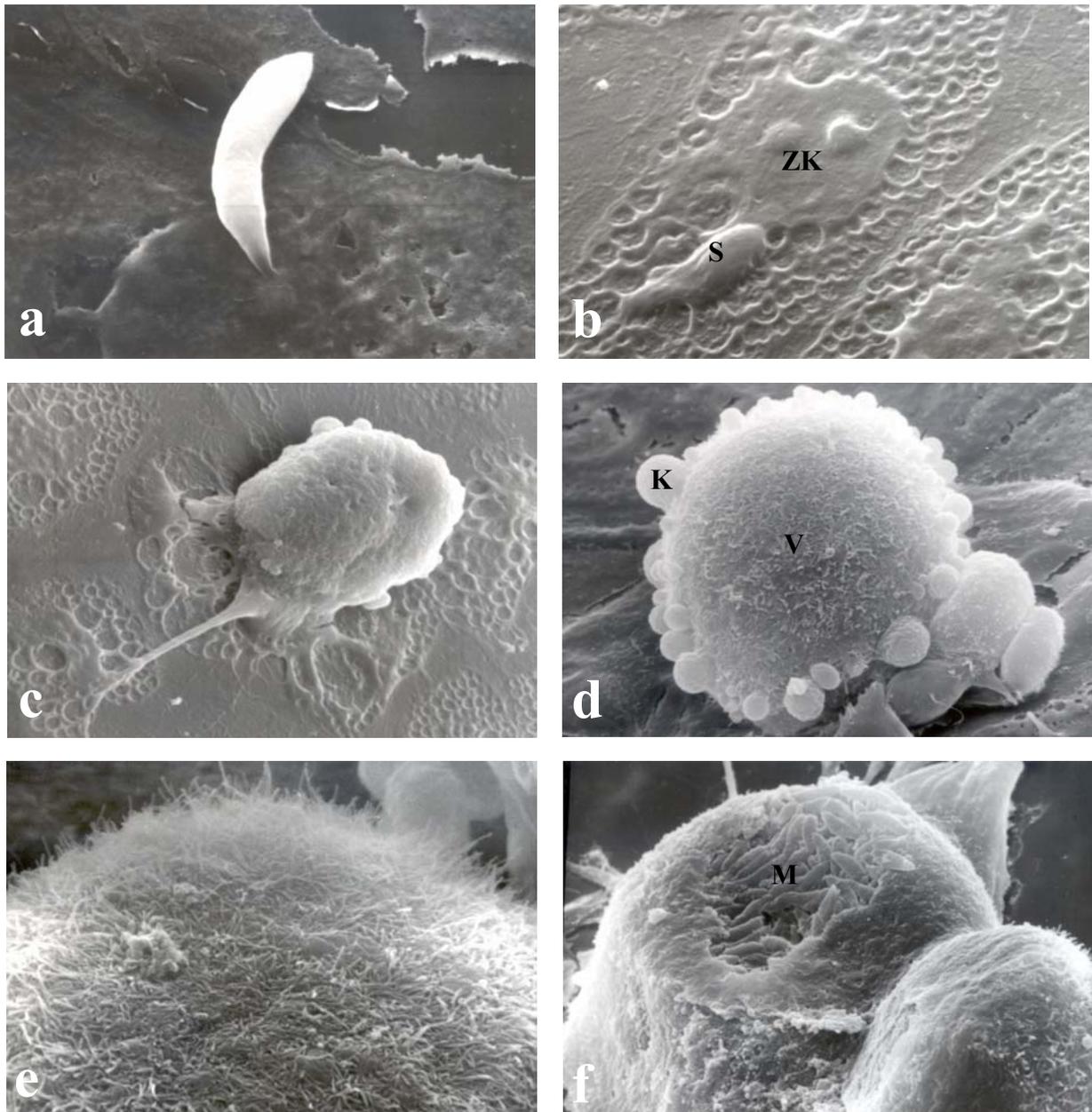


Abb. 2: Rasterelektronische Darstellung *E. bovis*-infizierter BUVEC:

a: Sporozoit (S) bei der Zellinvasion (10 min p. i., Vergr. 891 x); b: Intrazellulärer Sporozoit (1 Tag p. i., S: Sporozoit; ZK: Zellkern; Vergr. 891 x); c: Makroschizont-haltige Zelle mit glatter Oberfläche (15 Tage p. i., Vergr. 891 x); d: Makroschizont-haltige Zelle mit „knötchenförmiger“ Oberfläche (K) und Villi (V) (15 Tage p. i., Vergr. 908 x); e: Ausschnitt aus „d“: villöse Oberfläche (Vergr. 1815 x); f: Eröffneter Makroschizont mit Merozoiten I (M) (15 Tage p. i., Vergr. 462 x).

4.3 Nachweis immunreaktiver Komponenten auf der Oberfläche *E. bovis*-infizierter Zellen mit Seren infizierter Rinder

4.3.1 Methodische Untersuchungen

Orientierende Versuche bedienten sich eines Poolserums, das von wiederholt infizierten Kälbern 45 Tage nach der Erstinfektion mit 70.000 sporulierten *E. bovis*-Oozysten und 15 Tage nach der Reinfektion gewonnen worden war. Als Zielzellen wurden infizierte BFGC 15 Tage p. i. verwendet. Nach Titrationsversuchen stellte sich die Verdünnung 1 : 100 in BSA/PBS als optimal für die IIFT-Versuche heraus.

4.3.2 Darstellung immunreaktiver Oberflächenstrukturen auf verschiedenen infizierten Zelltypen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Parasiten mittels des Poolserums postpatenter Rinder

4.3.2.1 Im IIFT nachweisbare Oberflächenantigene

Versuche, immunreaktive Komponenten auf der Oberfläche PAGA-fixierter, infizierter Zellen 3 und 5 Tage p. i. nachzuweisen, verliefen erfolglos. Erste Reaktionen zeigten sich 7 Tage p. i. (Abb. 3a). Die Fluoreszenz war zu diesem Zeitpunkt gewöhnlich schwach, gelegentlich unregelmäßig fleckig, erfaßte in anderen Fällen jedoch die Zelloberfläche auch diffus und komplett. Die Frage, ob ab 7 Tage p. i. alle infizierten Zellen reagierten, ließ sich nicht eindeutig klären, weil die Identifizierung infizierter Zellen schwierig war und auch unter Berücksichtigung mehrerer Merkmale, wie Parasitennachweis und Zellgröße nicht immer gelang. Die Intensität der Fluoreszenz als Ausdruck der Antigenmenge auf den Zellen nahm danach, wie auch gewöhnlich die Zellgröße, kontinuierlich bis zum 15. Tag p. i. zu (Abb. 3b; zu beobachten ist die gegenüber Abb. 3a unterschiedliche Vergrößerung). Spätere Zeitpunkte waren nicht zu bewerten, weil nach den 15. Tag p. i. die Schizonten gewöhnlich unter Freisetzung der Merozoiten aufbrachen.

Die Intensität der Fluoreszenz war nicht bei allen Zellen gleich (vgl. Abb. 3a, b, c), so daß vermutet wurde, daß sie vom Reifegrad der Schizonten abhängig war. Dies konnte nicht sicher geklärt werden. Abb. 3c stellt eine zwar vergleichsweise schwach reagierende Zelle dar, doch enthielt diese Zelle offensichtlich mehrere Schizonten, die sich über die

Fluoreszenzintensitäten, die die höckerige Oberfläche solcher multipel infizierten Zellen nachzeichnen, markieren.

Abb. 3a: Reaktion eines von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BFGC 7 Tage p. i. (Vergr. 1475 x).

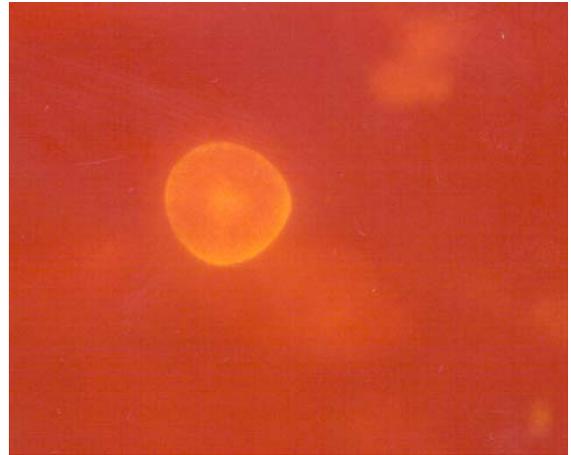
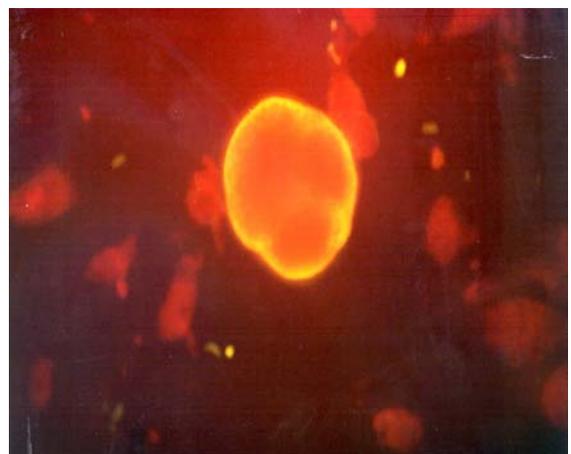


Abb. 3b: Reaktion eines von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der gesamten Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BFGC 15 Tage p. i. (Vergr. 288 x).



Abb. 3c: Reaktion eines von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der Oberfläche multipel infizierter, *E. bovis*-Schizonten tragender BFGC 15 Tage p. i. (Vergr. 288 x).



Die in BUVEC entstehenden Schizonten entwickelten sich langsamer und blieben gewöhnlich kleiner als die in BFGC, konnten aber besser angesprochen werden, weil BUVEC streng als Monolayer wachsen. Im zeitlichen Auftreten immunreaktiver Oberflächenstrukturen ergab sich gegenüber BFGC kein prinzipieller Unterschied (vgl. Abb. 4a, b), doch waren die Hintergrundfluoreszenzen deutlich geringer, so daß die Beurteilung in der frühen Phase p. i. einfacher war. Allerdings waren die Fluoreszenzintensitäten durchweg schwächer als bei infizierten BFGC, so daß auf geringe Mengen oberflächlicher Antigene geschlossen wurde. Bei infizierten BSLEC ließen sich ähnliche Verhältnisse wie bei BUVEC beobachten (Abb. 5a, b).

Im Fall von MDBK-Zellen war die Beurteilung dadurch erschwert, daß es zum mehrschichtigen Wachstum der Wirtszellen kam. Hinzu kamen die relativ geringen Befallsraten dieser Zellen mit *E. bovis*-Schizonten und deren meist relativ geringe Größe. Gleichwohl traten 8 Tage p. i. deutliche Reaktionen auf, die sich unabhängig von den Problemen bei der Beurteilung mit zunehmenden Zeiträumen nach der Infektion allerdings nur wenig verstärkten (Abb. 6a, b).

Da in VERO-Zellen, wie vorn dargestellt, Sporozoiten zwar eindringen und in der Zelle über Wochen persistieren, eine Entwicklung zum 1. Schizonten jedoch nicht stattfindet, war die Reaktion dieser Zellen von besonderer Bedeutung. Zu keinem Zeitpunkt nach der Sporozoiteninvasion konnte bei diesen Zellen eine Bindung des verwendeten Serums nachgewiesen werden.

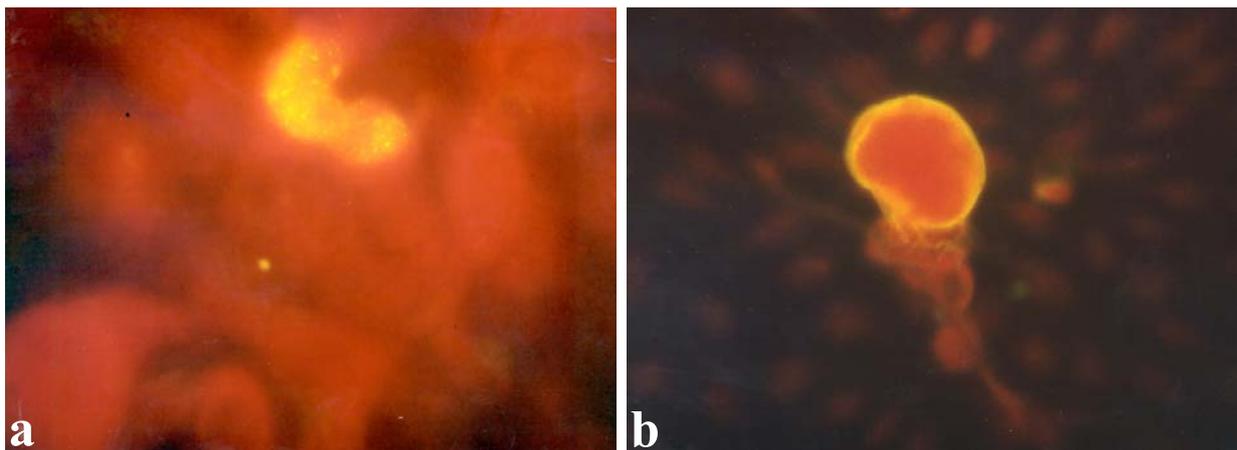


Abb. 4: Reaktion eines von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BUVEC; a: 8 Tage p. i. (Vergr. 1475 x); b: 15 Tage p. i. (Vergr. 304 x).

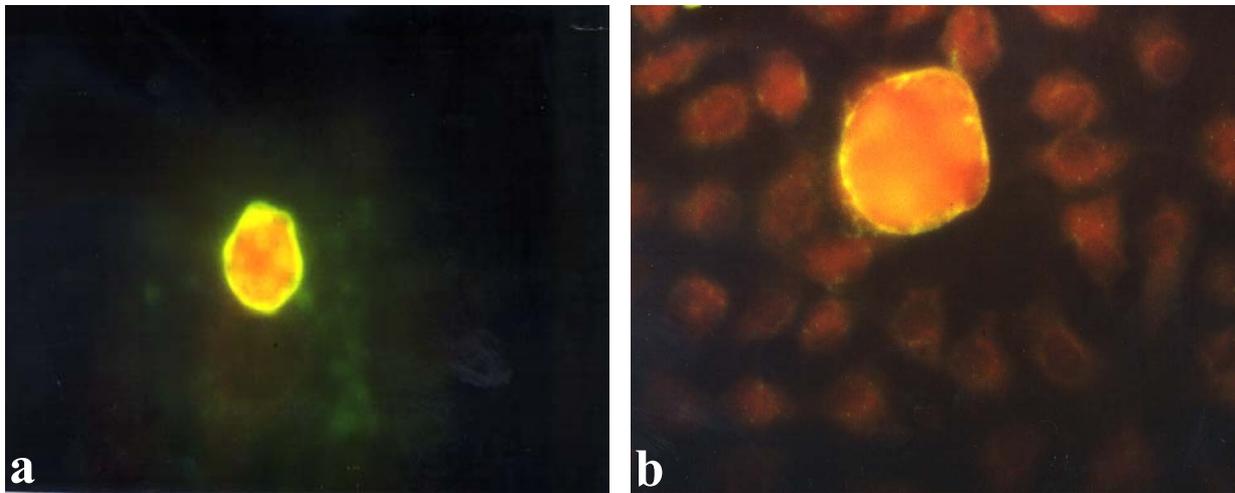


Abb. 5: Reaktion eines von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BSLEC; a: 8 Tage p. i. (Vergr. 1400 x); b: 15 Tage p. i. (Vergr. 518 x).

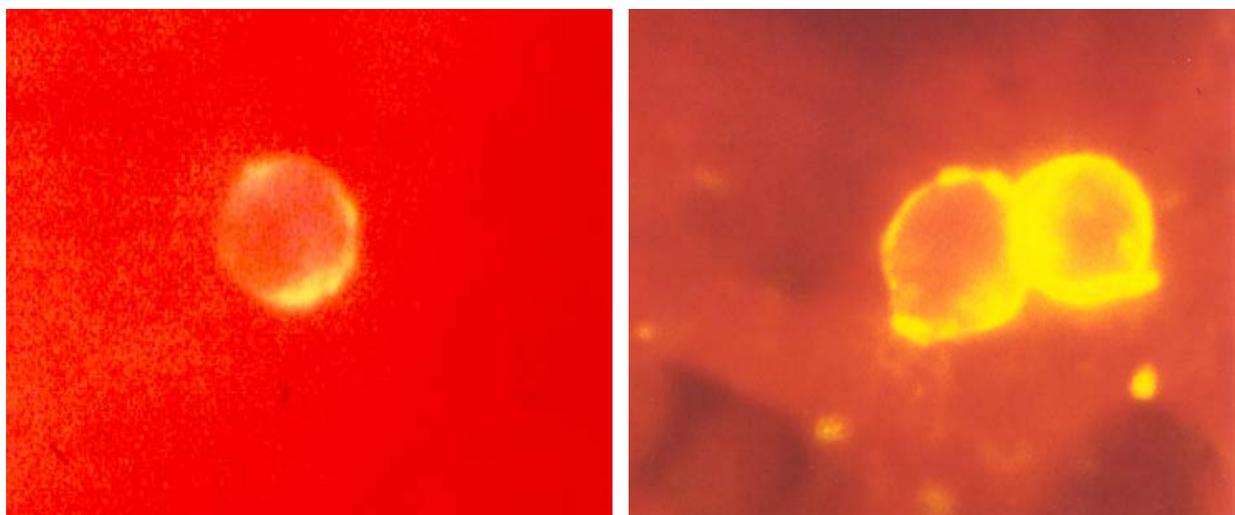


Abb. 6: Reaktion eines von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender MDBK-Zellen; a: 8 Tage p. i. (Vergr. 1975 x); b: 15 Tage p. i. (Vergr. 518 x).

4.3.2.2 Immunelektronenmikroskopisch nachweisbare Oberflächenantigene auf Schizonten I enthaltenden BFGC

Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation der immunreaktiven Komponenten wurden im Präembedding-Verfahren durchgeführt. Als Antigen fanden Schizonten tragende Zellen 15 Tage p. i., als Antikörper das Poolserum reinfizierter Kälber Verwendung. Die Studien bestätigten eindeutig die Antikörperbindung und damit die Lokalisation der Antigene auf der Wirtszelloberfläche (Abb. 7). Die die Antikörperbindung markierenden Goldpartikel fanden sich vereinzelt oder in Gruppen auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Seren von nicht infizierten Kälbern reagierten nicht; das Goldkonjugat band nicht an Zelloberflächen (diese Kontrollen ohne Abbildung).

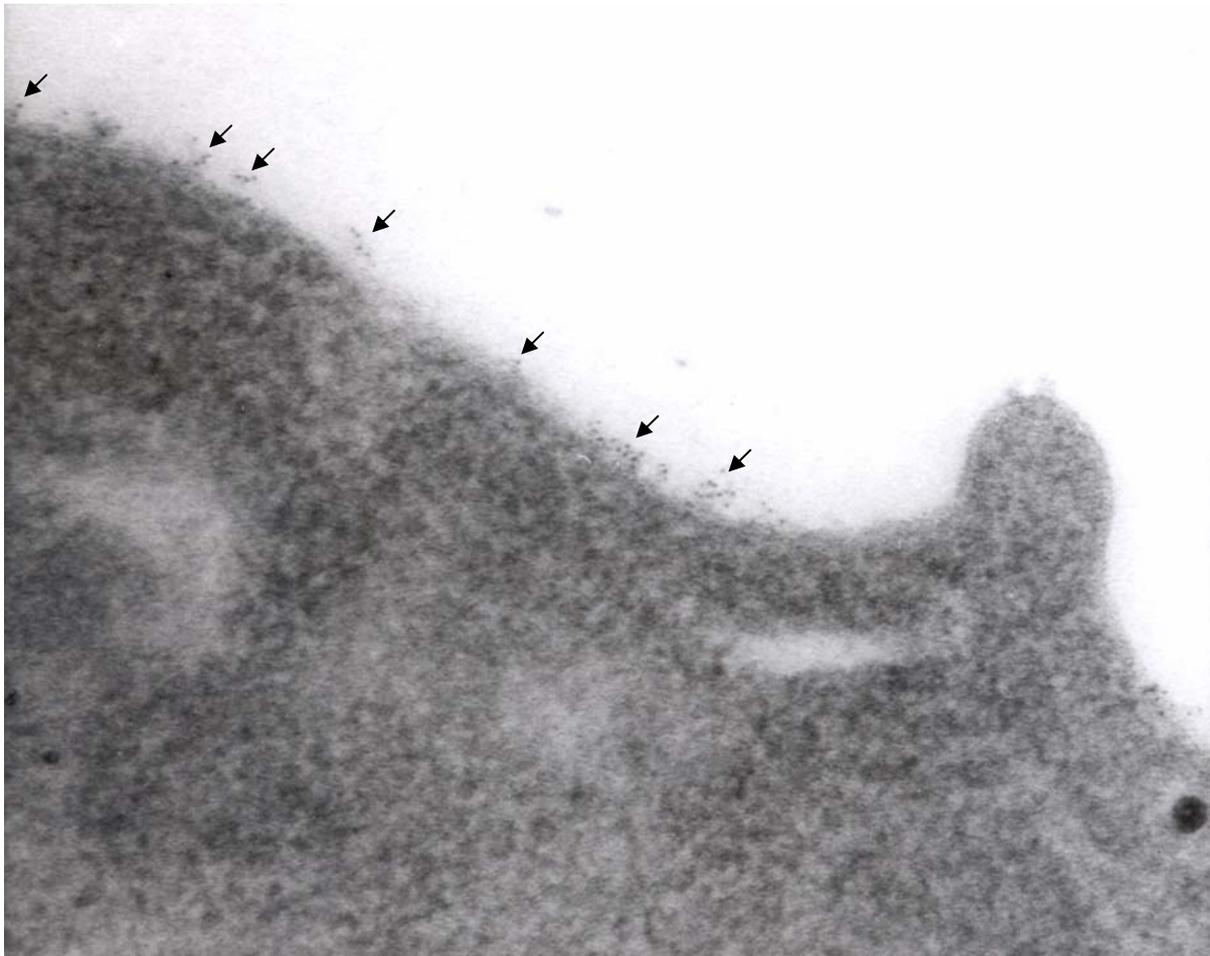


Abb. 7: Bindung des von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums an der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BFGC 15 Tage p. i. (Immunelektronenmikroskopie; Präembedding-Verfahren, Vergr. 84.000 x).

4.3.3 Nachweis von Oberflächenantigenen auf *E. bovis*-Schizonten I enthaltenden BFGC in Abhängigkeit von Status der Serumspender

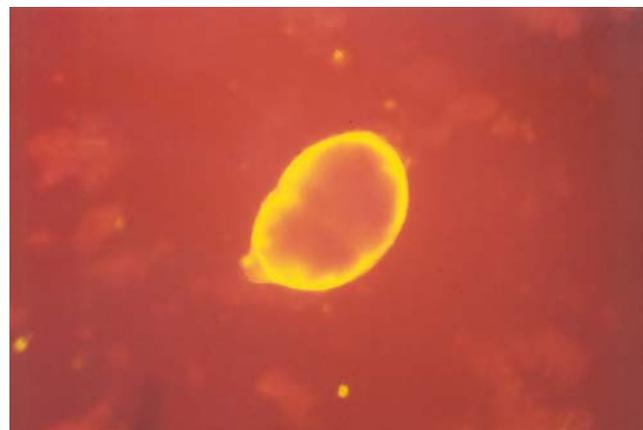
Als Antigen dienten PAGA-fixierte, infizierte BFGC 15 Tage p. i. Zur Untersuchung kamen Poolseren vom nicht infizierten Kälbern (Präseren) sowie Kälberseren, die 7, 18, 29, und 45 Tage nach einer Infektion mit 70.000 sporulierten Oozysten isoliert worden waren.

Präseren, d. h. Seren nicht infizierter Kälber reagierten mit infizierten Zellen nicht (Abb. 8a). Das gleiche Ergebnis war bei den 7 und 18 Tage nach der Infektion isolierten Seren zu verzeichnen (Abb. 8a). Deutliche und in der Intensität nicht zu unterscheidende Reaktionen mit der Oberfläche Schizonten tragender BFGC traten dagegen im Fall der 29 und 45 Tage p. i. isolierten Seren auf (Abb. 8b).

Abb. 8a: Seren nicht infizierter Kälber (Präseren) reagieren nicht mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BFGC 15 Tage p. i. (Vergr. 366x).



Abb. 8b: Reaktion eines 29 Tage p. i. von *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Poolserums mit der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten tragender BFGC 15 Tage p. i. (Vergr. 366 x).



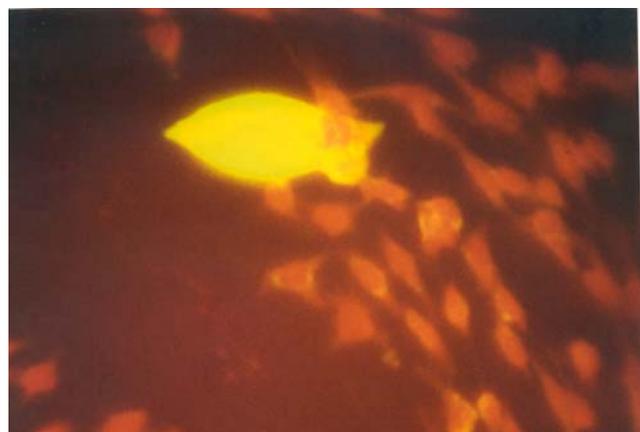
4.3.4 Reaktion Schizonten I enthaltender Zellen mit Hyperimmunsereen aus Ratten gegen *E. bovis*-Merozoiten I

Um eventuelle wirtsspezifische Einflüsse in der Bindung der Seren an infizierte Zellen auszuschließen, wurden infizierte BFGC und BUVEC 15 Tage p. i. Hyperimmunsereen aus Ratten ausgesetzt, die mehrfach mit homogenisierten Merozoiten I immunisiert worden waren. Die Reaktionsbilder im IIFT sind in Abbildungen 9 und 10 dokumentiert. Infizierte Zellen zeigten bei beiden Zelltypen eine starke, homogen die Zelloberfläche abdeckende Fluoreszenz, die sich eindeutig von Hintergrundreaktionen abgrenzen ließen. Die Reaktionen, die an infizierten Zellen zu beobachten waren, entsprechen in Qualität und Intensität denen, die mit Rekonvaleszenzseren von Rindern zu beobachten waren.

Abb. 9: Bindung eines Hyperimmunsereums aus Ratten gegen *E. bovis*-Merozoiten I an der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten I enthaltender BFGC 15 Tage p. i. (Vergr. 316 x).



Abb. 10: Bindung eines Hyperimmunsereums aus Ratten gegen *E. bovis*-Merozoiten I an der Oberfläche *E. bovis*-Schizonten I enthaltender BUVEC 15 Tage p. i. (Vergr. 316 x).



4.4 Beeinflußbarkeit der Oberflächenantigenität *E. bovis*-Schizonten I tragender Zellen durch Behandlung mit Salzen, Detergentien und Enzymen

Für eine erste Charakterisierung der Oberflächenantigene auf Schizonten tragenden Wirtszellen wurden infizierte BFGC 15 Tage p. i. mit Salzen, Detergentien oder Enzymen behandelt (vgl. Tab. 2, 3) und nach PAGA-Fixierung im IIFT auf Bindung von Antikörpern in nach wiederholter *E. bovis*-Infektion isolierten Rinderseren (Poolserum) untersucht. BFGC wurden verwendet, weil bei dieser Zelllinie infizierte, Schizonten tragende Zellen 15 Tage p. i. bereits durch ihre Größe ausreichend deutlich von nicht infizierten Zellen zu unterscheiden waren. Anfängliche Versuche an intakten, infizierten Zellrasen hatten eine Reihe von Problemen aufgezeigt, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigten. So lösten sich die Zellen häufig in größeren Flächen ab oder die Substanzen konnten wegen mehrschichtiger Zelllagen nicht einheitlich einwirken. In der Folge wurden daher die Zellen in Suspension behandelt und im IIFT untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 zusammengefaßt.

Weder NaCl noch CHAPS hatten in den eingesetzten Konzentrationen und Einwirkzeiten einen erkennbaren Einfluß auf die Oberflächenantigenität infizierter BFGC (Abb. 11a, b). Im Fall von CHAPS führte eine Erhöhung der Konzentration auf 5 mM oder 10 mM zur weitgehenden Lysis der Zellen.

Bei den Detergentien Triton X-100, Triton X-114 und Triton X-405 waren Effekte abhängig von den Konzentrationen und der Einwirkdauer:

Triton X-100 bewirkte ab einer Konzentration von 5 µl/ml und einer Inkubationsdauer von 15 min eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität; längere Expositionen führten zur Zellyse. Der Effekt war allerdings nicht völlig homogen, vielmehr schien die Zelloberfläche nach der Behandlung gewöhnlich eher von körneligen, griesartigen Strukturen bedeckt (Abb. 11c). Zur vollständigen Entfernung der immunreaktiven Komponenten auf der Zelloberfläche kam es nicht.

Triton X-114-Behandlungen führten gleichfalls konzentrations- und zeitabhängig zur Abschwächung der Oberflächenantigenität. Gewöhnlich fehlten griesartige Auflagerungen, wie sie nach Behandlung mit Triton X-100 zu beobachten waren (Abb. 11d).

Bei Triton X-405 waren höhere Konzentrationen und längere Einwirkzeiten für klare Effekte nötig (vgl. Tab.2). Die Gefahr der Zelllysis bestand unter den gewählten Bedingungen hier nicht. Die Fluoreszenz im IIFT stellte sich nach Triton X-405-Behandlung bei genereller Abschwächung der Intensität eher wabig dar (Abb. 11e).

Phospholipase C hatte keinen meßbaren Einfluß auf die Antigenität der Zelloberfläche infizierter BFGC. Auch nach einer Inkubationsdauer von 24 h unterschieden sich die Zellen im IIFT nicht von unbehandelten Kontrollen (Tab. 2; ohne Abbildung).

Die deutlichsten Effekte waren mit Proteinase K zu erreichen, indem mit dem Enzym komplett die Oberflächenantigene beseitigt werden konnten (Abb. 11f). Die Wirkung war allerdings nicht bei allen Zellen gleich; vielmehr traten neben komplett IIFT-negativen, infizierten BFGC stets noch solche auf, deren Reaktivität im IIFT unbeeinflusst blieb (vgl. Tab. 3). Die Effizienz der enzymatischen Behandlung war dabei eher von der Behandlungsdauer als von der Enzymkonzentration abhängig (Tab. 3). Allerdings führte eine Konzentration von 0,4 mg/ml offensichtlich bereits innerhalb von 30 min zur Lysis zahlreicher Zellen, so daß nur noch eine geringe Anzahl zur Bewertung zur Verfügung stand. Auch die bei geringeren Konzentrationen mit der Inkubationszeit zurückgehende Anzahl in die Bewertung einbeziehbarer Zellen ist in diesem Sinne zu beurteilen (vgl. n-Zahl in Tab. 3).

Tab. 2: Beeinflußbarkeit der Oberflächenantigenität *E. bovis*-Schizonten I tragender BFGC durch Behandlung mit verschiedenen Agentien (Untersuchung im IIFT)

Agens	Konzentration	Dauer der Exposition	Auswirkungen
NaCl	≤ 1 M	1 h	keine
CHAPS	1 mM ^a	2 h	keine
Triton X-100	1 µl/ml	30 - 60 min	keine
	5 µl/ml	15 - 30 min ^b	Fluoreszenzintensität generell abgeschwächt
	10 µl/ml	15 - 30 min ^b	Fluoreszenzintensität generell abgeschwächt
Triton X-114	1 µl/ml	30 min	keine
	1 µl/ml	1 h	Fluoreszenzintensität generell abgeschwächt
	5 µl/ml ^a	30 - 60 min ^b	Fluoreszenzintensität generell abgeschwächt
Triton X-405	1 µl/ml	≤ 2 h	keine
	5 µl/ml	30 - 60 min	keine
	5 µl/ml	2 h	Fluoreszenzintensität generell abgeschwächt
	10 µl/ml	30 - 120 min	Fluoreszenzintensität generell abgeschwächt
Phospholipase C	1 mg/ml	1 - 2 h	Keine
Proteinase K	Siehe Tabelle 3		

^a: Höhere Konzentrationen führten zur Zelllysis

^b: Längere Inkubationszeiten führten zur Zelllysis

Tab. 3: Beeinflußbarkeit der Oberflächenantigenität *E. bovis*-Schizonten I tragender BFGC mit Proteinase K (Untersuchung im IIFT)

Konzentration Proteinase K	Inkubationsdauer (min)	n	% Zellen IIFT-positiv
0,1 mg/ml	30	1483	56,6
	60	600	16,2
	120	139	15,0
0,2 mg/ml	30	945	64,0
	60	295	20,0
	120	386	12,1
0,4 mg/ml	30	34	36,0
	60	- ^a	
	120	- ^a	

n: Anzahl infizierter Zellen bewertet

^a: Komplette Lysis der Zellen

Abb. 11: Effekt der Behandlung mit Salzen, Detergentien und Enzymen (Untersuchung im IIFT) auf die Oberflächenantigenität *E. bovis*-Schizonten I (15 Tage p. i.) tragender BFGC:

a: Infizierte Zelle nach einstündiger Behandlung mit 1 M NaCl: Die Oberflächenantigenität ist unbeeinflußt erhalten (Vergr. 326 x)

b: Infizierte Zelle nach zweistündiger Behandlung mit 1 mM CHAPS: Die Oberflächenantigenität ist unbeeinflußt erhalten (Vergr. 850 x)

c: Infizierte Zelle nach 30minütiger Behandlung mit Triton X-100 (10 µl/ml): Die Fluoreszenz ist abgeschwächt und inhomogen körnelig (Vergr. 850 x)

d: Infizierte Zelle nach einstündiger Behandlung mit Triton X-114 (1 µl/ml): Die Fluoreszenz ist abgeschwächt und unregelmäßig fleckig (Vergr. 850 x)

e: Infizierte Zelle nach zweistündiger Behandlung mit Triton X-405 (10 µl/ml): Die Fluoreszenz ist abgeschwächt und unregelmäßig wabig auf der Oberfläche verteilt (Vergr. 326 x)

f: Infizierte Zelle nach zweistündiger Behandlung mit Proteinase K (0,1 mg/ml): Antigene Strukturen sind komplett beseitigt (Vergr. 326 x)

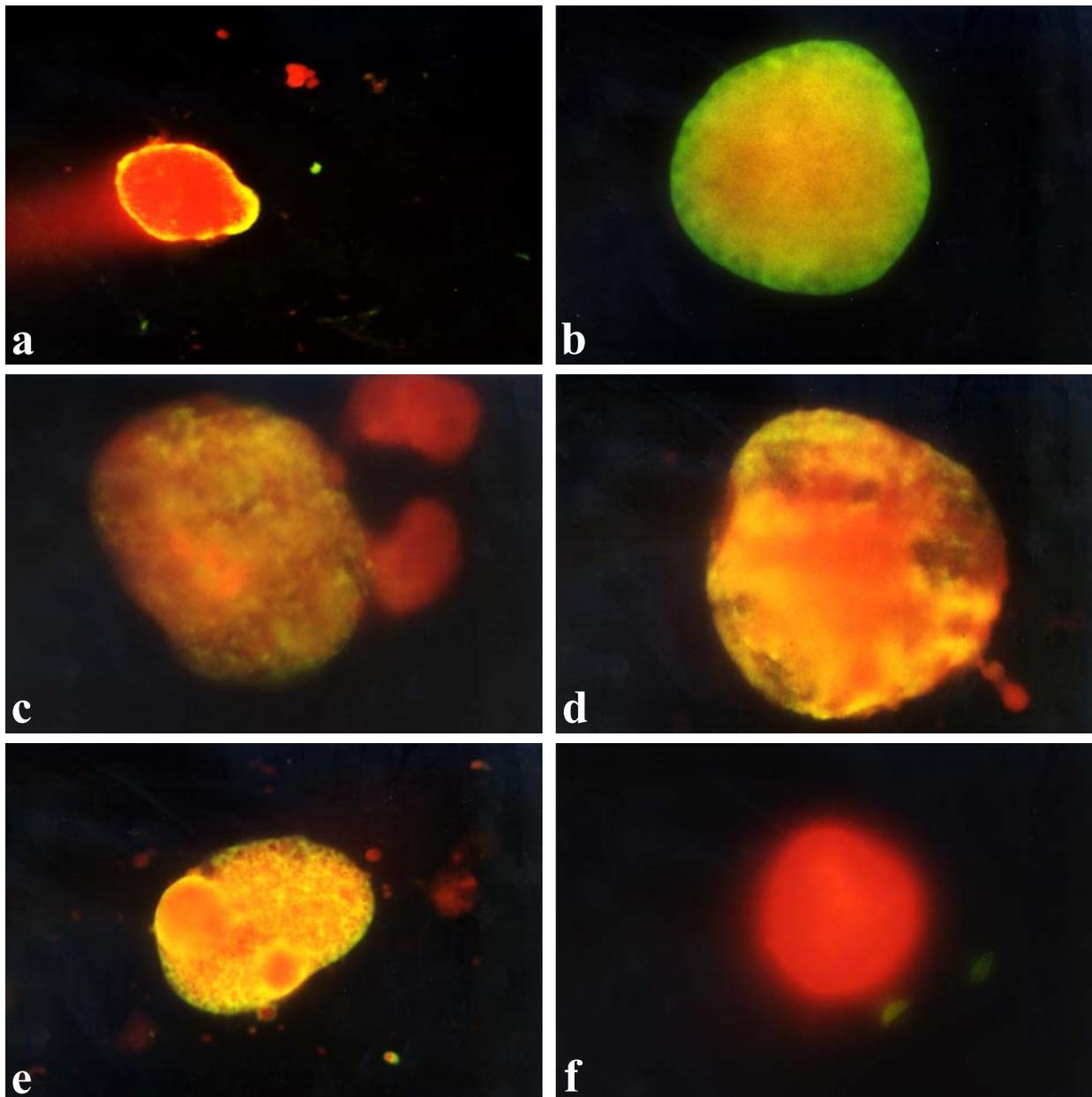


Abb. 11 (a-f)

4.5 Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Rindern an *E. bovis*-Schizonten I tragenden BFGC und Reaktivität der gereinigten Antikörper

4.5.1 Affinitätsreinigung

Um die Oberflächenantigenität mit Schizonten I infizierter Zellen weiter zu charakterisieren wurden an die Oberfläche infizierter, fixierter Zellen bindende Antikörper aus nach einer wiederholten *E. bovis*-Infektion gewonnenen Kälberseren an infizierten Zellen affinitätsmäßig

aufgereinigt. Nach einstündiger Inkubation infizierter BFGC im Serum und mehrmaligen Waschen wurden gebundene Antikörper durch pH-Erniedrigung (pH 2,3) abgespalten, neutralisiert und mit BSA stabilisiert.

Ausgedehnte Vorversuche hatten gezeigt, daß es dazu notwendig war, die Zellen von der Unterlage abzulösen und in Suspension zu behandeln. Der Versuch, die Reinigung an infizierten Zellen in der Kulturflasche durchzuführen (ursprünglich vorgesehen, um Zellen zu sparen), resultierte in einem erhöhten Verbrauch von Serum und nicht reproduzierbaren Ergebnisse. Ein wesentlicher Grund war offensichtlich in der Mehrlagigkeit der Zellen zu sehen, die einen einheitlichen Zell-Serum-Kontakt und effiziente Waschungen behinderte.

4.5.2 Reaktivität affinitätsgereinigter Antikörper im IIFT

Die Reaktivität gereinigter Antikörper im IIFT wurde gegen PAGA-fixierte, 15 Tage alte Schizonten enthaltende BFGC, Merozoiten I und Sporozoiten sowie gegen Methanol-fixierte Merozoiten und Sporozoiten als Antigene geprüft.

Infizierte Zellen zeigten eine die Zelloberfläche homogen bedeckende, intensive Fluoreszenz, die sich nicht von der unterschied, die mit dem kompletten Serum zu erzielen war (Abb. 12). PAGA-fixierte Merozoiten I reagierten mit einer intensiven homogene Oberflächenfluoreszenz (Abb. 13).

Gleich fixierte Sporozoiten zeigten eine homogene Oberflächenfluoreszenz nach Inkubation mit dem unbehandelten Poolserum der Rinder (Abb. 14a), die affinitätsgereinigten Antikörper banden dagegen nicht (Abb. 14b).

Die Reaktion der Methanol-fixierten Merozoiten I mit dem unbehandelten Poolserum der Rinder zeigte sich in Form einer Fluoreszenz der Parasitenoberfläche und des Zellinneren. Dabei trat eine verstärkte Reaktion im Bereich vor dem Zellkern auf (Abb. 15a). Mit den affinitätsgereinigten Antikörpern reagierten im vorderen Drittel der Parasiten lokalisierte Antigene, eine Position, die vermuten ließ, daß die Antikörper im wesentlichen Mikronemen erfaßten. Eine Reaktion mit der Parasitenoberfläche war zwar nachweisbar, doch war sie gegenüber der, die mit dem kompletten Serum zu erzielen war, deutlich schwächer (Abb. 15b).

Wurden Methanol-fixierte Sporozoiten dem Poolserum aus reinfizierten Kälbern ausgesetzt, so zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz im Zellinnern, von der lediglich die Refraktilen Körper

(Abb. 16a; Pfeile) angespart waren. Im Gegensatz dazu reagierten die affinitätsgereinigten Antikörper nicht mit den Sporozoiten (Abb. 16b).

Abb. 12: Reaktion an *E. bovis*-Schizonten I enthaltenden BFGC affinitätsgereinigter Antikörper mit Oberfläche PAGA-fixierter, *E. bovis*-infizierter BFGC 15 Tage p. i. (IIFT; Vergr. 850 x): Die gereinigten Antikörper binden an die Oberfläche der Zelle wie Seren *E. bovis*-reinfizierter Rinder.

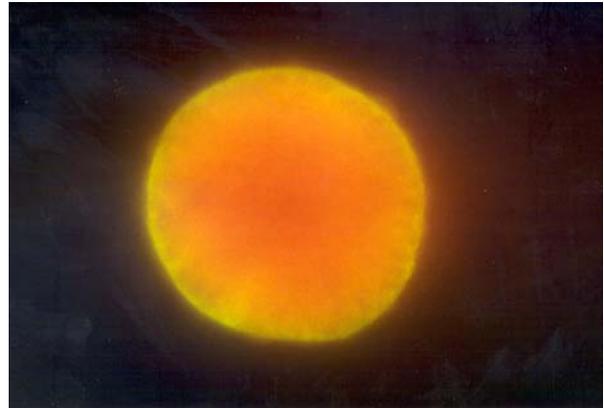


Abb. 13: Reaktion an *E. bovis*-Schizonten I enthaltenden BFGC affinitätsgereinigter Antikörper mit Oberfläche PAGA-fixierter Merozoiten I (IIFT; Vergr. 1450 x): Die gereinigten Antikörper binden wie Seren *E. bovis*-reinfizierter Rinder an die Merozoitenoberfläche.

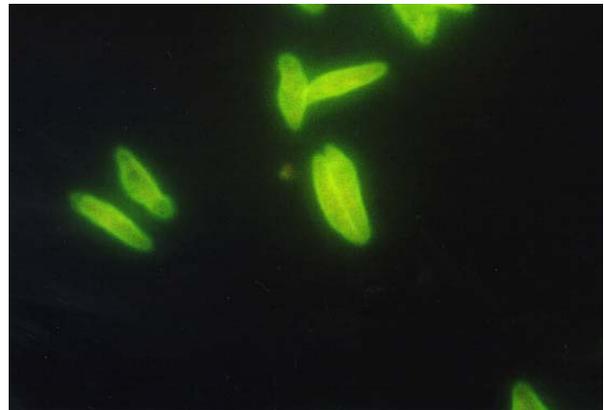


Abb. 14: Reaktionen PAGA-fixierter Sporozoiten von *E. bovis* mit a: von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Seren (Poolserum) sowie b: an *E. bovis*-Schizonten I enthaltenden BFGC affinitätsgereinigten Antikörpern (IIFT; Vergr. 1450 x): Im Gegensatz zum unbehandelten Infektionsserum erkennen die affinitätsgereinigten Antikörper die Sporozoitenoberfläche nicht.

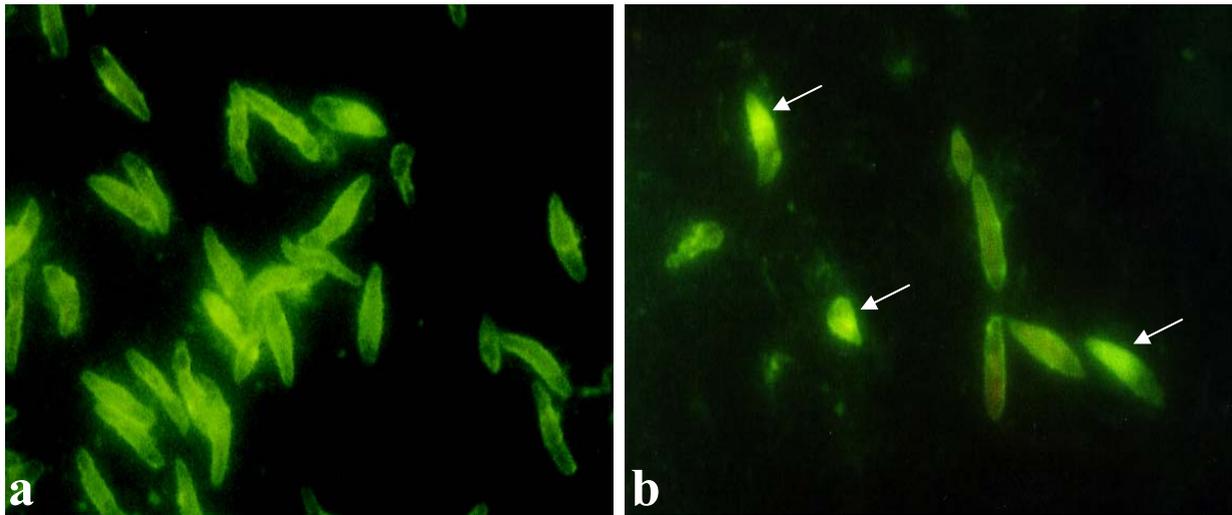


Abb. 15: Reaktion Methanol-fixierter *E. bovis*-Merozoiten I mit a: von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Seren (Poolserum) sowie b: an *E. bovis*-Schizonten I enthaltenden BFGC affinitätsgereinigten Antikörpern (IIFT; Vergr. 1450 x): Sowohl die kompletten Infektionsseren als auch die affinitätsgereinigten Antikörper erkennen Antigene auf der Zelloberfläche und im Zellinneren, die gereinigten Antikörper insbesondere Strukturen im vorderen Bereich der Parasiten.

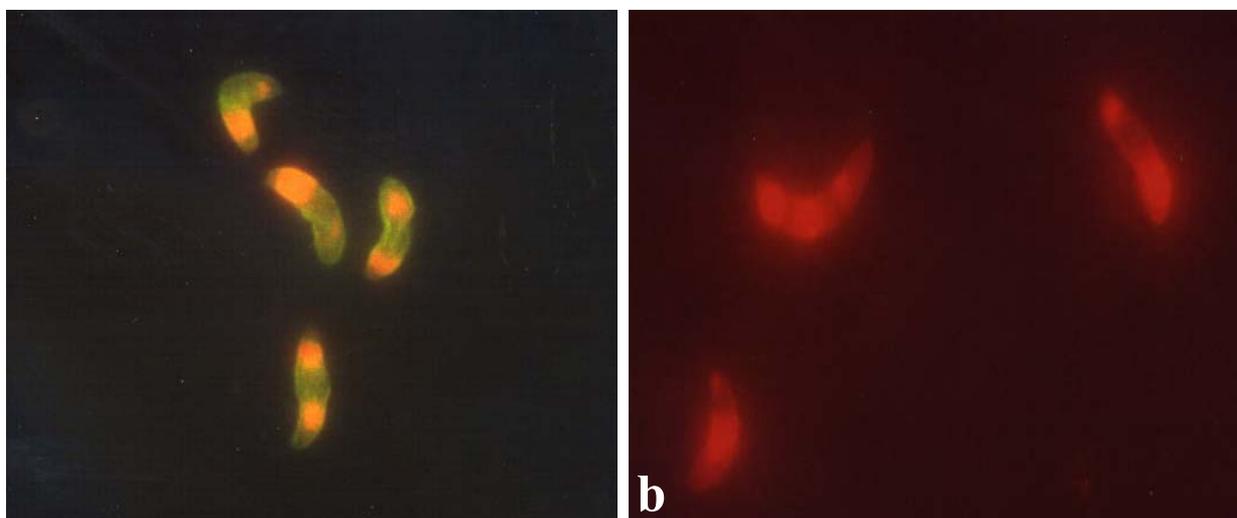


Abb. 16: Reaktion Methanol-fixierter *E. bovis*-Sporozoiten mit a: von wiederholt *E. bovis*-infizierten Kälbern gewonnenen Seren (Poolserum) sowie b: an *E. bovis*-Schizonten I enthaltenden BFGC affinitätsgereinigten Antikörpern (IIFT; Vergr. 1450 x): Während die kompletten Infektionsseren mit intrazellulären Strukturen außer Refraktilen Körpern (Pfeile) reagieren, binden die affinitätsgereinigten Antikörper nicht.

4.5.3 Reaktivität affinitätsgereinigter Antikörper mit *E. bovis*-Merozoiten I in der Immunelektronenmikroskopie

Nachdem die affinitätsgereinigten Antikörper aus rekonvaleszenten Rindern nach lichtmikroskopischen Kriterien um vorderen Drittel der Merozoiten I banden, wurde versucht, die Bindungsstellen immunelektronenmikroskopisch genauer zu lokalisieren. Verwendung fand hier das Postembedding-Verfahren.

Antikörperbindung ließ sich anhand der Goldpartikel des Konjugats deutlich in Mikronemen der Parasiten nachweisen (Abb. 17a), wobei allerdings nicht alle Mikronemen markiert wurden. Goldmarkierung fand sich darüber hinaus in etwa gleicher Dichte in den „Dichten Granula“, insbesondere in Kernnähe (Abb. 17b). Der Kern, die Rhoptrien sowie die Amylopektin granula wurden von den affinitätsgereinigten Antikörpern nicht erfaßt. Abbildung 17c zeigt zur Orientierung beide reagierenden Organellen.

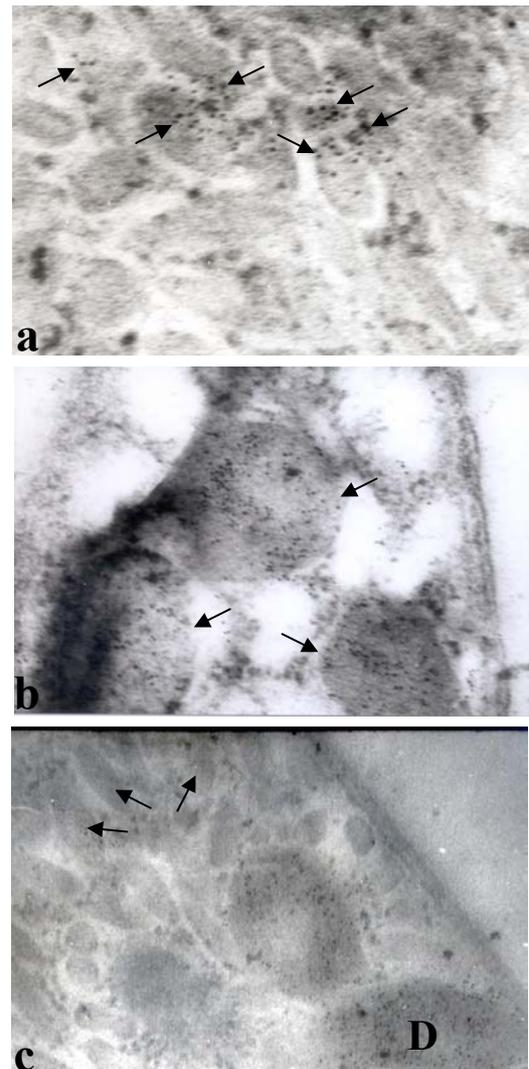


Abb. 17: Reaktion an *E. bovis*-Merozoiten I affinitätsgereinigter Antikörper mit Merozoiten I (Immunelektronenmikroskopie; Postembedding-Verfahren):

a: Bindung in Mikronemen (Querschnitt; Vergr. 76.000 x)

b: Bindung in „Dichten Granula“ (Längsschnitt; Vergr. 61.000 x)

c: Übersicht mit Mikronemen (M) und „Dichten Granula“ (D) zur Übersicht (Längsschnitt; Vergr. 51.600 x)

4.5.4 Reaktivität der affinitätsgereinigten Antikörper im Immunoblot

Homogenate von *E. bovis* Schizonten-tragenden BFGC (15 Tage p. i.; 8 µg Proteine/Geltasche) und Merozoiten I (8 µg Proteine/Geltasche) wurden über SDS-Gele unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot gegen Poolseren aus nicht infizierten und reinfizierten Rindern gegen affinitätsgereinigte Antikörper getestet. Nach Reaktion von Merozoitenantigenen mit dem Poolserum aus reinfizierten Rindern zeigten sich zahlreiche Antigene zwischen <20 kDa bis >220 kDa; davon waren die Antigene mit scheinbaren Molekulargewichten von 90, 78, 49, 40 und 27 kDa intensiv immungefärbt (Abb. 18, Spur 1). Wurden Schizonten I tragende Zellen als Antigen eingesetzt, so wurde gleichfalls ein breites, wenngleich gegenüber Merozoitenantigen etwas eingeschränktes Spektrum von Antigenen erkannt, die in vielen Fällen bezüglich des Molekulargewichts Antigenen aus Merozoiten entsprachen (Abb. 18, Spur 2). Allerdings ergaben sich deutliche Unterschiede in den Intensitäten der Immunfärbung. Die hier am intensivsten angefärbten Antigene wiesen scheinbare Molekulargewichte von 90, 78, 72, 49, 47, 40 und 36 kDa auf.

Auch affinitätsgereinigte Antikörper erfaßten in Merozoitenhomogenaten zahlreiche Antigene, die oft in Bezug auf die Molekulargewichte solchen, die vom kompletten Serum erkannt wurden, entsprachen (vgl. Abb. 18, Spur 3). In der Reaktion mit Homogenat aus infizierten Zellen war die Anzahl markierter Antigene geringer insbesondere im hochmolekularen Bereich (vgl. Abb. 18, Spur 4). Die deutlichsten Reaktionen waren in beiden Fällen mit 78, 72, 40 und 27 kDa Antigenen zu verzeichnen. Einzelne Antigene (29 kDa und 45 kDa) wurden nur in Homogenaten infizierter Zellen erkannt.

Serum aus nicht-infizierten Rindern band weder an Merozoitenantigene (Abb. 18, Spur 5) noch an Antigene in Homogenaten von infizierten BFGC (Abb. 18, Spur 6). Bei Reaktion der affinitätsgereinigten Antikörper mit nicht-infizierten Kontrollzellen zeigten sich 2 schwache Banden von 47 kDa und 55 kDa, die photographisch nicht darstellbar waren (in Spur 7 schematisch markiert).

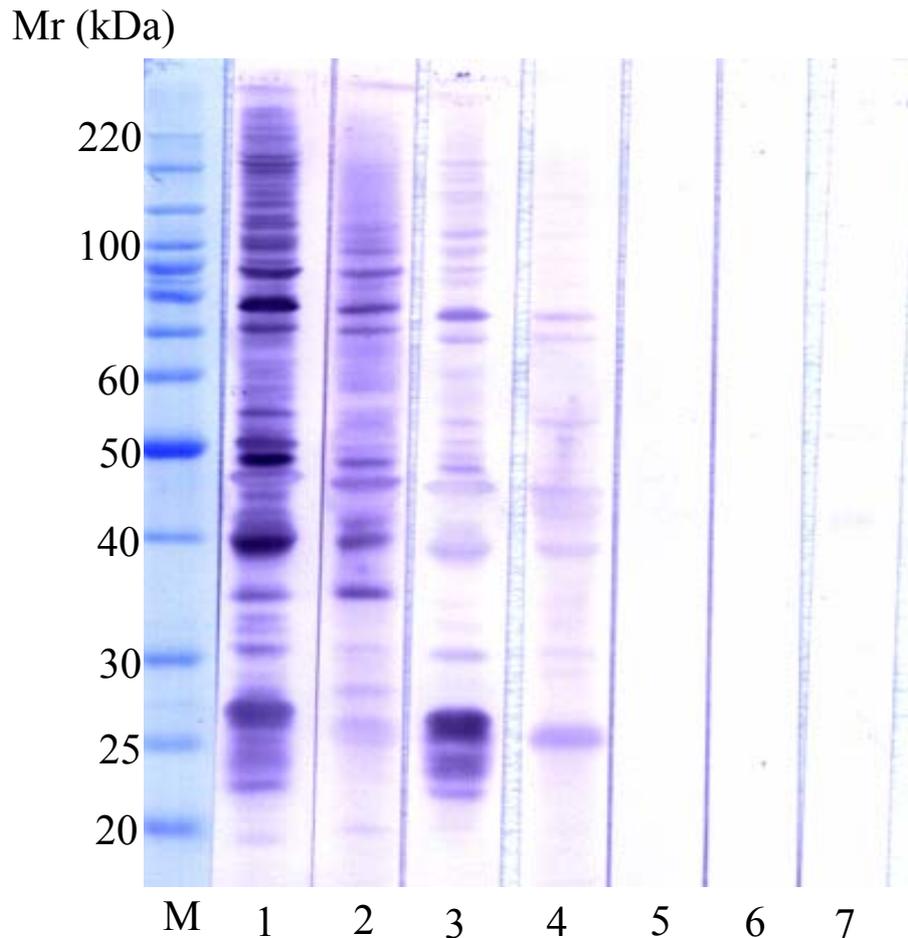


Abb. 18: Reaktion von *E. bovis*-Merozoiten I-Homogenat und Homogenat von *E. bovis*-Schizonten I tragenden BFGC mit Infektionsserum *E. bovis*-reinfizierter Rinder (Poolserum), und mit an infizierten Zellen affinitätsgereinigten Antikörpern. Immunoblot nach SDS-PAGE (10%iges Gel, reduzierende Bedingungen):

M: Marker

Spur 1: Poolserum (45 Tage p. i.) in Reaktion mit Merozoiten I-Homogenat

Spur 2: Poolserum (45 Tage p. i.) in Reaktion mit Homogenat von Schizonten-tragenden BFGC (15 Tage p. i.)

Spur 3: Affinitätsgereinigte Antikörper in Reaktion mit Merozoiten I-Homogenat

Spur 4: Affinitätsgereinigte Antikörper in Reaktion mit Homogenat von Schizonten-tragenden BFGC (15 Tage p. i.)

Spur 5: Serum nicht infizierter Rinder (affinitätsgereinigt) in Reaktion mit Merozoiten I-Homogenat

Spur 6: Serum nicht infizierter Rinder (affinitätsgereinigt) in Reaktion mit Homogenat von Schizonten-tragenden BFGC (15 Tage p. i.)

Spur 7: Affinitätsgereinigte Antikörper in Reaktion mit Homogenat von nicht infizierten BFGC

5 DISKUSSION

Mit der vorliegenden Arbeit sollten die Eignung verschiedener Zelltypen für die *in vitro*-Kultivierung von *E. bovis* überprüft, im Rasterelektronenmikroskop darstellbare Veränderungen bei infizierten Zellen erfaßt, das Auftreten antigener Strukturen auf der Oberfläche infizierter Zellen verfolgt und schließlich der Versuche einer vorläufigen Charakterisierung dieser Antigene gemacht werden.

In die Untersuchungen waren verschiedene bovine Zelltypen sowie VERO-Zellen einbezogen worden, die alle von *E. bovis*-Sporozoitien invadiert wurden. Eine Weiterentwicklung konnte jedoch nur in bovinen Zellen beobachtet werden, obwohl die Erreger in den VERO-Zellen mindestens 3 Wochen überlebten.

Die grundsätzliche Beobachtung, daß sich *E. bovis* in Zellen vom Rind *in vitro* zumindest zum 1. Schizontenstadium entwickeln kann, wurde bereits früh von FAYER und HAMMOND (1967), HAMMOND und FAYER (1968), SPEER et al. (1985) und REDUKER und SPEER (1986a) mitgeteilt. Daß tatsächlich eine Speziespezifität besteht, haben auch breiter angelegte Studien von HERMOSILLA et al. (2002) belegt, in denen neben VERO-Zellen auch humane und porcine Endothelzellen eingesetzt worden waren. Auch die oben beschriebene Bildung einer außerordentlich großen parasitophoren Vakuole um die Sporozoitien in VERO-Zellen entspricht den Befunden von HERMOSILLA et al. (2002). Diese Situation wurde bereits erfolgreich von BEHRENDT et al. (2000) zur Messung des Ionengehalts und des pH-Werts in den einzelnen Kompartimenten einer *E. bovis*-infizierten Zelle genutzt.

In den vorliegenden Experimenten war nie eine Entwicklung über das erste Schizontenstadium hinaus beobachtet worden. In den Untersuchungen von HERMOSILLA et al. (2002) hatte sich eine Weiterentwicklung als sehr seltenes Ereignis ergeben. Eine Beobachtung von SPEER und HAMMOND (1973), nach der Gamonten und Oozysten *in vitro* in primären, bovinen embryonalen Nierenzellen entstehen, konnte offensichtlich nie bestätigt werden.

Die Entwicklung von *E. bovis* verlief allerdings auch in Zellen bovinen Ursprungs sehr unterschiedlich. In Übereinstimmung mit HERMOSILLA et al. (2002) wurden die Schizonten am größten und enthielten die meisten Merozoiten in BFGC. In den übrigen Zelllinien waren

die Parasiten weniger produktiv. Das galt auch für Endothelzellen, die in den zentralen Lymphkanälen der Ileumzotten als Wirtszelle *in vivo* dienen (vgl. HAMMOND et al., 1964). Offensichtlich spielt innerhalb des bovinen Systems *in vitro* die Herkunft der Zelle nicht die entscheidende Rolle für die Eignung als Wirtszelle für *E. bovis*. Allerdings ist nichts Definitives über die Zuordenbarkeit der bei BFGC die Schizonten tragenden Zellen bekannt. Die Zelllinie war vor Jahren aus Rinderfeten isoliert worden, und alle Versuche ihrer Charakterisierung anhand bestimmter Marker, wie z. B. Vimentin, scheiterten (ZAHNER, pers. Mittlg.). Trotz fehlender Charakterisierung wurden aber in mehreren Experimenten die unempfindlichen, einfach zu handhabenden und zahlreiche Merozoiten produzierenden BFGC auch in der vorliegenden Arbeit herangezogen.

Auffallend war, daß nebeneinander reife und unreife Stadien auftraten, bei Mehrfachbefall auch in der selben Zelle. Hinsichtlich der Situation *in vivo* könnte dies eine Erklärung für die sich auch nach einmaliger Infektion gelegentlich über mehr als eine Woche hinziehende Oozystenausscheidung (vgl. FIEGE et al., 1992) sein. Die Mechanismen sind jedoch unklar. Ein gewisser „Crowding-Effect“, wie er bei den hohen Infektionsdosen *in vitro* denkbar wäre, sollte *in vivo* wohl kaum eine Rolle spielen, da das Zellangebot *in vivo* größer als *in vitro* sein dürfte.

Bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich das bekannte Invasionsverhalten von Sporozoiten (DUBREMETZ et al., 1998; OPITZ und SOLDATI, 2002 u. a.), indem der Parasit über den apikalen Pol in die Wirtszelle eindringt (daß es der apikale war, war mit der hier verwendeten Methodik allerdings nicht erfaßbar) und unter Mitnahme der Wirtszellmembran seine parasitophore Vakuole bildet. Das Bild der Wirtszelle von außen blieb über einen Zeitraum von 5 Tagen unverändert, wobei der Sporozoit in der flachen Endothelzelle gut erkennbar blieb. Erst mit dem Beginn der Schizogonie, der *in vitro* ähnlich der Situation *in vivo* (vgl. HAMMOND et al., 1946, 1963) auf etwa den 7. - 8. Tag anzusetzen ist, setzte eine Vergrößerung der Wirtszelle ein, die im Fall der verwendeten BUVEC letztlich in ca. 80 - 90 µm großen Zellen resultierte. Dabei waren an mehrfach infizierten Zellen die einzelnen Schizonten deutlich erkennbar. Unter der Annahme, daß in dieser Studie nur BUVEC als Endothelzellen aus bovinen Nabelschnurvenen zum Einsatz kamen, die zudem jeweils nur aus einem Tier stammten ist allerdings die beobachtete Pleomorphie im Bezug auf die Oberfläche der infizierten Zellen nicht zu erklären. Hier war ein einheitliches Bild erwartet worden. Diese Frage muß vorerst offen bleiben.

Daß die Oberfläche infizierter, sich entwickelnde oder reife Schizonten enthaltender Wirtszellen modifiziert wird, zeigte sich auch in den nachfolgenden Untersuchungen im IIFT. Sobald die Teilung der intrazellulären Erreger begonnen hatte, wiesen die Wirtszellen unabhängig vom Zelltyp oberflächliche Komponenten auf, die mit dem Serum wiederholt infizierter Kälber reagierten. Eine beginnende Schizogonie war die Voraussetzung, denn VERO-Zellen, auch wenn sie mehrere Sporozoiten enthielten, banden keine Antikörper aus den Kälberseren. Auch die mit dem Fortschreiten der Schizogonie zu beobachtende Intensivierung der Reaktion spricht für einen Zusammenhang der immunreaktiven Oberflächenkomponenten mit der intrazellulären Proliferation der Erreger. Auch, daß BFGC im allgemeinen stärker als Endothelzellen und diese stärker als MDBK-Zellen reagierten, ist in Anbetracht der in dieser Reihenfolge abnehmenden Merozoitenzahlen (s. o.) wohl auch in dieser Weise zu interpretieren. Allerdings traten teils deutliche Unterschiede zwischen individuellen, zum gleichen Zeitpunkt infizierten Zellen auf. Die ursprüngliche Vermutung, dies hinge mit unterschiedlichen Reifegraden der Schizonten zusammen, ließ sich nicht zweifelsfrei klären. Die Unterschiede waren innerhalb einer Zelllinie größer als generell zwischen den Zelllinien. Es erscheint denkbar, daß ein Zusammenhang mit der rasterelektronenmikroskopisch beobachteten Vielfalt der Zelloberflächen nach Infektionen besteht, doch konnte diese Frage im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht entschieden werden.

So, wie das Auftreten reaktiver Komponenten auf infizierten Zellen zeitlich definiert war, traten auch reaktive Antikörper in Kälbern erst zu einem bestimmten Zeitpunkt p. i. auf. Weder in der Präpatenz noch in der beginnenden Patenz, 18 Tage p. i., von *E. bovis*-infizierten Kälbern isolierte Seren reagierten mit infizierten Zellen; erst 29 Tage p. i., d. h. nach Ende der Patenz, und später entnommene Seren enthielten die spezifischen Antikörper. Die wissenswerte Information, ob bereits in der frühen Patenz entsprechende Antikörper auftreten, konnte aus versuchstechnischen Gründen nicht erhalten werden. Dennoch zeigen die Ergebnisse, daß die Antikörperantwort gegen diese Antigene im Vergleich zu zahlreichen anderen Antigenen verzögert einsetzt (vgl. FIEGE et al., 1992).

Die weiteren Experimente belegen zweifelsfrei, daß die fraglichen Antigene tatsächlich auf der Oberfläche der Wirtszelle auftreten und Parasitenantigene sind. Ersteres zeigt sich anhand der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung, die im Präembedding-Verfahren durchgeführt wurde, d. h. daß fixierte Zellen in den Testseren inkubiert und danach aufgearbeitet wurden. Die die gebundenen Antikörper markierenden Goldpartikel des

Konjugats fanden sich auf amorphem Material auf der Zelloberfläche, ein Bild, das im Prinzip dem entspricht, daß sich im IIFT ergeben hatte. Die elektronenmikroskopischen Studien erbrachten keinen Hinweis auf „Knob“-ähnliche Veränderungen wie sie bei *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten auftreten und sich dort als elektronendichte, knopfartige, unter der Erythrozytenmembran liegende und die Membran nach außen vorbuchtende Strukturen darstellen. Mit diesen „Knobs“ sind bei *P. falciparum* mehrere Antigene assoziiert, so auch PfEMP1 (zusammenfassend bei WICKHAM et al., 2001). Im Falle von *E. bovis* schien das antigene Material eher amorph auf die Wirtszelloberfläche aufgelagert.

Zur Klärung der Herkunft der Antigene waren die infizierten Zellen anstatt mit Seren infizierter Kälber mit Hyperimmunseren gegen Merozoiten I von *E. bovis* aus immunisierten Ratten untersucht worden. Damit sollte sichergestellt werden, daß nicht unbekannte Wirtsstrukturen, die möglicherweise Autoantikörper im Kalb induzieren, im IIFT erfaßt wurden. Ratten wurden anstatt der sonst üblichen Kaninchen zur Antikörperproduktion verwendet, weil bei ihnen von einer kokzidienfreien Aufzucht ausgegangen werden konnte. Die zur Immunisierung eingesetzten Merozoiten waren nach mehrmaligem Waschen als frei von Komponenten aus Rinderzellen erachtet worden. Die von den Ratten gewonnenen Antisera reagierten im IIFT mit fixierten infizierten Zellen analog den Seren aus mehrfach infizierten Kälbern. Dies wurde als Beweis dafür erachtet, daß es sich bei den oberflächlichen, immunreaktiven Komponenten um parasitenspezifisches Material handelte.

Die Antigene waren von/aus der Zellwand nicht mit 1 M NaCl abzuspalten. Diese Behandlung ist eine gebräuchliche Methode, um zwischen peripheren und integralen Membranproteinen zu unterscheiden (THOMAS und McNAMEE, 1990) und das Ergebnis spricht dafür, daß die Antigene eher in die Zellwand integriert, als lediglich absorbiert sind.

Ohne Effekt blieb auch die Behandlung mit Phospholipase C. *E. bovis*-Antigene auf infizierten Zellen inserieren demnach wahrscheinlich nicht über GPI-Anker in der Wirtszellmembran. Eine solche Verankerung ist zwar auch nicht für entsprechende Antigene bei anderen Apicomplexa, speziell bei Plasmodien (vgl. GOWDA, 2002) bekannt, die Frage war jedoch von grundlegendem Interesse, da GPIs sich in *E. bovis* (ZAHNER und SCHWARZ, pers. Mittlg.) wie in Plasmodien und z. B. in *Toxoplasma gondii* (MANGER et al., 1998) nachweisen lassen, und diese Strukturen ein hohes pathogenes Potential besitzen (GOWDA, 2002; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003). Die Ergebnisse sprechen weiterhin dagegen, daß Phosphorylcholin (PC)-haltige Antigene ein wesentliches Kontingent der Oberflächenproteine stellen. Auch dieses Haptenmolekül, dem eine Vielzahl von biologischen

Aktivitäten zugesprochen wird (vgl. LOCHNIT et al., 2000) findet sich in *E. bovis* und zwar offensichtlich besonders in Mikronemen (HEISE et al., 1999a), die nach den immunelektronischen Studien in dieser Arbeit als ein Synthesort der Oberflächenantigene auf infizierten Wirtszellen angesehen werden müssen.

CHAPS als zwitterionisches Detergens hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Oberflächenantigenität infizierter Wirtszellen, während mit den nicht-ionischen Detergentien eine partielle, sich in einer generell abgeschwächten Fluoreszenz im IIFT äußernde Extraktion der Antigene erreicht wurde. Die letzteren Ergebnisse erlauben keine Aussage darüber, ob aus der gesamten Palette der Oberflächenantigene einzelne Antigene extrahiert wurden oder ob generell ein Teil der Antigene betroffen war.

Nach den Untersuchungen z. B. von TAYLOR et al. (1990) zu einem bei Apicomplexa hoch konservierten Antigen ist aber anzunehmen, daß vor allem die Anteile unter den Antigenen die Detergensbehandlung *in situ* überdauerten, die mit Elementen des Zytoskeletts der Wirtszelle assoziiert sind. Solche Befunde hatten sich auch für das RESA-Protein (FOLEY et al., 1991) sowie verschiedene *Var*-Proteine bei *P. falciparum* (HOWARD et al., 1987) ergeben.

Der Effekt von Proteinase K schließlich spricht dafür, daß es sich bei den Antigenen um Proteine handelt, oder daß sie zumindest mit Proteinstrukturen assoziiert sind.

Zur Affinitätsreinigung der Seren wurden die Zellen mit 3% Formaldehydlösung fixiert, um sicherzustellen, daß ausschließlich Oberflächenantigene erfaßt wurden. Diese Methode hatte sich für die Affinitätsreinigung von Antikörpern gegen die Oberfläche von Mikrofilarienscheiden (SCHARES et al., 1994) und, in abgewandelter Form, die Oberfläche *B. bovis*-infizierter Erythrozyten bewährt (ALLRED, 1997) und hatte offensichtlich auch hier zum Erfolg geführt, da bei Verwendung der gereinigten Seren zumindest für die Erkennung interner Strukturen des Parasiten eine deutlich größere Selektivität zu verzeichnen war.

Die vergleichende Untersuchung der ungereinigten und affinitätsgereinigten Rinderseren an Merozoiten I und Sporozoiten zeigte interessante Spezifitäten auf. Während die ungereinigten Infektionsseren an die Oberfläche beider Stadien banden, beschränkte sich die Reaktion der gereinigten Antikörper auf die Merozoiten. Bei Methanol-fixierten Parasiten, d. h. Parasiten bei denen die internen Strukturen Antikörpern zugänglich waren, ergaben sich gleichermaßen eindeutige Unterschiede: Das komplette Serum erfaßte bei Sporozoiten unter Aussparung der

Refraktilen Körperchen das gesamten Zellinnere, während die gereinigten Antikörper mit Sporozoiten nicht mehr reagieren. Im Falle der Merozoiten beschränkte sich die Bindung der gereinigten Antikörper auf den Bereich vor dem Zellkern. Dieses Reaktionsbild ließ bereits vermuten, daß die Mikronemen der Parasiten erfaßt wurden. Diese Vermutung wurde durch die immunelektronenmikroskopische Untersuchung bestätigt. Außerdem banden die Antikörper an Antigene der Dichten Granula. Diese Ergebnisse sprechen für eine ausgeprägte organell-spezifische Expression sowie Stadienspezifität der Wirtszelloberflächenantigene (s. u.).

Die Beobachtung, daß die Refraktilen Körperchen der Sporozoiten nicht von Infektionsseren erkannt wurden, ist in ihrer Bedeutung schwer bewertbar. Nach ABRAHAMSEN et al. (1994a) und HERZENBERG et al. (1995) kann davon ausgegangen werden, daß die Proteine der Refraktilen Körperchen relativ konserviert sind. Vergleichbare Untersuchungen bei Infektionen mit anderen Apicomplexa, bei denen die Bindungsstellen von Antikörpern aus Infektionsseren definiert wurden, sind dem Autor jedoch nicht bekannt. Nachdem in verschiedenen Fällen, einschließlich *E. bovis*, monoklonale Antikörper (MAK) gegen Proteine aus Refraktilen Körperchen entwickelt wurden, kann aber davon ausgegangen werden, daß sie antigene Strukturen haben (AUGUSTINE et al., 1988; DANFORTH und AUGUSTINE, 1989; VERMEULEN et al., 1993). Bei *E. bovis* ließen sich mit einem MAK Proteine in infizierten Zellen nachweisen (ABRAHAMSEN et al., 1994a, 1994b), die auch noch in Schizonten I auftreten (ABRAHAMSEN et al., 1994b). MAKs gegen Proteine aus Refraktilen Körperchen aus Eimerien reduzierten *in vitro* die Invasionsrate (AUGUSTINE, 1999, 2001) und CRONENBERG et al. (1999), und KOPKO et al. (2000) verzeichneten bei Hühnern nach Immunisierung mit rekombinanten Proteinen von Refraktilen Körperchen von Eimerien Schutzeffekte gegen homologe Belastungsinfektionen. Die Situation im infizierten Wirt ist damit allerdings nicht geklärt, insbesondere, wenn berücksichtigt wird, daß der von AUGUSTINE (1999) beschriebene, *in vitro* schützende MAK auch Oberflächenantigene auf den nicht infizierten Wirtszellen (Nierenzellen von Baby-Hamstern) erkennt.

Mit der Zuordnung der auf der Oberfläche *E. bovis*-infizierter Zellen nachweisbaren Antigene zu den Mikronemen und Dichten Granula der Merozoiten kommen diesen Organellen möglicherweise neue, bisher nicht bekannte Funktionen zu. Für Mikronemenproteine werden zur Zeit hauptsächlich Funktionen im Zusammenhang mit der Wirtszellerkennung, der Anlagerung an die Wirtszelle und die Invasion der Zelle gesehen (Zusammenfassungen bei DUBREMETZ et al., 1998; SOLDATI et al., 2001). Bekannt ist allerdings, daß Komponenten

aus Mikronemen auf die Parasitenoberfläche gelangen und diese bedecken (siehe HEISE, 1997). Dem entspricht, wie die affinitätsgereinigten Antikörper mit PAGA-fixierten Merozoiten reagierten, d. h., daß sie homogen an deren Oberfläche banden.

Daß sich Mikronemenproteine auf der Oberfläche infizierter Wirtszellen finden, wurde dagegen bisher nicht nachgewiesen. Einschränkend muß hier allerdings erwähnt werden, daß eine solche Zuordnung zumindest bei Plasmodien, bei denen die meisten, der hier relevanten Studien durchgeführt wurden, schwierig ist, weil es zur Ein-/Anlagerung der Parasitenantigene in die Wirtszellmembran bereits in frühen Phasen der Plasmodienentwicklung kommt, in denen die Organellen noch nicht ausgebildet sind.

Eine Zuordnung der hier in Frage kommen den Mikronemenantigene zu bisher bekannten *E. bovis*-Antigenen aus diesem Organell ist nicht möglich. Die von HEISE et al. (1999a) mittels MAKs dargestellten Merozoiten I-spezifischen 135 kDa und 180 kDa Antigene ließen sich nicht auf der Oberfläche der Merozoiten finden. Auch passten dominante Merozoiten-Oberflächenantigene, wie sie von HEISE (1997) nach Biotinylierung beschrieben wurden, nicht in die Molekulargewichtsbereiche, die von affinitätsgereinigten Antikörpern im Immunoblot erkannt wurden. Außerdem sind die verschiedenen Angaben zu Merozoiten-Oberflächenantigenen (REDUKER und SPEER, 1986b; WHITMIRE et al., 1989; HEISE, 1997) insgesamt außerordentlich widersprüchlich. Berücksicht muß bei diesen Überlegungen natürlich werden, daß das Wissen über solche Antigene bei *E. bovis* im Vergleich zur *E. tenella*, insbesondere aber auch zu *T. gondii*, bei denen 7 bzw. 9 Mikronemenantigene weitestgehend charakterisiert wurden (zusammengefaßt bei TOMLEY und SOLDATI, 2001), sehr schmal ist.

Von Proteinen aus Dichten Granula ist bekannt, daß sie bei Eimerien in einer relativ späten Phase der Entwicklung entstehen, in die parasitophore Vakuole abgegeben, und in ein tubuloretikuläres Netzwerk in der Vakuole sowie in die Vakuolenwand integriert werden (siehe DUBREMETZ et al., 1998; BLACKMAN und BANNISTER, 2001; SIBLEY, 2003). Die Untersuchungen von AIKAWA et al. (1990), in denen die Autoren zeigen konnten, daß das „Ring-infected erythrocyte surface antigen“ (RESA oder Pf 155) von *P. falciparum*, das auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten zu finden ist, in den Dichten Granula synthetisiert wird, zeigen aber, daß Dichte-Granula-Produkten auch andere Funktionen zukommen. Die Ergebnisse von AIKAWA et al. (1990) sind als Parallele zu den hier erarbeiteten Daten zu werten und sollten Anlass sein, auch bei anderen Apicomplexa zu überprüfen, ob Dichte-Granula-Proteine auf der Oberfläche von infizierten Zellen auftreten. Dies sollte insbesondere

bei den Arten von Interesse sein, bei denen detaillierte Kenntnisse über Dichte-Granula-Proteine bestehen wie bei *T. gondii* (siehe FERGUSON et al., 1999a, 1999b).

Über die Funktion und die Rolle der parasitenspezifischen Antigene auf der Oberfläche Schizonten I tragender Zellen in Infektionsgeschehen kann derzeit allenfalls spekuliert werden. Sie ist auf keinen Fall vergleichbar mit der der variablen *Var*-Antigene von Plasmodien (vgl. CRAIG und SCHERF, 2001) und *Ves*-Antigene von Babesien (zusammengefaßt bei ALLRED et al., 2000). Diese Antigene fungieren einerseits als Adhäsionsmoleküle, sind aber mit ihrer Variabilität auch Teil des Evasionssystems der Parasiten. Für die Rolle der beschriebenen Antigene auf Theilerien-infizierten Zellen (SCHIELS et al., 1989; KNOWLES et al., 1997; PRESTON et al., 1998) existieren keine nachvollziehbaren Annahmen. Eindeutig ist, daß die auf *E. bovis*-infizierten Zellen auftretenden Antigene im Verlauf einer Erstinfektion zumindest nicht mit dem humoralen Immunsystem interagieren, da dann, wenn in infizierten Tieren spezifische Antikörper gegen diese Antigene auftreten, mit Sicherheit die weitaus größte Anzahl der Schizonten I bereits nach Freisetzung der Merozoiten verschwunden ist (vgl. HAMMOND et al., 1946, 1963, 1965; REDUKER und SPEER, 1985). Sie sollten nach dem derzeitigen Kenntnisstand wahrscheinlich auch nichts mit zellulären Abwehrreaktionen nach einer Erstinfektion zu tun haben, da zu dem Zeitpunkt p. i., zu dem die Antigene auf der Wirtszelloberfläche auftreten und danach, Lymphozyten aus dem Blut und aus lymphatischen Organen *E. bovis*-infizierter Kälber maximal auf eine antigene Stimulation mit *E. bovis*-Merozoitenantigen reagieren (HUGHES et al., 1989b; HERMOSILLA et al., 1999) und die Schizonten trotzdem überleben.

Daß andererseits schwere oder wiederholte moderate *E. bovis*-Infektionen zu einer stabilen Immunität gegen Belastungsinfektionen führen, ist mehrfach belegt (u. a. FIEGE et al., 1992). Nach den Befunden bei *T. annulata*, nach denen infizierte Zellen über Infektionsseren in Verbindung mit Komplement auf Grund der vom Parasiten stammenden Oberflächenantigene lysiert werden (PRESTON et al., 1986), kann nicht ausgeschlossen werden, daß humorale Antikörper gegen die hier besprochenen Antigene auch bei der Immunelimination von *E. bovis* nach Super- oder Reinfektionen eine Rolle spielen. Der Effekt von Antikörpern im Rahmen einer schützenden Immunität gegen Eimerien wird jedoch allgemein im Vergleich zu zellulären Mechanismen als gering erachtet (zusammenfassend bei ZAHNER et al., 1994; SHI, 2000). Von Bedeutung sind im Falle von Eimerien hier eher T-Zell-Effekte und dabei insbesondere die zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen, CT-Zellen; vgl. ZAHNER et al., 1994 und SHI, 2000). Ob die Oberflächenantigene auf *E. bovis*-infizierten Wirtszellen hierbei

eine Rolle spielen, bleibt zu klären. Nachdem sich gezeigt hat, daß sich im Fall von Eimerien bei immunen Tieren die Immuneffekte hauptsächlich gegen reife Schizonten I richten, erscheint dies nicht unwahrscheinlich. Belegt wurden solche stadienspezifische Auswirkungen bei *E. falciformis* (MESFIN und BELLAMY, 1979) und *E. vermiformis*-Infektionen (ROSE et al., 1992) in Mäusen, bei der *E. separata*-Infektion in Ratten (SHI, 2000) und bei der *E. tenella*-Infektion in Hühnern (ROSE et al., 1984a).

Effekte zytotoxischer T-Zellen setzen voraus, daß die das Epitop repräsentierenden Peptide in Verbindung mit MHC I-Molekülen präsentiert werden. Dies geschieht auf der Zelloberfläche in einer „Grube“, in der die T-Zelle über den spezifische T-Zellrezeptor an das Epitop bindet (TIZARD, 2000). Räumlich sollte der Zugang für so präsentierte Peptide auch für die das Antigen bindenden Immunglobulinstrukturen möglich sein (T-Zellrezeptoren und Immunglobuline gehören einer gemeinsamen Immunglobulin-Superfamilie an und sind strukturell verwandt; vgl. TIZARD, 2000). Außerdem sind Antikörper, die T-Zell-Epitope in Verbindung mit MHC I auf Zellen erkennen, beschrieben (PORGADOR et al., 1997). Diese Interpretation ist zweifellos hochspekulativ und impliziert, daß *in vivo* im Verlauf einer Erstinfektion keine gegen solche Epitope gerichteten zytotoxischen T-Zellen entstehen. Alternativ, aber ähnlich spekulativ wäre die Annahme, daß die beschriebenen Oberflächenantigene auf infizierten Zellen MHC I-gebundene Peptide abdecken und so die Wirtszelle vor einem Erkennen durch spezifische T-Zellen schützen.

Derzeit ist die Funktion der beschriebenen Antigene somit völlig ungeklärt. Auch fragt sich, ob solche Strukturen bei Apicomplexa generell oder zumindest bei den *Eimeria*-Arten der Wiederkäuer, in deren Zyklus Makroschizonten eingeschaltet sind (vgl. TAYLOR und CATCHPOLE, 1994; ROMMEL, 2000), auftreten. Eventuell sind gezieltere Experimente und fundiertere Spekulationen möglich, wenn ihre Struktur auf molekularer Ebene bekannt ist. Derzeitige Bemühungen gehen in diese Richtung (DYATCHENKO, pers. Mittlg.). Unabhängig davon haben die vorgelegten Untersuchungen aber wahrscheinlich auf bisher unbekannte Rollen von Mikronemen, und Dichte-Granula-Komponenten bei Eimerien hingewiesen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit befaßt sich mit dem Nachweis und der Charakterisierung von Oberflächenantigenen auf *E. bovis*-infizierten Zellen im Verlauf der Entwicklung des Parasiten *in vitro*.

Vier bovine Zelllinien, darunter 2 primäre Endothelzelllinien und VERO-Zellen wurden *in vitro* mit *E. bovis*-Sporozoitien infiziert. Eine Weiterentwicklung erfolgte nur in den Zellen vom Rind, wobei die Entwicklung in einer Linie von fetalen gastrointestinalen Zellen (BFGC) am besten war, indem sich dort die größten und Merozoiten-reichsten Schizonten entwickelten. In VERO-Zellen kam es zwar zu keiner Schizogonie, aber die Sporozoitien überlebten für mehrere Wochen.

In rasterelektronenmikroskopischen Studien an *E. bovis*-infizierten Endothelzellen wurden die Größenzunahme der Wirtszelle und Veränderungen ihrer Oberflächenstruktur im Verlauf der Entwicklung des Parasiten verfolgt. Die Oberfläche infizierter Zellen nach Abschluß der Schizogonie erwies sich als uneinheitlich, indem teils knötchen- oder blasenartige, teils villus- oder haarförmige Strukturen auftraten.

Infizierte, mit 4% Paraformaldehyd/0.25% Glutaraldehyd (PAGA) fixierte Wirtszellen banden ab dem 7. Tag p. i. und danach zunehmend auf der Oberfläche im indirekten Immunfluoreszenztest nachweisbare Antikörper aus Seren wiederholt infizierter (immuner) Kälber, reagierten aber nicht mit Seren nicht infizierter Tiere. Die Fluoreszenz war homogen auf der Zelloberfläche verteilt. Immunreaktive Oberflächenkomponenten wurden im Fall von infizierten VERO-Zellen nicht nachgewiesen, d. h. die Expression dieser Antigene ist offensichtlich auf die sich entwickelnden und reifen Schizonten begrenzt. Antikörper aus einmalig mit *E. bovis*-infizierten Kälbern erkennen diese Antigene erst nach Abschluß der Patenz (29 Tage p. i.). Da die Oberflächenantigene auch von Hyperimmunsereen gegen *E. bovis*-Merozoiten I aus Ratten erkannt wurden, ist davon auszugehen, daß es sich um parasiteneigene Antigene handelt.

Immunelektronenmikroskopische, im Präembedding-Verfahren durchgeführte Untersuchungen bestätigten die Bindung der Antikörper auf der Zelloberfläche.

Die Behandlung infizierter (15 Tage p. i.) Zellen mit 1 M NaCl, 1 mM CHAPS und Phospholipase C (1 mg/ml) hatten keinen Einfluß auf die Antikörperbindungsfähigkeit der Zellen. Triton X-100, Triton X-114 und Triton X-405 führten bei geeigneten Konzentrationen und Einwirkungszeiten zur Abschwächung der Antikörperbindung. Proteinase K-Behandlung hatte zur Folge, daß der Anteil reaktiver Zellen drastisch verringert war.

An infizierten (15 Tage p. i.), 3% Formaldehyd-fixierten Zellen affinitätsgereinigte Antikörper aus immunen Kälbern banden wie das komplette unbehandelte Serum an PAGA-fixierte infizierte Zellen, PAGA-fixierte Merozoiten aber im Gegensatz zum unbehandelten Serum nicht an PAGA-fixierte Sporozoiten. In Methanol-fixierten (permeabilisierten) Sporozoiten und Merozoiten reagierten die affinitätsgereinigten Antikörper mit Strukturen im apikalen Bereich der Merozoiten, nicht jedoch der Sporozoiten, während das unbehandelte Serum bei beiden Stadien diffus intrazellulär band. Anhand immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen (Postembedding-Verfahren) konnten als intrazelluläre Bindungsstellen der affinitätsgereinigten Antikörper die Mikronemen und Dichten Granula der *E. bovis*-Merozoiten I identifiziert werden.

Nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen erkannten die affinitätsgereinigten Antikörper sowohl in *E. bovis*-Schizonten enthaltenden BFGC (15 Tage p. i.) als auch in Merozoiten I-Homogenaten mehrere Polypeptide. Die deutlichsten Reaktionen waren in beiden Fällen mit 78 kDa, 72 kDa, 40 kDa und 27 kDa Antigenen zu verzeichnen. Zwei Antigene mit Molekulargewichten von 29 kDa und 45 kDa wurden nur in Homogenaten infizierter Zellen erkannt.

Parasitenantigene auf der Oberfläche *Eimeria* spp.-infizierter Zellen sind bisher nicht beschrieben worden. Obwohl die Rolle der oben beschriebenen *E. bovis*-Antigene noch völlig unklar ist, lassen die Ergebnisse dieser Studie vermuten, daß diesen sehr stadienspezifischen Parasitenmolekülen aus Mikronemen und Dichten Granula neue, noch unbekannt Funktionen zukommen.

7 SUMMARY

The study deals with the detection and characterization of antigens expressed on the surface of *Eimeria bovis* infected cells during development of the parasites *in vitro*.

Four bovine cell lines, 2 of which were primary endothelial cell lines and VERO cells were infected with *E. bovis* sporozoites *in vitro*. Development of the parasites to 1st generation schizonts took place only in bovine cells, whereby the best development, regarding the size of the schizonts and merozoite yields, was observed in BFGC, a line of bovine fetal gastrointestinal cells. Although the parasites survived in VERO cells for at least 3 weeks they could not develop to the first schizont stage.

Scanning electron microscopy of the *E. bovis* infected endothelial cells was used to determine changes of the surface of infected cells during the intracellular development of the parasites. Both nodule- or vesicle-like and villi- or hair-like structures could be detected on the surface of infected cells in the late stage of schizogony.

Sera of repeatedly infected (immune) calves bound to the surface of infected 4% paraformaldehyde/0.25% glutaraldehyde (PAGA)-fixed bovine cells as determined by indirect immunofluorescence test (IIFT) from day 7 after cell invasion onwards. The intensity of the fluorescence increased in parallel with further development of the parasites. Immunoreactive components were not found on infected VERO cells, i. e. expression of these antigens is obviously limited to developing and mature schizonts. There was no reaction with control sera from uninfected animals. Antibodies from *E. bovis* single infected calves did not bind to these antigens until the end of patency (29 days p. i.). Since the surface antigens were also recognized by hyperimmune serum from rats immunized with *E. bovis* first stage merozoites, it is assumed that these antigens are of parasitic origin.

Binding of the antibodies to the surface of infected cells was confirmed by immune electron microscopy (pre-embedding technique).

Treatment of infected (15 days p. i.) cells with 1 M NaCl, 1 mM CHAPS and Phospholipase C (1 mg/ml) did not affect the surface antigenicity of the cells. Triton X-100, Triton X-114 and Triton X-405 reduced the surface fluorescence after IIFT in general while after proteinase K-treatment of infected cells the proportion of reactive cells was drastically reduced.

Immune serum from infected calves was affinity purified on 3% formaldehyde-fixed *E. bovis* infected cells (15 days p. i.). The affinity purified antibodies reacted in IIFT with the surface of PAGA-fixed infected cells and PAGA-fixed free merozoites similarly to the complete serum, however, in contrast to the untreated serum did not bind to PAGA-fixed sporozoites. In methanol-fixed sporozoites and merozoites the affinity purified antibodies bound to structures within the apical area of merozoites, however, not of the sporozoites, while the untreated serum caused diffuse labelling of the internal structures of both stages. Immune electron microscopy (post-embedding technique) demonstrated the binding of affinity purified antibodies to micronemes as well as to dense granules of *E. bovis* merozoites.

When tested by immunoblotting under reducing conditions the affinity purified antibodies identified several antigens in both infected cells and merozoite extracts. Prominent bands were seen with both extracts at 78 kDa, 72 kDa, 40 kDa and 27 kDa positions, whereas two antigens with molecular weights of 29 kDa and 45 kDa were recognized only in infected cell homogenates.

Parasite antigens on the surface of cells infected with *Eimeria* sp. have not been reported so far. Although the roles of the antigens of *E. bovis* described above are yet completely unknown, the results of this study suggest new functions of these highly stage specific parasite molecules derived from micronemes and dense granules.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAMSEN, M. S.; JOHNSON, R. R.; CLARK, M. W.; WHITE, M. W. (1994a):

Developmental regulation of an *Eimeria bovis* mRNA encoding refractile body associated proteins.

Mol. Biochem. Parasitol. **68**, 25-34

ABRAHAMSEN, M. S.; JOHNSON, R. R.; JUTILA, M. A.; SPEER, C. A.; WHITE, M. W. (1994b):

Eimeria bovis: expression of a related group of refractile body-associated proteins during Schizogony.

Exp. Parasitol. **78**, 331-335

AIKAWA, M.; RABBEGE, J.; UNI, S.; RISTIC, M. ; MILLER, L. H. (1985) :

Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **34**, 45-49

AIKAWA, M.; TORII, M.; SJÖLANDER, A.; BERZINS, K.; PERLMANN, P.; MILLER, L. H. (1990):

Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites.

Exp. Parasitol. **71**, 326-329

ALEY, S. B.; SHERWOOD, J. A.; HOWARD, R. J. (1984):

Knob-positive and knob-negative *Plasmodium falciparum* differ in expression of a strain-specific malarial antigen on the surface of infected erythrocytes.

J. Exp. Med. **160**, 1585-1590

ALLEN, P. C. (1997a):

Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens.

Poult. Sci. **76**, 810-813

ALLEN, P. C. (1997b):

Production of free radical species during *Eimeria maxima* infection in chickens.

Poult. Sci. **76**, 814-821

ALLRED, D. R.; HINES, S. A.; AHRENS, K. P. (1993):

Isolate-specific parasite antigens of the *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface.

Mol. Biochem. Parasitol. **60**, 121-132

ALLRED, D. R.; CLINQUE, R. M.; LANE, T. J.; AHRENS, K. P. (1994):

Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis*-infected erythrocytes.

Infect. Immun. **62**, 91-98

ALLRED, D. R. (1997):

Immunological methods for identification of *Babesia bovis* antigens expressed on the erythrocyte surface.

Methods **13**, 177-189

ALLRED, D. R.; CARLTON, J. M.; SATCHER R. L.; LONG, J. A.; BROWN, W. C.; PATTERSON, P. E.; O'CONNOR, R. M.; STROUP, S. E. (2000):

The ves multigene family of *B. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface.

Mol. Cell. **5**, 153-162

ANDERSEN, F. L.; LOWDER, L. J.; HAMMOND, D. M.; CARTER, P. B. (1965):

Antibody production in experimental *Eimeria bovis* infections in calves.

Exp. Parasitol. **16**, 23-35

ANDERSSON, M.; PAABO, S.; NILSSON, T.; PETERSON, P. A. (1985):

Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance.

Cell **43**, 215-222

AUGUSTINE, P. C.; DANFORTH, H. D.; McANDREW, S. J. (1988):

Monoclonal antibodies reveal antigenic differences in refractile bodies of avian *Eimeria* sporozoites.

J. Parasitol. **74**, 653-659

AUGUSTINE, P. C. (1999):

Reduced invasion of cultured cells pretreated with a monoclonal antibody elicited against refractile body antigens of avian coccidial sporozoites.

J. Euk. Microbiol. **46**, 254-258

AUGUSTINE, P. C. (2001):

Invasion of different cell types by sporozoites of *Eimeria* species and effects of monoclonal antibody 1209-C2 on invasion of cells by sporozoites of several apicomplexan parasites.

J. Euk. Microbiol. **48**, 177-181

BARKER, I. K. (1993):

Pathological processes associated with coccidiosis. In: Proc. VIth International Coccidiosis Conference; June 21 – 25, 1993, Guelph, Ontario, Canada

BARUCH, D. I.; GORMLEY, J. A.; MA, C.; HOWARD, R. J.; PASLOSKE, B. L. (1996):

Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **93**, 3497-3502

BEHRENDT, J. H.; MILDE, H.; WEBER, W. M.; KOWALIK, S.; ZAHNER, H.; BÜRGER, H.-J.; CLAUSS, W. (2000):

Intracellular calcium and pH conditions of cultured cells infected with *Eimeria bovis* or *E. separata*.

Parasitol. Res. **86**, 294-300

BEKHTI, K.; KAZANJI, M.; PERY, P. (1992):

In vitro interactions between murine neutrophils and *Eimeria falciformis* sporozoites.

Res. Immunol. **143**, 909-917

BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. (2001):

Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation.

Mol. Biochem. Parasitol. **117**, 11-25

BRADFORD, M. M. (1976):

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. **72**, 248-254

BROWN, G. V.; CULVENOR, J. G.; CREWETHER, P. E.; BIANCO, A. E.; COPPEL, R. L.; SAINT, R. B.; STAHL, H. D.; KEMP, D. J.; ANDERS, R. F. (1985):

Localization of the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* in merozoites and ring-infected erythrocytes.

J. Exp. Med. **162**, 774-779

BROWN, P. J.; BILLINGTON, K. J.; BUMSTEAD, J. M.; CLARK, J. D.; TOMLEY, F. M. (2000):

A microneme Protein from *Eimeria tenella* with homology to the apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein.

Mol. Biochem. Parasitol. **107**, 91-102

BRYDGES, S. D.; SHERMAN, G. D.; NOCKEMANN, S.; LOYENS, A.; DÄUBENER, W.; DUBREMETZ, J. F.; CARRUTHERS, V. B. (2000):

Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*.

Mol. Biochem. Parasitol. **111**, 51-66

BURNETTE, W. N. (1981) :

“Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal. Biochem. **112**, 195-203

BÜRGER, H.-J. (1983):

Eimeria infektionen beim Rind.

Berlin München Tierärztl. Wschr. **69**, 350-357

BYRNES, S.; EATON, R.; KOGUT, M. (1993) :

In vitro Interleukin-I and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*.

Int. J. Parasitol. **23**, 639-645

CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. (1999):

Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells.
Cell Microbiol. **1**, 225-235

CHA, D. Y.; SONG, I. K. ; LEE, G. S. ; HWANG, O. S.; NOH, H. J.; YEO, S. D.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. (2001)

Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* und *in vivo*.
Korean J. Parasitol. **39**, 233-240

CHEN, Q.; SCHLICHTERLE, M.; WAHLGREN, M. (2000):

Molecular aspects of severe malaria.
Clin. Microbiol. Rev. **13**, 439-450

CHOBOTAR, B.; SCHOLTYSECK, E. (1982):

Ultrastructure. In: The biology of the Coccidia (LONG, P. L.), University Park Press, Baltimore, 101-155

CLARK, T. G.; ABRAHAMSEN, M. S.; WHITE, M. W. (1996):

Developmental expression of heat shock protein 90 in *Eimeria bovis*.
Mol. Biochem. Parasitol. **78**, 259-263

COPPEL, R. L.; CULVENOR, J. G.; BIANCO, A. E.; CREWETHER, P. E.; STAHL, H.; BROWN, G. V.; ANDERS, R. F.; KEMP, D. J. (1986):

Variable antigen associated with the surface of erythrocytes infected with mature stages of *Plasmodium falciparum*.
Mol. Biochem. Parasitol. **20**, 265-277

CRABB, B. S.; COOKE, B. M.; REEDER, J. C.; WALLER, R. F.; CARUANA, S. R.; DAVERN, K. M.; WICKHAM, M. F.; BROWN, G. V.; COPPEL, R. L.; COWMAN, A. F. (1997):

Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress.
Cell **89**, 287-296

CRAIG, A.; SCHERF, A. (2001):

Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion.

Mol. Biochem. Parasitol. **115**, 129-143

CRONENBERG, A. M.; VAN GEFFEN, C. E.; DORRESTEIN, J.; VERMEULEN, A. N.; SONDERMEIJER, P. J. (1999):

Vaccination of broilers with HVT expressing an *Eimeria acervulina* antigen improves performance after challenge with *Eimeria*.

Acta Virol. **43**, 192-197

DANFORTH, H. D.; AUGUSTINE, P. C. (1989):

Eimeria tenella: use of a monoclonal antibody in determining the intracellular fate of the refractile body organelles and the effect on *in vitro* development.

Exp. Parasitol. **68**, 1-7

DASZAK, P.; BALL, S. J.; PITTILO, R. M.; NORTON, C. C. (1993):

Ultrastructural evidence for dense granule exocytosis by first-generation merozoites of *Eimeria tenella* in vivo.

Parasitol. Res. **79**, 256-258

DAUGSCHIES, A.; AKIMARU, M.; BÜRGER, H.-J. (1986):

Experimentelle *E. bovis* Infektionen beim Kalb: I- parasitologische und klinische Befunde.

Dtsch. Tierärztl. Waschr. **93**, 393-397

DAVID, P. H.; HADLEY, T. J.; AIKAWA, M.; MILLER, L. H. (1984):

Processing of a major parasite surface glycoprotein during the ultimate stages of differentiation in *Plasmodium knowlesi*.

Mol. Biochem. parasitol. **11**, 267-282

DE SOUZA LEO, S.; LANG, T. ; PRINA, E. ; HELLIO, R. ; ANTOINE, J. C. (1995):

Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalise and degrade MHC class II molecules of their host cells.

J. Cell. Sci. **108**, 3219-3231

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; AZZOUZ, N.; SCHMIDT, J.; DUBREMETZ, J. F.; GEYER, H.; GEYER, R.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; SCHWARZ, R. T. (2003):

Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages.

J. Biol. Chem. **278**, 32987-32993

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. (1988):

Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.

J. Immunol. **141**, 2407-2412

DUBREMETZ, J. F. (1993):

Apical organelles (rhoptries, micronemes, dense granules) and host cell invasion by coccidia: what do we know now? In: Proc. VIth International Coccidiosis Conference; June 21-25, 1993, Guelph, Ontario, Canada

DUBREMETZ, J. F. (1998):

Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*.

Trends Microbiol. **6**, 27-30

DUBREMETZ, J. F.; GARCIA-REGUET, N.; CONSEIL, V.; FOURMAUX, M. N. (1998) :

Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa.

Int. J. Parasitol. **28**, 1007-1013

DYKSTRA, M. J. (1993):

A manual of applied techniques for biological electron microscopy., Plenum Press, New York

ELLER, G. (1991):

Eimeria-Infektionen bei Kälbern: Vorkommen und Verlauf bei unterschiedlichen Haltungformen.

Inaug. Diss., Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Gießen

ERNST, J. V.; BENZ, G. W. (1986):

Intestinal coccidiosis in cattle.

Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. **2**, 283-291

FABER, J.; KOLLMANN, D.; HEISE, A.; BAUER, C.; FAILING, K.; BÜRGER, H.-J.;
ZAHNER, H. (2002):

Eimeria infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst
excretion and levels of specific serum and colostrums antibodies.

Vet. Parasitol. **104**, 1-17

FAYER, R.; HAMMOND, D. M. (1967):

Development of first-generation Schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells.

J. Protoozol. **14**, 764-772

FERGUSON, D. J.; CESBRON-DELAUW, M. F.; DUBREMETZ, J. F.; SIBLEY, L. D.;
JOINER, K. A.; WRIGHT, S. (1999a):

The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (coccidian)
forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat.

Exp. Parasitol. **91**, 203-211

FERGUSON, D. J.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; DUBREMETZ, J. F.; WRIGHT, S. E.
(1999b):

In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the
exoenteric (tachzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*.

Parasitology **119**, 259-265

FIEGE, N.; KLATTE, D.; KOLLMANN, D.; ZAHNER, H.; BÜRGER, H.-J. (1992):

Eimeria bovis in cattle: colostrum transfer of antibodies and immune response to
experimental infections.

Parasitol. Res. **78**, 32-38

FINDLY, R. C.; ROBERTS, S. J.; HAYDAY, A. C. (1993):

Dynamic response of murine gut intraepithelial T cells after infection by the coccidian
Parasite *Eimeria*.

Eur. J. Immunol. **23**, 2557-2564

FITZGERALD, P. R.; MANSFIELD, M. E. (1972):

Effects of bovine coccidiosis on certain blood constituents, feed consumption and
body weight changes of calves.

Am. J. Vet. Res. **33**, 1391-1397

FITZGERALD, P. R. (1975):

The significance of bovine coccidiosis as a disease of cattle in the United States.

Bovine Pract. **11**, 28-33

FITZGERALD, P. R. (1980):

The economic impact of coccidiosis in domestic animals.

Advances Vet. Sci. **24**, 121-143

FOLEY, M.; MURRAY, L. J.; ANDERS, R. F. (1990):

The ring infected erythrocyte surface antigen protein of *Plasmodium falciparum* is phosphorylated upon association with the host cell membrane.

Mol. Biochem. Parasitol. **38**, 69-76

FOLEY, M.; TILLEY, L.; SAWYER, W. H.; ANDERS, R. F. (1991):

The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane.

Mol. Biochem. Parasitol. **46**, 137-148

FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BIDERRE, C.; BRICHE, I.; LOYENS, A.; ODBERG-FERRAGUT, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. (1996) :

The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface.

Mol. Biochem. Parasitol. **83**, 201-210

FOUSSARD, F.; GALLOIS, Y.; TRONCHIN, G.; ROBERT, R.; MAURAS, G. (1990) :

Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition.

Parasitol. Res. **76**, 563-565

FOX, J. E. (1978):

Bovine coccidiosis.

Mod. Vet. Pract. **59**, 599-603

GENTON, B.; CORRADIN, G. (2002):

Malaria vaccines: from the laboratory to the field.

Curr. Drug. Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. **2**, 255-267

GOWDA, D. C. (2002):

Structure and activity of glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*.

Microbs & Infection **4**, 983-990

GRAAT, E. A.; HENKEN, A. M.; PLOEGER, H. W.; NOORDHUIZEN, J. P.; VERTOMMEN, M. H. (1994):

Rate and course of sporulation of oocysts of *Eimeria acervulina* under different environmental conditions.

Parasitology **108**, 497-502

GRÄFNER, G.; GRAUBMANN, H.-D.; KRON, A.; MÜLLER, H.; DAETZ, H.-H.; PLÖTNER, J.; BENDA, A. (1982):

Zum Auftreten der Weidekokzidiose in Jungrinderbeständen.

Monatshefte Vet. Med. **37**, 776-779

GRÄFNER, G.; GRAUBMANN, H.-D.; SCHWARZ, K.; HIEPE, T. H.; KRON, A. (1985):

Weitere Untersuchungen zu Vorkommen Epizootologie und Bekämpfung der *Eimeria*-Kokzidiose des Rindes unter den Bedingungen der intensiven Stallhaltung.

Mh. Vet. Med. **40**, 41-44

GRÜNDER, H. D. (1978):

Kokzidiose. In: Krankheiten des Rindes (ROSENBERGER, G.), Paul Parey Verlag, Berlin & Hamburg, 2. Auflage, 901-905

HALONEN, S. K.; WEIDNER, E. (1994):

Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments.

J. Euk. Microbiol. **41**, 65-71

HAMMOND, D. M.; BOWMAN, G. W.; DAVIS, L. R.; SIMMS, B. T. (1946):

The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*.

J. Parasitol. **32**, 409-427

HAMMOND, D. M.; ANDERSEN, F. L.; MINER, M. L. (1963):

The occurrence of a second asexual generation in the life cycle of *E. bovis* in calves.

J. Parasitol. **49**, 428-434

- HAMMOND, D. M.; DAVIS, L. R.; BOWMANN, L. (1964):
Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves.
Am. J. Vet. Res. **5**, 303-311
- HAMMOND, D. M.; ERNST, J. V.; GOLDMAN, M. (1965):
Cytological observations on *Eimeria bovis* merozoites.
J. Parasitol. **51**, 852-858
- HAMMOND, D. M.; FAYER, R. (1968):
Cultivation of *E. bovis* in three established cell lines and in bovine tracheal cell line cultures.
J. Parasitol. **54**, 559-568
- HAMMOND, D. M.; FAYER, R.; MINER, M. L. (1969):
Further studies on *in vitro* development of *Eimeria bovis* and attempts to obtain second-generation schizonts.
J. Protozool. **16**, 298-302
- HARNETT, W.; HARNETT, M. M. (1993):
Inhibition of murine B cell proliferation and down-regulation of protein kinase C levels by a phosphorylcholine-containing filarial excretory-secretory product.
J. Immunol. **151**, 4829-4837
- HEISE, A. (1997):
Herstellung und Charakterisierung von Monoklonalen Antikörpern gegen Antigene der Merozoiten 1 von *Eimeria bovis*.
Dissertation aus dem Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- HEISE, A.; PETERS, W.; ZAHNER, H. (1999a):
Microneme antigens of *Eimeria bovis* recognized by two monoclonal antibodies.
Parasitol. Res. **85**, 457-467
- HEISE, A.; PETERS, W.; ZAHNER, H. (1999b):
Phosphocholine epitopes in *Eimeria bovis*.
Exp. Parasitol. **92**, 279-282

HEISE, A.; PETERS, W.; ZAHNER, H. (1999c):

A monoclonal antibody reacts species-specifically with amylopectin granules of *Eimeria bovis* merozoites.

Parasitol. Res. **85**, 500-503

HERMOSILLA, C.; BÜRGER, H. -J.; ZAHNER, H. (1999):

T cell responses in calves to a primary *E. bovis* infection: phenotypical and functional changes.

Vet. Parasitol. **84**, 49-64

HERMOSILLA, C.; BARBISCH, B.; HEISE, A.; KOWALIK, S.; ZAHNER, H. (2002):

Development of *E. 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**, 301-307

HERZENBERG, A. M.; BARTA, J. R.; DESSER, S. S. (1995):

Monoclonal antibodies raised against coccidia and malaria parasites recognize antigenic epitopes found in lankesterellid and adeleorin parasites.

J. Parasitol. **81**, 543-548

HEUSSLER, V. T.; KUENZI, P.; FRAGA, F.; SCHWAB, R. A.; HEMMINGS, B. A.; DOBBELAERE, D. A. E. (2001):

The Akt/PKB pathway is constitutively activated in *Theileria*-transformed leucocytes, but does not directly control constitutive NF- κ B activation.

Cellular Microbiol. **3**, 537-550

HIBBERT, L. E.; HAMMOND, D. M. (1968):

Effects of temperature on *in vitro* excystation of various *Eimeria* species.

Exp. Parasitol. **23**, 161-170

HILL, A. B.; BARNETT, B. C.; McMICHAEL, A. J. (1994):

HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types I and 2.

J. Immunol. **152**, 2736-2741

HOLDER, A. A.; FREEMAN, R. R. (1981):

Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens.

Nature **294**, 361-364

HOWARD, R. J.; BARNWELL, J. W.; KAO, V. (1983):

Antigenic variation in *Plasmodium knowlesi* malaria: identification of the variant antigen on infected erythrocytes.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **80**, 4129-4133

HOWARD, R. J.; LYON, J. A.; UNI, S.; SAUL, A. J.; ALEY, S. B.; KLOTZ, F.; PANTON, L. J.; SHERWOOD, J. A.; MARSH, K.; AIKAWA, M.; ROCK, E. P. (1987):

Transport of an Mr 300,000 *Plasmodium falciparum* protein (PfEMP 2) from the intraerythrocytic asexual parasite to the cytoplasmic face of the host cell membrane.

J. Cell Biol. **104**, 1269-1280

HOWARD, R. J.; GILLADOGA, A. D. (1989):

Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria.

Blood **74**, 2603-2618

HUGHES, H. P. A.; WHITMIRE, W. M.; SPEER, C. A. (1988):

Antigen-specific lymphocyte transformation induced by oocysts antigens of *Eimeria bovis*.

Infect. Immun. **56**, 1518-1525

HUGHES, H. P. A.; BOIK, R. J.; GERHARDT, S. A.; SPEER, C. A. (1989a):

Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates and a new mathematical model for parasite killing.

J. Parasitol. **75**, 489-497

HUGHES, H. P. A.; WHITMIRE, W. M.; SPEER, C. A. (1989b):

Immunity pattern during acute infection by *Eimeria bovis*.

J. Parasitol. **75**, 86-91

ISLER, C. M. ; BELLAMY, J. E. C. ; WOBESER, G. A. (1987):

Pathogenesis of neurological signs associated with bovine enteric coccidiosis: a prospective study and review.

Can. J. Vet. Res. **51**, 261-270

JACKSON, A. R. B. (1964):

The isolation of viable coccidial sporozoites.

Parasitology **54**, 87-93

JACOBS, L. (1967):

Toxoplasma and toxoplasmosis.

Adv. Parasitol. **5**, 1-45

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. (1973):

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria.

J. Clin. Invest. **52**, 2745-2756

JOHNSON, G. D.; NOGUEIRA-ARAÚJO, G. M. D. C. (1981) :

A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy.

J. Immunol. Meth. **43**, 349-350

JOINER, K. A. (1991):

Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue.

Parasitol. Today **7**, 226-227

KAWAZOE, U.; TOMLEY, F. M.; FRAZIER, J. A. (1992):

Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites.

Parasitology **104**, 1-9

KIRVESKARI, J.; HE, Q.; LEIRISALO-REPO, M.; MAKI-IKOLA, O.; WUORELA, M.; PUTTO-LAURILA, A.; GRANFORS, K. (1999):

Enterobacterial infection modulates major histocompatibility complex class I expression on mononuclear cells.

Immunology **97**, 420-428

KLESZIUS, P. H.; KRISTENSEN, F.; ELSTON, A. L.; WILLIAMSON, O. C. (1977):

Eimeria bovis: evidence for a cell-mediated immune response in bovine coccidiosis.

Exp. Parasitol. **41**, 480-490

KNOWLES, D. P.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L. E. (1997):

Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belongs to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species.

Mol. Biochem. Parasitol. **90**, 69-79

KOPKO, S. H.; MARTIN, D. S.; BARTA, J. R. (2000):

Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies.

Poult. Sci. **79**, 336-342

LAL, R.B.; KUMARASWAMI, V.; STEEL, C.; NUTMAN, T. B. (1990):

Phosphocholine-containing antigens of *Brugia malayi* non-specifically suppress lymphocyte function.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **42**, 56-64

LÄMMLI, U. K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680-684

LEECH, J. H.; BARNWELL, J. W.; MILLER, L. H.; HOWARD, R. J. (1984):

Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

J. Exp. Med. **159**, 1567-1575

LEVINE, N. D.; IVENS, V. (1970):

The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of ruminants., Illinois Biol. Monogr. **44**, University of Illinois Press, Chicago

LEVINE, N. D. (1973):

Introduction, history, and taxonomy. In: The Coccidia (HAMMOND, D. M.; LONG, P. L.), University Park Press, Baltimore, 1-23

LIBERATOR, P. A.; HSU, J.; TURNER, M. J. (1989):

Tandem trinucleotide repeats throughout the nucleotide sequence of a cDNA encoding an *Eimeria tenella* sporozoite antigen.

Nucleic Acids Res. **17**, 7104

- LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. (1990):
Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine.
J. Immunol. **144**, 4794-4797
- LILLEHOJ, H. S. (1989):
Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to Eimerian infections in inbred chickens.
Infect. Immun. **57**, 1879-1884
- LILLEHOJ, H. S. (1994):
Analysis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis.
Res. Vet. Sci. **56**, 1-7
- LINGELBACH, K. (2001):
Life in vacuoles- a strategy for parasite survival.
Int. J. Parasitol. **31**, v-vi
- LOCHNIT, G.; DENNIS, R. D.; GEYER, R. (2000):
Phosphorylcholine substituents in nematodes : structures, occurrence and biological implications.
Biol. Chem. **381**, 839-847
- LONG, P. L. (1978):
The problem of coccidiosis: general considerations. In: Avian Coccidiosis (LONG, P. L.; BOORMAN, K. N.; FREEMAN, B. M.), British poultry Science Ltd., Edinburgh, 3-28
- LÜDER, C. G.; LANG, T.; BEUERLE, B.; GROSS, U. (1998):
Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*.
Clin. Exp. Immunol. **112**, 308-316

LÜDER, C. G.; WALTER, W.; BEUERLE, B.; MAEURER, M. J.; GROSS, U. (2001):

Toxoplasma gondii down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT I alpha.

Eur. J. Immunol. **31**, 1475-1484

MAIZELS, R. M.; SELKIRK, M. E. (1988):

Immunobiology of nematode antigens. In: The biology of parasitism (ENGLUND, P. T.; SHER, A. E.), A. R. Liss, New York.

MAGOWAN, C.; WOLLISH, W.; ANDERSON, L.; LEECH, J. (1988):

Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes.

J. Exp. Med. **168**, 1307-1320

MANGER, I. D.; HEHL, A. B.; BOOTHROYD, J. C. (1998):

The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAGI.

Infect. Immun. **66**, 2237-2244

MEHLHORN, H. (2000):

Encyclopedic Reference of Parasitology, Biology, Structure, Function., 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

MILLER, G. A.; BHOGAL, B. S.; McCANDLISS, R.; STRAUSBERG, R. L.; JESSEE, E. J.; ANDERSON, A. C.; FUCHS, C. K.; NAGEL, J.; LIKEL, M. H.; STRASSER, J. M.; STRAUSBERG, S. (1989):

Characterization and vaccine potential for a novel recombinant coccidial antigen.

Infect. Immun. **57**, 2014-2020

MEISSNER, M.; REISS, M.; VIEBIG, N.; CARRUTHERS V. B.; TOURSEL, C.; TOMAVO, S.; AJOKA, J. W.; SOLDATI, I. (2002):

A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts.

J. Cell Sci. **115**, 563-574

MESFIN, G. M.; BELLAMY, J. E. C. (1979):

Effects of acquired resistance on infection with *Eimeria falciformis* var. *pragensis* in mice.

Infect. Immun. **23**, 108-114

NASH, P. V.; SPEER, C. A. (1988):

B-lymphocyte responses in the large intestine and mesenteric lymph nodes of mice infected with *Eimeria falciformis* (Apicomplexa).

J. Parasitol. **74**, 144-152

NILO, L. (1970):

Bovine coccidiosis in Canada.

Can. Vet. J. **11**, 91-98

NYBERG, P. A.; HAMMOND, D. M. (1965):

Description of the sporulated oocysts and sporozoites of four species of bovine coccidia.

J. Parasitol. **51**, 669-673

NYBERG, P. A.; BAUER, D. H.; KNAPP, S. E. (1968):

Carbon dioxide as the initial stimulus for excystation of *Eimeria tenella* oocysts.

J. Protozool. **15**, 144-148

O'CONNOR, R. M.; LANE, T. J.; STROUP, S. E.; ALLRED, D. R. (1997):

Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation.

Mol. Biochem. Parasitol. **89**, 259-270

O'CONNOR, R. M.; ALLRED, D. R. (2000):

Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms.

J. Immunol. **164**, 2037-2045

OLIVER, R. A.; WILLIAMS, J. L. (1996):

Altered expression of class I major histocompatibility antigens on bovine cells infected with the protozoan parasite *Theileria annulata*.

Vet. Immunol. Immunopathol. **50**, 173-179

OPTIZ, C.; SOLDATI, D. (2002):

The glideosome: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*.

Mol. Microbiol. **45**, 597-604

OVINGTON, K. S. ; SMITH, N. C.; JOYSEY, H. S. (1990):

Oxygen derived free radicals and the course of *Eimeria vermiformis* infection in inbred strains of mice.

Parasite Immunol. **12**, 623-631

OVINGTON, K. S. ; SMITH, N. C. (1992):

Cytokines, free radicals and resistance to *Eimeria*.

Parasitol. Today. **8**, 422-426

OVINGTON, K. S.; ALLEVA, L. M.; KERR, E. A. (1995).

Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp.

Int. J. Parasitol. **25**, 1331-1351

PAVLASEK, I.; CELEDA, L.; URBANOVA, Z.; CERNY, J.; RASKOVA, H. (1984):

Coccidiosis in preruminating calves: the effect of management and short-term treatment on the spread of infection and reinfection.

Vet. Parasitol. **14**, 7-12

PELLERDY, L. P. (1974):

Coccidia and Coccidiosis., Paul Parey Verlag, Berlin, 2. Auflage, 723-761

PERKINS, M. E. (1992):

Rhoptry organelles of apicomplexan parasites.

Parasitol. Today **8**, 28-32

PERRIN, L. H.; DAYAL, R. (1982):

Immunity to asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: role of defined antigens in the humoral response.

Immunol. Rev. **61**, 245-269

PORGADOR, A.; YEWDELL, J. W.; DENG, Y.; BENNINK, J. R.; GERMAIN, R. N. (1997):

Localisation, quantitation, and *in situ* detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody.

Immunity **6**, 715-726

PRESTON, P. M.; McDOUGALL, C.; WILKIE, G.; SHIELS, B. R.; TAIT, A.; BROWN, C. G. (1986):

Specific lysis of *Theileria annulata*-infected lymphoblastoid cells by a monoclonal antibody recognizing an infection-associated antigen.

Parasite Immunol. **8**, 369-380

PRESTON, P. M.; JACKSON, L. A.; SUTHERLAND, I. A.; BELL-SAKYI, L.; WILKIE, G.; BROWN, D. J.; SCHOFIELD, J.; MELROSE, T. R.; SANDERSON, A.; BROWN, C. G. (1998):

Theileria annulata: the expression of two novel macroschizont antigens on the surface of infected mononuclear cells differs during *in vitro* attenuation of a virulent cell line.

Exp. Parasitol. **89**, 228-240

PROWSE, S. J.; PALLISTER, J. (1989):

Immunity to coccidiosis: interferon release by spleen and mucosal lymphoid cells from immune chickens. In: Coccidia and intestinal coccidiomorphs, Vth International Coccidiosis Conference, Tours, 541-544

RANJAN, A.; CHITNIS, C. E. (1999):

Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins.

PNAS, **96**, 14067-14072

REDUKER, D. W.; SPEER, C. A. (1985):

Isolation and purification of *Eimeria bovis* (Apicomplexa: Eimeriidae) first-generation merozoites.

Canad. J. Zool. **63**, 2478-2480

REDUKER, D. W.; SPEER, C. A. (1986a):

Antigens of *in vitro*-produced first-generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa).

J. Parasitol. **72**, 782-785

REDUKER, D. W.; SPEER, C. A. (1986b):

Proteins and antigens of merozoites and sporozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa).

J. Parasitol. **72**, 901-907

REDUKER, D. W.; SPEER, C. A. (1987):

Effect of sporozoite inoculum size on *in vitro* production of merozoites of *E. bovis* (Apicomplexa).

J. Parasitol. **73**, 427-430

REYNOLDS, E. S. (1963):

The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.

J. Cell Biol. **17**, 208-212

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; DAUKAK, A.; LAURENT, F.; KAZANJI, M.; YVORÉ, P.; PERY, P. (1993):

Protective oral immunization of chickens against *Eimeria tenella* with sporozoite surface antigens.

Vet. Immunol. Immunopathol. **38**, 327-340

ROBERTS, W. L.; HAMMOND, D. M. (1970):

Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four *Eimeria* species.

J. Protozool. **17**, 76-86

ROBERTS, D. J.; CRAIG, A. G.; BERENDT, A. R.; PINCHES, R.; NASH, G.; MARSH, K. NEWBOLD, C. I. (1992):

Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria.

Nature **357**, 689-692

ROBERTSON, N. P.; REESE, R. T.; HENSON, J. M.; SPEER, C. A. (1988):

Heat shock-like polypeptides of the sporozoites and merozoites of *Eimeria bovis*.

J. Parasitol. **74**, 1004-1008

ROMMEL, M. (2000):

Eimeriose. In: Veterinärmedizinische Parasitologie (ROMMEL, M.; ECKERT, J.; KUTZER, E.; KÖRTING, W.; SCHNEIDER, T.), Paul Parey Verlag, Berlin, 5. Aufl., 133-149

ROSE, M. E.; MOCKETT, A. p. A. (1983):

Antibodies to coccidia: detection by the enzym-linked immunosorbent assay (ELISA).
Parasite Immunol. **5**, 479-489

ROSE, M. E.; LAWN, A. M.; MILLARD, B. J. (1984a):

The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken.
Parasitology **88**, 199-210

ROSE, M. E.; PEPPARD, J. V.; HOBBS, S. M. (1984b):

Coccidiosis: characterization of antibody responses to infection with *Eimeria nieschulzi*.
Parasite. Immunol. **6**, 1-12

ROSE, M. E.; JOYSEY, H. S.; HESKETH, P.; GRENCIS, P. K.; WAKELIN, D. (1988):

Mediation of immunity to *Eimeria vermiformis* in mice by L3T4⁺ T cells.
Infect. Immun. **56**, 1760-1765

ROSE, M. E.; WAKELIN, D.; HESKETH, P. (1989):

Gamma interferon controls *Eimeria vermiformis* primary infection in BALB/c mice.
Infect. Immun. **57**, 1599-1603

ROSE, M. E.; WAKELIN, D.; HESKETH, P. (1991):

Interferon-gamma-mediated effects upon immunity to coccidial infections in the mouse.
Parasite. Immunol. **13**, 63-74

ROSE, M. E.; HESKETH, P.; WAKELIN, D. (1992):

Immune control of murine coccidiosis: CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections.
Parasitology **105**, 349-354

- ROSE, M. E.; HESKETH, P.; ROTHWELL, L.; GRAMZINSKI, R. A. (1996):
T-cell receptor $\gamma\delta$ lymphocytes and *Eimeria vermiformis* infection.
Infect. Immun. **64**, 4854-4858
- ROTHWELL, L.; ROBERT, A. G.; ROSE, M. E.; KAISER, P. (1995):
Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the
development of immunity to *Eimeria maxima*.
Parasite. Immunol. **17**, 525-533
- ROWE, J. A.; KYES, S. A.; ROGERSON, S. J.; BABIKER, H. A.; RAZA, A. (2002):
Identification of a conserved *Plasmodium falciparum* var gene implicated in malaria in
pregnancy.
J. Infect. Dis. **185**, 1207-1211
- SAATARA OZ, H.; STROMBERG, B. E.; BEMRICK, W. J. (1986):
Enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody response against *Eimeria*
bovis and *Eimeria zuernii* in calves.
J. Parasitol. **72**, 780-781
- SAHLINGER, R. (1977):
Beitrag zur Verbreitung der Rinderkokzidiosen in Österreich sowie Versuche zur
Differentialdiagnose von Oozysten mittels Rasterelektronenmikroskopie und Disk-
Elektrophorese.
Inaug. Diss., Vet. Med., Wien
- SAM-YELLOWE, T. Y. (1996):
Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular
survival.
Parasitol. Today **12**, 308-316
- SCHARES, G.; SCHUTZLE, B.; ZAHNER, H.; CONRATHS, F. J. (1994):
Surface antigens of *Litomosoides carinii* microfilariae: agglutinating antibodies react
with sheath components of 40 and 120 kilo Dalton molecular mass.
Parasitology **109**, 73-82

SCHERF, A.; HERNANDEZ-RIVAS, R.; BUFFET, B.; BOTTIUS, E.; BENATAR, C.;
POUVELLE, B.; GYSIN, J. ; LANZER, M. (1998) :

Antigenic variation in malaria : *in situ* switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intraerythrocytic development in *Plasmodium falciparum*.

EMBO J. **17**, 5418-5426

SCHITO, M. L.; BARTA, J. R. (1997):

Non specific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice.

Infect. Immun. **65**, 3165-3170

SCHITO, M. L.; CHOBOTAR, B.; BARTA, J. R. (1998):

Cellular dynamics and cytokine responses in BALB/c mice infected with *Eimeria papillata* during primary and secondary infections.

J. Parasitol. **84**, 328-337

SCHMIDT- ULLRICH, R.; WALLACH, D. F. H.; LIGHTHOLDER, J. (1979):

Two *Plasmodium knowlesi* antigens on the surface of Schizont-infected rhesus monkey erythrocytes induce antibody production in the immune host.

J. Exp. Med. **150**, 86-99

SCHMIDT-ULLRICH, R.; LIGHTHOLDER, J.; MONROE, T. M. (1983):

Protective *Plasmodium knowlesi* Mr 74,000 antigen in membranes of schizont-infected rhesus erythrocytes.

J. Exp. Med. **158**, 146-158

SCHOLTYSECK, E.; MEHLHORN, H. (1970):

Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms.

Z. Parasitenkd. **34**, 97-127

SCHOLTYSECK, E. (1979):

Fine structure of parasitic protozoa., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 15-34

SCHWARTZMAN, J. D.; PFEFFERKORN, E. R. (1989):

Immunofluorescent localisation of myosin at the anterior pole of the coccidian, *Toxoplasma gondii*.

J. Protozool. **30**, 657-661

SHEFFIELD, H. G.; HAMMOND, D. M. (1966):

Fine structure of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*.

J. Parasitol. **52**, 595-606

SHI, M. (2000):

Untersuchungen zur Immunität der Ratte gegen das Dickdarmkokzid *Eimeria separata*.

Inaug. Diss., Vet. Med.; Justus-Liebig-Universität Gießen

SHI, M.; HIRZMANN, J.; DAFA'ALLA, T. H.; ZAHNER, H. (2001a):

In vivo expression profiles of cytokine and iNOS mRNAs in rats infected with *Eimeria separata*.

Vet. Parasitol. **97**, 131-140

SHI, M.; HUTHER, S.; BURKHARDT, E.; ZAHNER, H. (2001b):

Lymphocyte subpopulations in the caecum mucosa of rats after infections with *Eimeria separata*: early responses in naïve and immune animals to primary and challenge infections.

Int. J. Parasitol. **31**, 49-55

SHIELS, B. ; HALL, R. ; GLASCODINE, J.; McDOUGALL, C.; HARRISON, C.; TARACHA, E.; BROWN, D.; TAIT, A. (1989):

Characterization of surface polypeptides on different life-cycle stages of *Theileria annulata*.

Mol. Biochem. Parasitol. **34**, 209-220

SHOMPOLE, S.; McELWAIN, T. F.; JASMER, D. P.; HINES, S. A.; KATENDE, J.; MUSOK, A. J.; RURANGIRWA, F. R.; McGUIRE, T. C. (1994) :

Identification of *Babesia bigemina* infected erythrocyte surface antigens containing epitopes conserved among strains.

Parasite Immunol. **16**, 119-127

SHOMPOLE, S.; PERRYMAN, L. E.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; JASMER, D. P.; MUSOKE A. J.; WELLS, C. W.; McGUIRE, T. C. (1995):

Monoclonal antibody to a conserved epitope on proteins encoded by *Babesia bigemina* and present on the surface of intact infected erythrocytes.

Infect. Immun. **63**, 3507-3513

SIBLEY, L. D.; KRAHENBUHL, J. L.; ADAMS, G. M.; WEIDNER, E. (1986):

Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins.

J. Cell Biol. **103**, 867-874

SIBLEY, L. D. (2003):

Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style.

Traffic **4**, 581-586

SMITH, A. L.; ROSE, M. E.; WAKELIN, D. (1994):

The role of natural killer cells in resistance to coccidiosis: investigations in a murine model.

Clin. Exp. Immunol. **97**, 273-279

SMITH, J. D.; CHITNIS, C. E.; CRAIG, A. G.; ROBERTS, D. J.; HUDSON-TAYLOR, D. E.; PETERSON, D. S.; PINCHES, R.; NEWBOLD, C. I.; MILLER, L. H. (1995):

Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes.

Cell **82**, 101-110

SMITH, A. L.; HAYDAY, A. C. (1998):

Genetic analysis of the essential components of the immunoprotective response to infection with *Eimeria vermiformis*.

Int. J. Parasitol. **28**, 1061-1069

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. (2001):

Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.

Int. J. Parasitol. **31**, 1293-1302

SPEER, C. A.; HAMMOND, D. M. (1973):

Development of second generation schizonts, gamonts and oocysts of *E. bovis* in bovine kidney cells.

Z. Parasitenkd. **42**, 105-113

SPEER, C. A.; REDUKER, D. W.; BURGESS, D. E.; WHITMIRE, W. M.; SPLITTER, G. A. (1985):

Lymphokine induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apikomplexa) in cultured bovine monocytes.

Infect. Immun. **50**, 566-571

SPEER, C. A. (1988):

Ultrastructure of two types of first-generation merozoites of *Eimeria bovis*.

J. Protozool. **35**, 379-381

SPEER, C. A.; WHITMIRE, W. M. (1989):

Shedding of the Immunodominant P20 surface antigen of *Eimeria bovis* sporozoites.

Infect. Immun. **57** (3), 999-1001

STOCKDALE, P. H. G.; YALES, W. D. G. (1978):

Resistance to *E. zuernii* produced after chemotherapy of experimental infections in calves.

Vet. Parasitol. **4**, 209-214

STOCKDALE, P. H. G.; SHEARD, A. (1982):

Resistance to *E. bovis* produced after chemotherapy of experimental infections in calves.

Vet. Parasitol. **9**, 171-177

SU, X.; HEATWOLE, V. M.; WERTHEIMER, S. P.; GUINET, F.; HERRFELDT, J. A.; PETERSON, D. S.; RAVETCH, J. A.; WELLEMS, T. E. (1995):

The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Cell **82**, 89-100

SUPPERER, R. (1971):

Kokzidiosen der Kälber und Jungrinder.

Wien. Tierärztl. Mschr. **3**, 126-127

SUPPERER, R. (1973):

Parasitosen der Kälber.

Tierärztl. Prax. **1**, 403-412

SVENSSON, C.; HOOSHMAND-RAD, P.; PEHRSON, B.; TÖRNQUIST, M.; UGGLA, A. (1993):

Excretion of *Eimeria*-oocysts in calves during their first three weeks after turn-out to pasture.

Acta. Vet. Scand. **34**, 175-182

TAYLOR, W. D.; EVANS, C. B.; ALEY, S. B.; BARTA, J. R.; DANFORTH, H. D. (1990):

Identification of an apically-located antigen that is conserved in sporozoan parasites.

J. Protozool. **37**, 540-545

TAYLOR, M. A.; CATCHPOLE, J. (1994):

Coccidiosis of domestic ruminants.

Appl. Parasitol. **35**, 73-86

THOMAS, C. T.; McNAMEE, M. G. (1990):

Purification of membrane proteins.

Meth. Enzymol. **182**, 499-520

TIZARD, I. R. (2000):

Veterinary Immunology: an introduction., 6th ed., W. B. Saunders, Toronto

TOMLEY, F. M.; CLARKE, L. E.; KAWAZOE, U.; DIJKEMA, R.; KOK, J. J. (1991):

Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *E. tenella*.

Mol. Biochem. Parasitol. **49**, 277-288

TOMLEY, F. M.; BUMSTEAD, J. M.; BILLINGTON, K. J.; DUNN, P. J. (1996):

Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*.

Mol. Biochem. Parasitol. **79**, 195-206

TOMLEY, F. M.; BILLINGTON, K. J.; BUMSTEAD, J. M.; CLARK, J. D.; MONAGHAN, P. (2001):

EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-1 repeats.

Int. J. Parasitol. **31**, 1303-1310

TOMLEY, F. M.; SOLDATI, D. S. (2001):

Mix and match modules: structure and function of microneme Proteins in apicomplexan parasites.

Trends Parasitol. **17**, 81-88

TREES, A. J.; CROZIER, S. J.; MCKELLAR, S. B.; WACHIRA, T. M. (1985):

Class-specific circulating antibodies in infections with *Eimeria tenella*.

Vet. Parasitol. **18**, 349-357

TROUT, J. M.; LILLEHOJ, H. S. (1993) :

Evidence of a role for intestinal CD8⁺ lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina* sporozoites.

J. Parasitol. **79**, 790-792

TROUT, J. M.; LILLEHOJ, H. S. (1995) :

Eimeria acervulina : evidence for the involvement of CD8⁺ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection.

Poult. Sci. **74**, 1117-1125

TROUT, J. M.; LILLEHOJ, H. S. (1996) :

T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections.

Vet. Immunol. Immunopathol. **53**, 163-172

UNI, S.; MASUDA, A.; STEWART, M. J.; IGARASHI, I.; NUSSENZWEIG, R.; AIKAWA, M. (1987):

Ultrastructural localization of the 150/130 KD antigens in sexual and asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **36**, 481-488

VERMEULEN, A. N.; KOK, J. J.; VAN DEN BOOGAART, P.; DIJKEMA, R.; CLASSENS, J. A. (1993):

Eimeria refractile body proteins contain two potentially functional characteristics: transhydrogenase and carbohydrate transport.

FEMS Microbiol. Lett. **110**, 223-229

VERVELDE, L.; VERMEULEN, A. N.; JEURISSEN, H. M. (1996):

In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens.

Parasite Immunol. **18**, 247-256

VIDOTTO, O.; McELWAIN, T. F.; MACHADO, R. Z.; PERRYMAN, L. E.; SUAREZ, C. E.; PALMER, G. H. (1995):

Babesia bigemina: identification of B cell epitopes associated with parasitized erythrocytes.

Exp. Parasitol. **81**, 491-500

WAKELIN, D.; ROSE, M. E. (1990):

Immunity to coccidiosis. In: Coccidiosis of man and domestic animals (LONG, P. L.), CRC Press, Florida, 281-306

WALLACH, M.; SMITH, N. C.; BRAUN, R.; ECKERT, J. (1995):

Potential control of chicken coccidiosis by maternal immunization.

Parasitol. Today **7**, 262-265

WEINANDY, H. (1989):

Langzeitstudie zur Epizootologie von Kokzidieninfektionen bei stallgehaltenen Kälbern und Jungrindern.

Inaug. Diss., Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Gießen

WHITMIRE, W. M.; KYLE, J. E.; SPEER, C. A.; BURGESS, D. E. (1988):

Inhibition of cultured cells by *Eimeria bovis* sporozoites by monoclonal immunoglobulin G antibodies against the parasite surface protein 20.

Infect. Immun. **56**, 2538-2543

WHITMIRE, W. M.; KYLE, J. E.; SPEER, C. A. (1989):

Protein 20, an immunodominant surface antigen of *Eimeria bovis*.

Infect. Immun. **57**, 289-290

WICKHAM, M. E.; RUG, M.; RALPH, S. A.; KLONIS, N.; McFADDEN, G. I.; TILLEY, L.; COWMAN, A. F. (2001):

Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes.

EMBO J. **20**, 5636-5649

ZAHNER, H.; HOMRIGHAUSEN-RIESTER, C.; BÜRGER, H.-J. (1994):

Eimeriosen. In: immunologische und molekulare Parasitologie (RÖLLINGHOFF, M.; ROMMEL, M.), Gustaf Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 67-82

ZÜBLIN, E. (1908):

Beitrag zur Kenntniss der roten Ruhr des Rindes.

Schweiz. Arch. Tierheilk. **50**, 123-169

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meines Gottes für seine Hilfe während meiner gesamten Arbeit und meiner Existenz hier in Deutschland.

Herrn Prof. Dr. H. Zahner möchte Ich für die freundliche Aufnahme am Institute für Parasitologie, Überlassung des Themas, nützliche und fachliche Betreuung, sowie die effektive Unterstützung bei der Abfassung des Manuskript herzlich danken.

Herrn Dr. C. Hermosilla danke Ich für seine unersetzlichen Ratschläge bei der Zellkultur und vielen anderen Labormethoden, seine jederzeit gezeigte Hilfsbereitschaft und seine große Hilfe bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. W. Kummer, Herrn G. Magdowski und Herrn G. Kripp (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) für die Bereitstellung elektronenmikroskopischer Geräte und Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Ich möchte auch Dr. G. Lochnit, Biochemisches Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen) für seine Ratschläge bezüglich des biochemischen Abschnitts dieser Arbeit danken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Heimat, Ägypten, für die Finanzierung und Unterstützung durch ein Stipendium.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre während der Arbeit. Speziell danke Ich Dr. T. Dafa'alla für seine Ratschläge und für Frau M. Hollmann für ihre Hilfe im Zellkulturlabor.