

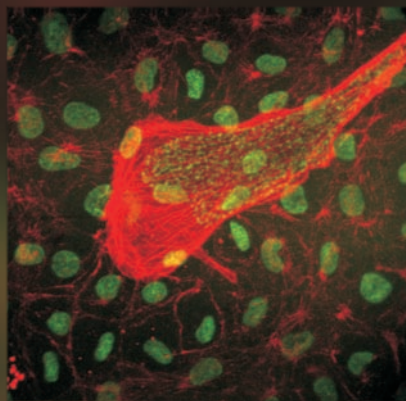
Justus-Liebig-Universität Gießen Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Parasitologie

# STUDIEN ZUR INTERAKTION DES RINDERKOKZIDS *EIMERIA BOVIS* MIT SEINER WIRTSZELLE

## HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Parasitologie im  
Fachbereich Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von

Dr. med. vet. **CARLOS HERMOSILLA**

Gießen 2009



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Justus-Liebig-Universität Gießen**  
**Fachbereich Veterinärmedizin**  
Institut für Parasitologie

**Studien zur Interaktion des Rinderkokzids *Eimeria bovis*  
mit seiner Wirtszelle**

**Habilitationsschrift**  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Parasitologie  
im Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dr. med. vet. Carlos Hermosilla**

Gießen 2009



**Diese Arbeit ist meinen Kindern Banoo Danira und Janis Xaleshen  
sowie meiner Frau Anja gewidmet.**



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Vorkommen von bovinen Kokzidieninfektionen und Erregerereigenschaften..</b>	<b>3</b>
2.1.1	Pathogenität von Eimerien und klinische Erscheinungen bei der Eimeriose des Rindes .....	5
2.1.2	Epidemiologische Einflussfaktoren bei Eimeriosen des Rindes .....	8
<b>2.2</b>	<b>Kritische Aspekte der Entwicklungsbiologie von <i>Eimeria bovis</i> und mögliche Interaktionen des Parasiten mit seiner endothelialen Wirtszelle.....</b>	<b>11</b>
2.2.1	<i>In vitro</i> -Systeme für <i>Eimeria bovis</i> als Voraussetzung für zellbiologische, parasitologische und immunologische Untersuchungen .....	15
<b>2.3</b>	<b>Besonderheiten der endothelialen Wirtszelle und ihre Reaktionen auf intrazelluläre Parasiten.....</b>	<b>19</b>
2.3.1	Modulation der Apoptosefähigkeit der Wirtszelle durch intrazelluläre Parasiten .....	22
<b>2.4</b>	<b>Allgemeine MHC-vermittelte Antigenpräsentation und Modulation der MHC-Expression durch intrazelluläre Parasiten als Ausdruck einer möglichen Evasionsstrategie.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Zusammensetzung des Zytoskeletts der Wirtszelle und Beeinflussung über intrazelluläre Apikomplexa .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Fortbewegung und „klassische“ Wirtszellinvasion bei Apicomplexa.....</b>	<b>28</b>
2.6.1	„Alternativer“ Invasions- und Egressmechanismus bei Apicomplexa..	31
<b>2.7</b>	<b>Sporozoiten- und Merozoiten I-Antigene von <i>Eimeria bovis</i> .....</b>	<b>34</b>
2.7.1	Parasitenspezifische Antigene auf der Oberfläche Apicomplexa-infizierter Wirtszellen .....	36
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>In den vorgelegten Veröffentlichungen verwendete Methoden .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....</b>	<b>43</b>



3.4	<b>Relative Quantifizierung der MHC-I- und MHC-II-Genexpression in <i>Eimeria bovis</i>-infizierten Wirtszellen mittels Realtime-PCR</b>	<b>44</b>
3.5	<b>Charakterisierung der bovinen Endothelzellen</b>	<b>45</b>
3.5.1	Dil-Ac-LDL-Aufnahme-Test	46
3.6	<b>Darstellung von Zytokeratin und der Zonula Occludens-1 in BUVEC- und BFGC-Zellen</b>	<b>47</b>
4	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>48</b>
4.1	<b>Charakterisierung primär isolierter Endothelzellen</b>	<b>48</b>
4.2	<b>Entwicklung von <i>Eimeria bovis</i> Meronten I <i>in vitro</i></b>	<b>50</b>
4.3	<b>Ultrastruktur <i>Eimeria bovis</i>-infizierter Wirtszellen</b>	<b>55</b>
4.3.1	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung <i>Eimeria bovis</i> -infizierter Wirtszellen	55
4.3.2	Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung <i>Eimeria bovis</i> -infizierter Wirtszellen	57
4.4	<b>Loslösung von <i>Eimeria bovis</i>-Meronten I aus dem Zellverband <i>in vitro</i></b>	<b>62</b>
4.5	<b>Entwicklung von <i>Eimeria bovis</i>-Meronten II <i>in vitro</i> in bovinen Epithelzellen</b>	<b>65</b>
4.6	<b>Alternativer Invasionsmechanismus bei <i>Eimeria bovis</i>-Sporozoiten</b>	<b>75</b>
4.6.1	Induzierter Egress von Kokzidien ( <i>Eimeria bovis</i> , <i>Neospora caninum</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> ) aus bovinen Endothelzellen	78
4.7	<b>Infektionen mit <i>Eimeria bovis</i> und anderen Apicomplexa (<i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Neospora caninum</i>) induzieren die endotheliale Synthese von Adhäsionsmolekülen mit nachfolgender PMN-Adhäsion</b>	<b>81</b>
4.7.1	Intrazelluläre <i>Eimeria bovis</i> -Stadien hemmen TNF- $\alpha$ -induzierte Reaktionen der endothelialen Wirtszelle	83
4.8	<b>Beeinflussung des Zytoskeletts der Wirtszelle durch <i>Eimeria bovis</i></b>	<b>84</b>
4.9	<b><i>Eimeria bovis</i>-Antigene auf der Oberfläche infizierter Wirtszellen <i>in vitro</i></b>	<b>88</b>
4.10	<b>Erfassung von MHC-Molekülen auf <i>Eimeria bovis</i>-infizierten Endothelzellen</b>	<b>94</b>
4.10.1	Etablierung eines Testsystems zur simultanen Erfassung von MHC-Molekülen und intrazellulären <i>E. bovis</i> -Sporozoiten bei bovinen Endothelzellen	94

---

4.10.2	Charakterisierung der MHC-Expression und -Transkription bei <i>Eimeria bovis</i> -infizierten Zellen.....	96
4.11	<i>Eimeria bovis</i> moduliert die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle .....	101
5	VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN .....	107
5.1	“Development of <i>Eimeria bovis</i> <i>in vitro</i> : 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.”.....	107
5.2	“Alternative mechanism of <i>Eimeria bovis</i> sporozoites to invade cells <i>in vitro</i> by breaching the plasma membrane.” .....	115
5.3	“ <i>Eimeria bovis</i> modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells.” .....	119
5.4	“ <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i> infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion.” .....	129
5.5	“Cytoskeletal changes in <i>Eimeria bovis</i> -infected host endothelial cells during first merogony.” .....	142
5.6	“Studies on synchronous release of coccidian parasites ( <i>Neospora caninum</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Eimeria bovis</i> ) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187.”.....	154
5.7	“ <i>Eimeria bovis</i> first generation schizonts <i>in vitro</i> infected host cells express parasite derived antigens on their surface.”.....	163
5.8	“Fluorescent <i>Eimeria bovis</i> sporozoites and meront stages <i>in vitro</i> : a helpful tool to study parasite-host cell interactions.”.....	193
5.9	“Inhibition of host cell apoptosis by <i>Eimeria bovis</i> sporozoites.”.....	204
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	214
7	SUMMARY.....	217
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	220



## 1 EINLEITUNG

Bei dem Rinderkokzid *Eimeria bovis* handelt es sich um einen Protozoen, der systematisch bei der Familie Eimeriidae zum Stamm Apicomplexa eingeordnet wird. Als Hauptwirt von *E. bovis* gilt das Rind (*Bos primigenius taurus*) (Levine und Ivens, 1970). Als weitere natürliche Wirte wurden beschrieben: das Zebu (*Bos indicus*) (Levine und Ivens, 1970), der Wasserbüffel (*Bubalus bubalis*) (Bhatia et al., 1968), der Wisent (*Bison bonanus*) und der Banteng (*Bibos banteng*) (Yamikoff, 1935).

*Eimeria*-Infektionen beim Rind können unter bestimmten epidemiologischen Bedingungen Ursache für klinische Rinderkokzidiosen mit erheblichen ökonomischen Folgen sein (Daugschies und Najdrowski, 2005). Insgesamt sind 21 *Eimeria*-Arten beim Rind beschrieben; klinisch bedeutsam sind aber vor allem *E. bovis* und *E. zuernii* als Ursache einer katarrhalisch diphtheroid-nekrotisierenden, z. T. hämorrhagischen Typhlokolitis und Proktitis (Bürger, 1983), vorwiegend im Zuge von Stallinfektionen (Stockdale et al., 1981; Daugschies et al., 1998, Daugschies und Najdrowski, 2005) und *E. alabamensis* als Erreger einer sich als katarrhalische Enteritis darstellenden Weidekokzidiose (Svensson et al., 1994). Die klinischen Kokzidiosen treten vor allem bei in Gruppenhaltung aufgestellten Kälbern auf (Gräfner und Graubmann, 1979; Bürger, 1983; Faber et al. 2002) und werden in der Regel in der 2.-5. Woche der Gruppenhaltung apparent (Faber et al., 2002; Daugschies und Nadrowski, 2005).

Das Krankheitsgeschehen bei *Eimeria*-infizierten Kälbern wird unter natürlichen Bedingungen in erster Linie immunologisch reguliert, wobei sich gewöhnlich über eine kontinuierliche Aufnahme relativ kleiner Mengen sporulierter Oozysten – diese Dauerstadien sind in allen Rinderhaltungsformen ubiquitär – eine partielle, vor klinischen Erkrankungen schützende Immunität entwickelt (Fitzgerald, 1967; Conlounge et al., 1984, Fiege et al., 1992; Daugschies et al., 1998). Über die Mechanismen solcher adaptativer, zellvermittelter Immunreaktionen gegen *E. bovis*-Infektionen liegen für das Rind einige orientierende Untersuchungen (Hughes

et al., 1989; Fiege et al., 1992; Hermosilla et al., 1999) vor, die aber insgesamt und insbesondere im Hinblick auf die angeborene Immunantwort noch kein abschließendes Bild ergeben.

Kaum Aufmerksamkeit wurde bisher bei *E. bovis*-Infektionen des Rindes Vorgängen gewidmet, die früh im Wirt nach der erstmaligen Konfrontation mit freien Sporozoiten (diese dringen in Lymphkapillaren ein, und könnten somit als potentieller Ziele der angeborenen Immunantwort gelten) stattfinden müssen und letztlich an der Überführung in adaptative Immunreaktionen beteiligt sind.

Untersuchungen im Bezug auf die langandauernde erste Merogonie von *E. bovis*, die mit der Bildung von sogenannten Makromeronten einhergeht, und bezüglich der Interaktion des Parasiten mit seiner spezifischen Wirtszelle, einer Endothelzelle, liegen nicht vor. Endothelzellen sind hochreaktive Zellen, die, sofern sie aktiviert werden, ein weites Spektrum an pro-inflammatorischen und immunomodulatorischen Molekülen synthetisieren können und somit Entzündungsreaktionen initiieren (zur Übersicht: Ebnet und Vestweber, 1999; Wagner und Roth, 2000). Über mögliche Evasionstrategien, die bei *E. bovis*-Infektionen zum Tragen kommen könnten, fehlen bisher ausreichende Kenntnisse.

In Anbetracht der biologischen Besonderheit von *E. bovis*, die die Bildung von Makromeronten (ca. 300 µm) beinhaltet, sind Kenntnisse zu Überlebensstrategien des intrazellulären Parasiten eine Voraussetzung zum Verständnis der Rinderkokzidiose. Im Folgenden werden Ergebnisse zu diesen Themen dargelegt. Dabei wird insbesondere auf folgende Thematiken eingegangen: Die *in vitro*-Kultur von *E. bovis*, die Interaktion des Parasiten mit der Wirtszelle unter Berücksichtigung der Invasion, des Zytoskeletts und der Apoptosefähigkeit der Wirtszelle, sowie Reaktionen der endothelialen Wirtszellen und der daraus eventuell resultierenden Immunreaktionen mit Leukozyten.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Vorkommen von bovinen Kokzidieninfektionen und Erregereigenschaften

Bei der bovinen Kokzidiose handelt es sich um eine akut bis chronisch verlaufende, katarrhalisch bis hämorrhagische Darmentzündung, die durch Protozoen der Gattung *Eimeria* aus dem Stamm der Apicomplexa hervorgerufen wird (Dauschies und Najdrowski, 2005). Die bovine Kokzidiose ist weltweit verbreitet und betrifft vorrangig Jungtiere, bei denen z. T. sehr hohe Prävalenzen vorliegen können (Fox, 1985; Cornelissen et al., 1995). Ein vermehrtes Auftreten klinischer Erscheinungen ist beim Umstallen zu größeren Kälbergruppen (Pavlassek et al., 1984), unter intensiven Haltungsbedingungen in sogenannten „feed-lots“ in Sinne einer „crowding disease“ (Fitzgerald, 1975; Fox, 1978), sowie bei erstsömmrigen Kälbern als Weideinfektion etwa 14 Tage nach dem Austrieb zu beobachten (Svensson et al., 1993, 1994; Marshall et al., 1998; Svensson, 2000).

Es sind beim Rind weltweit mehr als 20 verschiedene *Eimeria*-Arten beschrieben (Stockdale et al., 1981) davon gelten derzeit 15 als eigenständige Arten. In Mitteleuropa wurden bisher 13 Arten beobachtet (Bürger, 1983). Die weltweit wichtigsten und häufigsten Arten beim Rind sind nach Weinandy (1989): *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* und *E. auburnensis*.

Zur Bestimmung der einzelnen Arten, dienen vor allem morphologische Merkmale der sporulierten Oozysten wie deren Größe, Form, Farbe, Beschaffenheit der Oozystenhüllen, Vorhandensein oder Fehlen von Oozysten- und Sporozystenrestkörpern sowie Stieda- und Polkörperchen oder die Anzahl hyaliner Körperchen der Sporozoiten (Rommel, 1992). Eimerien haben einen monoxenen Entwicklungszyklus und die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme sporulierter Oozysten in der Außenwelt (Bürger, 1983; Dauschies und Najdrowski, 2005). Die Sporulationszeit (Sporogonie) der Oozysten in der Außenwelt ist für jede *Eimeria*-Art spezifisch und beträgt für *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* und

*E. cylindrica* 2-3 Tage, wohingegen andere Arten einige Tage länger zur Sporulation benötigen (z. B. bis zu 10-14 Tage bei *E. pellita*). Die Oozystensporulation wird in erster Linie durch höhere Temperaturen und Feuchtigkeit gefördert und kann entsprechend durch Austrocknung erheblich gehemmt werden (Graat et al., 1994; Radostits, 1994).

Nach der oralen Aufnahme von sporulierten *Eimeria*-Oozysten werden unter Berücksichtigung der strengen Wirtsspezifität (Kogut, 1990) die Sporozoiten im Rinderdarm unter Einfluss von Trypsin und Galle aus den Oozysten und Sporozysten freigesetzt und dringen artspezifisch in Zellen unterschiedlicher Lokalisationen in der Darmwand ein (Levine und Ivens, 1986; Fernando, 1990). Die intrazellulären Sporozoiten vermehren sich hier durch mehrfache Vielfachteilung (Merogonie) und bilden als Nachfolgestadien Merozoiten aus. Die freien Merozoiten dringen wiederum in andere Wirtszelle ein und durchlaufen artspezifisch ebenfalls eine oder mehrere Merogonie(n) (Fox, 1985). Die Merozoiten der letzten Merontengeneration infizieren eine neue Wirtszelle und differenzieren sich entweder zu einem weiblichen (Makrogamont) oder zu einer männlichen Geschlechtszelle (Mikrogamont). Der Mikrogamont wächst und der Kern teilt sich wiederum speziesspezifisch mehrere Male, sodass der reife Mikrogamont schließlich zahlreiche begeißelte Mikrogameten entlässt (Fernando, 1990). Der Makrogamont dagegen unterliegt keiner Zellteilung, sondern reift lediglich zum Makrogameten. Die freigesetzten, beweglichen Mikrogameten dringen in Makrogameten enthaltende Wirtszellen ein. Nach der Syngamie wird eine Zygote gebildet und Hüllbildungskörperchen („wall forming bodies“) aus dem Zytoplasma des Makrogameten bilden eine Wand um die Zygote aus, so dass schließlich eine intrazelluläre Oozyste geformt wird. Wirtszellen, die Oozysten enthalten, brechen auf und setzen die Oozysten frei, welche anschließend mit dem Kot ausgeschieden werden (Fernando, 1990).

Der detaillierte Entwicklungszyklus ist nur für wenige *Eimeria*-Arten beim Rind in seiner Gesamtheit bekannt und soll hier für *E. bovis* näher erläutert werden. Die Tiere infizieren sich per os durch die Aufnahme von sporulierten *E. bovis*-Oozysten. Im Darm werden die

Sporozoiten frei und invadieren für den nächsten Entwicklungsschritt, der ersten Merogonie, als Wirtszelle Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren der Darmzotten des distalen Ileums. Die Sporozoiten formen sich innerhalb einer parasitophoren Vakuole (PV) zu Trophozoiten um und beginnen 6-7 Tagen p. i. mit der ersten Merogonie. Die Entwicklung zum reifen Meronten im Lymphendothel ist ein relativ langanhaltender Prozess, für den *in vivo* 14-18 Tage benötigt werden. Er resultiert in der Bildung von ca. 300 µm großen Makromeronten, die >120.000 Merozoiten enthalten können (Hammond et al., 1946). Die zweite Merogonie sowie die Gamogonie finden dann in rascher Folge in Epithelzellen von Zäkum und Kolon statt, so dass die Präpatenz bei *E. bovis* insgesamt 18-21 Tage beträgt (Hammond, 1946; Hermosilla et al., 1999). Die *E. bovis*-Oozystenausscheidung erreicht bis etwa zum 22. Tag p. i. ein Maximum und ist ca. 25 Tage p. i. beendet (Hermosilla et al. 1999).

### **2.1.1 Pathogenität von Eimerien und klinische Erscheinungen bei der Eimeriose des Rindes**

Nach Levine und Ivens (1970) sind für das Rind *E. bovis* und *E. zuernii* die pathogensten Arten. Auch Infektionen mit *E. alabamensis* können, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, zu einer klinischen Weide-Kokzidiose führen (Svensson et al., 1993, 1994; Svensson, 2000), allerdings sind dafür höhere Infektionsdosen erforderlich als bei *E. bovis* oder *E. zuernii*. *E. bovis* und *E. zuernii* zeichnen sich durch große Makromeronten und durch tiefes Eindringen in die Darmmukosa in Verbindung mit einer ausgedehnten Lokalisation in Dünn- und Dickdarm aus. Dabei hat *E. bovis*, im Vergleich zu *E. zuernii*, das größere Reproduktionspotential (Ernst und Benz, 1986) und gilt somit als die pathogenste Art beim Rind. Während die meisten bovinen *Eimeria*-Arten epitheliale Dünndarmschäden verursachen, dominieren beim Befall von *E. bovis* und *E. zuernii* Dickdarmläsionen, die auch



tieferen Gewebsschichten erfassen und letztendlich in einer Typhlokolitis und Proktitis münden (Bürger, 1983).

Die wirtseigenen Immunreaktionen auf Makromeronten von *E. bovis* in den Endothelzellen der zentralen Lymphgefäße von Darmzotten im distalen Ileum sind relativ schwach. Schwerere Veränderungen rufen die zweiten Meronten und die Gamonten im Kolon und Zäkum hervor. Im Verlauf der Infektion werden in diesen Darmabschnitten fast alle Epithelzellen an der Basis der Krypten mit zweiten Meronten und Gamonten befallen. Dabei kommt es zur Erweiterung der Drüsen und zu subepithelialen, zellulären Infiltrationen. Die Submukosa wird infolge erweiterter Lymph- und Blutgefäße ödematös. Im Folgenden heben sich Epithelien großflächig ab und es befinden sich auf der Lamina propria diphtheroide Membranen aus Blut, Fibrin, Granulozyten, Oozysten und Zellebris. Die Dickdarmmukosa wird durch Granulationsgewebe ersetzt und die tieferen Gewebsschichten werden ödematös, stark zellulär infiltriert und hyperämisch. Beim Zerfall der Meronten in der Lamina propria wird subepitheliales Gewebe zerstört, einschließlich der sich darin befindlichen Kapillaren und es kommt in Folge zu starken Hämorrhagien. Die tief in den Krypten parasitierenden *E. bovis*- und *E. zuernii*-Arten können die Abstoßung ganzer Mukosaareale und entsprechend starke Hämorrhagien auslösen (Rommel, 1992). Weiterhin führt die Typhlokolitis zu deutlichen Resorptionsstörungen, die sich über verminderte  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Plasmakonzentrationen bemerkbar machen und zu Wasserverlust mit nachfolgender Dehydrierung führen (Daughschies et al., 1986). Die häufigste Todesursache bei infizierten Kälbern ist die mit Verlusten von Plasmaproteinen und Mineralstoffen einhergehende Exsikkose. Weiterhin sind Anämien infolge von Hämorrhagien bei schwer verlaufenden *E. bovis*-Kokzidiosen für Todesfälle von Kälbern verantwortlich.

Kälber, die an einer klinisch manifesten Kokzidiose leiden, zeigen Diarrhoe infolge der katarrhalisch, diphtheroid-nekrotischen Typhlokolitis. Sie zeigen einen aufgeschürzten Leib mit eingefallenen Flanken und Koliksymptome wie z. B. das Schlagen nach dem Abdomen,

Zähneknirschen und Tenesmus (Bürger, 1983; Dauschies et al., 1986). Gelegentlich kommt es zu einem Anstieg der Körpertemperatur und zu Inappetenz bei gleichzeitig gesteigertem Trinkbedürfnis. Im weiteren Verlauf der Kokzidiose setzen Kälber wässrig-rötlichen Kot ab, dem Blutkoagula in Form von langen Darmausgüssen beigemischt sein können. Nach Eller (1990) besteht zwischen der Kotkonsistenz und der Höhe der Oozystenausscheidung für mehrere *Eimeria*-Arten beim Rind positive Rangkorrelationskoeffizienten, und zwar für *E. alabamensis* ( $r = 0,32$ ), *E. bovis* ( $r = 0,22$ ), *E. zuernii* ( $r = 0,21$ ) und *E. ellipsoidalis* ( $r = 0,15$ ). Mit zunehmend dünner werdendem Kot steigt also die Oozystenausscheidung der verschiedenen Arten an.

Die Dehydratation ist an den eingesunkenen Augäpfeln, dem vermindertem Hauttugor und der lederartigen Hautbeschaffenheit zu erkennen. Blasse Schleimhäute deuten eine Anämie an. Verminderte Hämatokrit-, Hämoglobin- und Plasmaproteinwerte im Blut können ebenfalls bei einer klinisch manifesten Kokzidiose beobachtet werden (Fitzgerald und Mansfield, 1972; Stockdale et al., 1981).

Nach einer überstandenen Kokzidiose können allgemeine Schwäche, Abmagerung und struppiges Haarkleid noch nach Wochen persistieren und nach Fox (1978) ist das Rind in diesem geschwächten Zustand anfällig für Sekundärerkrankungen, insbesondere für Pneumonien, bakterielle Enteritiden und Virusinfektionen. Rinder die eine schwere Kokzidiose überstanden haben, werden nie wieder ihre volle Produktivitätskapazität erreichen und i. d. R. Kümmerer bleiben (Fayer, 1989).

### 2.1.2 *Epidemiologische Einflussfaktoren bei Eimeriosen des Rindes*

Nach Gregory (1989) handelt es sich bei Eimerien der Rinder um opportunistische, ubiquitär vorkommende Parasiten. Wie andere opportunistische Enteropathogene verursachen Kokzidien immer dann klinische Erkrankungen, wenn sie in großer Anzahl in einen nicht oder kaum immunen Wirt gelangen. Auch nach anderen Autoren (Rose, 1988; Fayer, 1989) besteht eine direkte Beziehung zwischen der Anzahl aufgenommener Oozysten und der Schwere der resultierenden Erkrankung. Die Ausscheidung von *Eimeria*-Oozysten ist somit eng verknüpft mit dem Vorhandensein des Parasiten in der Umwelt und der Wirtsempfänglichkeit. Die Schwere einer Kokzidieninfektion hängt nach Gräfner und Graubmann (1979), sowie nach Fox (1987) im Wesentlichen von drei Faktoren ab:

#### 1. Eigenschaften des Erregers:

Von großer Bedeutung ist die Infektionsdosis, das Reproduktionspotential (bei *E. bovis* am höchsten) und die Pathogenität der beteiligten Spezies. Die Arten mit der höchsten Pathogenität, wie *E. bovis* und *E. zuernii* (Pellerdy, 1974; Dausgchies und Najdrowski, 2005), zeichnen sich durch große Meronten und tieferes Eindringen in die Darmmukosa aus. Ein weiterer Faktor seitens des Erregers ist die Sporulationsdauer der verschiedenen *Eimeria*-Oozysten (*E. bovis* sehr kurz) in der Außenwelt.

#### 2. Reaktionslage des Wirtes:

Die Reaktionslage des Wirtes wird wiederum beeinflusst vom Alter des Tieres, der genetischen Resistenz/Disposition des Einzeltieres, der Immunitätslage und der Kondition der Tiere (Gräfner und Graubmann, 1979; Faber et al., 2002).

### 3. Umweltbedingungen und Belastungsfaktoren:

Fördernd auf die Ausbreitung und Stärke einer *Eimeria*-Infektion wirken solche Faktoren, die zur Optimierung der exogenen Entwicklung der Oozysten beitragen (z. B. Feuchtigkeit, Temperatur und Sauerstoffangebot) oder die den Wirt einer besonderen Belastung aussetzen, z. B. über schlechte Haltungs- und Fütterungsbedingungen oder Umstallung (Gräfner et al., 1978; Bürger, 1983; Faber et al., 2002).

Das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Infektionen beeinträchtigt die Immunitätslage des Wirtes und beeinflusst damit den Verlauf der Infektion und etwaige Schädwirkungen im Wirt. Die Bedeutung der Kokzidieninfektionen liegt u. a. darin, dass selbst bei subklinischem Verlauf geringere Gewichtszunahmen zu verzeichnen sind (Stromberg et al., 1982; Ernst und Benz, 1986; Faber et al., 2002; Dauschies und Najdrowski, 2005). In diesem Zusammenhang berichteten Durham et al. (1985) z. B. von dem Ausbruch einer experimentellen Parvoenteritis bei subklinisch an Kokzidiose erkrankten Kälbern. Auch nach Hoblet et al. (1992) lag eine größere Schädwirkung bei gleichzeitigem Befall von *E. bovis* und einer Coronavirusinfektion im Gegensatz zu Monoinfektionen vor.

Zwischen der Darmflora und Eimerien bestehen nach Yvoré und Lafont (1992) drei Formen der Interaktion: Erstens ist für die Entwicklung des Parasiten eine bestimmte intestinale Bakterienflora (*Enterobacteria* und anaerobe Bakterien) erforderlich. Zweitens kommt es im Zuge der *Eimeria*-Infektion zu einer deutlichen Reduktion der Lactobacillen und zu einer Vermehrung der *Enterobacteria* und anaerobe Bakterien. Drittens fördert die Kokzidiose unter Umständen die Entwicklung von pathogenen Bakterien im Intestinum.

Kennzeichnend für *Eimeria*-Infektionen ist, dass die meisten Tiere einer Herde befallen sind, aber nur in einigen Betrieben und bei relativ wenigen Tieren klinische Erkrankungen auftreten (Faber et al., 2002; Dauschies und Najdrowski, 2005). Nach Bürger (1983) besteht unter den

meisten Haltungsbedingungen eine enzootische Stabilität, d. h., ständige Infektionen mit geringen Mengen an Oozysten erhalten einen solchen Immunitätszustand aufrecht, bei dem es bei begrenzter Oozystenausscheidung nicht zu einem krankheitsverursachenden Ansteckungsrisiko kommt.

Zu Risikofaktoren, die klinische Eimeriose begünstigen können, gehören unter anderem:

1. Nichtimmune Tiere werden in eine mit *Eimeria*-Oozysten kontaminierte Umgebung verbracht.
2. Immune Tiere werden einem übermäßigen Infektionsdruck ausgesetzt.
3. Gegen eine spezifische *Eimeria*-Art immune Tiere werden mit Oozysten einer anderen *Eimeria*-Spezies konfrontiert.

Als Infektionsquellen dienen vor allem kotverschmutzte Medien wie Futter, Wasser, Einstreu, Wände, Gegenstände und das Haarkleid der Nachbartiere (Gräfner und Graubmann, 1979; Faber et al., 2002; Dauschies und Najdrowski, 2005). Als ein weiterer und wichtiger Faktor bezüglich des Ansteckungsrisikos gilt, neben Klimafaktoren im Stall (Feuchtigkeit, Temperatur, Sauerstoffgehalt), die Aufstallungsform (Eller, 1990). Klinisch manifeste Kokzidiosen treten vor allem dann auf, wenn Kälber aus Einzelboxen in Gruppen umgestallt werden. Dabei gelten diejenigen Aufstallungsformen als prädisponierend, die durch starken Besatz auf engstem Raum einen intensiven Kontakt der Tiere untereinander als auch zu ihren Fäzes ermöglichen (Fanta, 1967; Bürger, 1993; Faber et al., 2002). Bei häufigem Belecken kotverschmutzter Stalleinrichtungen kommt es zu einem starken Anstieg der Befallsextenstäten und -intensitäten, wobei erste Krankheitszeichen ca. 3 Wochen nach dem Umstallen auftreten können (Gräfner et al., 1985). Für die häufigsten *Eimeria*-Arten des Rindes, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii* und *E. bovis*, wurden nach Gruppenhaltung Befallshäufigkeiten von ~ 90 % gemessen, wohingegen die Werte für Tiere ohne

Haltungswechsel < 80 % lagen (Faber, 2000). Im Gegensatz zum Übergang von der Einzelhaltung auf die Kleingruppenhaltung zeigte sich beim Übergang auf die Großgruppe kein deutlicher Anstieg oder Abfall der Befallshäufigkeit mit den einzelnen *Eimeria*-Arten. Eine Ausnahme bildete *E. alabamensis* mit einer Steigerung der Befallshäufigkeit von 20 % auf fast 90 % (Faber, 2000). Nach Bürger (1993) bedeutet ein zweites Umgruppieren zwei Monate nach erstmaliger Gruppenbildung kein zusätzliches Risiko.

Nach Fayer (1989) sowie nach Ernst und Benz (1981) stellen insbesondere erwachsene, subklinisch infizierte Rinder aufgrund ihrer Ausscheidung von *Eimeria*-Oozysten eine wichtige Ansteckungsquelle für naive Kälber und Jungtiere dar. Kollman (1993) stellt bei Milchkühen im geburtsnahen Zeitraum einen Anstieg in der Befallsextenzität und -intensität fest. Dagegen konnte Svensson (1993) bei Untersuchungen von Milchkühen im peripartalen Zeitraum lediglich in 7 % der Kotproben eine geringe Anzahl Oozysten von *E. alabamensis*, *E. bovis*, *E. subspherica* und *E. zuernii* nachweisen.

## **2.2 Kritische Aspekte der Entwicklungsbiologie von *Eimeria bovis* und mögliche Interaktionen des Parasiten mit seiner endothelialen Wirtszelle**

Bei einigen *Eimeria*-Arten der Wiederkäuer (Rind: *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. aubernensis*; Ziege: *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. alijeви*; Schaf: *E. bakuensis*, *E. ovinoidalis*, *E. parva*, *E. ashata*, *E. crandallis*) kommt es mit der Bildung von langlebigen Makromeronten I zu einer biologischen Besonderheit (Eckert et al., 2005). Die Makromeronten dieser *Eimeria*-Arten sind makroskopisch sichtbar und resultieren in der Freisetzung von  $\sim 10^5$  Merozoiten (Daugshies und Najdrowski, 2005). Die Kenntnis von gegen Makromeronten oder frühere Stadien gerichteten, angeborenen Immunreaktionen stellt eine Voraussetzung für das grundsätzliche Verständnis der biologischen Abläufe der pathogenen *Eimeria*-Arten der Wiederkäuer dar.

Im Lebenszyklus von *E. bovis* ergeben sich in der frühen Entwicklungsphase mehrere, voneinander abhängige, kritische Situationen. Zum einen besiedelt der Sporozoit von *E. bovis* nicht Enterozyten, wie es die meisten anderen *Eimeria*-Arten des Rindes tun, sondern tieferliegende Endothelzellen der Lymphkapillare der Villi im Ileum. Der *E. bovis*-Sporozoit sollte daher zumindest über Mechanismen verfügen, um diese physikalische Barriere (Epithelzellschicht und Gefäßwand) zu durchwandern und seine eigentliche Zielzelle zu erreichen.

Im Zusammenhang mit der Wanderung und Zellinvasion von Apicomplexa-Sporozoiten wurde bei *Plasmodium* spp. neben der „klassischen“ Invasion mit nachfolgender Bildung einer parasitophoren Vakuole um den Parasiten im Zytosol der Wirtszelle eine zusätzliche Art der Zellinvasion beschrieben (Mota et al., 2001; Mota und Rodriguez, 2002). Bei dieser „alternativen“ Art der Invasion wird die Zellmembran verletzt und der invasive Sporozoit verbleibt anschließend ohne Bildung einer parasitophoren Vakuole im Zytosol der Wirtszelle. *Plasmodium*-Sporozoiten wären somit in der Lage Gefäßendothelzellen zu durchwandern und anschließend Hepatozyten zu infizieren, wo die erste Merogonie stattfindet (Mota et al., 2001; Mota und Rodriguez, 2002). Die Befähigung von *E. bovis*-Sporozoiten zur „alternativen“ Invasion war u. a. Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit.

*E. bovis* besiedelt mit der Endothelzelle eine hochreaktive und potente Wirtszelle, die, nach Aktivierung, ein breites Spektrum an pro-inflammatorischen und/oder immunmodulatorischen Molekülen synthetisieren kann. Diese sind sowohl Teil des adaptativen als auch des angeborenen Immunsystems bzw. können in beide Systeme modulatorisch eingreifen. So können z. B. Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine und Radikale wie Stickoxide (NO) (Ebnet und Vestweber 1999, Wagner und Roth, 2000) von Endothelzellen produziert werden. Allerdings ist *E. bovis* darauf angewiesen, in diesem Milieu zwei Wochen zu überleben. Diese im Vergleich zu anderen *Eimeria*-Arten lange

Dauer der ersten *E. bovis*-Merogonie wirft in Anbetracht bereits in der Präpatenz einsetzender Immunreaktionen (Fiege et al., 1992; Hermosilla et al., 1999) Fragen nach Evasionsstrategien des Parasiten auf. Nach bisherigen Studien in Nagermodellen sind die Sporozoiten und Meronten I die Hauptziele protektiver zellulärer Immunreaktionen immuner Tiere (zusammenfassend Shi et al., 2000; Shi et al., 2001a). Es erscheint naheliegend, dass diese Stadien im Falle von *E. bovis* ebenfalls immunologisch erfasst werden, insbesondere wenn man die Sporozoiten-Migration und ihre Lokalisation *in vivo* berücksichtigt. Sowohl Sporozoiten als auch Makromeronten I sind in direktem Kontakt mit Lymphe und sollten somit potenzielle Zielstadien von Leukozyten sein. Eine erfolgreiche Entwicklung unter diesen adversen Bedingungen setzt in Konsequenz hochangepasste Invasions- und Evasionsstrategien des Parasiten voraus.

Die erreichte Größe der *E. bovis*-Makromeronten I, die *in vivo* über 300 µm groß werden können, stellt einen weiteren kritischen Aspekt für die Parasiten dar. Diese überdimensionale Vergrößerung der Wirtszelle muss Stress für die parasitierte Zelle bedeuten, und Zellstress wiederum gilt als ein wichtiger Apoptose-Induktor (Van de Sand et al., 2005). In Konsequenz sollte *E. bovis* verhindern, dass die befallene Wirtszelle apoptotisch wird. Für einige nahe verwandte Parasiten aus dem Stamm der Apicomplexa, wie z. B. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* oder *Cryptosporidium parvum*, konnte nachgewiesen werden, dass sie die Apoptosefähigkeit ihrer Wirtszelle hemmen (Lüder et al., 2001; Heussler et al., 2001, Küenzi et al., 2003, Lüder und Gross, 2005). In der Mehrzahl der Fälle geschah dies über gesteigerte HSP65-Expression, NF-κB-Aktivierung oder über die Expression von anti-apoptotischen Faktoren, wie z. B. dem „cellular Fas ligand inhibition protein“ (c-FLIP) oder dem „cellular inhibition apoptosis protein“ (c-IAP) (Heussler et al., 1999, 2001; Lüder et al., 2001, Küenzi et al., 2003, Lüder und Gross, 2005).

Darüber hinaus könnte *E. bovis* als intrazellulärer Parasit die MHC-I-Expression der Wirtszelle beeinträchtigen und somit zytotoxische Aktivitäten von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verhindern,



da deren Erkennung parasitenspezifischer Antigene infizierter Zellen in Kombination mit MHC-I-Molekülen erfolgt. Die Ausnutzung dieses Evasionsmechanismus ist für eine Reihe viraler und intrazellulärer bakterieller Erreger (Andersson et al., 1985; Hill et al., 1994; Kirveskari et al., 1999), aber auch für Parasiten wie z. B. *Leishmania* (De Souza et al., 1995), *Theileria* (Oliver und Williams, 1996) und *T. gondii* (Lüder et al., 1998, Lüder et al., 2001a) nachgewiesen.

*E. bovis*-Meronten I-enthaltende Wirtszellen exprimieren auf ihrer Oberfläche parasitäre Antigene. Dieses potenziell immunreaktive Material lässt sich mit Hilfe von Immunsereen von *E. bovis*-reinfizierten Kälbern nachweisen (Zahner und Hermosilla, pers. Mittl.). Funktion und Zeitpunkt des Auftretens dieser parasitenspezifischen Antigene auf der Wirtszelloberfläche sind somit ebenfalls von Bedeutung für das Verständnis der Immunevasion von *E. bovis*.

Untersuchungen zu den obenangesprochenen Fragen, insbesondere zur Reaktion von Endothelzellen auf *E. bovis*-Infektionen können durchaus auf andere *Eimeria* spp. der Wiederkäuer übertragen werden und somit von generellem Wert sein. Dies trifft z. B. auf *E. bakuensis*, *E. ninakohlyakimovae* oder *E. arloingi* zu, die ebenfalls Endothelzellen der zentralen Lymphgefäße als spezifische Wirtszelle für die Merogonie I besiedeln.

Kaum Aufmerksamkeit wurde bisher bei *Eimeria*-Infektionen allgemein und bei denen des Rindes insbesondere Vorgängen gewidmet, die im Wirt früh nach erstmaliger Konfrontation mit Sporozoiten als Ausdruck einer angeborenen („innate“) Immunreaktion ablaufen und die eventuell zur Kontrolle einer Erstinfektion beitragen, zumindest aber bei der Überführung in adaptative Vorgänge eine Rolle spielen. Auch im Bezug auf mögliche Evasionstrategien der Sporozoiten fehlen bei Eimerien der Wiederkäuer bislang ausreichende Kenntnisse. Insbesondere die Tatsache, dass *E. bovis* als die pathogenste Art beim Rind gilt und

Endothelzellen befällt, spricht für diesen Parasiten als Model für andere relevante Eimerien der Wiederkäuer mit einem ähnlichem Lebenszyklus.

### ***2.2.1 In vitro-Systeme für Eimeria bovis als Voraussetzung für zellbiologische, parasitologische und immunologische Untersuchungen***

Untersuchungen zu Invasionsmechanismen von *E. bovis* Sporozoiten, zu Reaktionen der endothelialen Wirtszellen auf Sporozoiten oder Makromeronten, zu Reaktionen des Zytoskeletts auf die Bildung der Makromeronten, zur Persistenz dieser Stadien sowie zu Egressmechanismen von Merozoiten I aus den befallenen Wirtszellen können beim Rind nicht *in vivo* durchgeführt werden, sondern setzen geeignete *in vitro*-Systeme voraus. Die Etablierung solcher Kulturen, denen in erster Linie primäre bovine Endothelzelllinien als Wirtszellengrunde liegen müssen, war ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit und galt als Voraussetzung für viele der vorgestellten Experimente.

Die Isolierung von reinen primären Endothelzellkulturen aus Blut- oder Lymphgefäßen ist eine anspruchsvolle Methode, da häufig Kontaminationen mit glatten Muskelzellen- oder Fibroblasten vorliegen können. Darüberhinaus gelten primäre Endothelzellen allgemein als besonders anspruchsvolle Zellen, die nur unter Verwendung von speziellem Endothelzellmedien kultiviert werden können. Primäre Endothelzellen benötigen spezifische Wachstumsfaktoren, Hormone und können nur unter LPS-freien Bedingungen wachsen. Eine weitere Besonderheit ist der komplizierte, routinemäßige Umgang mit diesen Zellkulturen, da Endothelzellen auf jede Änderungen der Fließbedingungen (sogenannter „shear stress“) reagieren. So kann der einfache Mediumwechsel zur Fütterung der Zellkulturen bereits zur Aktivierung der Zellen führen, ein Fakt, der dementsprechend bei vielen Experimenten berücksichtigt werden muss. Ein wichtiger Bestandteil der gegenwärtigen Arbeit war daher,

ein geeignetes *in vitro*-System für *E. bovis* unter Verwendung primärer Endothelzellen aus bovinen Nabelschnurvenen, lymphatischen Milzendothelien oder Aorten zu etablieren.

Weiterhin stellt ein *in vitro*-System eine Voraussetzung für die Herstellung von stadienspezifischen Antigenen, wie z. B. aus *E. bovis*-Merozoiten I oder -II, für molekularbiologische, biochemische oder immunologische Ansätze dar.

Erste Versuche, ein adäquates *in vitro*-System für *E. bovis* zu etablieren, wurden von Hammond und Fayer (1967) unternommen. Sie konnten sowohl unter Verwendung von bovinen Primär- als auch Sekundärzelllinien partielle Erfolge erzielen. Nachfolgende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe (Hammond und Fayer, 1968) unter Einsetzung permanenter boviner Zelllinien, wie z. B. boviner Nierenepithelzellen (MDBK) und embryonaler Trachealzellen, zeigten, dass die Entwicklung erster Meronten in diesen Zellen nur partiell vervollständigt wurde. Speer et al (1985) sowie Reduker und Speer (1986) konnten unter Verwendung einer permanenten bovinen Monozytenzelllinie die erste Merogonie von *E. bovis* nachvollziehen. Allerdings ergaben sich in der Effizienz der *in vitro*-Systeme deutliche Unterschiede bezüglich der Größe der Meronten I (Variationen von < 30 µm – 435 µm) und der Entwicklungsdauer (Variationen von 8-25 Tage) (Hammond et al., 1966, 1969; Hammond und Fayer, 1968; Reduker and Speer, 1987).

Die in der Literatur bisher verwendeten bovinen Zelllinien, wie z. B. Monozyten, Nierenepithelzellen oder MDBK (Hammond et al., 1969, Speer et al., 1973), entsprechen nicht der eigentlichen Wirtszelle von *E. bovis* und die tatsächlichen Reaktionsmuster dieser hochreaktiven Zellen konnten somit nicht adäquat wiedergegeben werden. Sollen jedoch Untersuchungen zum parasiteninduzierten Reaktionsspektrum der Wirtszelle durchgeführt werden, muss die Charakteristik der tatsächlichen Wirtszelle beachtet werden. Endothelzellen unterscheiden sich stark in ihrer Reaktivität von den oben genannten Zelltypen und können

z. B. durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1, VCAM-1), pro-inflammatorische Zytokinen/Chemokinen-, Prostaglandinen- oder NO-Produktion (vgl. Ebnet and Vestweber, 1999; Wagner and Roth, 2000) starken Einfluss auf ablaufenden Immunreaktionen nehmen. Somit ist die Verwendung von nicht-endothelialen Wirtszellen bei der *in vitro*-Kultur nicht sinnvoll im Hinblick auf Fragestellungen zu parasiteninduzierten Reaktionen der Wirtszelle und hinsichtlich der Auswirkung solcher Reaktionen auf das Immungeschehen einer *E. bovis*-Kokzidiose.

Aus diesem Grund wurden Anstrengungen gemacht, verschiedene primäre Endothelzellen als Wirtszelle für *E. bovis*-Sporoziten zu testen. Hierbei wurden sowohl nicht-bovine Endothelzelllinien [Porcine Umbilical Vein Endothelial Cells (PUVEC); Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)], als auch bovine Endothelzelllinien [Bovine Spleen Lymphatic Endothelial Cells (BSLEC); Bovine Aortic Endothelial Cells (BAEC), Bovine Umbilical Vein Endothelial Cells (BUVEC)] verwendet. Da im bovinen System die spezifischen Antikörper zur Charakterisierung von Endothelzellen fehlen, erfolgte diese sowohl anhand ihrer Morphologie („cobblestone morphology“) als auch über die Überprüfung der Aufnahme von Dil-Ac-LDL (dioctadecyltetramethyl-indocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein). Die Dil-Ac-LDL-Aufnahme gilt als gängige Methode zur Charakterisierung von Endothelzellen (Knook et al., 1977; Neubauer et al., 1996).

Bei älteren Untersuchungen zur *in vitro*-Kultur von *E. bovis* wurde ein besonderes Phänomen bei der aktiven Sporoziten-Invasion beobachtet: Einige Sporoziten konnten durch verschiedene Wirtszellen hindurchwandern (Hammond und Fayer, 1967). Dabei drangen sie in eine Zelle ein und verließen diese sofort wieder (Hammond und Fayer, 1967). Ähnliche Invasions- und Egress-Mechanismen wurden aber auch bei anderen *Eimeria*-Sporoziten (Roberts et al., 1970, 1971; Speer et al., 1971; Danforth et al., 1984, 1992; Chobatar et al., 1993) und *Toxoplasma gondii*-Sporoziten beobachtet (Nichols and O’Conner, 1981; Speer

et al., 1997). Keine der oben erwähnten Arbeiten zur *in vitro*-Kultur von *Eimeria* ging auf die Besonderheit der Sporozoiteninvasion näher ein, obwohl die in Dünndarm freigewordenen *E. bovis*-Sporozoiten wahrscheinlich über einen eher komplexen Wandermodus zu den tieferliegenden Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren der Ileumzotten gelangen dürften. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Anstrengungen unternommen, die sich sowohl mit den genauen Abläufen der Sporozoiten-Invasion als auch mit denen des -Egresses aus der befallenen Zelle befassen.

Die Etablierung eines *in vitro*-Systems für *E. bovis*, das die vollständige Entwicklung vom intrazellulären Sporozoiten bis zu Oozyste erlaubt, wie es z. B: bereits für *E. tenella* belegt ist (Hofmann und Raether, 1990), wäre von großem Wert, da es teure und zum Teil sehr aufwendige experimentelle Infektionen bei Kälbern zur Gewinnung von Merozoiten, Gamonten oder Oozysten ersetzen könnte. Vor fast 40 Jahren wurden die ersten Anstrengungen unternommen, um dieses Ziel zu erreichen. Unter Verwendung von 11 verschiedenen Zelllinien wurden erste Versuche zur Kultivierung von *E. bovis*-Meronten II und -Gamonten unternommen, doch alle verwendeten Zelllinien eigneten sich nicht für diese Entwicklungsphasen (Hammond et al., 1969). Bei diesen *in vitro*-Experimenten wurden sowohl *ex vivo*- als auch *in vitro*-gewonnene Merozoiten I als Infektionsmaterial verwendet (Hammond et al., 1969), aber ohne Erfolg. Im Gegensatz dazu entwickelten sich solche Merozoiten I jedoch zu Meronten II weiter (mit nachfolgender Oozystenbildung), wenn sie *in vivo* in das Zäkum eines lebenden Kalbes inokuliert wurden (Hammond et al., 1969).

Um so überraschender erscheinen Ergebnisse einer *in vitro*-Studie, bei der sich in primären embryonalen Nierenzellen *E. bovis*-Meronten I, -Meronten II, -Gamonten, und -Oozysten entwickelten (Speer und Hammond, 1973), obwohl sich diese Zelllinie in einer vorherigen Arbeit sich als ungeeignet erwies (Hammond et al., 1969). In der Studie von Speer und Hammond (1973) wurden ausschließlich *ex vivo*-gewonnene *E. bovis*-Merozoiten I verwendet

und limitierende Voraussetzung für die erfolgreiche *in vitro*-Kultur war der exakte Zeitpunkt der Merozoitengewinnung. So konnten nur am Tag 14 p. i. gewonnene Merozoiten erfolgreich zur *in vitro*-Kultur verwendet werden. Merozoiten vom Tag 14.5 und 15 p. i. waren dagegen erstaunlicherweise nicht mehr geeignet.

Merozoiten II, Gamonten und Oozysten benötigen für ihre Entwicklung Epithelzellen des Dickdarms. Reife Meronten II entlassen *in vivo* 30-36 freie Merozoiten II, die sich von Merozoiten I durch ihre geringere Größe unterscheiden (Hammond et al., 1963). Unter Verwendung geeigneter *in vitro*-Systeme könnten sich freie Merozoiten II zu Mikro- und Makrogamonten weiterentwickeln und darauffolgend über Syngamie zur Oozystenbildung führen. Die Etablierung eines solchen *in vitro*-Systems zur kompletten Entwicklung von *E. bovis*, war ebenfalls ein Ansinnen der vorliegenden Arbeit.

### **2.3 Besonderheiten der endothelialen Wirtszelle und ihre Reaktionen auf intrazelluläre Parasiten**

Endothelzellen bilden einen kontinuierlichen Zellrasen, welcher die innere Intima des gesamten Lymph- und Blutgefäßsystems auskleidet. Hauptaufgabe dieses Zellverbandes ist die Regulation der Barrierefunktion zwischen Blut und Geweben. Aufgrund seiner anatomischen Lokalisation ist der Endothelzellverband permanent hämo/lymphodynamischen Belastungen ausgesetzt, was eine strukturelle Integrität des Endotheliums voraussetzt. Darüber hinaus müssen Endothelzellen auf widrige Bedingungen wie z. B. auf Ischämie, Hypoxie und Exposition von Pathogenen oder deren Toxine reagieren und mit dem Immunsystem kommunizieren können (Ebnet and Vestweber, 1999, Wagner und Roth, 2000).

Endothel reagiert grundsätzlich auf Pathogene mit einer Vielzahl von Mechanismen und ist somit in der Lage, immunkompetente Zellen, wie z. B. Leukozyten, gezielt zum Infektionsort

zu rekrutieren. Solche Reaktionen aktivierter Endothelzellen sind nicht MHC-abhängig und können als Ausdruck der angeborenen Immunreaktionen verstanden werden. Endothelzellen sind in der Lage ein breites Spektrum von Molekülen, die zur Adhäsion und Transmigration von Immunzellen führen, zu exprimieren und somit pro-inflammatorische Reaktionen zu initiieren und gezielt zu dirigieren (zur Übersicht siehe Carlos und Harlan, 1994; Ebnet und Vestweber, 1999; Wagner und Roth, 2000).

Eine Möglichkeit seitens der Endothelzelle, auf Invasionen von intrazellulären Parasiten zu reagieren, besteht in der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z. B. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E-Selektin oder P-Selektin (Carlos and Harlan, 1994, Tedder et al., 1995, Ebnet and Vestweber, 1999, Wagner and Roth, 2000). P- und E-Selektin werden in der Frühphase der Endothelaktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert und sind für das sog. „rolling“ der Leukozyten am Endothel zuständig, während ICAM-1 und VCAM-1 eher in einer Spätphase der Aktivierung zum Tragen kommen und eine feste Leukozyten-Adhäsion am Endothel ermöglichen (Carlos and Harlan, 1994; Ebnet und Vestweber, 1999). Die endothelzellvermittelte Adhäsion von Leukozyten gilt als Voraussetzung der Transmigration dieser Zellen in infiziertes oder anderweitig geschädigtes Gewebe. Daneben ermöglicht die Produktion von Zyto- und Chemokinen [z. B. GM-CSF (macrophage granulocyte colony stimulating factor), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), RANTES (regulation upon activation, normal T cell expressed and secreted), GRO- $\alpha$  (growth related oncogene protein  $\alpha$ ), IP-10 (10 kDa interferon-inducible protein) u. a.] seitens der Endothelzelle das Anlocken weiterer Abwehrzellen wie z. B. Monozyten, NK-Zellen, Granulozyten und Lymphozyten. Endothelzellen sind somit in der Lage evtl. infektionseliminierender Mechanismen einzuleiten und zu dirigieren. Endothelzellen sind in ihrem Reaktionsspektrum durchaus mit so potenten Zellen wie Makrophagen zu vergleichen, da sie zudem auch zu einer MHC-II-vermittelten

Antigenpräsentation befähigt sind (Benouchan et al., 2006; Methe und Edelman, 2006; Behling-Kelly und Czuprynski, 2007).

Insgesamt liegen zu *E. bovis* und anderen protozoären Parasiten zur Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen und nachfolgender Leukozyten-Adhäsion nur wenige Untersuchungen vor. So wurde im Fall der *T. gondii*-Infektion *in vitro* eine vermehrte Expression von ICAM-1 z. B. in Epithelzellen der Retina, Fibroblasten und Endothelzellen des Gehirns und Mikroglia beschrieben (Deckert-Schlüter et al., 1994, 1999; Nagineni et al., 2000). Auch VCAM-1 wurde im vermehrten Maße in Gehirngefäßen infizierter Mäuse nachgewiesen (Deckert-Schlüter et al., 1994). Mit Ausnahme eines Berichts über erhöhte Konzentrationen löslichen ICAMs oder E-Selektins in Sera *T. gondii*-infizierter Menschen (el-Shazly et al., 2001) ist ansonsten *in vivo* nichts bekannt über die Induktion von Adhäsionsmolekülen. Bezüglich *N. caninum*- oder *E. bovis*-Infektionen liegen zu diesem Thema keine Daten vor.

Auch die Chemo- oder Zytokinsynthese infizierter Endothelzellen wurde bisher wenig untersucht. *T. gondii*-Tachyzoiten führten in nicht-endothelialen Zellen wie HeLa-Zellen oder Fibroblasten zu einer vermehrten Bildung von IL-8, MCP-1 und GRO- $\alpha$  (Denney et al., 1999; Brenier-Pinchart et al., 2000); die Produktion von IP-10 wurde als kritischer Faktor bei der Ausbildung einer spezifischen Immunantwort in einem *T. gondii*-Mausmodell (Khan et al., 2000) beschrieben. Im Falle eines anderen Kokzids, *Cryptosporidium parvum*, reagierten befallene Kolon-Epithelzellen mit einer vermehrten Produktion von IL-8 und GRO- $\alpha$  (Laurent et al., 1997). Weitere Befunde bei Infektionen mit intrazellulär lebenden Protozoen beziehen sich auf *Trypanosoma cruzi* (siehe z. B. Aliberti et al., 1999; Lima et al., 1997), Leishmanien (siehe z. B. Moll, 1997) oder Plasmodien (siehe z. B. Burgmann et al., 1995) und weisen generell auf eine wichtige Rolle der Chemokine bei der Abwehr gegen diese Erreger hin.



### **2.3.1 Modulation der Apoptosefähigkeit der Wirtszelle durch intrazelläre Parasiten**

Mit dem langen Zeitraum, den der Parasit zum Abschluss der 1. Merogonie benötigt, unterscheidet sich *E. bovis* von den meisten anderen *Eimeria*-Arten, deren Entwicklung erheblich rascher abläuft. Diese lange Persistenz setzt eine erfolgreiche Evasionsstrategie des Parasiten voraus, die mehrere Ebenen betreffen muss. So muss gewährleistet sein, dass die befallene Endothelzelle als Wirtszelle diesen Zeitraum überhaupt überlebt, sie darf also nicht apoptotisch werden. Die Apoptose wird als programmierter Zelltod vornehmlich über drei Hauptwege initiiert: (i) über die Bindung von Granzym/Perforin aus CD8<sup>+</sup>-T-, CD4<sup>+</sup>-T- und NK-Zellen, (ii) über die Bindung sog. Tod-Liganden an ihre spezifischen Zelloberflächenrezeptoren wie Fas/APO-1 oder TNF-Rezeptor I und (iii) über einen "internen" Weg, der die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol der Zelle voraussetzt (Heussler et al., 2001).

Weitere Stimuli sind z. B. Zellstress und das Fehlen oder der Entzug von Wachstumsfaktoren. In allen Fällen werden letztlich Effektor-Caspasen als zentrale Komponenten der Apoptose-Maschinerie aktiviert. Ist die Apoptose über einen der Wege initiiert, muss dies nicht unweigerlich im programmierten Zelltod münden, sondern der Prozess kann auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade unterbrochen werden. So können z. B. Hitzeschockproteine (HSPs) (Hisaeda et al., 1997) und Vertreter aus einer Reihe von Molekülfamilien, wie z. B. der Bcl-2-Familie und den IAPs (inhibitor of apoptosis protein) hemmend einwirken. Die meisten dieser Proteine unterliegen der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (zusammenfassend bei Heussler et al., 2001; Lüder et al., 2001, Lüder und Gross, 2005).

Parasiten modulieren die Apoptose zu ihren Gunsten grundsätzlich auf zwei Arten: Einerseits steigern sie die Apoptose von Zellen des Immunsystems, wie für eine Reihe von protozoären Erregern und bei Helminthen nachgewiesen, um somit Immunreaktionen zu unterdrücken

(Lüder et al., 2001). Andererseits beeinträchtigen intrazelluläre Parasiten (*T. gondii*, *C. parvum*, Plasmodien, *Theileria parva*, Leishmanien, *T. cruzi*) wie auch verschiedene Viren und Bakterien die Apoptosefähigkeit ihrer Wirtszelle im Sinne einer Hemmung (Moore und Matlashewski 1994; Goebel et al., 1999; Chen et al., 2001; Küenzi et al., 2003; Van de Sand et al., 2005). In der Mehrzahl der bei Parasiten untersuchten Fälle geschah dies über gesteigerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung oder HSP65-Expression (Zusammenfassungen bei Heussler et al., 2001; Lüder et al., 2001). Bei den mit *E. bovis* nahe verwandten Hühner-Eimerien (*E. tenella* und *E. necatrix*) kam es *in vivo* ebenfalls im Zuge einer Apoptose-Inhibition zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B-Expression, die besonders deutlich zu Beginn der zweiten Merogonie zu beobachten war (Del Cacho et al., 2004). Gegen Ende der zweiten Merogonie wurde dagegen keine Apoptose-Inhibition mehr beobachtet. Dies führte zur Hypothese einer stadien/entwicklungsspezifischen Modulation der Apoptose. Demnach könnte die apoptosebedingte Lyse der Wirtszelle gegen Ende der *Eimeria*-Merogonie den Vorteil der Freisetzung der darin enthaltenden Merozoiten haben (Del Cacho et al., 2004).

Ein weiterer Aspekt der Modulation apoptotischer Vorgänge nach Infektionen mit Apikomplexa ergibt sich aus einer Untersuchung von Nishikawa et al. (2001) zu *N. caninum*. Während der Parasit selbst die Expression von Bcl-2, also eines anti-apoptotischen Proteins, induzierte und somit die Apoptose hemmte, kam es unter Einfluss von IFN $\gamma$  bei infizierten Zellen dagegen zur gesteigerten Apoptose über eine geminderte Bcl-2-Expression sowie zu einer erhöhten FasL-Expression. Im Falle der *N. caninum*-Infektion wurde damit deutlich, dass das Immunsystem des Wirtes über die lymphozytenvermittelte Zytokinproduktion einer bereits eingeleitete Hemmung der Apoptose entgegen steuern kann (Nishikawa et al., 2001).

## **2.4 Allgemeine MHC-vermittelte Antigenpräsentation und Modulation der MHC-Expression durch intrazelluläre Parasiten als Ausdruck einer möglichen Evasionsstrategie**

Während Antikörper antigene Determinanten in ihrer nativen dreidimensionalen Form binden, müssen Antigene für die Erkennung durch T-Lymphozyten ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) prozessiert werden. Dies leisten antigen-präsentierende Zellen (APC), wie z. B. Makrophagen und dendritische Zellen (DC). Die Produkte der Antigenprozessierung, kurze Peptide von 8-10 Aminosäuren, werden den T-Zellen dann im Komplex mit spezialisierten, zelleigenen Oberflächenmolekülen präsentiert, welche allgemein als MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) bezeichnet werden. Im Folgenden wird auf MHC-I-Moleküle, welche auf allen Zellen des Körpers exprimiert werden, sowie auf MHC-II-Moleküle, die hauptsächlich von professionellen APCs präsentiert werden, eingegangen.

Sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Die Wege der Antigenprozessierung und Peptidbindung an MHC-I- und MHC-II-Molekülen unterscheiden sich jedoch sehr.

Zusammen mit MHC-I-Moleküle werden hauptsächlich Peptidepitope von Proteinen präsentiert, welche im Zytosol der Zellen synthetisiert werden, wie z. B. Fremdproteine von Erregern, aber auch zelleigene Proteine. Einige dieser Proteine werden noch im Zytoplasma von Proteosomen in Peptide zerlegt. Die Peptide werden unter Verbrauch von ATP durch Transportmoleküle, wie z. B. das TAP (transporter associated with antigen processing), in das endoplasmatische Reticulum (ER) verlagert und dort auf neu synthetisierte MHC-I-Moleküle geladen. Durch die Peptidbindung werden die kurzlebigen Komplexe aus MHC-I- $\alpha$ -Kette und  $\beta$ 2-Mikroglobulin stabilisiert und können über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert werden. Da  $CD8^+$ -T-Zellen ihre antigenen Peptide in Verbindung mit MHC-I-Molekülen erkennen, sind diese Zellen besonders befähigt zur Wahrnehmung und Bekämpfung von intrazellulären Parasiteninfektionen.

Die MHC-II-Moleküle entstehen zwar ebenfalls im ER, können dort aber nicht mit Peptiden beladen werden, da ihre Peptidbindungsfurche zunächst durch eine invariante Kette blockiert ist. Die invariante Kette sorgt auch dafür, dass die MHC-II-Moleküle in den Zellen einen anderen Weg einschlagen als die MHC-I-Komplexe. Sie gelangen in ein spezialisiertes, endosomales Kompartiment. In diesem Kompartiment treffen sie dann auf Peptidepitope, welche von Proteinantigenen im Extrazellulärraum stammen, aus dem sie von der APC aktiv aufgenommen wurden. Es herrscht eine saures Milieu in dem Proteasen aktiv sind, die aufgenommenen Antigene in Bruchstücke zerlegen. Auch die invarianten Ketten werden proteolytisch degradiert, bis nur noch kleine Peptide in der Furche übrig bleiben (class II-associated invariant chain peptide, CLIP). Diese können gegen ein antigenes Peptidepitop ausgetauscht werden, und danach werden die MHC-II/Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche verbracht. In Verbindung mit MHC-II werden also v. a. Epitope extrazellärer Antigene präsentiert. Das sind z. B. viele Viren, Bakterien und Parasiten (solange diese noch nicht eine Zelle infiziert haben) und körpereigene Serumproteine.

Da das Erkennen infizierter Zellen durch T-Zellen in Verbindung mit MHC-Molekülen abläuft, könnte ein negativer Einfluss der Parasiten auf die Synthese dieser Moleküle gleichfalls als eine effiziente Evasionsstrategie angesehen werden. Solche Effekte sind für eine Reihe viraler und intrazellulärer bakterieller Erreger, aber auch für intrazelluläre Parasiten wie *Leishmania* (De Souza et al., 1995), *Theileria* (Oliver and Williams, 1996) und *T. gondii* (Lüder et al., 1998) beschrieben. Der Einfluss kann post-translational durch Degradation der Proteine, wie für *L. amazonensis* (De Souza et al., 1995) beschrieben, oder auf transkriptioneller Ebene geschehen, wie für *T. gondii* nachgewiesen. Im letzteren Fall wurde die Ursache in der Unterbindung des Kerntransports von phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  gesehen wird (Lüder et al., 2001).

Für *E. bovis* sind bisher keine Untersuchungen zur Modulation von MHC-I- und MHC-II-Moleküle bekannt. In dieser Hinsicht ist jedoch bemerkenswert, dass auch Endothelzellen

MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren und über Antigenpräsentation T-Lymphozyten aktivieren können (Benouchan et al., 2006; Methe und Edelman, 2006). Eine der Konsequenzen der *E. bovis*-Makromerontenentwicklung in einer lymphatischen Endothelzelle *in vivo* könnte der negative Einfluss von *E. bovis* auf die MHC-Expression sein, was für den intrazellulären Parasiten wiederum zum Vorteil gereichen könnte im Sinne einer Immunevasion.

## **2.5 Zusammensetzung des Zytoskeletts der Wirtszelle und Beeinflussung über intrazelluläre Apikomplexa**

Grundsätzlich sind drei unterschiedliche Filamentarten im Zytoskelett der Wirtszelle zu finden: intermediäre Filamente, Mikrotubuli und Aktinfilamente. Die intermediären Filamente, wie z. B. Vimentin, geben der Zelle mechanische Stärke. Zusätzlich sind viele subzelluläre Organellen und Makromoleküle im Netzwerk der intermediären Filamente im Zytosol verankert (Steinert and Roop, 1988; Halonen et al., 1994). Mikrotubuli bestimmen dagegen u. a. die Position von Membran-umgebenen Organellen; sie sind direkt am intrazellulären Transport von Molekülen, aber auch an vielen Signaltransduktionswegen der Zelle beteiligt (Kreis, 1990; Downing and Nogales, 1998ab; Morrissette et al., 2004). Die Aktinfilamente spielen bei der Morphologie der Zelloberfläche und der Zellstabilität, aber auch bei der Lokomotion der Zellen eine essentielle Rolle (Janmay, 1991). Zusätzlich gehören akzessorische Proteine, wie das Ankyrin, Band 4.1 oder Spektrin, die zur Verbindung von Zytoskelettfilamenten mit anderen Zellorganellen dienen (Bennett, 1985; Bennett und Gilligan, 1993; Begg et al., 2000) und die ebenfalls an der Bildung oder Aufrechterhaltung von spezialisierten Membrandomänen (Bennett, 1990) beteiligt sind, zum Gesamtkomplex des Zytoskeletts.

Die Makromeronten von *E. bovis* erreichen eine Größe von  $> 300 \mu\text{m}$ , was mit einer enormen Belastung für die parasitierte Zelle verbunden ist. Eine Zelle ist nur dann überlebensfähig, wenn sie physikalisch robust und intern adäquat strukturiert ist. Alle diese Voraussetzungen werden durch das Zystoskelett getragen und so ist anzunehmen, dass die *E. bovis*-Makromerontenbildung in der Zelle mit Veränderungen des Zytoskeletts verbunden ist, um die mechanische Stabilität und Struktur der Wirtszelle zu garantieren. Der mögliche Einfluss von *E. bovis*-Makromeronten auf das Zytoskeletts der Wirtszelle sollte daher näher untersucht werden. Kenntnisse zu diesen biologischen Vorgängen wären dann übertragend auch für andere, sich ähnlich entwickelnde *Eimeria*-Arten bei Wiederkäuern (*E. zuernii*, *E. aubernensis*, *E. ovinoidalis*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi*) dienlich.

Es liegen bisher nur wenige Studien vor, die sich mit der Modulation des Zytoskeletts der Wirtszelle bei apikomplexen Parasiten beschäftigen. So finden sich z. B. Arbeiten zu *T. gondii* und *C. parvum*, aber über die Gattung *Eimeria* fehlen jegliche Studien zu diesem Thema. In Falle von *T. gondii*-infizierten VERO-Zellen konnte eine starke Umstrukturierung und Ansammlung von Vimentin um die neugeformte PV beobachtet werden (Halonen et al., 1994). Bemerkenswerterweise war gegen Ende der *T. gondii*-Merogonie die Akkumulation von Vimentin hauptsächlich auf die PV konzentriert (Halonen et al., 1998). Weiterhin konnte für *T. gondii* gezeigt werden, dass die Mikrotubuli der Wirtszelle zur Ausbildung eines Transportsystems zur PV ausgenutzt wurden. Durch dieses tubuläre System können die Parasiten mit endolysosomalen Produkten versorgt werden (Coppens et al., 2006).

Die Modulation von Aktinfilamenten scheint im Falle von *T. gondii* unabhängig von einer Phosphorylierung zu sein (Morisaki et al., 1995), was im Gegensatz zu Befunden bei *C. parvum* steht, wo es zu einer Phosphorylierung bestimmter Proteine über Proteinkinasen kommt (Forney et al., 1999), die wiederum die Polymerisierung von Aktin vorantreiben. *T. gondii*-induzierte Veränderungen der intermediären Filamente-, aber auch des Mikrotubuli-

Systems, könnten zur Versorgung des Erregers mit Makromolekülen dienen, da über Interaktionen der beiden Systeme diese am intrazellulären Transport beteiligt sind (Kreitzer et al., 1999, Bonnet; 2001). Es wurde zudem spekuliert, dass die Ansammlung von Mikrotubuli um die PV bei *T. gondii* eine Art Barriere darstellt, die den Parasiten vor Abwehrmechanismen der Wirtszelle schützt, indem es die Fusion mit Phagolysosomen verhindert (Andrade et al., 2001).

Die *C. parvum*-vermittelte Beeinträchtigung des Aktinfilament-Systems der Wirtszelle durch Proteinkinasen resultiert in einer Zunahme und Reorganisation der Aktinfilamente an der basalen Seite der neuen PV-Membran (Forney et al., 1999). Dabei entsteht eine dicke, kompakte Aktinfilament-Schicht, welche zur Stabilisierung der entstehenden Meronten innerhalb der Zelle dient (Forney et al., 1999). Diese Befunde lassen sich auch auf molekularbiologischer Ebene bestätigen, da in *C. parvum*-infizierte Epithelzellen eine Hochregulation von diversen Genen beobachtet werden konnte, die bei der Aktin- und Mikrotubuli-Polymerisation eine entscheidende Rolle tragen (Deng et al., 2004).

Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderungen des Zytoskeletts im Verlauf der ersten Merogonie von *E. bovis* in zwei bovinen Endothelzelllinien (BUVEC, BSLEC) zu erfassen, insbesondere unter Berücksichtigung der Zytoskelettelemente Tubulin, Aktin, Spektrin und Vimentin.

## **2.6 Fortbewegung und „klassische“ Wirtszellinvasion bei Apicomplexa**

Vertreter der Apicomplexa besitzen eine Reihe von spezifischer, morphologischer Merkmale. So sind z. B. eine bananenförmige, gestreckte Form und das Vorhandensein charakteristischer Organellen am apikalen Pol (apikaler Komplex, daher der Name des Stammes) für die invasiven Stadien der Parasiten dieses Stammes typisch (Levine, 1970).

Apicomplexa verfügen nicht über Organellen, die der Fortbewegung dienen könnten, wie z. B. Zillien, Flagellen oder Lobopodien, sind aber trotzdem in der Lage, sich über Oberflächen zu bewegen. Diese Bewegung wird als „gliding motility“ bezeichnet (Soldati und Meissner, 2004). Bei dieser im ganzen Tierreich einzigartigen Fortbewegung spielen insbesondere die äußere Wandung der Parasiten und die im Apikalkomplex lokalisierten Mikronemen eine entscheidende Rolle. Die Sporozoiten und Merozoiten sind von einer äußeren Wand, der sog. Pellikula, umgeben, die eine komplexe Struktur aufweist. Die Pellikula besteht aus einer äußeren Membran, einem inneren Membrankomplex (IMC) und einer dazwischenliegenden osmiophoben Schicht (Roberts and Hammond, 1970). Als Teil der osmiophoben Schicht wurden bisher eine Vielzahl von Proteinen beschrieben, die vermutlich sowohl für die „gliding motility“ als auch für die aktive Invasion von Nöten sind (Soldati und Meissner, 2004). Zum IMC zählt ein Myosin A-Proteinkomplex, welcher mit dem in der äußeren Membran verankerten Aktin (Bergman et al., 2003; Soldati und Meissner, 2004). Bei der „gliding motility“ findet über eine kurzfristige Polymerisierung des Aktins mittels des Aktin-Myosin-Motors und nachfolgender Verbindung mit zusätzlichen Proteinen, v. a. Mikronemen-Proteinen, eine Bewegung der Parasiten statt. Die „gliding motility“ bei Apicomplexa ist die Voraussetzung für die später folgende Zellinvasion (Carruthers und Sibley, 1997; Tomley und Soldati, 2001).

Es wird vermutet, dass die Protrusion des am apikalen Ende der invasiven Stadien lokalisierten Konoids eine mechanische Rolle bei der Penetration von Wirtszellen spielt (Chobatar und Scholtyseck, 1982; Dubremetz, 1993; Mondragon und Frixione, 1996). Die apikomplexen Parasiten infizieren typischerweise eine Wirtszelle unter Bildung und Internalisierung einer PV, die den intrazellulären Erreger vollständig umgibt. Beim Eindringen der Parasiten in die Wirtszellplasmamembran, werden proteolytische Enzyme freigesetzt, u. a. aus den Rhoptrien (Perkins, 1992; Dubremetz, 1993), Mikronemen und Dichten Granula, deren Sekretion im Verlauf des Invasionsvorganges zeitlich abgestimmt ist



(Carruthers und Sibley, 1997). Die Mikronemenproteine werden unmittelbar vor und während der Invasion der Wirtszelle sezerniert (Tomley und Soldati, 2001). Die Sezernierung erfolgt über das vorgestreckte Konoid, vermutlich über die Fusion einzelner Mikronemen-Vesikel mit der äußeren Membran (Carruthers und Sibley, 1999). Nach der Sekretion werden Mikronemenproteine auf der Pellikulaoberfläche mit Hilfe eines pellikulären Aktin-Myosin-Motors vom apikalen Pol in Richtung Hinterende des Parasiten verbracht. Man vermutet, dass durch die Verlagerung von adhäsiven Mikronemenprotein-Komplexen vom apikalen zum distalen Pol letztendlich die Vorwärtsbewegung des Parasiten stattfindet (Carruthers und Sibley, 1999; Bumstead und Tomley, 2000).

Rhoptrienkomponenten werden zeitlich erst nach der Reorientierung des Parasiten mit dem apikalen Pol zur Wirtszellmembran und während des Eindringens sezerniert (Suss-Toby et al., 1996). Dabei scheinen Rhoptrienproteine nicht nur eine Lyse der Wirtszellmembran zu induzieren, sondern zudem an der Bildung der PV beteiligt zu sein (Sam-Yellowe, 1996). Die aus den Rhoptrien sezernierten Proteine spielen hier insbesondere eine Rolle in der Umformung der Wirtszellmembran zur eigentlichen PV-Membran (Mordue et al., 1999a). Die Eigenschaften dieser Hybridmembran sollen unter anderem eine Fusion der PV mit Lysosomen der befallenen Wirtszelle verhindern (Joiner, 1991; Mordue et al., 1999b; Lingelbach, 2001). Wirtszelloberflächenrezeptoren wie FcR, MHC-I und MHC-II werden während der Bildung der PV-Membran entfernt. Ferner fehlen der PV-Membran lysosomale Kompartimentsmarker und Fusionsproteine (z. B. rab5, rab7, NSF), so dass insgesamt die Rekrutierung und Fusionierung mit Lysosomen verhindert wird (Mordue und Sibley, 1997, Mordue et al., 1999a).

Im Unterschied zu Mikronemen und Rhoptrien wird der Inhalt der Dichten Granula nicht über den apikalen Bereich des Parasiten, sondern durch Exozytose (Daszak et al., 1993; Dubremetz et al., 1998) freigesetzt. Diese Freisetzung der Proteine in die PV erfolgt nach der Invasion des Parasiten in die Wirtszelle (Leriche und Dubremetz, 1990). Unter den Proteinen

der Dichten Granula befinden sich Nukleosid-Triphosphat-Hydrolasen (Sibley et al., 1994); Proteaseinhibitoren (Morris et al., 2002) und sog. „Dichte Granula-spezifische Proteine“ (GRA) (Cesbron-Deluw, 1989; Carey et al., 2000; Adjogble et al., 2004), deren Funktion nicht vollständig geklärt ist. Einige Dichte Granula-Proteine (z. B. GRA3, GRA5) werden in die PV-Membran integriert, andere (z. B. GRA1, GRA2) sind zwischen PV-Membran und Pellikula lokalisiert (Lecordier et al., 1993). Wiederum andere GRA-Proteine scheinen eine Funktion bei der aktiven Zellinvasion der Parasiten zu haben, da unter Verwendung von gegen GRA-Proteine von *T. gondii* gerichtete monoklonaler Antikörper die Invasion von Tachyzoiten in Wirtszellen *in vitro* und *in vivo* beeinträchtigt werden konnte (Cha et al., 2001).

### 2.6.1 „Alternativer“ Invasions- und Egressmechanismus bei Apicomplexa

Die im Dünndarm freigesetzten *E. bovis*-Sporozoitien müssen Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren der Ileumzotten infizieren, um dort Makromeronten zu bilden. Bisher ist noch unklar, wie *E. bovis*-Sporozoitien diese Wirtszellen erreichen. Wenn Sporozoitien auf direktem Weg zu den Lymphkapillaren wandern, müssen sie zunächst durch die luminal gerichtete Ileum-Epithelzellschicht migrieren. Wenn man sich den komplexen Invasionsprozess bei Apicomplexa vor Augen führt, u. a. die Sezernierung diverser Proteine und Bildung einer PV, erscheint es wahrscheinlich, dass die Transmigration durch die Epithelzellschicht über andere Wege, wie z. B. über eine parazelluläre Route zustande kommen könnte. Beobachtungen in der *in vitro*-Kultur von *Eimeria* spp. zeigen immer wieder rasche Invasions- und Egress-Versuche von Sporozoitien, wobei die dabei durchwanderten Wirtszellen nicht stark geschädigt werden (Fayer and Hammond, 1967; Danforth et al., 1984; Danforth et al., 1992; Chobatar et al., 1993). In diesem Zusammenhang sind intrazelluläre *Eimeria*-Sporozoitien, die ohne PV-Membran im Zytosol der Zelle liegen, bereits mehrfach

beschrieben worden (Long und Speer, 1977; Danforth et al., 1984; Danforth et al., 1992; Chobatar et al., 1993).

Kalzium-Ionen scheinen bei der Invasion und beim Egress der Apicomplexa eine besondere Rolle zu spielen (zusammenfassend bei Arrizabalaga und Boothroyd, 2004). So kann durch Erhöhung des intrazellulären Kalziums über Kalziumionophore der Egress von *T. gondii*-Tachyzoiten aus infizierten Zellen induziert werden (Endo et al., 1982; Stommel et al., 1997). Auch in *Sarcocystis neurona*-infizierten Zellkulturen konnte ein synchronisierter Merozoiten-Egress über die Zugabe eines Kalziumionophors erzielt werden. Ebenso wurde über Mikroinjektion der Wirtszelle der Egress von *T. gondii*-Tachyzoiten provoziert (Schwab et al., 1994). Dieser Egress scheint, zumindest in *T. gondii*-infizierten Humanfibroblasten, über eine erhöhte Permeabilität der Wirtszellmembran zustande zu kommen (Moudy et al. 2001). Letztere Autoren vermuten jedoch, dass die Permeabilitätsveränderung eher von einer intrazellulären Kalium- als von einer Kalzium-Zunahme abhängig ist.

Die biologische Bedeutung des Parasiten-Egresses bereits kurz nach der Invasion könnte darin liegen, dass der intrazelluläre Erreger auf diesem Weg in der Lage wäre eine subvitale oder anderweitig ungeeignete Zelle sofort wieder zu verlassen. Invasions- und Egress-Mechanismen sind sehr raschablaufende Prozesse (< 60 Sekunden) und könnten eine essentielle Strategie für das Überleben der Parasiten im Wirt darstellen, der sich auf diese Weise dem Immunsystem des Wirtes rasch entziehen kann. Insbesondere für Sporozoitendürften diese Mechanismen eine entscheidende Rolle spielen, da sie als erste Stadien mit Immunreaktionen des Wirtes konfrontiert werden und ihre erfolgreiche Replikation in der Wirtszelle die nächste Parasitengeneration absichern muss.

Infizierte Zellen können sich zudem selbst aktiv gegen eindringende Pathogene wie Eimerien über nicht-adaptative, intrazelluläre Mechanismen wehren, so z. B. über die Expression von Defensinen (Alcala et al., 2007). Über einen raschen Egress hätte der Sporozoit die

Möglichkeit, sich einem solch adversen Milieu zu entziehen. Beobachtungen zu raschen Invasions- und Egress-Versuchen von Sporozoiten wurden auch bei *P. berghei*- und *P. yoelii*-Infektionen *in vitro* gemacht (Mota und Rodriguez 2000, Mota et al., 2001; Nichols und Rodriguez, 2001). Diese Autoren postulieren einen „alternativen“ Invasionsmechanismus, der lediglich eine kurze Verletzung der Zelle, nicht jedoch die Bildung einer PV beinhaltet (Mota und Rodriguez, 2000, 2001; Mota et al., 2001). Die Verletzung der Wirtszellmembran durch den Sporozoiten bleibt dabei weitestgehend ohne Konsequenzen für die Wirtszelle (Mota et al., 2001) und Zellen werden schnell innerhalb von 1-2 Sekunden (*P. yoelii*) durchwandert. Diese Fähigkeit, Zellen zu durchwandern, könnte den Sporozoiten erlauben, physikalische Barrieren zu durchbrechen um an ihre Zielzelle zu gelangen. So müssen *Plasmodium*-Sporozoiten kurz nach dem *Anopheles*-Stich zunächst rasch in Blutgefäße eindringen, um von dort in die Leber zu gelangen, wo sie wiederum das Endothelium durchbrechen müssen um anschließend Hepatozyten zu infizieren, die die eigentlichen Wirtszellen dieser Parasitenstadien darstellen.

Eine weitere Bedeutung des „alternativen“ Invasionsmechanismus von Sporozoiten könnte in der Immunevasion liegen. Mota und Rodriguez (2001) zeigten, dass im Zytosol einer bereits von *P. yoelii*-Sporozoiten durchwanderten Zelle Parasitenantigene nachweisbar waren. Sollte diese Zellen über zytotoxische T-Zellen eliminiert werden, obwohl sie keine Sporozoiten mehr enthalten, könnten über diese Ablenkung der Immunzellen die tatsächlichen Entwicklung der Meronten in anderen Wirtszellen gesichert werden. Die detaillierten Mechanismen der Wanderung, Invasion und Egress von *E. bovis*-Sporozoiten sind weitestgehend unbekannt und sollen in dieser Arbeit ebenfalls näher untersucht werden.

## 2.7 Sporozoiten- und Merozoiten I-Antigene von *Eimeria bovis*

*E. bovis* exprimiert art-, stamm- und stadienspezifische Antigene, von denen anzunehmen ist, dass sie sowohl in unterschiedlicher Weise an der Induktion einer Immunantwort beteiligt sind als auch im Rahmen von Evasionsstrategien zum Tragen kommen.

Sowohl Sporozoiten als auch Merozoiten I verfügen über zahlreiche Proteine im Bereich von 15 bis 215 kDa (Reduker und Speer, 1986b); spezifisch für Merozoiten I sind Proteine von 15, 17, 39, 152 und 180 kDa; spezifisch für Sporozoiten sind Proteine von 12, 45 und drei Proteine von > 125 kDa. Zusätzlich sind in Sporozoiten drei sehr intensiv anfärbbare Proteinbanden von 20, 28 und 32 kDa nachweisbar, die nicht oder nur sehr schwach bei Merozoiten I auftreten. Im Immunoblot mit Immunsereen experimentell *E. bovis*-infizierter Kälber reagierten zahlreiche Merozoitenantigene im Bereich von 18 bis 215 kDa, wobei eine sehr intensive Immunmarkierung von 152- und 182-kDa-Merozoitenantigenen sowie von verschiedenen Sporozoitenantigenen von 28 bis 152 kDa zu beobachten waren. Neben stadienspezifischen Antigenen konnten vier Antigene mit Molekulargewichten von 58, 70, 83 und 98 kDa nachgewiesen werden, die sowohl bei Sporozoiten als auch bei Merozoiten I auftraten (Reduker und Speer, 1986). Bei der radioaktiven Markierung von Oberflächenproteinen wurden nur wenige Proteine an der Oberfläche der Parasitenstadien identifiziert: bei Merozoiten I waren es mehrere Proteine im Bereich von 15 bis 18 kDa, bei Sporozoiten wurden drei Oberflächenproteine von 28, 77 und 183 kDa nachgewiesen. Bei weiteren Untersuchungen zur radioaktiven Markierung von Oberflächenproteinen von Merozoiten I wurde zusätzlich ein Protein von 71-72 kD identifiziert (Robertson et al., 1988).

Aus *E. bovis*-Merozoiten I wurde ein Homolog zu dem bereits vielfach in eukaryotischen Zellen beschriebenen HSP90 nachgewiesen (Clark et al., 1996). Abgeleitet von Ergebnissen für HSP90 bei *P. falciparum* zogen Clark et al. (1996) in Betracht, dass das HSP90 von *E. bovis* an der Bildung der PV beteiligt sein könnte.

Ein Oberflächenprotein von 20 kDa (P20) wurde bei *E. bovis*-Sporozoiten beschrieben (Whitmire et al., 1988). Die Autoren vermuten, dass P20 in Rhoptrien und Mikronemen synthetisiert und anschließend zum apikalen Bereich transportiert wird, von wo aus nach Sekretion die Einlagerung ins Plasmalemma stattfindet. P20 wird offensichtlich nur während der beginnenden Merogonie in die PV abgegeben (Whitmire et al., 1988; Speer und Whitmire, 1989).

Abrahamsen et al. (1994b) beschrieben zwei weitere Antigene von 23 und 28 kDa, die Bestandteile der refraktilen Körperchen von *E. bovis*-Sporozoiten sind. Diese Antigene werden im Verlauf der ersten Merogonie sowohl in die PV integriert als auch in das Zytoplasma der Wirtszelle abgegeben (Abrahamsen et al., 1994b).

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen beschrieben Heise et al. (1999a) kohlenhydrathaltige Antigene bei Merozoiten I, darunter Antigene von > 200, 180, 135, 110, 83, 67 kDa und im Bereich von 80-77. Glykosilierte Antigene befinden sich auf der Oberfläche, in den Rhoptrien sowie in den Mikronemen von *E. bovis*-Merozoiten I. Heise et al. (1999b) beobachteten zudem auf der Oberfläche von Merozoiten I, Sporozoiten sowie in den Merozoiten-Rhoptrien phosphorylcholinhaltige (PC) Epitope. Weiterhin konnten PC-Epitope in *in vitro*-Kulturen direkt nach der Invasion der Wirtszelle kappenförmig am posterioren Pol der Sporozoiten nachgewiesen werden. Weitere Antigene von Merozoiten I, Moleküle mit einer Masse von 135 und 200 kDa aus Amylopektingranula, reagierten mit monoklonalem Antikörpern gegen *E. bovis*-Merozoiten I. Auch hier waren PC-Epitope zu vermuten, denn nach einer Behandlung der Merozoiten I mit Phospholipase C wurden diese Antigene nicht mehr erkannt (Heise et al., 1999c).

Ein relativ neu beschriebenes Antigen von Eimerien des Rindes, welches eine hohe Homologie mit dem *E. acervulina*-3-1E-Antigen beim Huhn aufweist, verfügt über interessante Eigenschaften: Es wurde sowohl als potenter Stimulator für die IL-12-Produktion im Darm sowie als Suppressor von Darmtumoren beschrieben (Rosenberg et al, 2005).

Unter Verwendung von cDNA-Banken aus Merozoiten I konnte eine ungewöhnliche Serin/Threonin-Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne (EbCDPK I) identifiziert werden (Dyachenko, 2006). Nach der Sequenzanalyse ließen sich mehrere funktionelle Domänen ermitteln: eine katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne und eine Calmodulin-homologe Domäne mit 4 Calmodulinbindungsstellen. Weiterhin weist die EbCDPK I eine hohe Homologie zu anderen CDPKs im Stamm der Apicomplexa auf. Fluoreszenzstudien zeigten, dass EbCDPK I sowohl in Sporozoiten als auch in Merozoiten I vorwiegend im apikalen Bereich lokalisiert war. Nach PAGA-Fixierung wurde EbCDPK I dagegen in beiden Stadien auf der Parasitenoberfläche nachgewiesen (Dyachenko, 2006).

### **2.7.1 Parasitenspezifische Antigene auf der Oberfläche Apicomplexa-infizierter Wirtszellen**

Das Auftreten parasitenspezifischer Komponenten auf der Oberfläche infizierter Zellen ist ein bekanntes Phänomen, das bei verschiedenen Vertretern der Apicomplexa wie z. B. bei *Plasmodium*, *Babesia* oder *Theileria* bereits beschrieben wurde. Zu *E. bovis* wurden zu diesem Thema bisher keine Untersuchungen durchgeführt.

Schon 1979 konnten Schmidt-Ullrich et al. zwei *P. falciparum*-Glykoproteine von 65 und 90 kDa auf der Oberfläche eines infizierten Erythrozyten darstellen. Immunisierungen von Primaten mit dem *P. falciparum*-65 kDa-Protein bewirkten eine kreuzreaktive Protektion gegen *P. knowlesi*-Infektionen. Ein anderes, *P. knowlesi*-spezifisches Oberflächenprotein von Erythrozyten, das sog. 74 kDa-Antigen, wurde von Schmidt-Ullrich et al. (1983) aufgereinigt und für Immunisierungsstudien erfolgreich verwendet. Es induzierte eine protektive Immunität gegenüber einer ansonsten tödlich verlaufenden *P. knowlesi*-Infektion bei empfänglichen Affen.

Auch bei *P. yoelii* konnte ein 230 kDa-Antigen auf der Oberfläche Meronten-tragender Erythrozyten nachgewiesen werden (Holder und Freemann, 1981). Mit diesem Protein immunisierte Mäuse waren vor einer *P. yoelii*-Primärinfektion geschützt. Resultate von David et al. (1984) zeigten, dass dieses Antigen einen Hauptbestandteil der Erythrozytenoberfläche darstellt und in erster Linie bei unreifen Merontenstadien exprimiert wird. In der Spätphase der Merontenreifung von *P. yoelii* wird dieses Protein dann in verschiedene Polypeptide (75, 57, 50 und 43 kDa) zerlegt (David et al., 1984).

Die Anwesenheit von parasiten-spezifischen Antigenen auf der Oberfläche Meronten-tragender Erythrozyten konnte für *P. falciparum* gleichermaßen gezeigt werden (Perrin und Dayal, 1982). Die Autoren konnten mindestens drei Oberflächenantigenen von > 200, 82 und 41 kDa eine schützende Funktion zuordnen. Zwei dieser Antigene (200 und 82 kDa) werden besonders stark gegen Ende der Merogonie exprimiert. Ein anderes, stadienspezifisches Antigen von *P. falciparum*, RESA/PF 155, das auf der Erythrozytenmembran nachgewiesen werden kann, ist in Studien von Brown et al. (1985) als ein Produkt der Ringformen und Merontenstadien näher charakterisiert worden. Die Autoren spekulieren über eine rasche Synthese von RESA-Antigenen während der Merogonie, die dann auf die Erythrozytenmembran gelangen. Das RESA/Pf 155-Antigen wurde in Dichten Granula von *P. falciparum*-Merozoiten nachgewiesen (Aikawa et al., 1990). Nach Foley et al. (1990, 1991) kann das RESA/Pf 155-Antigen durch die Verwendung von Detergentien wie Triton X-100 nicht aus der Erythrozytenmembran gelöst werden. Die Autoren vermuten daher eine starke Bindung des Antigens an das Spektrin des Zytoskeletts der infizierten Erythrozyten und spekulieren, dass sich so die Überlebenszeit der Erythrozyten in der peripheren Blutzirkulation verlängern könnte. Immunisierung mit RESA/Pf 155-Antigen führte bei Kindern in Papua-Neuguinea zu einer signifikanten Reduktion der Parasitämie (Genton and Corredan, 2002).



Howard et al. (1983) beschrieben zwei Proteine von 200 und 350 kDa auf der Oberfläche von *P. knowlesi*-infizierten Erythrozyten und bezeichneten diese als SICA-(schizont-infected cell agglutination) Proteine. Das dazu homologe Protein von *P. falciparum* ist PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein) (Leech et al., 1984). Beide Antigene sind nur schwer löslich mit nicht-ionischen Detergentien, so dass für die Extraktion der Proteine aus der Erythrozytenmembran SDS benötigt wurde (Aley et al., 1984). Das PfEMP1 gehört zu einer hochvariablen Proteinfamilie, den *Var*-Proteinen, für die 50-150 Gene einer Multigenfamilie kodieren (Su et al., 1995) und die in den Ringstadien aufeinanderfolgend synthetisiert werden (Scherf et al., 1998). PfEMP1 findet sich in Vorwölbungen der Erythrozytenmembran, den sog. „knobs“, die durch Zusammenlagerung mit einem anderen Parasitenprotein, dem „knob-associated histidine rich protein“ (KAHRP), entstehen (Crabb et al., 1997). Durch seine adhäsiven Eigenschaften zum Endothel ist PfEMP1 sowohl wichtig im Rahmen der Immunevasionsstrategie der Plasmodien (vgl. Carig und Scherf, 2001) als auch in der Malaria-Pathogenese (Magowan et al., 1988). Das PfEMP1 bindet an das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Roberts et al., 1992) und ist somit an der Sequestration von parasitierten Erythrozyten in peripheren Blutgefäßen beteiligt (Howard und Gilladoga, 1989). Chen et al. (2002) konnten als PfEMP1-Liganden zusätzlich das Adhäsionsmolekül PECAM 1/CD31, das Blutgruppen A-Antigen, IgM und P-Selektin identifizieren. Rowe et al. (2002) zeigten zudem, dass andere *Var*-Gen-kodierte Proteine von *P. falciparum* bei der diaplazentaren Übertragung des Parasiten eine wichtige Rolle spielen, indem sie an das Chondroitinsulfat A in der Plazenta binden. Ein weiteres Antigen bei *P. falciparum*, das Phosphoprotein PfEMP2, ist zum größten Teil unlöslich in Triton X-100 und wird frühestens bei Ringformen bis zur Spätphase der Merogonie synthetisiert (Coppel et al., 1986; Howard et al., 1987). Inzwischen wurden mindestens sieben weitere Genfamilien identifiziert, die für Proteine auf der Erythrozytenmembran kodieren, allerdings konnte in den meisten Fällen bisher keine Funktion zugeordnet werden (Craig und Scherf, 2001).

Auch bei *Babesia bovis* treten auf der Membran infizierter Erythrozyten Parasitenantigene auf. Ähnlich den „knobs“ bei *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten befinden sie sich in Protuberantien auf der Erythrozytenoberfläche (Aikawa et al., 1985; Allred et al., 1993). Da ebenfalls eine klonale Variation der Oberflächenantigene bei *B. bovis*-infizierter Erythrozyten gezeigt werden konnte, wurde eine ähnliche Situation wie bei PfEMP1 vermutet (Allred et al., 1993). In weiteren Studien (Allred et al., 1994; O'Connor et al., 1997) wurden in diesem Zusammenhang zwei parasitäre Komponenten von 118 und 113 kDa auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Diese Proteine formen ein Heterodimer, welcher als VESA1 (variant erythrocyte surface antigen 1) bezeichnet wird (O'Connor et al., 1997) und von einer polymorphen Multigen-Familie kodiert wird (Allred et al., 2001). Zwar adhären *B. bovis*-infizierte Erythrozyten ähnlich wie *P. falciparum*-infizierte Erythrozyten an Endothelzellen unter Beteiligung von VESA1, jedoch sind die verantwortlichen Domänen des Proteins noch nicht identifiziert (O'Connor und Allred, 2000; Allred et al., 2000).

Andere Untersuchungen zu *Babesia*-Antigenen auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, machen deutlich, dass es sich um mehr als nur VESA-Antigene handeln dürfte. So konnten sieben verschiedene Proteine (38–240 kDa) auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten identifiziert werden. Interessanterweise findet sich bei *B. bigemina* mit RAP-1 (rhoptry-associated protein 1) auch ein Rhoprien-Antigen auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten (Videtto et al., 1995).

Studien über parasitäre Antigene auf der Oberfläche *Theileria*-infizierte Zellen betreffen beide Wirtszelltypen im Säugetier-Zwischenwirt, Lymphozyten und Erythrozyten. Drei parasitäre Antigene von 20, 58 und 99 kDa konnten auf der Oberfläche *T. annulata*-infizierter Lymphoblastoidzellen nachgewiesen werden (Schiels et al., 1989). In einer anderen Studie ließen sich auf *T. annulata*-infizierten, mononukleären Zellen verschiedene Antigene nachweisen, von denen eines ausschließlich bei virulenten *Theileria*-Stämmen zu beobachten war (Preston et al., 1998). Untersuchungen zu *Theileria*-infizierten Erythrozyten liegen von

*T. equi* (früher *Babesia equi*) beim Pferd vor. Knowles et al. (1997) beschrieben zwei 34 bzw. 30 kDa große, als EMA-1 (equi merozoite antigen 1) und EMA-2 bezeichnete Moleküle, die untereinander stark homolog waren. Wie auch in anderen Fällen konnten den Antigenen bisher keine Funktionen zugeordnet werden.

Im Bezug auf die Expression parasitenspezifischer Antigene *E. bovis*-infizierter Wirtszellen bzw. ihrer Oberfläche fehlen entsprechende Veröffentlichungen. In diesem Zusammenhang erscheint es von Interesse, dass sich auf der Oberfläche von *E. bovis*-Meronten-tragender Wirtszellen immunreaktives Material nachweisen lässt, das Antikörper aus immunen Kälbern bindet (Zahner und Hermosilla, pers. Mittlg.). In der vorliegenden Arbeit sollte daher dieses Oberflächenmaterial nicht nur dargestellt sondern auch näher charakterisiert werden.

### 3 METHODEN

#### 3.1 In den vorgelegten Veröffentlichungen verwendete Methoden

- Semiquantitative Realtime RT-PCR
- FACS-Analyse
- Konfokal- und Immunelektronenmikroskopie (Präembedding- und Postembedding-Methoden)
- Messung der Adhäsion von Immunzellen mittels der Parallelen Durchflusskammer
- Gewinnung und Kultivierung von Primärendothelzellen (BUVEC, BAEC, PUVEC, HUVEC, BSLEC) und bovinen Gastrointestinalzellen (BFGC, BCEC)
- Kultivierung von MDBK- und VERO-Zellen
- Gewinnung und Kultur boviner PMN
- Cell Wound-Assay
- Phagotest®- und Phagoburst®-Assay
- Tunel®-Assay
- Caspase-3-Assay (EnzCheck® Caspase 3)
- Annexin V-Assay (FITC-Apoptosis Detection Kit®)
- Cytochrome C-Assay (Zymed® Cytochrome C ELISA)
- Färbungen von Parasitenstadien mit CFSE-, Texas Red-, Toto-3-, und Hoechst 33342-Fluoreszenzfarbstoffen
- Exzystierung von *Eimeria bovis*-Oozysten und Gewinnung von Sporoziten
- *In vitro*-Kultur von *Eimeria bovis* zur Produktion von Merozoiten I und Herstellung von Merozoiten I-Antigen
- *In vitro*-Kultur von *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* zur Produktion von Tachyzoiten
- Indirekter Immunofluoreszenztest (IIFT)
- Charakterisierung parasitenspezifischer Antigene auf der Wirtszelloberfläche (Natriumchlorid-, Phospholipase C-, Proteinase K- CHAPS, Triton X 100-, Triton X 114-, Triton X 405-Behandlungen)
- Affinitätsreinigung von Rinderinfektionsseren an *Eimeria bovis*-Meronten I-tragenden BFGC
- SDS-PAGE- und Immunoblot-Analysen
- Immunisierung von Ratten mit *Eimeria bovis*-Merozoiten I

Weiterhin wurden folgende Methoden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

### 3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

#### Lösungen und Reagenzien:

- PBS für Elektronenmikroskopie (PBS-E, pH 7,4): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Aqua dest. ad 1000 ml
- 1,5 %iges Glutaraldehyd (Stammlösung 25 %, Serva) in HBBS (Hank's balanced salt solution; Gibco)
- 1 M Cacodylatpuffer (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 Aqua dest. aufgefüllt
- 1 % Osmiumtetroxid (Roth) in 0,166 M Cacodylatpuffer
- Alkoholreihe: 50, 70, 80, 96 und 100 % Ethanol

#### Durchführung

BUVEC wurden auf Glass-Coverslips (10 mm Durchmesser, Nunc) angezchtet und mit *E. bovis*-Sporozoitien infiziert. Nach 10, 15 und 30 min, 1 Tag, 3, 5, 8 und 15 Tagen wurden die infizierten BUVEC-Monolayer in PBS-E dreimal gewaschen und mit 1,5 %iger Glutaraldehydlösung in HBBS 1 h bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend dreimal mit HBBS gewaschen 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 einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert und einer „critical-point-Trocknung“ mit CO<sub>2</sub> unterzogen. Anschließend wurden die Präparate nach Standardverfahren mit Gold gespottet (siehe Dykstra, 1993) und mit einem Rasterelektronenmikroskop (Philips PSEM 500) untersucht.

### 3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

#### Lösungen und Reagenzien:

- PBS für Elektronenmikroskopie (PBS-E, pH 7,4): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Aqua dest. ad 1000 ml
- 1,5 %iges Glutaraldehyd (Stammlösung 25 %, Serva) in HBBS (Hank's balanced salt solution; Gibco)
- 1 M Cacodylatpuffer (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 Aqua dest. aufgefüllt
- 1 % Osmiumtetroxid (Roth) in 0,166 M Cacodylatpuffer
- 2 % Uranylacetat (Roth)
- Propylenoxid (Roth)
- Epon (Roth)
- Alkoholreihe: 30, 50, 70, 80, 90, 96, 100 % Ethanol

#### Durchführung

BFGC wurden in Zellkulturflaschen (Nunc, 25 cm<sup>2</sup>) angezchtet und mit *E. bovis*-Sporoziten infiziert. Einen Tag, 3, 5, 8 und 15 Tage p. i. wurden die infizierten BFGC-Monolayer in PBS-E dreimal gewaschen und mit 1,5 %iger Glutaraldehydlösung in HBBS 1 h bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Zellschabers (Nunc) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mitsamt der Fixierlösung in ein Zentrifugenröhrchen (Nunc) überführt. Nach Zentrifugation (400 x g, 10 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 0,1 M Cacodylatpuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde vor Einbettung 2 x in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend in 1 % Osmiumtetroxid in 0,166 M Cacodylatpuffer für 2 h nachfixiert. Nach drei weiteren Waschungen in Aqua dest. (jeweils 20 min bei 4 °C) wurden die fixierten Zellen in 2 % Uranylacetat inkubiert (10 min) und nach Standardverfahren in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert. Für die Einbettung wurde das Pellet zunächst in Propylenoxid (2 h), dann in Propylenoxid/Epon (1:2; 2 h) und anschließend in reines Epon (4 h) verbracht. Anschließend wurden die Proben in Epon (60 °C, 24 h) ausgehärtet. Von den Epon-eingebetteten Zellen wurden Ultradünnschnitte angefertigt

(Ultramikrotom, Reichert) und auf Nickelnetze verbracht. Solche Proben wurden mit Uranylacetat kontrastiert. Anschließend wurden die Präparate mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM912 AB) untersucht.

### **3.4 Relative Quantifizierung der MHC-I- und MHC-II-Gentranskription in *Eimeria bovis*-infizierten Wirtszellen mittels Realtime-PCR**

Zur Gewinnung der totalen RNA von *E. bovis*-infizierten und nicht infizierten BUVEC wurde die in **Veröffentlichung 5.3/5.4** bereits beschriebene Methode verwendet. Für die Quantifizierung wurden die in Tab. 1 beschriebenen Primer and Sonden für bovines MHC-I- und -II verwendet. Die Proben wurden wie in **Veröffentlichung 5.3/5.4** beschrieben markiert und die PCR-Amplifikation wurde in einem automatisierten Fluorometer (ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) unternommen. Die Amplifikationsbedingung und semi-quantitative Analysen der Proben entsprachen der in **Veröffentlichung 5.3/5.4** beschriebenen Methode.

**Tab. 1 Sequenzen der in der Realtime RT-PCR verwendeten Primer und Sonden zur Quantifizierung MHC-I- und MHC-II-spezifischen mRNAs**

Spezifität	Primer (5'-3') Sonden (5'-6-FAM-TAMRA-3')
<b>MHC-I forw</b>	CCA CCC TGA CCT GTG TTC TCT T
<b>MHC-I rev</b>	ATG GAG AGG GTC CAG CTC TGT
<b>MHC-I Sonde</b>	CCT CAT GCA CAC TCC TGT TCC AGC AG
<b>MHC-II forw</b>	CCT CAT GCA CAC TCC TGT TCC AGC AG
<b>MHC-II rev</b>	CAA ACC CAA GTG CTC CAC CTT
<b>MHC-II Sonde</b>	CCT GCC CAC AAC AGA GGA TGT CTA TGA CTG
<b>GAPDH forw</b>	GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A
<b>GAPDH rev</b>	TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC
<b>GAPDH Sonde</b>	CTG GCA TTG CCC TCA ACG ACC ACT T

### 3.5 Charakterisierung der bovinen Endothelzellen

Für bovine Endothelzellen fehlen die für eine genaue Charakterisierung benötigten, spezifischen Antikörper, wie sie z. B. im Maus- oder Humansystem verwendet werden. Aus diesem Grund wurden BUVEC-Isolate anhand der typischen „Pflasterstein“-Morphologie und über die endothelzellspezifische Aufnahme von Dil-Ac-LDL (dioctadecyltetramethyl-indocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein) (Knook et al., 1977; Voyta et al., 1984; Neubauer et al., 1996) näher charakterisiert.



### 3.5.1 *Dil-Ac-LDL-Aufnahme-Test*

Ziel des Dil-Ac-LDL-Testes ist die Identifikation von „low density lipoprotein“ (LDL) aufnehmenden Endothelzellen zur Differenzierung von anderen Zelltypen, die keine Fähigkeit zur LDL-Aufnahme aufweisen. Bei diesem Verfahren wird azetyliertes LDL verwendet (Voyta et al., 1984)

#### Lösungen und Reagenzien

- Endothelzellen, kultiviert auf Deckgläschen in 6-well-Platten (Greiner)
- Dil-Ac-LDL (Harbor Bio-Products), 1:20 in Medium verdünnt (=LDL-Medium; Endkonzentration 10 µg/ml)
- Zellkulturmedium (ECGM, PromoCell)
- 0,02 M PBS
- 2 % Paraformaldehyd-Lösung
- Eindeckmedium (Vectashield Hard + Set Mounting Medium mit DAPI, Vector Laboratories)

#### Durchführung:

Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz auf Deckgläschen kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in 1 ml LDL-haltigem Medium inkubiert (4 h, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Negativkontrollen erhielten 1 ml LDL-freies Medium. Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt (10 min, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurde der Zellrasen 2 x mit 0,02 M PBS gewaschen und in 2 % Paraformaldehyd (10 min, RT) fixiert. Die Zellen wurden nochmals 3 x mit PBS gewaschen, die Deckgläschen entnommen, mit dem Zellrasen nach unten auf einem mit einem Tropfen Eindeckmedium versehenen Objektträger gelegt und zum Aushärten bei 4 °C über Nacht gelagert. Die Proben wurden dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### 3.6 Darstellung von Zytokeratin und der Zonula Occludens-1 in BUVEC- und BFGC-Zellen

#### Lösungen und Reagenzien:

- *Primärantikörper*
  - Polyklonale anti-bovines-Zytokeratin-Antikörper aus dem Kaninchen (Dako Cytomation)
  - Monoklonale anti-Zo-1 tight junction associated polypeptide-Antikörper aus der Maus (MAB1420, 1:50, Chemicon International)
- *Sekundärantikörper*
  - FITC-konjugierte anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus dem Esel, 1:200 (Chemicon International)
  - Cy3-konjugierte anti-Ratte IgG-Antikörper aus dem Esel, 1:300 (Chemicon International)
- 100 % Methanol (Merck)
- 0,02 M PBS
- 0,3 % Tween 20 (Sigma)
- Bovines Serum Albumin (BSA, Sigma)
- Eselserum (Chemicon International)
- Eindeckmedium (Vectashield Hard + Set Mounting Medium mit DAPI, Vector Laboratories)

#### Durchführung:

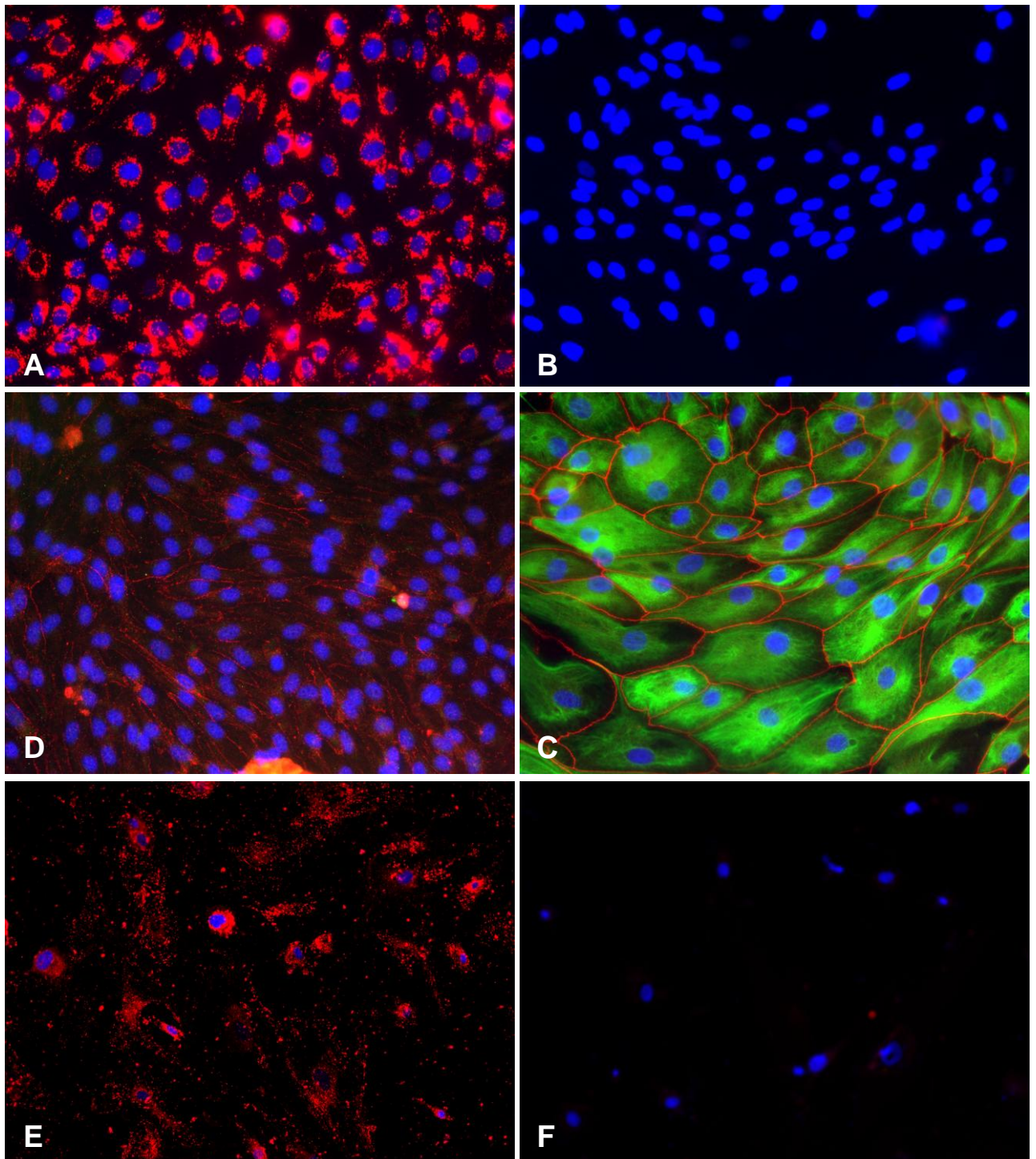
Die Zellen wurden in 6-well-Platten auf Deckgläschen angezüchtet und bei 90-100 % Konfluenz verwendet. Die Zellrasen wurden mit 100 % Methanol fixiert (10 min, -20°C) und bei RT für 30 min luftgetrocknet. Alle Waschschrte wurden mit 0,02 M PBS, supplementiert mit 0,3 % Tween 20, durchgeführt. Alle Antikörper und Sera wurden in PBS/0,3 % Tween 20/0,1 g/ml BSA im Verhältnis 2:1 verdünnt. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen (60 min, RT) in 1:10 verdünntem Eselserum erfolgte die Inkubation (60 min, RT) in den Primärantikörpern. Nach der Inkubation wurde der Zellrasen 3 x 10 min gewaschen und es folgte die zweite Inkubation (60 min, RT) in den Sekundärantikörpern. Zum Schluß wurden die Zellen 3 x 10 min gewaschen und die Deckgläschen aus den Näpfen entnommen. Zum Einbetten der Proben wurde Eindeckmedium mit DAPI verwendet und die Proben anschließend unter einem Olympus BX50-Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine Inkubation mit PBS anstatt mit Primärantikörpern diente als Negativkontrolle.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Charakterisierung primär isolierter Endothelzellen

Zur Charakterisierung insbesondere der primär isolierten Endothelzellen wurde der sog. „LDL-Test“ verwendet, der die Unterscheidung von Endothelzellen von anderen Zelltypen ermöglicht, da nur erstere aktiv azetyliertes LDL aufnehmen (Voyta et al., 1984). Wie erwartet, zeigten BUVEC eine aktive Aufnahme von azetyliertem LDL (Abb. 1A) im Gegensatz zu den Negativkontrollen (Abb. 1B). Zusätzlich wurde über Antikörper das Zonula Occludens 1-Protein nachgewiesen (Abb. 1C), welches nur in Endothel- und Epithelzellen (Abb. 1D) in den „tight junctions“ exprimiert wird. Auch konnte das Fehlen von Zytokeratin in BUVEC die endotheliale Herkunft bestätigen, da Endothelzellen grundsätzlich Zytokeratin-negativ sind. Als Positivkontrolle für Zytokeratin dienten bovine karunkuläre Epithelzellen (BCE), die freundlicherweise von P. Bridger (Institut für Anatomie, JLU Giessen) zur Verfügung gestellt wurden. Andere Antikörper-gestützte Verfahren, die üblicherweise zur Charakterisierung von humanen Endothelzellen eingesetzt werden und die den Nachweis von CD31 oder des von Willebrandt-Faktors 1 beinhalten, konnten leider im Rindersystem nicht verwendet werden.

Wie aus Abb. 2A ersichtlich, zeigten BUVEC eine deutliche Färbung fast aller Zellen nach Inkubation in azetyliertem LDL, was für eine homogene Endothelzellpopulation spricht. Interessanterweise liessen sich auch in BFGC-Kulturen, die ursprünglich aus dem Dünndarm von Kälberfoeten isoliert wurden, LDL-positive Zellen beobachten (Abb. 1E), was einen endothelialen Ursprung dieser Zellen vermuten lässt. Dies könnte zudem erklären, warum sich insbesondere BFGC für die Entwicklung der *E. bovis*-Meronten I gut eignen.



**Abb. 1. Charakterisierung von BUVEC- und BFGC-Zellen.** BUVEC (A, B) und BFGC (E, F) wurden für 4 h Dil-Ac-LDL im Medium zugesetzt und dessen Aufnahme fluoreszenzmikroskopisch erfasst (rot: LDL, blau: Kernfärbung mit DAPI). (D) BUVEC und bovine Karunkularzellen (BCE) (C) wurden mit Antikörpern gerichtet gegen Zytokeratin und Zonula Occludens 1 inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch erfasst (rot: Zonula Occludens 1, grün: Zytokeratin, blau: Kernfärbung DAPI). BCE dienten als Positivkontrolle für Zytokeratin und wurden freundlicherweise von P. Bridger überlassen. Vergrößerung: 400 x bei C; 200 x bei A, B, D-F

## 4.2 Entwicklung von *Eimeria bovis* Meronten I *in vitro*

Ein wichtiger Aspekt der hier vorgelegten Arbeit war, ein reproduzierbares *in vitro*-Kultursystem für *E. bovis* zu etablieren, um zellbiologische und immunologische Studien zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden sowohl bovine als auch nicht-bovine Zelllinien getestet (siehe **Veröffentlichung 5.1**).

Obwohl *E. bovis* als ein monoxener Parasit des Rindes gilt und Sporozoiten *in vivo* ausschließlich Endothelzellen der Lymphkapillaren der Ileum-Villi befallen, wurden alle verwendeten Zelltypen (BFGC, BSLEC, BUVEC, HUVEC, MDBK, PUVEC und VERO) erfolgreich infiziert. Alle Zellen wurden mit Ausnahme der MDBK-Zellen, sehr rasch (innerhalb von 20 min) von *E. bovis*-Sporozoiten invadiert. Diese außergewöhnliche Invasionsfähigkeit von Sporozoiten wurde bereits von anderen Autoren bestätigt (Fayer und Hammond, 1967; Hammond und Fayer, 1968). Die benötigte Zeit bis zur Invasion war nicht von der Herkunft der Zellen abhängig, da Sporozoiten HUVEC und PUVEC rascher infizierten als bovine MDBK. In MDBK-Kulturen erfolgte die Invasion der Sporozoiten wesentlich langsamer und erst nach 2 Stunden p. i. war die Mehrzahl der Sporozoiten intrazellulär zu finden (siehe **Veröffentlichung 5.1**). Es wird postuliert, dass die Invasions- und Penetrationsmechanismen von *Eimeria*-Sporozoiten von der Präsenz sog. „Ziel-Moleküle“ auf der Wirtszelloberfläche abhängig ist (Augustin, 2001). Diese Zielmoleküle sind bisher nicht bekannt, aber sie scheinen grundsätzlich so stark konserviert zu sein, dass die Invasion der Zelle - im Gegensatz zur nachfolgenden Weiterentwicklung - spezies-unabhängig ist.

Ebenfalls unabhängig vom Wirtszelltyp konnten Sporozoiten bis zu 48 Stunden p. i. bei wiederholten Invasions- und Egressversuchen beobachtet werden. In älteren Untersuchungen von Fayer und Hammond (1967) wurden bis 8 Tage p. i. spontane Egress-Versuche von *E. bovis*-Sporozoiten beschrieben. Der Egress von *E. bovis*-Sporozoiten konnte aber auch durch mechanische Irritation der Wirtszellmembran, wie z. B. bei „patch clamp“-

Experimenten, induziert werden (Behrendt et al., 2000). Beim spontanen Egress von Sporozoiten wurde interessanterweise kein erhöhter Anteil toter Wirtszellen beobachtet, anders als beim  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Egress von *T. gondii*-Tachyzoiten (Endo et al., 1982; Stommel et al., 1997).

In nicht-bovinen Zellen (HUVEC, PUVeC und VERO) erfolgte keine Weiterentwicklung von *E. bovis*, obwohl die Sporozoiten in PUVeC und HUVEC mindestens 16 Tage und in VERO > 21 Tage überleben konnten (siehe **Veröffentlichung 5.1**). Ein deutlicher Unterschied ließ sich zudem im Hinblick auf die Bildung der PV in den einzelnen Zelltypen feststellen. Die um die intrazellulären Sporozoiten gelegene PV war in allen Zelltypen, mit Ausnahme von VERO-Zellen, nur schwer erkennbar. Im Falle von VERO-Zellen dagegen war die PV bereits 2 Stunden nach der Invasion deutlich sichtbar und nahm innerhalb der nächsten 12 Stunden kontinuierlich an Größe zu, bis zu einem Durchmesser von ca. 20  $\mu\text{m}$ . Eine solche PV persistierte bis zu 3 Wochen nach der Infektion ohne mikroskopisch sichtbare Veränderungen. Bei Apicomplexa sind in erster Linie die Produkte von Rhoptrien, z. T. aber auch von Dichte Granula, an der Bildung der PV-Membran beteiligt (zusammenfassend bei Dubremetz et al., 1998, Entzeroth et al., 1998). So sollte die Bildung der ungewöhnlich großen PV um *E. bovis*-Sporozoiten in VERO-Zellen mit einer erhöhten Synthese und Exozytose von Produkten dieser spezifischen Organellen verbunden sein.

Primäre bovine Endothelzellen als *in vitro*-Systeme (BUVEC, BAEC, BSLEC) stehen mittlerweile zur Verfügung und können dosiert infiziert werden. Sie erlauben eine Entwicklung des Parasiten bis zum Abschluss der Merogonie unter Bildung von Makromeronten und Freisetzung von lebenden Merozoiten I (siehe **Veröffentlichungen 5.1; 5.2; 5.5 und 5.8**). Der zeitliche Ablauf der Entwicklung entspricht in etwa dem, der *in vivo* beobachtet wird. Die eingedrungenen Sporozoiten wechseln rasch ihre Form, werden breiter und runder (1-3 Tage p. i.) und verbleiben aber dann 5-7 Tage weitgehend unverändert. Die ungeschlechtliche Proliferation beginnt ab Tag 8-10 p. i. und führt zur Ausbildung reifer

Meronten I, die anschließend nach der Ruptur Merozoiten I in das Zellkulturmedium entlassen.

In bovinen Zellen allgemein (BFGC, BUVEC, BSLEC und MDBK) wurden jedoch deutliche Unterschiede in der Entwicklung von *E. bovis* beobachtet, insbesondere im Hinblick auf die Zeitspanne bis zur Reifung der Meronten I als auch hinsichtlich der erreichten Größe dieser Stadien. Mit der *in vivo*-Situation vergleichbare Makromeronten von > 240 µm Durchmesser wurden nur in Gastrointestinalzellen aus bovinen Feten (BFGC) beobachtet. In bovinen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (BUVEC) oder Milzlymphgefäßen (BSLEC) blieben sie mit durchschnittlich 90 µm deutlich kleiner. Die langsamste und größenmäßig schwächste Merontenentwicklung wurde in MDBK beobachtet (siehe **Veröffentlichung 5.1**).

Zu einer rasch ablaufenden Merogonie (innerhalb von 16 Tagen) und einer massiven Produktion von lebenden Merozoiten I kam es nur im BUVEC, BSLEC und BFGC (siehe **Veröffentlichung 5.1**). Lediglich in *E. bovis*-infizierten BFGC, die aus verschiedenen Zelltypen des fetalen Magendarmtraktes bestehen, wurde nach etwa 25-30 Tage p. i. die gesamte Entwicklung von Meronten I bis zu Oozysten durchlaufen. Allerdings war die Entwicklung *in vitro* ca. um 11 Tage verzögert im Vergleich zur *in vivo* Situation. Insgesamt waren die nachfolgenden Stadien Meronten II und Gamonten nur schwer zu identifizieren und es kam nur gelegentlich zur Bildung von einzelnen Oozysten (siehe **Veröffentlichung 5.1**). In dieser Hinsicht war das BFGC-System für eine Massenproduktion von *E. bovis*-Oozysten nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden zudem bovine Kolonepithelzellen (BCEC) als Wirtszelle für *E. bovis*-Merozoiten I getestet, um der *in vivo*-Situation näher zu kommen und eventuell die gesamte Entwicklung zu optimieren (siehe 4.4).

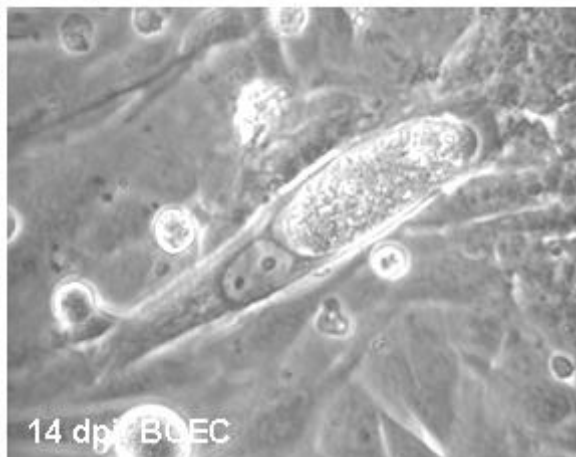
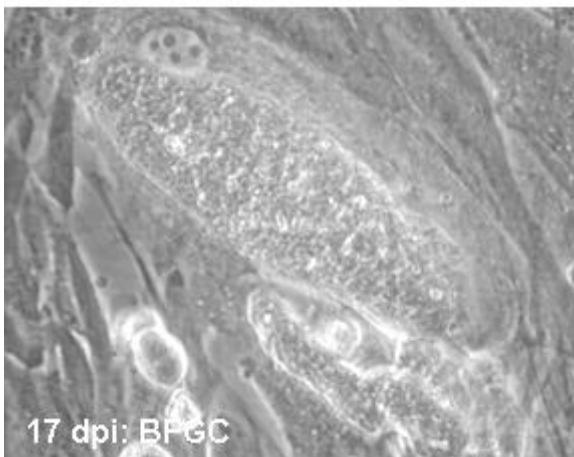
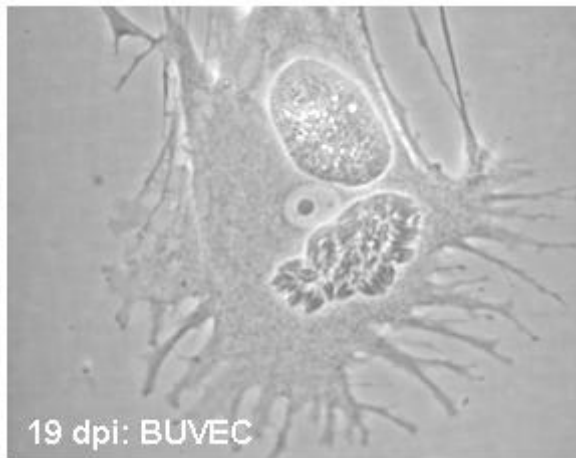
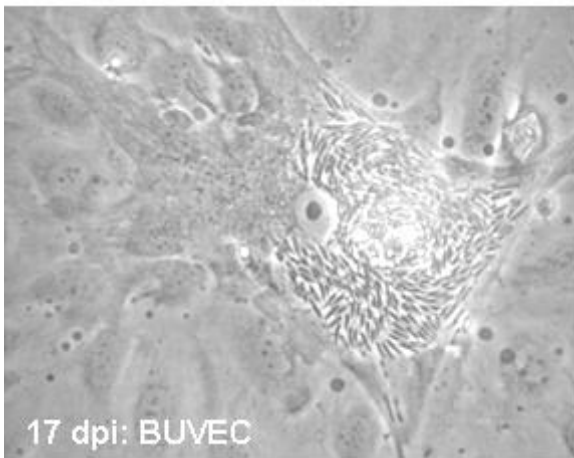
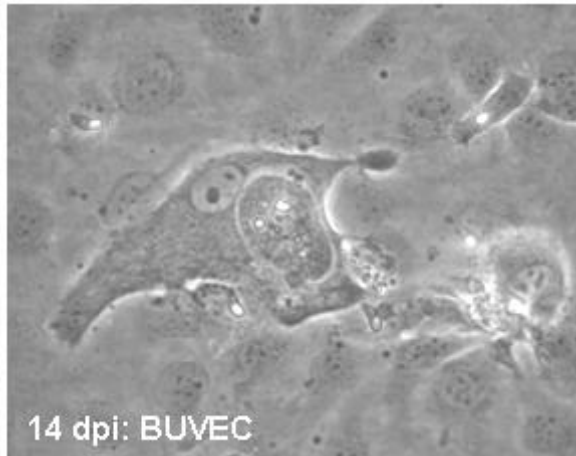
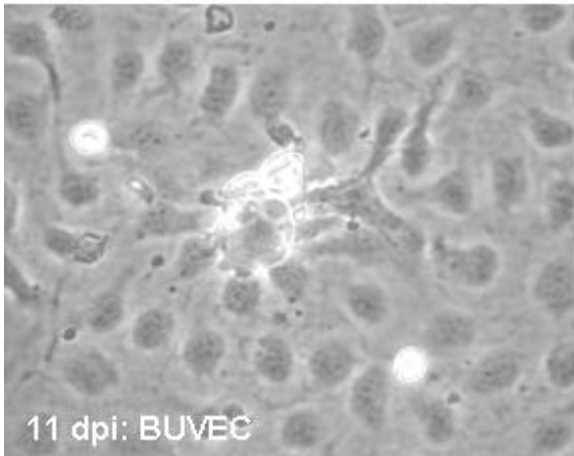
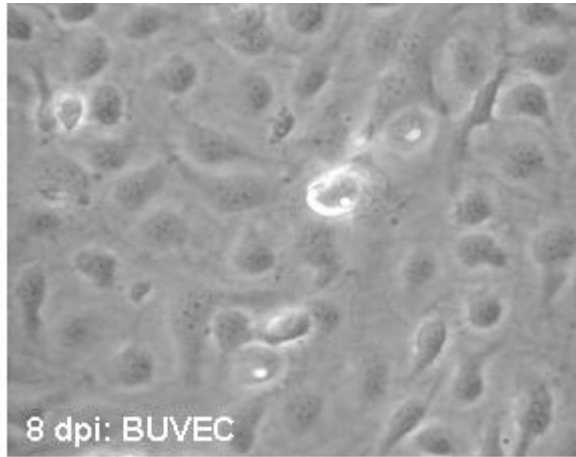
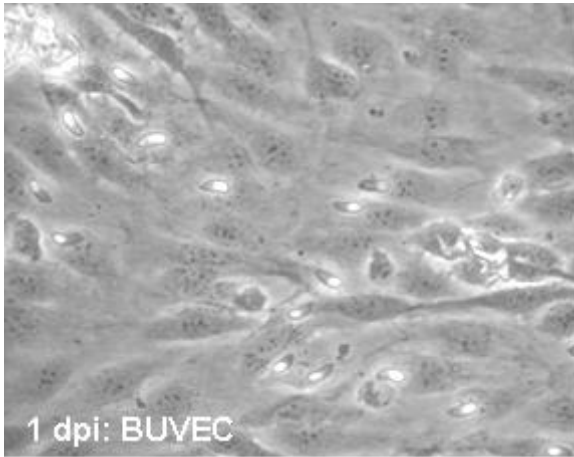
In allen *in vitro*-Kulturen von *E. bovis*, die die erste Merontenbildung zulassen, wurde im Bezug auf die Kernmorphologie der Wirtszelle, eine interessante Beobachtung gemacht. Ab dem 10.-11. Tag p. i. verändert der Zellkern lichtmikroskopisch sichtbar seinen Phänotyp. Aus einem eher aus hellen und dunklen Komponenten homogen gemusterten Typ entstand der

Phänotyp des „Spiegeleis“ mit dunklen, eher zentral gelegenen rundlichen Elementen (meist eins pro Zellkern, gelegentlich aber auch 2-4) und sie umgebenden sich hellgrau-homogen darstellenden Anteilen. Solche Kernveränderungen fanden sich sowohl in BUVEC als auch in BFGC und BCEC (siehe Abb. 2). Die Größe des Zellkerns blieb dabei – soweit lichtmikroskopisch erfassbar – unverändert. Die eher dunkel-kompakte Struktur des Zellkerns der befallenen Wirtszelle, kann als transkriptionsinaktives Heterochromatin gedeutet werden, dass sich in der Ultrastrukturanalyse häufig als dunkel-kompakte Masse darstellt. Die helleren Areale könnten dagegen als transkriptionsaktives Euchromatin im Zellkern verstanden werden. Da die veränderte Kernmorphologie mit zunehmender Proliferation des Merontens auf eine Verschiebung der Relationen zugunsten des Euchromatins schließen lässt, scheint ab diesem Zeitpunkt die Transkriptionsrate der betroffenen Wirtszelle erheblich gesteigert zu sein. Dies lässt vermuten, dass *E. bovis* dann die Kontrolle über die Wirtszelle übernommen hat und sich seiner Zellmaschinerie bedient. Die auffällige Nähe der intrazellulären *E. bovis*-Stadien zum Zellkern könnten ebenfalls als Hinweis in dieser Richtung gewertet werden. Auf diesem Weg könnte *E. bovis* für eine ausreichende *de novo* Proteinsynthese sorgen und somit die Bildung zehntausender Merozoiten garantieren. Zur Zeit werden weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchgeführt, die aber noch nicht abschließend sind. So sollten die oben gemachten Aussagen bisher nur als hypothetisch betrachtet werden.

**Abb. 2. Kernmorphologie infizierter Wirtszellen (BUVEC, BFGC, BCEC) im Verlauf einer Infektion mit *Eimeria bovis*-Sporozoiten (1 - 19 Tag p. i.).**

Verschiedene Zelltypen (BUVEC, BFGC und BCEC) wurden mit *Eimeria bovis*-Sporozoiten infiziert und ihre Morphologie an verschiedenen Tagen p. i. dokumentiert.





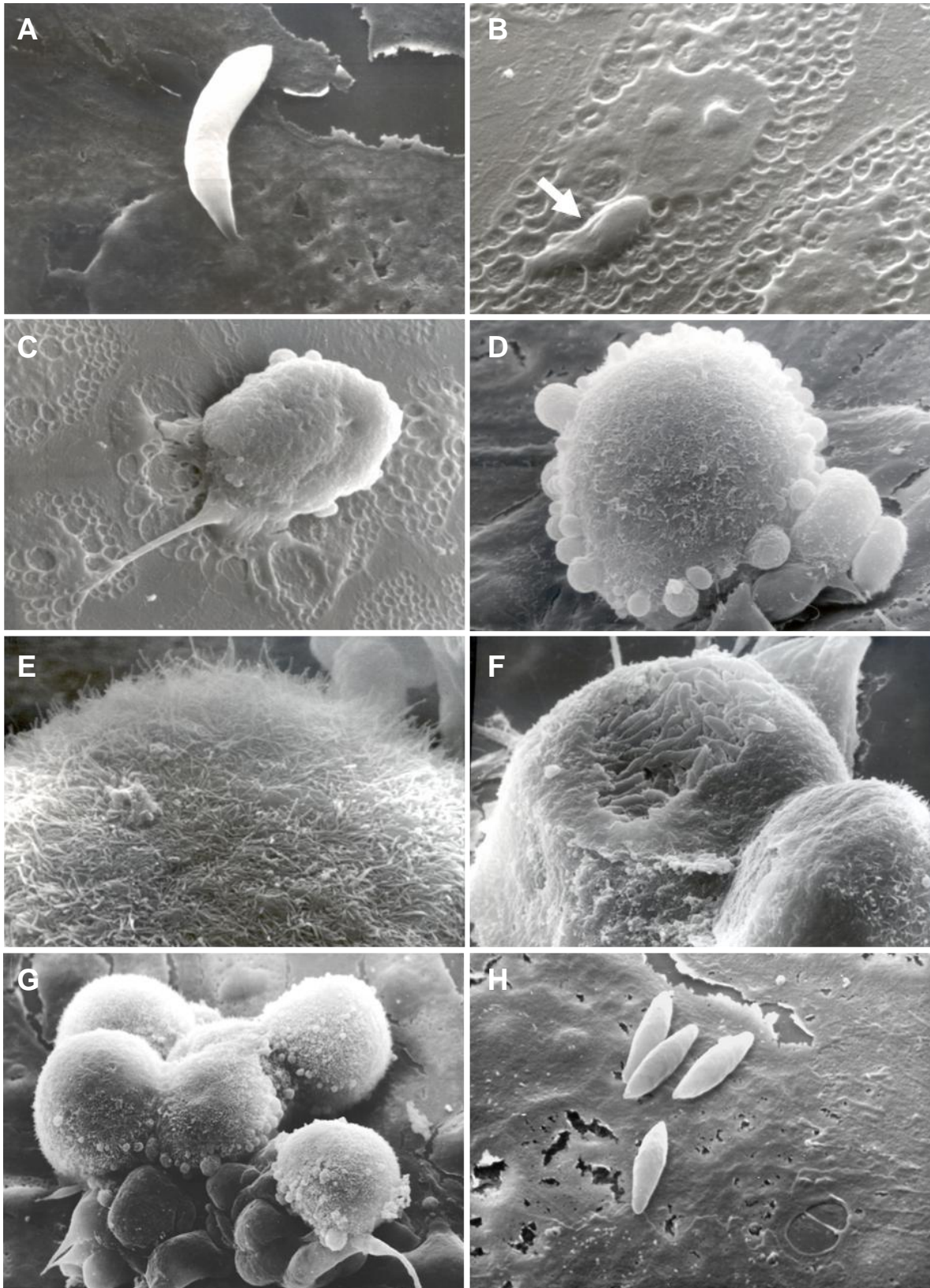
### 4.3 Ultrastruktur *Eimeria bovis*-infizierter Wirtszellen

#### 4.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung *Eimeria bovis*-infizierter Wirtszellen

Mittels rasterelektronenmikroskopischer Studien sollte die mit der Entwicklung von Meronten I einhergehende Vergrößerung der Wirtszelle und eine eventuelle Veränderung der Oberflächenstruktur der Zelle erfasst werden.

Die Invasion der Wirtszelle durch Sporozoiten erfolgt über den apikalen Pol des Parasiten. Die Abbildung 3A zeigt den engen Kontakt zwischen Sporozoiten-Pellikula und Wirtszellmembran (10 min p. i.), der entsteht, ehe der Sporozoit eindringt. Innerhalb infizierter Endothelzellen ist der intrazellulär gelegene Sporozoit über die Ausdehnung der Wirtszellmembran deutlich zu erkennen (Abb. 3B). Ab den 7. Tag p. i. kommt es mit beginnender Replikationsphase des Parasiten zu einer Umfangsvermehrung der infizierten Zelle, die nach 15 Tagen p. i. in einer Größe von 90 x 80 µm resultierte.

Das Erscheinungsbild der infizierten Endothelzellen im rasterelektronischen Bild war zu diesem Zeitpunkt nicht einheitlich. In vielen Fällen stellten sich die infizierten Zellen kugelförmig mit einer relativ glatt erscheinenden Oberfläche dar (Abb. 3C). Die Oberfläche wies z. T. blasenartige Auftreibungen und Einbeziehung auf (Abb. 3D, G). Zum Teil erschienen die Meronten I gekammert (Abb. 3G). Auffallend war bei einigen merontentragenden Zellen das Auftreten oberflächlicher villi- oder haarförmiger Strukturen mit geschätzten Längen von bis 2 – 3 µm (Abb. 3E). Wie in dem eröffneten Meronten I (Abb. 3F) zu erkennen, waren die Meronten I-haltigen Endothelzellen prall mit meist parallel liegenden Merozoiten I gefüllt. Freie Merozoiten zeigten die typische Morphologie der Apicomplexa (siehe Abb. 3H) und waren deutlich kleiner als Sporozoiten.



**Abb. 3. Rasterelektronische Darstellung *Eimeria bovis*-infizierter BUVEC:** (A) Sporozoit bei der Zellinvasion (10 min p. i., Vergr. 891 x); (B) Intrazellulärer Sporozoit (1 Tag p. i. Pfeil, Vergr. 891 x); (C) Meront-haltige Zelle mit glatter Oberfläche (15 Tage p. i., Vergr. 781 x); (D) Meront-haltige Zelle mit „knötchenförmiger“ Oberfläche und Villi (15 Tage p. i., Vergr. 908 x); (E) Ausschnitt aus „G“: villöse Oberfläche (Vergr. 1815 x); (F) Eröffneter Makromeront mit Merozoiten I (15 Tage p. i., Vergr. 462 x); (G) Makromeront-haltige Zelle mit mehreren Kammern (15 Tage p. i., Vergr. 781 x); (H) freie Merozoiten I (20 Tage p. i., Vergr. 903 x)

#### 4.3.2 Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung *Eimeria bovis*-infizierter Wirtszellen

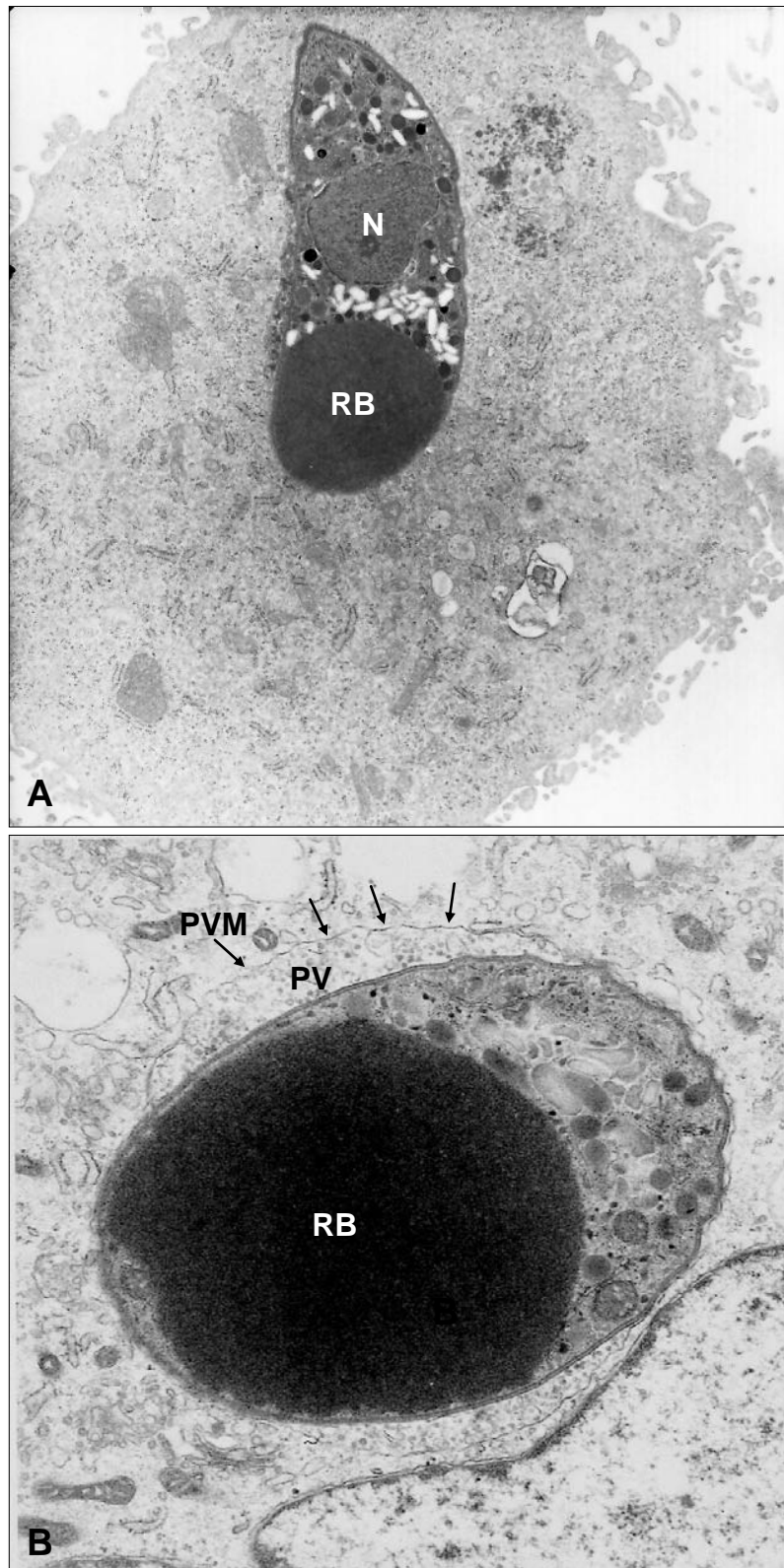
Eine Stunde p. i. lagen viele *E. bovis*-Sporozoitien intrazellulär. Diese intrazellulären Sporozoitien waren durch eine deutlich sichtbare elektronendichte Pellikula umgeben, eine PV konnte aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig angesprochen werden (Abb. 4A). Dagegen wurden Rhoptrien, Mikronemen, Dichte Granula und Amylopektin granula apikal des Kerns eindeutig dargestellt (Abb. 4A, C). Dichte Granula, Amylopektin granula und sogenannte Lipid- oder Protein-Vesikel wurden zudem distal des Kerns erfasst (siehe Abb. 4A, C). Das Konois als typische Organelle im apikalen Bereich der Apicomplexa war nur bei vereinzelten intrazellulären Sporozoitien deutlich zu erkennen (siehe Abb. 4C). Immer konnte dagegen das homogene, elektronendichte refraktile Körperchen der Sporozoitien dargestellt werden (Abb. 4A).

Auffällig war die frühe Ansammlung von Mitochondrien um intrazelluläre Sporozoitien (siehe Abb. 4A, B und C). Zudem wurde eine Anreicherung von ER (siehe Abb. 4A) in ähnlicher Lokalisation beobachtet. Drei Tage p. i. stellte sich die den Parasiten umgebende PV deutlich dar, zudem war die PV-Membran (PVM) gut zu erkennen (Abb. 4B). Zu diesem Zeitpunkt war der Raum zwischen der PVM und der Pellikula des Sporozoitien deutlich zu erkennen und beinhaltete einen granulierten Inhalt (siehe Abb. 4B). Weiterhin wurde eine Ansammlung von Mitochondrien, rauhem ER sowie Golgi Apparate um die PVM zu diesem Zeitpunkt beobachtet (Abb. 4b). Als prominentestes Organell des Sporozoitens stellte sich wiederum das refraktile Körperchen dar, welches elektronendicht, homogen und osmiophilisch erschien (Abb. 4A, B, C). Häufig war die Lokalisation der intrazellulären Sporozoitien wirtszellkernnah (Abb. 4A, B), wie bereits lichtmikroskopisch in infizierten BUVEC-Kulturen *in vitro* beobachtet.

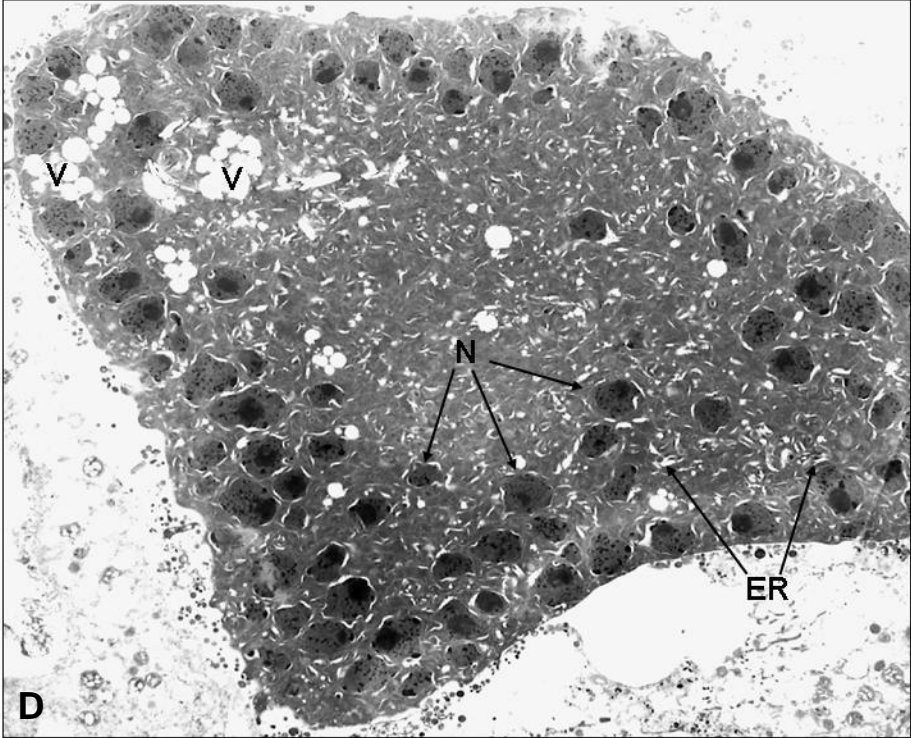
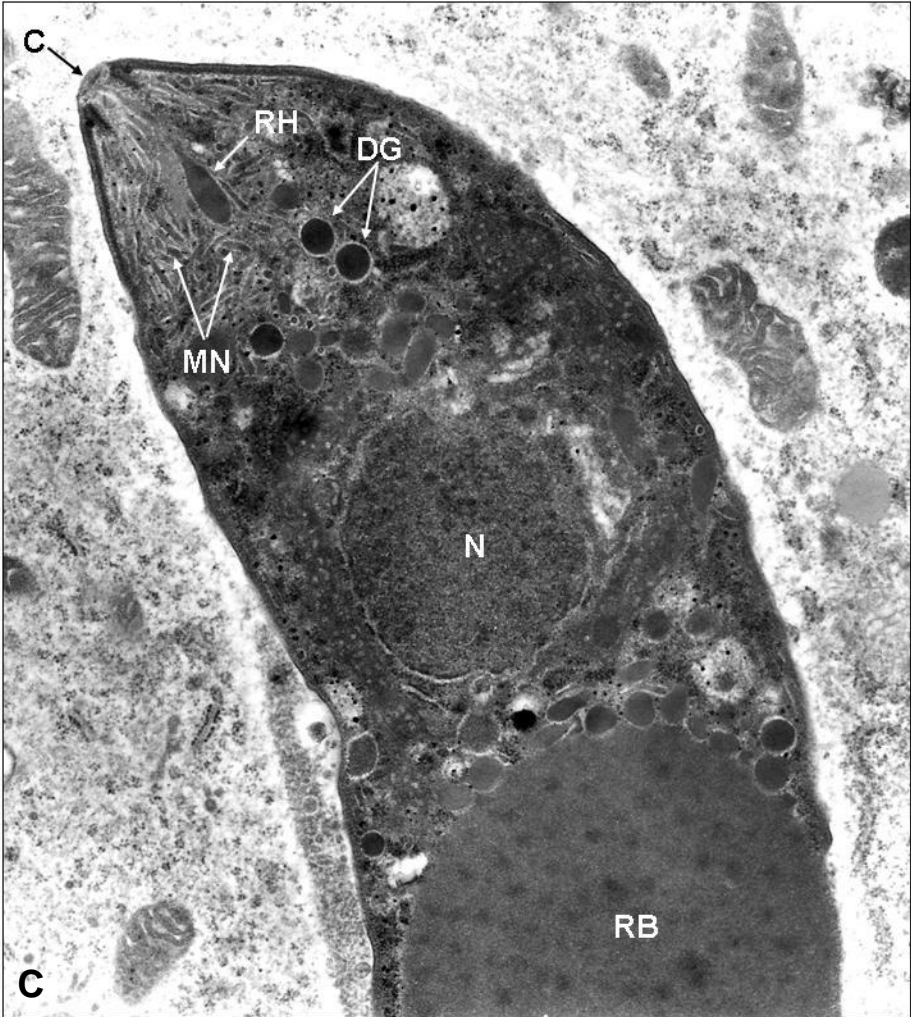
Weiterhin verdeutlichten die TEM-Aufnahmen die Vergrößerung der *E. bovis*-Makromeronten-tragenden Wirtszellen (BFGC) am 15. Tag p. i. (Abb. 4D). Viele dieser

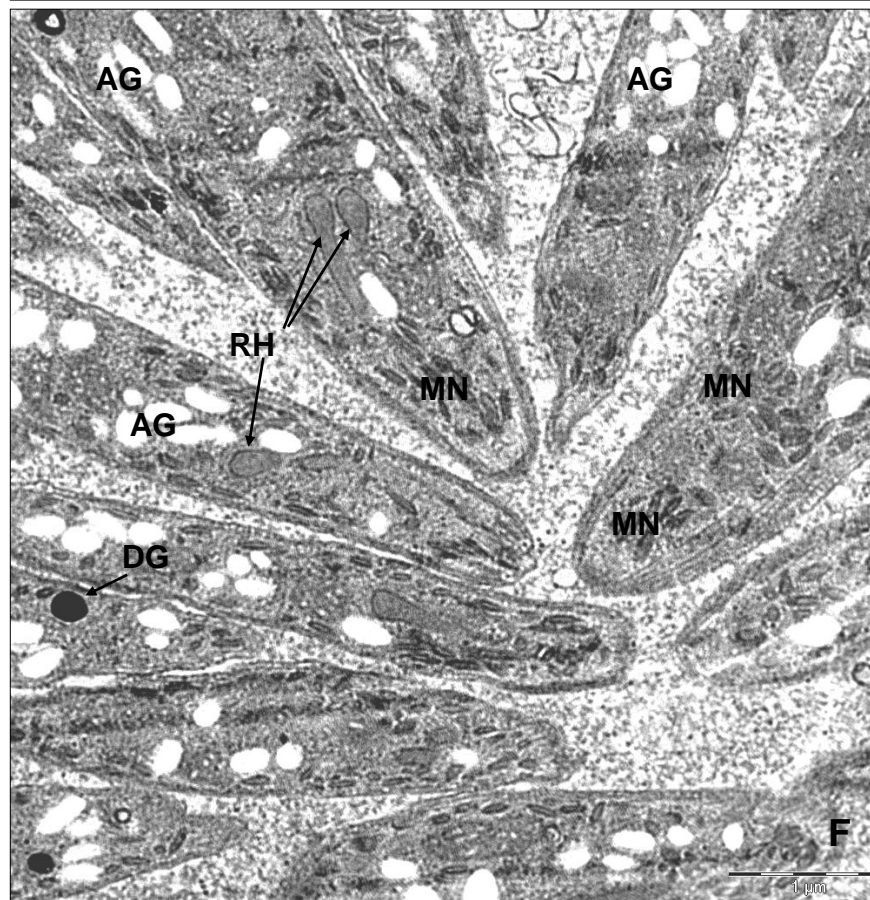
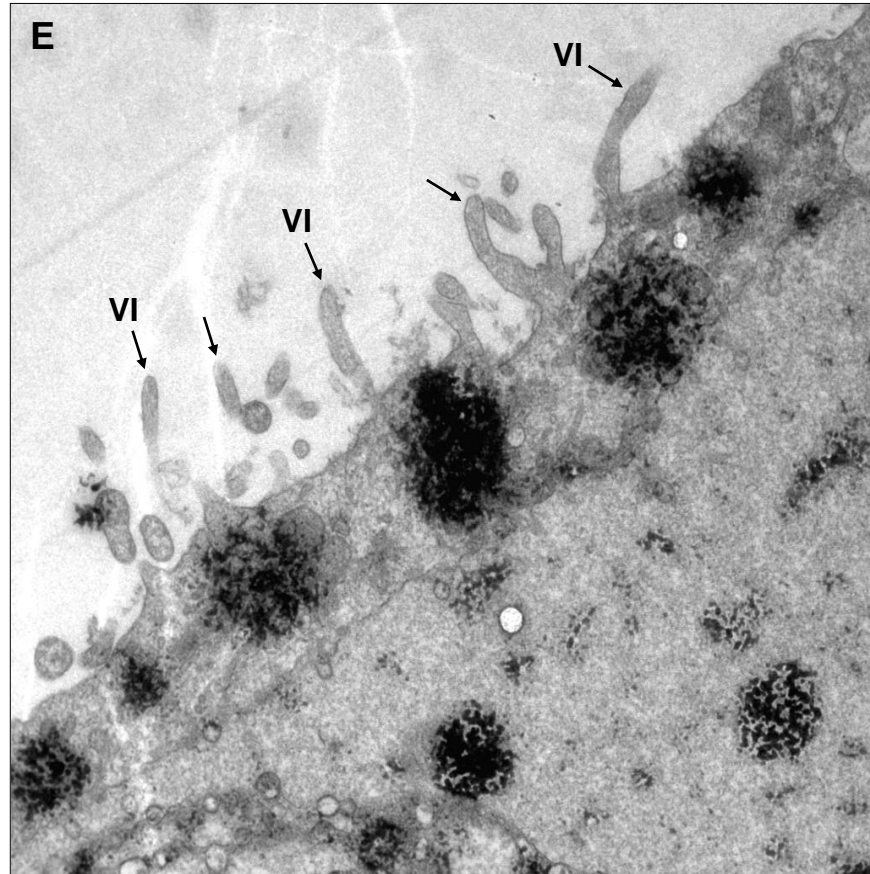
infizierten Zellen ließen im Zytoplasma Mitochondrien und ein gut entwickeltes ER erkennen (Abb. 4D). Zusätzlich wurden in Meronten I eine variierende Anzahl von Vesikeln beobachtet, die zum Teil sehr nahe am ER lokalisiert waren (Abb. 4D). Über die Funktion dieser Vesikel ist bisher bei Eimerien nichts bekannt. Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt konnte man viele Nuklei beobachten, die meist peripher im Meront lokalisiert waren und auf den Beginn der Zellkernteilung hinwiesen. In einzelnen Zellkernen der Meronten (15 Tag p. i.) ließ sich ein recht großer Nukleolus und viele osmiophile Areale erkennen (Abb. 4D). Im Gegensatz dazu, war bei anderen Zellkernen das Karyoplasma eher irregulär und mit osmophilem Material gefüllt. Im Zytosol der Meronten zeigten sich zudem viele vereinzelte Vesikel, aber auch Ansammlungen dieser Organellen (siehe Abb. 4D).

Die bereits unter 4.3.1 beschriebenen, variabel ausfallenden Veränderungen der Wirtszelloberfläche, konnten in TEM-Analysen bestätigt werden. Neben glatter Oberfläche waren auch filamentöse Oberflächenvergrößerungen und Mikrovilli zu erkennen (siehe Abb. 4E). Auffallend war bei mehreren solcher Meronten-tragenden Zellen das Auftreten von z. T. haarförmigen Strukturen mit geschätzten Längen von bis 2 - 3  $\mu\text{m}$ . Wie in Abb. 4E ersichtlich, waren reife Meronten-haltige Zellen mit streng gerichtet liegenden Merozoiten I gefüllt. Die Merozoiten I (20 Tag p. i.) waren deutlich schmaler und kleiner als Sporozoiten und zeigten ebenfalls die charakteristischen Strukturen invasiver Sporozoa-Stadien, wie Pellikula, Mikronemen, Rhoptrien, Dichte Granula und Amylopektin granula (Abb. 4F). Zudem konnte bei einzelnen Merozoiten I Teile des Konoids, Mitochondrien, Pellikula und subpelikulären Mikrotubuli beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt (20 Tag p. i.) war der Raum zwischen den einzelnen Merozoiten I innerhalb der Makromeronten mit einem granulierten Inhalt gefüllt (siehe Abb. 4F).



**Abb. 4 Transmissionselektronische Darstellung von *Eimeria bovis*-infizierten BFGC. (A)** intrazellulärer Sporozoit (1 h p. i.); **(B)** intrazellulärer Sporozoit (3 Tage p. i.): refraktiler Körperchen (RB), Membran der parasitophoren Vakuole (PVM, Pfeile) und parasitophore Vakuole (PV); **(C)** Apikalbereich eines intrazellulären Sporozoiten (3 Tage p. i.): Konoid (C), Rhoptrien (RH), Mikronemen (MN), Dichte Granula (DG), refraktiler Körperchen (RB) und Zellkern (N); **(D)** Meront I-haltige Wirtszelle (15 Tage p. i.): periphere Nuklei (N), endoplasmatisches Retikulum (ER), Vesikel (V); **(E)** villöse Oberfläche eines Meronten I (15 Tage p. i.): Villi (VI, Pfeile); **(F)** Merozoiten in einem reifen Meronten I (20 Tage p. i.): Mikronemen (MN), Rhoptrien (RH), Amylopektin granula (AG), Dichte Granula (DG)

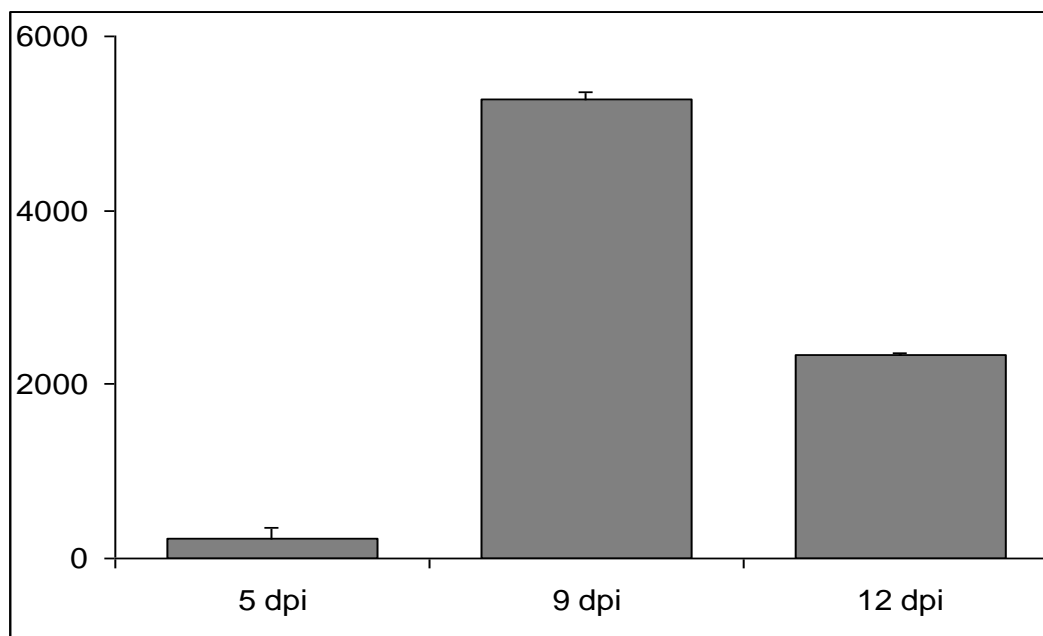






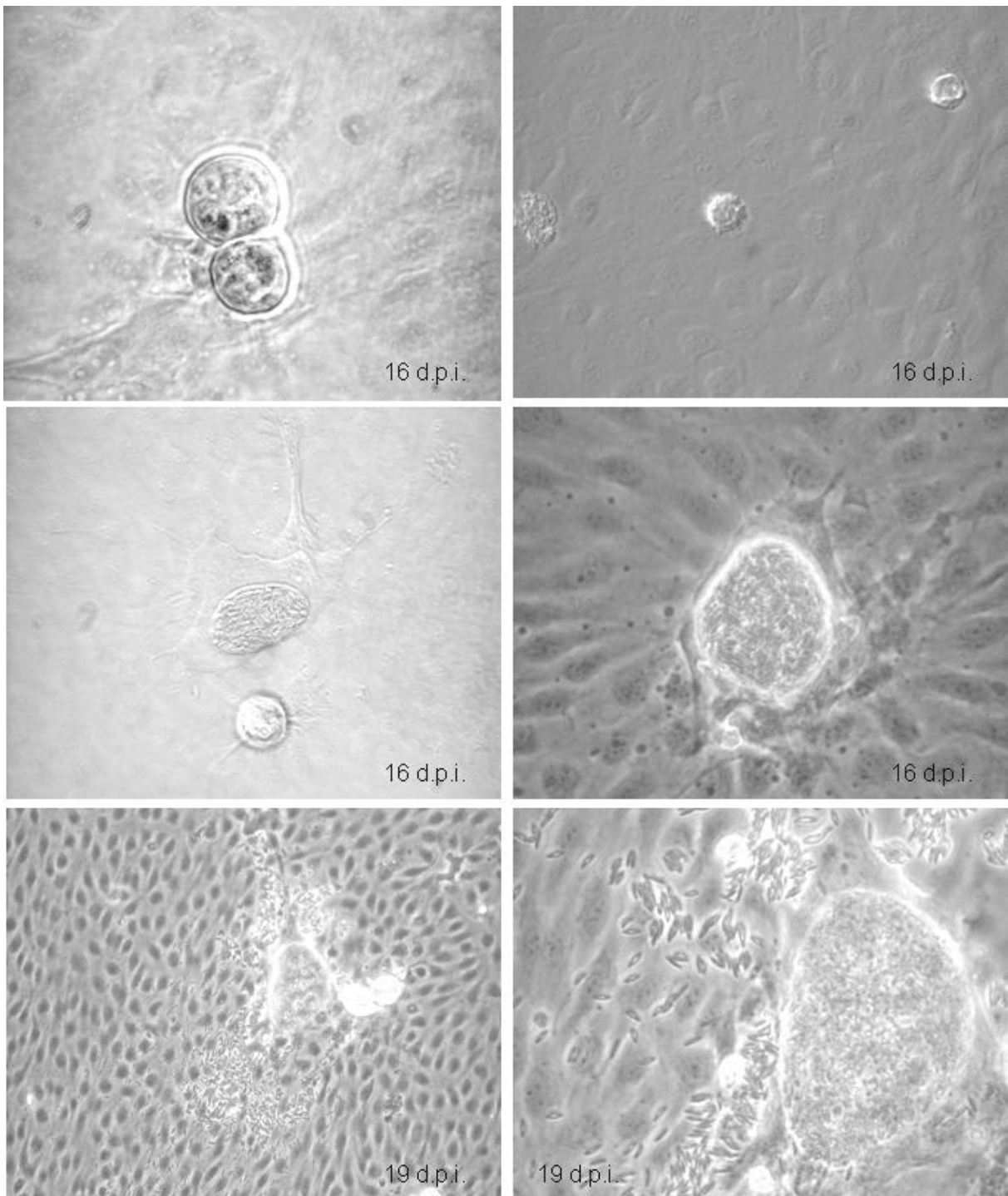
#### 4.4 Loslösung von *Eimeria bovis*-Meronten I aus dem Zellverband *in vitro*

Während der *in vitro*-Kultur von *E. bovis* konnten häufig aus dem endothelialen Zellverband losgelöste *E. bovis*-Meronten I beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde im BUVEC-System ab dem 4.-5. Tag p. i. beobachtet. Um die Lebensfähigkeit solcher losgelöster *E. bovis*-Meronten I zu überprüfen wurden die am 5., 9. und 12. Tag p. i. im Überstand befindlichen, losgelösten Meronten I auf nicht-infizierte BUVEC überführt. Anschließend wurde die Integration der Meronten I in den nicht-infizierten Zellrasen und eine eventuelle Weiterentwicklung beobachtet.



**Abb. 5. Reintegration bereits losgelöster *Eimeria bovis*-Meronten in nicht-infizierte BUVEC.** Am Tag 5, 9, 12 p. i. wurden die im Überstand der infizierten BUVEC befindlichen, losgelösten Meronten aus je 6 Flaschen BUVEC zweier Isolate auf eine nicht-infizierte BUVEC übertragen. Am Tag 13 p. i. wurden die reintegrierten Meronten pro Flasche gezählt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass ein Großteil der abgelösten Meronten I nicht abgestorben war und sich wieder in den Zellrasen Monolayer integrierte (Abb. 5, 6). Dies war insbesondere dann gegeben, wenn losgelöste Meronten I am 9. Tag p. i. verwendet wurden (Abb. 5). Die wieder eingefügten Meronten I entwickelten sich weiter und setzten viable Merozoiten I frei. Die Abb. 6 verdeutlicht die Entwicklung solcher losgelösten Meronten I in BUVEC.



**Abb. 6. Reintegration bereits losgelöster *Eimeria bovis*-Meronten in nicht-infizierte BUVEC.** In Überständen infizierter BUVEC enthaltene, losgelöste Meronten wurden am Tag 9 auf nicht-infizierte BUVEC übertragen und anschließend lichtmikroskopisch auf Überleben und Weiterentwicklung kontrolliert.

Auffällig war eine dichte Ansammlung von nicht-infizierten Zellen um den Meronten I unter Ausildung von Lamino- und Filopodien seitens der Meronten-tragenden Zelle (Abb. 6). Bereits ab dem 16 Tag p. i. wurden Merozoiten im Innern der reintegrierten *E. bovis*-Meronten I beobachtet. Ab Tag 19 p. i. kam es zur Ruptur der reifen Meronten I und zur Freisetzung von Merozoiten I (Abb. 6). Die freigesetzten Merozoiten zeigten „gliding motility“ und dürfen daher als vital angesehen werden.

Basierend auf diese *in vitro*-Untersuchung kann vermutet werden, dass ein ähnliches Migrationsverhalten *E. bovis*-Meronten I-tragender Endothelzellen *in vivo* vorkommen könnte, um zum Ort der Weiterentwicklung zu Meronten II im Dickdarmepithel zu gelangen. Bisher liegen keinerlei Untersuchungen zur *in vivo*-Situation bei *E. bovis*-Infektionen vor. Es ist jedoch auch nach wie vor unbekannt, wie freie *E. bovis*-Merozoiten I aus den Lymphgefäßen im Ileum zu den Kolon- und Zäkumepithelzellen gelangen könnten.

Bei anderen Apikomplexa liegen z. T. Hinweise auf deren Migrationsverhalten in der Darmmukosa vor. Bei einigen *Eimeria*-Spezies des Huhnes entwickelt sich ein Teil der Meronten und Gamonten in subepithelialen Gewebe des Darmes. Die Wanderung dorthin ist recht komplex und die Parasiten setzen dabei unterschiedliche Strategien ein. Zunächst dringen *E. tenella*-Sporozoiten in intraepitheliale Lymphozyten (IEL) oder Makrophagen ein und werden in diesen Zellen dann in die Darmkrypten transportiert (Rose et al., 1984), wo die erste Merogonie in Epithelzellen durchlaufen wird. Epithelzellen, die junge *E. tenella*-Meronten der zweiten Generation enthalten, lösen sich z. T. aus dem Epithelverband und wandern in das subepitheliale Gewebe ein (Allen und Fetterer, 2002), wo dann die Weiterentwicklung stattfindet.

Vergleichbare Verhaltensweisen wurden im Falle von *Plasmodium* spp. für Meronten-tragende Hepatozyten beschrieben. Hier kam es kurz vor der Merontenruptur zur Abrundung der Meronten-tragende Wirtszelle und zum Lösen dieser Zelle aus dem Leberzellverband. Solche Zellen wanderten dann in die Lebersinusoiden und gelangten nach Durchdringung der

endothelialen Auskleidung die Blutgefäße ins Blut (Van de Sand et al., 2005). Erst hier erfolgte die Freisetzung der Merozoiten, was sinnvoll erscheint, da die freien Merozoiten dann sofort Erythrozyten befallen können (Van de Sand et al., 2005). Bemerkenswert ist, dass die losgelösten Meronten-tragenden Hepatozyten apoptotische Merkmale zeigten: auf ihrer Oberfläche fehlten Phosphoserine-Moleküle, was als charakteristisches Merkmal der Früh-Apoptose gilt und zudem ein wichtiges Signal für Makrophagen zur Phagozytose dieser Zellen ist (Van de Sand et al., 2005).

#### **4.5 Entwicklung von *Eimeria bovis*-Meronten II *in vitro* in bovinen Epithelzellen**

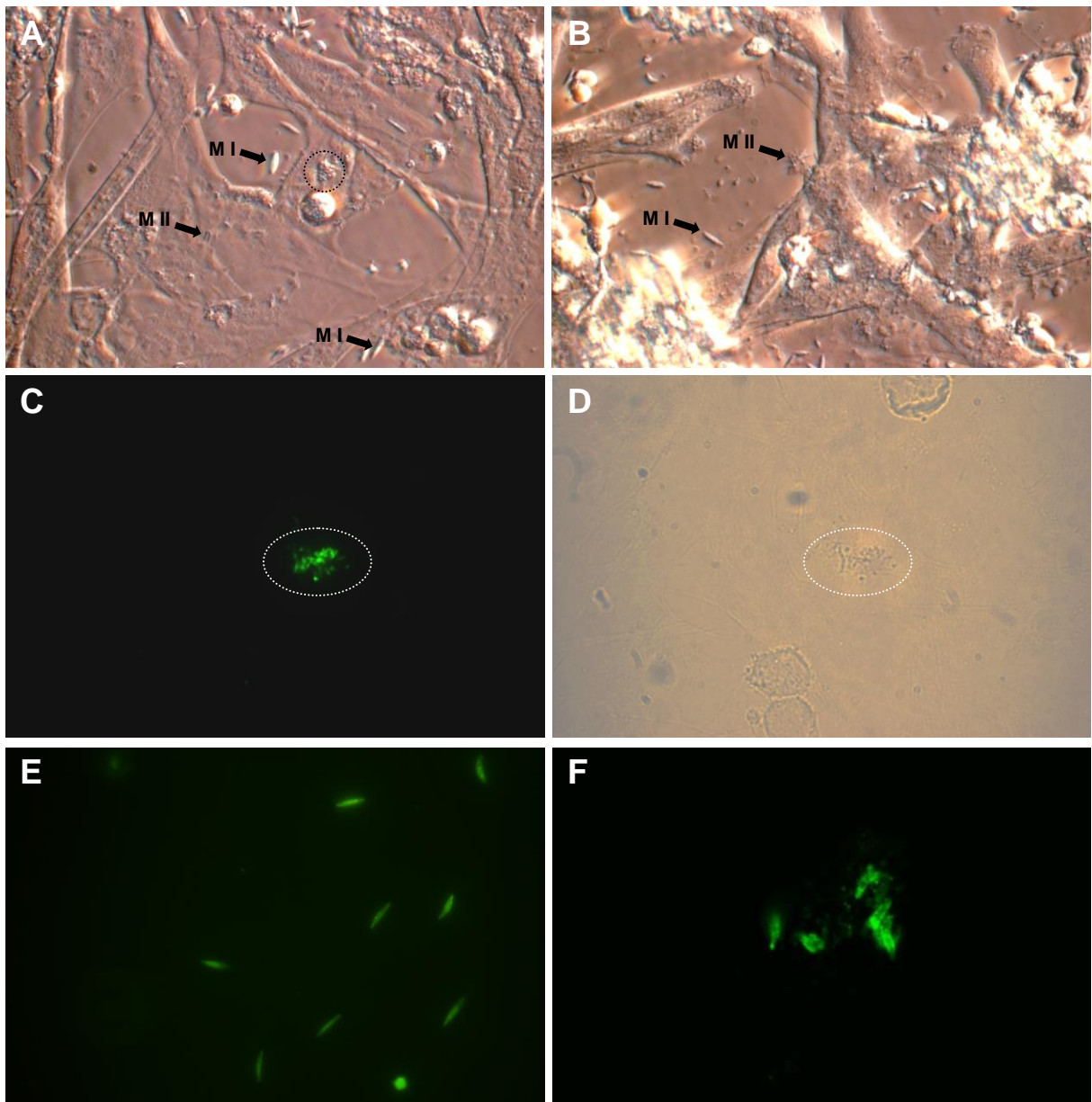
Die freien *E. bovis*-Merozoiten der ersten Generation dringen *in vivo* in Epithelzellen von Zäkum und Kolon ein und bilden dort innerhalb von 2 Tagen die zweite Merontengeneration mit je 30-36 Merozoiten. Diese dringen wiederum in Zäkum- und Kolonepithelzellen ein und entwickeln sich zu Makro-/Mikrogamonten und anschließend zu Oozysten. Die Ruptur der Wirtszelle führt dann letztendlich zu den klinischen Symptomen.

Um den Zyklus von *E. bovis in vitro* zu vervollständigen, sollten in dieser Arbeit bovine Epithelzellen aus dem Dickdarm für die zweite Merogonie und Gamogonie von *E. bovis* verwendet werden. Nach Optimierung einer von Föllmann et al. (2000) beschriebenen Methode gelang es, bovine Kolonepithelzellen zu gewinnen und zu kultivieren (AG von Herrn PD Dr. C. Menge, Institut für Tierhygiene, JLU Giessen). Vier Tage nach der Gewinnung aus Kolonkrypten wurden Epithelzellen auf die Präsenz von Zytokeratin getestet. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der Primärzellen Zytokeratin-positiv und somit epithelialen Ursprungs war. Diese Epithelzellen wurden anschließend unter Verwendung eines SV40 Promoters von Retroviren transfiziert und immortalisiert (freundlicherweise durchgeführt von Herrn Dr. A. König, Institut für Virologie, JLU Giessen). Die resultierende, permanente

bovine Kolonepithelialzelllinie (BCEC), wurde anschließend auf ihre *in vitro*-Tauglichkeit für die Entwicklung von *E. bovis*-Meronten II- und Gamonten getestet.

BCEC-Kulturen und primäre Kolonepithelzellisolate wurden mit unterschiedlichen Infektionsdosen frisch isolierter *E. bovis*-Merozoiten I infiziert und auf Weiterentwicklung des Parasiten überprüft. Beide Epithelzelltypen ließen sich grundsätzlich infizieren, die eingedrungenen Merozoiten I waren jedoch aufgrund ihrer geringen Größe und der relativ größeren Dicke der Epithelzellen schwer zu erkennen. Nach 48 Stunden p. i. wurden erste Meronten II in beiden Epithelzellpräparationen beobachtet, wobei die Anwendung der Phasenkontrast-Optik sich als hilfreich erwies (Abb. 7). Auch erste freie Merozoiten II im Zellkulturüberstand wurden zu diesem Zeitpunkt beobachtet (siehe Abb. 7B). Die freien Merozoiten II waren deutlich kleiner als Merozoiten I (Abb. 7A, B). Weder in mit *E. bovis*-Merozoiten I-infizierten BCEC noch in primären Kolonepithelzellen konnten Makro- und Mikrogamonten und folglich auch keine Oozysten beobachtet werden. Interessanterweise, eigneten sich BCEC-Kulturen, neben BUVEC und BFGC, ebenso für die Entwicklung der ersten Merogonie von *E. bovis*, wobei die Rate der sich entwickelnden Meronten I jedoch gering und die der Merozoiten I-Produktion deutlich schwächer verglichen mit BFGC und BUVEC war.

Da die Merozoiten II aufgrund ihrer geringen Größe nur sehr schwer konventionell nachzuweisen waren, wurden Merozoiten I vor Infektion der Epithelzellen zur besseren Darstellung mit CFSE (**siehe Veröffentlichung 5.8.**) gefärbt und ihre Weiterentwicklung fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Auch hier stellten sich erste Merozoiten II 48 h nach der Infektion dar (Abb. 7C, D). Zur Absicherung, dass es sich hierbei um parasitäre Strukturen handelt, wurden zusätzlich über die Verwendung eines gegen *E. bovis* gerichteten Hyperimmunserums Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Das Immunserum reagierte hier spezifisch mit intrazellulären und freien Merozoiten II (Abb. 7F).



**Abb. 7. Entwicklung von *Eimeria bovis*-Merozoiten II in BCEC**

BCEC wurden mit ungefärbten (**A, B**) oder CFSE-gefärbten (**C-E**), *in vitro*-generierten Merozoiten I infiziert und die Weiterentwicklung der Parasiten beobachtet:

(**A, B**) intrazellulärer Meront II (Umkreisung), Merozoiten I (M I) und Merozoiten II (M II), 48 Stunden p. i., Hoffmann-Optik, 630 x); (**C, D**) intrazelluläre Merozoiten II, 72 Stunden p. i., 1000 x; (**E**) CFSE-gefärbte Merozoiten II, 1000 x; (**F**) mit aus immunen Kälbern gewonnenem Antiserum gefärbte freie Merozoiten II, 1500 x.

Nachdem geklärt war, dass sich Merozoiten I in den verwendeten Epithelzellen weiterentwickeln wurden zudem Experimente durchgeführt, um das Reaktionsspektrum der infizierten Epithelzellen zu analysieren. Auch Epithelzellen sind in der Lage, eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Mediatoren (z. B. Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle) zur Einleitung inflammatorischer Prozesse zu produzieren.

Primäre bovine Kolonepithelzellen und BCEC wurden mit Merozoiten I infiziert und auf Transkriptionsebene auf infektionsbedingte Veränderungen bezüglich IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10, und MCP-1 untersucht. Es zeigte sich, dass die Transkription von IL-6 und IL-8 relativ schwach zu einem frühen Zeitpunkt (6 bzw. 4 h p. i.) nach Infektion, die von IP-10 zeitlich versetzt (24 h p. i.) jedoch deutlich in primären Kolonepithelzellen induziert wurde. Die Transkription der anderen untersuchten Gene wurde dagegen kaum beeinflusst. (Abb. 8). Bei TNF- $\alpha$ /LPS-stimulierten Kontrollen waren, wie erwartet, alle Zyto- und Chemokin-Gene stark in ihrer Transkription erhöht.

Bei Verwendung von BCEC zeigte sich grundsätzlich ein vergleichbares Bild, da es hier ebenfalls zu einer stark erhöhten Transkription des IP-10-Gens kam (Abb. 9). Bereits 6 h p. i. wurde eine fast 40fache Steigerung der IP-10-Gentranskription gemessen, die 24 h p. i. mit einem > 70fachen Anstieg im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle die höchsten Werte erreichte (Abb.9). Im Falle von IL-6, IL-8 und GM-CSF kam es nach 24 h p. i. ebenfalls zu einer Zunahme der Gentranskription. Im Gegensatz zu primären Kolonepithelzellisolaten reagierten BCEC jedoch kaum auf eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  und LPS, was auf ein durch die Immortalisierung verändertes Reaktionsspektrum dieser Zellen schließen lässt.

In BCEC konnte zudem eine infektionsdosisabhängige Hochregulation der Transkription der IL-6-, IL-8-, GM-CSF- und IP-10-Gene beobachtet werden (Abb. 10). Hierbei bestätigte sich, dass IP-10 am stärksten beeinflusst wurde (Abb. 10).

Insgesamt betrachtet können somit Merozoiten I-infizierte Epithelzellen über die Produktion verschiedener Chemo- und Zytokine das angeborene Immunsystem beeinflussen. Insbesondere Chemokinen ist dabei eine Schlüsselrolle zuzurechnen. Es handelt sich bei diesen Molekülen um eine umfangreiche Superfamilie von 8-10 kDa großen Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Chemotaxis von Leukozyten spielen und die über Interaktionen mit Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren entzündliche Prozesse regulieren (Locati et al., 2002). Chemokine werden nach der relativen Position ihrer Cystein-Resten im Molekül bezeichnet, sind in ihrer Wirkung pleiotrop und wirken mit den beiden wichtigsten Familien der CXC- und CC-Chemokine hauptsächlich auf PMN bzw. auf Monozyten und T-Lymphozyten (Montavani und Sozzani, 2000; Locati et al., 2002).

Daten zur Merozoiten-induzierten Modulation von Wirtszell-produzierten Chemokinen liegen kaum vor und beziehen sich im Wesentlichen auf Human- und Mauszellen mit *T. gondii*-Merozoiten. Diese Daten variieren z. T. erheblich, sogar, wenn der gleiche Wirtszelltyp benutzt wurde. Im bovinen System mit BUVEC als Wirtszelle sind dagegen sowohl *T. gondii*- als auch *N. caninum*-Merozoiten potente Induktoren von Chemokinen, insbesondere der CC-Chemokine MCP-1 und RANTES und der CC-Chemokine GRO- $\alpha$ , IL-8 und IP-10 (Taubert et al., 2006). Völlig anders als bei Merozoiten der rasch proliferierenden Arten *T. gondii* und *N. caninum* wirken sich dagegen Infektionen mit *E. bovis*-Sporozoitien auf die Chemokin-Genexpression aus (Taubert et al., 2006), da allenfalls moderate Steigerungen der MCP-1- und RANTES-Transkripte beobachtet wurden; eine CXC-Chemokinsynthese wurde über *E. bovis*-Sporozoitien auch bei hohen Infektionsraten nicht induziert. Im Gegensatz dazu steht die deutliche Induktion von IP-10 über Infektionen mit Merozoiten I in Epithelzellen.

In Anbetracht der differenzierten Entwicklung von *E. bovis*-Sporozoitien und -Merozoiten I liegt es nahe, die unterschiedlichen Reaktionsmuster auf Ebene der Stadienspezifität zu



interpretieren. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass im Falle von *T. gondii* die MCP-1-Synthese in humanen Fibroblasten nur bei der rasch ablaufenden Merogonie zur Entwicklung von Tachyzoiten gesteigert war; die sich langsam teilenden Bradyzoiten stimulierten dagegen die MCP-1-Synthese kaum (Brenier-Pinchart et al., 2002). *E. bovis*-Merozoiten I durchlaufen in Kolonepithelzellen ebenfalls eine eher rasche Merogonie (von etwa 48 h *in vivo*) und sind daher von ihrer Replikationszeit eher mit Tachyzoiten als mit Sporozoiten bzw. Bradyzoiten zu vergleichen.

Über Produktion von Zyto- und Chemokinen könnten infizierte Epithelzellen das Anlocken von Leukozyten wie z. B. Monozyten, NK-Zellen, Granulozyten oder dendritische Zellen initiieren und damit evtl. infektionseliminierende Mechanismen einleiten. Chemokine wie GRO- $\alpha$  und IL-8 gelten als potente Moleküle zur Anlockung von Granulozyten (Luster, 1998; Rudack et al., 2003). Dagegen könnten über die Freisetzung von IP-10 einerseits NK-Zellen angelockt werden und andererseits über die Chemotaxis von T-Zellen bereits in der Frühphase der Infektion das sich entwickelnde Th1/Th2-Gleichgewicht beeinflusst werden (Scharton und Scott, 1993; Vester et al., 1999). Dieses bei Merozoiten I-infizierten primären, als auch permanenten Kolonepithelzellen gleichermaßen gesteigerte Chemokin scheint eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Kokzidien zu haben. So zeigten Depletionsstudien in Mäusen, dass eine Neutralisation von IP-10 über Verabreichung monoklonaler Antikörper zu einer > 1000fach erhöhten Parasitenbürde führte (Khan et al., 2000). In ähnlicher Weise könnte im Falle von *E. bovis* die erhöhte Transkription von IP-10 in infizierten Epithelzellen als eine der die Entwicklung des Parasiten negativ beeinflussende Schutzreaktion der Wirtszelle verstanden werden.

*E. bovis*-Merozoiten I induzieren zudem die Synthese von GM-CSF in infizierten BCEC (siehe Abb. 6). GM-CSF gilt als ein Wachstumsfaktor, der u. a. die Proliferation und Reifung

von PMN beeinflusst. Auch *T. gondii*-Merozoiten induzieren die GM-CSF-Synthese (Naginei et al., 2000), ebenso war dies der Fall bei Infektionen von Endothelzellen mit *N. caninum*-Merozoiten und *E. bovis*-Sporozoiten (Taubert et al., 2006). Über die direkten oder indirekten Effekte auf die Parasiten liegen jedoch widersprüchliche Angaben vor. So kann GM-CSF die Fähigkeit von Makrophagen und Mikrogliazellen, *T. gondii* abzutöten einerseits steigern (Fischer et al., 1993; Benedetto et al., 2000), nach anderen Berichten jedoch reduzieren (Delemarre et al., 1995, 1998).

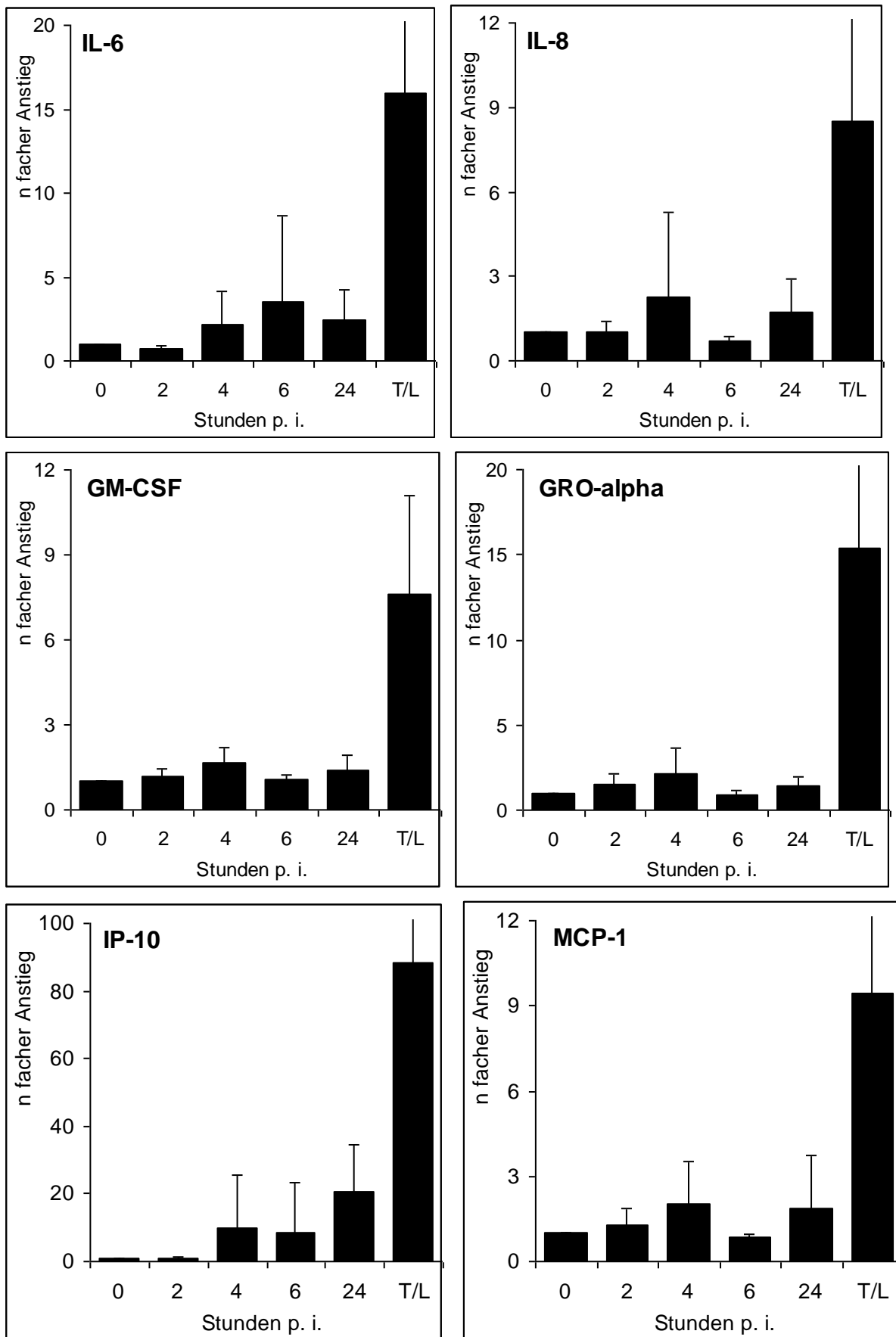


Abb. 8. Transkription der IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10 und MCP-1-Gene in primären bovinen Kolonepithelzellen nach Infektion mit *Eimeria bovis*-Merozoiten I. Primäre bovine Kolonepithelzellen ( $n = 5$ ) wurden mit  $2 \times 10^6$  Merozoiten I infiziert. Nach den angegebenen Stunden p. i. wurde Total-RNA gewonnen, reverse transkribiert und mittels Realtime PCR die Transkripte von IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10 und MCP-1 nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  und LPS (T/L) über 24 h.

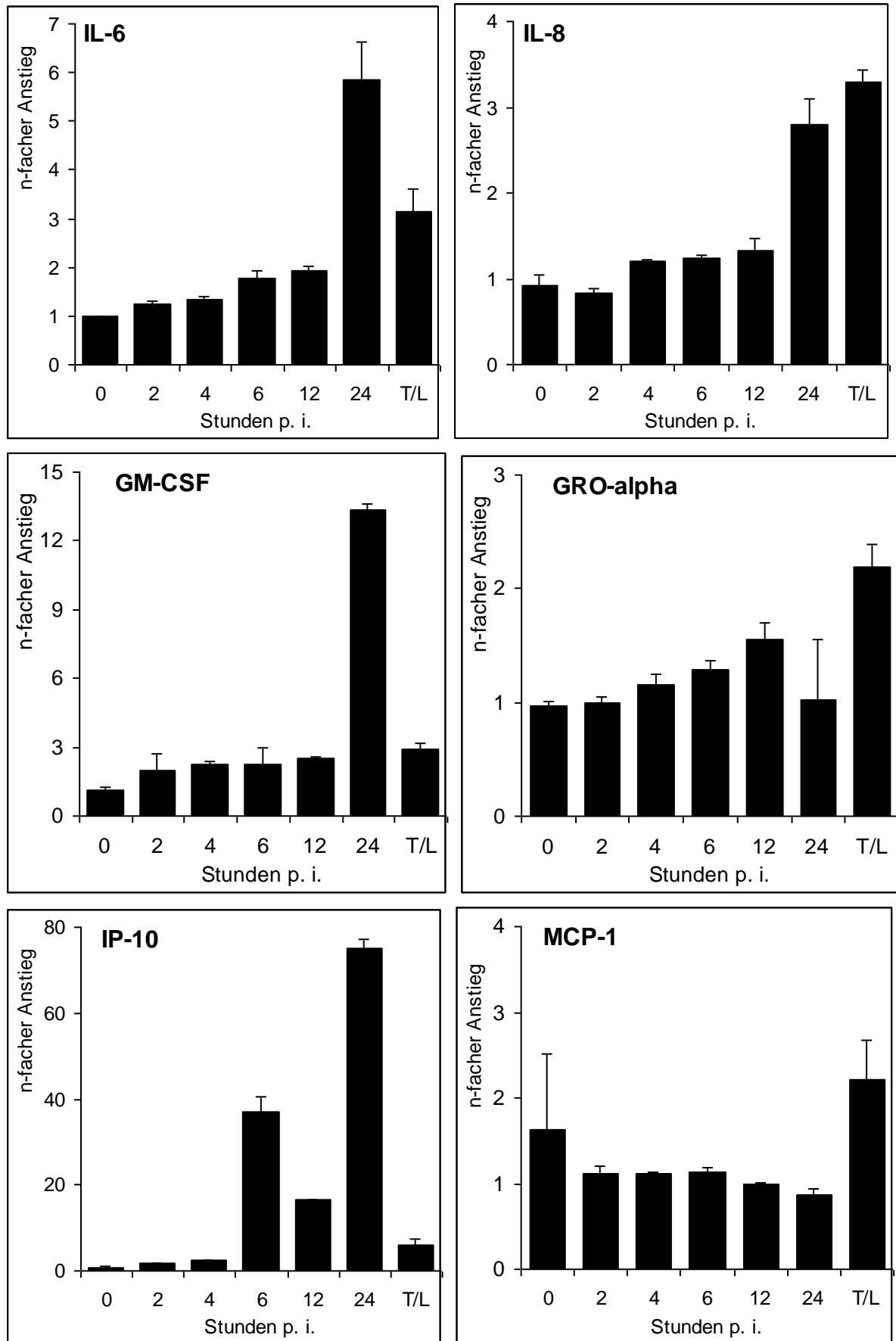
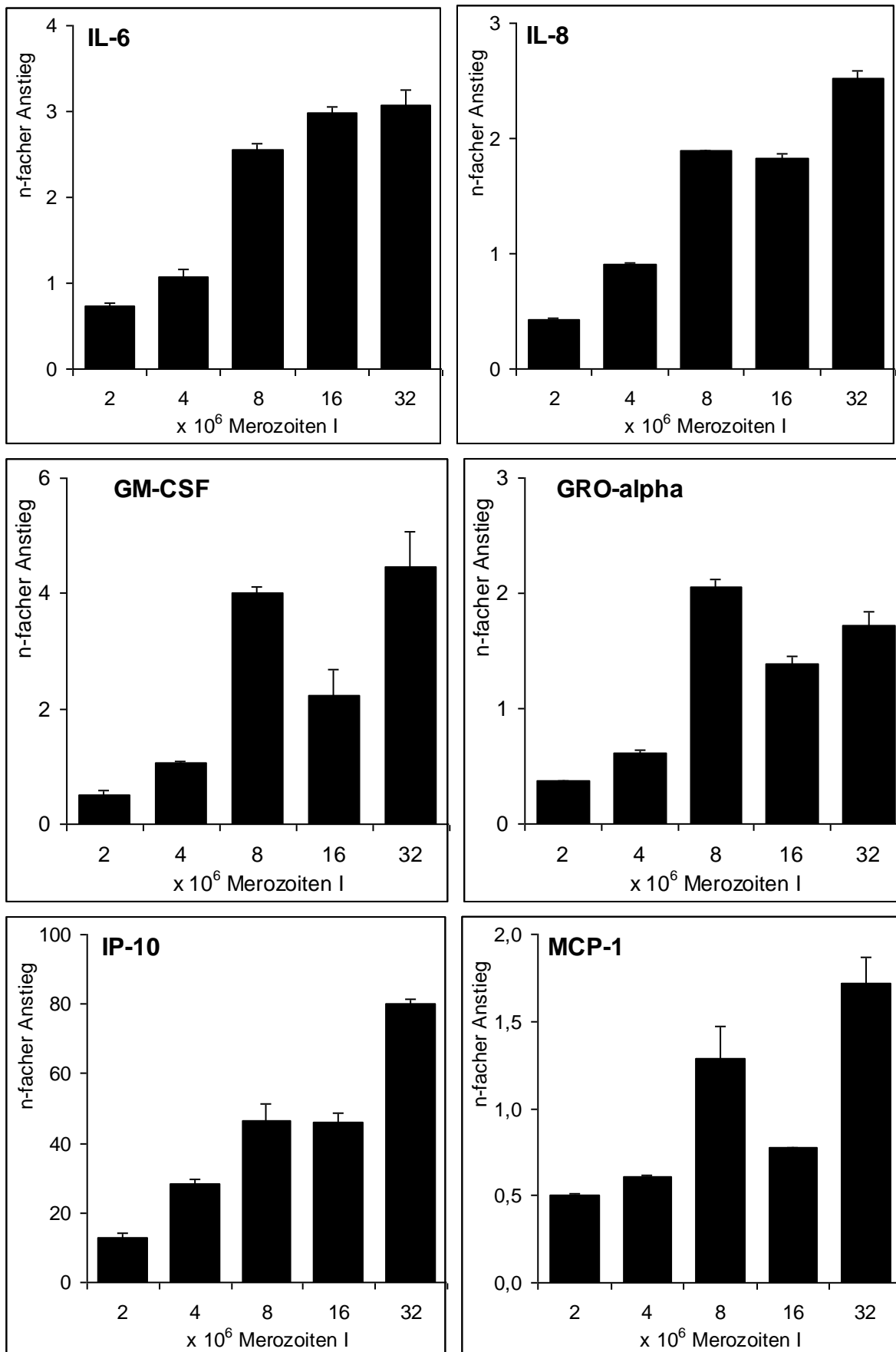


Abb. 9. Transkription der IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10 und MCP-1-Gene in BCEC nach Infektion mit *E. bovis*-Merozoiten I. BCEC wurden mit  $2 \times 10^6$  Merozoiten I infiziert. Nach den angegebenen Stunden p. i. wurde Total-RNA gewonnen, reverse transkribiert und mittels Realtime PCR die Transkripte von IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10 und MCP-1 nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  und LPS (T/L) über 24 h.



**Abb. 10. Infektionsdosis-abhängige Transkription der IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10 und MCP-1-Gene in BCEC nach Infektion mit *E. bovis*-Merozoiten I.** BCEC wurden mit Merozoiten I infiziert. Nach 6 Stunden p. i. wurde Total-RNA gewonnen, reverse transkribiert und mittels Realtime PCR die Transkripte von IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , IP-10 und MCP-1 nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  und LPS (T/L) über 24 h.

#### 4.6 Alternativer Invasionsmechanismus bei *Eimeria bovis*-Sporozoiten

Im Dünndarm frisch exzystierte *E. bovis*-Sporozoiten haben eine Epithelzellschicht zu durchwandern, die als physikalische Barriere betrachtet werden kann. Wie bereits erwähnt, können bereits intrazellulär situierte *E. bovis*-Sporozoiten *in vitro* spontan ihre Wirtszelle verlassen und eine neue Zelle befallen. Dieses Phänomen steht im klaren Widerspruch zur „klassischen“ Zellinvasion von Apicomplexa, welche mit der Bildung einer PV und damit eines separaten Kompartiments innerhalb des Zytoplasmas einhergeht.

Unter Verwendung eines standardisierten „Cell Wound“-Assays in Verbindung mit unterschiedlicher Zelltypen boviner (BSLEC, BAEC) sowie nicht-boviner Herkunft (HT29, VERO), wurde die Fähigkeit von *E. bovis*-Sporozoiten, Zellen zu durchwandern, untersucht. Für vergleichsweise Aussagen wurden außerdem Tachyzoiten von *T. gondii* und *N. caninum* auf ihre Invasionsmechanismen überprüft (siehe **Veröffentlichung 5.2**). Der „Cell Wound“-Assay basiert auf einem zellimpermeablen Marker (FITC-Dextran), welcher bei einer Verletzung der Zellmembran in die Zelle gelangt und nach Reparatur der Zellmembran im Zytoplasma verbleibt (McNeil et al., 1999). Tote Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, werden nicht dauerhaft gefärbt und können somit leicht von „verletzten“ Zellen unterschieden werden. Weiterhin erlaubt dieser Test die Abgrenzung von endozytotisch inkorporiertem FITC-Dextran, das sich als kleine fluoreszierende Punkte im Zytoplasma im Gegensatz zur homogenen Fluoreszenz von „verletzten“ Zellen darstellen lässt.

Die mit diesem Test erzielten Ergebnisse waren eindeutig. Bei mit *E. bovis*-Sporozoiten infizierten Endothelzellen wurde ein relativ höherer Anteil „verletzter“ Zellen beobachtet verglichen mit *T. gondii*- oder *N. caninum*-Infektionen. Die FITC-Dextran-gefärbten Zellen waren dabei in allen Fällen parasitenfrei. Bei der Verwendung von  $4 \times 10^4$  Sporozoiten pro Coverslip wurden so 2,5 % und 3,5 % FITC-Dextran-gefärbte Zellen respektive in BAEC und BSLEC gefunden (siehe **Veröffentlichung 5.2**). Das Verhältnis zwischen der eingesetzten Parasitenzahl und gefärbter Zellen war  $0,95 \pm 0,23$  und  $0,9 \pm 0,08$  in BAEC bzw. BSLEC und

der Unterschied zu Infektionen mit Tachyzoiten von *T. gondii* und *N. caninum* war hochsignifikant ( $P < 0.001$ ). Unabhängig vom Zelltyp waren *T. gondii*- und *N. caninum*-Tachyzoiten somit offensichtlich nicht in der Lage, Zellen zu durchwandern (siehe **Veröffentlichung 5.2**). Die Resultate verdeutlichen zudem, dass Sporozoiten von *E. bovis*, ebenso wie solche von *P. yoelii* (Mota et al., 2001), über einen Transmigrationsmechanismus verfügen, der es ihnen ermöglicht, durch Zellbarrieren zu migrieren, um die endgültige Wirtszelle zu erreichen.

Ob der Farbstoff während der Invasion oder des Egresses aus der Zelle ins Zytosol eindrang, konnte anhand dieses Testes nicht geklärt werden. Einige Arbeiten zu alternativen Invasionsmechanismen von Sporozoiten deuten darauf hin, dass bei dieser Form der Migration keine PV in der Wirtszelle gebildet wird (Mota et al., 2001, Mota and Rodriguez, 2001, 2002), wie sie bei der klassischen Invasion bei Apicomplexa belegt ist (Dubremetz et al., 1998). Interessanterweise wurden bereits bei anderen *Eimeria*-Sporozoiten Invasions- und Egress-Versuche *in vitro* beschrieben (Speer et al., 1971, Danforth et al., 1984, 1992, Chobatar et al., 1993), jedoch erfolgte keine weitergehende Untersuchung dieses Phänomens. Zudem beschreiben eine Reihe von Studien, dass Sporozoiten anderer Coccidia kurz nach der Zellinvasion ebenso frei im Zytosol vorliegen (Aikawa et al., 1984, Danforth et al., 1992, Chobatar et al., 1993). Dies legt nahe, dass die Fähigkeit von Sporozoiten, durch Zellen zu migrieren, bei Eucoccidiida weiter verbreitet ist als bisher angenommen. Wie bereits von anderen Autoren vermutet (Mota et al., 2001, Mota und Rodriguez, 2002), könnte der Vorteil der Transmigrationsfähigkeit der Sporozoiten darin liegen, sie in die Lage zu versetzen, physikalische Barrieren zu durchwandern. Dies könnten insbesondere für solche Parasiten eine Rolle spielen, deren Sporozoiten an Orten freigesetzt werden, an denen ihre spezifische Wirtszelle nicht vorliegt, wie z. B. im Falle von *P. yoelii* und *E. bovis*. Diese Sporozoiten müssen möglichst schnell eine adäquate Wirtszelle finden und invadieren, um nicht vom Immunsystems des Wirtes erfasst zu werden. Somit scheint der Zeitfaktor bei der Invasion

nicht unerheblich zu sein. Bei *E. bovis*-Sporozoiten dauert die klassische Invasion von Wirtszellen etwa 20-25 Sekunden, dagegen läuft die alternative Invasion mit anschließendem Egress sehr viel schneller in nur wenigen Sekunden (2-5) ab. Bei *P. yoelii*-Sporozoiten findet diese Art der Invasion mit  $< 2$  Sekunden sogar noch schneller statt (Mota et al., 2001).

Es wäre naheliegend anzunehmen, dass insbesondere nicht-bovine Wirtszellen wie z. B. humane HT29- oder von Primaten stammende VERO-Zellen eher von *E. bovis*-Sporozoiten durchwandert werden als bovine Endothelzellen (BAEC, BSLEC). Diese Vermutung bestätigte sich jedoch nicht. So war der Anteil FITC-Dextran-positiver Zellen deutlich niedriger in infizierten HT29- und VERO-Zellrasen als in bovinen Endothelzellen; in der Regel überschritten die Werte nicht diejenigen nicht-infizierter Kontrollen (siehe **Veröffentlichung 5.2**). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der alternative Weg der Invasion der Wirtszelle unabhängig vom Zelltyp zu sein scheint. Zum besseren Verständnis dieser Phänomene wären detaillierte Untersuchungen zu molekularen Grundlagen sowohl der Invasion als auch des Egresses von Sporozoiten im bovinen System nötig.

Über die tatsächliche Bedeutung der Transmigrationsfähigkeit von Sporozoiten bei Apicomplexa wurde viel spekuliert, insbesondere bezüglich Plasmodien. Hier wird vermutet, dass die Sporozoiten-Transmigration zudem eine Rolle als Evasionsstrategie spielen könnte. Bei der Migration von *P. yoelii*-Sporozoiten durch Hepatozyten *in vitro* wurde so z. B. eine Spur vom sog. „circumsporozoite protein“ (CSP) nachgewiesen und spekuliert, dass dies dazu dienen könnte, eine „falsche Fährte“ für das Immunsystem zu hinterlegen und dieses so in die Irre zu führen (Mota et al., 2002). Zudem hätten Sporozoiten so die Gelegenheit Wirtszellen intrazellulär auf optimale „Mikrohabitatsbedingungen“ für die angestrebte Replikation zu testen.

Die stadienspezifisch ausschließlich bei Sporozoiten vorhandene Transmigrationsfähigkeit, könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass unterschiedliche Parasitenstadien hochspezifische



„Werkzeuge“ für ihre in unterschiedlichen Zelltypen ablaufende Weiterentwicklung bedürfen. Dazu passt, dass auch Merozoitenstadien von *T. gondii* und *N. caninum* nicht die Fähigkeit zur alternativen Invasion haben (siehe **Veröffentlichung 5.2**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sporozoiten von *E. bovis* durch ihre stadienspezifische Fähigkeit, die Zellmembran zu durchbrechen ohne den Zelltod auszulösen, physikalische Barrieren, wie z. B. Epithelschichten des Ileums, schnell durchwandern könnten um somit rasch zum eigentlichen Ort der ersten Merogonie zu gelangen. Es ist daher anzunehmen, dass *E. bovis*-Sporozoiten eher auf direktem Weg durch Zellen wandern, statt über eine parazelluläre Route zum lymphatischen Endothel zu gelangen.

#### **4.6.1 Induzierter Egress von Kokzidien (*Eimeria bovis*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*) aus bovinen Endothelzellen**

Die Fähigkeit von Apicomplexa zum Egress aus einer bereits infizierten Zelle ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung einer Coccidia-Infektion (zusammenfassend bei Hoff und Carruthers, 2002). Beim Egress kommen ähnliche molekulare Mechanismen zum Tragen wie bei der Invasion der Wirtszelle und er kann durch ähnliche Stimuli (s. u.) induziert werden. Kalzium spielt grundsätzlich sowohl bei der Invasion als auch beim Egress von Apicomplexa eine essentielle Rolle (zusammenfassend bei Arrizabalaga und Boothroyd, 2004). So gilt der Anstieg von intrazellulärem Kalzium in der Wirtszelle als ein potenter Induktor des Egresses (Endo et al., 1982, Schwab et al., 1994, Stommel et al., 1997).

Ursprüngliches Ziel der in **Veröffentlichung 5.6** dargestellten Untersuchungen war es, einen synchronen Egress von Merozoiten verschiedener Coccidia-Arten *in vitro* zu erzielen, um

sowohl Merozoiten von hoher Reinheit als auch von großer Anzahl zu ernten. Zu diesem Zweck wurden bovine Endothelzellen (BUVEC, BSLEC) mit *E. bovis*, *N. caninum* und *T. gondii* infiziert und gegen Ende der Merogonie durch Zugabe des Kalzium-Ionophors A23187 zum synchronen Austritt aus der Zelle zu stimulieren.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die ionophorvermittelte Zunahme der Kalziumkonzentration in Zytosol der Wirtszelle grundsätzlich zu einem schnellen Egress von *T. gondii*- und *N. caninum*-Merozoiten führte. Dies erfolgte in Abhängigkeit der Ionophorkonzentration und des Reifungszustandes der entsprechenden Meronten. So war ein Ionophor-induzierter Egress der Merozoiten aus der Wirtszelle bei *T. gondii* und *N. caninum* früh nach der Infektion am 1. Tag p. i. nicht möglich, was mit der schnell einsetzenden Weiterentwicklung der intrazellulären Stadien zusammenhängen könnte. Dagegen kam es bei den sich langsamer weiterentwickelnden *E. bovis*-Sporozoiten noch bis zum 2. Tag p. i. zum Egress der Sporozoiten aus der Zelle. Anschließend war es jedoch nicht mehr möglich, Sporozoiten zum Verlassen der Zelle zu veranlassen (siehe **Veröffentlichung 5.6**).

Über die genauen Mechanismen des Ionophors-induzierten Egresses bei Kokzidien ist wenig bekannt. Es ist zu vermuten, dass der ionophor-vermittelte Anstieg der Kalziumkonzentration im Wirtszellzytosol vom Parasiten als Signal von Zelltod gedeutet wird, das ihn veranlasst, die Zelle sofort zu verlassen. In diesem Zusammenhang konnten Moudy et al. (2001) eine gesteigerte Permeabilisierung der Wirtszellmembran messen, die ca. 2-3 min vor dem Egress von *T. gondii*-Tachyzoiten stattfand. Die Membranpermeabilisierung ihrerseits führt ebenfalls zu einem sofortigem Kalziumanstieg. Eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration führt schließlich zum Tod der Zelle. Somit hätten frisch eingedrungene Sporozoiten durch die Egressfähigkeit die Möglichkeit auch nach der Invasion neue Zellen zu befallen, falls adverse Bedingungen im Zytosol eintreten sollten. Dies könnte in direktem Zusammenhang mit den bereits beschriebenen Beobachtungen stehen. So verlassen *T. gondii*-Tachyzoiten auch kurz nach der Invasion eine Wirtszelle wieder, wenn Bedingungen im Zytosol nicht optimal sind,

wie z. B. nach dem Verlust von intrazellulären Kalium (Moudy et al., 2001). Die besondere Fähigkeit zum Egress aus der Wirtszelle stellt sicherlich einen Vorteil dar für intrazelluläre Parasiten, da eine effektive Replikation nur in vitalen Wirtszellen durchzuführen ist (Hoff und Carruthers, 2002). Es wird daher postuliert, dass sowohl der Egress bei Apicomplexa als auch die Zellinvasion essentielle Bestandteile der erfolgreichen Etablierung der Infektion im Wirt darstellen (Hoff und Carruthers, 2002).

Anders als bei *T. gondii* und *N. caninum* konnte nach Zugabe des Ionophors A23187 kein schneller Egress der *E. bovis*-Merozoiten I induziert werden. Dieses Verhaltensmuster war unabhängig vom Zelltyp und Zeitpunkt der Merontenreifung. Eine mögliche Erklärung wäre die doch sehr asynchrone Entwicklung der *E. bovis*-Makromeronten *in vitro* (siehe **Veröffentlichung 5.1**). Andererseits könnte die starke Anreicherung von Zytoskelettelementen um die PV von *E. bovis*-Makromeronten Grundlage dieses Phänomens sein (siehe **Veröffentlichung 5.5**). *E. bovis*-Merozoiten I müssten im Prinzip drei Schichten, die PV-Membran, die verdichteten Zytoskelettelemente und die Wirtszellmembran penetrieren, um die Wirtszelle zu verlassen. Dies wäre vergleichsweise mit deutlich mehr Aufwand verbunden als im Falle von von *T. gondii*- und *N. caninum*-Tachyzoiten oder *E. bovis*-Sporozoiten (zum frühen Zeitpunkt ist das Zytoskelett noch nicht maßgeblich verändert). Bei *E. bovis* fehlen jegliche Kenntnisse auf molekularer Ebene zum Egress von Merozoiten I. Grundsätzliche Hinweise zu dieser Fragestellung kommen aus der Malaria-Forschung. Hier konnte gezeigt werden, dass beim Egress von *P. falciparum*-Merozoiten aus den Erythrozyten von Merozoiten produzierte Proteasen maßgeblich beteiligt sind (Salmon et al., 2005; Soni et al., 2005; Yeoh et al., 2007). Über diese Enzyme wird offensichtlich das Zytoskelett der Erythrozyten kurz vor dem Egress aufgespalten, so dass die Merozoiten die Zelle verlassen können (Deguercy et al. 1990, Le Bonniec et al., 1999, Hanspal et al., 2002). Das Zytoskelett der Erythrozyten unterscheidet sich jedoch wesentlich von der kompakten Vernetzung der Mikrotubuli und Aktinfilamente, die die reifen *E. bovis*-Makromeronten

aumgeben (siehe **Veröffentlichung 5.5**). Ein Inhibitor der Cystein-Protease (E64), der den Egress der *P. falciparum*-Merozoiten aus Erythrozyten hemmen konnte, zeigte bei *E. bovis*-, *T. gondii*- oder *N. caninum*-infizierten Zellen keinen Einfluss. Folgerichtig muss angenommen werden, dass diejenigen Proteasen, die durch E64 aktiv blockiert werden, beim Egress-Mechanismus dieser Parasiten anscheinend nicht beteiligt sind.

#### **4.7 Infektionen mit *Eimeria bovis* und anderen Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) induzieren die endotheliale Synthese von Adhäsionsmolekülen mit nachfolgender PMN-Adhäsion**

Werden z. B. über Zytokine oder Pathogene Endothelzellen aktiviert, kommt es nachfolgend zur Adhäsion von Leukozyten an das Endothel im irritierten Bereich. Diese Leukozyten-Adhäsion wird in erster Linie von endothelial exprimierten Adhäsionsmolekülen vermittelt (Ebnet und Vestweber, 1999, Wagner und Roth, 2000).

Im Falle der *E. bovis*-Infektion kommt es *in vitro* unter physiologischen Fließbedingungen („parallel plate flow chamber“-Assay) schnell nach dem Eindringen der Sporozoiten zur Aktivierung der BUVEC (siehe **Veröffentlichung 5.3**). Dies wurde anhand der innerhalb von 30 Minuten induzierten Transkription der P- und E-Selektinogene gezeigt. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln frühe, noch reversible Kontakte zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Tedder et al., 1995). ICAM-1 und VCAM-1, Adhäsionsmoleküle, die dagegen eher die feste Bindung der Leukozyten vermitteln, wurden über *E. bovis* wesentlich schwächer induziert (siehe **Veröffentlichung 5.3**). In allen Fällen beschränkte sich die Hochregulation der Gentranskription aber auf einen Zeitraum von wenigen Stunden nach der Infektion. Es ist somit zu vermuten, dass die eingedrungenen Sporozoiten und nicht die sich anschließend entwickelnden Meronten (die Durchflusskammer-Experimente umfassten einen

Zeitraum von insgesamt 14 Tagen nach der Infektion) Ursache für die Aktivierung der Endothelzellen sind (**Veröffentlichung 5.3**).

Bei bakteriellen Infektionen von Endothelzellen z. B. durch *Chlamydia pneumoniae* oder *Bartonella henselae* wurde ebenfalls eine Induktion von Adhäsionsmolekülen in humanen Endothelzellen gezeigt (Krüll et al., 1999, Fuhrmann et al., 2001), wobei die zeitlichen Abläufe der Hochregulation ungefähr denen bei *E. bovis* entsprachen. Im Falle dieser Infektionen wird angenommen, dass bereits die Anlagerung der Bakterien an Endothelzellen die Transkription dieser Gene induziert. Auch lösliche, bakterielle Komponenten, wie z. B. Endotoxine und Listeriolysin lösten sofortige Reaktionen bei Endothelzellen aus (Krüll et al., 1996, 1997). In diesem Zusammenhang könnten auch lösliche, exkretorisch/sekretorische Produkte von *E. bovis*-Sporozoit, die z. B. bei der „gliding motility“ abgegeben werden (zusammenfassend bei Dubremetz et al., 1998, Augustine, 2001), eine Rolle spielen. Wie unter **Veröffentlichung 5.2** beschrieben, sind Sporozoit als invasive Stadien sehr beweglich und zusätzlich in der Lage, Endothelzellen zu durchwandern. Diese mechanischen Reize könnten ebenfalls für die Aktivierung der Endothelzellen verantwortlich sein.

Reaktionen mit vergleichbaren Zeitabläufen ließen sich auch nach Infektionen von Endothelzellen mit *T. gondii*- und *N. caninum*-Tachyzoiten beobachten. Diese Parasitenstadien induzierten allerdings im Vergleich zu Sporozoit von *E. bovis* trotz deutlich geringeren resultierenden Infektionsraten um den Faktor 4-10 höhere Transkriptionsraten (siehe **Veröffentlichung 5.3** und **5.4**).

Im Anschluss an die Expression der Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen können Leukozyten an das aktivierte Endothel binden. Diese Vorgänge lassen sich, wie bereits oben erwähnt, mittels einer speziellen Durchflusskammer unter physiologischen Flussbedingungen simulieren und erfassen. Da Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen relativ lange persistieren (Scholz et al., 1996), können

*E. bovis*-infizierte Endothelzellen trotz des kurzfristigen, auf Stunden beschränkten Anstiegs der Gentranskription über einen längeren Zeitraum z. B. PMN binden (siehe **Veröffentlichung 5.3**). Infektionen mit *E. bovis*-Sporozoiten induzierten eine messbare Adhäsion von PMN an infizierte endotheliale Zellrasen über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg. Wie im Falle der Transkription der Adhäsionsmoleküle fiel die PMN-Adhäsion bei *E. bovis* im Vergleich zu *T. gondii*- oder *N. caninum*-infizierten BUVEC deutlich jedoch deutlich schwächer aus. Dies trifft v. a. zu, wenn die bei *E. bovis* vorliegenden, wesentlich höheren Befallsraten berücksichtigt werden (siehe **Veröffentlichungen 5.3** und **5.4**). Es somit zu vermuten, dass *E. bovis*-Sporozoiten und – Meronten I auch *in vivo* einen geringeren Entzündungsreiz für Endothelzellen bedeuten als Merozoiten von *T. gondii* und *N. caninum*.

Die Adhäsion der PMN an infizierte Endothelzellen erfolgte jedoch nicht ausschließlich an infizierte Zellen, sondern betraf auch nicht-infizierte Zellen innerhalb eines infizierten Zellrasens (siehe **Veröffentlichung 5.3**). Dieses Verhaltensmuster konnte ebenfalls für mit *T. gondii*- und *N. caninum*-infizierte BUVEC gezeigt werden (siehe **Veröffentlichung 5.4**). Die Ursachen hierfür sind vollkommen unbekannt. Mechanische Einflüsse, die beim Gliding der Parasiten über potenzielle Wirtszellen gesetzt werden, oder von infizierten Zellen sezernierte, parakrin wirkende Faktoren könnten hier zugrunde liegen.

#### **4.7.1 Intrazelluläre *Eimeria bovis*-Stadien hemmen TNF- $\alpha$ -induzierte Reaktionen der endothelialen Wirtszelle**

Es mutet erstaunlich an, dass in *E. bovis*-infizierten Endothelzellen im späteren Infektionsverlauf trotz der massiven Parasitenproliferation jegliche Transkription der für Adhäsionsmoleküle kodierenden Gene unterbleibt. Dieser im Prinzip anerge Zustand der befallenen Endothelzelle legt die Annahme nahe, dass *E. bovis* selbst die Transkription

bestimmter Gene moduliert. Unsere *in vitro*-Experimente zeigten, dass dies tatsächlich der Fall ist. In Versuchen, in denen der stimulatorische Effekt von TNF- $\alpha$ , einem potenten Aktivator von Endothelzellen, vergleichend bei infizierten und nicht-infizierten Zellen untersucht wurde, zeigte sich, dass sowohl die PMN-Adhäsion als auch die Transkription der für Adhäsionsmoleküle kodierenden Gene bei *E. bovis*-infizierten BUVEC schwächer war als bei nicht-infizierten Kontrollen (siehe **Veröffentlichung 5.3**). Daraus muss gefolgert werden, dass *E. bovis* tatsächlich dieses für die Initiierung von Entzündungsreaktionen relevante System der Endothelzellen hemmend beeinflussen kann. In Anbetracht der langsamen Entwicklung der Meronten I erscheint es als mögliche Evasionsstrategie durchaus sinnvoll für *E. bovis*, pro-inflammatorische Prozesse, die zur Schädigung der Meronten führen könnten, zu unterbinden. Diese Experimente zeigten weiterhin auch erstmalig, dass *E. bovis* grundsätzlich und ähnlich wie *T. gondii* (Shapira, et al., 2002, Aliberti et al., 2004, Lüder und Gross, 2005) befähigt ist, die Genexpression der Wirtszelle zu seinem Vorteil zu modulieren.

#### **4.8 Beeinflussung des Zytoskeletts der Wirtszelle durch *Eimeria bovis***

Eine Besonderheit in der Entwicklungsbiologie von *E. bovis* ist die Bildung der Makromeronten in den Endothelzellen der Lymphkapillaren der Villi des Ileums. Dabei wird die befallene Endothelzelle bis zu 300  $\mu\text{m}$  groß und diese enorme Größenzunahme sollte mit Veränderungen des Zytoskeletts einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit zur Beeinflussung des Zytoskeletts der endothelialen Wirtszelle (BSLEC, BUVEC) durch *E. bovis* wurde auf folgende Komponenten eingegangen: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Vimentin) (siehe **Veröffentlichung 5.5**). Außerdem wurde Spektrin als ein sog. „akzessorisches Molekül“ des Zytoskeletts mit einbezogen, da es u. a. an der Verankerung des Zytoskeletts an der Zellmembran, beteiligt ist.

Insgesamt wurden im Verlauf der ersten Merogonie von *E. bovis* deutliche Veränderung des Zytoskeletts beobachtet. Dies betraf insbesondere Aktinfilamente und Mikrotubuli. Diese Veränderungen waren in der Frühphase der Infektion (8 Tage p. i.) zunächst als eine Ansammlung von Fasern um die PV erkennbar (siehe **Veröffentlichung 5.5**). Mit zunehmender Größe der Meronten bis zum 15.-20. Tag p. i. wurden die Unterschiede zwischen infizierten Zellen und Kontrollen immer evidenter. So waren die Makromeronten schließlich von einer dicken, kompakten Schicht aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten umgeben (siehe **Veröffentlichung 5.5**). Es ist somit anzunehmen, dass im Zuge der extremen Vergrößerung der den Makromeronten tragenden Wirtszelle speziell die Aktinfilamente bezüglich der strukturellen Stabilität und Bruchfestigkeit der Zelle (Janmay, 1991) eine Rolle spielen. Unsere Daten stimmen mit Beobachtungen bei wesentlich kleiner ausgeprägten Meronten, wie z. B. von *C. parvum* überein, da auch dort eine Vermehrung der Aktinfilamente um die PV beobachtet wurde (Elliot und Clark, 2000, Elliot et al., 2001).

Neben Aktinfilamenten spielen die Mikrotubuli eine essentielle Rolle bei der Verteilung und Bewegung von intrazellulären Organellen (Kelly, 1990, Morrisette et al., 2004). Die Modulation dieser Fasernetzwerke seitens der Parasiten könnte in Hinsicht auf die Versorgung mit Nährstoffen zum Tragen kommen. So moduliert z. B. *T. gondii* gezielt die Mikrotubuli der Wirtszelle, um selektiv Endolysosomen zur PV zu rekrutieren (Coppens et al., 2006). Die Autoren konnten darüber hinaus die Bildung kleiner Mikrotubuli-Invaginationen auf der PVM beobachten, die offensichtlich ebenfalls der Versorgung der Parasiten zu dienen schien. In ähnlicher Weise könnte *E. bovis* das Netzwerk der Mikrotubuli zu seinem Vorteil ausnutzen, indem er z. B. Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat oder das ER in räumliche Nähe zur PVM bringt und so für eine effizientere Zufuhr von Nährstoffen sorgt. Dementsprechend war gegen Ende der *E. bovis*-Makromerontenentwicklung und somit zum Zeitpunkt der stärksten Replikationsaktivität eine signifikante



Vermehrung der Mikrotubuli zu erkennen. Dies könnte mit dem zu diesem Zeitpunkt erhöhten Energiebedarf der Parasiten in Verbindung stehen.

Bei *T. gondii*-infizierten Zellen wurden ähnliche Veränderungen des Mikrotubulsystems beschrieben, allerdings betrafen diese im Gegensatz zu *E. bovis* die Frühphase der Infektion (Melo et al., 2001).

Im Falle von *E. bovis* wurde zudem eine signifikante Zunahme von posttranslational azetylierten Mikrotubuli in der Endphase der ersten Merogonie beobachtet. Die posttranslationale Modifikation der Mikrotubuli spricht zum einen für eine Stabilisierung der Fasern und somit indirekt der PV und zum anderen für die Anbindung von Proteinen an dieses Netzwerk. Somit könnte *E. bovis* der Zugang zu zellulären Makromolekülen ermöglicht werden, die zur letztendlichen Reifung des Parasiten beitragen könnten.

Eine Modulation der Mikrotubuli durch intrazelluläre Parasiten könnte ebenfalls im Zusammenhang mit „wirtszelleigenen Immunreaktionen“ stehen, da die Vermehrung dieser Zytoskelettelemente um die PV als eine Art Barriere für Phagolysosomen angesehen werden kann (Andrade et al., 2001). In unseren Untersuchungen wurde ab Tag 15 p. i. eine deutliche Verstärkung des Mikrotubuli-Netzwerks um die PV von *E. bovis* beobachtet (siehe **Veröffentlichung 5.5**), was auch in dem oben genannten Zusammenhang bewertet werden kann. Dies deutet zudem an, dass *Eimeria* spp. grundsätzlich in der Lage sind, sich gegen intrazelluläre Abwehrmechanismen der Wirtszelle zu wehren. Bei naheverwandte *Eimeria*-Arten der Ziege, wurde kürzlich über die Regulierung von  $\beta$ -Defensin-2-Genen ebenso ein Eingriff des Parasiten in zelleigene Abwehrmechanismen beobachtet (Ibarra-Velarde und Alcalá-Canto, 2007).

Die Bewertung der Spektrendaten wurde dadurch erschwert, dass sowohl Sporozoiten als auch die sich entwickelnden Merozoiten I diese Moleküle exprimieren, was eine Quantifizierung

im Hinblick auf die Wirtszelle nahezu unmöglich machte. Innerhalb der reifen Meronten konnten trotzdem eine verstärkte Einlagerung von Spektrin in die Septen der Merontenkammern beobachtet werden. Daten zur Präsenz von Spektrin in *Eimeria*-Stadien fehlen bisher; bei *T. gondii*-Stadien sind Spektrin-ähnliche Proteine im apikalen Bereich bereits belegt (Ghazali et al., 1995).

Über die Funktionen von Spektrin werden bislang nur Mutmaßungen angestellt. Diskutiert wird die Formation eines Netzwerks, das ähnliche Funktionen wie das Spektrin der Erythrozyten innehaben könnte und somit zur Strukturhaltung, Organisation von Mikrodomänen, Transport und Selektion von Proteinen, Vesikelbildung, Herstellung einer Verbindung zum mikrotubulären Zytoskelett sowie zur Ausbildung eines „spectrin-ankyrin adapter-protein trafficking system“ (SAATS) dienen könnte (Beck et al., 1997, Devarajan et al., 1997, De Matteis und Morrow, 1998, Lippincott-Schwartz, 1998; Stankewich et al., 1998, Holleran und Holzbaur, 1998).

Vimentin sollte als Intermediärfilament eine dominante Komponente des Zytoskeletts der Endothelzelle darstellen. In den verwendeten BUVEC und BSLEC konnte jedoch sowohl bei infizierten, als auch bei Kontrollzellen nur eine diffuse Färbung im Zytosol beobachtet werden. Es waren keine filamentösen Strukturen zu erkennen, obwohl solche Elemente in anderen bovinen Zellen unter Verwendung desselben Antikörpers nachgewiesen werden konnten. Ursache hierfür könnte z. B. eine bereits beim Menschen (Bart et al., 2005, Natsuga et al., 2005) und Rind (Matthews and Allen, 2005) beschriebene Mutation des Plektin-Genes sein, welches indirekt eine Beeinträchtigung der Ausbildung der Vimentinfilamente nach sich zieht.

Über die molekularen Mechanismen, die der Beeinflussung des Zytoskeletts durch Apicomplexa zugrunde liegen, ist bisher nur wenig bekannt. In *C. parvum*-infizierten

Humanepithelzellen wurde die Stimulation der Gentranskription von Proteinen beschrieben, die mit der Bindung und Polymerisierung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli in Zusammenhang stehen (Deng et al., 2004). Darüber hinaus induzierten intrazelluläre *C. parvum*-Sporozoitene bestimmte Kinasen, welche indirekt für die Polymerisierung von Mikrotubuli und Aktinfilamente benötigt werden (Forney et al., 1999).

Insgesamt verdeutlichen die in **Veröffentlichung 5.5** vorgestellten Daten, dass es zu signifikanten Veränderungen des Zytoskeletts im Zuge der ersten Merogonie von *E. bovis in vitro* kommt. Die Beeinflussung des Zytoskeletts durch *E. bovis* könnte dabei folgenden Strategien folgen: *i*) Erhalt der Wirtszellstabilität während der Makromerontenbildung, *ii*) Rekrutierung von Wirtszellorganellen zur PV als Nahrungsquelle und *iii*) Inhibition der Fusion von Phagolysosomen mit der PVM.

#### **4.9 *Eimeria bovis*-Antigene auf der Oberfläche infizierter Wirtszellen *in vitro***

Die im Vergleich zu anderen *Eimeria*-Arten recht lange Persistenz der ersten Merogonie von *E. bovis* wirft in Anbetracht bereits in der Präpatenz einsetzender, starker humoraler und zellulärer Immunreaktionen (Fiege et al., 1992; Hermosilla et al., 1999) Fragen nach parasitenspezifischer Antigenexpression einerseits und nach Evasionsstrategien des Parasiten andererseits auf. Nach allen bisherigen, zumeist im Nagermodell durchgeführten Studien, stellen Sporozoitene oder frühe Merontene I die Hauptziele protektiver Immunreaktionen bei immunen Tieren dar (zusammenfassend bei Shi et al., 2000). Auch im Falle von *E. bovis* deuten Daten einer älteren Studie (Hammond, 1963) auf frühe Schizontene als Ziel der Immunität hin. In diesem Zusammenhang erscheint es von Interesse, dass sich auf der Oberfläche *E. bovis*-infizierter Wirtszellen immunreaktives Material *in vitro* nachweisen lässt, das Antikörper aus immunen Kälbern bindet. In der vorliegenden Arbeit (siehe

**Veröffentlichung 5.7)** sollten daher diese parasitenspezifischen Antigene auf der Wirtszelloberfläche (*Eimeria bovis* host cell surface antigens; EbHCSAg) dargestellt und näher charakterisiert werden.

Dass die Oberfläche infizierter, sich entwickelnde oder reife Meronten enthaltender Wirtszellen modifiziert wird, zeigte sich deutlich in den Untersuchungen zur Erfassung von EbHCSAg (siehe **Veröffentlichung 5.7**). Sobald die Replikation der intrazellulären Erreger begonnen hatte (ab dem 7. Tag p. i.), wiesen die Wirtszellen unabhängig vom Zelltyp Komponenten auf der Oberfläche auf, die mit dem Serum immuner Kälber reagierten. Eine solche Reaktivität konnte auch mit Seren aus mit *E. bovis*-Merozoiten I immunisierten Ratten nachvollzogen werden. Die beginnende Merogonie war aber offensichtlich Voraussetzung, denn an VERO-Zellen, die zwar Sporozoitien enthielten aber keine weitere Entwicklung zuließen, banden Antikörper entsprechend nicht. Auch die mit dem Fortschreiten der Merogonie zu beobachtende Intensivierung der Reaktionen spricht für einen Zusammenhang der immunreaktiven Oberflächenkomponenten mit der intrazellulären Proliferation und Reifung von *E. bovis*-Meronten. Auch die beobachtete, wirtszellabhängige Graduierung der Reaktion passt ins Bild, da die am stärksten reagierenden Zellen (BFGC) zugleich diejenigen sind, die die höchste Anzahl von Merozoiten produzieren (siehe **Veröffentlichung 5.1**). Allerdings traten teils deutliche Unterschiede zwischen individuellen, zeitgleich infizierten Zellen auf. Da sich *E. bovis* innerhalb eines Zellrasens nicht synchron entwickelt, könnte diese Beobachtung mit unterschiedlichen Reifegraden der Meronten zusammenhängen. Es erscheint denkbar, dass ein Zusammenhang mit der rasterelektronenmikroskopisch beobachteten Vielfalt der Wirtszelloberfläche nach Infektionen besteht, doch konnte diese Frage im Rahmen der hier durchgeführten Versuche nicht beantwortet werden.

Das zeitliche Auftreten von EbHCSAg auf der Oberfläche infizierter Wirtszellen entsprach nicht dem Erscheinen reaktiver Antikörper in primär infizierten Kälbern. Im Gegenteil, weder die in der Präpatenz noch in der beginnenden Patenz von *E. bovis*-infizierten Kälbern

gebildeten Antikörper reagierten mit infizierten Zellen *in vitro*. Frühestens ab 29 Tage p. i., also gegen Ende der Patenz und später enthielten die Seren spezifisch reagierende Antikörper. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen diese Oberflächenantigene, im Gegensatz zu zahlreichen anderen Antigenen, offensichtlich verzögert einsetzt (vgl. Fiege et al., 1992).

Im Gegensatz zur humoralen Immunreaktion *E. bovis* primär infizierter Kälber, scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Auftreten von EbHCSAg und der Reaktivität von T-Zellen zu bestehen. So konnte eine deutliche erhöhte Proliferationsleistung und IFN- $\gamma$ -Produktion von PBMC um Tag 8 p. i. beobachtet werden (Hermosilla et al., 1999; Taubert et al., 2007). Dies erscheint insbesondere deshalb interessant, da die bei Reinfektion entstehende Immunität offensichtlich zellulär und nicht humoral (Fiege et al., 1992) vermittelt wird.

Die weiterhin durchgeführten Experimente bestätigen, dass die fraglichen EbHCSAg tatsächlich auf der Oberfläche der Wirtszelle auftreten und parasitären Ursprungs sind. Anhand der immunelektronmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *E. bovis*-spezifische Antikörper an Komponenten auf der Zelloberfläche banden (siehe **Veröffentlichung 5.7**). Diese Studien erbrachten keine Hinweise auf „knob“-ähnliche Veränderungen wie sie z. B. bei *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten auftreten (zusammenfassend bei Wickham et al, 2000). Im Falle von *E. bovis* schien das EbHCSAg eher homogen auf der Wirtszelloberfläche verteilt zu sein. Um die EbHCSAg näher zu charakterisieren, wurden unterschiedliche chemische Oberflächenbehandlungen infizierter Zellen durchgeführt.

Die EbHCSAg waren von der Wirtszellwand nicht mit 1 M NaCl abzuspalten, eine Behandlung, die die Unterscheidung zwischen peripheren und integralen Membranproteine

ermöglicht (Thomas und McNamee, 1990). Es kann somit gefolgert werden, dass diese Antigene eher in die Zellmembran integriert sind.

Ohne Effekte blieb auch die Behandlung mit Phospholipase C. Die EbHCSAg inserieren demnach wahrscheinlich nicht über GPI-Anker in der Wirtszellemembran. Eine solche Verankerung ist zwar bisher auch bei anderen Apicomplexa, z. B. Plasmodien (vgl. Gowda, 2002) bekannt, die Frage war jedoch von grundlegendem Interesse, da GPIs sich grundsätzlich in Homogenaten von *E. bovis*-Merozoiten (Zahner und Schwarz, pers. Mittlg.) und anderen Apicomplexa (Manger et al., 1998) nachweisen lassen und diese Strukturen ein hohes pathogenes Potential besitzen (Gowda, 2002, Debierre-Grockiego et al., 2003). Die Ergebnisse der Phospholipase C-Behandlung sprechen weiterhin dagegen, dass Phosphylcholin (PC)-haltige Antigene einen wesentlichen Bestandteil der EbHCSAg stellen. PC-haltige Antigene wurden bei *E. bovis* bereits beschrieben und waren offensichtlich in Mikronemen besonders stark vertreten (Heise et al., 1999).

Die Behandlung mit CHAPS als zwitterionischem Detergens hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Oberflächenantigenität infizierter Wirtszellen. Dagegen wurde mit nicht-ionischen Detergentien eine partielle, sich in einer generell abgeschwächten Fluoreszenz im IIFT äußernden Extraktion der EbHCSAg erreicht (siehe **Veröffentlichung 5.7**). Die letzteren Ergebnisse erlauben jedoch keine Aussage darüber, ob aus der Gesamtheit der EbHCSAg einzelne Antigene extrahiert wurden oder ob ganze Gruppen von Antigenen betroffen waren. Da unter Anwendung von Proteinase K ein deutlicher Effekt eintrat, spricht dies letztendlich dafür, dass es sich bei EbHCSAg um Proteine handelt, oder dass sie zumindest mit Proteinstrukturen assoziiert sind.

Die vergleichende Studie der ungereinigten und an Merozoiten I und Sporozoiten affinitätsgereinigten Immunsereen zeigten interessante Spezifitäten auf. Während die ungereinigten Immunsereen an die Oberfläche beider Parasitenstadien banden, beschränkte sich die Reaktion der affinitätsgereinigten Antikörper auf Merozoiten-Antigen (siehe

**Veröffentlichung 5.7).** Demnach scheint es sich bei EbHCSAg um Merozoiten-spezifische Antigene zu handeln, die nicht auf Sporozoiten vorkommen. Bei Methanol-fixierten Parasiten, also solchen Stadien, bei denen die inneren Strukturen Antikörpern zugänglich waren, ergaben sich gleichermaßen eindeutige Unterschiede: das ungereinigte Immuneserum erfasste bei Sporozoiten unter Aussparung der refraktilen Körperchen das gesamte Zellinnere, während affinitätsgereinigte Antikörper mit Sporozoiten nicht reagierten. Im Falle der Merozoiten beschränkte sich die Bindung der gereinigten Antikörper auf den Bereich apikal des Zellkerns. Dieses Reaktionsbild könnte auf die Erfassung von Mikronemen von *E. bovis* schließen lassen. Diese Vermutung wurde durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt. Neben Mikronemen banden die Antikörper zusätzlich an Antigene der Dichte Granula. Diese Ergebnisse sprechen insgesamt für eine ausgeprägte, organell-spezifische Expression sowie für eine deutliche Stadienspezifität der EbHCSAg.

Die Beobachtung, dass die refraktilen Körperchen der Sporozoiten von ungereinigten Immuneseren nicht erfasst wurden, ist in ihrer Bedeutung schwer bewertbar. Abrahamsen et al. (1994a, b) berichteten, dass *E. bovis*-Antigene (Eb-25/50) aus den refraktilen Körperchen in der Lage sind, die PV zu durchwandern und sich im Zytosol der Wirtszelle verteilen. Da aber reife Merozoiten I, welche vermutlich EbHCSAg synthetisieren, keine Transkripte von Eb-25/50 aufweisen (Abrahamsen et al., 1994) sollten diese Antigene keine entscheidende Komponente von EbHCSAg darstellen.

Anhand der IIFT- und immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten als intrazelluläre Bindungsstellen der affinitätsgereinigten Antikörper Mikronemen und Dichte Granula der *E. bovis*-Merozoiten I identifiziert werden. Proteine der Dichte Granula von *Eimeria* spp. werden eher in der Spätphase der Merogonie synthetisiert, in die PV abgegeben und sind z. T. in dem sog. tubulo-retikulärem Netzwerk in der Vakuole und Vakuolenmembran lokalisiert (Dubremetz et al., 1998, Blackman und Bannister, 2001,

Sibley, 2003). Insbesondere Studien über das sog. Dichte Granula RESA Antigen von *P. falciparum* (Pf 155), welches auch auf der Erythrozytenoberfläche vorkommt (Aikawa et al., 1990), könnten ein indirekten Hinweis dafür geben, dass einige der EbHCSAg in den Dichte Granula synthetisiert werden und anschließend an die Oberfläche der Wirtszelle gelangen.

Bezüglich der Funktion der EbHCSAg im Verlauf einer *E. bovis*-Infektion kann zur Zeit nur spekuliert werden. Sie sind sicherlich nicht mit den *var*-Antigenen bei *P. falciparum* (siehe Craig und Scherf, 2001) oder den *ves*-Antigenen von Babesien (zusammenfassend bei Allred et al., 2000) gleichzusetzen, da diese Antigene als sog. Adhäsionsantigene gelten und eher über ihre Variabilität in der Evasionsstrategie dieser Blutparasiten eine Rolle spielen. So scheint auch die Beteiligung von EbHCSAg bei der humoralen Immunantwort als eher unwahrscheinlich, da spezifisch gegen EbHCSAg gerichtete Antikörper erst am Ende der Patenz der Rinderkokzidiose beobachtet werden und die humorale Immunantwort insgesamt nicht protektiv ist (Fiege et al., 1992). Es wäre von besonderem Interesse zu untersuchen, ob Peptide der EbHCSAg an MHC-I-Molekülen gebunden werden und somit bei der CD8<sup>+</sup>-vermittelten Immunantwort im Verlauf der Reinfektion eine Rolle spielen könnten. Die Ergebnisse dieser Studie lassen insgesamt jedoch vermuten, dass die sehr stadienspezifischen Parasitenmoleküle aus Mikronemen und Dichte Granula neue, noch unbekannt Funktionen bei der Immunantwort gegen *E. bovis* innehaben könnten.



## 4.10 Erfassung von MHC-Molekülen auf *Eimeria bovis*-infizierten Endothelzellen

### 4.10.1 Etablierung eines Testsystems zur simultanen Erfassung von MHC-Molekülen und intrazellulären *E. bovis*-Sporozoiten bei bovinen Endothelzellen

In den erarbeiteten *in vitro*-Systemen war es nicht möglich, mit Zellrasen zu arbeiten, die zu annähernd 100 % infiziert waren. Um jedoch die Expression der MHC-Moleküle jeweils infizierten oder nicht-infizierten Zellen zuordnen zu können und somit Analysen auf Einzelzellebene durchzuführen, bedurfte es eines adäquaten Testsystems. Dazu wurde ein fluoreszenzbasiertes System etabliert, bei dem mittels FACS-Analysen sowohl die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen als auch intrazelluläre Sporozoiten simultan erfasst werden konnten. Zur Färbung der Sporozoiten wurde der membran-durchlässige Farbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) verwendet, der die Eigenschaft besitzt, bei der Zellteilung auf die nächste Generation übertragen zu werden und sich somit z. B. für Langzeitfärbungen und zur Verfolgung bestimmter Lymphozytenpopulationen *in vitro* und *in vivo* eignet (Lyons and Parish, 1994, Lyons, 2000, Becker et al., 2004). In Vortests konnte gezeigt werden, dass diese Färbung mit diesem Farbstoff keinen nachteiligen Effekt auf Vitalität oder Infektiosität der Sporozoiten hat. Die CFSE-Färbung wurde auch erfolgreich zur Bestimmung von Infektionsraten für Studien zur Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle bei *C. parvum* und *C. hominis* verwendet (Feng et al., 2006).

Die Quantifizierung der Infektionsraten bei *E. bovis*-infizierten BUVEC wurde durch die Färbung mit CFSE erheblich erleichtert. Mit CFSE-Sporozoiten infizierte BUVEC konnten schnell und reproduzierbar über FACS-Analysen von nicht-infizierten Zellen unterschieden werden (siehe **Veröffentlichung 5.8**). Die CFSE-Sporozoiten behielten ihre Fähigkeit zur „gliding motility“, welche Voraussetzung für die Invasion der Wirtszelle ist, und entwickelten sich zudem zu reifen fluoreszierenden Makromeronten bis zum 22. Tag p. i. (siehe

**Veröffentlichung 5.8).** In Übereinstimmung zu unseren Ergebnissen wurde die „gliding motility“ der Sporozoiten von *Cryptosporidium* spp. durch CFSE-Färbung ebenfalls kaum beeinträchtigt (Feng et al., 2006). Die „gliding motility“ der CFSE-Sporozoiten von *E. bovis*, konnte auch indirekt in Form von fluoreszierenden Spuren auf dem überwanderten Untergrund nachgewiesen werden. Da insbesondere die sog. MIC-Proteine an der Fortbewegung von Sporozoiten beteiligt sind (Soldati et al., 2004), könnte dies als Hinweis auf die Färbung solcher Proteine mit CFSE gewertet werden.

Sowohl in CFSE-gefärbten Sporozoiten als auch in sich entwickelnden Trophozoiten waren die refraktilen Körperchen besonders stark gefärbt. Im apikalen Bereich der Parasiten ließ sich eher eine abgeschwächte, diffuse Fluoreszenz nachweisen, die aller Wahrscheinlichkeit nach auch Mikronemen anfärbte. In reifenden und reifen *E. bovis*-Makromeronten waren insbesondere in der Peripherie dieser Stadien kleine, rundliche fluoreszierende Strukturen zu erkennen. Die refraktilen Körperchen bei Eimeriidae sind die prominentesten Organellen der Sporozoiten. Analysen zum Proteom dieser Organellen bei Eimerien belegen, dass sie als Reservoir für eine Vielzahl von Proteinen, u. a. für solche, die für die Wirtszellinvasion benötigt werden, dienen (de Venevelles et al., 2006). Im Zuge der ersten Merogonie von *Eimeria* spp. kommt es zu einer Größenabnahme der refraktilen Körperchen (Doran, 1982). Dies könnte einerseits durch die Freisetzung von refraktilem Material bedingt sein, andererseits wurde das Abschnüren von bläschen-ähnliche Strukturen beobachtet (Doran, 1982, Danforth und Augustine, 1989), was eine Erklärung für die charakteristisch peripher-vesikuläre CFSE-Färbung bei *E. bovis*-Meronten bieten könnte (siehe **Veröffentlichung 5.8**). Die fehlende Färbung der reifen Merozoiten I liegt vermutlich der starken Replikation der Parasiten und dem damit verbundenen Verdünnungseffekt des Farbstoffes zugrunde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CFSE-Färbung nicht nur die Darstellung der Parasiten sondern auch die Differenzierung von infizierten und nicht-infizierten Zellen durch Methoden wie die FACS-Analyse vereinfacht. Die Bestimmung der Infektionsraten *in vitro*

wurde durch diese Technik enorm vereinfacht und erlaubte zudem phenotypische Studien der parasitierten Wirtszelle.

#### ***4.10.2 Charakterisierung der MHC-Expression und -Transkription bei Eimeria bovis-infizierten Zellen***

Mit Hilfe des unter 4.10.1. beschriebenen Testsystems wurde der Simultannachweis von entweder MHC-I- oder MHC-II-Molekülen und intrazellulären CFSE-Sporozoit in BUVEC durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnte die Anwendbarkeit der CFSE-Technik klar gezeigt werden, deutliche Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten BUVEC konnten im Verlauf der Infektion jedoch nicht beobachtet werden. Von anderen Apicomplexa ist dagegen bekannt, dass sie sehr effizient die MHC-Expression der parasitierten Zelle hemmen können. So konnte bei mit *T. gondii*-infizierten Wirtszellen eine deutlich verminderte MHC-Expression beobachtet werden (Lüder et al., 1998, 2001, 2003). Aber auch bei nicht-apikomplexen Protozoen, wie *Leishmania amazonensis*, wurde eine reduzierte MHC-Expression in befallenen Makrophagen beobachtet (Courret et al., 2001).

Für Untersuchungen an *E. bovis*-infizierten Zellen wurden zwei BUVEC-Isolate mit drei unterschiedlichen Infektionsdosen infiziert und bis zum 14 Tag p. i. analysiert. Die MHC-I- und MHC-II-Expression von *E. bovis*-infizierten BUVEC erschien im Verlauf der ersten Merogonie kaum verändert. Allenfalls konnte eine tendenzielle Zunahme der Dichte der MHC-Moleküle pro Zelle über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet werden (siehe **Veröffentlichung 5.8**). Bei der Infektionsdosis von  $7.5 \times 10^5$ /Flasche wurde eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität für die mit anti-MHC-konjugiertem APC-Antikörpern markierten BUVEC gemessen im Vergleich zu nicht-infizierten BUVEC (siehe

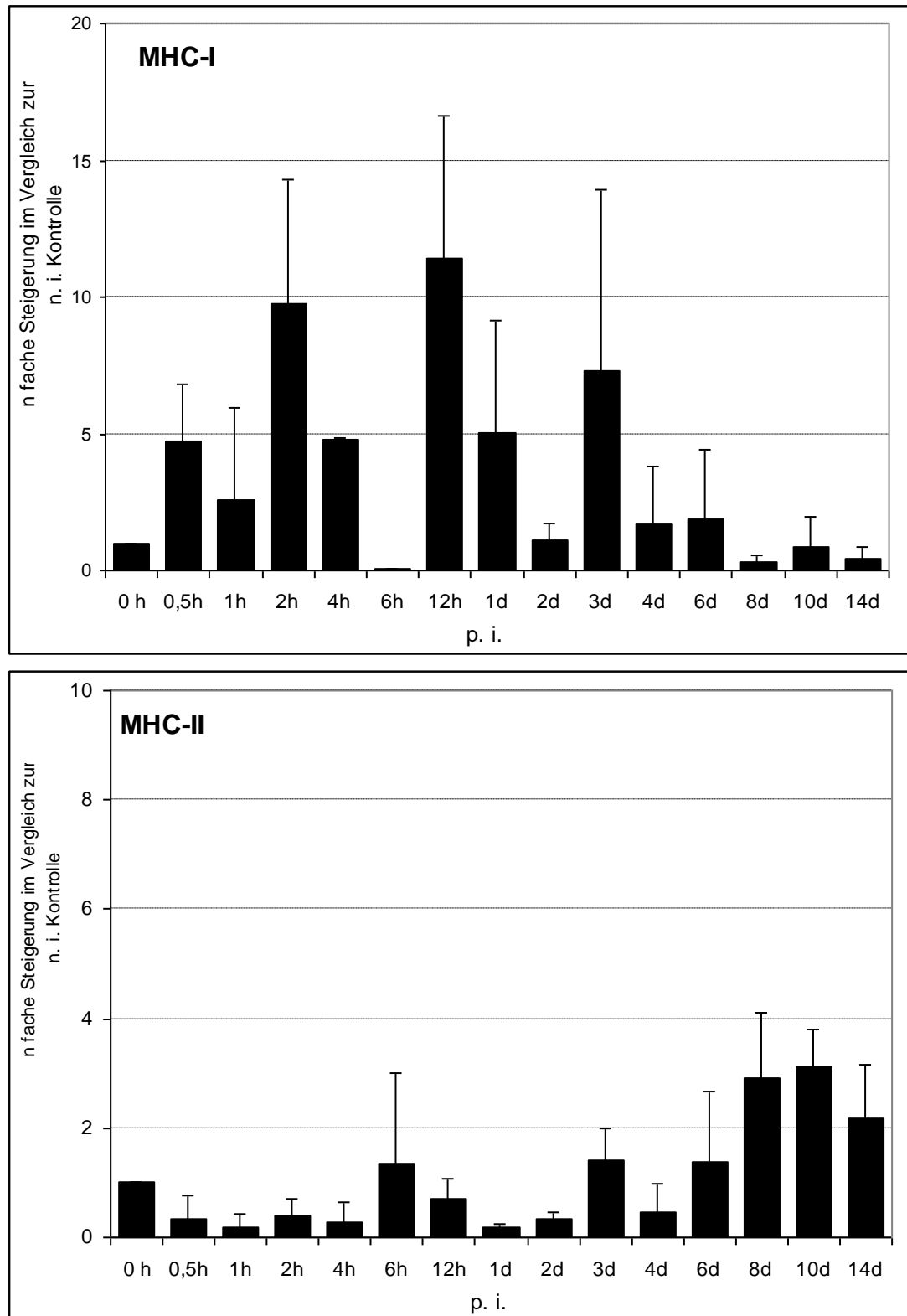
**Veröffentlichung 5.8).** Diese moderate Zunahme der MHC-Expression in infizierten BUVEC ( $7.5 \times 10^5$  Sporozoiten/Flasche) konnte in weiteren BUVEC-Isolaten bestätigt werden.

Weiterhin wurden Studien unternommen, um die Transkription der MHC-I- und MHC-II-Gene im Verlauf der ersten *E. bovis*-Merogonie in BUVEC *in vitro* zu erfassen. Zu diesem Zweck, wurden drei verschiedene BUVEC-Isolate mit  $2.5 \times 10^5$  Sporozoiten infiziert. Auch auf Transkriptionsebene ließen sich für beide Gene eine leichte Zunahme feststellen, wobei die höchsten Werte der MHC-I-Gentranskription in der Frühphase gemessen wurde (12 h p. i.). Danach blieb die Gentranskription bis 3 Tage p. i. auf einem höheren Niveau im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen (siehe Abb. 11). Bei der MHC-II-Gentranskription wurde erst gegen Mitte bis Ende (8-14 Tag p. i.) der Merogonie eine moderate Hochregulation beobachtet (Abb. 11B).

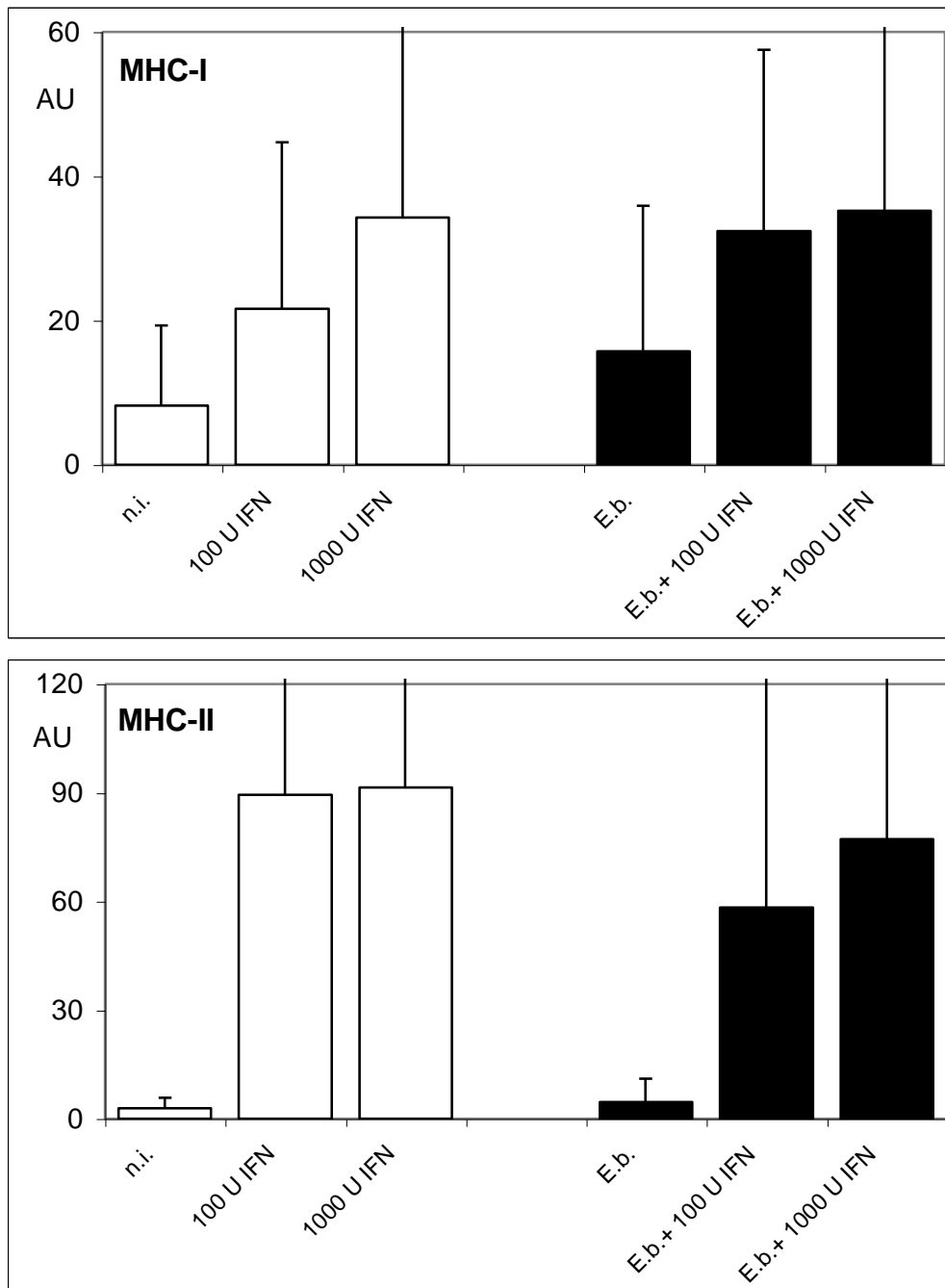
In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von IFN- $\gamma$ , das zuvor als potenter Induktor beider MHC-Moleküle auch im bovinen System bestätigt wurde, bei einer *E. bovis*-Infektion auf die MHC-Gentranskription überprüft. Dazu wurden drei unterschiedliche BUVEC-Isolate 4 h p. i. mit unterschiedlichen Dosen IFN- $\gamma$  stimuliert und mittels Realtime RT-PCR die Transkription der MHC-I- und II-Gene untersucht. Verglichen mit den nicht-infizierten Kontrollen kam es jedoch in keinem Fall zu einer signifikanten Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -induzierten MHC-Gentranskription durch *E. bovis* (siehe Abb. 12)

Die hier dargestellten Ergebnisse auf Transkriptionsebene bestätigen die bereits in **Veröffentlichung 5.8** vorgestellten Daten, die besagen, dass es im Zuge einer *E. bovis*-Infektion *in vitro* eher zu einer Zunahme als zu einer Abnahme der MHC-Expression kommt. Damit scheint die Beeinflussung der MHC-Moleküle durch *E. bovis* nicht in einem Zusammenhang mit einer Immunevasion zu stehen. Interessanterweise konnte auch im Falle einer *T. gondii*-Enzephalitis in CD200<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht nur eine Zunahme der Mikroglia-Aktivitäten festgestellt werden, die sich in einer erhöhten TNF- und iNOS-Produktion

äußerte, sondern auch eine erhöhte MHC-II-Expression auf der Oberfläche dieser Zellen belegt werden (Deckert et al., 2006). Auch bei Protozoen aus dem Stamm der Euglenozoa liegen Berichte zur Hochregulation von MHC-Molekülen vor, insbesondere bei *Leishmania* spp. Histopathologische Befunde in Lymphknoten von Hunden mit einer viszeralen Leishmaniose zeigten, dass es bei Lymphozyten aus dieser Region zur Hochregulation der MHC-II-Expression kommt (Giunchetti et al., 2007). Auch bei viralen Infektionen, wie z. B. einer Coronavirus verursachte Encephalomyelitis wurde eine Induktion der MHC-II-Expression in befallenen Gliazellen beobachtet. Die Autoren mutmaßen, dass die Konsequenz dieser Hochregulation in einer effizienteren T-Lymphozyten-Aktivierung liegen könnte (Hamo et al., 2007). Diese Virus-induzierte MHC-II-Hochregulation führte zur Retention von Astrozyten und Mikrogliazellen am Infektionsort. Insbesondere Astrozyten zeigten nach der Coronavirus-Infektion eine phänotypische Hochregulation von MHC-I im Gegensatz zu Mikroglia im ZNS (Hamo et al., 2007). Dies verdeutlicht, dass im Zuge unterschiedlicher Infektionen sehr variable MHC-Modulationen vorkommen und somit auch der Ausgang der Immunantwort variieren kann.



**Abb. 11** Transkription der MHC-I- und MHC-II -Gene im Verlauf einer *Eimeria bovis* Infektion in BUVEC. Drei unterschiedliche BUVEC-Isolate wurden mit  $2,5 \times 10^5$  Sporozoiten infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten p. i. wurde Total-RNA gewonnen, in cDNA revers transkribiert und mittels Realtime RT-PCR unter Einsatz spezifischer TaqMan®-Sonden und Primern für die MHC-I- und MHC-II-Gene untersucht.



**Abb. 12** Transkription der MHC-I- und MHC-II-Gene in *Eimeria bovis* infizierten BUVEC nach Stimulation mit bovinem rekombinantem IFN $\gamma$ . Drei unterschiedliche BUVEC-Isolate wurden 4 h p. i. mit unterschiedlichen Dosen IFN $\gamma$  (100 U/ml, 1000 U/ml) stimuliert. 6 h nach Stimulation wurde Total-RNA gewonnen, in cDNA revers transkribiert und mittels Realtime RT-PCR unter Einsatz spezifischer TaqMan $^{\circledR}$ -Sonden und Primern für die MHC-I- und MHC-II-Gene untersucht.

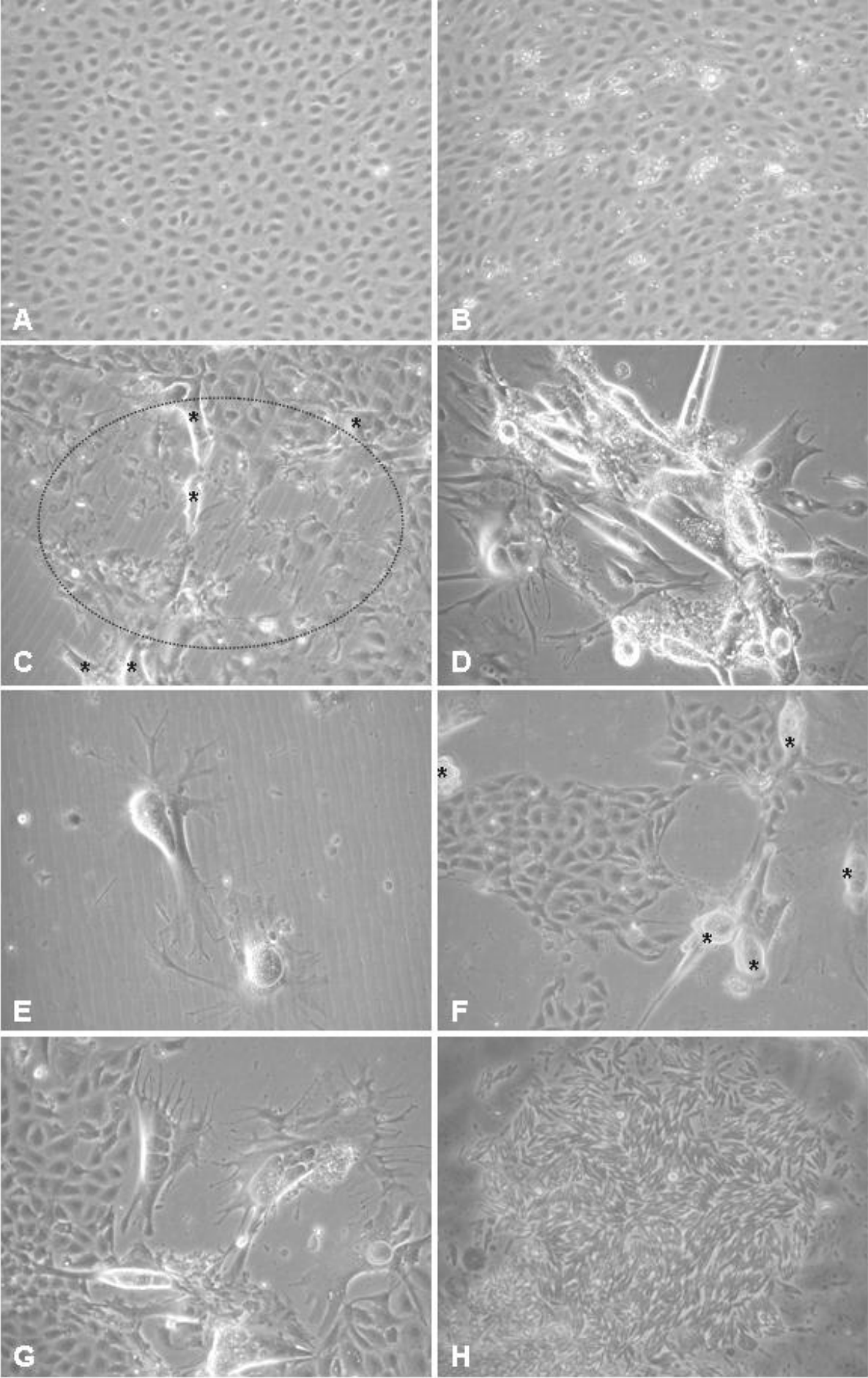
#### 4.11 *Eimeria bovis* moduliert die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle

Mit den in **Veröffentlichung 5.9** vorgestellten Experimenten sollte überprüft werden, ob *E. bovis* die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle negativ beeinflussen kann, wie es für andere intrazelluläre Parasiten wie *T. gondii* (Goebel et al., 1999, Lüder und Gross, 2005), *N. caninum* (Nishikawa et al., 2002), *C. parvum* (Chen et al., 2001, Mele et al., 2004), *Plasmodium* spp. (Doolan und Hoffman, 2000, Van de Sand et al., 2005) und *Theileria parva* (Heussler et al., 2001) beschrieben wird. Auch im Falle der naheverwandten Arten *E. tenella* und *E. necatrix* beim Huhn wurde eine Hemmung der Apoptosefähigkeit von infizierten Epithelzellen *in vivo* belegt (Del Cacho et al., 2004).

Während der *in vitro*-Kultur von *E. bovis*-Sporozoitien in BUVEC haben wir insbesondere bei der Verwendung von hohen Infektionsdosen wiederholt beobachtet, dass es unter dem Stress der Infektion zu einem vermehrten Absterben von BUVEC kommt. Dabei sind jedoch in erster Linie nicht-infizierte Zellen betroffen; infizierte Zellen überleben i. d. R. zu einem hohen Prozentsatz und der Parasit entwickelt sich normal weiter. Zum Teil ist das Absterben der Zellen so dramatisch, dass nur noch infizierte Zellen in den Zellkulturflaschen verbleiben und erst später wieder von nicht-infizierten Zellen umwachsen werden. Zur Veranschaulichung siehe Abb. 13 und **Veröffentlichung 5.9**.

**Abb. 13** *In vitro*-Entwicklung von *Eimeria bovis* in BUVEC im Hinblick auf Apoptose-Hemmung. (A) intakter Zellrasen nicht-infizierter Zellen, (B) mit Sporozoitien infizierte Zellen einen Tag p. i.; der Zellrasen ist intakt, (C) infizierte Zellen 18 Tage p. i.; vermehrtes Absterben (eingekreist) der die infizierten Zellen (\*) umgebenden, nicht-infizierten Zellen, (D) Bildung von Agglomeraten infizierter, merontentragenden Zellen (20 Tage p. i.), (E) vereinzelte infizierte, merontentragende Zellen (20 Tage p. i.), (F) langsames Auswachsen nicht-infizierter Zellen zwischen infizierten, merontentragenden Zellen (\*, 22 Tage p. i.), (G) zunehmende Vervollständigung des neuen Zellrasens (24 Tage p. i.), (H) Platzen eines reifen Meronten mit Freisetzung von Merozoiten





In den Experimenten zur Apoptose-Inhibition (siehe **Veröffentlichung 5.9**) sollten ursprünglich BFGC, BUVEC und VERO als Wirtszellen verwendet werden. Es stellte sich jedoch bei der Ermittlung optimaler Apoptoseinducerkonzentrationen und -Inkubationszeiten heraus, dass BUVEC extrem empfindlich und nicht-reproduzierbar auf Behandlungen dieser Art reagierten und für diese Zellen somit kein reproduzierbares Testsystem etabliert werden konnte. In Folge beschränkten sich die entsprechenden Versuche auf BFGC- und VERO-Zellen (hier dringt der Sporozoit von *E. bovis* ein, entwickelt sich aber nicht weiter, vgl. **Veröffentlichung 5.1**). In Nativ-Untersuchungen sowie in TUNEL-Assays zeigte sich, dass *E. bovis* die Apoptosefähigkeit infizierter BFGC- und VERO-Zellen in Reaktion auf Actinomycin D, Colchicin oder Cytochalasin B grundsätzlich hemmt (siehe **Veröffentlichung 5.9**).

Bestrebungen, eine *E. bovis*-induzierte Beeinflussung der Frühapoptose über Annexin V nachzuweisen, scheiterten. Der Nachweis von Annexin V ist in dieser Hinsicht ein anerkanntes Verfahren, bei dem die im Rahmen der Frühapoptose auf die Oberfläche der Zelle translozierten Phosphatidylserine von Annexin V mit hoher Affinität gebunden werden. Es wurde versucht, dieses Verfahren auf *E. bovis*-infizierte BFGC, bei denen über Colchicin, Actinomycin D oder Cytochalasin Apoptose induziert wurde, anzuwenden. Bereits bei der Etablierung der Positiv- und Negativ-Kontrollen tauchten Probleme in dem Sinne auf, dass immer alle untersuchten Proben positiv waren. Entsprechend konnte den Befunden *E. bovis*-infizierter Zellen kein Glauben geschenkt werden. Auch die intensive Austestung von Annexin V-Proben unterschiedlicher Hersteller, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren (Alexa 488; FITC), brachte keine maßgebliche Verbesserung der Ergebnisse.

Um den molekularen Mechanismus der *E. bovis*-induzierten Apoptosehemmung detaillierter zu klären, wurden einige in den Signalkaskaden involvierte Proteine untersucht. Leider mussten die Untersuchungen wegen mangelnder Verfügbarkeit von Antikörpern im bovinen

System auf wenige Moleküle beschränkt werden. Für bovine Zellen standen letztendlich nur kreuzreagierende Antikörper aus dem Humansystem gegen c-FLIP, Bcl-2 und c-IAP1 zur Verfügung (vgl. Heussler et al., 2001). Während c-FLIP die Caspase 8-Aktivität unterbindet (Thome und Tschopp, 2001) ist c-IAP1 in der Lage, die Effektor-Caspasen-3, -6, -7 und -9 effizient zu blocken (Küenzi et al., 2003). Bcl-2, welches die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien blockiert, kann den sog. endogenen Weg der Apoptose inhibieren.

Die Arbeiten mit diesen monoklonalen Antikörpern gegen die obengenannten inhibitorischen Proteine der Apoptosekaskade lieferten eindeutige Ergebnisse. In konfokalmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, ähnlich wie bei *T. parva* (Küenzi et al., 2003), eine vermehrte Expression von c-IAP1 und c-FLIP in *E. bovis*-infizierten Zellen verglichen mit nicht-infizierten Kulturen (siehe **Veröffentlichung 5.9**). Dagegen konnte die Bcl-2-Expression in den unterschiedlichen Wirtszellsystemen nicht nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität auf Einzelzellebene (infizierte und nicht-infizierte Zellen) ergab eine signifikante ( $P < 0.005$ ) Zunahme für c-IAP1 und c-FLIP in *E. bovis*-infizierten Zellen. Über Westernblotanalysen konnte diese Beobachtung zumindest für c-FLIP verifiziert werden. So war in *E. bovis*-infizierten BFGC an den Tagen 2, 3, 5 und 6 p. i., die c-FLIP-Expression verstärkt (siehe **Veröffentlichung 5.9**).

Des Weiteren wurden *E. bovis*-infizierte BFGC und VERO-Zellen hinsichtlich der Expression der Kaspasen 3, 8, 9 und bezüglich Cytochrom C (damit wäre dann der dritte und letzte Weg der Signalkaskade der Apoptoseregulation abgedeckt) bearbeitet. Hier konnte bei *E. bovis*-infizierten und über Cytochalasin B Apoptose-induzierten VERO-Zellen eine verminderte Caspase 3-Aktivität verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen nachwiesen werden (siehe **Veröffentlichung 5.9**). Somit deuten alle bisherigen Ergebnisse eindeutig auf eine parasiteninduzierte Hemmung der Apoptosefähigkeit der Wirtszelle hin.

Insgesamt verdeutlichen die genannten Befunde, dass *E. bovis* über die Induktion von c-IAP1 und c-FLIP in unterschiedliche Wege der Signalkaskade inhibitorisch einwirkt. Über die induzierte c-IAP1-Expression beeinflusst *E. bovis* aktiv den Fas/Fas-Ligand-abhängigen Weg über die Blockade der Kaspasen 3, 6, 7 und 9 (Heussler et al., 2001, Küenzi et al., 2003) und kann somit die Apoptose effizient unterbinden. Durch die parasiteninduzierte c-FLIP-Expression dagegen kann *E. bovis* zusätzlich auf dem Niveau des sog. „death receptors“ aktiv eingreifen und die Kaspase 8 inhibieren (Thome und Tschopp, 2001).

Eine Ko-Expression von c-IAP1 und c-FLIP wurde auch in *T. parva*-infizierten T-Lymphozyten beschrieben (Küenzi et al., 2001) und die Beteiligung von NF- $\kappa$ B bei der Regulation dieser Expression bewiesen (Palmer et al., 1997). Ob aber die Beeinflussung von NF- $\kappa$ B bei *E. bovis*-infizierten Wirtszellen eine entscheidende Rolle spielt, ist noch unklar. Die Tatsache, dass eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B auch bei *E. tenella*- und *E. necatrix*-Meronten-tragenden Epithelzellen *in vivo* gezeigt wurde (Del Cacho et al., 2004), könnte ein Hinweis auf einen, bei *Eimeria* spp. allgemein gültigen Mechanismus sein. Obwohl wir keinen Effekt auf den dritten, „inneren“ Weg der Kaskade über Bcl-2 nachweisen konnten, ist nicht auszuschließen, dass der Parasit auch diesen Signalweg über die Beeinflussung anderer, hier nicht untersuchter Proteine moduliert.

Andere apikomplexe Parasiten, wie z. B. *T. gondii* und *C. parvum*, beeinflussen die Apoptosefähigkeit ihrer Wirtszelle auf verschiedenen Ebenen (zusammenfassend bei Lüder et al., 2001), so z. B. auch für die Freisetzung der Merozoiten über Induktion der Wirtszellapoptose. In einem vergleichbaren Zusammenhang könnte die Hemmung von anti-apoptotischen Faktoren, wie z. B. von Bcl-x<sub>L</sub> gegen Ende der *E. tenella*- und *E. necatrix*-Merogonie zu bewerten sein, da die Induktion der Apoptose zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung evtl. die Freisetzung der Merozoiten beschleunigen könnte (Del Cacho et al., 2004). Die an *E. bovis* durchgeführten Untersuchungen beschränkten sich auf die

Anfangsphase der ersten Merogonie (1-6 Tag p. i.), daher können zu diesem Aspekt keine Aussagen gemacht werden.

Die Hemmung der Apoptosefähigkeit der Wirtszelle könnte einerseits eine wichtige Evasionsstrategie für *E. bovis* darstellen um gezielt Angriffen der Immunantwort des Wirtes zu entkommen, da apoptotische Zellen insbesondere von Phagozyten erkannt und eliminiert werden (Williams, 1994). Andererseits erscheint es essentiell, über diesen Mechanismus die mit der Entwicklung verbundene Wirtszellvergrößerung zu ermöglichen. Es ist belegt, dass Zellstress als wichtiger Induktor der Zellapoptose gilt (Van de Sand et al., 2005). Die Umfangsvermehrung ( $> 250 \mu\text{m}$ ) der Wirtszelle im Reifungsprozess der Makromeronten sollte einen nicht unbedeutenden Stressfaktor darstellen. Die TUNEL-Assay-Ergebnisse verdeutlichen, dass *E. bovis*-befallene Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen vor der Induktion der Apoptose geschützt waren. Bei *T. gondii*-infizierten Zellen wurde ähnliches beobachtet; auch hier war die Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose-Induktoren erhöht (Nash et al., 1998, Goebel et al., 1999).

## 5 VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

### 5.1 “Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells.”

Hermosilla, C. \*, Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S., and Zahner, H.

*Parasitol. Res.* (2002) **88**: 301-307

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche wesentlich
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig

Parasitol Res (2002) 88: 301–307  
DOI 10.1007/s00436-001-0531-1

ORIGINAL PAPER

C. Hermosilla · B. Barbisch · A. Heise  
S. Kowalik · H. Zahner

## Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin–Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells

Received: 26 June 2001 / Accepted: 2 October 2001 / Published online: 8 December 2001  
© Springer-Verlag 2001

**Abstract** Several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal cells (BFGC), Madin–Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells were exposed in vitro to sporozoites of *Eimeria bovis*. Parasites invaded all cells used and changed their shape to more stumpy forms within 12 h. Sporozoites left their host cells and invaded new ones frequently within the first 12 h post-infection. Further development took place only in bovine cells, although parasites survived in the other cells for at least 3 weeks. Within the non-bovine cells, conspicuously enlarged parasitophorous vacuoles developed in VERO cells and reached a diameter of 15–20 µm. The best development to first generation schizonts with regard both to time required to mature, to schizont size and to merozoite yields was observed in BFGC, followed by bovine umbilical vein and bovine spleen lymphatic endothelial cells. MDBK cells were less suitable. The life cycle was completed (development of oocysts) only occasionally in BFGC. Results are considered under several aspects. Thus, infected VERO cells may represent a suitable tool for studying the parasitophorous vacuole, while infected endothelial cells represent a system quite narrow to the in vivo situation and should allow basic studies on parasite/host cell interactions and BFGC can be used for the mass production of *E. bovis* first generation merozoites.

### Introduction

*Eimeria bovis* is one of the pathogenic coccidia of cattle which can cause severe clinical coccidiosis with sometimes fatal outcome in calves (Friend and Stockdale 1980; Dausgies et al. 1998). In general, however, a distinct degree of immunity develops which guarantees an enzootic stability (Bürger 1983). The endogenous development of the parasite includes two schizogonies, the first of which results in the formation of so-called macroschizonts. This stage develops in vivo within 15–16 days post-infection (p.i.) in endothelial cells of the central lacteals in the villi of the distal ileum, reaching a size of up to 300 µm and containing more than 120,000 merozoites (Hammond et al. 1964). Second stage schizonts, which contain only 36 merozoites, and gamonts develop in epithelial cells of the caecum (Hammond et al. 1963). Particularly the first generation schizonts of *E. bovis* are of interest in various aspects. On the one hand, the long duration of schizont maturation suggests that *E. bovis* is influencing/modifying its host cell in a way that allows the parasite to persist; e.g. it is known that *Toxoplasma gondii*, another member of the suborder Eimeriina, protects its host cell from apoptosis (e.g. Nash et al. 1998). On the other hand, there is good evidence that first generation schizonts represent a major target for protective immune reactions in animals immune to *Eimeria* spp (Speer et al. 1985; Rose et al. 1992; Shi et al. 2000).

Detailed studies on either question depend on in vitro systems which allow the maturation of the schizonts. In principle, such systems exist. Early attempts to produce first generation schizonts of *E. bovis* in vitro by Hammond and Fayer (1967) used a variety of primary and secondary bovine cell lines and were at least partially successful. Subsequent experiments by these authors (Hammond and Fayer 1968) showed that continuous bovine cell lines – Madin–Darby bovine kidney (MDBK) cells – and embryonic tracheal cells also

C. Hermosilla (✉) · B. Barbisch · A. Heise  
S. Kowalik · H. Zahner  
Institute of Parasitology, Justus Liebig University,  
Rudolf-Buchheim-Strasse 2, 35392 Giessen, Germany  
E-mail: Carlos\_R.Hermosilla@vetmed.uni-giessen.de  
Tel.: + 49-641-9938475  
Fax: + 49-641-993846

allowed the development of *E. bovis* first generation schizonts. Even human embryonic intestinal cells enabled the parasite to develop, whereas the sporozoites underwent degeneration in mouse fibroblasts after 4 days. In addition, more recent studies by Speer et al. (1985) and Reduker and Speer (1986) successfully used an established cell line of bovine monocytes.

In all these cases, however, cell types were employed which differ from the principle host cell in vivo, an endothelial cell. They may therefore lack parts of the spectrum of responses which are peculiar to endothelial cells in the sense of host defence, e.g. the ability to express inducible NO synthase or molecules involved in the adherence of blood cells, like selectins, integrins and Ig-superfamily molecules (E-selectin, ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1; Butcher 1991; Abelda et al. 1994; Carlos and Harlan 1994; Tedder et al. 1995). The suitability of non-endothelial cells as host cells of *E. bovis* may therefore be limited under cell biological aspects or in questions of pathogenesis or immunology.

To overcome these problems, we tested in the present study a variety of bovine and other primary endothelial cell lines as potential host cells for *E. bovis*; and we compare these results with data obtained in MDBK cells (as known experimental host cells), African green monkey kidney cells (VERO; as continuous cell lines) and in primary cell lines of bovine fetal gastrointestinal cells (BFGC).

## Materials and methods

### Parasites

*Eimeria bovis* strain H was isolated in 1985 in the field in northern Germany and is maintained by passages in calves (Fiege et al. 1992). For oocysts production, calves were orally infected at the age of 10 weeks with  $7 \times 10^4$  sporulated *E. bovis* oocysts. Excreted oocysts were isolated from the faeces, beginning 22 days p.i., according to the method of Jackson (1964). Sporulation was achieved by incubation in 2% (w/v) potassium dichromate solution at room temperature. Sporulated oocysts were stored at 4 °C and used within 6 months. Sporozoites were excysted from sporulated oocysts and purified by a modified method of Fayer and Hammond (1967). In brief, oocysts were suspended in sterile 0.02 M L-cysteine HCl/0.2 M NaHCO<sub>3</sub> solution and incubated in a 100% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C for 20 h. Subsequently, the oocysts were resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco) containing 0.4% (w/v) trypsin (Sigma) and 8% (v/v) sterile, filtered bovine bile (obtained from the local abattoir) and were incubated under microscopic control up to 4 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Free sporozoites were suspended at concentrations of  $1 \times 10^5$  to  $7 \times 10^5$  sporozoites/ml in tissue culture medium appropriate for the host cell type to be used later on, containing 10% dimethylsulfoxide (Merck) and were cryopreserved in liquid nitrogen for up to 4 months.

### Host cells

MDBK monolayer cell line cultures were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC 90050801) and maintained through several passages in RPMI 1640 culture medium (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 µg/ml; all Sigma) and 10% fetal calf

serum (FCS; Gibco) at 37 °C and a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks. Cells used for experiments were treated with trypsin [10 min in medium with 0.25% (w/v) trypsin, 1 mM EDTA], washed with RPMI 1640 culture medium (10 min, 400 g) and transferred to new flasks or at the rate of  $1 \times 10^5$  cells/ml to 24-well plates (Nunc).

African green monkey kidney cells (*Cercopithecus aethiops*; VERO) were obtained (ECACC 84113001) and cultivated as described for MDBK cells.

For BFGC, *in utero* fetuses (4–6 months after conception) were obtained at a local abattoir and immediately transferred on ice to the laboratory. Mucosal scrapings from the small and large intestine were minced and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 25% trypsin for 20 min at 37 °C. The resulting cells were washed (10 min, 400 g) with PBS and suspended in culture medium composed of Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM; Sigma), 2 mM L-glutamine, 0.22% NaHCO<sub>3</sub>, 50 units penicillin/ml, 50 µg streptomycin/ml and 15% FCS. This cell suspension was transferred into 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Gibco) and incubated (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) until they attached and began to divide. For experimental purposes, cells were then trypsinised (see above), washed with IMDM (10 min, 400 g) at room temperature and seeded as above, but using 10% FCS.

Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) were isolated from umbilical cord veins, according to Jaffe et al. (1973). Umbilical cords were collected under aseptic conditions from calves born by caesarean section (kindly provided by B. Meinecke, Hannover). Umbilical cord vein endothelial cells obtained from collagenase digestion [20 min in 0.025% collagenase (Worthington Biochemical Corp.) in PSA salt solution (Jaffe et al. 1973) at 39 °C and a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere] were washed, resuspended in modified endothelial cell growth medium [ECGM; composed of 0.4% endothelial cell growth supplement/heparin, 0.1 ng epidermal growth factor/ml, 1.0 ng basic fibroblast growth factor/ml, 1.0 ng hydrocortisone/ml (all Promocell) and 50 µg gentamicin/amphotericin B/ml, (Sigma) supplemented with 2% FCS] and seeded into 25 cm<sup>2</sup> culture flasks. Cells were released from the culture dishes by trypsinisation and handled as described above. Human (HUVEC) and porcine umbilical vein endothelial cells (PUVEC) were prepared from the respective umbilical cord veins, applying the technique described above and were kindly provided by N. Suttorp (Berlin, at that time Giessen).

Bovine spleen lymphatic endothelial cells (BSLEC) were originally prepared from bovine splenic lymphatic vessels and were kindly provided by K. Preissner (Giessen). They were cultured like the other primary endothelial cells, using modified ECGM medium supplemented with 10% FCS.

### In vitro infection and evaluation of parasite development

Only confluent cell monolayers were used for infection. In general, approximately  $7.5 \times 10^5$  sporozoites were applied to infect a 25 cm<sup>2</sup> culture flask. If the development of schizonts and merozoites was to be quantitatively evaluated, cells were seeded in 24-well culture plates and infected with  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  and  $2.5 \times 10^3$  sporozoites/well. These experiments were performed in triplicate. For infection, frozen sporozoites were quickly thawed at 37 °C, centrifuged (10 min, 400 g), counted and resuspended in the appropriate culture medium. Cultures were generally controlled over periods of 20–30 days. In culture flasks, the culture medium was changed 24 h after infection and thereafter every second day; and in culture plates, the medium was changed every third day.

For quantitative evaluations, the total number of generation schizonts (immature and mature) that developed per well was determined and expressed as a percentage of the number of sporozoites applied. In addition, ( $n=15$ ) randomly selected schizonts/well were measured by size 12, 15 and 18 days after infection, using an ocular micrometer. After free merozoites were found in culture, they were harvested at daily or longer intervals by aspiration of the supernatant and were counted in a Neubauer haemocytometer (medium was replaced after harvesting the merozoites).



Attempts were also made to detect a further development of *E. bovis* beyond the first generation schizonts. Since the sporozoite preparations were always contaminated with a few unsporulated oocysts, which subsequently could have been mistaken for newly formed oocysts, these contaminations were thoroughly quantified in the culture plates and later taken into consideration.

## Results

### Host cell invasion

All cell types, except MDBK cells, were rapidly invaded by the sporozoites (sometimes within 1–2 min, usually within 20 min). In MDBK cells, the invasion process was much slower, taking approximately 2 h before the majority of sporozoites was found intracellularly. Up to 12 h p.i., sporozoites were observed relatively often leaving their host cell and invading a new one. This occurred independently of the cell type used. It was observed more rarely also later on, generally up to 48 h p.i.

### Early intracellular development

Sporozoites which had invaded host cells in general changed their shape within approximately 12 h, becoming shorter and broader than free sporozoites. The average size of free sporozoites was  $15.7 \times 3.2 \mu\text{m}$  ( $n=15$ ), whereas intracellular sporozoites had an average size of  $10.9 \times 3.8 \mu\text{m}$  ( $n=15$ ). These changes happened

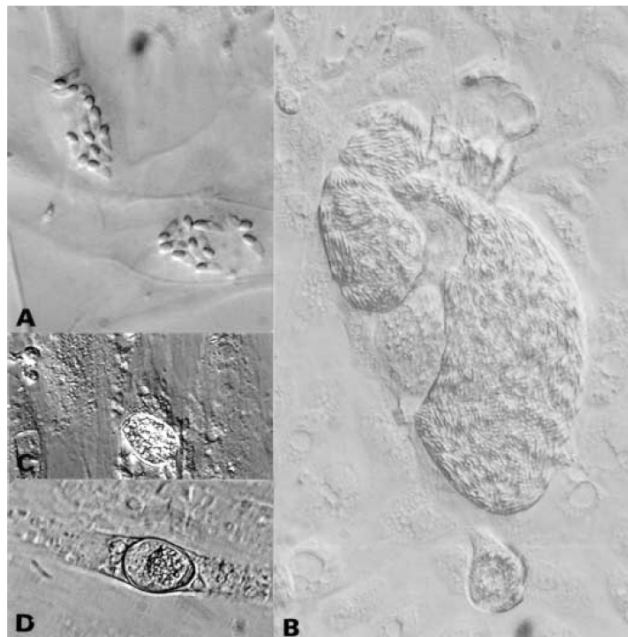
independently of the host cell type, i.e. it also happened in cell types which did not allow further development of the parasite (see below). When large amounts of sporozoites were administered ( $> 1 \times 10^6$  sporozoites in the case of BUVEC), multiple infections were often observed (Fig. 1A), some cells harbouring up to ten sporozoites. These multiple infections occurred more often in cell lines of bovine origin than in others.

In HUVEC, PUEVC and VERO cells, the sporozoites did not show any further development, although they persisted and survived in these cells for at least 16 days (HUVEC, PUEVC) and 21 days (VERO). A striking difference, however, concerned the parasitophorous vacuole in these cells. Whereas it remained small and often hardly detectable in HUVEC and PUEVC, as in the bovine cells, it was clearly visible after approximately 2 h in VERO cells and increased continuously during the next 10–12 h, finally measuring 15–20  $\mu\text{m}$  in diameter. This type of the parasitophorous vacuole persisted without detectable further changes throughout an observation period of 3 weeks after infection of the sporozoite (Fig. 2).

### Formation of first generation schizonts

First generation schizonts of *Eimeria bovis* developed in all bovine cell lines tested. However, considering the number of immature schizonts determined 12 days p.i., the developmental rate clearly differed between the

**Fig. 1A–D** Infection and development of *Eimeria bovis* in bovine cell lines. **A** Multiple sporozoite infection of bovine umbilical vein endothelial cells 1 day after infection. **B** Multiple *Eimeria bovis* infection of a single bovine umbilical vein endothelial cell with development of three schizonts at different stages of maturation [15 days post-infection (p.i.)]. **C** Immature *E. bovis* oocyst in bovine fetal gastrointestinal cells (28 days p.i.). **D** Fully developed oocyst of *E. bovis* in bovine fetal gastrointestinal cells (28 days p.i.)



304

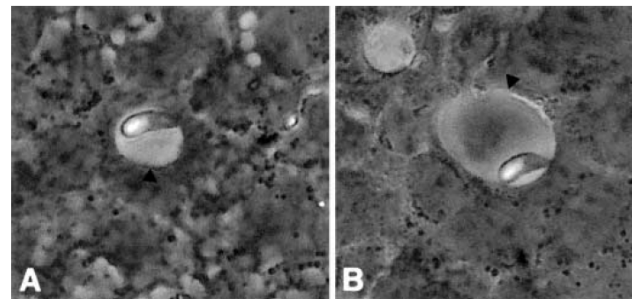
various cell types (Table 1). Generally 20- to 30-fold more first generation schizonts were found in BFGC when compared with MDBK cells. An intermediate but still much better developmental rate than in MDBK cells was found in BUVEC and BSLEC. There was an inverse relationship between infection dose and developmental rate in BFGC and BUVEC which could not be detected with the other cell lines.

The size of developing schizonts was similar in the various bovine cell lines until day 8 p.i. Subsequently, the mean sizes of schizonts rose markedly in BFGC to an average of 250×85 µm on day 19, whereas a moderate growth was observed in the other cell lines (Table 2). However, in general, schizont size varied very obviously

and mainly due to differences in maturation. These differences occurred not only between schizonts located in different host cells but also between those within one cell. Figure 1B shows an example where schizonts of three different stages of maturation developed in a single BFGC.

When cultured in 24-well culture plates, mature schizonts with merozoites inside them were first detected 13 days after inoculation in BUVEC, followed by BSLEC and BFGC (16 days p.i.). When cultured in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks, maturation was generally hastened. Under these conditions, schizonts containing merozoites were found in BFGC as soon as 11 days p.i.

**Fig. 2A, B** Infection of VERO cells with *E. bovis* sporozoites. Development of large parasitophorous vacuoles (arrow-heads) 3 days p.i. (A) and 8 days p.i. (B)



**Table 1** Rate of infection (% cells containing developing schizonts) of various bovine cell types 12 days after in vitro infection of monolayers in 24-well culture plates with different amounts of sporozoites of *Eimeria bovis*. Tests were performed in triplicate;

and results are given as arithmetic means. *BFGC* Bovine fetal gastrointestinal cells, *BUVEC* bovine umbilical vein endothelial cells, *BSLEC* bovine spleen lymphatic endothelial cells, *MDBK* Madin-Darby bovine kidney cells

Host cell	% cells containing schizonts after in vitro infection with:		
	1×10 <sup>5</sup> Sporozoites	5×10 <sup>4</sup> Sporozoites	2.5×10 <sup>4</sup> Sporozoites
BFGC	11.2	15.1	18.9
BUVEC	8.7	10.4	14.4
BSLEC	6.4	7.1	6.1
MDBK	0.3	0.8	0.7

**Table 2** Development of *E. bovis* first generation schizonts and number of first generation merozoites released in different bovine cell types in vitro after infection of monolayers in 24-well culture plates. Tests were performed in triplicate; and results are given as

arithmetic means. *BFGC* Bovine fetal gastrointestinal cells, *BUVEC* bovine umbilical vein endothelial cells, *BSLEC* bovine spleen lymphatic endothelial cells, *MDBK* Madin-Darby bovine kidney cells, *nd* not determined

Development	Days post-infection	Infection with 1×10 <sup>5</sup> sporozoites			
		BFGC	BSLEC	BUVEC	MDBK
Schizont size (µm)	12	130×103	65×59	88×61	57×57
	19	250×85	78×60	92×80	73×61
Number of free merozoites (×10 <sup>5</sup> ) produced	18	2.0	–	1.0	–
	18–20	6.5	–	4.7	–
	20–24	11.0	5.1	8.4	<0.04
	24–28	7.0	4.0	6.5	<0.04
Total of free merozoites (×10 <sup>5</sup> )/sporozoite	up to 31	26.5	9.1	20.6	nd

## Release of first generation merozoites

Free first generation merozoites in the supernatant were seen in 24-well culture plates on days 14 p.i. (BUVEC), 17 p.i. (BFGC) and 20 p.i. (BSLEC). In MDBK cells, 25 days were necessary to produce free merozoites under these conditions. Otherwise, this occurred as early as 12 days p.i. in culture flasks using BFGC; and also with other cell lines these culture conditions resulted in a faster development.

The number of free merozoites increased daily after their first appearance. Using 24-well culture plates, a peak was reached 24–25 days after sporozoite inoculation (Table 2). A progressive decline in the number of merozoites then ensued until day 31, at which time only a few merozoites were found; and this was independent of the cell types used. Total first generation merozoite yield was greatest in BFGC and lowest in MDBK cells. The largest inoculum produced the largest number of merozoites in all of the different cell types used in this study. The average numbers of merozoites which developed in 24-well plates after infection with  $10^5$  sporozoites over the 31-day sampling period is summarised in Table 2. The highest average number of merozoites harvested per inoculum size was obtained in BFGC, where the application of  $10^5$  sporozoites resulted in a yield of  $26.5 \times 10^5$  merozoites. In BUVEC, the same infection allowed the development of  $20.6 \times 10^5$  merozoites; and, in BSLEC, only  $9.1 \times 10^5$  merozoites were collected. The lowest harvest occurred in MDBK where, at the end of the sampling period, only 4,000 merozoites were obtained. However, the productivity was generally enhanced when culture flasks were used. BFGC proved particularly suitable for mass production of first generation merozoites of *E. bovis*. The general yield was approximately  $3 \times 10^7$  merozoites from a 25 cm<sup>2</sup> culture flask infected with  $7.5 \times 10^5$  sporozoites.

## Formation of second generation schizonts, gamonts and oocysts

Development to second generation schizonts could not be unambiguously identified in any of the cell lines. However, they seem to have been overlooked in BFGC since, sporadically in these cells, gamont-like stages and newly formed predominantly intracellular oocysts were found at day 25 of incubation and later on (Fig. 1C, D) suggesting that *E. bovis* completes its life cycle in BFGC.

---

**Discussion**

*Eimeria bovis* is a host-specific parasite of cattle and buffaloes. Its sporozoites are highly specialised in vivo and invade particular cells, the endothelium of the central lacteals of the intestinal villi, developing into first generation schizonts. Concerning the selection of host cells and the invasion of cells in vitro however, there was

neither host- nor cell type-specificity, since all cell types offered were seized by the sporozoites. This behaviour in principle was not astonishing, because similar observations had been reported earlier by Fayer and Hammond (1967) and Hammond and Fayer (1968). Even the speed of invasion did not depend on cell source, as sporozoites invaded HUVEC and PUEVC faster than the cattle-derived MDBK cells. Possibly, such differences are related to the abundance of target molecules on the host cell surface, which are recognised by the parasite for adherence or penetration, as summarised recently by Augustine (2001). These molecules are not yet known in the case of *E. bovis*.

Once a sporozoite had invaded a cell, that did not necessarily mean that it would stay in this particular cell. We observed sporozoites leaving their host cell and invading a new one relatively often within the first 12 h after infection, i.e. up to the time when the parasites started to change their shape, a process which possibly interferes with their ability to leave their host cell. In fact, *E. bovis* sporozoite egress from cells may still occur later on [Fayer and Hammond (1967) observed it 8 days after infection], and can be provoked by mechanical irritation of the cell (e.g. during patch clamp experiments; Behrendt et al., unpubl.; see also Behrendt et al. 2000). However, it happened generally only with parasites of the original slender type.

Since we did not see enhanced deaths of potential host cells after experimental infection of various cell types, we currently do not have the impression that this kind of egress is associated with severe harm to the abandoned cell, as was reported after Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of *Toxoplasma gondii* (Endo et al. 1982; Stommel et al. 1997). It rather resembles a process which was described recently for *Plasmodium falciparum* sporozoites (Mota et al. 2001): they enter and leave cells by an alternative mechanism, which does not include the formation of a parasitophorous vacuole but “breaching of the plasma membrane of the host cell followed by rapid repair”. The authors speculate this ability might be essential for *Plasmodium* sporozoites to pass cell barriers to reach their definite host cell, the hepatocyte. The phenomenon did not occur with *T. gondii* tachyzoites, which can develop in every nucleated cell. It would, however, make sense in case of *E. bovis* sporozoites, which also have to cross tissue barriers to invade the lacteal endothelium; and it would explain the non-specificity with regard to cell invasion. Current studies consider these questions.

*E. bovis* sporozoites not only indiscriminately entered all cell types which were offered but also generally underwent early intracellular development to the above-mentioned stumpy forms within approximately 12 h. With that, a peculiar difference to all other cells was observed in VERO cells, where an extended parasitophorous vacuole developed within a few hours after invasion. In the case of coccidia, the parasite’s rhoptries and, to some extent, dense granule products also contribute to the formation of the parasitophorous vacuole

membrane (reviewed by Dubremetz et al. 1998; Entzeroth et al. 1998). Thus, the quick development and expansion of the vacuole should be associated with an enhanced synthesis and secretion/exocytosis of such organellar products. Independent of these questions, however, the *E. bovis*-infected VERO cell with a large parasitophorous vacuole represents an interesting experimental tool, which has been recently used for permeability studies and analyses of  $\text{Ca}^{2+}$  content and pH conditions in the various compartments of the infected cell (Behrendt et al. 2000). Development of the parasite to mature schizont took place only in cells of bovine origin. This was in principle also shown in earlier investigations, when not even all bovine embryonic cell lines were found suitable (Fayer and Hammond 1967). The only exception was reported by Hammond and Fayer (1968), who observed schizonts in infected human intestinal cells (intestine 407) but this was obviously a rare event.

The rate of development to first schizonts was predominantly influenced by the cell types used, whereas the time required for maturation and the yield of merozoites also varied with the culture conditions. Generally, large volumes – in the present study, 25 cm<sup>2</sup> culture flasks – provided better conditions for growth and maturation than small-volume culture, e.g. in 24-well plates. We cannot specify the reasons for these differences in case of *E. bovis*, but possibly some kind of “conditioning”, supporting cell growth and development in vitro indirectly also supports growth and development of the parasite. Within the range of bovine cells used in the present study, BFGC was the most suitable cell type from various points of view: (1) it showed the highest rate of infection, (2) schizonts were larger, (3) schizonts reached maturity days earlier than in the other cells and (4) it provided the best yield of merozoites, i.e. usually approximately 50 merozoites/sporozyte in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks. This yield seems less than that obtained by Reduker and Speer (1987) in primary bovine monocytes (using a similar inoculum, they obtained an approximately four times higher yield/sporozyte). However, it seems doubtful that these results can be compared directly; e.g. the use of MDBK cells in the present study resulted in a clearly worse development of *E. bovis* than can be estimated from the data presented by Hammond and Fayer (1968) and Speer et al. (1985). Otherwise, the sizes of schizonts found in BFGC were quite similar to those reported in bovine tracheal cells as another suitable cell line for *E. bovis* first generation schizont development (Hammond and Fayer 1968). Maturation of schizonts was completed in a few cases in BFGC as early as 12 days p.i., which corresponds to the shortest time required for schizont development in vivo (Hammond and Fayer 1968). However, as in the studies of the above authors, development was clearly delayed in MDBK cells, when compared with other bovine cells.

The endothelial cells included in the experiments in fact were less productive than BFGC, but nevertheless

proved to be suitable host cells as well. This seems of particular importance for further studies because, at least in type, they correspond with the natural host cell in vivo. The infection of endothelial cells by *E. bovis* might therefore represent an in vitro system far closer to the natural situation than all other experimental in vitro systems described so far. Concerning the completion of the life cycle of *E. bovis* in vitro, there was little success, since only in BFGC and only a few gamont-like stages and oocysts were found in culture after infection with sporozoites. Hammond et al. (1969) had generally failed to develop second generation merozoites and sexual stages of *E. bovis* in a total of 11 different types of mammalian cells, using both in vivo- and in vitro-generated merozoites. In contrast, these merozoites developed further (resulting in oocyst excretion) when introduced into the ligated caecum of a calf. It therefore appears astonishing that Speer and Hammond (1973) reported successful growth of second generation schizonts, gamonts and oocysts in vitro in primary embryonic kidney cells, a cell type already included in the unsuccessful attempts of Hammond et al. (1969). They used in vivo-generated merozoites and the only limitation was that these had to be isolated 14 days p.i. Merozoites isolated 14.5 days p.i. and 15 days p.i. were no longer invasive. In conclusion, the present study shows that *E. bovis* sporozoites obviously invade indiscriminately cells of different source and origin, whereas the development of first generation schizonts seems to be limited to bovine cells. Some of the parasite-host cell systems show special characteristics which makes them potential tools for experimental in vitro studies.

**Acknowledgements** We acknowledge the kind supply of bovine umbilical cords (B. Meinecke, Hannover), bovine splenic lymphatic endothelial cells (K. Preissner, Giessen) and human and porcine umbilical vein endothelial cells (N. Suttorp, Berlin, at that time Giessen). We thank Christiane Pfarrer (Giessen) for helpful comments on the expression of intermediate filaments in cultured cells.

## References

- Abelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8:504
- Augustine PC (2001) Cell:sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int J Parasitol* 31:1–8
- Behrendt JH, Milde H, Weber WM, Kowalik S, Zahner H, Bürger H-J, Clauss W (2000) Intracellular calcium and pH conditions of cultured cells infected with *E. bovis* and *E. separata*. *Parasitol Res* 86:294–300
- Bürger H-J (1983) *Eimeria*-Infektionen beim Rind. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 69:350–357
- Butcher EC (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more steps) to specificity and diversity. *Cell* 67:1033
- Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068
- Dauguschies A, Bürger HJ, Akimura M (1998) Apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance during experimental infection of calves with *Eimeria bovis*. *Vet Parasitol* 77:93–102

- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28:1007–1013
- Endo T, Sethi KK, Piekarski G (1982) *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp Parasitol* 53:179–188
- Entzeroth R, Mattig FR, Werner-Meier R (1998) Structure and function of the parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. *Int J Parasitol* 28:1015–1018
- Fayer R, Hammond DM (1967) Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. *J Protozool* 4:764–772
- Fiege N, Klatte D, Kollmann D, Zahner H, Bürger H-J (1992) *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol Res* 78:32–38
- Friend SC, Stockdale PH (1980) Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: a histopathological study. *Can J Comp Med* 44:129–140
- Hammond DM, Fayer R (1967) In vitro cultivation of *Eimeria bovis*. *J Protozool* 14 [Suppl]:23
- Hammond DM, Fayer R (1968) Cultivation of *Eimeria bovis* in three established cell lines and in bovine tracheal cell line culture. *J Parasitol* 54:559–568
- Hammond DM, Andersen FL, Miner ML (1963) The occurrence of a second generation in the life cycle of *Eimeria bovis* in calves. *J Parasitol* 49:428–434
- Hammond DM, Davis LR, Bowmann L (1964) Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves. *Am J Vet Res* 5:303–311
- Hammond DM, Fayer R, Miner ML (1969) Further studies on in vitro development of *Eimeria bovis* and attempts to obtain second-generation schizonts. *J Protozool* 16:298–302
- Jackson ARB (1964) The isolation of viable coccidial sporozoites. *Parasitology* 54:87–93
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Mimmick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JCR, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A (2001) Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291:141–149
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ (1998) *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 160:1824–1830
- Reduker DW, Speer CA (1986) Antigens of in-vitro produced first generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). *J Parasitol* 72:782–785
- Reduker DW, Speer CA (1987) Effects of sporozoite inoculum size on in vitro production of merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). *J Parasitol* 73:427–430
- Rose ME, Millard BJ, Hesketh P (1992) Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. *Infect Immun* 60:5283–5290
- Shi MQ, Huther S, Burkhardt E, Zahner H (2000) Immunity in rats against *Eimeria separata*: oocyst excretion, effects on endogenous stages and local tissue response after primary and challenge infections. *Parasitol Res* 11:891–898
- Speer CA, Hammond DM (1973) Development of second-generation schizonts, gamonts and oocysts of *Eimeria bovis* in bovine kidney cells. *Z Parasitenkd* 42:105–113
- Speer CA, Rudeker DW, Burgess DE, Whitmire WM, Splitter GA (1985) Lymphokine-induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultured bovine monocytes. *Infect Immun* 50:566–571
- Stommel EW, Ely KH, Schwartzmann JD, Kasper LH (1997) *Toxoplasma gondii*: dithiol-induced  $Ca^{2+}$  flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp Parasitol* 87:88–97
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9:866

**5.2 “Alternative mechanism of *Eimeria bovis* sporozoites to invade cells *in vitro* by breaching the plasma membrane.”**

Behrendt, J. H., Clauss, W., Zahner, H., and Hermosilla, C.\*

*J. Parasitol.* (2004) **90**: 1163-1165

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative                 | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung             | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche  | unterstützend              |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich                 |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

## RESEARCH NOTES

*J. Parasitol.*, 90(5), 2004, pp. 1163–1165  
© American Society of Parasitologists 2004

### Alternative Mechanism of *Eimeria bovis* Sporozoites to Invade Cells In Vitro by Breaching the Plasma Membrane

J. H. Behrendt, W. Clauss, H. Zahner\*, and C. Hermosilla\*†, Institute of Animal Physiology, Justus Liebig University Giessen, Wartweg 95, 35392 Giessen, Germany; \*Institute for Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Rudolf-Buchheim-Strasse 2, 35392 Giessen, Germany; †To whom correspondence should be addressed. e-mail: carlos.r.hermosilla@vetmed.uni-giessen.de

**ABSTRACT:** In vitro *Eimeria bovis* sporozoites invade a wide range of cell types, and in the case of bovine cells, they may develop to first-generation schizonts. Often, however, they subsequently leave their host cell to invade a new one, which seems contrary to the classical way of infecting a cell by forming a parasitophorous vacuole. Using a standard, "cell wound assay," we show that *E. bovis* can invade bovine endothelial cells by breaching the plasma membrane and may again leave the surviving cell. *Eimeria bovis* sporozoites also infected VERO and HT29 cells but obviously without damaging the plasma membrane. The same held true when bovine endothelial cells were exposed to tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. According to a literature report dealing with *Plasmodium yoelii* sporozoites, breaching the membrane of certain host cells may be a common phenomenon for coccidian sporozoites but may not be for merozoites.

*Eimeria bovis* is a common and pathogenic coccidium of cattle, which may cause severe hemorrhagic enteritis (Daugochies et al., 1998). Its endogenous development shows a number of peculiarities. Sporozoites are liberated in the host's gut and must invade endothelial cells of the central lymph capillaries in the villi of the ileum, where they replicate, forming multinucleated macroschizonts, which contain hundreds of thousands of first-generation merozoites. Second-generation schizonts and gamonts then develop quickly in epithelial cells of the large intestine (Hammond et al., 1944). It is unclear how the sporozoites reach their destination. If migrating directly, they would need to traverse the ileum epithelial cell layer. Because invasion of cells by coccidia is a complex process involving the release of particular parasite products and an invagination of the host cell plasma membrane to form a parasitophorous vacuole (PV) around the invading stage (Dubremetz et al., 1998; Entzeroth et al., 1998), one might speculate that sporozoites take a paracellular route on their way to the predetermined host cell. However, while monitoring the invasion of cells by *E. bovis* sporozoites in

vitro, we have often observed parasites entering and leaving cells quickly and repeatedly, without harming them severely, as has been described by others (Fayer and Hammond, 1967). A similar observation was recently reported by Mota et al. (2001) for sporozoites of *Plasmodium yoelii*, which similarly traverse hepatocytes in vitro. The latter authors suggested that these sporozoites may use an alternative mode of invasion by breaching the host cell membrane without forming a PV. This breaching of the plasma membrane would be followed by a rapid membrane repair, i.e., cells usually survive it.

To determine whether *E. bovis* sporozoites also share the ability to simply traverse cells, we performed several experiments using a variety of host cell types and compared the results with those obtained in the course of host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* tachyzoites.

The *E. bovis* strain was isolated in 1988 in the field in northern Germany and maintained by passages in calves (Fiege et al., 1992). Sporozoites were isolated from oocysts according to Hermosilla et al. (2002). *Toxoplasma gondii* (RH strain; Sabin, 1941) tachyzoites were harvested from the peritoneal cavity of BALB/c mice 48 hr after intraperitoneal injection of the parasites and were washed several times with phosphate-buffered saline (PBS), then centrifuged at 400 g for 10 min. *Neospora caninum* (strain NC-1; Dubey et al., 1988) was maintained in VERO cells. Tachyzoites were washed off the cultures and prepared as above.

The experiments used bovine aortic endothelial cells (BAEC), bovine spleen lymphatic endothelial cells (BSLEC), African green monkey kidney cells (VERO), and human colon adenocarcinoma cells (HT29). BAEC were isolated from freshly resected aortas by collagenase digestion (20 min in 0.2% collagenase type II [Worthington Biochemical Corp., Lakewood, New Jersey] in Puck's saline A [PSA, GIBCO, Eggenstein, Germany] salt solution at 37 C and 5% CO<sub>2</sub>). They were washed, resuspended in endothelial cell growth medium (ECGM; Prom-

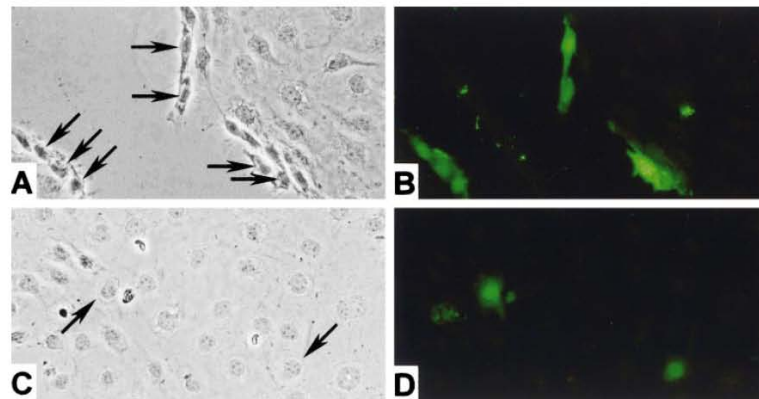


FIGURE 1. Cell wound assay. A–B. "Positive" control. Scratch mark in a BSLEC monolayer, applied in the presence of FITC-dextran. (A, phase contrast picture, arrows indicate dextran positive cells; B, fluorescence picture.) C–D. Pattern after infection of a BSLEC monolayer with *Eimeria bovis* sporozoites in the presence of FITC-dextran. (C, phase contrast picture, arrows indicate dextran positive cells; D, fluorescence picture.)

ocell, Heidelberg, Germany) supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml) and 10% fetal calf serum (FCS), seeded on glass coverslips (15 mm, NeoLab, Heidelberg, Germany) and cultured in 4-well culture plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. BSLEC were originally prepared from bovine splenic lymphatic vessels and cultured as above. VERO cells and HT29 cells were purchased from the European collection of cell cultures (ECACC, Salisbury, United Kingdom) and maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented as above.

Breaching of cell membrane by parasites and membrane repair were determined according to McNeil et al. (1999) by a "cell wound assay." The assay uses a cell-impermeant tracer (fluorescein isothiocyanate [FITC]-labeled dextran, MW 10,000; Molecular Probes, Leiden, Netherlands), which penetrates wounded cells and is trapped inside after membrane repair. Cell monolayers on glass coverslips were exposed to the parasites (*E. bovis*: all cell types; *T. gondii* and *N. caninum*: only BAEC and BSLEC) in the presence of the tracer (5 mg/ml) diluted in the corresponding cell culture medium and incubated for 2 hr at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, the cells were washed 3 times with PBS to remove exogenous tracer and fixed 15 min in 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany). The glass coverslips were transferred to microscopic slides, covered with Mowiol mounting medium (Hoechst, Frankfurt am Main, Germany) and incubated at 4 °C in darkness overnight. As a positive control, a cell monolayer was incubated as above, but without parasites. After 30 min of incubation, the monolayer was scratched with the tip of a blood lancet. Using a fluorescence microscope (Leitz excitation filter 515–560), the numbers of cells, parasites, and wounded or repaired cells were determined for 10 microscopic fields per coverslip.

The assay gave clear results. Endocytosed FITC-dextran was observed as a fine dotted pattern in the cell cytosol and was easily distinguished from homogenous staining in wounded cells (Fig. 1). Dead cells, which did not reseal, were usually not labeled. In the positive control, dextran-positive cells were detected along the scratch mark (Figs. 1A, B). FITC-dextran did not affect the motility and infectivity of *E. bovis* sporozoites or *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoites. On principle, they moved by gliding and flexing on the cell monolayer and generally invaded all cell types offered, although in the case of *E. bovis* the infection was approximately 5-fold greater in bovine endothelial cells than in VERO or HT29 cells. *Eimeria bovis* infection of endothelial cells resulted in a relatively high proportion of dextran-positive cells. Using an inoculum size of  $4 \times 10^4$  sporozoites per coverslip, up to 2.5 and 3.5% of BAEC and BSLEC were stained, respectively. Uninfected control cells were only occasionally stained. The number of dextran-positive cells was a linear function of the number of sporozoites detected in the cells. The linear trend was highly significant as evaluated by the *t*-test ( $P < 0.001$ ). Ratios between the numbers of parasites and stained cells were  $0.95 \pm 0.23$  and  $0.91 \pm 0.08$  in BAEC and BSLEC, respectively. In general, dextran-positive cells did not contain parasites.

These data strongly suggest that *E. bovis* sporozoites, as well as sporozoites of *P. yoelii* (Mota et al., 2001), possess mechanisms of traversing cells before invasion of a final host cell for replication. Although on the basis of the performed cell wound assay we could not distinguish between breaching of the plasma membrane due to invasion or egress, findings on other apicomplexan parasites, as reviewed by Mota and Rodriguez (2001), suggest that a mechanism of entry different from the classic way, i.e., from forming a PV, is involved. Considering that the ability to egress from once-invaded cells has also been reported for sporozoites of other *Eimeria* species, (Speer et al., 1971; Long and Speer, 1977; Danforth et al., 1984; Danforth et al., 1992; Chobotar et al., 1993) and *T. gondii* (Nichols and O'Connor, 1981; Speer et al., 1997) and that sporozoites of coccidia have been frequently found without a PV in the cytosol of host cells shortly after infection, both in vivo and in vitro (Aikawa et al., 1984; Danforth et al., 1992; Chobotar et al., 1993), this capability to traverse cells seems common in the Eucoccidida. As previously speculated by Mota et al. (2001), the advantage could be an ability of sporozoites to reach their final destination by crossing physical cellular barriers, particularly in cases when the suitable targets of the parasites are not available at the place of entry into the host.

On the basis of this assumption, we expected that cells unsuitable for the further development of the parasite, i.e., VERO or HT29 cells (see

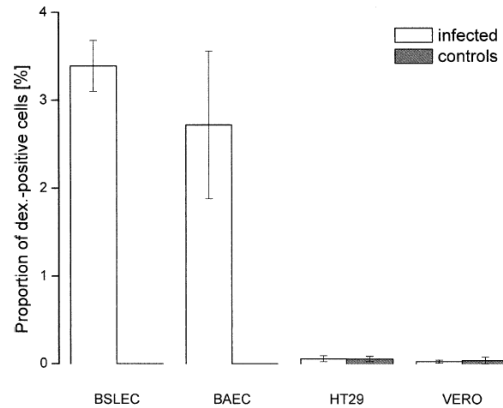


FIGURE 2. Cell wounding and membrane repair effects in bovine endothelial (BAEC, BSLEC), African green monkey kidney (VERO), and human colon adenocarcinoma cells (HT29) after in vitro infection with *Eimeria bovis* sporozoites ( $10^4$  sporozoites/10 cm<sup>2</sup> cell monolayer). Proportion of dextran-positive (wounded and repaired) cells. Vertical bar: standard error of the mean.

Hermosilla et al., 2002), would be traversed by the sporozoites more often than suitable host cells such as those from the bovine endothelium. However, the opposite was observed. Thus, the proportion of dextran-positive cells was considerably low in *E. bovis*-infected VERO and HT29 cell cultures. In general, it did not exceed the proportion of stained cells in the uninfected controls ( $0.026 \pm 0.016$  vs. the controls, which were  $0.038 \pm 0.038$  in VERO; and  $0.059 \pm 0.033$  vs. the controls, which were  $0.056 \pm 0.030$  in HT29 cells) (Fig. 2). This means that hardly any cell wounding or repair occurred because of *E. bovis* sporozoite penetration. The reason for this cell type-dependent difference is presently not known. It may depend on the cell donor species because sporozoites did not traverse cells of human or monkey origin, whereas traversal also occurred in other bovine cell types not included in this study (data not shown). Better understanding of the phenomenon would require knowledge on the molecular events accompanying the parasites' breaching of the host cell membrane and the related parasite egress, which is not available.

However, the ability of coccidian parasites to traverse cells without forming a PV seems to be limited to sporozoites. We could not study the behavior of *E. bovis* merozoites because there is currently no cell type available, which is regularly invaded by *E. bovis* merozoites in vitro. We repeated the experiments of Mota et al. (2001) with *T. gondii* merozoites using endothelial cells instead of hepatocytes and extended the study to merozoites of *N. caninum*. Both parasites invaded BAEC and BSLEC rapidly, but obviously only in the common manner by forming a PV (next generation schizonts developed within 2–3 days) because the proportion of dextran-positive cells in infected cell cultures was almost "zero." Even using inoculum sizes that resulted in infection of 20 and 30%, respectively, did not change the pattern (data not shown). This stage-specific capacity of migration through cells may reflect the different requirements of the different developmental stages of apicomplexan parasites. In fact, the sporozoite stages are the forms of the parasite that encounter physical barriers to reach their final host cell and replication site for schizogony. Thus, the ability of *E. bovis* sporozoites to traverse by disrupting the plasma membrane of the host cell may be an essential requirement to overcome the physical barriers that separate the sporozoite from their final destination and to ensure a successful infection in the mammalian host.

We would like to thank K. Preissner in Giessen for the kind donation of BSLEC.



## LITERATURE CITED

- AIKAWA, M., A. SCHWARTZ, S. UNI, R. NUSSENZWEIG, AND M. HOLLINGDALE. 1984. Ultrastructure of in vitro cultured exo-erythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**: 792–799.
- CHOBOTAR, B., H. D. DANFORTH, AND R. ENTZEROTH. 1993. Ultrastructural observations of host-cell invasion by sporozoites of *Eimeria papillata* in vivo. *Parasitology Research* **79**: 15–23.
- DANFORTH, H. D., B. CHOBOTAR, AND R. ENTZEROTH. 1984. Cellular pathology in mouse embryonic brain cells following in vitro penetration by sporozoites of *Eimeria papillata*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **70**: 165–171.
- , R. ENTZEROTH, AND B. CHOBOTAR. 1992. Scanning and transmission electron microscopy of host cell pathology associated with penetration by *Eimeria papillata* sporozoites. *Parasitology Research* **78**: 570–573.
- DAUGSCHIES, A., H. J. BÜRGER, AND M. AKIMURA. 1998. Apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance during experimental infection of calves with *Eimeria bovis*. *Veterinary Parasitology* **77**: 93–102.
- DUBEY, J. P., A. L. HATTEL, D. S. LINDSAY, AND M. J. TOPPER. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **193**: 1259–1263.
- DUBREMETZ, J. F., N. GARCIA-REQUET, V. CONSEIL, AND M. N. FOURMAUX. 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology* **28**: 1007–1013.
- ENTZEROTH, R., F. R. MATTIG, AND R. WERNER-MEIER. 1998. Structure and function of the parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. *International Journal for Parasitology* **28**: 1015–1018.
- FAYER, R., AND D. M. HAMMOND. 1967. Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. *Journal of Protozoology* **14**: 764–772.
- FIEGE, N., D. KLATTE, D. KOLLMANN, H. ZAHNER, AND H. J. BURGER. 1992. *Eimeria bovis* in cattle: Colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitology Research* **78**: 32–38.
- HAMMOND, D. M., L. R. DAVIS, AND L. BOWMANN. 1944. Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves. *American Journal of Veterinary Research* **5**: 303–311.
- HERMOSILLA, C., B. BARBISCH, A. HEISE, S. KOWALIK, AND H. ZAHNER. 2002. Development of *Eimeria bovis* in vitro: Suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitology Research* **88**: 301–307.
- LONG, P. L., AND C. A. SPEER. 1977. Invasion of host cells by Coccidia. In *Parasite invasion*, A. E. R. Tayler and R. Müller (eds.). Blackwell Scientific, London, U.K., p. 1–16.
- MCNEIL, P. L., M. F. S. CLARKE, AND K. MIYAKE. 1999. Cell wound assays. In *Current protocols in cell biology*, I. J. S. Bonifacino, M. Dasso, J. B. Harford, J. Lippincott-Schartz, and K. M. Yamada (eds.). Wiley, New York, p. 12.4.1–12.4.15.
- MOTA, M. M., G. PRADEL, J. P. VANDERBERG, J. C. R. HAFALLA, U. FREVERT, R. S. NUSSENZWEIG, V. NUSSENZWEIG, AND A. RODRIGUEZ. 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* **291**: 141–144.
- , AND A. RODRIGUEZ. 2001. Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes and Infection* **3**: 1123–1128.
- NICHOLS, B. A., AND G. R. O'CONNOR. 1981. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Laboratory Investigation* **44**: 324–335.
- SABIN, A. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association* **116**: 801–814.
- SPEER, C. A., L. R. DAVIS, AND D. M. HAMMOND. 1971. Cinemicrographic observations of the development of *Eimeria larimerensis* in cultured bovine cells. *Journal of Protozoology* **18**: 11.
- , J. P. DUBEY, J. A. BLIXT, AND K. PROKOP. 1997. Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles, and the transformation of sporozoites to tachyzoites in the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* **83**: 565–574.

*J. Parasitol.*, 90(5), 2004, pp. 1165–1169  
© American Society of Parasitologists 2004

## A Focus of Human Infection by *Haplorchis taichui* (Trematoda: Heterophyidae) in the Southern Philippines

Vicente Y. Belizario, Jr., Winifreda U. de Leon, Mary Joan J. Bersabe\*, Purnomo†, J. Kevin Baird†, and Michael J. Bangs‡, College of Public Health, University of the Philippines, Pedro Gil, Ermita, Manila, Philippines; \*Center for Health Development for Southern Mindanao, Department of Health, Davao City, Philippines; †U.S. Naval Medical Research Unit No. 2 (NAMRU-2), Kompleks P2M/PLP, Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta 10560, Indonesia; ‡To whom correspondence should be addressed. e-mail: michael.bangs@ndvecc.navy.mil

**ABSTRACT:** We report an exceptionally high rate of infection by *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924) in human populations on Mindanao Island, southern Philippines. This intestinal fluke is seldom encountered, and this is the first report of high prevalence of infection (36%) in humans by *H. taichui* in the Philippines. The likely source of haplorchine infection has been linked to consumption of raw or undercooked freshwater fish containing infective metacercariae. The most common clinical symptoms appeared as upper abdominal discomfort or pain and borborygmi. Praziquantel (75 mg/kg divided in 3 doses in 1 day) was a well-tolerated and effective treatment for infection by *H. taichui*.

Food-borne trematodiasis are an important cause of disease in humans that create an adverse economic impact in endemic tropical areas (Rim et al., 1994; WHO, 1995). Until recently, the prevalence of heterophyidiasis in humans had been reported as very low in the Philippines. For example, less than 1% of more than 30,000 stool specimens examined in nationwide surveys during 1970–1980 were found to contain heterophyid ova (Cross and Basaca-Sevilla, 1984), with site-specific

infection rates not exceeding 3%. Intestinal parasite surveys were conducted in 1998 and 1999 in 2 communities in Monkayo, Compostela Valley Province, southern Mindanao in connection with an outbreak of intestinal capillariasis (Belizario et al., 2000). Survey results indicated heterophyid infection rates of 17% and 16%, respectively, in the general population (Belizario et al., 2000, 2001). Infections were reported as heterophyid (Heterophyidae) flukes on the basis of egg size and morphology, without definitive species identification. This report examined adult worms recovered after treatment of patients given praziquantel and provides conclusive identification of *Haplorchis taichui* (Trematoda: Heterophyidae) as the parasitic agent. Additional epidemiological background on the investigations conducted in 2000 from infection foci, including symptomatology and treatment of *H. taichui* infections, is provided. All clinical aspects of the investigation were conducted in full accordance with Good Clinical Practice Guidelines and provisions of the World Medical Association Declaration of Helsinki (amended, 1996).

The *barangay* (village) of San Isidro is in the municipality of Mon-

**5.3 “*Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells.”**

Hermosilla, C.\*, Zahner, H., and Taubert, A

*Int. J. Parasitol.* (2006) **36**: 423-431

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche wesentlich
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

International Journal of Parasitology 36 (2006) 423–431

[www.elsevier.com/locate/ijpara](http://www.elsevier.com/locate/ijpara)

## *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells

Carlos Hermosilla\*, Horst Zahner, Anja Taubert

Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Rudolf-Buchheim-Str. 2, D-35392 Giessen, Germany

Received 27 September 2005; received in revised form 3 January 2006; accepted 4 January 2006

### Abstract

*Eimeria bovis* is an important coccidian parasite of cattle causing severe diarrhea in young animals. Its first schizogony takes place in endothelial cells of the ileum resulting in the formation of macroschizonts 14–18 days p.i. This longlasting development suggests a particular immune evasion strategy of the parasite. Here, we analyse early innate immune reactions to *E. bovis* by determining the adhesion of polymorphonuclear neutrophils (PMN) to infected endothelial cell layers under flow conditions and the transcription of adhesion molecule genes in infected host cells. Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) were infected with *E. bovis* sporozoites. Sporozoites invaded BUVEC within 1 h and the first mature macroschizonts occurred 14 days p.i. PMN adhesion was enhanced in *E. bovis*-infected BUVEC layers as early as 8 h p.i.; maximum adhesion occurred 48 h p.i. Increased adhesion rates persisted until the end of the observation period at 14 days p.i. PMN adhered to both infected and uninfected cells within monolayers, suggesting paracrine cell activation. *E. bovis* infection upregulated the transcription of genes encoding for P-selectin, E-selectin, vascular cellular adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). Most marked effects concerned E-selectin followed by P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1. Increased transcript levels were found beginning 30 min p.i. and maximum values occurred 1–2 h p.i. (P-selectin) and 2–4 h p.i. (E-selectin, VCAM-1, ICAM-1). By 12–24 h p.i. levels had decreased to those of uninfected controls. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced PMN adhesion was significantly reduced in infected vs. uninfected BUVEC. *Eimeria bovis* also had suppressive effects on TNF $\alpha$ -mediated upregulation of adhesion molecule gene transcription. The data presented here suggest that infection of BUVEC with *E. bovis* on one hand induces proinflammatory reactions resulting in enhanced PMN adhesion mediated by upregulated adhesion molecule gene transcription but on the other downregulates TNF $\alpha$ -induced cell activation. © 2006 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Eimeria bovis*; Endothelial cells; PMN adhesion; Flow conditions; Adhesion molecules; Realtime PCR

### 1. Introduction

*Eimeria bovis* is an enteropathogen of cattle causing clinical disease in calves and high economic losses worldwide (Fitzgerald, 1980; Dauschies et al., 1998). Instead of infecting enterocytes like other *Eimeria* species in cattle, free *E. bovis* sporozoites invade endothelial cells of the central lymph capillaries of the lacteals in the villi of the ileum, where they develop within a period of 14–18 days to large (up to 250  $\mu$ m) first generation macroschizonts (Hammond, 1946).

*Eimeria* infections in general are under immunological control and a variety of studies have been performed on adaptive immunity to *E. bovis* (Speer et al., 1985; Hughes et al.,

1988, 1989; Fiege et al., 1992; Hermosilla et al., 1999). There is, however, little data available on the innate immune reactions to this parasite. Host endothelial cells could play a critical role in these reactions. They are highly immunoreactive cells, able to produce a broad range of adhesion molecules, cytokines and proinflammatory chemokines upon activation, thereby initiating leukocyte trafficking, e.g. by recruiting polymorphonuclear neutrophils (PMN), natural killer (NK) cells, T lymphocytes and monocytes to the site of infection (for reviews, see Tedder et al., 1995; Ebnet and Vestweber, 1999; Wagner and Roth, 2000). The endothelium-derived adhesion molecules, such as E-selectin, P-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) or vascular cellular adhesion molecule 1 (VCAM-1) are important in these processes (Tedder et al., 1995; Wagner and Roth, 2000). They regulate signaling between the cells and monitor their movement. E-selectin and P-selectin mediate the reversible process of tethering and

\* Corresponding author. Tel.: +49 641 9938475; fax: +49 641 9938469.  
E-mail address: [carlos.r.hermosilla@vetmed.uni-giessen.de](mailto:carlos.r.hermosilla@vetmed.uni-giessen.de) (C. Hermosilla).

rolling of PMN on activated endothelial cells, ICAM-1 and VCAM-1 promote the firm adhesion (for review, see Wagner and Roth, 2000).

Recent studies demonstrate that invasion of endothelial cells by microorganisms such as *Listeria monocytogenes* or *Bartonella henselae* leads to increased expression of adhesion molecules and adhesion of circulating PMN to infected endothelial cells, representing an early step in innate immune reactions (Krüll et al., 1997; Fuhrmann et al., 2001). PMN accumulate very early at the site of schizont formation in *Eimeria* spp. infected rodents (Mesfin et al., 1978; Blagburn and Todd, 1984; Schito and Barta, 1997). They have been shown to kill *Toxoplasma gondii* tachyzoites (Wilson and Remington, 1979) and *Eimeria falciformis* sporozoites in vitro (Bekhti et al., 1992). PMN are further able to generate proinflammatory cytokines (e.g. IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$ ) and chemokines (e.g. IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  and RANTES) (Kasama et al., 1993, 1994; Bliss et al., 1999a,b, 2001; Denkers, 2003) in order to attract other immunocompetent cells to the site of infection.

To characterize such early innate immune reactions to *E. bovis* we analysed in vitro interactions between infected endothelial cells and PMN under physiological flow conditions. We show in a time-course study that PMN adhesion to infected endothelial cell monolayers and quantify the transcription of genes encoding relevant adhesion molecules (E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1) in the host cells. Our data suggest that infected endothelial cells respond upon *E. bovis* infection by distinct interactions with PMN initiated by parasite-induced expression of adhesion molecules.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasites

The *E. bovis* strain H used in the present study was maintained by passages in Holstein–Frisian calves for oocyst production. Sporozoites were excysted from sporulated oocysts as previously described (Hermosilla et al., 2002). Free sporozoites were collected and suspended at concentrations of  $2.5 \times 10^5/500 \mu\text{l}$  in complete endothelial cell growth medium (ECGM, Promocell).

### 2.2. Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC)

BUVEC were isolated from bovine umbilical cords according to Jaffe et al. (1973). Umbilical cords obtained from calves born by caesarean section were kept at 4 °C in 0.9% HBSS-HEPES buffer (pH 7.4, Gibco), supplemented with 500 U/ml penicillin (Sigma) and 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin (Sigma) for 1 h. After clamping one end of the umbilical cord vein closed 0.025% collagenase type II (Worthington Biochemicals Corporation) in PSA salt solution (Gibco) was infused into the lumen. After closing the open end of the vein as well, it was incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 20 min. Thereafter, the vein was gently massaged and the collagenase solution was collected in 50 ml plastic tubes (Nunc) containing 1 ml FCS (Gibco) to

inactivate the collagenase. The vein lumen was washed two times with RPMI 1640 medium (Gibco). The washes were pooled and centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min. The cell pellet was resuspended in complete ECGM (Promocell) and the cells were plated in 25 cm<sup>2</sup> plastic tissue culture flasks (Nunc) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. BUVEC were fed with complete ECGM 1 day after isolation and thereafter every 2–3 days.

### 2.3. Isolation of bovine PMN

Calves were bled by puncture of the jugular vein and blood was collected in 50 ml plastic tubes (Nunc) containing 0.1 ml heparin (Sigma). Heparinized blood was centrifuged at  $400 \times g$  for 20 min on a discontinuous Percoll gradient (Amersham) to yield a PMN fraction of >97% purity. PMN were washed twice with RPMI 1640 medium (Gibco) to remove Percoll, were resuspended ( $5 \times 10^6$  cells/ml) in RPMI 1640 medium (Gibco) containing 2% FCS (Gibco) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for at least 30 min before use.

### 2.4. Infection of BUVEC for PMN adhesion assays

Infected and control BUVEC on Thermanox<sup>®</sup> coverslips (Nunc), previously coated for 1 h at room temperature with bovine fibronectin (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) and cultured in 4-well plates (Nunc) were infected with  $2.5 \times 10^5$  *E. bovis* freshly isolated sporozoites and tested for PMN adhesion 3, 6, 12, 24, 48, 72 h p.i. and in a second series 1, 2, 3, 4, 6, 10, 14 days p.i. under flow conditions.

### 2.5. PMN adhesion assay under flow conditions

Infected and control BUVEC monolayers on Thermanox<sup>®</sup> coverslips were mounted in a parallel plate flow chamber which allows a constant and uniform laminar flow field (Lawrence and Springer, 1991). Prewarmed (37 °C) RPMI 1640 medium was perfused over the BUVEC for 2–3 min in order to remove soluble factors and cell debris. Subsequently the PMN suspension was perfused into the system at a flow rate which resulted in a constant wall shear stress of 1.0 dyne/cm<sup>2</sup> (syringe pump sp 100i; World Precision Instruments). Interactions between BUVEC and PMN were visualized using a phase-contrast videomicroscope (microscope DMIRB, Leica; CCD Video Color Camera, Sony) and videotaped (S-VHS; Panasonic). Quantification of PMN adhesion was performed microscopically by determining the number of adherent cells in five randomly selected vision fields after 5 min. In each adhesion assay PMN of at least three different animals were tested on three different BUVEC isolations. For all experiments, we worked with passages 1 or 2 after primary BUVEC isolation.

In order to determine whether PMN adhered to infected (24 h p.i.) or also to uninfected cells within one monolayer, Thermanox<sup>®</sup> coverslips obtained from PMN adhesion assays were fixed for 10 min in methanol (4 °C), stained with haematoxylin and analysed by light microscopy.

### 2.6. Isolation and DNase I treatment of total RNA of *E. bovis* infected and uninfected BUVEC

To determine the effects of *E. bovis* infection on adhesion molecule gene transcription 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Nunc) containing confluent BUVEC monolayers were infected with  $2.5 \times 10^5$  freshly isolated sporozoites. After 0.5, 1, 2, 4, 6 and 12 h p.i. and 1, 2, 3, 6, 10 and 14 days p.i. infected BUVEC were harvested by accutase treatment (3 ml per flask, 5–15 min, 37 °C; PAA Laboratories) and two consecutive washings in M199 medium (400×g, 10 min; Gibco). Sporozoites were applied in a volume of 500 µl avoiding the removal of medium. Any stronger movement or changing of the horizontal position of culture tissue flasks was also avoided. For each time point of the assays described above an uninfected control was examined in parallel. This turned out to be essential as uninfected control adhesion molecule gene transcripts were enhanced even due to the handling of the culture flasks. For each assay, cells of three different BUVEC isolations were used.

Total RNA was isolated from cell pellets using the RNeasy-Kit for isolation of total RNA (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. In order to minimise contamination with genomic DNA and to achieve reliable photometric measurements of RNA, an on-column-DNase I treatment (Qiagen) during total RNA isolation was applied according to the manufacturer's instructions. Total RNA probes were stored at –80 °C until further use.

A total of 0.3 µg RNA from each sample was controlled for RNA integrity by electrophoresis on a 1% agarose gel. Since the on-column-DNase I treatment was not absolutely efficient, the RNA (1 µg) was additionally treated with RNase-free DNase I (1 U, Boehringer Mannheim; 30 min, 37 °C) in the presence of RNase-free DNase I (1 U, Boehringer Mannheim). DNase I was inactivated by heating the sample (75 °C, 6 min).

### 2.7. Reverse transcription of total RNA

The cDNA synthesis from total RNA was performed using M-MLV-reverse-transcriptase (Gibco). Briefly, 1 µg DNase I-treated total RNA was mixed with 5 µl 5× RT-buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>], 2 µl dithiothreitol (0.1 M), 2 µl hexanucleotides (62.5 A<sub>260</sub>/ml; all Roche), 1 µl dNTPs (10 mM, MBI Fermentas), and 1 µl M-MLV-reverse transcriptase (200 U/µl). The reaction was carried out in a final volume of 25 µl at 37 °C for 60 min. The synthesized cDNA solution was diluted with 185 µl TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA] and stored at –20 °C until further use.

### 2.8. Realtime PCR for relative quantification of bovine *E-selectin*, *P-selectin*, *VCAM-1*, *ICAM-1* and *GAPDH* gene transcripts

Primers and probes were designed using the Primer Express software (version 2.0; Applied Biosystems). As genomic DNA sequences were not available in all cases, probes were designed

to avoid spanning the junctions of two exons. Primers (purchased from MWG Biotech) and probes (purchased from Eurogentec) were used as described (Taubert et al., accepted). Probes were labelled at the 5'-end with the reporter dye FAM (6-carboxyfluorescein) and at the 3'-end with the quencher dye TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine). PCR amplification was performed on an automated fluorometer (ABI PRISM<sup>TM</sup> 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) using 96-well optical plates. Samples were analysed in duplicate. For PCR 5 µl cDNA (corresponding to 25 ng total RNA) were used in a 25 µl PCR reaction mixture containing 12.5 µl TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer and 200 nM probe. Amplification conditions were the same for all targets assayed: one cycle at 50 °C for 2 min, one cycle at 95 °C for 10 min, 45 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s.

Semiquantitative analyses used the comparative C<sub>T</sub> method ( $\Delta\Delta C_T$  method) according to the instructions of the manufacturer of the ABI PRISM<sup>TM</sup> 5700 Sequence Detector and reported as *n*-fold differences in comparison to one of the samples arbitrarily chosen as the calibrator (after normalising all samples referring to their corresponding housekeeping gene GAPDH).

### 2.9. Response of *E. bovis* infected BUVEC to cytokine challenge

The study showed that mRNA levels of adhesion molecules in *E. bovis* infected BUVEC had decreased below control levels from day 6 p.i. onwards. In order to clarify whether this effect relied on a non-responsiveness of aging cells or was due to parasite infection we determined reactions of infected and non-infected controls upon TNF $\alpha$  stimulation.

In a first series of experiments we controlled whether PMN adhesion to infected BUVEC can be influenced by cytokine treatment. For this purpose infected and uninfected BUVEC were treated 6 days p.i. with 10 ng/ml human recombinant TNF $\alpha$  (Serotec). Three different BUVEC isolations and PMN of three different donors (*n*=9) were used. PMN adhesion assays were performed under flow conditions 1 day after cytokine challenge as described.

In a second series of experiments in a time course study up to 13 days p.i. infected and non-infected BUVEC (*n*=3) were treated with 10 ng/ml TNF $\alpha$ . Cells were harvested 4 h later and mRNA levels of adhesion molecule were determined as described above.

### 2.10. Statistical analysis

Results for PMN adhesion are presented as geometric means  $\pm$  dispersion factors. For statistical analyses by ANOVA using the BMDP programme (Dixon, 1987) logarithmically ( $\log_{10}$ ) transformed data obtained from time course studies were analysed. Effects of *E. bovis* infections on TNF $\alpha$  induced activation of BUVEC were analysed by *t*-test for paired samples (PMN adhesion) and two factorial ANOVA (adhesion

molecule gene transcription). Differences between variables were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. *Eimeria bovis* infection of BUVEC leads to enhanced PMN adhesion

BUVEC were rapidly invaded by *E. bovis* sporozoites. The majority of sporozoites were found intracellularly after 1 h p.i. Microscopically detectable replication of the parasite started 6 days p.i. and first macroschizonts of *E. bovis* were observed at 14 days p.i. Infection of BUVEC with *E. bovis* sporozoites resulted in a profound, transient cell activation as seen by subsequently enhanced PMN adhesion to the BUVEC monolayer. ANOVA indicated significant differences in PMN adhesion rates throughout the short ( $P < 0.0001$ ) and long-term ( $P < 0.01$ ) time course.

In the first series of experiments determining short term kinetics up to 72 h p.i. enhanced PMN adhesion was observed as early as 4–8 h p.i. It increased continuously up to 12 h, peaked at 48 h and remained at increased levels until 72 h p.i.

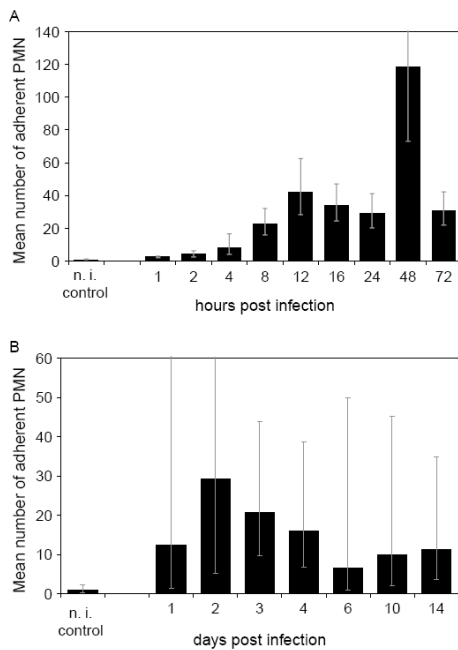


Fig. 1. Adhesion of bovine polymorphonuclear neutrophils (PMN) to *Eimeria bovis*-infected and non-infected (n.i. control) bovine umbilical vein endothelial cell (BUVEC) monolayers, determined in parallel plate flow chambers. Geometrical means of three different BUVEC isolations probed with PMN of three different animals and five viewing fields/isolate and dispersion factors (vertical lines). (A) Short-term time course (1–72 h p.i.). (B) Long-term time course (1–14 days p.i.).

when it returned to non-infected control levels (Fig. 1A). In the second series of experiments which covered the period of time from day 1 to day 14 p.i. PMN adhesion was found markedly enhanced until day 4 p.i. It decreased towards the end of the experiment, but remained at higher levels than the controls throughout the observation period (Fig. 1B). Maximum PMN adhesion was again detected 48 h p.i., confirming data from the first series of experiments (Fig. 1B). There were, however, quantitative differences between the two series of experiments as adhesion rates were distinctly higher in the short-term study when compared with the long-term experiment.

#### 3.2. PMN adhesion induced by *E. bovis* is not restricted to parasitized cells within one BUVEC monolayer

The infection dose used in our experiments led to an infection rate of approximately 25%, i.e. about 75% of the cells were not parasitized within one cell layer. To address the question of whether PMN adhesion occurs exclusively on infected cells, monolayers obtained from adhesion assays performed under flow conditions 24 h p.i. were fixed and stained. Fig. 2 shows that PMN adhesion was not restricted to parasitized endothelial cells within one cell monolayer but that 91% of adhered PMN were found attached to non-infected cells and only 9% of PMN adhered to *E. bovis* infected cells.

#### 3.3. *Eimeria bovis* infection of BUVEC causes temporary upregulation of *E-selectin*, *P-selectin*, *ICAM-1* and *VCAM-1* gene transcription in host cells

*Eimeria bovis* infection significantly induced ( $P < 0.05$ ) upregulation of adhesion molecule gene transcription over time. In the case of P-selectin a marked, rapid increase to 6-fold

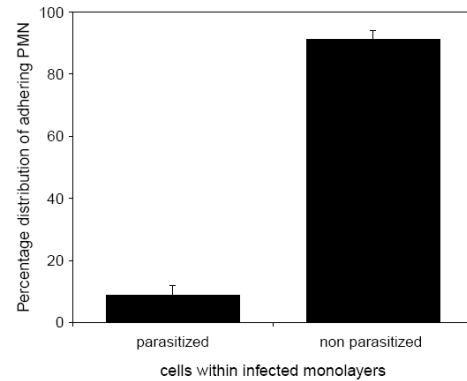


Fig. 2. Percentage of polymorphonuclear neutrophils (PMN) adhering to *Eimeria bovis*-infected and to non-infected cells within bovine umbilical vein endothelial cell (BUVEC) monolayers. Two BUVEC isolations were exposed to PMN of three different animals ( $n=6$ ) in parallel flow chambers 24 h p.i., fixed and haematoxylin stained. The sum of adhering PMN was set 100% and by counting PMN adhering either to parasitized or non-parasitized cells within the cell monolayer, the percentage distribution of adhering PMN was estimated.

levels when compared with controls occurred within 30 min after adding the sporozoites (Fig. 3A). Levels remained at this level for approximately 2 h p.i. but subsequently declined to almost control levels between 1 and 2 days p.i. Measurements performed 6 days p.i. and later suggest a downregulation of the gene transcription.

In case of E-selectin (Fig. 3B) an increase of transcription was observed until a maximum 4 h p.i. to an approximately 25-fold increase when compared with uninfected control cells. Thereafter the levels of transcription decreased to almost control levels 1 day p.i. The subsequent time course was similar to that of the P-selectin gene transcription (Fig. 3A).

VCAM-1 transcript levels followed a time course similar to that of E-selectin, however, the transcription was upregulated to a much lower extent (Fig. 4A). Thus maximum levels 2 h and 4 h p.i. showed a 3-fold increase of transcript levels when compared with uninfected control cells only.

ICAM-1 gene transcription did not seem to be much induced in *E. bovis* infected cells at all (Fig. 4B). Indeed, mean transcript levels seem slightly increased 4 h p.i. (2-fold in comparison with controls) but not to a significant extent.

### 3.4. Influence of *E. bovis* infection on cytokine mediated PMN adhesion to and adhesion molecule gene transcription in BUVEC

TNF $\alpha$  induced significant PMN adhesion to non-infected BUVEC, which was approximately 3-fold higher than adhesion due to the *E. bovis* infection (Fig. 5). Treatment of infected BUVEC with TNF $\alpha$  resulted in PMN adhesion which on average was enhanced by the factor 1.6 when compared with untreated infected cells but reduced approximately by the factor 0.7 when compared with treated, uninfected cells. Differences between infected and uninfected BUVEC were significant ( $P < 0.01$ ).

The effects of TNF $\alpha$  stimulation on adhesion molecule gene transcription in infected and uninfected BUVEC is shown in Fig. 6. Transcription was enhanced by TNF $\alpha$  throughout the cultivation period of 13 days p.i. in infected BUVEC and corresponding uninfected cells but the efficacy decreased until day 13 by approximately 70% for P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 in uninfected cells and by up to 81% (ICAM-1) in infected BUVEC ( $P < 0.0001$  in all cases). In contrast,

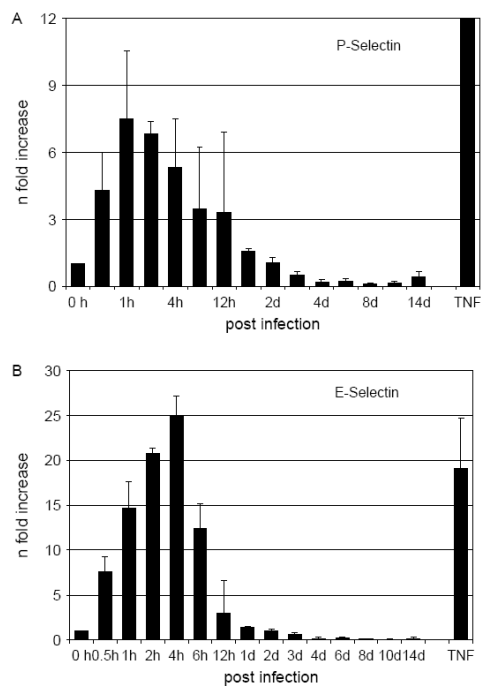


Fig. 3. Relative P-selectin (A) and E-selectin mRNA levels (B) in bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) after infection with *Eimeria bovis* sporozoites compared with non-infected controls (0 h) using Realtime reverse transcriptase (RT)-PCR. Stimulation of BUVEC with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (10 ng/ml) served as a positive control. Arithmetic means of three different BUVEC isolates and standard deviations (vertical lines).

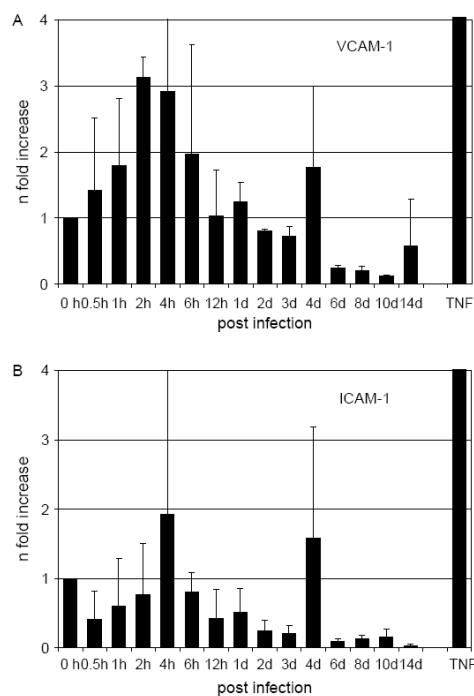


Fig. 4. Relative vascular cellular adhesion molecule 1 (VCAM-1) (A) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA levels (B) in bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) after infection with *Eimeria bovis* sporozoites compared with non-infected controls (0 h) using Realtime reverse transcriptase (RT)-PCR. Stimulation of BUVEC with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (10 ng/ml) served as a positive control. Arithmetic means of three different BUVEC isolates and standard deviations (vertical lines).

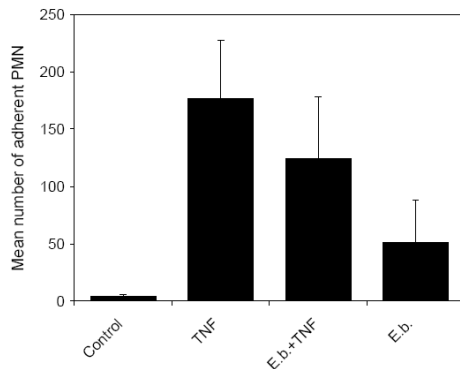


Fig. 5. Adhesion of polymorphonuclear neutrophils (PMN) to *Eimeria bovis*-infected and non-infected bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) after challenge with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ): BUVEC were treated 6 days p.i. with TNF $\alpha$  (10 ng/ml) and exposed to PMN 1 day later. PMN adhesion was determined in parallel plate flow chambers. Arithmetic means of three different BUVEC isolates and PMN from three different donors and standard deviations (vertical lines). TNF and *E. b.* + TNF: uninfected and infected BUVEC, respectively, treated with TNF $\alpha$ ; *E. b.*: infected, untreated BUVEC; Control: uninfected, untreated BUVEC).

E-selectin mRNA levels were hardly affected by long-term incubation throughout the observation period. Transcription intensity did not decrease in a strictly continuous manner with time. Particularly in case of ICAM-1 and VCAM-1 and less distinct in case of P-selectin a marked drop was observed between days 1 and 2 after beginning the incubation followed by increased levels on day 4 and a subsequent decrease to mRNA levels which remained almost constant until day 13.

In general and on average mRNA amounts detected in infected cells were smaller than those found in corresponding uninfected cells. Differences were significant in case of ICAM-1 ( $P < 0.05$ ) and slightly below significance in case of P-selectin ( $P = 0.06$ ).

#### 4. Discussion

This study demonstrates early responses of bovine endothelial cells after exposure to *E. bovis* sporozoites in vitro by upregulation of gene transcription of adhesion molecules and enhanced adhesion of PMN to infected endothelial cell layers compared with uninfected cells.

The cascade started in a sequential manner with enhanced selectin gene transcription followed by that of the VCAM-1 gene and to a clearly less extent of the ICAM-1 gene. Selectins mediate early, reversible contacts between endothelial cells and leukocytes in the blood resulting in a rolling movement of leukocytes on the endothelium surface. VCAM-1 and ICAM-1 are members of the immunoglobulin superfamily which bind to leukocyte integrins and cause their firm adhesion to the endothelium to allow active migration of leukocytes on and their transmigration through the endothelium (for reviews, see

Tedder et al., 1995; Ebnet and Vestweber, 1999). These phenomena were consistently found in our assays and most probably result from upregulated expression of adhesion molecule genes.

Upregulation of adhesion molecule gene transcription started early after exposure of BUVEC to *E. bovis* sporozoites. In particular, selectin gene transcripts were found at high levels after 30 min. When compared with other responses of BUVEC to an *E. bovis* infection this reaction appears to be rapid. For example, substantial amounts of chemokine mRNA, e.g. of MCP-1 and RANTES, were not found until 4 h p.i. (Taubert et al., 2004a,b). In fact, nothing is known on possibly differing signal transduction pathways involved in processing these genes in bovine cells, however, the observed time course for adhesion molecule gene transcription resembles that reported for bacteria (e.g. *Chlamydia pneumoniae*, *B. henselae*) infections of human endothelial cells (Krüll et al., 1999; Fuhrmann et al., 2001). In both cases it was suggested that attachment of the bacteria to the host cell membrane is sufficient for transcription upregulation of adhesion molecule genes, which means cell invasion is not required. It remains to be determined which step of host cell infection initiates upregulation of adhesion molecule genes in the present case. Apicomplexan parasites like *E. bovis* interact with the host cell surface before invasion by releasing a variety of molecules from particular organelles (for review, see Dubremetz et al., 1998; Augustine, 2001) which could play a role with this respect. Interestingly, soluble bacterial components e.g. endotoxins and lysteriolysin (Krüll et al., 1996, 1997) induce almost immediate upregulation of adhesion molecule expression and extracts of *T. gondii*, a protozoan parasite related to *E. bovis*, cause synthesis of cytokines by PMN (Bennouna et al., 2003; Denkers, 2003; Denkers et al., 2004). *E. bovis* derived excretory/secretory proteins may as well have acted on BUVEC and contributed to endothelial cell activation. The possible role of such molecules should be clarified in the future.

The time courses of adhesion molecule gene transcription and PMN adhesion on *E. bovis* infected BUVEC suggest a single stimulus, possibly the attachment of sporozoites to the host cell membrane and a prolonged presence of expressed adhesion molecules. The longevity of the various adhesion molecules on the surface of endothelial cells differs. In the human system ICAM-1 (Scholz et al., 1996), which is of particular importance in adhesion of PMN (Wagner and Roth, 2000), seems to remain for a longer period of time than the other adhesion molecules. As ICAM-1 is – besides being produced de novo – additionally constitutively expressed to a certain degree in endothelial cells, it may nevertheless have played a role in prolonged PMN adhesion to infected BUVEC.

The observation that levels of adhesion molecule mRNA in infected cells fell to levels of controls especially in the late phase of infection appears of special interest as this phenomenon may contribute to a successful development of *E. bovis* macroschizonts. On one hand, it has to be considered that primary cell lines may more or less lose particular capacities after long-term cultivation. This definitely played a



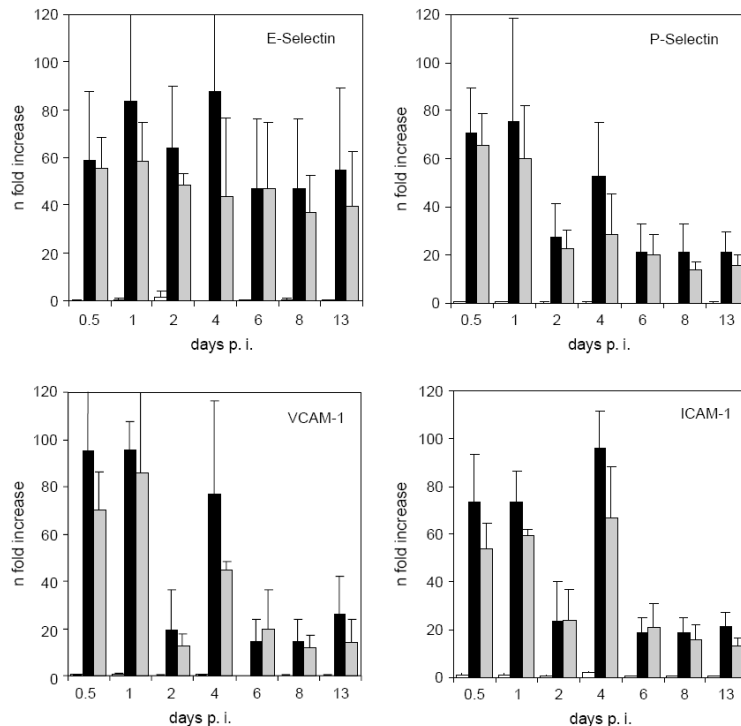


Fig. 6. E-selectin, P-selectin, vascular cellular adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA levels in *Eimeria bovis*-infected (grey columns) and uninfected bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) (black columns) after stimulation at various days p.i. with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (white columns: uninfected, untreated BUVEC). Arithmetic means of three different BUVEC isolates and standard deviations (vertical lines).

role in the present study. Both infected and uninfected BUVEC responded after 6 days of cultivation significantly less to suitable inducers (in our case TNF $\alpha$ ) by enhancement of adhesion molecule gene transcription than cells cultivated for a shorter period of time. On the other hand, at 6 days p.i. BUVEC responded to TNF $\alpha$  to a lesser extent by adhesion molecule gene transcription and PMN adhesion than uninfected control cells, suggesting an active downregulation of these parameters by the parasite, thereby minimising subsequent PMN adhesion and other immune reactions. Considering the long time *E. bovis* needs to complete the first schizogony, this would make sense as an evasion strategy avoiding severe inflammatory processes particularly in the late phase of schizont development. The general ability of apicomplexan parasites to modulate the host cell gene expression is well known (e.g. for *T. gondii*, see Shapira et al., 2002; Aliberti et al., 2004; Lüder and Gross, 2005).

The observation that PMN adhesion is concentrated to non-infected cells in an infected cell monolayer may be explained by a paracrine activation of non-infected bystander cells. Comparable reactions were demonstrated in cytomegalovirus-infected human umbilical vein endothelial cells (Dengler et al., 2000) where infected cells induced activation of non-infected

bystander cells via IL-1 $\beta$ . Apart from IL-1 $\beta$  and among a variety of other molecules, IL-8 and MCP-1 could also play a role in these processes. Recently, we found that at least MCP-1 gene transcription is upregulated in *E. bovis* infected BUVEC layers (Taubert et al., unpublished). Furthermore, soluble proteins excreted or secreted by the parasite may have contributed to these reactions but in our opinion activating processes induced by direct host cell–parasite interactions and subsequent endothelial cell-derived production of molecules acting on neighbour cells would be more convincing. Furthermore, it must be considered that *E. bovis* sporozoites are able to invade cells not only in the classical mode by invagination of the host cell plasma membrane and forming a parasitophorous vacuole (reviewed, e.g. by Dubremetz et al., 1998; Beyer et al., 2002) but also by breaching the cell membrane. Sporozoites generally exit the cells the same way and generally survive (Behrendt et al., 2004). These cells may also be activated and enhance PMN adhesion, however, their number might have been too small to explain the ubiquitous PMN adherence. Behrendt et al. (2004) found a ratio of approximately 1:1 between the numbers of cells having been passed through by parasites and the number of cells harbouring sporozoites within a parasitophorous vacuole. In addition we

have evidence for paracrine endothelial cell activation after infection of BUVEC with tachyzoites of *T. gondii* and *Neospora caninum* (Taubert et al., in press) and we know that tachyzoites of these species fail to breach the host cell membrane as *E. bovis* sporozoites do (Behrendt et al., 2004).

The upregulation of adhesion molecule genes and enhancement of PMN adhesion to endothelial cells seem to be common consequences of coccidia infections. VCAM-1 and ICAM-1 upregulation was reported in *T. gondii* infected endothelial cells (Deckert-Schlüter et al., 1994; Knight et al., 2005) and we recently showed enhanced PMN adhesion and upregulation of E-selectin, P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 in *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoite-infected bovine endothelial cells (Taubert et al., 2004a,b). It seems, however, that the reactions of BUVEC to these latter parasites were distinctly stronger than to *E. bovis*. For example, in a recent experiment PMN adhesion to *E. bovis*-infected BUVEC was about half of that observed after *T. gondii* infection although the infection rate was four times higher in case of *E. bovis* (Taubert and Hermosilla, unpublished). Similarly *T. gondii* and *N. caninum* proved to be more potent inducers of chemokine synthesis in BUVEC than *E. bovis* (Taubert et al., 2004a,b). One might speculate this relatively weak activity of *E. bovis* in stimulating innate immune responses is part of an immune evasion strategy of this parasite, which, in contrast to the rapidly developing and dividing other species, needs to persist in the host cell for more than 2 weeks to complete its first schizogony.

Nevertheless, the above data stand for the capacity of sporozoites of *E. bovis* to initiate a cascade of proinflammatory reactions in its host cell which in vitro leads to adhesion of PMN to an infected cell layer. Since the PMN adhesion experiments were performed under a physiological flow rate and wall shear stress (Lawrence and Springer, 1991) it is likely that the results reflect the situation in vivo. We do not know at present whether or to what extent these innate immune responses affect the parasite during primary infection. At least bovine PMN are involved in killing of *E. bovis* sporozoites in vitro in the presence of serum from convalescent calves (Behrendt et al., unpubl.). However, even if these innate reactions are of little influence on a primary infection in vivo, they participate in a cascade of events involved in mounting a specific immune response (Cassatella, 1995; Scapini et al., 2000), and therefore, are of general importance in the control of *E. bovis* infections. On the other hand, the observation that *E. bovis* seems able to downregulate inflammatory host processes, suggests a well modulated host response as a pre-requisite of the long lasting first schizogony.

#### Acknowledgements

We are indebted to B. Meinecke and H. Zerbe (University of Veterinary Medicine, Hannover) for their kind cooperation and supply of bovine umbilical cords. Further, we acknowledge B. Hofmann and C. Scheld for their excellent technical assistance in cell culture. We also thank K. Failing (Giessen) for support in statistical analyses of the data. This work was

supported by the German Research Foundation (DFG; project TA 291/1-1).

#### References

- Aliberti, J., Jankovic, D., Sher, A., 2004. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol. Rev.* 201, 26–34.
- Augustine, P.C., 2001. Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1–8.
- Behrendt, J.H., Clauss, W., Zahner, H., Hermosilla, C., 2004. Alternative mechanism of *Eimeria bovis* sporozoites to invade cells in vitro by breaching the plasma membrane. *J. Parasitol.* 90, 1163–1165.
- Bekhti, K., Kazanji, M., Pery, P., 1992. In vitro interactions between murine neutrophils and *Eimeria falciformis* sporozoites. *Res. Immunol.* 143, 909–917.
- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., Denkers, E.Y., 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 171, 6052–6058.
- Beyer, T.V., Svezhova, N.V., Radchenko, A.I., Sidorenko, N.V., 2002. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). *Cell Biol. Int.* 26, 861–871.
- Blagburn, B.L., Todd Jr., K.S., 1984. Pathological changes and immunity associated with experimental *Eimeria vermiformis* infections in *Mus musculus*. *J. Protozool.* 31, 556–561.
- Bliss, S.K., Marshall, A.J., Zhang, Y., Denkers, E.Y., 1999a. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J. Immunol.* 162, 7369–7375.
- Bliss, S.K., Zhang, Y., Denkers, E.Y., 1999b. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *J. Immunol.* 163, 2081–2088.
- Bliss, S.K., Gavrilescu, L.C., Alcaraz, A., Denkers, E.Y., 2001. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect. Immun.* 69, 4898–4905.
- Cassatella, M.A., 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16, 21–26.
- Dauguschies, A., Bürger, H.J., Akimaru, M., 1998. Apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance during experimental infection of calves with *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 77, 93–102.
- Deckert-Schlüter, M., Schlüter, D., Hof, H., Wiestler, O.D., Lassmann, H., 1994. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 457–468.
- Dengler, T.J., Raftery, M.J., Werle, M., Zimmermann, R., Schonrich, G., 2000. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1beta. *Transplantation* 69, 1160–1168.
- Denkers, E.Y., 2003. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Immunol. Med. Microbiol.* 39, 193–203.
- Denkers, E.Y., Butcher, B.A., Del Rio, L., Bennouna, S., 2004. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int. J. Parasitol.* 34, 411–421.
- Dixon, W.J., 1987. *BMDP Statistical Software*. Manual Printing. University of California Press, Berkeley, CA.
- 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.
- Ebnet, K., Vestweber, D., 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell Biol.* 112, 1–23.
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H., Bürger, H.J., 1992. *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol. Res.* 78, 32–38.
- Fitzgerald, P.R., 1980. The economic impact of coccidiosis in domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24, 121–143.

- Fuhrmann, O., Arvand, M., Gohler, A., Schmid, M., Krull, M., Hippenstiel, S., Seybold, J., Dehio, C., Suttrop, N., 2001. *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect. Immun.* 69, 5088–5097.
- Hammond, D., 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.
- Hermosilla, C., Bürger, H.J., Zahner, H., 1999. T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Vet. Parasitol.* 84, 49–64.
- Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S., Zahner, H., 2002. Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol. Res.* 88, 301–307.
- Hughes, H.P., Thomas, K.R., Speer, C.A., 1988. Antigen-specific lymphocyte transformation induced by oocyst antigens of *Eimeria bovis*. *Infect. Immun.* 56, 1518–1525.
- Hughes, H.P., Whitmire, W.M., Speer, C.A., 1989. Immunity patterns during acute infection by *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.* 75, 86–91.
- Jaffe, E., Nachman, R., Becker, C., Mimnick, C., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52, 2745.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J. Exp. Med.* 178, 63–72.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1994. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J. Immunol.* 152, 3559–3569.
- Knight, B.C., Brunton, C.L., Modi, N.C., Wallace, G.R., Stanford, M.R., 2005. The effect of *Toxoplasma gondii* infection on expression of chemokines by rat retinal vascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 160, 41–47.
- Krüll, M., Dold, C., Hippenstiel, S., Rosseau, S., Lohmeyer, J., Suttrop, N., 1996. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus* alpha-toxin potentially induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 157, 4133–4140.
- Krüll, M., Nost, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., Suttrop, N., 1997. *Listeria monocytogenes* potentially induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 159, 1970–1976.
- Krüll, M., Klucken, A.C., Wuppermann, F.N., Fuhrmann, O., Magerl, C., Seybold, J., Hippenstiel, S., Hegemann, J.H., Jantos, C.A., Suttrop, N., 1999. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J. Immunol.* 162, 4834–4841.
- Lawrence, M.B., Springer, T.A., 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65, 859–873.
- Lüder, C.G., Gross, U., 2005. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289, 219–237.
- Mesfin, G.M., Bellamy, J.E., Stockdale, P.H., 1978. The pathological changes caused by *Eimeria falciformis* var *pragensis* in mice. *Can. J. Comp. Med.* 42, 496–510.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A., 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177, 195–203.
- Schito, M.L., Barta, J.R., 1997. Nonspecific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice. *Infect. Immun.* 65, 3165–3170.
- Scholz, D., Devaux, B., Hirche, A., Potzsch, B., Kropp, B., Schaper, W., Schaper, J., 1996. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* 284, 415–423.
- Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A., Caamano, J., Hunter, C.A., 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl. 1), S66–S72.
- 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* (Apicomplexa) in cultured bovine monocytes. *Infect. Immun.* 50, 566–571.
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2004a. Polymorphonuclear cell adhesion and adhesion molecule gene transcription in coccidia (*Eimeria bovis*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*) infected bovine endothelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 71–72.
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2004b. Chemokines, GM-CSF, COX-2 and iNOS gene transcription in coccidia (*Eimeria bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) infected bovine endothelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 75.
- Taubert, A., Krüll, M., Zahner, H., Hermosilla, C., accepted for publication. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Vet. Immunol. Immunopathol.*
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., Engel, P., 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 9, 866–873.
- Wagner, J.G., Roth, R.A., 2000. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* 52, 349–374.
- Wilson, C.B., Remington, J.S., 1979. Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 140, 890–895.

**5.4 “*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion.”**

Taubert, A.\*, Krüll, M., Zahner, H., and Hermosilla, C.

*Vet. Immunol. Immunopathol.* (2006) **112**: 272-283

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche wesentlich
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig



## *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion

Anja Taubert<sup>a,\*</sup>, Matthias Krüll<sup>b</sup>, Horst Zahner<sup>a</sup>, Carlos Hermosilla<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Parasitology, Rudolf-Buchheim-Str. 2, 35392 Giessen, Germany

<sup>b</sup> Department of Internal Medicine/Infectious Diseases, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Received 19 October 2005; received in revised form 15 March 2006; accepted 29 March 2006

### Abstract

*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are important, closely related coccidian parasites infecting a broad spectrum of hosts and host cells. Infections under a complex immunological regulation; however, little is known on innate immune reactions to these parasites. To investigate interactions between infected cells and polymorphonuclear neutrophil cells (PMN), PMN adhesion to tachyzoite-infected bovine umbilical vein endothelial cells (BUVECs) under physiological flow conditions and adhesion molecule (E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1) gene transcription in infected BUVECs were examined in vitro for 72 h post-infection (p.i.). BUVECs were rapidly invaded by *T. gondii* and *N. caninum*; in general 10–15% of the cells became infected. Tachyzoites were released from 24 and 48 h p.i. onwards, for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively. PMN adhesion to infected cell layers increased early (4 h) after infection with both parasites, reached maximum levels 16–24 h p.i., but remained enhanced throughout the observation period. PMN adhered to both, infected and non-infected cells within one cell layer, suggesting parasites induced paracrine activation of the BUVECs. Semiquantitative Realtime RT-PCR showed upregulated transcription of the E- and P-selectin genes in BUVECs within 1 h p.i. and of ICAM-1 and VCAM-1 genes within 2 h p.i. Maximum transcript levels were observed at 4–6 h p.i.; the 24 h p.i. gene transcription had declined to control levels. In general, *T. gondii* more strongly induced PMN adhesion and adhesion molecule gene transcription than *N. caninum*. The data suggest an effective role of PMN in innate immune reactions to these parasites.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; Bovine endothelial cells; PMN adhesion; Adhesion molecules

\* Corresponding author. Tel.: +49 641 99 38475; fax: +49 641 99 38469.

E-mail address: [anja.taubert@vetmed.uni-giessen.de](mailto:anja.taubert@vetmed.uni-giessen.de) (A. Taubert).

### 1. Introduction

*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are closely related coccidian species infecting a broad

range of hosts and host cells. *T. gondii* may cause abortion in sheep (Dubey and Welcome, 1988) and is an important zoonotic agent; *N. caninum* is responsible for reproductive problems, especially in cattle (Anderson et al., 2000). Both infections undergo a complex immunological regulation (Gazzinelli et al., 1993, 1994, 1996, 1998; Rettigner et al., 2004; Innes et al., 2005; Moore et al., 2005); however, little is known on innate immune reactions, especially to *N. caninum*, although the interaction of both parasites with the innate host defence should be critical in determining the character of the subsequent infection. Some data are available in *T. gondii* infections. For example, murine NK cells are capable of lysing parasite-infested cells (Hauser and Tsai, 1986; Subauste et al., 1992) and  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> T cells seem to play a protective role against *T. gondii* in the mouse system (Hisaeda et al., 1995, 1996a,b, 1997). Furthermore, Gr-1<sup>+</sup> monocytes have been demonstrated to be essential for control of acute toxoplasmosis (Robben et al., 2005). Some information exist on interactions of *T. gondii* with polymorphonuclear neutrophil cells (PMN), which play a critical role in innate immune responses to bacteria and fungi (Conlan and North, 1991; Rogers and Unanue, 1993; Romani et al., 1996). In the case of *T. gondii*, PMN can phagocytose and kill tachyzoites (Wilson and Remington, 1979; MacLaren and De Souza, 2002; MacLaren et al., 2004) and *T. gondii* antigen upregulates IL-12, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , RANTES, MCP-1 and TNF $\alpha$  synthesis in PMN (Bliss et al., 1999a,b, 2001; Bennouna et al., 2003; Denkers et al., 2003, 2004). Therefore, PMN may attract other immune cells, such as T cells, macrophages and monocytes, and stimulate ongoing innate immune reactions and even adaptive immune responses. Furthermore, IL-6-deficient mice, which show an impaired neutrophil response (Romani et al., 1996), or mice depleted of granulocytes are more susceptible to an acute *T. gondii* infection than normal controls (Sayles and Johnson, 1996; Alexander et al., 1997; Scharton-Kersten et al., 1997).

The present study investigates the interactions of PMN with *T. gondii*- and *N. caninum*-infected cells and innate reactions of the host cells upon parasite infection. Considering the fact that *N. caninum* is a non-zoonotic parasite so far and represents an important causative agent of abortion, mainly in cattle, which are also susceptible for *T. gondii* infections, we have selected the bovine system for

our experiments and use endothelial cells as host cells. Endothelial cells can be invaded by tachyzoites of both parasite species (Dimier and Bout, 1993; Hemphill et al., 1996; Brunton et al., 2000; Daubener et al., 2001) and are highly immunoreactive cells, which have often been demonstrated to react very rapidly towards different infective or stimulating agents by producing a broad range of molecules, such as adhesion molecules, cytokines or chemokines (for reviews, see Carlos and Harlan, 1994; Ebnert and Vestweber, 1999; Wagner and Roth, 2000), thereby initiating proinflammatory responses. As shown for several microorganisms, the process of invasion into endothelial cells is critical in the patho- and immunogenesis of the resulting infection (Krüll et al., 1996, 1997; Fuhrmann et al., 2001). In the case of *T. gondii*, recent works showed upregulation of the adhesion molecule ICAM-1 in brain and retinal vascular endothelial cells (Deckert-Schlüter et al., 1999; Knight et al., 2005), a molecule which is also implicated in *T. gondii* transepithelial migration (Barragan et al., 2005). Furthermore, Knight et al. (2005) demonstrated upregulation of GRO1, MCP-1, and RANTES gene transcription in retinal vascular endothelial cells—pointing at possible recruitment of immune cells due to the infection.

Our studies showed that *T. gondii* and *N. caninum* invaded and strongly activated bovine umbilical vein endothelial cells (BUVECs), promoting enhanced PMN adhesion. Due to the lack of commercially available antibodies directed against bovine adhesion molecules we had to restrict our experiments to the analysis of gene transcription and could demonstrate that increased PMN adhesion was associated with upregulated E-selectin, P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 gene transcription. PMN adhesion was not restricted to infected cells but also occurred on non-infected cells of the same cell layer suggesting parasite-induced paracrine cell activation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites

Cryopreserved *T. gondii* (RH strain; Sabin, 1941) tachyzoites were passaged twice by intraperitoneal injection of BALB/c mice. Parasites were isolated

48 h after the last injection by intraperitoneal lavage with PBS, washed several times with PBS (400 × g, 10 min) and cultivated in vitro in Vero cells. *N. caninum* (strain NC-1; Dubey et al., 1988) was maintained in vitro in Vero cells. Liberated tachyzoites of both species were washed off the cultures and prepared as above.

### 2.2. Isolation and maintenance of bovine umbilical vein endothelial cells (BUVECs)

BUVECs were isolated according to Jaffe et al. (1973): Umbilical cords obtained from calves born by *Sectio caesarea* were kept at 4 °C in 0.9% HBSS–HEPES buffer (pH 7.4; Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% penicillin (500 U/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA) and streptomycin (500 µg/ml; Sigma). For preparation of endothelial cells, 0.025% collagenase type II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) was infused into the lumen of the isolated and ligated umbilical vein and incubated for 20 min at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. After gently massaging the umbilical vein, the collagenase-cell suspension was collected and supplemented with 1 ml FCS (Gibco) to inactivate the collagenase. After two washings (400 × g, 10 min, 4 °C), the cells were resuspended in ECGM (endothelial cell growth medium; PromoCell, Heidelberg, Germany), plated in 25 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) and kept at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Isolation of bovine PMN

Heparinized bovine blood was centrifuged on a discontinuous Percoll gradient (400 × g, 20 min; Amersham Pharmacia Biotech) to yield a PMN fraction of >97% purity. After two consecutive washings (400 × g, 10 min), PMN were resuspended in RPMI-1640 containing 2% FCS and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for at least 30 min before use in adhesion assays.

### 2.4. PMN adhesion assays performed under flow conditions

PMN adhesion was determined using a parallel plate flow-chamber according to Lawrence and Springer (1991). After coating Thermanox<sup>®</sup> cover-

slips (22 mm × 60 mm; Nunc) with bovine fibronectin (10 µg/ml, 2 h RT; Sigma) BUVECs were grown on these coverslips to confluence and infected with 2.5 × 10<sup>5</sup> freshly isolated tachyzoites of *T. gondii* and *N. caninum* or stimulated with human recombinant TNFα (10 ng/ml for 24 h; Serotec, Oxford, UK) for positive control. Before infection and 4, 8, 12, 16, 24, 48, and 72 h post-infection (p.i.), the coverslips were placed into the chamber and a suspension of 5 × 10<sup>6</sup> PMN/ml was perfused into the system at a constant wall shear stress of 1.0 dyne/cm<sup>2</sup> (syringe pump sp100i; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Interactions between PMN and endothelial cells were visualized using a phase-contrast video-microscope (microscope DMIRB, Leica; CCD Video Color Camera, Sony) and videotaped (S-VHS; Panasonic). Using 100× magnification, cell adhesion was determined after 5 min of perfusion by counting adherent cells in five randomly chosen vision fields. In each adhesion assay, PMN of at least three different animals were tested on two different BUVEC isolations (passage 1 or 2). Stimulation of BUVECs with human recombinant TNFα (Serotec; 10 ng/ml, 24 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) was used as a positive control.

To determine of whether PMN adhered selectively to infected (2 days p.i.) cells or to non-infected BUVECs within the cell layer, coverslips obtained from the above described assays were fixed (10 min in ice-cold methanol), stained with haematoxylin and analysed by light microscopy. Using 400× magnification, adherent cells in five randomly chosen vision fields were counted.

### 2.5. Isolation and DNase I treatment of total RNA of *T. gondii*- and *N. caninum*-infected BUVECs

Confluent BUVEC cell layers were infected as mentioned above. For each time point investigated we included a non-infected control. Stimulation of BUVECs with recombinant human TNFα (10 ng/ml for 6 h) served as positive control. At 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h p.i., cells were harvested after treatment with accutase (3 ml per flask, 5–10 min, 37 °C; PAA Laboratories) and washed twice with medium M199 (400 × g, 10 min; Gibco). Total RNA was isolated from the cell pellet using the RNeasy kit for isolation of total RNA (Qiagen, Venlo, The Netherlands) following the manufacturer's instructions.

To minimize contamination with genomic DNA and achieve reliable photometric measurements of RNA, an on-column DNase I treatment (Qiagen) of RNA was applied, according to the manufacturer's instructions. RNA probes were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

A total of 0.3  $\mu\text{g}$  RNA from each sample was run on a 1% agarose gel to check RNA integrity. As the on-column DNase I treatment was not absolutely efficient, the RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was additionally treated with RNase-free DNase I (1 U; Boehringer Mannheim; 30 min,  $37^{\circ}\text{C}$ ) followed by DNase I inactivation ( $75^{\circ}\text{C}$ , 6 min).

2.6. Reverse transcription of total RNA

cDNA synthesis was performed using M-MLV-reverse transcriptase (Gibco). Briefly, 1  $\mu\text{g}$  DNase I-treated total RNA was mixed with 5  $\mu\text{l}$   $5\times$  RT-buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ], 2  $\mu\text{l}$  DTT (0.1 M), 2  $\mu\text{l}$  hexanucleotides (62.5  $\text{A}_{260}/\text{ml}$ ; all Boehringer Mannheim), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and 1  $\mu\text{l}$  M-MLV-reverse transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ ). The reaction was carried out in a final volume of 25  $\mu\text{l}$  at  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 min. The synthesized cDNA was diluted with 175  $\mu\text{l}$  TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA] and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use.

2.7. Realtime PCR for relative quantification of *E-selectin*, *P-selectin*, *VCAM-1*, *ICAM-1* and *GAPDH* gene transcripts

Primers and probes used for Realtime RT-PCR systems are depicted in Table 1. The probes (purchased from Eurogentec, Liege, Belgium) were labelled at the 5'-end with the reporter dye FAM (6-carboxyfluorescein) and at the 3'-end with the quencher dye TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine). PCR amplification was performed on an automated fluorometer (ABI PRISM<sup>TM</sup> 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 96-well optical plates. Sample were analysed in duplicates. For PCR, 5  $\mu\text{l}$  cDNA (corresponding to 25 ng total RNA) were used in a 25  $\mu\text{l}$  PCR reaction mixture containing 12.5  $\mu\text{l}$  TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer and 200 nM

Table 1  
Sequences of bovine probes and primers used for Realtime RT-PCR

Target	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Probe 5' FAM-3' TAMRA	Length (nt)
GAPDH	GCGATACTCAGTCTTCTACCTTTCGA	TCGTACACAGGAAATGAGCTTGAC	CTGGCATTGCCCTCAACGACCCTT	82
E-selectin	ACTCCTTGGCAGTTGGACTT	AGGGTTTCAGAGCCAGAA	TGCTGGAGTCTCCCTGTGTGACAATACCATC	83
P-selectin	GCCACCTAGGAAACATACGGAGTT	GATTTGGACGAGGTCAACCAAGA	CTGCGTTTGAACCCCAAGCCCTTAAGAGAC	91
VCAM-1	TTGGATGGTGTTCAGATTCT	AGTCAGTGAACAGAGTACCAATCT	AGCTTCCCAAAATCCACATATTCCCAAGTG	97
ICAM-1	CTCTGTCCATGGGATTTGACA	GTITTCATGTGACCCCTGTGGTAG	CAGGCCATAAATGGTGTCTCACTCTTCAT	86



probe. The amplification conditions were the same for all targets assayed: one cycle at 50 °C for 2 min, one cycle at 95 °C for 10 min, 45 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s. Semiquantitative analysis was done using the comparative  $C_T$  method ( $\Delta\Delta C_T$  method), according to the instructions of the manufacturer of the ABI PRISM™ 5700 Sequence Detector.

2.8. Determination of the linear range and amplification efficiency

The comparative  $C_T$  method is reliable only if amplification efficiencies of target and housekeeping genes are approximately equal. To determine the linear range and amplification efficiencies of the GAPDH and adhesion molecule cDNAs, six fourfold dilution steps were amplified from two different cDNAs derived from TNF $\alpha$ -stimulated BUVECs to obtain standard curves. The differences in slopes between standard curves obtained from GAPDH and the adhesion molecules (which should be <0.1 for reliable quantification) were plotted against the logarithm of input total RNA and a regression line was calculated.

2.9. Statistical analyses

Statistical analyses used ANOVA tests. Data were transformed to  $\log_{10}$  values and described by evaluating geometric means and dispersion factors. A  $P$ -value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Infections of BUVECs with *T. gondii* and *N. caninum* lead to increased PMN adhesion

BUVECs were invaded by tachyzoites of both species within 20 min. Major parasite replication and host-cell rupture occurred, in general, at 48 and 72 h p.i., for *T. gondii* and *N. caninum*, respectively.

Stimulation with TNF $\alpha$  was used as positive control and induced enhanced PMN adhesion to non-infected BUVECs (Fig. 1A and B). The minor variations in PMN adhesion between the two experiments might be explained by the use of two different TNF $\alpha$  batches.

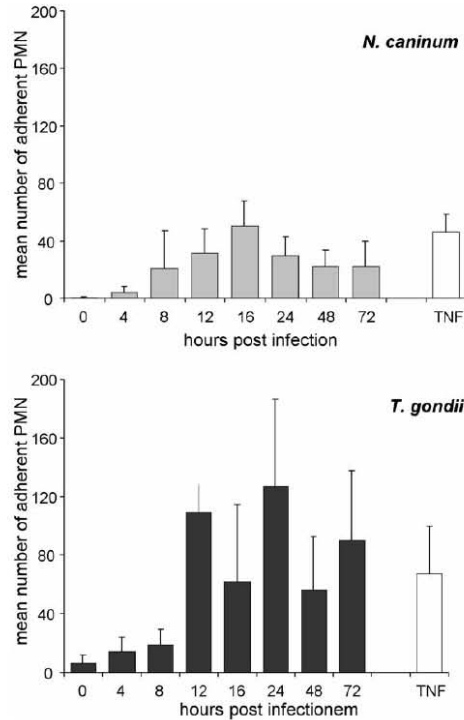


Fig. 1. PMN adhesion on *N. caninum*- and *T. gondii*-infected BUVECs performed under flow conditions. BUVECs were grown to confluence and infected with  $2.5 \times 10^5$  tachyzoites of *N. caninum* (A) or *T. gondii* (B). Stimulation with human recombinant TNF $\alpha$  (10 ng/ml) for 24 h served as positive control. Using the parallel plate flow chamber bovine PMN were tested for adhesion on 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 and 72 h p.i. Arithmetical means of five randomly chosen vision fields (100 $\times$  magnification) derived from assays probing two different BUVEC isolates with PMN of three different animals and standard deviations (vertical lines).

In both infections, significantly ( $P < 0.0001$ ) enhanced PMN adhesion occurred over time (Fig. 1). In the case of *N. caninum* infections, the number of adhered PMN increased continuously until 16 h p.i. and decreased thereafter, but at 72 h p.i., PMN adhesion still was significantly enhanced. In the case of *T. gondii* the number of adherent cells increased distinctly until 12 h p.i. Subsequently, adhesion rates varied irregularly but remained at a high level throughout the observation period, with

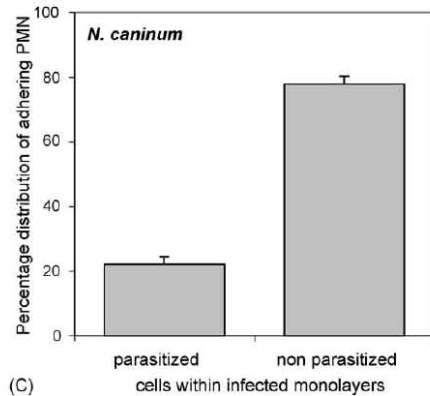
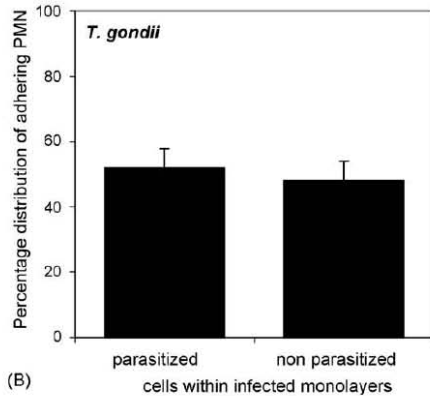
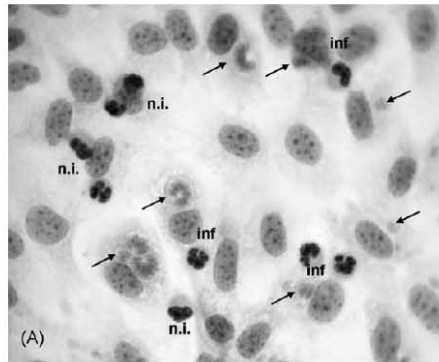


Fig. 2. PMN adhesion on *T. gondii*- (A and B) or *N. caninum*- (C) infected and non-infected BUVECs within one cell layer. BUVECs were grown to confluence and infected with  $2 \times 10^5$  tachyzoites of

maximum counts at 24 h p.i. In general and referring to the overall experiment, levels of PMN adhesion were significantly higher ( $P < 0.001$ ) after *T. gondii* infection (Fig. 1B) compared with *N. caninum* infection (Fig. 1A).

3.2. *T. gondii* and *N. caninum* induced PMN adhesion is not restricted to infected BUVECs

Stained coverslips derived from the adhesion assays described above (48 h p.i.) showed that PMN adhesion was not restricted to infected BUVECs but occurred on non-infected cells as well. In the case of *T. gondii* where 54% of the cells were infected, approximately half of the adherent PMN were found attached to parasitized and parasite-free BUVECs (Fig. 2). In the case of *N. caninum*, 13% of the cells were infected and 22 and 78% of the PMN had adhered to infected and non-infected cells, respectively.

3.3. Linear range and amplification efficiencies of the GAPDH and adhesion molecule Realtime RT-PCR systems

To determine the linear range and amplification efficiencies of GAPDH and adhesion molecule PCR systems, six fourfold dilutions of two different cDNAs derived from TNF $\alpha$  stimulated BUVECs were amplified in duplicate. The titration curves obtained revealed highly significant ( $R^2 > 0.98$  in all cases, data not shown) results. Differences between the slopes of GAPDH and the adhesion molecules were 0.017 (VCAM-1), 0.022 (ICAM-1), 0.046 (E-selectin) and 0.029 (P-selectin). As according to the manufacturer's instructions, these differences should be  $< 0.1$  to make the comparative  $C_T$  method for quantification applicable—all developed systems fit very well to these requirements.

*T. gondii* or *N. caninum*. Using the parallel plate flow chamber bovine PMN were tested for adhesion on 48 h p.i. After fixation and haematoxylin staining (A), the proportion of PMN adhering on *N. caninum*- (C) or *T. gondii*-infected (A: inf, B: parasitized) or non-infected (A: n.i., B: non-parasitized) cells was estimated. Arithmetical means of two different BUVEC isolates tested with PMN of two different animals and standard deviations (vertical lines). The arrows indicate intracellular parasites of different maturation grades.

3.4. Infections of BUVECs with *T. gondii* or *N. caninum* lead to upregulation of E-selectin, P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 gene transcription

To identify host cell-derived adhesion molecules responsible for enhanced PMN adhesion on *N. caninum*- and *T. gondii*-infected BUVECs, levels of E-selectin (Fig. 3), P-selectin (Fig. 4), VCAM-1 (Fig. 5) and ICAM-1 (Fig. 6) gene transcription were determined in the course of in vitro infections. All adhesion molecules investigated were significantly ( $P < 0.001$ – $0.0001$ ) upregulated by both infections when calculated for the overall experiment. Levels of gene transcription peaked 4–6 h p.i. and declined thereafter until 24 h p.i. to the levels of non-infected controls (Figs. 3–6). Generally higher gene-transcript levels were found in *T. gondii*-infected cells compared with *N. caninum* infection, although the differences were only significant in case of E- (Fig. 3) and P-selectin (Fig. 4) ( $P < 0.01$ ). In addition, the transcription of the adhesion molecule genes seemed to start slightly earlier in the former infection compared with *N. caninum* infection. The responses were, in principle, similar in both infections, i.e. the most pronounced increase of gene transcription was observed in the case of E-selectin followed by

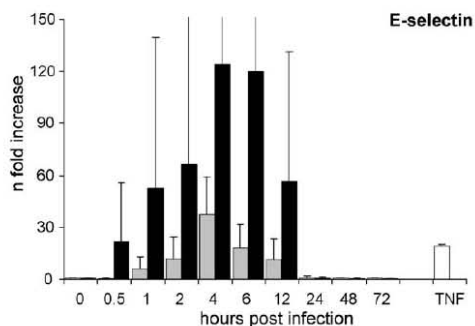


Fig. 3. Transcription of the E-selectin gene in BUVECs throughout *T. gondii* and *N. caninum* infection. BUVECs were grown to confluence and infected with  $2.5 \times 10^5$  tachyzoites of *N. caninum* (grey bars) or *T. gondii* (black bars). Stimulation with human recombinant TNF $\alpha$  (10 ng/ml) served as positive control. Total RNA was isolated after 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h p.i. Non-infected controls were run for each time point and the gene transcription values were illustrated as *n*-fold increase in relation to the non-infected control of that specific time point. Then, 1  $\mu$ g total RNA was reverse transcribed into cDNA and probed with Realtime RT-PCR systems for the detection of E-selectin mRNA equivalents.

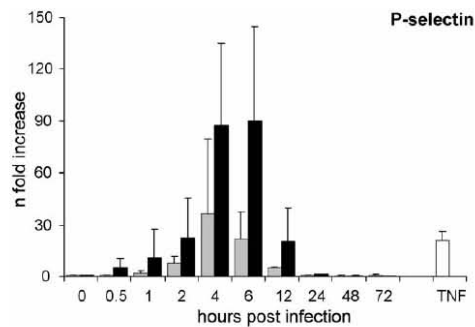


Fig. 4. Transcription of the P-selectin gene in BUVECs throughout *T. gondii* and *N. caninum* infection. BUVECs were grown to confluence and infected with  $2.5 \times 10^5$  tachyzoites of *N. caninum* (grey bars) or *T. gondii* (black bars). Stimulation with human recombinant TNF $\alpha$  (10 ng/ml) served as positive control. Total RNA was isolated after 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h p.i. Non-infected controls were run for each time point and the gene transcription values were illustrated as *n*-fold increase in relation to the non-infected control of that specific time point. Then, 1  $\mu$ g total RNA was reverse transcribed into cDNA and probed with Realtime RT-PCR systems for the detection of P-selectin mRNA equivalents.

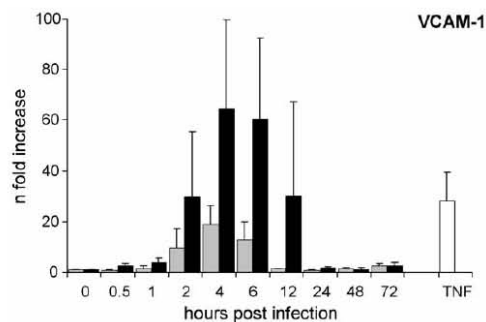


Fig. 5. Transcription of the VCAM-1 gene in BUVECs throughout *T. gondii* and *N. caninum* infection. BUVECs were grown to confluence and infected with  $2.5 \times 10^5$  tachyzoites of *N. caninum* (grey bars) or *T. gondii* (black bars). Stimulation with human recombinant TNF $\alpha$  (10 ng/ml) served as positive control. Total RNA was isolated after 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h p.i. Non-infected controls were run for each time point and the gene transcription values were illustrated as *n*-fold increase in relation to the non-infected control of that specific time point. Then, 1  $\mu$ g total RNA was reverse transcribed into cDNA and probed with Realtime RT-PCR systems for the detection of VCAM-1 mRNA equivalents.

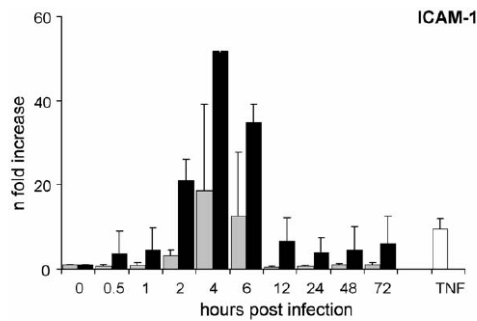


Fig. 6. Transcription of the ICAM-1 gene in BUVECs throughout *T. gondii* and *N. caninum* infection. BUVECs were grown to confluence and infected with  $2.5 \times 10^5$  tachyzoites of *N. caninum* (grey bars) or *T. gondii* (black bars). Stimulation with human recombinant TNF $\alpha$  (10 ng/ml) served as positive control. Total RNA was isolated after 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h p.i. Non-infected controls were run for each time point and the gene transcription values were illustrated as *n*-fold increase in relation to the non-infected control of that specific time point. Then, 1  $\mu$ g total RNA was reverse transcribed into cDNA and probed with Realtime RT-PCR systems for the detection of ICAM-1 mRNA equivalents.

P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1. However, considering the maximum levels, the response to *T. gondii* was three to four times stronger than to *N. caninum*, although infection rates were comparable (at 10.2 and 8.7%, respectively).

#### 4. Discussion

The experiments described above show that tachyzoites of the coccidian species *T. gondii* and *N. caninum* invade BUVECs and activate these cells rapidly, resulting in enhanced adhesion molecule gene transcription and adhesion of PMN to an infected endothelial cell monolayer in vitro. The adhesion experiments were performed under flow and wall shear stress conditions, which correspond to the situation in blood capillaries. Thus, they may simulate in vivo conditions. As activated endothelial cells and PMN both take part in initiating innate and adaptive immune responses by recruiting several kinds of immune cells, e.g. T cells, monocytes or macrophages via chemokine production, the reactions described above should be of relevance in subsequent immune reactions against the parasites.

Enhanced adhesion of PMN seems to be induced already by the invaded tachyzoite stage. It started 4 h p.i., i.e. before any light microscopically detectable development of the parasites occurred and, in the case of *N. caninum*, even maximum reactions were observed before replication was accomplished. With progressing parasite development, PMN adhesion to infected BUVEC layers decreased somewhat.

Due to the lack of commercially available antibodies against bovine adhesion molecules, we had to restrict our experiments to analyses of adhesion molecule gene transcription. Increased PMN adhesion to infected cell layers was associated with a temporarily upregulated transcription of the genes encoding for E-selectin, P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1. Interestingly, in the bovine system, P-selectin is – besides being stored in Weibel–Palade-like bodies, as known for humans (Bonfanti et al., 1989; McEver et al., 1989) – additionally inducible upon single cytokine treatment (Weller et al., 1992; Bischoff and Brasel, 1995), so that analyses of this gene were included in our assays. The upregulation of adhesion molecule gene transcripts started within the first hour after infection and reached maximum levels 4 h p.i., suggesting the tachyzoite stage as the cause of these reactions. Furthermore, the gene transcription of adhesion molecules had decreased to control levels even before new tachyzoites had developed.

Our findings confirm data reported by others in the case of *T. gondii*; for *N. caninum* infections no related data are available so far. Thus, a prominent induction of VCAM-1 in endothelial cells of cerebral blood vessels of *T. gondii*-infected mice and increased levels of ICAM-1 were detected in rat retinal epithelial cells, murine and rat vascular endothelial cells and murine cerebral endothelial cells (Deckert-Schlüter et al., 1994, 1999; Nagineni et al., 2000; Knight et al., 2005). Knight et al. (2005) reported on upregulated ICAM-1 gene transcription 2 h p.i., but low transcript levels 24 h p.i. in infected murine retinal endothelial cells. Furthermore, el-Shazly et al. (2001) showed elevated levels of ICAM-1 and E-selectin in sera of *T. gondii*-infected humans, indicating that our results may reflect the in vivo situation.

Adhesion of PMN to endothelial monolayers and synthesis of adhesion molecules are in a close functional relationship. The prerequisite of both is a stimulus (which may be represented by different

soluble molecules, microorganisms or other factors) leading to endothelial cell activation by inducing a sequel of molecules on the surface of endothelial cells which represent ligands for the attachment and adhesion of immune cells (for review, see Ebnet and Vestweber, 1999; Wagner and Roth, 2000): E- and P-selectin are known to mediate the reversible process of tethering and rolling of PMN on activated endothelial cells, a phenomenon which was consistently observed in our assays. PMN binding to activated endothelium is mediated primarily by interaction of their  $\beta_2$ -integrins, LFA-1 and Mac-1, with endothelial derived ICAM-1, 2, 3. In contrast, VCAM-1 mainly binds to  $\beta_1$ -integrins and is particularly important for adhesion and migration of monocytes and eosinophils (for review, see Wagner and Roth, 2000) but promotes PMN adhesion as well. The early attraction of PMN observed above corresponds with a rapid extravasation and migration of PMN to *T. gondii*-infested areas in vitro (Bliss et al., 1999a,b) and should be of immunological importance in both infections. Thus, mice depleted of granulocytes or IL-6-deficient mice, which show impaired PMN response (Romani et al., 1996), were more susceptible to an acute *T. gondii* infection (Sayles and Johnson, 1996; Alexander et al., 1997; Scharton-Kersten et al., 1997), suggesting a crucial role of PMN in *T. gondii* defence. Furthermore, the importance of PMN-derived cytokines was demonstrated in toxoplasma reactions (Marshall and Denkers, 1998; Bliss et al., 1999a,b). Activated PMN seem capable of even producing IFN $\gamma$  (Ellis and Beaman, 2002) and may, therefore, even participate in directing the host immune response towards a T helper type-1 response.

In fact, interactions of infected endothelial cells with PMN in vivo is only one part of the innate immune reactions following cell invasion by coccidian parasites. We could, for example, show distinct upregulation of the transcription of a broad spectrum of chemokine genes in *T. gondii*- and *N. caninum*-infected bovine endothelial cells (Taubert et al., 2004), suggesting the involvement of immune cells other than PMN and additional mechanisms in the defence against coccidian parasites. Furthermore, PMN themselves react upon stimulation with *T. gondii* antigen by producing several chemotactic molecules, such as MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , RANTES and MCP-1 (Bliss et al., 1999a, 2001; Bennouna et al., 2003;

Denkers et al., 2003, 2004), thereby most probably attracting other immune cells and initiating innate immune reactions, as well as adaptive responses.

The degree of parasite-induced endothelial cell activation and subsequent PMN adhesion may be enhanced by paracrine cell activation of non-infected host cells neighbouring infected ones. This seems likely in *T. gondii*- and *N. caninum*-infected endothelial cell layers due to the observed adhesion of PMN to infected, as well as to non-infected BUVECs. Comparable reactions were demonstrated in Cytomegalovirus-infected human umbilical vein endothelial cells (Dengler et al., 2000), where infected cells induced activation of non-infected 'bystander' cells via IL-1 $\beta$ , a molecule that has been reported to inhibit *T. gondii* replication in human endothelial cells (Dimier and Bout, 1993) when applied in combination with TNF $\alpha$ . Apart from IL-1 $\beta$  and among a variety of other molecules, IL-8 and MCP-1 could also play a role in these processes. Both chemokines were recently found upregulated in *T. gondii*- and *N. caninum*-infected bovine endothelial cells (Taubert et al., 2004).

Comparing the effects caused by the two parasites, a stronger response was generally observed in *T. gondii* infection. In fact, *T. gondii* developed slightly faster than *N. caninum*; however, differences between the species occurred very early after infection, e.g. in the case of VCAM-1 and ICAM-1 gene transcription within 2 h p.i., indicating the relevance of parasite host cell invasion. As Naguleswaran et al. (2003) showed, *T. gondii* and *N. caninum* clearly differ in their mode of host cell invasion, which may vary the induction of proinflammatory effects. Besides this fact, differences in PMN adhesion and adhesion molecule gene transcription may reflect the virulence of a species or of a developmental stage. This hypothesis finds a correlation in *T. gondii*-induced MCP-1 production by fibroblasts, as this chemokine was exclusively upregulated by the fast-developing tachyzoites but not by bradyzoites (Brenier-Pinchart et al., 2002). Species-dependent differences in the response of host cells to coccidians can be even more distinct, as shown in comparative in vitro studies in BUVECs with *T. gondii*, *N. caninum* and the bovine coccidian, *Eimeria bovis*. Infection with the sporozoite stage of the latter parasite induced significantly less PMN adhesion and chemokine gene transcription than the other species, although the infection rate was clearly higher than in the case of

*T. gondii* and *N. caninum* (Taubert et al., unpublished results). Thus, the response of host cells to the invasion of coccidian parasites is probably not the effect of a mechanical irritation but may result from particular interactions between parasite and host cell.

Overall, the data suggest that infections of BUVECs with the protozoa *T. gondii* and *N. caninum* trigger a cascade of proinflammatory reactions, leading to endothelial cell activation and, in consequence, to enhanced PMN adhesion, mediated by upregulated adhesion molecule gene transcription. These results have implications for both pathogenesis and induction of immune responses in *T. gondii* and *N. caninum* infections.

#### Acknowledgements

We are indebted to Dr. H. Zerbe (University of Veterinary Medicine, Hannover) for kind cooperation and constant supply of bovine umbilical cords. We acknowledge Brigitte Hofmann and Christina Scheld for their technical assistance in cell culture. This project was supported by the German Research Foundation (DFG, project number TA 291/1-1).

#### References

- Alexander, J., Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Roberts, C.W., Liew, F.Y., Sher, A., 1997. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 352, 1355–1359.
- Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A., 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61, 417–431.
- Barragan, A., Brossier, F., Sibley, L.D., 2005. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol.* 7, 561–568.
- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., Denkers, E.Y., 2003. Crosstalk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 171, 6052–6058.
- Bischoff, J., Brasel, C., 1995. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 174–180.
- Bliss, S.K., Marshall, A.J., Zhang, Y., Denkers, E.Y., 1999a. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J. Immunol.* 162, 7369–7375.
- Bliss, S.K., Zhang, Y., Denkers, E.Y., 1999b. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *J. Immunol.* 163, 2081–2088.
- Bliss, S.K., Gavrilescu, L.C., Alcaraz, A., Denkers, E.Y., 2001. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect. Immun.* 69, 4898–4905.
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., Wagner, D.D., 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel–Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73, 1109–1112.
- Brenier-Pinchart, M., Vigan, I., Jouvin-Marche, E., Marche, P., Pelet, E., Gross, U., Ambrose-Thomas, P., Pelloux, H., 2002. Monocyte chemotactic protein-1 secretion and expression after *Toxoplasma gondii* infection in vitro depend on the stage of the parasite. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 45.
- Brunton, C.L., Wallace, G.R., Graham, E., Stanford, M.R., 2000. The effect of cytokines on the replication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 102, 182–188.
- Carlos, T.M., Harlan, J.M., 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068–2101.
- Conlan, J.W., North, R.J., 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174, 741–744.
- Daubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K.S., Schroten, H., 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 69, 6527–6531.
- Deckert-Schlüter, M., Schlüter, D., Hof, H., Wiestler, O.D., Lassmann, H., 1994. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 457–468.
- Deckert-Schlüter, M., Buck, C., Schlüter, D., 1999. Kinetics and differential expression of heat-stable antigen and GL7 in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 98, 97–106.
- Dengler, T.J., Raftery, M.J., Werle, M., Zimmermann, R., Schonrich, G., 2000. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1beta. *Transplantation* 69, 1160–1168.
- Denkers, E.Y., Kim, L., Butcher, B.A., 2003. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Microbiol.* 5, 75–83.
- Denkers, E.Y., Butcher, B.A., Del Rio, L., Bennouna, S., 2004. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int. J. Parasitol.* 34, 411–421.
- Dimier, I.H., Bout, D.T., 1993. Co-operation of interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *Immunology* 79, 336–338.
- Dubey, J.P., Welcome, F.L., 1988. *Toxoplasma gondii*-induced abortion in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 697–700.

- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259–1263.
- Ebnet, K., Vestweber, D., 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell Biol.* 112, 1–23.
- el-Shazly, A.M., Soliman, M., el-Kalla, M.R., Rezk, H., el-Nemr, H., Handoussa, A.E., el-Aaty, H.E., Morsy, T.A., 2001. Evaluation of soluble adhesion molecules in the diagnosis of amoebiasis, giardiasis and toxoplasmosis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31, 691–700.
- Ellis, T.N., Beaman, B.L., 2002. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon-gamma in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J. Leukoc. Biol.* 72, 373–381.
- Fuhrmann, O., Arvand, M., Gohler, A., Schmid, M., Krull, M., Hippenstiel, S., Seybold, J., Dehio, C., Suttrop, N., 2001. *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect. Immun.* 69, 5088–5097.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., Sher, A., 1993. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infect. Agents Dis.* 2, 139–149.
- Gazzinelli, R.T., Brezin, A., Li, Q., Nussenblatt, R.B., Chan, C.C., 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp. Parasitol.* 78, 217–229.
- Gazzinelli, R.T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J.M., Sher, A., 1996. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 219, 127–139.
- Gazzinelli, R.T., Talvani, A., Camargo, M.M., Santiago, H.C., Oliveira, M.A., Vieira, L.Q., Martins, G.A., Aliberti, J.C., Silva, J.S., 1998. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 89–104.
- Hauser Jr., W.E., Tsai, V., 1986. Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. *J. Immunol.* 136, 313–319.
- Hemphill, A., Gottstein, B., Kaufmann, H., 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112, 183–197.
- Hisaeda, H., Nagasawa, H., Maeda, K., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Ito, Y., Good, R.A., Himeno, K., 1995. Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 155, 244–251.
- Hisaeda, H., Sakai, T., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Yasutomo, K., Himeno, K., 1996a. Mechanisms of HSP65 expression induced by gamma delta T cells in murine *Toxoplasma gondii* infection. *Pathobiology* 64, 198–203.
- Hisaeda, H., Sakai, T., Nagasawa, H., Ishikawa, H., Yasutomo, K., Maekawa, Y., Himeno, K., 1996b. Contribution of extrathymic gamma delta T cells to the expression of heat-shock protein and to protective immunity in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 88, 551–557.
- Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Good, R.A., Himeno, K., 1997. Heat shock protein 65 induced by gammadelta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 159, 2375–2381.
- Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macalodowie, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., 2005. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 29–36.
- Jaffe, E.A., Nachmann, R.L., Becker, C.G., Mimnick, C.R., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52, 2745.
- Knight, B.C., Brunton, C.L., Modi, N.C., Wallace, G.R., Stanford, M.R., 2005. The effect of *Toxoplasma gondii* infection on expression of chemokines by rat retinal vascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 160, 41–47.
- Krüll, M., Dold, C., Hippenstiel, S., Rosseau, S., Lohmeyer, J., Suttrop, N., 1996. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus* alpha-toxin potentially induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 157, 4133–4140.
- Krüll, M., Nost, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., Suttrop, N., 1997. *Listeria monocytogenes* potentially induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 159, 1970–1976.
- Lawrence, M.B., Springer, T.A., 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65, 859–873.
- MacLaren, A., De Souza, W., 2002. Further studies on the interaction of *Toxoplasma gondii* with neutrophils and eosinophils. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34, 99–104.
- MacLaren, A., Attias, M., de Souza, W., 2004. Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Vet. Parasitol.* 125, 301–312.
- Marshall, A.J., Denkers, E.Y., 1998. *Toxoplasma gondii* triggers granulocyte-dependent cytokine-mediated lethal shock in D-galactosamine-sensitized mice. *Infect. Immun.* 66, 1325–1333.
- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F., 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel–Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84, 92–99.
- Moore, D.P., Leunda, M.R., Zamorano, P.I., Odeon, A.C., Romera, S.A., Cano, A., de Yaniz, G., Venturini, M.C., Campero, C.M., 2005. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.* 130, 29–39.
- Nagineni, C.N., Detrick, B., Hooks, J.J., 2000. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 407–410.
- Naguleswaran, A., Muller, N., Hemphill, A., 2003. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay

- reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Exp. Parasitol.* 104, 149–158.
- Rettigner, C., Lasri, S., De Meerschman, F., Focant, C., Beckers, J.F., Losson, B., 2004. Immune response and antigen recognition in non-pregnant ewes experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet. Parasitol.* 122, 261–271.
- Robben, P.M., LaRegina, M., Kuziel, W.A., Sibley, L.D., 2005. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J. Exp. Med.* 201, 1761–1769.
- Rogers, H.W., Unanue, E.R., 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* 61, 5090–5096.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., Poli, V., 1996. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J. Exp. Med.* 183, 1345–1355.
- Sabin, A., 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116, 801–814.
- Sayles, P.C., Johnson, L.L., 1996. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil-depleted mice. *Nat. Immun.* 15, 249–258.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., Sher, A., 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 185, 1261–1273.
- Subauste, C.S., Dawson, L., Remington, J.S., 1992. Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 176, 1511–1519.
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2004. Chemokines, GM-CSF, COX-2 and iNOS gene transcription in coccidia (*Eimeria bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) infected bovine endothelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 75.
- Wagner, J.G., Roth, R.A., 2000. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* 52, 349–374.
- Weller, A., Isenmann, S., Vestweber, D., 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P- selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 267, 15176–15183.
- Wilson, C.B., Remington, J.S., 1979. Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 140, 890–895.



**5.5 “Cytoskeletal changes in *Eimeria bovis*-infected host endothelial cells during first merogony.”**

Hermosilla, C. \*, Schröpfer, E., Stowasser, M., Eckstein-Ludwig, U., Behrendt, J. H., and Zahner, H.

*Vet. Res. Commun.* (2008) **32**: 521-531

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche unterstützend
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig

Vet Res Commun (2008) 32:521–531  
DOI 10.1007/s11259-008-9054-x

ORIGINAL ARTICLE

## Cytoskeletal changes in *Eimeria bovis*-infected host endothelial cells during first merogony

Carlos Hermosilla · Elmar Schröpfer ·  
Michael Stowasser · Ursula Eckstein-Ludwig ·  
Jan Hillern Behrendt · Horst Zahner

Accepted: 2 April 2008 / Published online: 31 July 2008  
© Springer Science + Business Media B.V. 2008

**Abstract** The first merogony of *Eimeria bovis* takes place in lymphatic endothelial cells of the ileum, resulting in the formation of macromeronts up to 250 µm. In this study, we investigated the host cell cytoskeleton (actin filaments, microtubules, spectrin, vimentin intermediate filaments) associated with parasitic development *in vitro* by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using primary bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) and bovine spleen lymphatic endothelial cells (BSLEC) as host cells. No prominent changes in the host cell cytoskeleton were detected 1–3 days after *E. bovis* sporozoite invasion. With ongoing meront maturation a significant increase in microtubules and actin filaments close to the parasitophorous vacuole (PV) was found. Mature macromeronts within the PV were completely enclosed by these cytoskeletal elements. Our findings suggest, that in order to guarantee the survival of the host cell on the enlargement of macromeronts, *E. bovis* needs not only to augment but also to rearrange its cytoskeletal system.

**Keywords** *Eimeria bovis* · Cytoskeleton · Actin · Tubulin · Spectrin · Vimentin

### Abbreviations

BSA bovine serum albumin  
BSLEC bovine spleen lymphatic endothelial cells  
BUVEC bovine umbilical vein endothelial cells  
CLSM confocal laser scanning microscopy

C. Hermosilla · M. Stowasser · J. H. Behrendt · H. Zahner  
Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen,  
Rudolf-Buchhheim-Str. 2, 35392 Giessen, Germany

E. Schröpfer · U. Eckstein-Ludwig  
Institute of Animal Physiology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

### Present address:

C. Hermosilla (✉)  
Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College,  
Herts AL9 7TA, UK  
e-mail: chemosilla@rvc.ac.uk

DMSO	dimethylsulphoxide
ECGM	endothelial cell growth medium
FCS	foetal calf serum
PBS	phosphate-buffered saline
p. i.	post-infection
PV	parasitophorous vacuole
RT	room temperature

## Introduction

*Eimeria bovis* is an intracellular apicomplexan parasite of cattle, causing severe haemorrhagic diarrhoea, especially, in calves and high economic losses worldwide (Faber et al. 2002; Dauschies and Najdrowski 2005). During its life cycle, *E. bovis* sporozoites invade endothelial cells of central lymph capillaries of the villi from the ileum, where they develop within a period of 14–18 days to large first generation macromeronts of up to 250  $\mu\text{m}$  (Hammond et al. 1964). Correspondingly, *E. bovis* macromeronts develop *in vitro* in primary and secondary bovine cell lines (Hammond and Fayer 1968; Speer et al. 1985; Reduker and Speer 1986; Hermosilla et al. 2002).

To survive infection cells have generally to be correctly shaped, physically robust and properly structured internally, attributes which depend on the cytoskeletal filament system. Thus, enlargements as suffered by *E. bovis* infected cells should be associated with changes in the cytoskeleton. Three types of cytoskeleton filament are common in cells: intermediate filaments, microtubules and actin filaments. Intermediate filaments, e. g. vimentin in mesenchymal cells, provide mechanical strength to the cell with many subcellular organelles and macromolecules attached to this network (Steinert and Roop 1988; Halonen and Weidner 1994). Microtubules determine the position of membrane-enclosed organelles, direct intracellular transport and participate in various cell signalling pathways (Downing and Nogales 1998a, b; Kreis 1990; Morrisette et al. 2004). Actin filaments determine the shape of the cell's surface, their stability and are involved in cell locomotion (Janmey 1991). In addition, there are accessory proteins such as ankyrin, band 4.1 and spectrin that link cytoskeletal filaments to other cell components, e. g. the cell plasma membrane (Bennett 1985).

Available data on the effects of apicomplexan parasites on host cell cytoskeletal elements are rare and derive from other species, e. g. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum*. In the case of *T. gondii*, infected Vero cells showed a strong rearrangement of host cell vimentin intermediate filaments around the parasitophorous vacuole (PV) (Halonen and Weidner 1994). Most recently, it was demonstrated that *T. gondii* exploits host cell microtubules to mediate a delivery system supplying the parasite with endolysosomal products (Coppens et al. 2006). *C. parvum* sporozoite invasion leads to focal rearrangement and accumulation of host cell actin filaments at the site of infection and initiation of *C. parvum* PV formation (Forney et al. 1999; Feng et al. 2006). Moreover, multiple genes encoding binding proteins responsible for actin and microtubular assembly were upregulated by *C. parvum* in infected human epithelial cells (Deng et al. 2004). The aim of the present study was to investigate the effects of *E. bovis* on the host cell cytoskeleton during the specific situation of macromeront formation, using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The study was performed *in vitro* using two primary endothelial cell lines, bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) and bovine spleen lymphatic endothelial cells (BSLEC), to be as close to the *in vivo* situation as possible.

## Material and methods

### Parasites

The *E. bovis* strain H used in the present study was maintained by passages in Holstein-Frisian calves for oocyst production (Fiege et al. 1992). Sporozoites were excysted from sporulated oocysts as previously described (Hermosilla et al. 2002). Free sporozoites were collected and suspended in endothelial cell growth medium (ECGM; PromoCell, Heidelberg, Germany) containing 10% dimethylsulphoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany) and cryopreserved in liquid nitrogen for up to 5 months.

### Host cells

BUVEC and BSLEC were used as host cells. BUVEC were isolated as previously described (Hermosilla et al. 2006) and BSLEC were kindly donated by K. Preissner (Justus Liebig University Giessen, Germany). Both cell lines were cultured in modified ECGM [composed of 0.4% (v/v) endothelial growth supplement/heparin, 0.1 ng epidermal growth factor/ml, 1 ng basic fibroblast growth factor/ml, 1 µg hydrocortisone/ml (PromoCell) and 50 µg gentamicin/amphotericin B/ml (Sigma-Aldrich), whilst supplemented 2% (v/v) foetal calf serum (FCS; Gibco, Karlsruhe, Germany)]. Cells were seeded into 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Gibco) and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were recovered from culture flasks by trypsinisation and seeded onto glass coverslips (15 mm Ø; Gibco) and cultured in 4-well culture plates (Gibco) for CLSM studies.

### Host cell infection

Frozen sporozoites of *E. bovis* were thawed at 37°C, centrifuged (400 g, 10 min), counted in a haemocytometer and resuspended in modified ECGM. Confluent BUVEC and BSLEC monolayers grown on glass coverslips were infected with 4 × 10<sup>4</sup> sporozoites per glass coverslip. The culture medium was changed 24 h after infection and, thereafter, every third day.

### Cytoskeleton- and DNA-staining for CLSM

Infected BUVEC and BSLEC and uninfected control monolayers grown on glass coverslips were washed in phosphate-buffered saline (PBS). For tubulin demonstration, cells were fixed for 10 min in ice-cold methanol (Merck, Darmstadt, Germany), washed twice with PBS and incubated 20 min at room temperature (RT) with 3% (w/v) milk powder in PBS, to block non-specific binding sites. For all other treatments washed cells were fixed 15 min in 3% (w/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in PBS, washed and permeabilised (10 min, RT) by 0.1% (v/v) Triton X (Sigma-Aldrich) in PBS. Blocking (10 min) was performed with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich).

Actin was demonstrated with Alexa 488-conjugated phalloidin [5 µg/ml in 1% (w/v) BSA in PBS; Invitrogen, Karlsruhe, Germany]. Other cytoskeletal components were visualised by specific monoclonal antibodies and Alexa 488-labelled conjugates (Invitrogen). Monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich) to α-tubulin (clone DM 14) and acetylated tubulin (clone 6–11B-1) were diluted 1:80 and 1:500 in 3% (w/v) milk powder in PBS, respectively. Monoclonals to vimentin (clone Vim 3B4, DakoCytomation, Hamburg, Germany) and to α- and β-spectrin (clone SB-SP2, Sigma-Aldrich) were employed at 1:200 dilutions in 1% (w/v) BSA in PBS. After washing in blocking puffer [3% (w/v) milk

**Fig. 1** Visualisation of actin filaments (stained with Alexa 488-conjugated phalloidin; CLSM) in BSLEC after *Eimeria bovis* infection: (A) actin filaments around the PV of an immature *E. bovis* meront at 8 days p. i. (yellow arrow; no parasite DNA was stained at this time point of infection); (B-D) overlay pictures of a host cell containing an *Eimeria bovis* meront (15 days p. i.) and actin filaments from the basal (B) to the apical side (D) of the cell; (B) visualisation of actin accumulation around the PV (yellow arrow, parasite DNA stained by Hoechst 33342); (E, F) overlay pictures of single infected host cells containing *Eimeria bovis* macromeronts [15 (E) and 20 days p. i.(F)] filled with merozoite DNA (yellow arrows) encapsulated by prominent actin filaments

powder or 1% (w/v) BSA in PBS; see above] cells were incubated with the specific primary antibodies (1 h) or phalloidin (45 min) at RT in the dark. Cells were then washed and those which had been incubated with antibodies were reacted 1 h at RT with Alexa 488-conjugated goat IgG anti-mouse IgG antibodies (1:200 in milk powder or BSA solutions; see above). In order to clearly differentiate host cells and intracellular parasites, reacted cell layers were washed again and incubated 10 min at RT with H 33342 (2 µg/ml PBS; Invitrogen), a membrane-permeable nuclear DNA stain. Controls omitted incubation with primary antibodies and phalloidin, respectively. After two final washings in PBS, the coverslips were mounted with Mounting medium II (Sigma-Aldrich), dried overnight and investigated using a confocal laser scanning microscope (MRC 1024; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) equipped with an argon laser. The laser excitations were 488 nm for the green and 532 nm for the red fluorescence.

#### Data analysis

The fluorescence data were collected using the Laser sharp® 3.1 software (Bio-Rad Laboratories). Optical slices of confocal measurements were combined to an overlay picture and within these pictures, one *E. bovis*-infected and three uninfected cells were marked as areas for fluorescence intensity measurements. Arithmetic means of fluorescence intensities of 15 such events were determined and processed for ANOVA. A *P*-value of < 0.05 was considered significant.

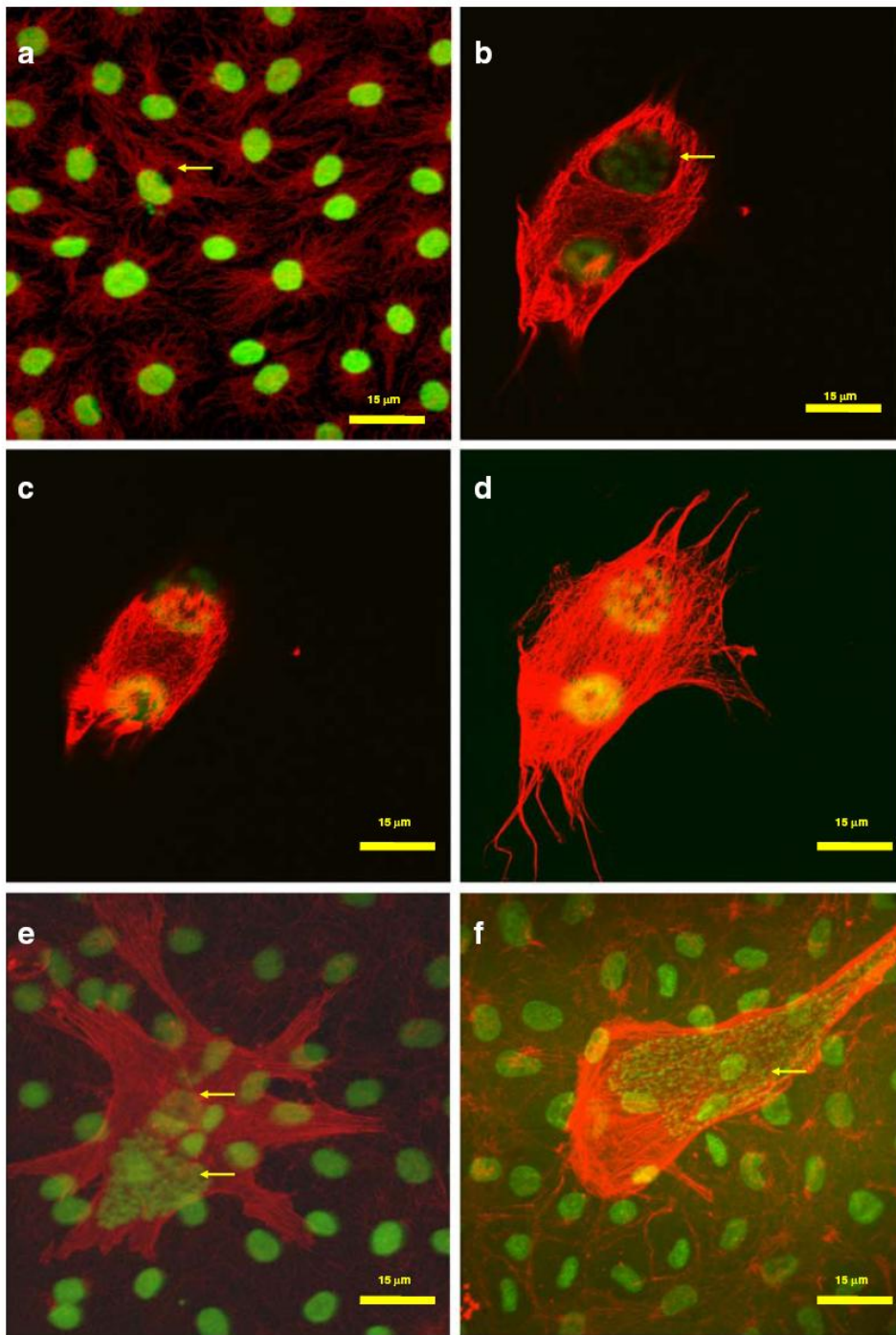
## Results

### Host cell infection and parasitic development

Bovine endothelial cells of both types were invaded by *E. bovis* sporozoites within 1 h. Invading sporozoites, in general, changed their shape within 96 h, i. e., became shorter than free sporozoites and rounded up until day 5 p. i. Developing meronts found 15 days p. i. were of similar size (approximately 60×50 µm) in both cell types. Later on, the growth of meronts was more enhanced in BUVEC when compared with BSLEC resulting in 20 days p. i. with macromeronts of 110×70 µm and 65×55 µm on average, respectively. Mature *E. bovis* macromeronts, releasing merozoites, were detected 20 days p. i. in the case of both cell types.

### Actin filaments

Uninfected cells showed a typical arrangement of actin filaments, i. e. in two types of arrays as contractile bundles and as weblike networks. Alexa 488-phalloidin staining at 72 h p. i. revealed no major changes in the distribution of actin filaments in infected cells. Sporozoites were found close to the host cell nucleus as detected by H 33342 DNA staining. The surrounding of the small PV, if at all, bound little phalloidin. After eight days p. i., the H 33342 failed to visualise parasite DNA (host cell DNA was still clearly stained) making it difficult to localise the parasites unambiguously. The PV appeared as an unstained



**Fig. 2** Visualisation of microtubules in BSLEC (A-E) and spectrin in BUVEC (F,G) after *Eimeria bovis* infection (both cytoskeletal elements stained by Alexa 488-conjugated anti mouse IgG antibodies; CLSM): (A) microtubules in a doubly-infected BSLEC by *Eimeria bovis* sporozoites at 72 hours p. i. (yellow arrow; parasite DNA stained by H 33342); (B) cross-section of a BSLEC containing a two-chambered *Eimeria bovis* macromeront PV (15 days p. i.) surrounded by microtubules (yellow arrow, parasite DNA stained by H 33342); (C,D) vertical section of an *Eimeria bovis* macromeront in BSLEC (20 days p. i.) encapsulated by microtubules (yellow line indicates the region of vertical section; yellow arrow indicates the two distinct microtubule layers separated by a narrow rim of host cell cytoplasm); (E) overlay picture of a macromeront (20 days p. i.) reinforced by microtubules at the periphery (yellow arrows); (F) visualisation of spectrin in an infected BUVEC containing a multichambered *Eimeria bovis* macromeront (15 days p. i.); (G) rupture of an *Eimeria bovis* macromeront (20 days p. i.) in BUVEC releasing spectrin-stained first generation merozoites (yellow arrows)

intracellular area, now weakly marked by a surrounding pattern of fluorescence (Fig. 1A). The subsequent swelling of meronts was associated with a remarkable accumulation of actin filaments around the PV (see Fig. 1B-D). The PV of immature macromeronts were found densely enclosed by phalloidin-reactive material 15 days p. i. and, in addition, the actin stacking of the host cell was subject to complete reorganisation (Fig. 1B). At 20 days p. i., *E. bovis* mature macromeronts containing merozoite DNA were completely surrounded by prominent actin filaments, even on the apical side of the host cell, when compared to uninfected cells (see Fig. E,F). Total amount of actin, determined by measuring fluorescence intensity, was significantly ( $P<0.05$ ) enhanced in infected cells when compared with uninfected controls at 15 and 20 days p. i., respectively (Table 1).

#### Microtubular system

The microtubules in uninfected cells showed a loose radial arrangement. Seventy-two hours after sporozoite invasion, accumulated microtubules were observed close to the sporozoite PV (Fig. 2A). The PV became clearly visible, additional to the green parasite DNA staining, as a dark area close to the host cell nucleus (Fig. 2A, arrow). Later on (8 days p. i.), all *E. bovis*-infected BSLEC and BUVEC exhibited a weak reorganisation of microtubules around the PV of immature meronts. In maturing macromeronts 15 days p. i., a marked accumulation of microtubules surrounded the PV and dense filaments crossed the host cell cytoplasm (Fig. 2B). The same was true for acetylated microtubules, the stabilised polymerisation form of microtubules, which were closely associated with the PV at this phase of development. A sagittal section of an infected host cell, in Fig. 2C,D, shows the two distinct microtubule layers separated by a small rim of host cell cytoplasm. At the late stage of maturation (20 days p. i.), host cell microtubules formed a thick and compact cage-

**Table 1** Fluorescence intensity (arithmetic mean  $\pm$  standard deviation) of *Eimeria bovis* infected and uninfected control BSLEC after immunostaining for actin,  $\alpha$ -tubulin and acetylated tubulin (CLSM;  $n=15$ )

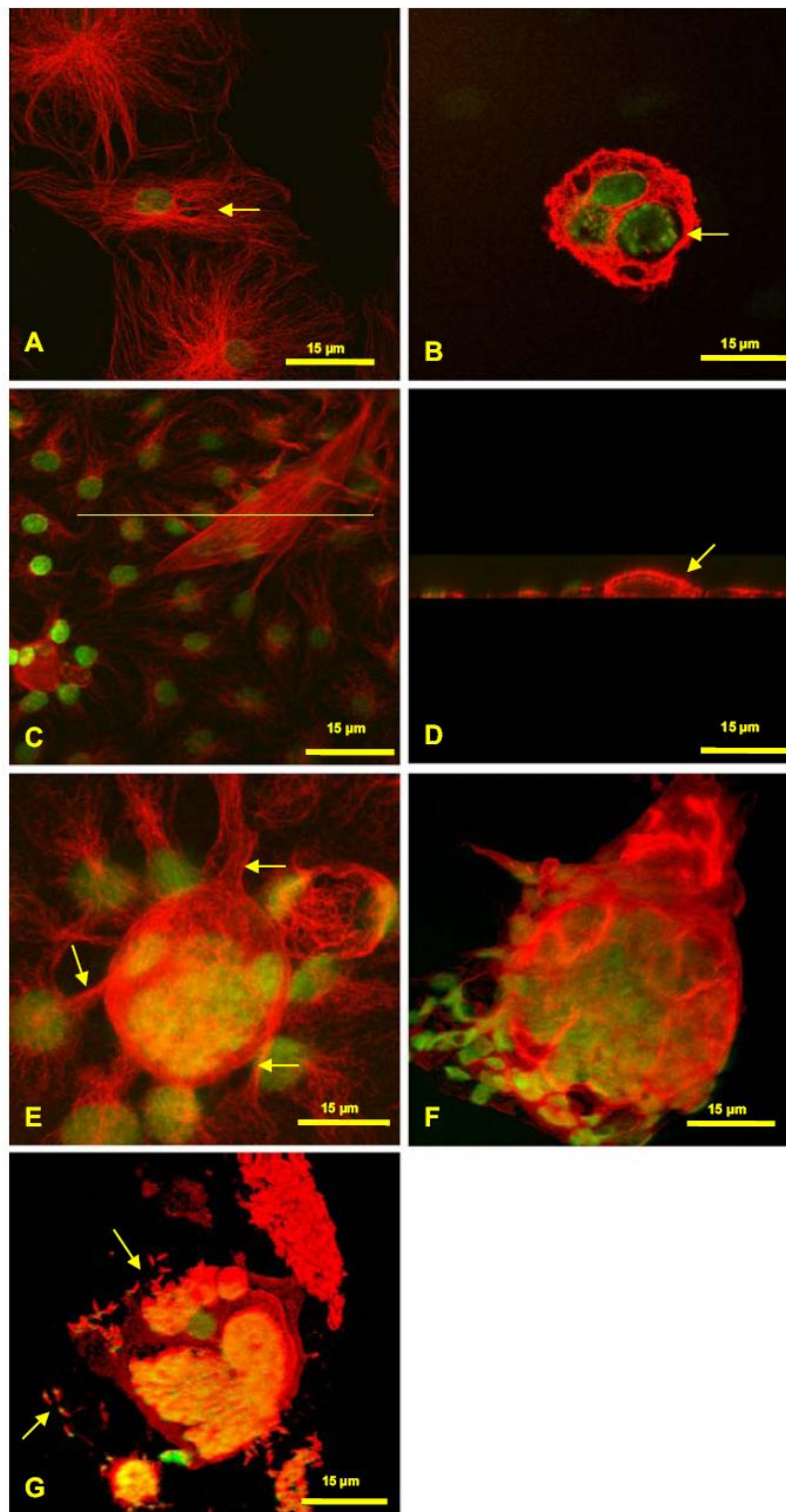
days p. i.	actin <sup>1</sup> inf.	contr.	$\alpha$ -tubulin <sup>2</sup> inf.	contr.	acetylated <sup>3</sup> tubulin inf.	contr.
3	76 $\pm$ 1.4	82 $\pm$ 1.5	85 $\pm$ 1.3	85.5 $\pm$ 1.3	50 $\pm$ 1.2	51 $\pm$ 1.4
8	61 $\pm$ 1.6	59 $\pm$ 1.3	42 $\pm$ 1.2	41 $\pm$ 1.2	40 $\pm$ 1.4	40 $\pm$ 1.1
15	55 $\pm$ 1.9*	15 $\pm$ 1.7	100 $\pm$ 1.2*	45.5 $\pm$ 1.3	58 $\pm$ 1.4*	21 $\pm$ 1.5
20	71 $\pm$ 1.5*	16 $\pm$ 1.7	102 $\pm$ 1.2*	44 $\pm$ 1.4	79 $\pm$ 1.3*	20 $\pm$ 1.1

<sup>1</sup> stained by Alexa 488-labelled phalloidin

<sup>2</sup> stained by monoclonal antibodies directed against  $\alpha$ -tubulin and Alexa 488-labelled conjugates

<sup>3</sup> stained by monoclonal antibodies directed against acetylated tubulin and Alexa 488-labelled conjugates

\*  $P<0.05$  when comparing infected and control cells





like formation surrounding *E. bovis* macromeronts (Fig. E). In addition, microtubule layers in the host cell periphery were markedly reinforced (Fig. E, arrows). As for actin filaments, total amount of microtubules, for both  $\alpha$ -tubulin and acetylated tubulin, was significantly ( $P < 0.05$ ) increased in infected cells when compared with uninfected controls at 15 and 20 days p. i. (Table 1).

#### Spectrin and vimentin intermediate filaments

Both host cell spectrin and parasite spectrin could be demonstrated by CLSM; labelling of intracellular sporozoites by anti-spectrin monoclonal antibodies became evident as a homogeneous red staining of the parasites. Reorganisation and association of host cell spectrin with the PV commenced with the onset of parasite replication (8 days p. i.) close to the host cell nucleus. With ongoing parasite multiplication (15 days p. i.) spectrin seemed to accumulate around the PV, particularly, in septa-forming chambers of the macromeronts (Fig. 2F). Free first generation merozoites released 20 days p. i. were also stained for spectrin (Fig. 2G, arrows).

In contrast to the cytoskeletal elements described above, vimentin intermediate filaments in infected host cells did not appear markedly changed. Independent of the host cell type and the parasite developmental stage, the staining pattern for vimentin was in general diffuse and hardly any vimentin accumulation could be detected at the host-parasite interface. The *E. bovis*-infected cells stained for vimentin in total showed a weak increase in fluorescence intensity, which was not significant when compared to uninfected controls.

#### Discussion

Apicomplexan parasites establish a nonfusogenic PV, which is extensively modified by secreted parasite proteins (Lingelbach and Joiner 1998). It, also, seems probable that host cell integral membrane proteins are also present in the PV membrane (Sibley 2003), mediating the binding of cytoskeletal elements, e. g. actin filaments and microtubules, to the PV membrane.

Although the actin and microtubular covering began within 3 days p. i., the strongest increase in these cytoskeletal components was clearly evident at the end of meront maturation (15–20 days p. i.), where the whole macromeront was surrounded by a thick and compact layer of these structures. As the *E. bovis* macromeront enlarges extremely within its host cell, it would seem logical to assume that actin filaments, which are known for their structural stability and tensile strength (Janmey 1991), may function to stabilise the growing macromeront within the host cell. Even in much smaller meronts, such as of *C. parvum*, actin accumulation as a thick plaque of filaments around the PV has been observed previously (Elliot and Clark 2000; Elliot et al. 2001).

It is known, that the distribution of diverse organelles within the cytosol is dominantly governed by the microtubular network (Kelly 1990; Morrissette et al. 2004), and microtubule remodelling might be a mechanism to bring mitochondria, endoplasmic reticulum or other organelles more closely to the *E. bovis* PV during parasitic replication. For instance, *T. gondii* actively recruits host cell microtubules, resulting in a selective attraction of host endolysosomes to the PV (Coppens et al. 2006). The authors provided evidence that microtubule-based invaginations of the PV membrane serve as conduits for the delivery of such host organelles within the *T. gondii* PV. Host cell microtubules associated with PV and the wrapping of mature *E. bovis* macromeronts by these components were strongly enhanced during the maximal parasitic replication, namely, at

the end of merogony (15–20 days p. i.). Consistent findings were found during *T. gondii* replication, where microtubules also changed their distribution and concentrated predominantly around the PV (Melo et al. 2001), but in contrast to *E. bovis*, rearrangement occurred very early after parasite invasion (24 hours p. i.). Interestingly, at the end of *E. bovis* merogony post-translationally modified subunits of tubulin, such as acetylated  $\alpha$ -tubulin, were also detected in both cell types. Post-translationally modified  $\alpha$ -tubulin is involved in the binding of microtubule-associated proteins (Kreitzer et al. 1999; Bonnet et al. 2001) and the stabilisation of microtubules might be important to gain access to host cell nutrients. Another potential role for the remodelling of microtubules by *E. bovis* might be to escape intracellular defence mechanisms. It was suggested that microtubules accumulated around *T. gondii* PV form a barrier for phagolysosomal fusion (Andrade et al. 2001).

With ongoing meront maturation (15 days p. i.), spectrin concentrations were mainly demonstrated in the septa of the inner meronts but also at the outer parts of infected host cells. One of the problems faced by *E. bovis* is how to create sufficient space for replication. For this process to occur inside the host cell, a considerable expansion of the plasma membrane is required and spectrin accumulation in membranes might be one strategy to overcome this problem. Not only host cell spectrin but also spectrin of *E. bovis* sporozoites and released merozoites were stained by the monoclonal antibodies. To our reported knowledge, the presence of spectrin in *E. bovis* is missing from the literature, but spectrin-like proteins have been already described in the anterior part of *T. gondii* (Ghazali et al. 1995).

Although vimentin intermediate filaments are known to be a dominant part of the filamentous network from endothelial cells, no changes in vimentin were detected within *E. bovis*-infected host cells. In contrast to our negative vimentin findings, accumulation of host cell-vimentin intermediate filaments around the *T. gondii* PV has been described *in vitro* (Halonen and Weidner 1994; Halonen et al. 1998). At the late stage of *T. gondii* replication, the impact of vimentin accumulation was largely confined to an area surrounding the PV (Halonen et al. 1998). Vimentin intermediate filaments are held together by accessory proteins, such as plectin, and mutations in this gene are known to occur not only in humans (Bart and Lussky 2005) but also in cattle (Matthews and Allen 2005), which might be one plausible explanation for our negative vimentin results. Unfortunately, the primary bovine host cell cultures used in the current study were not tested for such gene mutations.

Regarding parasite DNA labelling by H 33342, the staining was limited to sporozoites and to completely mature macromeronts containing fully developed merozoites. The lack of labelled DNA in maturing stages of *E. bovis* (e. g. 8 days p. i.) might be explained by the mode of DNA-H 33342 binding, which seems to be impaired during stages of rapid DNA replication.

For *E. bovis*, nothing is currently known as to the molecular mechanisms by which this intracellular parasite might modulate the host cell-cytoskeleton. Nevertheless, some interesting data are available from other apicomplexan parasites. Multiple genes encoding for binding proteins responsible for actin and microtubular assembly in the host cell cytoplasm were upregulated by *C. parvum* in infected human epithelial cells (Deng et al. 2004). Furthermore, sporozoites of *C. parvum* induced phosphatidyl and protein kinase activities in infected host cells resulting in the rearrangement of actin filaments at the site of the PV (Forney et al. 1999). In contrast to this pathway, tachyzoites of *T. gondii* did not utilise phosphorylation to modulate actin filaments during intracellular development (Morisaki et al. 1995), suggesting not only dissimilarities between the two species but also indicating stage-specific differences as well.

We have presented data showing a significant increase of actin filaments and microtubules in response to *E. bovis* first merogony *in vitro*. Thus, the remodelling of

these cytoskeletal elements might be an important event for *E. bovis* in order to (i) overcome the enlargement of the macromeronts and (ii) to accumulate host cell-organelles around the PV in order to gain access to host cell-nutrients.

**Acknowledgements** We acknowledge the kind supply of BSLEC by K. Preissner (Justus Liebig University Giessen) and of bovine umbilical cords by H. Bollwein and A. Koch (University of Veterinary Medicine Hannover). We are indebted to B. Hofmann, C. Scheld and M. Buss for their excellent technical assistance in cell culture. Further, we are grateful to K. Failing (Justus Liebig University Giessen) for support in statistical analyses of the data.

## References

- Andrade, E.F., Stumbo, A.C., Monteiro-Leal, L.H., Carvalho, L. and Barbosa, H.S., 2001. Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion?, *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 33(3), 337–341
- Bart, B.J. and Lussky, R.C., 2005. Bart syndrome with associated anomalies, *American Journal of Perinatology*, 22(2), 365–369
- Bennett, V., 1985. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implication for more complex cells, *Annual Review of Biochemistry*, 54, 273–304
- Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P. and Larcher, J.C., 2001. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 12839–12848
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C. and Joiner, K.A., 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space, *Cell*, 125, 261–274.
- Dauguschies, A. and Najdrowski, M., 2005. Eimeriosis in cattle: current understanding, *Journal of Veterinary Medicine*, 52, 417–427
- Deng, M., Lancto, C.A. and Abrahamsen, M.S., 2004. *Cryptosporidium parvum* regulation of human epithelial cell expression, *International Journal of Parasitology*, 34, 73–82
- Downing, K.H. and Nogales, E., 1998a. Tubulin and microtubule structure, *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 16–22
- Downing, K.H. and Nogales, E., 1998b. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions, *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 785–791
- Elliot, D.A. and Clark, D.P., 2000. *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface, *Infection and Immunity*, 68, 2315–2322
- Elliot, D.A., Coleman, D.J., Lane, M.A., May, R.C., Machesky, L.M. and Clark, D.P., 2001. *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization, *Infection and Immunity*, 69, 5940–5942
- Faber, J.E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Bürger, H.J. and Zahner, H., 2002. *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies, *Veterinary Parasitology*, 104(1), 1–17
- Feng, H., Nie, W., Bonilla, R., Widmer, G., Sheoran, A. and Tzipori, S., 2006. Quantitative tracking of *Cryptosporidium* infection in cell culture, *Journal of Parasitology*, 92, 1350–1354
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H. and Bürger, H.J., 1992. *Eimeria bovis* in cattle: colostrum transfer of antibodies and immune response to experimental infections, *Parasitology Research*, 78, 32–38
- Forney, J.R., DeWall, D.B., Yang, S., Speer, C.A. and Healy, M.C., 1999. A role for host phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal remodelling during *Cryptosporidium parvum* infection, *Infection and Immunity*, 67, 844–852
- Ghazali, M., Rodier, M.H., el Moudni, B.E., Babin, P., Fernandez, B. and Jacquemin, J.L., 1995. Detection and immunolocalization of human erythrocyte spectrin immunoanalogues in *Toxoplasma gondii* (Protozoan, Parasite), *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42, 427–433
- Halonen, S.K. and Weidner, E., 1994. Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41, 65–71

- Halonen, S.K., Weiss, L.M. and Chiu, F.C., 1998. Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes in vitro, *International Journal of Parasitology*, 28, 815–823
- Hammond, D.M., Davis, L.R. and Bowmann, L., 1964. Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves, *American Journal of Veterinary Research*, 5, 303–311
- Hammond, D.M. and Fayer, R., 1968. Cultivation of *Eimeria bovis* in three established cell lines and bovine tracheal cell line culture, *Journal of Parasitology*, 54, 559–568
- Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S. and Zahner, H., 2002. Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells, *Parasitology Research*, 88, 301–307
- Hermosilla, C., Zahner, H. and Taubert, A., 2006. *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells, *International Journal of Parasitology*, 36, 423–431
- Janmey, P.A., 1991. Mechanical properties of cytoskeletal polymers, *Current Opinion in Cell Biology*, 3, 4–11
- Kelly, R., 1990. Microtubules, membrane traffic and cell organization, *Cell*, 61, 5–7
- Kreis, T.E., 1990. Role of microtubules in the organization of the Golgi apparatus, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 15, 67–70
- Kreitzer, G., Liao, G. and Gundersen, G.G., 1999. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism, *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1105–1118
- Lingelbach, K. and Joiner, K.A., 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells, *Journal of Cell Science*, 111, 1447–1475
- Matthews, G. and Allen, M., 2005. Epidermolysis bullosa in cattle in the UK, *Veterinary Record*, 157, 456
- Melo, E.J., Carvalho, T.M. and De Souza, W., 2001. Behavior of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*, *Biocell*, 25(1), 53–59
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E. and Sibley, L.D., 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell, *Journal of Cell Science*, 108, 2457–2464
- Morrisette, N.S., Mitra, A., Sept, D. and Sibley, L.D., 2004. Dinitroanilines bind  $\alpha$ -tubulin to disrupt microtubules, *Molecular Biology of the Cell*, 15, 1960–1968
- Reduker, D.W. and Speer, C.A., 1986. Antigens of in-vitro produced first generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa), *Journal of Parasitology*, 72, 782–785
- Sibley, L.D., 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style, *Traffic*, 4(9), 581–586
- Speer, C.A., Reduker, D.W., Burgess, D.E., Whitmire, W.M. and Splitter, G.A., 1985. Lymphokine-induced inhibition of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultured bovine monocytes, *Infection and Immunity*, 50, 566–571
- Steinert, P.M. and Roop, D.R., 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments, *Annual Review of Biochemistry*, 57, 593–625

**5.6 “Studies on synchronous release of coccidian parasites (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187.”**

Behrendt, J. H\*., Taubert, A., Zahner, H., and Hermosilla, C

Vet. Res. Commun. (2008) **32** : 325-332

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche unterstützend
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig

Vet Res Commun (2008) 32:325–332  
 DOI 10.1007/s11259-007-9033-7

ORIGINAL ARTICLE

## Studies on synchronous egress of coccidian parasites (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187

Jan H. Behrendt · Anja Taubert · Horst Zahner · Carlos Hermosilla

Accepted: 30 November 2007 / Published online: 25 December 2007  
 © Springer Science + Business Media B.V. 2007

**Abstract** *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Eimeria bovis* are coccidian parasites of veterinary importance. Tachyzoites of *N. caninum* and *T. gondii* and sporozoites of *E. bovis* are able to invade and replicate in endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. As it holds true for all eukaryotic cells, the survival of parasitized host cells and the parasites themselves should be dependent on ion balances, especially on extra- and intracellular calcium concentrations. Addition of the calcium ionophore A23187 reliably did release merozoites from mature *N. caninum* and *T. gondii* meronts grown in cultured primary bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC). Extent and time course of merozoite release depended on both, maturity of the meronts and concentration of the calcium ionophore. Attempts, however, to achieve synchronous release of merozoites from *E. bovis* first generation meronts by ionophore treatment failed, suggesting a different biological behaviour of this parasite. According to microscopical observations, the quite variable time of *E. bovis* macromeront maturation and a hampered merozoite exit owing to dense parasite-induced cytoskeleton elements surrounding the meront may be a reason for the lack of inducible synchronous release.

**Keywords** Calcium ionophore A23187 · Egress · Endothelial cells · *Eimeria bovis* · Intracellular calcium · *Neospora caninum* · *Toxoplasma gondii*


### Abbreviations

BUVEC bovine umbilical vein endothelial cells  
 DMSO dimethyl sulfoxid (methylsulfinylmethane)  
 ECGM endothelial cell growth medium  
 p. i. post infection

**Electronic supplementary materials** The online version of this article (doi: 10.1007/s11259-007-9033-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. H. Behrendt · A. Taubert · H. Zahner · C. Hermosilla  
 Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, D-35392 Giessen, Germany

J. H. Behrendt (✉)  
 Institute of Parasitology, Rudolf-Buchheim-Strasse 2, D-35392 Giessen, Germany  
 e-mail: jan-hillern.behrendt@vetmed.uni-giessen.de

 Springer

## Introduction

*Neospora caninum* is responsible for abortion in cattle and neurological disorders in dogs (Dubey and Lindsay 1996), *Eimeria bovis* can cause severe haemorrhagic enteritis in calves (Daugochies and Najdrowski 2005) and *Toxoplasma gondii* can cause serious disease, both, in animals and humans (Tenter et al. 2000). Calcium seems to play an important role in the life cycle of apicomplexan parasites and may be involved in the invasion of host cells and the release of merozoites (for *T. gondii* reviewed in Hoff and Carruthers 2002; Arrizabalaga and Boothroyd 2004). In particular, it was demonstrated that increasing the host cell intracellular calcium levels by calcium ionophore treatment triggers the exit of *T. gondii* merozoites (Endo et al. 1982; Stommel et al. 1997; Caldas et al. 2007). Microinjection also triggers calcium-dependent *T. gondii* merozoite egress (Schwab et al. 1994). Ionophore treatment has even been used to isolate merozoites in high purity and quantity as described for *Sarcocystis neurona* (Ellison et al. 2001). Since we were in need of *N. caninum* and *E. bovis* merozoites of similar quality we tried to employ the technique for these parasites, too. Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) were used as host cells. They were recently shown to be suitable for the propagation of *N. caninum* tachyzoites and the formation of *E. bovis* first generation meronts. Parasite replication and subsequent release from BUVEC in general takes 72 hours for *N. caninum* (Taubert et al. 2006) whereas it needs 2–3 weeks to form mature *E. bovis* macromeronts (Hermosilla et al. 2002). As a kind of control organism we included *T. gondii* which develops in BUVEC to merozoite-releasing meronts within 48 hours, in general (Taubert et al. 2006). Expectedly, we observed in principle corresponding effects in case of *N. caninum* and *T. gondii*, as merozoites of these parasites were set free after calcium ionophore treatment, whilst however, treatment-induced egress of *E. bovis* merozoites was not achieved.

The cysteine protease inhibitor E64 ((2S,3S)-3-[[[2S]-1-[4-(diaminomethylideneamino)butylamino]-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]carbamoyl]oxirane-2-carboxylic acid) is described to inhibit merozoite release from *Plasmodium falciparum* meronts (Salmon et al. 2001; Soni et al. 2005). We tested the above protease inhibitor for its ability to interfere with merozoite release from *E. bovis* macromeronts, which are completely enclosed by cytoskeleton elements (Hermosilla et al. 2000).

## Material & methods

Parasites - *N. caninum* (strain NC-1, Dubey et al. 1988) and *Toxoplasma gondii* (RH strain, Sabin, 1941) were maintained by serial passages in Vero cells (cell line derived from the kidney of the African green monkey, *Cercopithecus aethiops*). Tachyzoites were collected from Vero cell culture supernatants, washed with PBS and centrifuged at 400×g for 10 min. The *Eimeria bovis* strain H was isolated in 1988 in the field in northern Germany and maintained by passages in calves (Fiege et al. 1992). Sporozoites were isolated from sporulated oocysts according to Hermosilla et al. (2002).

Culture of primary bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) - BUVEC were isolated from umbilical cord veins based on a protocol by Jaffe et al. (1973) as described previously (Hermosilla et al. 2006). Cultivation was performed in 25 cm<sup>2</sup> plastic tissue culture flasks (Nunc) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> using endothelial cell growth medium (ECGM, PromoCell). Medium was changed every 2–3 days using ECGM supplemented with 70% medium 199 (Sigma). In some experiments cells were detached by trypsination, seeded into glass bottomed dishes coated with fibronectin (10 µg/ml, Sigma) and cultivated as above.

Parasite infection - BUVEC monolayers were inoculated with *N. caninum* or *T. gondii* tachyzoites or *E. bovis* sporozoites at a density of 10,000 parasites/cm<sup>2</sup>.

Egress assay - During the experiments, cells were kept in the above mixture of media (which contains 2 mM Ca<sup>2+</sup>) or in a medium containing 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM glucose and 10 mM HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid); pH adjusted to 7.4. The calcium ionophore A23187 hemicalcium salt (calcium 5-methylamino-2-[[[(2S,3R,5R,8R,9R)-3,5,9-trimethyl-2-[(2S)-1-oxo-1-(1H-pyrrol-2-yl)propan-2-yl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-8-yl]methyl]-1,3-benzoxazole-4-carboxylate, Sigma), which is commonly used to increase intracellular calcium concentration, was dissolved to a 10 mM stock solution in DMSO (Merck), stored at -20°C and, for use in the experiments, further diluted in the respective medium. Release of parasites from infected monolayers due to treatment with the calcium ionophore was controlled 10 min after addition of the ionophore using an inverted phase-contrast microscope (Leica DM) equipped with a ccd video camera (Sony).

The influence of the protease inhibitor E64 (Sigma) on merozoite release was tested by adding E64 to a final concentration of 10 µM to the culture medium. In *N. caninum*- or *T. gondii*-infected BUVEC E64 was added 24 hours after inoculation. In case of *E. bovis* E64 was added at the premature meront stage (14 days p. i.) and replaced by a freshly prepared solution every 48 h, together with new culture medium.

## Results

The calcium ionophore A23187 induced exit of tachyzoites from *N. caninum*-infected BUVEC in a dose dependent manner. Maximum release was obtained from mature meronts although an ionophore concentration of 10 µM caused a parasite release from younger meront stages, too. This ionophore-induced release was likewise achievable with *T. gondii* meronts (Table 1). Corresponding to the faster replication of the *T. gondii* RH-strain, 2 days p. i. 85% or 97% of meronts released tachyzoites to the medium upon treatment with 1 µM or 10 µM A23187, respectively (Table 1).

Attempts to achieve synchronous release of *E. bovis* merozoites from first generation meronts by treatment with calcium ionophore A23187 failed. Even concentrations of 20 µM, applied at 20–25 days p. i. (when some of the macromeronts had already released their merozoites spontaneously) did not provoke enhanced parasite release within the monitored period of 4 hours, when compared to untreated controls.

Microscopic observation revealed further differences between *E. bovis* and *T. gondii*/*N. caninum*. While *N. caninum*- and *T. gondii* tachyzoites seemed to be able to easily exit their

**Table 1** *N. caninum* and *T. gondii* meronts releasing tachyzoites due to ionophore treatment

		48 hours p. i.	60 hours p. i.	72 hours p. i.
<i>N. caninum</i>	1 µM A23187	0% (sporadically)	1,7% (sporadically)	77%
	10 µM A23187	46%	98%	100%
<i>T. gondii</i>	1 µM A23187	86% <sup>1)</sup>	-	-
	10 µM A23187	97% <sup>1)</sup>	-	-

<sup>1)</sup> Approximately 25% of the meronts had already released merozoites spontaneously before ionophore treatment.

Data was collected after 10 minutes of ionophore treatment.



host cell by multiple synchronous ruptures of the cell membrane at any spot all over the host cell surface, *E. bovis* macromeronts generally ruptured localized and merozoites left the meronts at these particular sites (Fig. 1). Thereby, tachyzoites of *N. caninum* and *T. gondii* left their host cell within seconds after starting to move, whereas *E. bovis* merozoites could be seen moving for minutes before leaving the host cell.

When *E. bovis*-infected BUVEC were cultured in the presence of the cysteine protease inhibitor E64 no difference in parasite development and merozoite release was found. Also, merozoite release from *T. gondii* and *N. caninum* meronts was not affected by the utilized protease inhibitor.

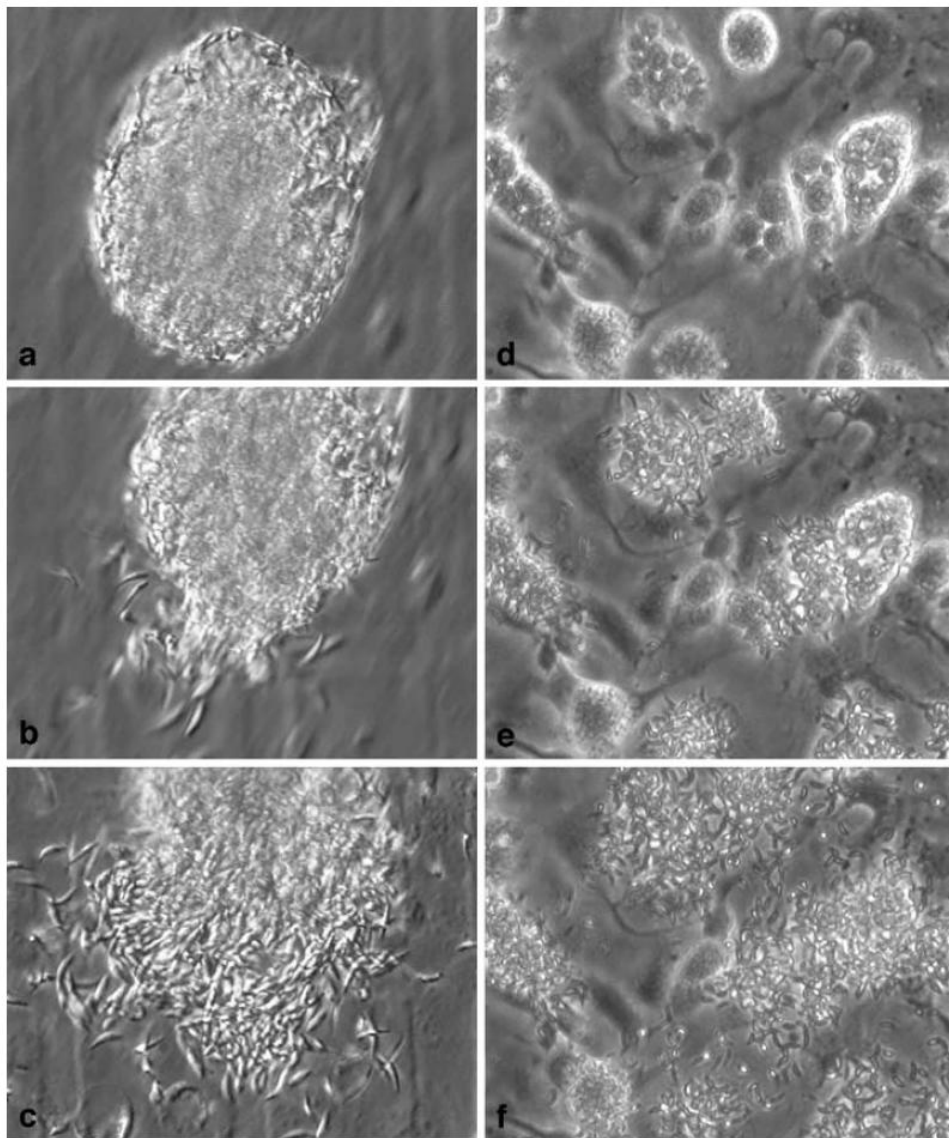
Besides inducing tachyzoite egress from mature meronts, the ionophore caused intracellular parasites to emerge from recently invaded host cells in all three species – which very recently has been shown for *T. gondii* by Caldas et al. (2007). In case of *T. gondii* and *N. caninum* this was limited to the first 2 hours p. i. and concerned virtually all of the intracellular parasites (Table 2). *E. bovis* could also be affected in this manner, in general up to 24 hours after infection, although the maximum response was observed within the first hours after infection, too. Two days p. i. only sporadic egress of sporozoites was observed. However, it is noteworthy that individual intracellular *E. bovis* sporozoites, which obviously had not developed further, were stimulated by the ionophore to emerge from the cells as late as 20 days p. i.

*E. bovis* sporozoites left their host cells in general within 5 min after addition of the ionophore to the medium. The fastest observed sporozoite started to emerge just after 1 min.

## Discussion

The usage of primary bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) provided the possibility to investigate calcium-induced egress of the three different parasites in a single type of host cells. The A23187-mediated egress of *T. gondii* tachyzoites from recently invaded host cells and from mature meronts is concordant with former reports, which demonstrated, that an increase in host cell intracellular calcium by calcium ionophore treatment (Endo et al. 1982; Stommel et al. 1997; Caldas et al. 2007) or microinjection (Schwab et al. 1994) triggers the exit of intracellular *T. gondii* stages. Our studies show for the first time that egress of the closely related parasite *N. caninum* can be achieved likewise. Moreover, ionophore-induced egress of *N. caninum* and *T. gondii* was shown to be dependent on both developmental stage of the parasite and concentration of the ionophore. The lack of ionophore-inducible egress 1 day p. i. most likely is due to current parasite developmental stage; it is obvious that the parasite is not motile in the course of replication. Just alike, *E. bovis* sporozoites escaped from recently invaded host cells upon calcium ionophore treatment and lost this ability with ongoing intracellular development. Consistent with the slower development of *E. bovis*, egress could still be induced 1 day p. i., but not longer. Parasite egress owing to purinergic activated intracellular calcium signaling as seen in *E. bovis*- or *N. caninum*-infected bovine spleen lymphatic endothelial cells (Behrendt 2004) could not be reproduced in *E. bovis*-, *N. caninum*- or *T. gondii*-infected BUVEC (unpublished data).

Little is known on the mechanisms involved in ionophore-induced egress and the most data available deal with *T. gondii* (reviewed in Hoff and Carruthers 2002; Arrizabalaga and Boothroyd 2004). Even less is known about the impact of this process in the parasites biology. In the late intracellular stages, when parasites have already replicated, host cell



**Fig. 1** (a–c; video 1) Release of *E. bovis* merozoites from a mature first generation meront in a BUVEC monolayer. When the meront was spotted, it contained barely moving merozoites. 15 minutes later, briskly moving merozoites could be seen inside the meront but it did not rupture yet (a). Finally, 30 min after spotting it, the meront ruptured and released the merozoites through the resulting opening (b and c). (d–f; video 2) Release of *N. caninum* tachyzoites from mature meronts grown in bovine endothelial cells. Tachyzoites started moving and escaped apparently unhampered and simultaneously in all directions (e and f). Videos of the depicted events are available as supplemental data

breakdown, inevitably leading to sustained high levels of intracellular free calcium, may alert intracellular parasites to leave their dying host cell. Quick escape and rapid invasion of a new host cell might help to avoid contact with host immune cells. In studies on *T. gondii*-infected human foreskin fibroblasts Moudy *et al.* (2001) showed permeabilisation of the host cell membrane to occur 2–3 minutes prior to egress. These authors, however, attribute activation of the normal spontaneous egress process to the loss of cytoplasmic potassium

**Table 2** Ionophore-induced parasite egress from recently invaded host cells

	1–2 hours p. i.	1 day p. i.	2 days p. i.
<i>E. bovis</i> sporozoites	> 90%	≈ 80%	sporadically
<i>N. caninum</i> tachyzoites	100%	Sporadically	(meronts!)
<i>T. gondii</i> tachyzoites	100%	Sporadically	(meronts!)

Data was collected after 10 minutes of ionophore treatment (2 μM A23187).

rather than increase in calcium. A possible biological role for this phenomenon, when taking place in recently invaded host cells, might be the detection of a dying host cell and the subsequent egress and search for a new host cell suitable for intracellular development.

When treating mature *E. bovis* macromeronts with the calcium ionophore A23187 we expected merozoites to be released also. But, different from observations on related parasites, no quick calcium-induced parasite egress was observed. One reason might be the quite asynchronous maturation of *E. bovis* macromeronts. While the average time for developing into merozoite-releasing mature meronts was about 48 h in *T. gondii*- and 72 h in *N. caninum*-infected BUVEC (q. v. Taubert et al. 2006), the development of *E. bovis* sporozoites to mature macromeronts lasted 20 to 25 days p. i. in average. Thereby the first merozoites were released 14 days after infection and merozoite release continued up to day 30 and longer (q. v. Hermosilla et al. 2002). Moreover, even at this time point, there were still intracellular sporozoites which had not developed at all. Furthermore, regarding recent observations on cytoskeleton development in *E. bovis*-infected cells *in vitro*, a quick escape of merozoites seems very unlikely since mature macromeronts are extensively surrounded by cytoskeleton elements (Hermosilla et al. 2000). In order to leave their host cell, merozoites have to overcome this cytoskeleton barrier first. At present, there is no knowledge of a mechanism by which *E. bovis* merozoites could possibly break this barrier. For *Plasmodium* spp. however, the involvement of proteases in merozoite release is discussed. Several authors showed that protease inhibitors have an adverse effect on merozoite release from mature meronts (Hadley et al. 1983; Lyon and Haynes 1986; Salmon et al. 2001). Moreover, studies on *P. falciparum*-infected erythrocytes identified proteases capable of cleaving erythrocyte cytoskeleton proteins. Hence, proteases are possibly involved in parasite release from mature meronts (Deguercy et al. 1990; Le Bonniec et al. 1999; Hanspal et al. 2002). The erythrocytic cytoskeleton may differ from the cytoskeleton surrounding *E. bovis* macromeronts, but, nonetheless, is quite rigid since it has to stabilize the plasma membrane while enduring heavy shear stress in passages through capillaries. Thus, the parasitophorous vacuoles of both parasites are surrounded by a distinct cytoskeleton which represents a barrier for merozoite egress, suggesting proteases to be involved in merozoite release in both cases. Our unsuccessful attempts, however, to block merozoite release from *E. bovis* macromeronts by the use of cysteine protease inhibitor E64 do not support the idea, that, in case of *E. bovis*, proteases (at least those inhibited by E64) are involved in this process. Likewise, inhibition of merozoite release from *T. gondii* or *N. caninum* meronts by E64 failed in our hands. However, even in *P. falciparum*-infected erythrocytes proteases did not always affect merozoite release (Banyal et al. 1981; S. Baumeister, personal communication 2007), leaving questions on their role in this process. At the same time, the models describing how *Plasmodium* spp. merozoites escape their host cells are numerous (reviewed in Rayner 2006). The video microscopy studies of *E. bovis* merozoite egress showing localized rupture of macromeronts are pointing out a parasite egress hampered by an extensive cytoskeleton envelope. If there is a distinct process of fusion between parasitophorous vacuole membrane and host cell membrane underlying this

behaviour, or if the cytoskeletal envelope just breaks at its weakest point, with merozoites then taking the line of the least resistance, remains open.

**Acknowledgements** We thank the Central Media Service of the Justus Liebig University Giessen for digitizing and processing the video material.

## References

- Arrizabalaga, G. and Boothroyd, J.C., 2004. Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *International Journal for Parasitology*, 34, 361–368.
- Banyal, H.S., Misra, G.C., Gupta, C.M. and Dutta, G.P., 1981. Involvement of malarial proteases in the interaction between the parasite and host erythrocyte in *Plasmodium knowlesi* infections. *The Journal of parasitology*, 67, 623–626.
- Behrendt, J.H., 2004. Untersuchungen zum Infektionsmechanismus von Eimerien, (Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, urn:nbn:de:hebis:26-opus-19033).
- Caldas, L.A., de Souza, W. and Attias, M., 2007. Calcium ionophore-induced egress of *Toxoplasma gondii* shortly after host cell invasion. *Veterinary Parasitology*, 147, 210–220.
- Dauguschies, A. and Najdrowski, M., 2005. Eimeriosis in cattle: current understanding. *Journal of Veterinary Medicine Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52, 417–427.
- Deguercy, A., Hommel, M. and Schrevel, J., 1990. Purification and characterization of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* which cleave erythrocyte cytoskeletal components. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 38, 233–244.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S. and Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193, 1259–1263.
- Dubey, J.P. and Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67, 1–59.
- Ellison, S.P., Greiner, E. and Dame, J.B., 2001. *In vitro* culture and synchronous release of *Sarcocystis neurona* merozoites from host cells. *Veterinary Parasitology*, 95, 251–261.
- Endo, T., Sethi, K.K. and Piekarski, G., 1982. *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Experimental Parasitology*, 53, 179–188.
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H. and Bürger, H.-J., 1992. *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitology Research*, 78, 32–38.
- Hadley, T., Aikawa, M. and Miller, L.H., 1983. *Plasmodium knowlesi*: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Experimental Parasitology*, 55, 306–311.
- Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A.H. and Mizuno, A., 2002. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood*, 100, 1048–1054.
- Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S. and Zahner, H., 2002. Development of *Eimeria bovis* *in vitro*: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitology Research*, 88, 301–307.
- Hermosilla, C., Schröpfer, E., Behrendt, J.H., Eckstein-Ludwig, U., Clauss, W. and Zahner, H., 2000. *Eimeria bovis* infection induced changes of the host cell cytoskeleton, In: *European Union - COST 820 Annual Workshop Proceedings: Vaccines Against Animal Coccidiosis, Dublin, Ireland.15–17 June 2000.*, 29.
- Hermosilla, C., Zahner, H. and Taubert, A., 2006. *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *International Journal for Parasitology*, 36, 423–431.
- Hoff, E. F. and Carruthers, V.B., 2002. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends in Parasitology*, 18, 251–255.
- Jaffé, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 52, 2745–2756.
- Le Bonniec, S., Deregnacourt, C., Redeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg, D.E. and Schrevel, J., 1999. Plasmeprin II, an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 14218–14223.

- Lyon, J.A. and Haynes, J.D., 1986. *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. *Journal of Immunology*, 136, 2245–2251.
- Moudy, R., Manning, T.J. and Beckers, C.J., 2001. The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 41492–41501.
- Rayner, J.C., 2006. Erythrocyte exit: Out, damned merozoite! Out I say!. *Trends in Parasitology*, 22, 189–192.
- Sabin, A., 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association*, 116, 801–814.
- Salmon, B.L., Oksman, A. and Goldberg, D.E., 2001. Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98, 271–276.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J. and Joiner, K.A., 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 91, 509–513.
- Soni, S., Dhawan, S., Rosen, K.M., Chafel, M., Chishti, A.H. and Hanspal, M., 2005. Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 35, 201–211.
- Stommel, E.W., Kenneth, H.E., Schwartzmann, J.D. and Kasper, L.H., 1997. *Toxoplasma gondii*: Dithiol-induced  $\text{Ca}^{2+}$  flux caused egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Experimental Parasitology*, 87, 88–97.
- Taubert, A., Krüll, M., Zahner, H. and Hermosilla, C., 2006. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112, 272–283.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R. and Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 1217–1258.

**5.7 “*Eimeria bovis* first generation schizonts in vitro infected host cells express parasite derived antigens on their surface.”**

Badawy, A., I., Hermosilla, C., and Zahner, H.\*

*Parasitology* (2008) (submitted manuscript)

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- |                              |                            |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative                 | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung             | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche  | unterstützend              |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich                 |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

*Eimeria bovis* first generation schizont in vitro infected host cells express parasite derived antigens on their surface

Ahmed Ibrahim I. Badawy, Carlos Hermosilla, Horst Zahner\*

Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen,  
Rudolf-Buchheim-Strasse 2, 35392 Giessen, Germany

\*Corresponding author. Tel.: +49-641-99-38460; Fax: +49-641-99-38469

E-mail address: [horst.zahner@vetmed.uni-giessen.de](mailto:horst.zahner@vetmed.uni-giessen.de)

**Abstract**

*Eimeria bovis* in vitro infected bovine cells express *E. bovis* antigens (EbHCSAg) on the surface which are recognized by sera of infected calves isolated after the end of patency and by rat hyperimmune sera to *E. bovis* 1<sup>st</sup> generation merozoites when tested by indirect immunofluorescence tests (IFAT) and immune electron microscopy. Antigen expression started 7 days p. i. with the onset of parasite replication. Vero cells which allow invaded sporozoites to survive > 20 days but not to replicate were free of such antigens. EbHCSAg could be removed by proteinase K, partly by Triton X - 100, Triton X-114 and Triton X-405, but not by 1M NaCl, CHAPS or phospholipase C. Antibodies, affinity-purified on paraformaldehyde/glutaraldehyde (PAGA)-fixed *E. bovis* schizont I-infected bovine cells bound (IFAT) to the surface of PAGA-fixed infected cells and 1<sup>st</sup> generation merozoites but in contrast to the untreated serum not to sporozoites. When tested by IFAT on methanol-fixed merozoites and sporozoites affinity-purified antibodies bound to structures in the apical area of merozoites but not to sporozoites while the untreated serum caused diffuse labelling of internal structures of both stages. Immune electron microscopy demonstrated binding of affinity-purified antibodies to micronemes and dense granules of 1<sup>st</sup> generation merozoites.

**Keywords:** *Eimeria bovis*; 1<sup>st</sup> generation schizont; In vitro; Parasite antigen on host cell surface; Micronemes; Dense granules



## Introduction

*Eimeria bovis* is one of the most common and pathogenic coccidial parasites of cattle world wide (Fitzgerald and Mansfield, 1972; Dauschies et al., 1986; Ernst et al., 1987; Fayer, 1989; Faber et al., 2002). Similar to other ruminant coccidia its life cycle includes so-called macroschizont as 1<sup>st</sup> generation schizonts which may contain > 100,000 merozoites. In case of *E. bovis* this development takes place in vivo in endothelial cells off the central lacteals of the villi in the distal ileum where the schizonts mature within 15 - 17 days p. i. and reach a size of up to 300 µm (Hammond et al., 1946, 1966). The small 2<sup>nd</sup> generation schizonts develop within 2 days in epithelial cells of the caecum and colon and after gamogony first oocyst are found in the faeces 18 - 21 days p. i. (Hammond et al., 1963). Schizonts I also develop in vitro in a variety of bovine cells (Hammond and Fayer, 1968; Speer et al., 1985; Hermosilla et al., 2002) but fail to do so in non-bovine cells although they may survive in such cells for > 3 weeks (Behrendt et al., 2000; Hermosilla et al., 2002).

Considering that strong cellular and humoral immune responses occur already during prepatency in infected calves (Hughes et al., 1988; Fiege et al., 1992; Hermosilla et al., 1999; Taubert et al., 2004b) the long persistence of *E. bovis* schizonts I on the one hand rises the question for effective evasion mechanisms of the parasites. Some strategies of the parasite became meanwhile evident. Thus *E. bovis* prevents its host cell from undergoing apoptosis (Hermosilla et al., unpubl.) and downregulates the transcription of adhesion molecule genes in infected endothelial cells (Hermosilla et al., 2004; Taubert et al., 2004a). On the other hand developing or mature 1<sup>st</sup> generation schizonts have been shown to be targets of protective immune reactions after challenge infections of immune hosts (see Shi et al., 2000). Supposed this holds true also for *E. bovis*, immune calves should be able to recognize infected cells, most probably by surface expressed parasite derived antigens. The present study describes such antigens detectable on infected host cells in vitro by sera of repeatedly infected, immune calves.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasite, in vivo infection, isolation of oocysts and sporozoites

*Eimeria bovis* (strain H) was maintained by serial passages in calves. For this purpose calves were reared coccidia-free and infected with 70.000 sporulated oocysts at an age of 7 weeks.

Oocysts were isolated from the faeces of the calves according to Jackson (1964) and sporulated in 2 % K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> solution at room temperature. Sporulated oocysts were stored at 4 °C and used within 6 months.

Oocysts were treated with 4 % NaOCl (20 min, on ice) and centrifuged (5 min, 300 x g). The supernatant, containing the oocysts, was diluted 1:2 with H<sub>2</sub>O and centrifuged (5 min, 400 x g). Oocysts in the sediment were subjected to repeated gradient centrifugation (60 % Percoll<sup>®</sup> gradient, 20 min, 400 x g and 50 % Percoll gradient, 20 min, 400 x g) and washed with H<sub>2</sub>O (10 min, 400 x g). Subsequently the oocysts were suspended in sterile 0.02M L-cysteine hydrochloride/0.2M NaHCO<sub>3</sub> solution and incubated in 100 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 ° C for 20 min, centrifuged (10 min, 500 x g), suspended in Hanks balanced salt solution (HBSS, Gibco) containing 0.4 % (w/v) trypsin (Sigma) and 8 % (v/v) fresh, sterile filtered bovine bile (obtained from the local abattoir) and incubated for excystation at 37 ° C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere under microscopic control up to 4 h. Free sporozoites were collected by centrifugation (10 min, 400 x g) and either used immediately to infect cells or they were cryopreserved in medium RPMI (Gibco) containing 2.5 % (v/v) fetal calf serum (FCS; Biochrom K.G., Berlin), 200 mM glutamine (Gibco) and 10 % dimethyl sulfoxide (Merck) in liquid nitrogen.

### 2.2. Host cells

Cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Gibco) or in Nunc Labtek TM Tissue Culture Chamber Slides (Nunc).

### 2.2.1. Bovine Umbilical Vein Endothelial Cells (BUVEC)

BUVEC were isolated from umbilical cord veins according to Jaffe et al. (1973). Umbilical cords were collected under aseptic conditions from calves born by caesarean section (kindly provided by B. Meinecke, Hannover). Umbilical cord vein endothelial cells obtained from collagenase digestion [20 min in 0.025 % collagenase (Worthington Biochemical Corp.) in Puck's saline A buffer (Gibco) at 39 °C and in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere] were washed, resuspended in modified endothelial cell growth medium [ECGM; composed of 0.4 % endothelial cell growth medium supplement/heparin, 0.1 ng epidermal growth factor/ml, 1.0 ng basic fibroblast growth factor/ml, 1.0 ng hydrocortisone/ml (all Promocell) and 50 µg gentamicin/amphotericin B/ml (Sigma) supplemented with 2 % FCS] and seeded into 25 cm<sup>2</sup> culture flasks.

Cells used for experiments were treated with trypsin [10 min in medium with 0.25 % (w/v) trypsin, 1 mM EDTA], washed with culture medium RPMI 1640 (Gibco) (10 min, 400 g) and transferred to new flasks or Chamber Slides.

### 2.2.2. Bovine Fetal Gastrointestinal Cells (BFGC)

BFGC had been initially isolated from mucosal scrapings of the intestine of *in vitro* fetuses 4 months after conception (Hermosilla et al., 2002). Cells used in the present study had been immortalized by lipofection with the plasmid pSVneo<sup>3</sup> encoding the SV40 large T antigen according to Pauly et al. (1995) (immortalized cells were kindly provided by M. König, Giessen). Cells were grown in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM; Sigma) supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.22 % NaHCO<sub>3</sub>, 50 units penicillin/ml, 50 µg streptomycin/ml and 15 % FCS at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. For experimental purposes, cells were than trypsinised (see above), washed with IMDM (10 min, 400 x g) at room temperature and seeded as above, but using 10 % FCS.

### 2.2.3. Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells

MDBK monolayer cell line cultures were purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC 90050801) and maintained through several passages in medium RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 µg/ml; all Sigma) and 10 % FCS and handled as above.

### 2.2.4. African Green Monkey Kidney Cells (VERO)

African green monkey kidney cells (*Cercopithecus aethiops*; VERO) were obtained (ECACC 84113001) and cultivated as described for MDBK cells.

### 2.3. In vitro cultivation of *E. bovis*

Only confluent cell monolayers were used for infection. In case of tissue culture flasks  $7.5 \times 10^5$  sporozoites were applied in approximately 1.5 ml appropriate medium. Cells on Chamber Slides were infected with  $10^4$  sporozoites in 0.1 ml medium. Media were changed 24 h after infection and thereafter every second day.

### 2.4. Isolation of *E. bovis* 1<sup>st</sup> generation merozoites

BFGC were used in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks for merozoite production. Infected cells were cultured as above until day 12 p. i. when the FCS-containing culture medium was replaced by serum-free medium. Schizonts ruptured beginning 14 days p. i. Free merozoites were taken off with the supernatant and zentrifuged for 1 min at 200 x g to remove floating cells and other debris. The merozoites in the supernatant were concentrated (25 min, 200 x g) and either used immediately after isolation (IFAT see below) or frozen and stored at - 80 ° C.

## 2.5. Sera and affinity purified antibodies

### 2.5.1. Calf sera

Calf sera were collected immediately before infection with *E. bovis* (pre-infection calf serum), 10, 18 and 27 days p. i. and 12 days after challenge 30 days after primary infection (repeatedly infected calf serum: riCS). Sera were stored at - 20 ° C until use.

### 2.5.2. Rat antiserum to *E. bovis* merozoite antigen

Twelve weeks old male Lewis rats were intraperitoneally injected with 10<sup>6</sup> living *E. bovis* merozoites. 7, 21 and 45 days after infection the rats were boosted with the same amounts of merozoites. Blood was taken 7 days after the last booster. Sera were removed after clotting by centrifugation and stored at - 20 ° C.

### 2.5.3. Affinity purification of antibodies (affCS)

Serum pools from calves reinfected 30 days after primary infection and bled 12 days after challenge (riCS) were affinity-purified on *E. bovis* infected BFGC. Pre-infection sera served as control. Infected cell layers grown in culture flasks were removed mechanically 15 days p. i., washed three times in PBS (10 min, 400 x g) and fixed in buffered (pH 7.0) 3 % paraformaldehyde solution for 24 h at 4 ° C. Thereafter the cells were washed four times in PBS and sedimented in Eppendorf tubes [5 min, 3,500 rounds per min (rpm)]. Discharging the supernatant, the pellet was suspended in calf serum as mentioned above and incubated 1 h at room temperature. In general approximately 7.5 x 10<sup>5</sup> cells with an infection rate of 20 - 40 % were used per 100 µl calf serum. Subsequently the cells were pelleted and washed four times with PBS (5 min, 3,500 rpm). The pellet was suspended in 300 µl elution buffer (0.1 M glycine, adjusted to pH 2.3 by HCl), incubated 3 min at room temperature and centrifuged (5 min, 3,500 rpm). The supernatant was removed, immediately neutralized with 45 µl 1 M Tris buffer (pH 8.0) and substituted by 35 µl of a 20 % BSA solution in H<sub>2</sub>O. Eluted proteins were stored at - 20 ° C until use.

## 2.6. *Indirect immune fluorescent antibody test (IFAT)*

### 2.6.1. *Antigen preparation*

Infected and uninfected (control) BUVEC, BFGC, MDBK and Vero cells on Chamber Slides were three times washed with PBS and fixed with 4 % paraformaldehyde/0.25 % glutardialdehyde in PBS (PAGA) 10 min at room temperature. In some experiments infected BFGC were scraped off by a rubber policeman, washed three times with PBS (10 min, 400 x g) and resuspended in fixing solution as above for 10 min. Subsequently cells were washed three times with PBS, dropped on poly-L-lysine coated slides and air-dried.

Life sporozoites and merozoites were handled as BFGC in suspension. Moreover, sporozoites and merozoites were fixed with methanol for 10 min, washed and applied to lysine coated slides as above.

### 2.6.2. *Test performance*

Slides coated with PAGA-fixed cells or parasites were treated with 10 mM lysine (Sigma) in PBS for 15 min at room temperature to block free aldehyde groups. These slides and those with methanol-fixed antigens were washed 15 min with PBS and incubated 30 min at 37 °C with calf pool sera, rat antisera to 1<sup>st</sup> generation merozoites or antibodies affinity purified on PAGA-fixed schizont-infected or control BFGC. Calf and rat sera were diluted 1:100 in PBS/2 % BSA, purified antibodies 1:5 in the same buffer. After three washings with PBS conjugates [FITC conjugated Rabbit Anti-bovine IgG or FITC conjugated Goat Anti-rat IgG (both Sigma) diluted 1:20 in PBS/0.05 % (w/v) Evans Blue (Serva)] were added and incubated 30 min at 37 °C. Washed and air-dried slides were covered with anti-fading buffer modified after Johnson and Nogueira-Aranjo (1981) [1 % (w/v) p-phenylene diamine in PBS, mixed with 9 volumes glycerin (Sigma) and adjusted to pH 8.0 with carbonate-bicarbonate buffer] and a cover slide and investigated by an upright UV microscope.

2.8. *Treatment of infected cells with saline, detergents and enzymes to remove surface antigens*

BFGC were infected, isolated 15 days p. i. as above and washed three times with PBS (400 x g, 10 min). The pellets (approximately  $7.5 \times 10^5$  cells each) were suspended in

1. 1 ml 1M NaCl and incubated 30 min and 60 min at 4 ° C (modified after Thomas and McNamee, 1990),
2. 1 ml phospholipase C (Type I; Sigma) solution (1 mg/ml PBS) and incubated 1 h at room temperature,
3. 1 ml proteinase K (Boehringer Mannheim, No. 33752) solution in PBS (0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml or 0.4 mg/ml) for 30 min, 1 h or 2 h at 37 ° C (water bath),
4. 1 ml CHAPS (3-[3-cholamidopryl-dimethylammino]-1-propansulfonate) (Sigma) solution in PBS (1 mM, 10 mM or 100 mM) and incubated up to 2 h at 37 ° C (modified after Halonen and Werdner, 1994),
5. Triton X-100 (Sigma) solution in PBS (1 µl/ml, 5 µl/ml or 10 µl/ml) and incubated up to 2 h at 37 ° C,
6. Triton X-114 (Sigma) solution as above and treatment as above (5.),
7. Triton X-405 (Sigma) solution as above and treatment as above (5.).

Subsequently the cells were washed three times with PBS and fixed and processed as described in 2.6.1 and 2.6.2

2.9. *Immune electron microscopy*

2.9.1. *Pre-embedding technique*

Infected BFGC were isolated 15 days p. i. as described (2.6.1) and washed three times (400 x g, 10 min) with PBS-E (13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). The pellet was suspended in fixing buffer (0.1M cacodylate buffer, pH 7.4, containing 4 % paraformaldehyde and 0.25 % glutardialdehyde (Polyscience, St. Goar) and fixed 10 min at room temperature. After centrifugation (400 x g, 10 min) the pellet was suspended in 0.01 % (w/v) lysine in PBS-E, incubated 15 min and washed three times (3,500 rpm, 5 min). Subsequently the pellet was suspended and incubated 1 h at room temperature in test sera (diluted 1:100 in PBS-E). After 3

washes (3,500 rpm, 5 min) in PBS-E the cells were suspended in anti-bovine IgG gold conjugate (particle size 4 nm; Dianova, Hamburg) diluted 1:50 in PBS-E and incubated 1 h at room temperature. After three washes they were re-treated for 12 h at room temperature with fixing buffer, washed three times with PBS-E and exposed 1.5 h to 2 % osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer. After washes the cells were dehydrated and embedded in araldit (Serva) according to standard techniques (Dykstra, 1993).

Ultrathin sections were absorbed to nickel grids and investigated using a Zeiss EM 9-25 electron microscope.

#### 2.9.2. Post-embedding technique

*E. bovis* merozoites (2.4) were fixed 2 h at room temperature in fixing buffer (2.9.1), washed three times in 0.1M cacodylate buffer, treated 30 min at room temperature with 10 mM lysine in 0.1M cacodylate buffer and washed 3 x 10 min in 0.1M cacodylate buffer. The pellet was soaked with 40 °C warm 3.5 % agar in buffer. After solidification it was cut into 2 x 2 x 2 mm blocks, which were dehydrated in increasing ethanol concentrations and infiltrated and polymerized with LR-White (London Resin Company, Surve, England) by standard techniques. Ultrathin sections were absorbed to nickel grids and incubated upside down 20 min with 0.01 % (w/v) lysine in PBS-E. After two 10 min washes with PBS-E and incubation (20 min) with PBS-E containing 0.2 % acetylated BSA (Biotrend, Köln) and 0.1 % Tween 20 (Roth, Karlsruhe) the antigen was incubated 2 h with affinity purified antibodies in PBS-E. One washing in PBS-E/BSA/Tween 20 and two further washes with PBS-E were followed by 1 h incubation with anti-bovine IgG gold conjugate (1:10 in PBS-E). Final washes were performed with PBS-E (2 x 10 min) and distilled water (5 min). The sections were contrasted with 4 % uranyl acetate in 5 % ethanol (5 min) and lead citrate (prepared according to Reynolds, 1963) (2 min) and were investigated using a electron microscope LEO 906.



### 3. Results

#### 3.1. Occurrence of *E. bovis* antigens on host cell surfaces

##### 3.1.1. *E. bovis* host cells surface antigens (EbHCSAg) detected by IFAT

PAGA-fixed *E. bovis* infected BFGC were exposed 3, 5, 7 and 15 days p. i. to sera of repeatedly infected calves (riCS) and pre-infection calf sera and tested by IFAT for antibody binding.

Cells failed to bind to any serum 3 and 5 days p. i. Starting 7 days p. i. and increased on day 15 p. i. immunoreactive material was detected on infected cells by riCS but not by pre-infection serum (Fig. 1 a-c). The first expression of immunoreactive surface components coincided with the morphologically detectable onset of schizogony in infected BFGC (Fig. 2 a-c). Corresponding binding pattern of the calves sera were observed with infected BUVEC. Immunoreactive components were also demonstrated on infected MDBK cells by riCS although the fluorescence was comparatively weak on day 7 p. i. and increased hardly until day 15. In contrast infected Vero cells did not react with any serum independent of the time p. i. (results with BUVEC, MDBK and Vero cells not shown in figures).

Corresponding pictures to those observed with riCS were obtained when infected BFGC were exposed 15 days p. i. to sera from rats immunized with *E. bovis* merozoites. riCS-reactive antigens on the surface of infected host cells were therefore regarded to be parasite derived (**E. bovis** **Host** **Cell** **Surface** **Antigen**: EbHCSAg). Sera taken from the rats before immunization did not bind to infected BFGC (results with rat sera not shown in figures).

##### 3.1.2. EbHCSAg detected by immune electron microscopy

Employing the pre-embedding technique binding of riCS to the surface of infected BFGC 15 days p. i. could be clearly demonstrated by gold-labelled secondary antibodies (Fig. 3). Gold particles were found scattered or locally accumulated on the cell surface. Knob-like surface alterations were not observed. Binding of pre-infection serum and of the conjugate to the cells was excluded (not shown in figures).

### 3.2. Occurrence of antibodies to EbHCSAg in calves in the course of *E. bovis* infections

Attempts to demonstrate such antibodies by IFAT in sera of experimentally infected calves 7 and 18 days p. i. failed completely. Sera obtained 28 days after primary infection and particularly sera of repeatedly infected calves (riCS) bound strongly to the surface of infected BFGC as observed above.

### 3.3. Effects of saline, enzyme and detergent treatment on EbHCSAg

Neither NaCl, CHAPS, nor phospholipase C in the concentrations used had any detectable effect on the surface antigenicity of infected (15 days p. i.) BFGC (not shown in figures). CHAPS concentrations of  $\geq 5$  mM caused lysis of the BFGC. Effects of Triton X-100, Triton X-114 and Triton X-405 depended on concentrations and duration of incubation. Triton X-100 treatment reduced the binding intensity of riCS beginning at a concentration of 5  $\mu$ l/ml and an incubation period of 15 min in general and resulted in a more grained fluorescence when compared with infected untreated BFGC. Extended exposure caused cell lysis. Triton X-114 treatment resulted in a generally weakened but still homogenous surface fluorescence of infected BFGC (Fig 1 d). Also Triton X-405 affected the binding of antibodies to BFGC in a dose and time dependent manner although increased concentrations were required when compared with the other detergents. Treated infected cells showed a cloddy surface fluorescence (Fig. 1 e). In contrast to the above procedures proteinase K removed EbHCSAg in a time dependent manner (Fig. 1 f; Table 1). There was, however, no uniform efficacy as with increasing incubation periods an increasing proportion of infected cells lost its surface antigenicity whereas others seemed completely refractory (Table 1).

### 3.4. Reactivity of EbHCSAg affinity purified antibodies

#### 3.4.1. Reactivity determined by IFAT

Sera of repeatedly infected calves (riCS) were affinity purified on infected BFGC 15 days p. i. Purified antibodies (affCS) bound to infected (15 days p. i.) PAGA-fixed

cells as expected. When reacted with PAGA-fixed merozoites they bound strongly to the surface of the parasites (Fig. 1 g). In contrast, they failed to bind to the surface of PAGA-fixed sporozoites (Fig. 1 m) whereas the complete riCS reacted strongly with these parasites (Fig. 1 k).

To determine binding sites of affCS inside the parasites methanol-fixed *E. bovis* merozoites and sporozoites were exposed to these antibodies and riCS. affCS recognized the surface of merozoites as well as internal structures, particularly antigens localized in a position apical to the nucleus (Fig. 1 i), whereas riCS bound homogenously to surface and cytoplasm of the merozoites (Fig. 1 h). Sporozoites were not recognized at all by affCS whereas riCS bound homogenously to the parasites, however, except the refractile bodies (Fig. 1 l).

#### 3.4.2. Reactivity determined by immune electron microscopy

Immune electron microscopy (post-embedding technique) was applied to localize the binding sites of affCS more precisely. Gold granules, indicating antibody binding were found accumulated in micronemes (Fig. 4 a) and dense granules (Fig. 4 b) of the 1<sup>st</sup> generation merozoites although not all micronemes bound the antibodies. Rhoptries, amylopectin granules and the nucleus were generally free of gold particles.

## 4. Discussion

The study demonstrates antigens on the surface of in vitro *E. bovis* infected bovine cells (*EbHCSAg*) reactive to antibodies in sera of repeatedly *E. bovis* infected or postpatent calves and rat derived hyperimmune sera to *E. bovis* merozoites. The antigens could not be detected until day 7 p. i., i. e. the occurrence coincided with the morphologically detectable onset of schizogony. Correspondingly the antigens were detectable on all types of infected cells which allow the formation of 1<sup>st</sup> generation schizonts of *E. bovis* in vitro whereas Vero cells where *E. bovis* persists at the sporozoite stage (see Behrendt et al., 2000; Hermosilla et al., 2002) were free of *EbHCSAg*. The corresponding type of binding of *EbHCSAg* to infected calves sera and rat hyperimmunserum to merozoites I already suggested that these antigens

were of parasite origin. This was confirmed by the binding pattern of the affinity purified antibodies.

Immune electron microscopy showed clearly that the antigens were expressed on the host cell surface. Although they seemed sometimes to aggregate, according with the picture obtained by IFAT they represented an amorphous surface coat. In no case we found them accumulated in knobs as they are described on *P. falciparum* infested erythrocytes containing several superficially exposed *P. falciparum* antigens including the PfEMPI (summarized by Wickham et al., 2001 and Craig and Scherf, 2001).

The *E. bovis* antigens on schizont I infected host cells are obviously an integral part of the surface membrane. At least they could not be eliminated by treatment with 1M NaCl which is a common method to discriminate between absorbed and membrane bound components (see Thomas and McNamee, 1990). CHAPS as a zwitterionic detergent did not affect the antigenic coat either. In contrast, non-ionic detergents had generally reduced the intensity of antibody binding and changed to some extent the distribution of the surface antigens - instead of covering the host cell homogenously the antigens seemed aggregated. However, these effects do not necessarily indicate that antigens had been removed by the treatment. Considering data on var proteins (Howard et al., 1987) and the RESA antigen (Foley et al., 1990, 1991) on *P. falciparum* infected erythrocytes the persistence of at least some *E. bovis* antigens on the surface of detergent treated host cells suggest they are in some way associated with the cytoskeleton of the cell.

The failure of phospholipase C treatment argues against the involvement of GPI structures in anchoring *E. bovis* antigens in the host cell membrane. GPI structures are common in Apicomplexa (e. g. see Manger et al., 1998 in case of *T. gondii*) and have also been shown in *E. bovis* merozoites (Zahner and Schwarz, unpublished). The uneffectivity of phospholipase C also makes it unlikely that phosphocholine (PC) antigens represent a substantial proportion of the antigens in question. This has to be considered since PC-containing molecules seem to accumulate in micronemes of *E. bovis* merozoites I (Heise et al., 1999a) and micronemes are a probable source of *EbHCSAg* (see below). According with the effect of proteinase K *EbHCSAg* are probably proteins or at least associated with protein structures.

The studies performed with affinity purified antibodies (affCS) suggest the *EbHCSAg* are strongly stage specific. affCS did not recognize sporozoites antigens at all whereas the complete infection serum riCS reacted with sporozoite surface and

internal antigens. However, it is unclear why riCS did not bind to sporozoite refractile bodies. Apart from the general fact that refractile bodies in *Eimeria* parasites contain antigenic molecules (Danforth and Augustine, 1989; Vermeulen et al., 1993 and others) refractile body-derived antigens would have been of particular interest in the present case: Abrahamsen et al. (1994a, 1994b) reported that such antigens of *E. bovis* (*Eb-25/50*) are able to cross the parasitophorous vacuole membrane and are distributed in the host cell cytoplasm. The corresponding gene is continuously transcribed during schizogony at least up to day 12 p. i. (Abrahamsen et al., 1994a). However, since the mature merozoites which synthesize *EbHCSAg* lack the *Eb-25/50* gene transcripts (Abrahamsen et al., 1994) *Eb-25/50* may not contribute to *EbHCSAg*.

Results obtained by IFAT and by immune electron microscopy rather suggest micronemes and dense granules are the source of *EbHCSAg*. This implies a so far unknown function of components synthesized in these organelles. The role of microneme proteins is presently seen predominantly in host cell recognition and invasion (summarized e. g. by Dubremetz et al., 1998 and Soldati et al., 2001). It is, however, also known that microneme antigens are exported to the parasite surface and cover it homogeneously. This was for example shown for the micronemal protein EtMIC<sub>4</sub> of *E. tenella* (Tomley et al., 2001) and it may be suggested for *E. bovis* antigens too. Future studies have to define involved antigens within the known spectrum of reported *E. bovis* merozoite microneme/surface antigens (Reduker and Speer, 1986; Whitmire et al., 1989; Heise, 1997). It is, however, unlikely that *EbHCSAg* correspond with *E. bovis* microneme antigens described by Heise et al. (1999b) since the corresponding monoclonal antibodies did not recognize the surface of PAGA-fixed merozoites.

Dense granule proteins in *Eimeria* spp. are generally synthesized relatively late during schizogony, are released into the parasitophorous vacuole and are integrated into a tubulo-reticular network in the vacuole and the vacuole membrane (Dubremetz et al., 1998; Blackman and Bannister, 2001; Sibley, 2003). Concerning the current study it is of particular interest that the RESA antigen (Pf 155) of *P. falciparum* which is expressed on the surface of infected erythrocytes, is synthesized in dense granules (Aikawa et al., 1990). It does therefore not seem unlikely that these organelles are involved in the synthesis of *EbHCSAg* too.

The function and role of these antigens in *E. bovis* infections can currently be discussed only speculatively. *EbHCSAg* will not correspond with the variable *var* antigens of *P. falciparum* (see Craig and Scherf, 2001) and *ves* antigens of *Babesia* spp. (summarized by Allred et al., 2000). These antigens function as adhesion molecules but are also part of the parasite's evasion strategy due to their variability. It seems also unlikely that the *EbHCSAg* play a role in the control of a primary *E. bovis* infection - at least not concerning humoral antibodies - as antibodies to *EbHCSAg* are obviously not developed in infected calves until the end of patency. The distinct *E. bovis* specific T-cell responses in calves during prepatency (Hughes et al., 1989; Hermosilla et al., 1999) are obviously also not directed to *EbHCSAg* as 1<sup>st</sup> generation schizonts do survive. It remains open whether the antibodies to *EbHCSAg* developed after patency act in vivo against challenge infections. In case of *Theileria annulata* a monoclonal antibody recognizing infection associated surface antigen on lymphoblastoid cells lysed infected cells in the presence of complement (Preston et al., 1986). However, humoral factors are generally of secondary importance in immuno protective effects against challenge infections with *Eimeria* spp. Studies in rodents (Schito and Bartha, 1997; Shi et al., 2001) and chickens (Byrnes et al., 1993; Vervelde et al., 1996; Breed et al., 1996) rather suggest they are mediated by cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) T-cells. It would therefore be of particular interest to know whether *EbHCSAg* include MHC I bound peptides. Since MHC I associated peptides on cell surfaces in principle may be recognized by antibodies (Porgador et al., 1997) it cannot be excluded. A further, although speculative interpretation could be that *EbHCSAg* conceal MHC I associated T-cell epitopes and are part of an evasion strategy of the parasite. Ongoing studies, e. g., on the MHC expression of infected cells attempt to answer such questions.

## References

- 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., 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.
- 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 *E. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. *Mol. Cell* 5, 153-162.
- 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.
- Blackman, M.J., Bannister, L.H., 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117, 11-25.
- Breed, D.G., Dorrestein, J., Vermeulen, A.N., 1996. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Dis.* 40, 37-48.
- Byrnes, S., Eaton, R., Kogut, M., 1993. In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *Int. J. Parasitol.* 23, 639-645.
- 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.
- 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.

- Dauguschies, A., Akimaru, M., Bürger, H.J., 1986. Experimentelle *E. bovis*-Infektionen beim Kalb: 1. Parasitologische und klinische Befunde. Dtsch. tierärztl. Wschr. 93, 393-397.
- 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.
- Ernst, J.V., Stewart, T.B., Witlock, D.R., 1987. Quantitative determination of coccidian oocysts in beef calves from the coastal plain area of Georgia (USA). Vet. Parasitol. 23, 1-10.
- Faber, J.E., 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 colostrum antibodies. Vet. Parasitol. 104, 1-17.
- Fayer, R., Epidemiology and control of bovine coccidiosis. In: Yvoré, P. (ed.): Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France 17.-20. October 1989. Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, I.N.R.A. Publ.: 445-456.
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H., Bürger, H.J., 1989. *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. Parasitol. Res. 78, 32-38.
- Fitzgerald, P.R., Mansfield, M.E., 1972. Effects of bovine coccidiosis on certain blood components, feed consumption and body weight changes of calves. Am. J. Vet. Res. 33, 1391-1397.
- 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.
- 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., Andersen, F.L., Miner, M.L., 1963. The occurrence of a second asexual generation in the life cycle of *Eimeria bovis* in calves. J. Parasitol. 49, 428-434.
- Hammond, D.M., Bowman, G.W., 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., Ernst, J.V., Miner, M.L., 1966. The development of first generation schizonts of *Eimeria bovis*. J. Protozool. 13, 559-564.
- 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.
- Heise, A., 1997. Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Antigene der Merozoiten I von *Eimeria bovis*. Inaug. Diss. Giessen.
- Heise, A., Peters, W., Zahner, H., 1999a. Phosphocholine epitopes in *Eimeria bovis*. Exp. Parasitol. 92, 279-282.
- Heise, A., Peters, W., Zahner, H., 1999b. Microneme antigens of *Eimeria bovis* recognized by two monoclonal antibodies. Parasitol. Res. 85, 457-467.
- 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.
- 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., Zahner, H., Taubert, A., 2004. Polymorphonuclear cell adhesion and adhesion molecule gene transcription in coccidia (*Eimeria bovis*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*) infected bovine endothelial cells. Int. J. Med. Microbiol. 293, Suppl. No. 38, 71-72.
- 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.
- 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., Whitmire, W.M., Speer, C.A., 1989. Immunity pattern during acute infection by *Eimeria bovis*. J. Parasitol. 75, 86-91.
- Jackson, A.R.B., 1964. The isolation of viable coccidial sporozoites. Parasitology 54, 87-93.
- 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-Araujo, G.M.D.C., 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. J. Immunol. Meth. 43, 349-350.
- 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 SAG1. Infect. Immun. 66, 2237-2244.
- Pauly, T., Elbers, K., König, M., Lengsfeld, T., Saalmüller, A., Thiel, H.-J., 1995. Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. J. General Virol. 76, 3039-3049.
- 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., Mc Dougall, 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.
- Reduker, D., Speer, C.A., 1986. Antigens of *in vitro*-produced first-generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). J. Parasitol. 72, 782-785.
- 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.
- Shi, M.Q., Huther, S., Burkhardt, E., Zahner, H., 2000. Immunity in rats against *Eimeria separata*: oocyst excretion, effects on endogenous stages and local tissue response after primary and challenge infections. Parasitol. Res. 86, 891-898.
- Shi, M., Huther, S., Burkhardt, E., Zahner, H., 2001. Lymphocyte subpopulations in the caecum mucosa of rats after infections with *Eimeria separata*: early responses in naive and immune animals to primary and challenge infections. Int. J. Parasitol. 31, 49-55.

- Shito, M.L., Barta, J.R., 1997. Nonspecific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice. *Infect. Immun.* 65, 3165-3170.
- Sibley, L.D., 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4, 581-586.
- 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., Reduker, D.W., Burgess, D.E., Whitmire, W.M., Splitter, G.A., 1985. Lymphokine induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultured bovine monocytes. *Infect. Immun.* 50, 566-571.
- Taubert, A., Sühwold, A., Hermosilla, C., Zahner, H., 2004a. T cell proliferation and cytokine gene transcription in *Eimeria bovis* primary and reinfected calves. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, Suppl. No. 38, 65.
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2004b. *Eimeria bovis* infection reduces adhesion of polymorphous nuclear neutrophils to infected endothelial cells by down-regulation of adhesion molecule gene transcription. *Int. J. Med. Microbiol.* 263, Suppl. No. 38, 77-78.
- Thomas, C.T., McNamee, M.G., 1990. Purification of membrane proteins. *Meth. Enzymol.* 182, 499-520.
- 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-I repeats. *Int. J. Parasitol.* 31, 1303-1310.
- 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, S.H.M., 1996. In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunol.* 18, 247-256.
- 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.

**Table 1:** Effect of proteinase K on *E. bovis* derived antigens (*EbHCSAg*) on the surface of *E. bovis* in vitro infected bovine fetal gastrointestinal cells (BFGC) 15 days p. i.; IFAT using sera of repeatedly *E. bovis* infected calves; means of 2 independent experiments.

Proteinase K mg/ml	Incubation min	n	% infected cells IFAT-positive
0.1	30	1483	56.6
	60	600	16.2
	120	139	15.0
0.2	30	945	64.0
	60	295	20.0
	120	386	12.1
0.4	30 <sup>1</sup>	34	36.0

n: number of infected cells considered

<sup>1</sup> prolonged incubation resulted in complete leysis of the cells

### Legends to figures

**Fig 1:** Binding pattern (IFAT) to *E. bovis* infected Bovine Fetal Gastrointestinal Cells (BFGC) and *E. bovis* stages of calf serum isolated after repeated infections with *E. bovis* (riCS) and riCS antibodies affinity purified to surface antigens on *E. bovis* infected BFGC.

**Fig. 1 a-c:** Binding of riCS to formaldehyde fixed *E. bovis* infected and uninfected BFGC (Magnif. x 95)

**a:** Infected BFGC 7 days p. i.

**b:** Infected BFGC 15 days p. i.

**c:** Uninfected BFGC

**Fig. 1 d-f:** Effects of detergent and proteinase K treatment of *E. bovis* infected BFGC on the binding of riCS (Magnif. x 95)

**d:** Treatment with Triton x-114 (1µl/ml, 1 h)

**e:** Treatment with Triton x-405 (1µl/ml, 1 h)

**f:** Proteinase K (0.1 mg/ml), 1h)

**Fig. 1 g-i:** Reaction of *E. bovis* 1<sup>st</sup> generation merozoites with riCS and affinity purified antibodies (Magnif. x 640)

**g:** Formaldehyde-fixed merozoites reacted with riCS

**h:** Methanole-fixed merozoites reacted with riCS

**i:** Methanol-fixed merozoites reacted with affinity purified antibodies; note: strong binding to apical region of the parasite (arrows)

**Fig. 1 k-m:** Reaction of *E. bovis* sporozoites with riCs and affinity purified antibodies (Magnif. x 640)

**k:** Formaldehyde-fixed sporozoites reacted with riCS;

note: refractile bodies (arrows) do not bind antibodies

**l:** Methanole-fixed sporozoites reacted with riCS;

**m:** Formaldehyde-fixed sporozoites with affinity-purified antibodies

**Fig. 2 a-c:** *E. bovis* infected Bovine Fetal Gastrointestinal Cells (BFGC; arrows indicate host cell margin) (Magnif. x 160)

**a:** BFGC with 2 trophozoites of *E. bovis* (arrow heads; 5 days p. i.)

**b:** BFGC, 2 early division stages of *E. bovis* (arrow heads; 5 days p. i.)

**c:** BFGC with a young 1<sup>st</sup> generation schizont of *E. bovis* (8 days p. i.)

**Fig. 3:** Binding (arrows) of repeatedly *E. bovis* infected calf serum to the surface of an *E. bovis* infected (15 days p. i.) Bovine Fetal Gastrointestinal Cell (immune electron microscopy, pre-embedding technique; magnif. x 60.000)

**Fig. 4 a-b:** Binding to *E. bovis* 1<sup>st</sup> generation merozoite organelles of repeatedly *E. bovis* infected calf antibodies affinity purified to surface antigens on *E. bovis* infected Bovine Fetal Gastrointestinal Cells (immune electron microscopy, post-embedding technique)

**a:** binding to micronemes (arrows) (Magnif. x 76.000)

**b:** binding to Dense Granules (arrows) (Magnif. x 61.000)

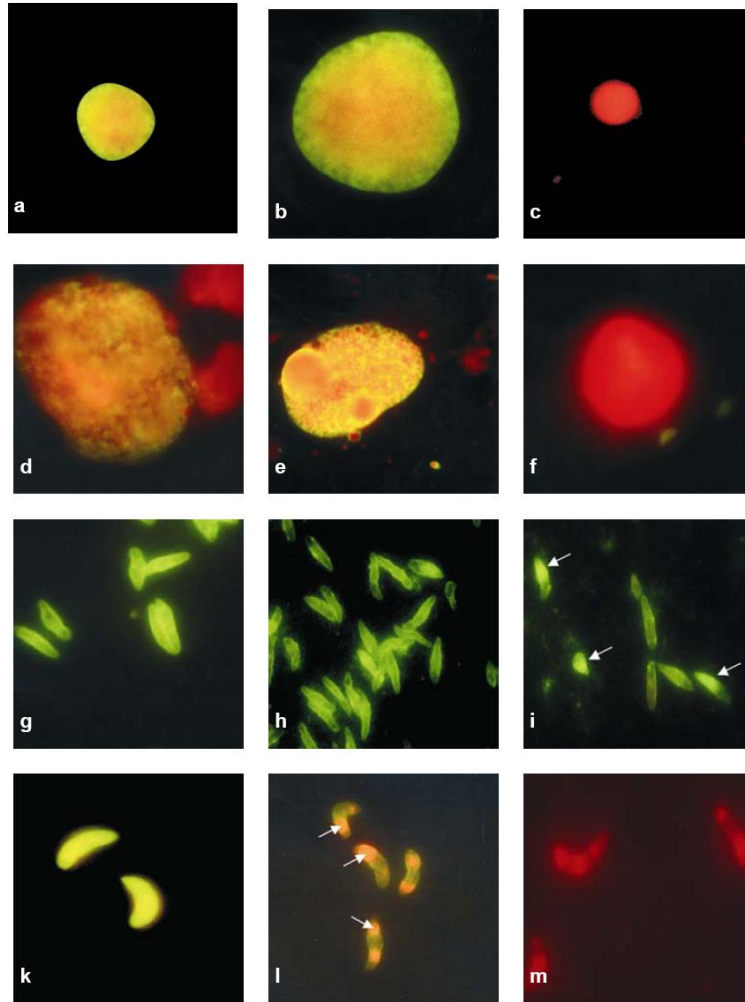


Fig. 1



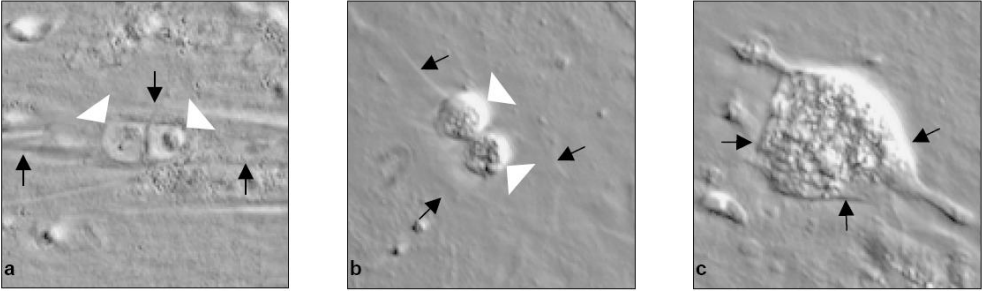
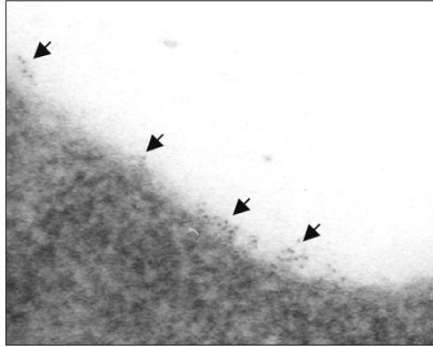


Fig. 2



**Fig. 3**

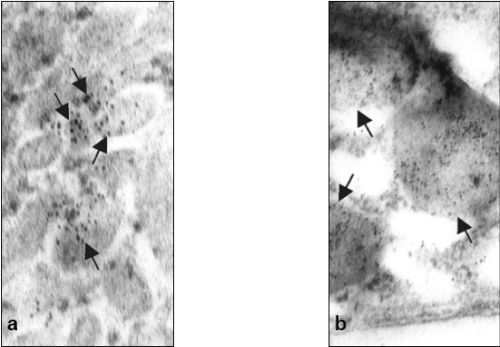


Fig. 4

**5.8 “Fluorescent *Eimeria bovis* sporozoites and meront stages *in vitro*: a helpful tool to study parasite-host cell interactions.”**

Hermosilla, C. \*, Stamm, I., Taubert, A., Lutz, K., Zahner, H. & Menge, C.

*Parasitol. Res.* (2008) **102**: 777-786

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche wesentlich
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig

## Fluorescent *Eimeria bovis* sporozoites and meront stages in vitro: a helpful tool to study parasite–host cell interactions

Carlos Hermosilla · Ivonne Stamm · Anja Taubert · Kathleen Lutz · Horst Zahner · Christian Menge

Received: 20 November 2007 / Accepted: 5 December 2007 / Published online: 4 January 2008  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** A fluorescence-based technique was established to trace intracellular sporozoites of *Eimeria bovis* for tests on gliding motility, invasion, replication and quantification of infection rates in cultured bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) by laser scanning confocal microscopy and flow cytometry (FCM) analyses. Employing the fluorescent dye 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), we determined its effects on sporozoites at various concentrations and duration of staining. More than 98% of sporozoites were labelled with the dye at a concentration of 2.5  $\mu$ M. Staining was predominantly found in refractile bodies and presumptive micronemes. Upon infection of BUVEC, CFSE-labelled sporozoites developed into fluorescent immature macromeronts, which were traceable inside the cells until 22 days postinfection (p. i.). Consistent with a peripheral localisation of the fluorescence signal in macromeronts merozoites released from these lacked detectable fluorescence. As example of use, a multicolour FCM approach for the simultaneous determination of *E. bovis* infection and host cell surface molecule expression was established. The approach proved suitable to quantify major histocompatibility complex (MHC-I) and MHC-II expression, thereby clearly distinguishing between infected and uninfected BUVEC up to day 14 p. i. In conclusion, CFSE labelling of *E. bovis* sporozoites facilitates monitoring of intracellular

stages in vitro and will be a highly useful tool for studying host cell responses towards parasite invasion.

### Introduction

Reliable methods for tracing intracellular parasites in vivo and in vitro are of great interest in experimental biology concerning *Eimeria* spp. Attempts for stable transfections with fluorescent marker proteins used for other Apicomplexa, such as *Plasmodium* spp. (VanWye and Haldar 1997; Natarajan et al. 2001), *Toxoplasma gondii* (Bradley et al. 2004; Gubbels et al. 2004) or *Sarcocystis neurona* (Gaji et al. 2006), have failed in *Eimeria*. As an alternative, staining techniques have not been developed to a standard level so far. Fuller and McDougald (2003) employed cell membrane labelling using a fluorescent dye (PKH-67 GL) for tracking *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. Stained parasites indeed invaded host cells. However, the authors were unable to unveil whether the staining persisted in dividing parasites. As another option, membrane-permeant reactive tracers, such as 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) seemed promising. CFSE is intracellularly converted into a green-fluorescent molecule by esterases and binds covalently to amino groups (McCabe et al. 2002; Spadaro et al. 2007). This staining was recently shown to be useful for tracing *Cryptosporidium* spp. sporozoites in vitro (Feng et al. 2006).

In the current work, we tested CFSE staining of *Eimeria bovis* sporozoites with respect to the parasites viability, invasive and developmental capabilities in primary cultured bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC). Additionally, we tested CFSE-labelled sporozoites for gliding motility, a prerequisite for the cell invasion process of apicomplexan parasites (Soldati et al. 2004; Wetzel et al.

C. Hermosilla (✉) · A. Taubert · K. Lutz · H. Zahner  
Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen,  
Rudolf-Buchheim-Str. 2,  
35392 Giessen, Germany  
e-mail: Carlos.R.Hermosilla@vetmed.uni-giessen.de

I. Stamm · C. Menge  
Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals,  
Justus Liebig University Giessen,  
Giessen, Germany

2005). CFSE-labelled sporozoites infect BUVEC and develop into fluorescent macromeronts (22 days postinfection (p. i.)). The technique allows the quantitation of infection rates by flow cytometry (FCM) analyses and permits many other options for studying parasite–host cell interactions. To demonstrate the usefulness of this technique, we established a multicolour FCM assay for the separate evaluation of major histocompatibility complex (MHC) expression on infected and uninfected cells in heterogeneous cultures.

## Materials and methods

### Parasites

*E. bovis* strain H was maintained by passages in Holstein–Friesian calves (Fiege et al. 1992). Oocysts were isolated from faeces and sporulated according to the method of Jackson (1964). Sporozoites were excysted from sporulated oocysts and purified as previously described (Hermosilla et al. 2002). After excystation, sporozoites were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in endothelial cell growth medium (ECGM; PromoCell) and counted in a Neubauer haemocytometre.

### Host cells

Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) were isolated according to Taubert et al. (2006) and cultured in modified ECGM [0.4% endothelial growth supplement–heparin, 0.1 ng epidermal growth factor per millilitre, 1 ng basic fibroblast growth factor per millilitre, 1 µg hydrocortisone per millilitre (all PromoCell), 50 µg gentamicin–amphotericin B solution per millilitre (Sigma), 2% fetal calf serum (FCS; Gibco)]. Cells were seeded into 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Nunc) and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were released from the tissue culture flasks by trypsinisation (37°C, 5 min) for further analyses. In the case of laser scanning confocal microscopy (LSCM), analyses cells were seeded on glass coverslips located in six-well culture plates (Nunc) and cultured (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) until confluent.

### Labelling of *E. bovis* sporozoites

Freshly excysted sporozoites were suspended in ECGM without FCS at a concentration of 1 × 10<sup>6</sup> sporozoites per millilitre and pulsed with various concentrations of CFSE (0.075 µM, 0.75 µM, 2.5 µM, 7.5 µM, Invitrogen) prediluted in dimethyl sulfoxide (Merck). Sporozoites were suspended in the dye by gently shaking and incubated for 5 min, 1, 2 and 3 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). In order to stop the labelling process, an equal volume of ECGM with

10% FCS was added and CFSE-labelled sporozoites (sporozoites<sup>CFSE</sup>) were washed four times (400 × g, 10 min) in ECGM, resuspended in ECGM plus FCS and protected from light before use.

### Demonstration of gliding motility of *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup>

Sporozoites<sup>CFSE</sup> were resuspended in ECGM plus FCS, dropped (20 µl) on glass slides and allowed to move on the glass slides for 1 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). After fixation (4% [w/v] paraformaldehyde [Merck], 10 min, dark), slides were washed three times in PBS, mounted in Mowiol (Sigma) and stored in the dark at 4°C until use. The gliding trails of sporozoites<sup>CFSE</sup> were visualised using LSCM (TCS SP2 Leica) equipped with an argon laser. Laser excitation wave lengths were 496 nm.

### Host cell infection

For the FCM analyses, confluent BUVEC monolayers grown in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Nunc) were infected with 2.5 × 10<sup>5</sup>, 7.5 × 10<sup>5</sup> and 1.5 × 10<sup>6</sup> sporozoites<sup>CFSE</sup> or unstained sporozoites. For LSCM analyses, 1 × 10<sup>4</sup> sporozoites<sup>CFSE</sup> were used to infect BUVEC monolayers grown on glass coverslips in six-well culture plates (Nunc). Culture medium was changed 24 h after infection and thereafter every third day.

To determine whether CFSE staining influenced the infectivity of sporozoites, confluent BUVEC isolates (25 cm<sup>2</sup> culture flasks) were infected with 2.5 × 10<sup>5</sup> labelled or unlabelled sporozoites. To determine infection rates, intracellular sporozoites were counted microscopically in five randomly selected vision fields at 3 h p. i.

### *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> development in vitro

To control the long-term persistence of CFSE labelling, sporozoites<sup>CFSE</sup>-infected BUVEC were analysed on days 1, 3, 8, 14 and 22 p. i. For this purpose, infected BUVEC grown on coverslips were fixed (4% [w/v] paraformaldehyde [Merck], 10 min, dark), washed three times in PBS, mounted in Mowiol (Sigma) and stored in the dark at 4°C until use. For fluorescence detection by LSCM, a microscope (TCS SP2, Leica) and a phase-contrast videomicroscope (DMIRB, Leica) equipped with argon lasers were used. The laser excitation wave lengths were 488 nm.

### MHC expression on BUVEC infected with *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup>

The MHC-I and MHC-II expression on sporozoites<sup>CFSE</sup>-infected and uninfected control BUVEC was determined on days 1, 3, 8 and 14 p. i. by a multicolour FCM approach.

*E. bovis*-infected and noninfected BUVEC monolayers were trypsinised and washed in PBS (400×g, 10 min, 4°C). For immunolabelling, anti-bovine MHC-I (mouse immunoglobulin G2a (IgG2a), clone IL-A88) and anti-bovine MHC-II (mouse IgG1; clone J-11; both hybridoma cell lines kindly provided by J. Naessens, International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya) monoclonal antibodies, biotin-conjugated anti-mouse goat IgG1 and anti-mouse goat IgG2a antibodies (BD Biosciences) and allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin (BD Biosciences) were employed. Immunolabelling was performed according to Menge et al. (2001). Briefly, cell pellets were resuspended in 50- $\mu$ l PBS as negative control or with 50- $\mu$ l supernatant of the hybridoma cell lines (MHC-I and MHC-II), incubated for 30 min on ice, subsequently washed once with PBS and incubated (30 min on ice) with biotin-conjugated anti-mouse goat IgG1 (1:800) or with biotin-conjugated anti-mouse goat IgG2a (1:400) as appropriate and with APC-conjugated streptavidin (1:40, 30 min on ice). Thereafter, cells were washed twice with PBS and submitted to FCM analyses.

#### FCM analyses

A FACSCalibur (BD Biosciences) equipped with an argon laser and a standard filter setting was used. Laser excitation wave lengths were 488 nm for the green fluorescence (CFSE) and 635 nm for the red fluorescence (APC). In each sample, 10,000 events were analysed for fluorescent signals utilising the Cell Quest Pro software (BD Biosciences). Subsequent data processing was performed with the FCS express V2 software (DeNovo Software).

#### Results

##### CFSE labelling of *E. bovis* sporozoites

Incubation of sporozoites with 7.5- $\mu$ M CFSE for 5 min resulted in a bright fluorescence of >99% of the parasites. Increasing the incubation time led to increased fluorescence intensity as demonstrated by FCM analyses (data not shown). By using 0.75  $\mu$ M, a prolonged incubation period was necessary: >95% of the sporozoites were stained only after 1 h. Staining of sporozoites with 0.075- $\mu$ M CFSE for up to 3 h resulted in 7% stained sporozoites. In general, CFSE staining led to a strong homogenous fluorescence of the sporozoites. By fluorescence microscopy (Figs. 1a, 2b and 3a,b), the refractile bodies showed the strongest fluorescence and a more weakly stained cytoplasm interspaced with more intensely stained granule-like structures in the apical region of the parasite (Fig. 1a), probably reflecting the micronemes. The *E. bovis* sporozoites were

labelled for 5 min with 2.5- $\mu$ M CFSE in the subsequent experiments.

*E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> show gliding motility and release fluorescent material

Sporozoites<sup>CFSE</sup> showed typical movements on glass slides and released fluorescent gliding trails (Fig. 1e). Occasionally, sporozoites<sup>CFSE</sup> shedding fluorescent material from the apical tip were found (Fig. 1f). Thus, proteins involved in the gliding process of sporozoites, such as micronemere proteins were obviously stained by CFSE as well.

When determined by light microscopy, at 3 h p. i., 9.6±1.2% (mean±SD of  $n=3$  experiments) of exposed BUVEC were infected with sporozoites<sup>CFSE</sup>. Control infections with untreated sporozoites resulted in slightly enhanced infection rates of 12.8±0.8% (mean±SD of  $n=3$  experiments) but differences were not significant (Fig. 3c).

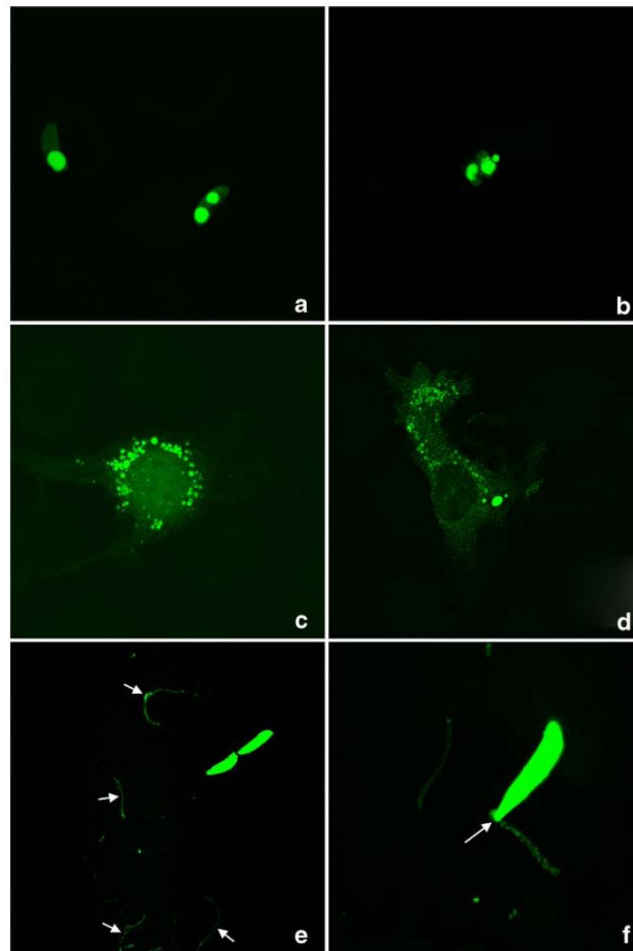
*E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> develop into fluorescent trophozoite and meront stages

Intracellular sporozoites<sup>CFSE</sup> displayed a strong green fluorescence of the refractile bodies and a weak staining of the cytoplasm as illustrated in Fig. 1a. In general, the anterior refractile body had disappeared and only the posterior had remained. On day 3 p. i., intracellular sporozoites<sup>CFSE</sup> were shortened and had rounded up into trophozoite stages (Fig. 1b). Most of the remaining refractile bodies still showed a bright fluorescence. In addition, fluorescing material was found in the cytoplasm of the parasite (Fig. 1b). As also holds true for non-labelled sporozoites, the majority of sporozoites<sup>CFSE</sup> remained as intracellular sporozoite or trophozoite stages, but some sporozoites<sup>CFSE</sup> initiated asexual replication resulting in bright fluorescent immature *E. bovis* meronts on day 8 p. i. (Fig. 1c). These immature meronts showed a marked fluorescence, visible as green dots, probably due to the dispersion of the refractile bodies. Fluorescent *E. bovis* macromeronts were detectable on day 14 p. i. (Fig. 1d) and showed fluorescing granules mainly concentrated at the periphery. First-generation *E. bovis* merozoites were released from mature macromeronts 22 days p. i. and onwards (Fig. 2a). Free merozoites, however, lacked LSCM-detectable fluorescence although the staining persisted in the macromeronts (see Fig. 2b).

Analysis of *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup>, infected and noninfected BUVEC cells by FCM

In order to assess whether sporozoite<sup>CFSE</sup>-infected BUVEC can be distinguished from noninfected cells within the same culture by FCM, BUVEC monolayers were infected with *E.*

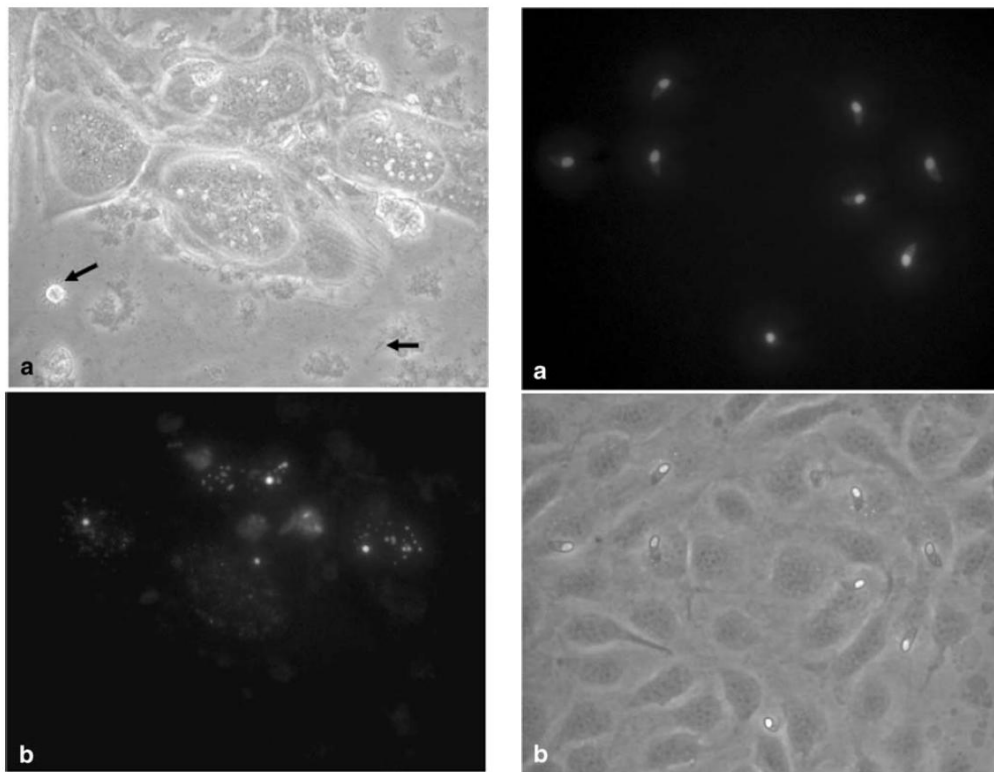
**Fig. 1** CFSE-labelled (2.5  $\mu$ M) *Eimeria bovis* stages (sporozoites, trophozoites, meronts) and fluorescent gliding trails detected by confocal laser scanning microscopy. BUVEC were grown to confluence and infected with CFSE-labelled sporozoites ( $2.5 \times 10^5$ /flask). Infected BUVEC were investigated on 1, 3, 8 and 14 days p. i. CFSE-labelled sporozoites were dropped on glass coverslips and analysed after 1-h incubation (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). **a** intracellular stained sporozoites with fluorescent refractile bodies and cytosol at 1 day p. i., **b** intracellular stained trophozoites with fluorescent refractile bodies and cytoplasm at 3 days p. i., **c** fluorescent immature meront at 8 days p. i., **d** fluorescent macromeront at 14 days p. i. (**a** to **d**  $\times 600$  magnification), **e** extracellular stained sporozoites and fluorescent gliding trails (**arrows**;  $\times 400$  magnification), **f** stained extracellular sporozoite shedding fluorescent material from the apical part and fluorescent trails (**arrow**;  $\times 640$  magnification)



*bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> overnight and subsequently detached by trypsinisation. The expression of MHC-I was used as a marker for bovine cells. Immunodetection of MHC-I molecules was performed and the resulting suspension was submitted to FCM analyses (“BUVEC sporozoites<sup>CFSE</sup>” in Fig. 4). For controls, suspensions of sporozoites<sup>CFSE</sup> cultured in the absence of BUVEC and of BUVEC without sporozoites<sup>CFSE</sup> (see “sporozoites<sup>CFSE</sup>” and “BUVEC”, respectively, in Fig. 4) were analysed. Plotting of the forward scatter height signal (corresponding to the size of the particles) versus the side scatter height signal (corresponding to the granularity) allowed the definition of three regions. Region one (R1) was devoid of events when a sporozoite suspension was analysed but was found to

contain events almost all of which being MHC-I-positive when suspensions derived from noninfected or infected BUVEC cultures were analysed. Analysis of a noninfected BUVEC culture resulted in 98.87% MHC-I-positive events in R1 that lacked a specific CFSE (fluorescence 1 height (FL1-H)) signal. In turn, 3.02% of the events in R1 were CFSE (FL1-H)/MHC-I-APC (FL4-H) double-positive when a suspension derived of sporozoite<sup>CFSE</sup>-infected BUVEC cultures were analysed. These staining patterns of the events in R1 are consistent with the interpretation of R1 just comprising viable endothelial cells that were or were not sporozoite-infected. Sporozoite<sup>CFSE</sup>-infected endothelial host cells could be clearly distinguished from uninfected cells by their significantly different CFSE (FL1-H) signal.

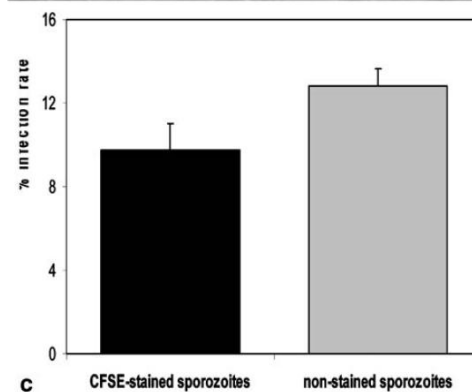




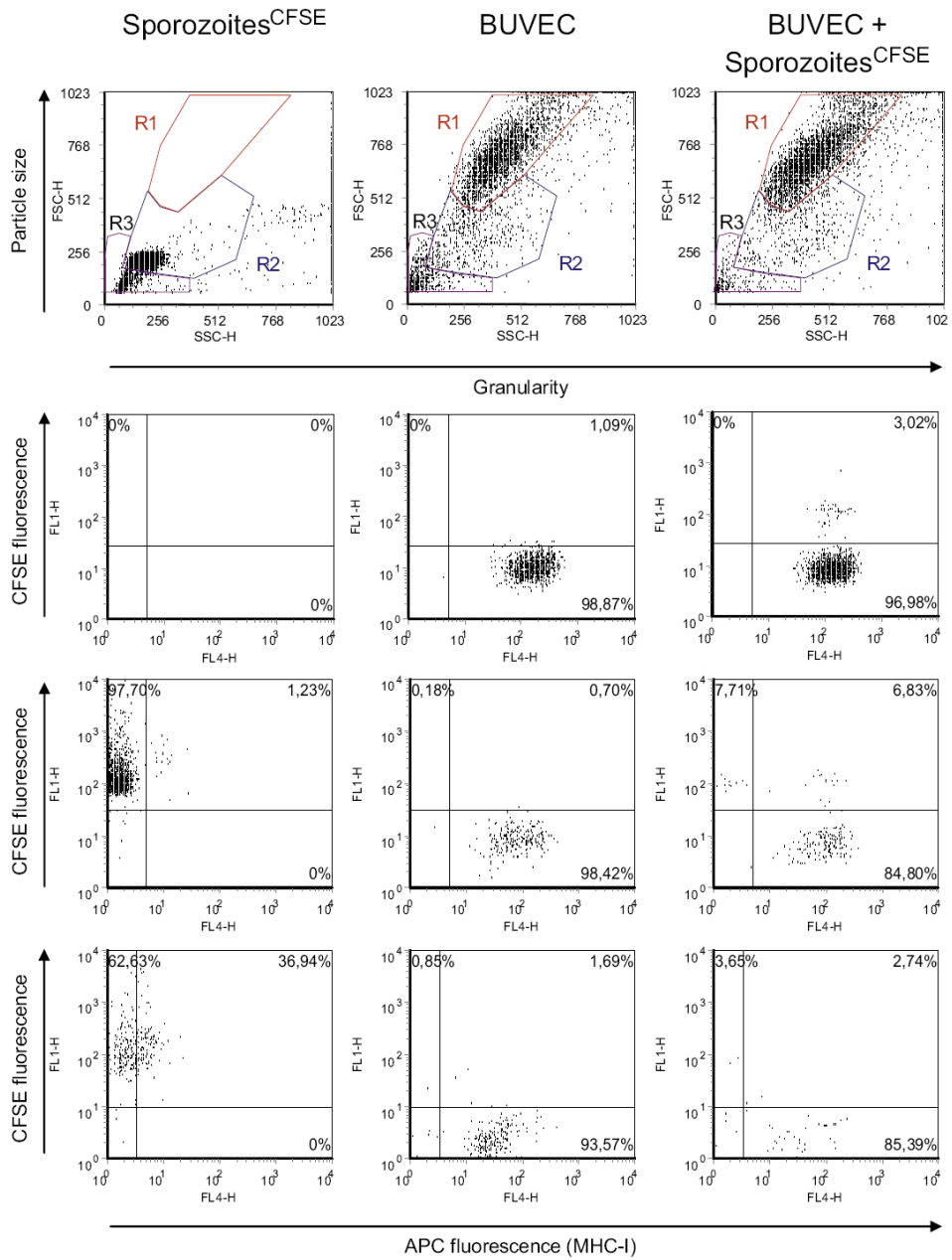
**Fig. 2** CFSE-labelled (2.5  $\mu$ M) *Eimeria bovis* macromeronts and free released merozoites. BUVEC were grown to confluence and infected with CFSE-labelled sporozoites ( $2.5 \times 10^5$ /flask). Infected BUVEC were investigated at 22 days p. i. **a** four macromeronts and free, released merozoites (arrows) detected by phase-contrast microscopy, **b** the same CFSE-labelled macromeronts detected by fluorescence microscopy ( $\times 400$  magnification)

Sporozoites that were not cell-associated were not included in R1 because CFSE-positive events lacking a MHC-I-APC signal could not be detected in R1 during the analysis of neither suspension.

The vast majority of cell-free sporozoites<sup>CFSE</sup> could be found in region two (R2) when analysing a sporozoite<sup>CFSE</sup> suspension. Accordingly, cell-free sporozoites<sup>CFSE</sup> appeared in R2 together with uninfected and infected endothelial host cells when a suspension of an infected BUVEC culture was submitted to FCM analysis. Compared to R1, however, the endothelial cells in R2 displayed a reduced particle size consistent with morphological alterations occurring during cellular death (Menge et al. 2001). Region three (R3) finally defined very small events that, according



**Fig. 3** Intracellular CFSE-labelled (2.5  $\mu$ M) *Eimeria bovis* sporozoites. BUVEC were grown to confluence, infected with CFSE-labelled sporozoites ( $2.5 \times 10^5$ /flask) and investigated 3 h p. i. **a** intracellular fluorescent sporozoites detected by fluorescence microscopy, **b** by phase-contrast microscopy ( $\times 200$  magnification); **c** comparison of microscopically determined infection rates using CFSE-stained and non-stained sporozoites (arithmetical means of infection rates in three different BUVEC isolates and standard deviations)



◀ **Fig. 4** Morphological and fluorescence patterns of CFSE-labelled (2.5  $\mu$ M) *Eimeria bovis* sporozoites (left column), uninfected BUVEC (middle column) and BUVEC infected with CFSE-labelled *E. bovis* sporozoites (right column) detected by flow cytometry analyses. BUVEC were detached by trypsinisation and submitted to FCM analysis. Relative sizes (*FSC-H*), granularities (*SSC-H*), *FL1-H* fluorescences and *FL4-H* fluorescences of 10,000 particles (i.e. sporozoites, BUVEC cells and debris) are recorded. Fluorescence intensities are displayed separately for events defined by different regions (*R1*, *R2*, *R3*) set according to the *FSC-H* and *SSC-H* signals. Numbers refer to the percentages of events in the respective region that displayed a specific fluorescence signal (above the threshold indicated by the quadrants) for *FL1-H* only, for *FL4-H* only and for both *FL1-H* and *FL4-H*, respectively

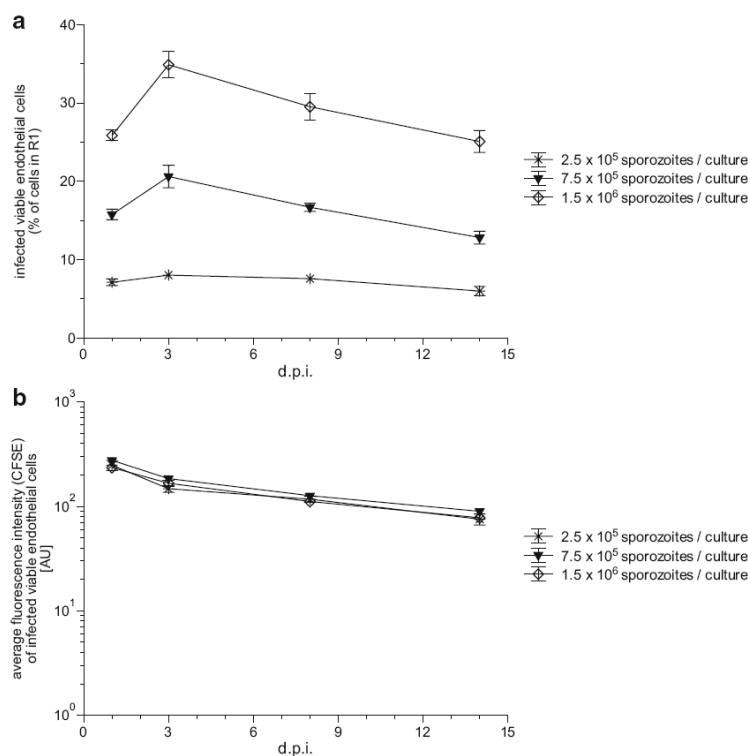
to the staining pattern, represented cellular debris derived from sporozoites and/or endothelial cells.

Application of FCM to qualitatively and quantitatively monitor the infection process of *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> in BUVEC

Analysis of events in R1 was applied to monitor BUVEC cultures infected with various doses of sporozoites<sup>CFSE</sup> for

up to 14 days of incubation. The percentage of infected viable BUVEC (i. e. percentage of CFSE-positive, MHC-I-APC-positive events of all events located in R1) was utilised as a read-out to quantify the *E. bovis* infection rates in BUVEC at different infection doses. A clear distinction between infected and uninfected cells was possible throughout the entire observation period because the CFSE fluorescence intensity of infected cells at day 14 p. i. was found to be reduced by only approximately threefold compared to cells analysed at day 1 p. i. (Fig. 5b). Quantifying by means of FCM analysis the percentage of infected BUVEC, a positive correlation between the sporozoite<sup>CFSE</sup> infection dose and the number of infected host cells was observed (Fig. 5a). Lowest infection rates of approximately 7% were obtained at day 1 p. i. with  $2.5 \times 10^5$  sporozoites per approximately  $1.5\text{--}1.6 \times 10^6$  cells per 25-cm<sup>2</sup> culture flask. Infection with  $7.5 \times 10^5$  sporozoites<sup>CFSE</sup> led to approximately 16% and with  $1.5 \times 10^6$  sporozoites<sup>CFSE</sup> to 26% infected endothelial cells at day 1 p. i. While at the lowest infection dose, the infection process appears to have been completed within the first 24 h p. i.; the percentage of infected cells raised to 20% and 35% in cultures infected

**Fig. 5** Kinetics of a the percentage of viable endothelial cells (as defined by region R1 in Fig. 4) infected with CFSE-labelled *Eimeria bovis* and b the average intensity of the CFSE signal of infected cells. At day 0, BUVEC cultures (containing approximately  $2 \times 10^6$  cells) were infected with different numbers of CFSE-labelled (2.5  $\mu$ M) *Eimeria bovis* sporozoites as indicated. Data are depicted as mean $\pm$ SD of sixfold determinations from one out of two independent experiments with similar results. Missing error bars are within symbols



with  $7.5 \times 10^5$  and  $1.5 \times 10^6$  sporozoites<sup>CFSE</sup>, respectively, at day 3 p. i. However, the percentage of infected, viable endothelial cells returned to the levels observed at day 1 p. i. in either case by the end of the observation period. This phenomenon might be explained by numerous sporozoites leaving host cells after inadequate infection trails (using high infection doses we often observe multiple infected host cells that may not permit development of all sporozoites) and being rinsed off by the feeding of the BUVEC cultures.

Application of FCM to quantify MHC expression on BUVEC infected with *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup>

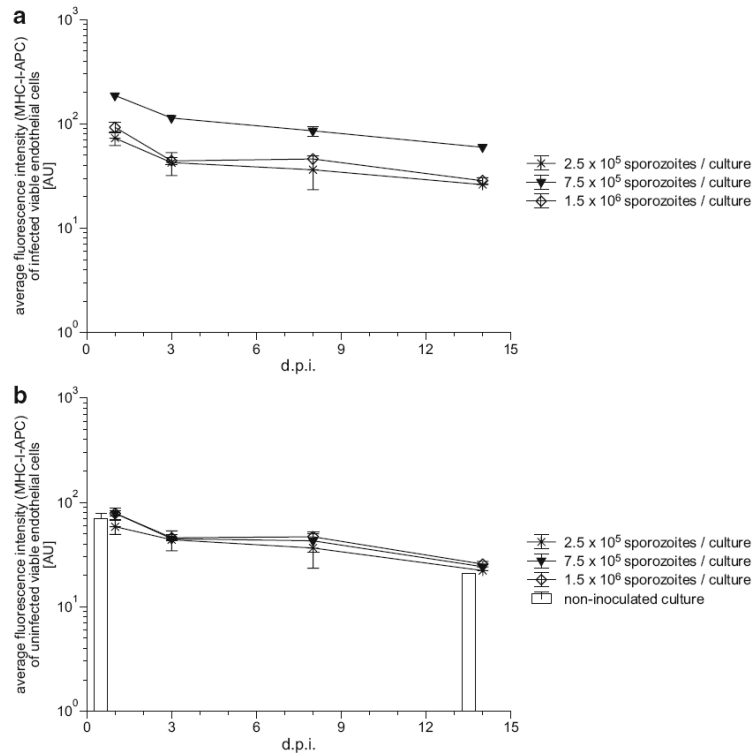
The multicolour FCM approach allowed for the simultaneous quantitation of MHC-I molecule expression on infected and uninfected BUVEC over the entire observation period. Irrespective of the number of sporozoites used to infect the BUVEC cultures, the average number of MHC-I molecules on the surface of uninfected cells, as assessed by the mean APC fluorescence intensity, was similar to the expression by cells from non-inoculated cultures (Fig. 6b). Even though the percentage of endothelial cells expressing MHC-I remained

above 95% throughout, the average expression level per cell somewhat declined over time. Interestingly, the MHC-I expression by infected BUVEC (Fig. 6a) was found to be higher as compared to uninfected cells within cultures that were inoculated with  $7.5 \times 10^5$  sporozoites<sup>CFSE</sup>. The same difference in expression levels also occurred with regard to MHC-II molecules (expressed by approximately 90% of the cells throughout; data not shown). Even though the relative increase in MHC expression by infected BUVEC at intermediate infection doses was less apparent in the repetition of the experiment, this observation indicates the potential of the method to independently quantify the expression of surface molecules on infected and uninfected cells in the same cultures.

Discussion

Here, we describe a simple and sensitive fluorescent-based approach to trace and quantitate *E. bovis* infection in cultured BUVEC monolayers. *E. bovis* sporozoites were easily and quickly stained with CFSE and maintained their

**Fig. 6** Kinetics of the average fluorescence intensity for the detection of MHC-I antigens (labeled with APC, detected by FL4-H) on the surface of BUVEC in cultures infected with CFSE-labelled (2.5 μM) *Eimeria bovis* sporozoites cultures: **a** *E.-bovis*-infected BUVEC, **b** BUVEC that remained uninfected, i.e. cells exhibiting a CFSE signal not exceeding autofluorescence. At day 0, cultures were inoculated with different numbers of CFSE-labelled *E. bovis* sporozoites as indicated. Cultures not inoculated were used as controls ("non-inoculated culture"). Data are depicted as mean±SD of triplicate determinations from one out of two independent experiments with similar results. Missing error bars are within symbols



gliding motility, infectivity and developmental capacity. The CFSE fluorescence within *E. bovis* sporozoites was segregated upon first merogony, resulting in bright fluorescent macromeronts until 22 days p. i.. The fluorescence in stained sporozoites and trophozoites was particularly intensive in the refractile bodies and structures in the apical area, possibly micronemes. In maturing and mature macromeronts, the staining was concentrated to small spherical peripheral bodies. Refractile bodies are prominent organelles in sporozoites of Eimeriidae and proteome analysis confirmed that these organelles are reservoirs for proteins probably involved in host cell invasion (de Venevelles et al. 2006). During merogony, refractile bodies of *Eimeria* spp. diminish in size by either releasing small amounts of refractile material or by forming several smaller spherical bodies (Doran 1982; Danforth and Augustine 1989), which could be an explanation for the staining patterns observed in fluorescent *E. bovis* macromeronts.

The predominant staining of refractile body components might also explain the lack of fluorescence in merozoites as these organelles are restricted to sporozoites and trophozoites. Considering the extreme replication rate in macromeronts, the binding of CFSE to other sporozoite molecules is obviously insufficient to be detected in the offspring or has been discharged prior to cell invasion as demonstrated by fluorescent gliding tracks. The latter observation supports the above interpretation that CFSE-stained structures in the apical area of sporozoites represent micronemes as microneme proteins are released onto the host cell surface to promote adhesion of the parasites (Soldati et al. 2004). The reason for a preferential labelling of particular organelles with CFSE is unknown. It has not been observed when *Cryptosporidium* spp. sporozoites were stained (Feng et al. 2006). The dye binds to aminomoiety (McCabe et al. 2002) and therefore should predominantly react with basic proteins, particularly to those with many moieties, e. g. histones, hyaluronates, glycosaminoglycans or amino sugars (Sunjara et al. 2000; Spadaro et al. 2007). However, recent proteomic studies on refractile bodies of *E. tenella* (de Venevelles et al. 2006) rather suggest a predominance of acidic proteins than basic ones and to our knowledge other studies on the composition of refractile bodies are not available.

BUVEC infected with sporozoites<sup>CFSE</sup> became brightly fluorescent and could easily be distinguished from uninfected cells by FCM analysis. Corresponding results were reported with CFSE-stained *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* sporozoites (Feng et al. 2006). Also in accordance with our results, the authors demonstrated that CFSE-stained *C. parvum* sporozoites discharge fluorescent material during gliding motility.

Moreover, CFSE has successfully been used to investigate drug effects against stained parasites, e. g. the proliferation of CFSE-stained *Leishmania infantum* promastigotes

after exposure to allopurinol (Kamau et al. 2000) and dinitroaniline compounds by FCM analyses (Kamau et al. 2001), indicating the potential applicability of CFSE in pharmacological screenings.

In a study using the fluorescent dye PKH-67 GL for labelling sporozoites of *E. tenella* (Fuller and McDougald 2003), infectivity of parasites was not affected, but no further development into meronts was observed. PKH-67-GL-labelled sporozoites did not lose fluorescence intensity after prolonged storage at 4°C, but stained parasites were neither exposed to higher temperatures nor longer period of time as it was the case in the current study (37°C, 22 days p. i.). Even the incubation of *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> at 60°C for 30 min did not affect their labelling intensity (data not shown).

Alternative techniques to visualise *Eimeria*, e.g. antibody-based immunoassays, have some limitations (Augustin and Danforth 1984; Danforth and Augustine 1989), such as the requirement of specific antibodies, fixation and permeabilisation techniques to allow access of antibodies to parasitic antigens. Whereas stable transformation of parasites requires laborious experiments and is often unsuccessful due to sexual replication of the parasite, the CFSE procedure offers a simple and useful alternative method. CFSE shows low cytotoxicity and a slow loss of fluorescence. The covalent bounds formed by the dye prevent transfer of dye to host cell cytoplasm. These advantages are of obvious benefit for the study of any other *Eimeria* species in ruminants replicating in long terms (e. g. *Eimeria zuernii*, *Eimeria auburnensis*, *Eimeria bakuensis*, *Eimeria ashata*, *Eimeria arloingi*, *Eimeria ninakohlyakimovae*).

The simultaneous detection of MHC-I or MHC-II expression on BUVEC infected with sporozoites<sup>CFSE</sup> showed the applicability of this staining technique for phenotypical studies of single host cells. In contrast to the active downregulation of MHC molecules, as described for *T. gondii*-infected host cells (Lüder et al. 1998, 2001, 2003) and for *Leishmania-amazonensis*-infected murine macrophages (Courret et al. 2001), data collected here from *E.-bovis*-infected BUVEC indicated, if at all, a slight increase in MHC-I expression when compared to controls, and this held true for the whole course of first merogony in vitro. However, this effect was exclusively observed in the case of  $7.5 \times 10^5$  sporozoites per flask but not in the highest dosage. At the moment, we do not have a plausible explanation for this phenomenon and further investigation using this tool will be needed to dissect these reactions. Nonetheless, a possible explanation may be a reciprocal effect caused by overdosage or the fact that increasing infection doses do not result in a proportional increase of infection rates owing to multiple infection of host cells.

In principle, *E. bovis* sporozoites might use other evasion strategies than the active downregulation of MHC expression. One possible mechanism might be the diminishment of the recruitment of leukocytes to the site of *E. bovis* infection. In this context, we could show suppressive effects of *E. bovis* sporozoites on tumour-necrosis-factor- $\alpha$ -mediated polymorphonuclear leukocyte adhesion (Hermosilla et al. 2006) and lower activation of infected BUVEC when compared to *T. gondii* or *Neospora caninum* infections (Taubert et al. 2006).

Taken together with the present work, we showed that *E. bovis* sporozoites<sup>CFSE</sup> offer a simple tool to investigate parasite–host cell interactions. CFSE facilitated visualisation and separation of single infected host cells by FCM and LSCM. Infection rates could be easily determined. Therefore, the CFSE labelling technique could be helpful not only for phenotypical studies of *Eimeria*-spp.-infected host cells but also for immunobiological investigations and pharmacological screening studies.

**Acknowledgements** We are indebted to A. Holz and S. Beckmann (Justus Liebig University Giessen) for technical assistance in LSCM. We acknowledge B. Hofmann, C. Scheld and B. Reinhardt for their excellent technical assistance in cell culture. This work was supported by the German Research Foundation (DFG, project number TA 291/1–1).

## References

- Augustin PC, Danforth HD (1984) Use of monoclonal antibodies to locate *Eimeria* sporozoites (Protozoa) in intestinal sections. *Proc Helminthol Soc Wash* 51:361–362
- Bradley PJ, Li N, Boothroyd JC (2004) A GFP-based motif-trap reveals a novel mechanism of targeting for the *Toxoplasma* ROP4 protein. *Mol Biochem Parasitol* 137(1):111–120
- Courret N, Frehel C, Prina E, Lang T, Antoine JC (2001) Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitol* 122(3):263–279
- Danforth HD, Augustine PC (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
- De Venevelles P, Francois Chich J, Faigle W, Lombard B, Loew D, Pery P, Labbe M (2006) Study of proteins associated with the *Eimeria tenella* refractile body by a proteomic approach. *Int J Parasitol* 36:1399–1407
- Doran DJ (1982) Behavior of coccidia *in vitro*. In: Long PL (ed) *The biology of the coccidia*. University Park Press, Baltimore, pp 229–285
- Feng H, Nie W, Bonilla R, Widmer G, Sheoran A, Tzipori S (2006) Quantitative tracking of *Cryptosporidium* infection in cell culture with CFSE. *J Parasitol* 92(6):1350–1354
- Fiege N, Klatt D, Kollmann D, Zahner H, Bürger HJ (1992) *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol Res* 78:32–38
- Fuller AL, McDougald LR (2003) Cell membrane labelling of *Eimeria tenella* sporozoites with the fluorescent dye PKH-67 GL for tracking parasite–host interactions. *Parasitol Res* 87:521–525
- Gaji RY, Zhang D, Breathnach CC, Vaishnav S, Striepen B, Howe DK (2006) Molecular genetic transfection of the coccidian parasite *Sarcocystis neurona*. *Mol Biochem Parasitol* 150:1–9
- Gubbels MJ, Wieffer M, Striepen B (2004) Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol* 137(1):99–110
- Hermosilla C, Barbisch B, Heise A, Kowalik S, Zahner H (2002) Development of *Eimeria bovis in vitro*: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cells lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin–Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol Res* 88:301–307
- Hermosilla C, Zahner H, Taubert A (2006) *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *Int J Parasitol* 36:423–431
- Jackson ARB (1964) The isolation of viable coccidial sporozoites. *Parasitology* 54:87–93
- Kamau SW, Hurtado M, Muller-Dobles U, Grimm F, Nunez R (2000) Flow cytometric assessment of allopurinol susceptibility in *Leishmania infantum* promastigote. *Cytometry* 40:353–360
- Kamau SW, Nunez R, Grimm F (2001) Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacol* 1:1
- Lüder CG, Lang T, Beuerle B, Gross U (1998) Down-regulation of MHC class II molecules and inability to upregulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 112:308–316
- Lüder CG, Lang C, Giraldo-Velasquez M, Algnier M, Gerdes J, Gross U (2003) *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *J Neuroimmunol* 134(1–2):12–24
- Lüder CG, Walter W, Beuerle B, Maeurer MJ, Gross U (2001) *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1 alpha. *Eur J Immunol* 31:1475–1484
- McCabe D, Cukierman T, Gabay JE (2002) Basic residues in azurocidin/HBP contribute to both heparin binding and antimicrobial activity. *J Biol Chem* 277:27477–27488
- Menge C, Stamm I, Wührer M, Geyer R, Wieler LH, Baljer G (2001) Globotriaosylceramide (Gb3/CD77) is synthesized and surface expressed by bovine lymphocytes upon activation *in vitro*. *Vet Immunol Immunopathol* 83:19–36
- Natarajan R, Thathy V, Mota MM, Hafalla JCR, Ménard R, Vernick KD (2001) Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. *Cell Microbiol* 3(6):371–379
- Soldati D, Foth BJ, Cowman AF (2004) Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol* 20(12):567–574
- Spadaro M, Curcio C, Varadhachary A, Cavallo F, Engelmayr J, Blezinger P, Pericle F, Forni G (2007) Requirement for IFN- $\gamma$ , CD8, T lymphocytes, and NKT cells in talactoferrin-induced inhibition of neu. tumors. *Cancer Res* 67:6425–6432
- Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJT (2000) An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med* 191:1051–1056
- Taubert A, Zahner H, Hermosilla C (2006) Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet Parasitol* 142:214–222
- VanWye JD, Hardar K (1997) Expression of green fluorescent protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 87:225–229
- Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibley LD (2005) Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect Immun* 73(9):5379–5387

## 5.9 “Inhibition of host cell apoptosis by *Eimeria bovis* sporozoites.”

Lang, M., Kann, M., Zahner, H., Taubert, A., and Hermosilla, C.\*

Vet. Parasitol. (2009) **160**: 25-33

\*korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative weitestgehend eigenständig
- Projektplanung weitestgehend eigenständig
- Durchführung der Versuche unterstützend
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation weitestgehend eigenständig

Author's personal copy

Veterinary Parasitology 160 (2009) 25–33



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Inhibition of host cell apoptosis by *Eimeria bovis* sporozoites

Mirjam Lang<sup>a</sup>, Michael Kann<sup>b,d</sup>, Horst Zahner<sup>a</sup>, Anja Taubert<sup>a</sup>, Carlos Hermosilla<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Germany

<sup>b</sup>Institute of Virology, Justus Liebig University Giessen, Germany

<sup>c</sup>Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, University of London, United Kingdom

<sup>d</sup>CNRS-UMR 5234-Université Bordeaux 2, Département 1, Bordeaux, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 September 2008

Received in revised form 17 October 2008

Accepted 20 October 2008

#### Keywords:

*Eimeria bovis*

Apoptosis

c-IAP1

c-FLIP

Actinomycin D

Cytochalasin B

Colchicin

### ABSTRACT

Sophisticated evasion strategies of obligate intracellular parasites, in particular prevention of host cell apoptosis, are necessary to ensure successful replication. To study the ability of *Eimeria bovis* in this regard, *in vitro* experiments were performed applying bovine foetal gastrointestinal cells (BFGC), bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) and African green monkey kidney cells (VERO) as host cells. BUVEC and BFGC allow maturation of sporozoites to macromeronts, in VERO cells sporozoites survive for weeks without showing further development. In highly infected BUVEC monolayers, infected cells survived until merozoite release whereas uninfected cells underwent apoptosis. Light microscopy and TUNEL assays performed 3–10 days p.i. showed that, within infected BFGC and VERO cell monolayers, uninfected cells underwent programmed cell death after application of various inducers of apoptosis, whereas infected cells survived. Incidentally, the anti-apoptotic efficacies in infected cells were independent of the drugs and the host cell type. We could not demonstrate significant differences between infected and uninfected cells after colchicin treatment in terms of translation of phosphatidylserines to the host cell surface, caspase 3 activity and cytochrome c release, probably since obtainable infection rates were too low. However, we could show by laser scanning confocal microscopy on single cell levels that the expression of the anti-apoptotic factors cellular Flice inhibitory protein (c-FLIP) and cellular inhibition of apoptosis protein 1 (c-IAP1) were enhanced in *E. bovis* infected cells after application of colchicin, in the latter case also in non-infected cells directly neighbouring infected ones. Our data show that *E. bovis* protects its host cell from apoptosis by increasing expression of c-IAP1 and c-FLIP.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Eimeria bovis* is an obligate intracellular apicomplexan parasite which represents the most pathogenic species in cattle coccidiosis, causing severe haemorrhagic typhlocolitis in calves and high economic losses worldwide (Dauguschies et al., 1998; Dauguschies and Najdrowski,

2005). Free *E. bovis* sporozoites invade endothelial cells of the central lymph capillaries of the ileal villi, in order to develop to large first generation macromeronts, 250 µm in size, within a period of 14–18 days (Hammond et al., 1964). Parasite invasion and replication and the final enlargement of the host cell far beyond the physiological size may cause considerable stress to the host cell (Frias et al., 2007; Fisch et al., 2007) and cell stress, in turn, is well known to trigger apoptosis (Green and Reed, 1998; Green, 2000). The parasite, however, depends on a live host cell to complete its development. In consequence, *E. bovis* needs to manipulate the host cell in order to survive. The general capability of intracellular parasites to interfere with host

\* Corresponding author at: Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, Hertfordshire AL9 7TA, United Kingdom. Tel.: +44 1707 666265; fax: +44 1707 652090.

E-mail address: [chermosilla@rvc.ac.uk](mailto:chermosilla@rvc.ac.uk) (C. Hermosilla).



cell apoptosis is well documented. Thus it is known that other parasites related to *E. bovis*, e.g. *Cryptosporidium parvum* (Chen et al., 1999, 2001), *Theileria parva* (Heussler et al., 1999, 2001; Küenzi et al., 2003), *Toxoplasma gondii* (Goebel et al., 1998, 1999; Caamaño et al., 2000; Lüder and Gross, 2005; Carmen et al., 2006; Keller et al., 2006) and *Plasmodium* spp. (Doolan and Hoffman, 2000; Van de Sand, 2005) are active in this sense. In particular, it was recently shown that also *Eimeria* spp. in chicken (*E. tenella*, *E. necatrix*) induce the transcriptional factor NF- $\kappa$ B and the anti-apoptotic factor Bcl- $\chi_L$  in the course of their development of second generation meronts to protect infected cells from apoptosis (Del Cacho et al., 2004).

All the above species, however, conclude their intracellular proliferation steps within a few days, whereas at least 2 weeks are required by *E. bovis* to develop to mature macromeronts. The question arose, whether *E. bovis* uses corresponding mechanisms to ensure its development and the present study aimed to answer this in *in vitro* experiments. We employed permissive host cells, which allow macromeront formation *in vitro* and non-permissive cells, which allow the sporozoites to survive but prevent any further development of the parasite (Hermosilla et al., 2002; Behrendt et al., 2004, 2008). In order to trigger host cell apoptosis we used the pro-apoptotic inducers actinomycin D, cytochalasin B and colchicin (Kalousek et al., 2007; Wang et al., 2007; Saji et al., 2007). Employing several techniques to demonstrate host cell apoptosis and its prevention by *E. bovis* sporozoites our data show that host cells infected with *E. bovis* sporozoites are generally protected from apoptosis and identified up-regulated expression of the anti-apoptotic factors cellular Flice inhibitory protein (c-FLIP) and cellular inhibition of apoptosis protein 1 (c-IAP1) as molecular mechanisms being involved in this process.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasites

The *E. bovis* strain H used in the current study was isolated in the field in northern Germany (Fiege et al., 1992) and maintained by passages in Holstein-Frisian calves for oocysts production. Calves were infected orally with  $5 \times 10^4$  sporulated *E. bovis* oocysts. Oocysts were isolated and sporulated and sporozoites were excysted as previously described (Hermosilla et al., 2002). Free sporozoites were collected and suspended at concentrations of  $2.5 \times 10^5/500 \mu\text{l}$  in Iscove's modified Dulbecco culture medium (IMDM; Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS; Gibco), 500 U/ml penicillin (Sigma–Aldrich) and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Gibco).

### 2.2. Host cells and parasite infection

Bovine foetal gastrointestinal cells (BFGC), an immortalized primary cell line, were cultured in IMDM culture medium supplemented with 500 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin and 15% FCS. Cells were cultured in 25  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks (Gibco) and incubated (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere) until confluency. Cell monolayers used for

experiments were trypsinised (10 min in medium with 0.25% trypsin, w/v, 1 mM EDTA; Sigma–Aldrich), washed with IMDM culture medium containing 10% FCS (10 min,  $400 \times g$ ) and seeded on 25  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks, 12-well plates (Gibco) or on glass coverslips (Gibco).

Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) were isolated as previously described (Taubert et al., 2006) and cultured in endothelial cell growth medium (ECGM; PromoCell). Cells were seeded into 25  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks and incubated at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Cell cultures were released from tissue culture flasks by trypsinisation (37 °C, 5 min) for further studies or seeded on glass coverslips for laser scanning confocal microscopy (LSCM) studies.

Africangreen monkey kidney (VERO) cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECAACC 84113001) and cultivated in RPMI 1640 culture medium (Gibco) supplemented with 500 U/ml penicillin (Sigma–Aldrich), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Sigma–Aldrich) and 10% FCS (Gibco). VERO cell monolayers for experimental purposes were handled as BFGC and BUVEC cultures.

Confluent BFGC, BUVEC, and VERO cell monolayers grown on 25  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks were infected with  $1 \times 10^6$  freshly excysted *E. bovis* sporozoites. Cell viability was determined by trypan blue exclusion test. Long-term viability in non-permissive host cells (VERO) was determined by inducing parasite egress by addition of  $\text{Ca}^{++}$  ionophores according to Behrendt et al. (2008).

### 2.3. Induction of apoptosis

Actinomycin B (Calbiochem), cytochalasin B (Sigma–Aldrich) and colchicin (Sigma–Aldrich) were used as pro-apoptotic inducers. The various host cell types showed different sensitivity to the inducers. In final experiments we used the following conditions, which triggered apoptosis in approximately 50% of cells: actinomycin D: 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 24 h incubation (BFGC) and 3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48 h incubation (VERO); cytochalasin B: 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48 h incubation (BFGC) and 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48 h incubation (VERO); colchicin: 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48 h incubation (BFGC) and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 48 h incubation (VERO). BUVEC were highly sensitive to all inducers and BUVEC monolayers were completely destroyed shortly after exposure even at very low concentrations (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). On this account, these experiments were restricted to BFGC and VERO cell cultures. Inducers of apoptosis were not applied to infected cells until 72 h because otherwise parasites were initiated to egress from the once infected host cell.

### 2.4. TUNEL<sup>®</sup> assays

Apoptosis at single cell level was analysed by the TUNEL<sup>®</sup> assay (Roche), which is based on the fluorescent labelling of DNA strand breaks. Cell cultures grown on 8-well chamberslides (Falcon) were infected with  $4 \times 10^4$  freshly isolated *E. bovis* sporozoites. Three days after infection actinomycin D, cytochalasin B or colchicin were applied as described above. Following incubation, chamberslides were rinsed twice with PBS, dried at room temperature (RT) and fixed with paraformaldehyde (4% w/

## Author's personal copy

M. Lang et al. / *Veterinary Parasitology* 160 (2009) 25–33

27

v, 1 h, RT; Serva). Cells were permeabilised with 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma–Aldrich) in PBS (10 min, RT), rinsed twice with PBS, exposed to 50  $\mu$ l of TUNEL<sup>®</sup> reaction mixture (Roche), covered with coverslips and incubated (humidified atmosphere at 37 °C, 1 h in the dark). Slides were then rinsed three times with PBS, and the samples were analysed by fluorescence microscopy (Leitz Diaplan, Leica) with an excitation wave length of 450–550 nm for the green fluorescence.

### 2.5. Annexin V assays

In the early course of apoptosis phosphatidylserines localized on the inner side of cell membranes are shifted to the cell surface and these molecules bind to Annexin V. The detection kit employed (BD Pharmingen) utilises FITC-conjugated Annexin V. Its binding to the cell surface is used to discriminate apoptotic and viable cells by fluorescence microscopy or flow cytometry (FCM) analyses. In brief, confluent, infected and non-infected BFGC ( $n = 3$ ) and VERO ( $n = 3$ ) monolayers were treated with the pro-apoptotic inducers. Corresponding numbers of non-infected BFGC and VERO monolayers were used as controls. Cells were isolated by trypsinisation, washed in PBS and incubated with Annexin V-FITC (1:25, 20 min, RT, in the dark). Cells were then submitted to FCM analyses or analysed by fluorescence microscopy. After 3, 5, 7 and 10 days p.i. apoptosis was induced for 24 h by actinomycin D, cytochalasin B or colchicin treatment. After incubation, cells were trypsinised and washed in PBS (400  $\times$  g, 10 min, 4 °C). Cell pellets were resuspended in PBS and  $3 \times 10^5$  cells were incubated in Annexin V-FITC (1:25, 20 min, RT, in the dark). Cells were then submitted to FCM analyses or analysed by fluorescence microscopy. In three experiments 5 aliquots of each cell type were probed. For FCM analyses a FACScalibur (BD Biosciences) equipped with an argon laser (wave length 488 nm) and a standard filter setting was used. In each sample, 10,000 events were analysed utilising the Cell Quest Pro software (BD Biosciences). The FCS express V2 software (DeNovo Software) was used for data processing.

### 2.6. Determination of caspase 3 activity

Induction of apoptosis results in caspase 3 activation. To determine this activation as an indicator of the early phase of apoptosis, infected and uninfected BFGC and VERO cells were treated with the pro-apoptotic compounds for 5 h (a period of time, found optimum for activation in preliminary experiments). Caspase 3 activity was determined in pelleted cells after lysis using the Enz Check<sup>®</sup> Caspase 3 Assay (Invitrogen) by detecting the change in the fluorescence intensity due to the release of the fluorescent dye rhodamin-110 (R-110) from the synthetic caspase 3 substrate (DEVD-R-110) following cleavage by activated caspase 3. R-110 was measured using a fluoro-luminescent reader (Fluoroscan Ascent<sup>®</sup>; Labsystem). Each experiment was repeated at least three times and for each experiment the caspase activity assay was performed in triplicates.

### 2.7. Detection of cytochrome c release

Effects of *E. bovis* infection on host cell cytochrome c release were determined by the Zymed<sup>®</sup> Cytochrome c ELISA (Zymed Laboratories Incorporation). For this, infected and non-infected host cell monolayers were induced for apoptosis by actinomycin D, cytochalasin B or colchicin, scraped off, pelleted and stored at –80 °C. The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions. An ELISA multiplate reader (E<sup>max</sup> Precision Microplate Reader<sup>®</sup>; MWG Biotech) was used for the evaluation.

### 2.8. Detection of c-IAP1 and c-FLIP expression in host cells by LSCM

BFGC were cultivated on glass coverslips ( $\emptyset$  12 mm) in 12-well culture plates (Gibco) until confluency. Freshly excysted sporozoites were labelled with Texas Red dye (Invitrogen) (2.5  $\mu$ M, 1 h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, in the dark). Labelled sporozoites were then washed four times in PBS (600  $\times$  g, 15 min). Cell cultures were infected with  $2.5 \times 10^5$  labelled sporozoites per coverslip. Infected cell samples on coverslips and non-infected controls were treated with colchicin (0.03  $\mu$ g/ml) for 48 h at 3 and 5 days p.i. Thereafter, cells were washed three times in PBS, fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (4 °C, overnight) and permeabilised in 0.1% (v/v) Triton X-100 (10 min, RT). Cells were then rinsed twice in PBS and blocked with 1% (w/v) BSA (Roth) and 5% (v/v) goat serum in PBS (15 min, RT). The samples were reacted with primary antibodies (1:100 in PBS/1% BSA) directed against human c-IAP1 (Santa Cruz Biotechnology) and human c-FLIP (BD Biosciences) for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere, washed four times with PBS and incubated in FITC-conjugated anti-rabbit goat IgG antibodies (1:100 in PBS/1% BSA). After rinsing the samples twice in PBS cells were stained with TOTO-3 (Invitrogen) (1  $\mu$ M, 15 min, 37 °C, in the dark) to clearly identify the nuclei of host cells and intracellular parasites. Samples were then rinsed in Aqua dest, mounted in Mowiol medium (Calbiochem), dried overnight and investigated by using a LSCM (TCS NT, Leica) equipped with an argon-krypton/UV laser with an excitation wave length of 488 nm for green (FITC), of 567 nm for red (Texas Red) and of 648 nm for blue fluorescence (TOTO-3). For quantification, the fluorescence intensities of 120 single infected or non-infected cells were measured using the Image Quant<sup>®</sup> software (Molecular Dynamic).

### 2.9. Statistical analyses

Arithmetic means were calculated and processed for ANOVA. A *p*-value of <0.05 was considered as significant.

## 3. Results

### 3.1. Light microscopic observations

Infections of the various host cell types with the listed numbers of sporozoites resulted in infection rates of 30–40%. Rates could not further be enhanced by increasing the

amount of sporozoites in general, although multiple infections of cells were common. Approximately 7 days p.i. parasites residing in BUVEC and BFGC started to divide. Fully developed 1st generation macromeronts were observed from 15 days p.i. onwards. Sporozoites in VERO cells failed to develop further but remained alive for >20 days p.i. as determined by their egress from the host cell in response to  $Ca^{++}$  ionophores.

First hints of *E. bovis*-induced inhibition of host cell apoptosis were obtained from observations in infected BUVEC. In highly infected ( $2 \times 10^6$  sporozoites/25 cm<sup>2</sup> flask) BUVEC monolayers we reproducibly observed increasing numbers of dying non-infected cells beginning with days 8–

10 p.i., whilst infected cells remained attached to the flasks either as single cells or as clusters (Fig. 1). In ongoing cultures, these infected cells survived and mature macromeronts I developed. Sometimes almost exclusively non-infected cells disappeared, but, over the course of the cultivation, proliferated again and formed more or less confluent cell layers (Fig. 1). Overall, this phenomenon was parasite-induced, as non-infected control BUVEC monolayers remained intact during the whole period of cultivation.

Subsequent experiments with BFGC and VERO cells showed that *E. bovis* protects its host cell also from drug-induced apoptosis. Infected cells were resistant to actinomycin D, cytochalasin B and colchicin whereas uninfected

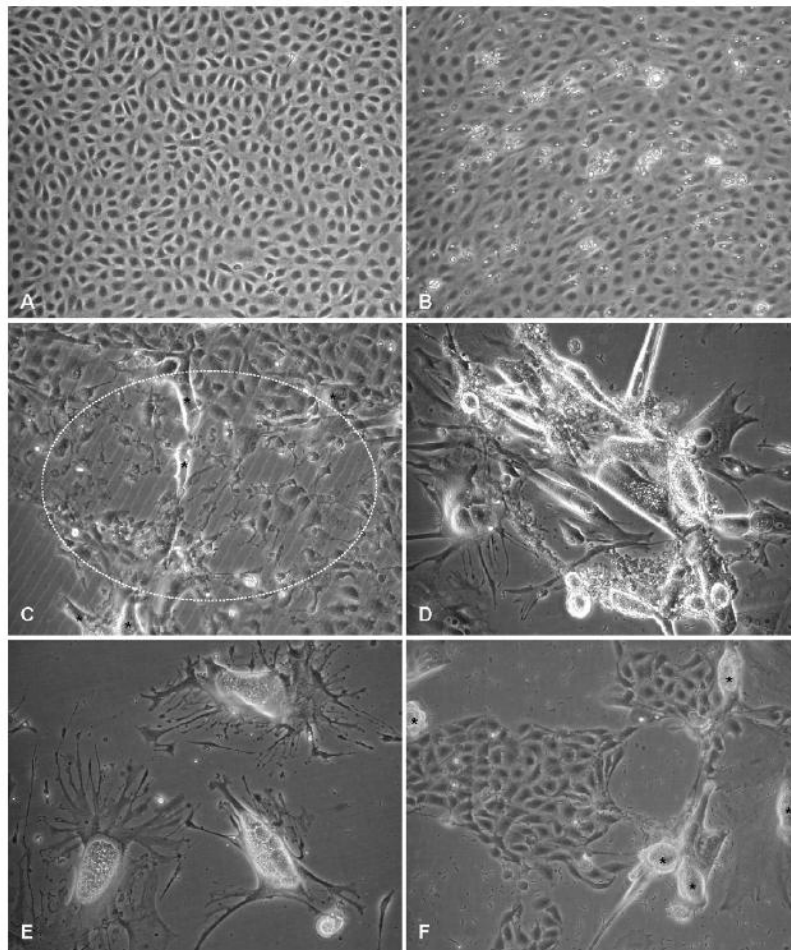


Fig. 1. *In vitro* development of *Eimeria bovis* in highly infected BUVEC. Confluent BUVEC monolayers (A) were infected with *E. bovis* sporozoites ( $2 \times 10^6$ /25 cm<sup>2</sup>). Three days after infection (B) monolayers were still intact. From day 10 p.i. onwards non-infected cells increasingly died (C, indicated by a circle), whereas cells carrying immature schizonts remained alive and showed enlargement of the host cells (C, indicated by asterisks). Whilst non-infected cells disappear, infected cells remain either as agglomerates (D, 20 days p.i.) or as single cells (E, 22 days p.i.). Thereafter, infected cells (F, indicated by asterisks) are surrounded again by proliferating, non-infected cells (magnification 200 $\times$ ).

Author's personal copy

M. Lang et al. / *Veterinary Parasitology* 160 (2009) 25–33

29

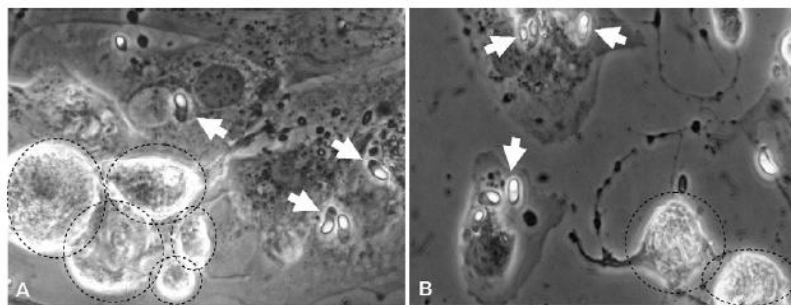


Fig. 2. Inhibition of apoptosis in *E. bovis*-infected BFGC visualized by light microscopy. *E. bovis*-infected BFGC were treated with actinomycin D (A, 3 days p.i.) or cytochalasin B (B, 5 days p.i.) to induce apoptosis. Note apoptotic, non-infected cells with "apoptotic bodies" (A, B, indicated by circles) and vital, non-apoptotic *E. bovis*-infected cells (A, B, indicated by arrows). Magnification 400 $\times$ .

cells underwent the programmed cell death (Fig. 2). Anti-apoptotic effects took place independent of whether the drugs were added 3, 5, 7 or 10 days p.i. and did obviously not depend on the further development of the parasites since infected VERO cells survived as well although *E. bovis* persists in the sporozoite stage in these host cells.

To confirm, that these observations correlated with inhibition of apoptosis in infected cells, we additionally induced apoptosis by different drugs, i.e. by actinomycin D, cytochalasin B and colchicin. Unfortunately, BUVEC were too sensitive to all these pro-apoptotic drugs so that we had to restrict these assays to VERO cells and BFGC. For both cell types we observed mainly infected cells to survive artificial induction of apoptosis (see Fig. 2).

### 3.2. TUNEL assay

In the absence of apoptotic inducers, only single cells underwent apoptosis and this was equally observed in *E.*

*bovis*-infected and non-infected BFGC and VERO cell cultures. After treatment with the pro-apoptotic drugs, the number of apoptotic cells increased strongly. However, almost exclusively uninfected cells were concerned, showing intense green fluorescence and membrane blebbing. Apoptotic bodies were common. Infected cells, detectable by orange fluorescing sporozoites, did not show any signs of apoptosis. Thus infection obviously protected the host cells from apoptosis. Protection occurred in both infected BFGC and VERO cells and was observed throughout an observation of 10 days p.i. (Fig. 3).

### 3.3. Annexin V-based apoptosis detection, caspase-3 activity- and cytochrome c release-assays

*E. bovis* infection of BFGC and VERO cell monolayers did not result in significantly reduced numbers of cells negative for superficially located phosphatidylserines after treatment with the pro-apoptotic compounds (data not

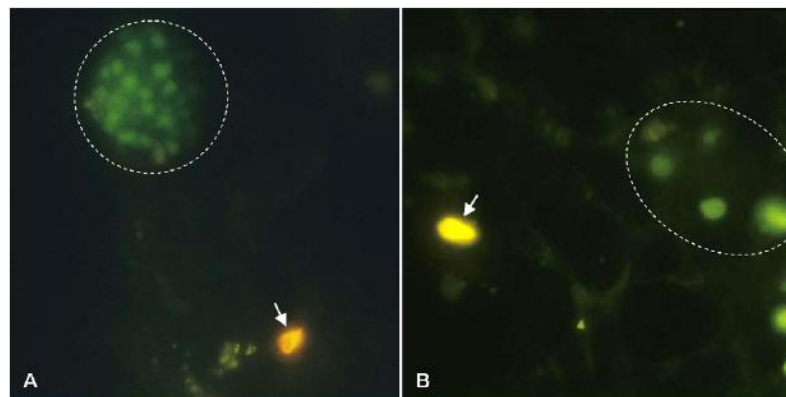


Fig. 3. Inhibition of apoptosis in *E. bovis*-infected BFGC visualized by TUNEL assays. BFGC (A) or VERO cells (B) were infected with *E. bovis* sporozoites and treated with actinomycin D 5 days p.i. to induce apoptosis. Single- and double-stranded DNA breaks (A, B, green fluorescence) indicating apoptosis were visualized by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL<sup>®</sup> assay). *E. bovis* sporozoites were detected simultaneously by the strong orange autofluorescence of the anterior and posterior refractile bodies. Note apoptotic, non-infected cells (A, B, indicated by circles) and non-apoptotic, *E. bovis*-infected cells (A, B, indicated by arrows). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Author's personal copy

30

M. Lang et al. / Veterinary Parasitology 160 (2009) 25–33

shown). Furthermore neither caspase 3 activity nor cytochrome c release differed significantly between *E. bovis* infected and uninfected BFGC and VERO cell monolayers after treatment with pro-apoptotic substances (data not shown). In all three assays we obtained reliable results for positive and negative controls.

### 3.4. Influence of *E. bovis* on the expression of apoptosis inhibition proteins

#### 3.4.1. Expression of c-IAP1

c-IAP1 is a central inhibitor of apoptosis by interfering with effector caspases and therefore may block the

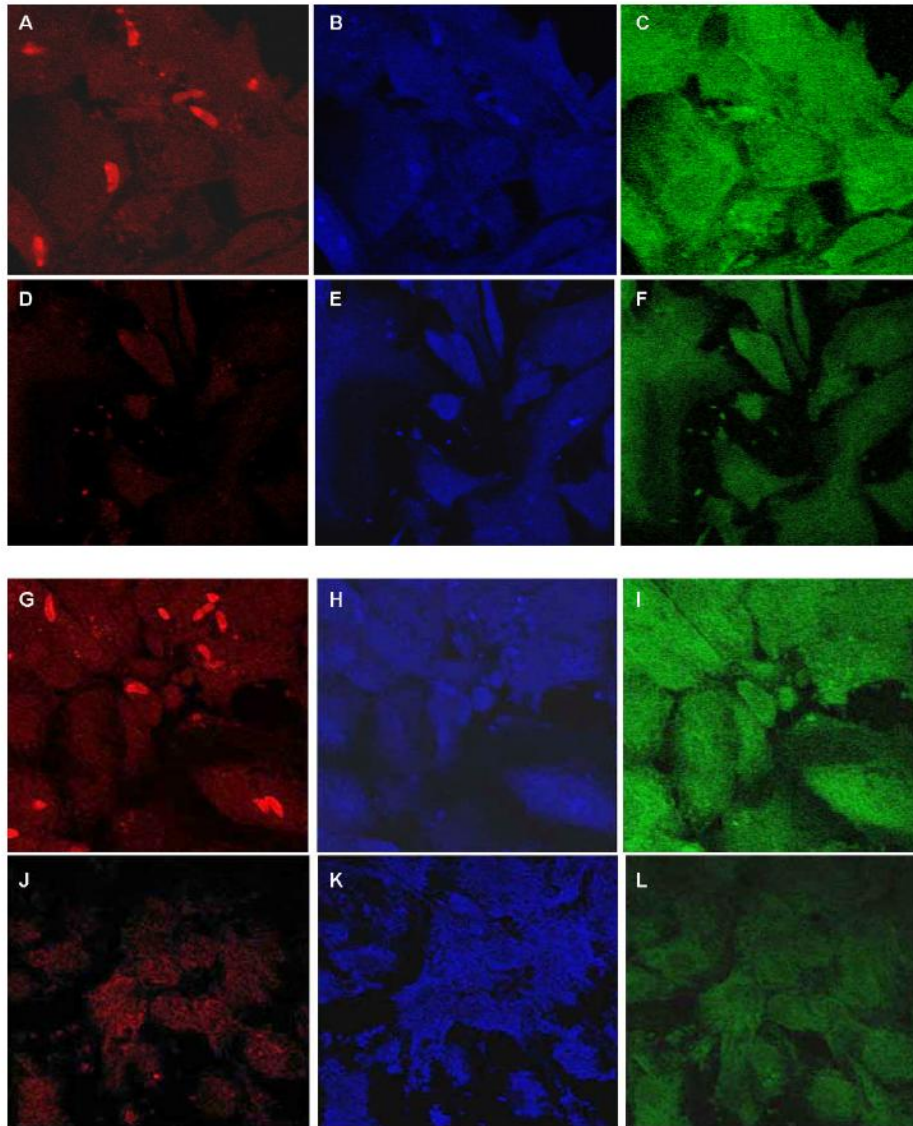


Fig. 4. Expression of c-IAP1 and c-FLIP in *E. bovis*-infected BFGC after colchicin treatment. BFGC were infected with Texas Red-stained *E. bovis* sporozoites. Apoptosis was induced in infected cells (a–c, g–i) by colchicin treatment 96 h after infection. Treatment of non-infected BFGC served as negative control (d–f, j–l). All assays were analysed by confocal laser scanning microscopy. *E. bovis* sporozoites were illustrated in red by Texas Red staining (a, d, g, j), host cell DNA was stained blue with TOTO-3 (b, e, h, k) and c-IAP1 (c, f) or c-FLIP (i, l) expression was visualized in green by the use of FITC-conjugated specific antibodies. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

programmed cell death independent of the pathway. Applying LSCM, untreated infected and untreated uninfected BFGC showed a faint staining in the green channel (Fig. 4F, L). Staining was enhanced after treatment of uninfected cells with colchicin but the fluorescence was much weaker when compared with colchicin treated infected cells (Fig. 4C, I), indicating highly increased c-IAP1 expression in infected cells and non-infected cells neighbouring *E. bovis*-infected BFGC (Fig. 5). Both infected cells and their neighbouring cells showed significantly ( $p < 0.001$ ) enhanced fluorescence when compared BFGC of uninfected monolayers.

#### 3.4.2. Expression of c-FLIP

c-FLIP blocks apoptotic processes on the level of caspase 8 activation, i.e. interferes with the receptor-mediated pathway. It was significantly ( $p < 0.001$ ) up-regulated similarly to c-IAP1 in infected colchicin treated BFGC when compared with uninfected cells (Fig. 6), however, in contrast to c-IAP1 this did not concern cells neighbouring infected BFGC.

#### 4. Discussion

The present study demonstrates that infected host cells with *E. bovis* sporozoites are protected from artificially induced apoptosis with c-FLIP and c-IAP1 being involved as anti-apoptotic proteins in this process. We initially came across the idea of parasite-promoted inhibition of host cell apoptosis based on an observation in highly *E. bovis* infected BUVEC monolayers: whilst infected endothelial cells allowed the maturation of 1st generation macromeronts and survived for up to 3 weeks, the number of non-infected endothelial cells decreased until almost all had disappeared.

Applying TUNEL<sup>®</sup> assays, we confirmed that *E. bovis*-infected host cells are protected from experimentally induced apoptosis *in vitro*. These findings seem to reflect a general evasion strategy of intracellular apicomplexa and

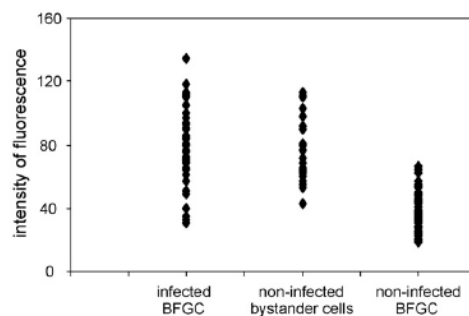


Fig. 5. Quantification of c-IAP1 expression in *E. bovis*-infected and colchicin-treated BFGC at single cell level. BFGC were infected with *E. bovis* sporozoites and treated with colchicin 96 h p.i. to induce apoptosis. The expression of c-IAP1 was detected by confocal laser scanning microscopy using c-IAP1 specific FITC-conjugated antibodies. Quantification was done on single cell level of non-infected cells, infected cells and cells neighbouring infected cells by analysing cellular fluorescence intensities using the programme Image<sup>®</sup> Quant.

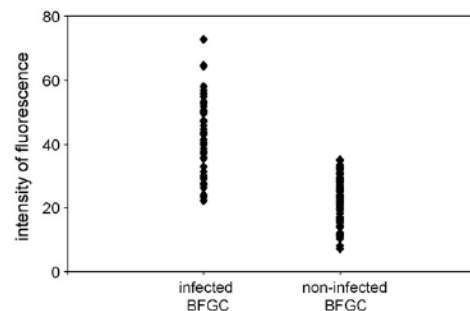


Fig. 6. Quantification of c-FLIP expression in *E. bovis*-infected and colchicin-treated BFGC at single cell level. BFGC were infected with *E. bovis* sporozoites and treated with colchicin 96 h p.i. to induce apoptosis. The expression of c-FLIP was detected by confocal laser scanning microscopy using c-FLIP specific FITC-conjugated antibodies. Quantification was done on single cell level of non-infected cell cultures and of single infected cells within *E. bovis*-infected cultures by analysing cellular fluorescence intensities using the programme Image<sup>®</sup> Quant.

are consistent with data on related parasites, such as other *Eimeria* spp. (Del Cacho et al., 2004), *T. gondii* (Nash et al., 1998; Goebel et al., 1999; Payne et al., 2003; Lüder and Gross, 2005) and *Neospora caninum* (Nishikawa et al., 2001, 2002; Herman et al., 2007).

The molecular mechanisms underlying inhibition of apoptosis induced by different intracellular protozoans are diverse. In cells infected with *Encephalitozoon* spp., for example, the inhibition of the p53-dependent apoptotic pathway was recently shown (Del Aguila et al., 2006) which results in changes in Bax or Bcl-2 expression. Infection by *Leishmania donovani* promastigotes inhibits macrophage apoptosis by the induction of TNF- $\alpha$ , GM-CSF, TGF- $\beta$  and IL-6 gene expression, implicating these soluble factors as the mediators of inhibition (Moore and Matlashewski, 1994). Here we provide evidence that cells infected with viable sporozoites of *E. bovis* are protected by enhanced expression of c-FLIP and c-IAP1, anti-apoptotic molecules involved in different apoptosis signalling pathways, i.e., the inner (Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996; Deveraux et al., 1997; Irmeler et al., 1997; Bratton et al., 2001) and the Fas/Fas ligand-dependent apoptotic pathway (Micheau et al., 2002; Scarabelli et al., 2006; Golks et al., 2006). The same molecules are involved in *Theileria parva*-induced protection of host cells (Küenzi et al., 2003). Up-regulation of c-IAP and c-FLIP may trigger constitutive activation of NF- $\kappa$ B as described for *T. gondii* (Palmer et al., 1997) or in host cells infected with second generation meronts of *E. tenella* and *E. necatrix* (Del Cacho et al., 2004). NF- $\kappa$ B was also enhanced in *E. bovis* sporozoite-infected epithelial cells (Alcala-Canto and Ibarra-Velarde, 2008), i.e., a surrogate host cell. According to our results, inhibition of host cell apoptosis early after infection appears independent of the host cell type; we assume therefore *E. bovis*-mediated up-regulation of NF- $\kappa$ B also in infected endothelial cells.

In the present case, however, the observation that both *E. bovis*-infected BFGC and VERO cells are protected from

apoptosis is of particular further interest. It shows that intracellular parasite proliferation is not a premise for anti-apoptotic effects as *E. bovis* sporozoites persist further in VERO cells for several weeks without any detectable development (Hermosilla et al., 2002).

As a general problem, however, we were not able to determine whether the anti-apoptotic parasite-driven effects start with the host cell penetration or at a definitive time p.i., because treatment with the pro-apoptotic drugs earlier than 48 h p.i. led to general spontaneous egress of most sporozoites. Obviously the parasite–host cell relationship is still rather labile early after invasion. Accordingly, Behrendt et al. (2008) could show that *E. bovis* sporozoite egress from the host cell can be mediated by calcium ionophores at least up to 24 h p.i.

In this study we were neither able to demonstrate any *E. bovis*-induced modulation of cytochrome c release and caspase 3 activity nor could we show differences in Annexin V expression on host cell surfaces between infected and uninfected cell monolayers after experimental apoptosis induction by otherwise suitable techniques. At least in the latter case, this seems confusing, because enhanced c-IAP1 expression should be linked with diminished activity of caspase 3. A plausible explanation might be that there is a critical time frame for optimal detection of caspase 3 activity reduction (Lüder, personal communication) which we possibly did not meet. However, it must be also considered that in *in vitro* infections with sporozoites of *E. bovis* the infection rates do generally not exceed 40%. In comparable studies with other parasites, e.g. *T. gondii*, considerably higher infection rates were obtained (e.g., see Goebel et al., 1998, 1999). It seems therefore possible that the rates attainable with *E. bovis* are not high enough to get reliable results by techniques which are not considering individual cells but use a whole cell population of monolayer with both infected and uninfected cells. Data obtained on a single cell basis support this assumption.

Apart from the generally anti-apoptotic effects of intracellular parasites it should, however, not be overlooked that also an ability of apicomplexa to promote host cell apoptosis is known. As such, upon complete maturation of *E. tenella* and *E. necatrix* meronts infected host cells lack expression of anti-apoptotic factors, suggesting that the parasites then initiate host cell apoptosis in order to promote the release of merozoites (Del Cacho et al., 2004). Also other apicomplexa exhibit dual ability to inhibit or to promote the host cell apoptosis in this sense, as seen for *T. gondii* and *P. berghei* (for review see Lüder et al., 2001; Van de Sand et al., 2005). In our case we abandoned corresponding studies because there are crucial structural differences between, e.g. meronts of *T. gondii* and mature macromeronts of *E. bovis*. In particular in the latter species macromeronts develop within 2 weeks or even more and are surrounded by extensive, compact layers of cytoskeleton elements (Hermosilla et al., 2008). The mode by which the merozoites of *E. bovis* egress from this kind of “encapsulation” is not yet known, however, at least the egress cannot be induced by Ca<sup>++</sup> ionophore treatment as it is possible in the case of mature *T. gondii* and *N. caninum* meronts (Behrendt et al., 2008). However, this does not

explain the observation done in *E. bovis*-infected BUVEC where apoptosis in uninfected cells neighbouring infected ones occurred, a finding which might be interpreted as a contribution factor to the pathogenesis of *E. bovis* coccidiosis.

In summary our data show that *E. bovis* protects its host cell from apoptosis by interfering with both, the inner and the Fas/ligand-mediated apoptosis signalling pathway by increasing the expression of the anti-apoptotic factors c-IAP1 and c-FLIP. Ongoing investigations are needed to identify other triggering factors as well as parasite-derived molecules involved in this modulatory process.

#### Acknowledgements

We are indebted to A. Koch (University of Veterinary Medicine, Hannover) for the kind supply of bovine umbilical cords. We further acknowledge B. Hoffmann and B. Reinhardt for their excellent technical assistance in cell cultures. This work was supported by the German Research Foundation (DFG, project TA 291/1-1).

#### References

- Alcala-Canto, Y., Ibarra-Velarde, F., 2008. Cytokine gene expression and NF-kappaB activation following infection of intestinal epithelial cells with *Eimeria bovis* and *Eimeria alabamensis* in vitro. *Parasite Immunol.* 30, 175–179.
- Behrendt, J.H., Clauss, W., Zahner, H., Hermosilla, C., 2004. Alternative mechanism of *Eimeria bovis* sporozoites to invade cells *in vitro* by breaching the plasma membrane. *J. Parasitol.* 90 (5), 1163–1165.
- Behrendt, J.H., Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2008. Studies on synchronous egress of coccidian parasites (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187. *Vet. Res. Commun.* 32, 325–332.
- Bratton, S.B., Walker, G., Sriniasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., Cohen, G.M., 2001. Recruitment activation and retention of caspase-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* 20, 998–1009.
- Caamaño, J., Tato, C., Cai, G., Villegas, E.N., Speirs, K., Craig, L., Alexander, J., Hunter, C.A., 2000. Identification of a role for NF-κB2 in the regulation of apoptosis and in maintenance of T cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 165, 5720–5728.
- Camen, J.C., Hardi, L., Sinai, A.P., 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell. Microbiol.* 8 (2), 301–315.
- Chen, X.M., Gorges, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N., 1999. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in epithelia by a Fas/Fas ligand dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* 277, G599–G608.
- Chen, X., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V., Larusso, N.F., 2001. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor κB in biliary epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 120, 1774–1783.
- Dauguschies, A., Bürger, H.J., Akimura, M., 1998. Apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance during experimental infection of calves with *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 77, 93–102.
- Dauguschies, A., Najdrowski, M., 2005. Eimeriosis in cattle: current understanding. *J. Vet. Med.* 52, 417–427.
- Del Aguila, C., Izquierdo, F., Granja, A.G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, S., Revilla, Y., 2006. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int. J. Parasitol.* 36, 869–876.
- Del Cacho, E., Gallego, M., López-Bemad, F., Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., 2004. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Vet. Parasitol.* 125, 287–300.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1997. X-linked IAPs direct inhibitor of cell-death apoptosis. *Nature* 388, 300–304.
- Doolan, D.L., Hoffman, S.L., 2000. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *J. Immunol.* 165, 1453–1462.

## Author's personal copy

M. Lang et al. / Veterinary Parasitology 160 (2009) 25–33

33

- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clen, R.J., van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M., Thompson, C.B., 1996. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus IAP gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15, 2685–2694.
- Fiege, N., Klatte, D., Kolmann, D., Zahner, H., Bürger, H.J., 1992. *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol. Res.* 78, 32–38.
- Fisch, S., Gray, S., Heyman, S., Haldar, S.M., Wang, B., Pfister, O., Cui, L., Kumar, A., Lin, Z., Sen-Banerjee, S., Das, H., Peterson, C.A., Mende, U., Burleigh, B.A., Zhu, Y., Pinto, Y., Liao, R., Jain, M.K., 2007. Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (17), 7074–7079.
- Frias, M.A., Rebsamen, M.C., Gerber-Wicht, C., Lang, U., 2007. Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: a role in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 73 (1), 57–65.
- Goebel, S., Lüder, C.G., Lugert, R., Bohne, R., Gross, U., 1998. *Toxoplasma gondii* inhibits the in vitro induced apoptosis of HL-60 cells. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23, 351–356.
- Goebel, S., Lüder, C.G., Gross, U., 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from Actinomycin D-induced apoptosis. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 221–226.
- Golks, A., Brenner, D., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., 2006. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappa B activation. *J. Exp. Med.* 203, 1295–1305.
- Green, D., Reed, J., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Green, D.R., 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1–4.
- Hammond, D.M., Davis, L.R., Bowmann, L., 1964. Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves. *Am. J. Vet. Res.* 5, 303–311.
- Herman, R.K., Molestina, R.E., Sinai, A.P., Howe, D.W., 2007. The apicomplexan pathogen *Neospora caninum* inhibits host cell apoptosis in the absence of discernible NF-kappa B activation. *Infect. Immunol.* 75, 4255–4262.
- Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S., Zahner, H., 2002. Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol. Res.* 88, 301–307.
- Hermosilla, C., Schröpler, E., Stowasser, M., Eckstein-Ludwig, U., Behrendt, J.H., Zahner, H., 2008. Cytoskeletal changes in *Eimeria bovis*-infected host endothelial cells during first merogony. *Vet. Res. Commun.* 32, 521–531.
- Heussler, V.T., Machado, J.J., Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Perse, M.J., Dobbelaere, D.A., 1999. The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7312–7317.
- Heussler, V.T., Küenzi, P., Rottenberg, S., 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* 31, 1166–1176.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, B., Steiner, V., Bodner, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J., 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190–195.
- Kalousek, I., Brodská, B., Otevřelová, P., Röslová, T., 2007. Actinomycin upregulates proapoptotic protein Puma and downregulates Bcl-2 mRNA in normal peripheral blood lymphocytes. *Anticancer Drugs* 18 (7), 763–772.
- Keller, P., Schaumburg, F., Fischer, S.F., Hacker, G., Gross, U., Lüder, C.G., 2006. Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 258 (2), 312–319.
- Küenzi, P., Schneider, P., Dobbelaere, D.A., 2003. *Theileria parva*-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *J. Immunol.* 171, 1224–1231.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, G., Charton Horvat, R., Farahani, M., McLean, J., Ikeda, E., MacKenzie, A., Korneluk, R.G., 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and related family of IAP genes. *Nature* 379, 349–353.
- Lüder, C.G., Bohne, W., Soldati, D., 2001. Toxoplasmosis: a persisting challenge. *Trends Parasitol.* 17, 460–463.
- Lüder, C.G., Gross, U., 2005. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289, 219–237.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., Grutter, M.G., 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 277, 45162–45171.
- Moore, K.J., Matlashewski, G., 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 152, 2930–2937.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J., 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* 160, 1824–1830.
- Nishikawa, Y., Mishima, M., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T., 2001. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 123, 25–31.
- Nishikawa, Y., Makalam, L., Otsuka, H., Mikami, T., Nagasawa, H., 2002. Mechanisms of apoptosis in murine fibroblasts by two intracellular protozoan parasites, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 24, 347–354.
- Palmer, G.H., Machado, J.J., Fernandez, P., Heussler, V., Perinat, T., Dobbelaere, D.A., 1997. Parasite-mediated nuclear factor kappa B regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12527.
- Payne, T.M., Molestina, R.E., Sinai, A.P., 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappa B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J. Cell Sci.* 116, 4345–4358.
- Saji, K., Fukumoto, Y., Suzuki, J., Fukui, S., Nawata, J., Shimokawa, H., 2007. Colchicine a microtubule depolymerizing agent, inhibits myocardial apoptosis in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 213 (2), 139–148.
- Scarabelli, T.M., Knight, R., Stephanou, A., Townsend, P., Chen-Scarabelli, C., Lawrence, K., Gottlieb, R., Latchman, D., Narula, J., 2006. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Curr. Probl. Cardiol.* 31, 181–264.
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2006. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet. Parasitol.* 142, 214–222.
- Van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lütgehetmann, M., Pollock, J.M., Libert, C., Heussler, V.T., 2005. The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol. Microbiol.* 58 (3), 731–742.
- Wang, M.J., Liu, S., Zheng, D., 2007. Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci. Res.* 59 (1), 40–46.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Voraussetzung für hier durchgeführte Untersuchungen, war die Etablierung einer *in vitro*-Kultur für *E. bovis*. Die erarbeiteten Kulturen unter Einbeziehung von primären bovinen Endothelzellen (BUVEC, BAEC, BSLEC) sowie bovinen Epithelzellen aus dem Darm (BFGC, BCEC) liessen sich dosiert infizieren und erlaubten die Entwicklung des Parasiten bis zum Abschluss der ersten Merogonie unter Bildung von reifen Makromeronten. Beobachtungen zu sich ablösenden, unreife Meronten lassen auf eine mögliche Verbreitungsstrategie des Parasiten schließen. Die Entwicklung zum Makromeronten entspricht etwa der, die *in vivo* zu beobachten ist. Die immense Vergrößerung der Wirtszelle (> 250 µm) wird dabei offensichtlich von einer parasiten-induzierten Umgestaltung des Wirtszellzytoskeletts (u. a. Aktinfilamente und Mikrotubuli) getragen. In BFGC-Kulturen konnte zudem gelegentlich die vollständige Entwicklung der Parasiten bis zur Produktion von Oozysten beobachtet werden. In BCEC-Kulturen fand die zweite Merogonie statt.

Auf der Oberfläche von Makromeronten-tragenden Wirtszellen wurden erstmalig merozoitenspezifische, immunreaktive Komponenten ab dem Tag 7 p. i. nachgewiesen. Obwohl ihre Rolle bisher noch völlig unklar ist, lassen unsere Daten vermuten, dass diese stadienspezifischen Komponenten aus Mikronemen und Dichte Granula stammen und noch unbekannte Funktionen bei der Entwicklung einer protektiven Immunantwort haben könnten.

*E. bovis*-Sporozoitensiedeln mit Endothelzellen hochreaktive Wirtszellen, die ein breites Spektrum an pro-inflammatorischen und immunmodulatorischen Molekülen synthetisieren können. Eine erfolgreiche Entwicklung unter diesen Bedingungen setzt hochangepasste Invasions- und Evasionsstrategien von *E. bovis* voraus. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass *E. bovis*-Sporozoitensiedeln, anders als Merozoitenstadien, über einen alternativen Invasionsmechanismus verfügen, der es ihnen ermöglicht, ohne Ausbildung einer

PV durch Zellen zu migrieren. Theoretisch könnte diese Art der Zellinvasion freien *E. bovis*-Sporozoiten auf ihrer komplexen Wanderung von der mukosalen Oberfläche zu den tiefergelegenen Lymphendothelzellen dienen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *E. bovis*-Sporozoiten sowie *T. gondii*- und *N. caninum*-Tachyzoiten bis zu 24 h p. i. nach der Zugabe von Kalzium-Ionophor A23187 zum Egress aus der Wirtszelle stimuliert werden können. Jedoch ergaben sich parasitenspezifische Unterschiede in der Freisetzung der Merozoiten aus reifen Meronten nach der Applikation dieses Ionophores. Der Egress aller drei hier verwendeten Kokzidienarten ließ sich nicht durch die Zugabe von Protease-Inhibitor E64 hemmen, wie zuvor bei *Plasmodium* beschrieben. Die stadienspezifische Fähigkeit zum Egress spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der erfolgreichen Besiedlung von Wirtszellen. Insbesondere scheinen früh eingedrungene Parasiten diese Möglichkeit zu nutzen, um einem adversen intrazellulären Milieu zu entkommen.

Die Reaktionen infizierter Endothelzellen als Wirtszelle selbst können unter den Komplex der nicht-adaptativen Immunreaktionen eingestuft werden. In der Zusammenfassung zeigen alle bisherigen Studien am Endothel, dass *E. bovis* in der frühen Phase der Entwicklung zum Makromeronten im Vergleich mit den rasch proliferierenden Arten *T. gondii* und *N. caninum* in einem geringeren Maß befallene Endothelzellen aktiviert, wenn nicht sogar hemmend auf diese Wirtszelle einwirkt. Das Ausmaß der Expression sowohl von Adhäsionsmolekülen (E- und P-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) als auch der resultierenden Adhäsion von PMN blieb im Vergleich zu *T. gondii* und *N. caninum* schwächer, was insgesamt als Teil einer möglichen Evasionsstrategie gedeutet werden kann. Es ließ sich zudem zeigen, dass *E. bovis* sowohl die Transkription der entsprechenden Gene als auch die PMN-Adhäsion nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  negativ beeinflussen kann. Eine Modulation der MHC-Expression im Verlauf der

ersten Merogonie in infizierten Endothelzellen, scheint bei dagegen *E. bovis* im Gegensatz zu anderen Apicomplexa keine Rolle zu spielen.

Die Beobachtungen insgesamt deuten darauf hin, dass in *E. bovis*-infizierten Endothelzellen alle Reaktionen unterbleiben oder allenfalls auf niedrigem Niveau ablaufen, über die das nicht-adaptative Immunsystem aktiviert werden könnte. Damit und in Verbindung mit der hier nachgewiesenen Beeinträchtigung der Apoptosefähigkeit *E. bovis*-infizierter Zellen über die Induktion anti-apoptotischer Proteine (c-IAP1, c-FLIP) scheinen offensichtlich Voraussetzungen dafür gegeben zu sein, dass sich der Parasit in einem langwierigen Prozess zum Makromeronten entwickeln kann.

## 7 SUMMARY

A prerequisite for the cell- and immunobiological studies concerning parasite invasion and immunoreactions against *E. bovis* was the establishment of an *in vitro* culture system. Such *in vitro*-systems based on primary bovine endothelial cells (BUVEC, BAEC, BSLEC) as well as bovine epithelial cells of the intestine (BFGC, BCEC) were successfully established. Parasite infections could be performed in a dose-dependent manner and the cells allowed the development of mature first generation macromeronts. Observations based on the release of immature meronts from cell monolayers might be interpreted as a dissemination strategy of the parasite. The development of macromeront formation corresponded to the one seen *in vivo*. The enormous enlargement suffered by the infected host cell (> 250 µm) was combined with a rearrangement and significant increase of host cell cytoskeletal elements (amongst others actin filaments and microtubules). Occasionally, in infected BFGC cultures the complete development of *E. bovis* was achieved resulting in oocysts formation. In BCEC cultures, the second merogony was successfully completed. For the first time merozoite-specific and immunoreactive components were demonstrated at 7 days p. i. on the surface of host cells carrying macromeronts. Although the role of parasite-specific surface antigens of *E. bovis*-infected cells described here are yet completely unknown, the results of this study suggest new functions in the development of protective immunity of these highly stage-specific parasite molecules derived from micronemes and dense granules.

Sporozoites of *E. bovis* must invade highly reactive endothelial host cells, which are able to produce a wide spectrum of pro-inflammatory and immunomodulatory molecules. A successful parasitic development under such conditions implicate highly adapted invasion and evasion strategies of *E. bovis*. In this context, it was shown that sporozoites of *E. bovis*, but not merozoites, are able to infect host cells by an alternative mechanism of invasion without forming a PV and thereby traversing through cells. In theory, this alternative mode of

invasion might reflect the complex mechanism used by free sporozoites within the gut when migrating from the mucosal surface to the deeper lying lymphatic endothelial host cells.

Furthermore, it was demonstrated that the egress of intracellular sporozoites of *E. bovis* as well as tachyzoites of *T. gondii* and *N. caninum* can actively be induced until 24 h p. i. by the use of the calcium ionophore A23187. However, parasite-specific differences were observed regarding the exit of merozoites from mature meronts after the application of the ionophore. The egress of all three coccidian species used in these experiments was not affected by the protease inhibitor E64, as previously described for *Plasmodium*. The stage-specific egress capacity of the parasites could be judged as an important mechanism to establish successful infection of host cells. In particular, the recently invaded parasites seem to make use of this mechanism to escape from an adverse intracellular environment.

Reactions of infected endothelial cells themselves can be judged as innate immune responses. In this context, all studies performed so far in the endothelial system indicate that *E. bovis* induce much weaker reactions of host endothelial cells than *T. gondii* and *N. caninum* infections do, which have direct implications in the outcome of innate immune reactions. The extent of expression of adhesion molecules (E- and P-selectin, ICAM-1, VCAM-1), as well as the resulting PMN adhesion, was always lower in *E. bovis* when compared to *T. gondii* and *N. caninum*, which may be interpreted as a sort of evasion strategy. In the case of *E. bovis*, the effects of TNF- $\alpha$  stimulation on adhesion molecule gene transcription and PMN adhesion was efficiently reduced by this parasite.

The modulation of MHC expression, which has been described as an important evasion strategy for other apicomplexan parasites, was not observed during the course of *E. bovis* first merogony in infected endothelial cells, meaning that this strategy might not play a role.

Overall these observations indicate, that *E. bovis*-infected endothelial cells do not respond or at the most occurring at low levels. Additionally the capacity of *E. bovis* to inhibit the apoptosis of host cells by the expression of anti-apoptotic proteins (cIAP1, c-FLIP) apparently seem preconditions for the parasite to assess the enduring development into macromeronts.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adjogble, K. D., Mercier, C., Dubremetz, J. F., Hucke, C., Mackenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M. F., and Daubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* **34**: 1255-1264
- Allen, P. C., and Fetterer, R. H. (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites in poultry. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 58-65
- Aliberti, J. C., Machado, F. S., Souto, J. T., Campanelli, A. P., Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T., and Silva, J. S. (1999). Beta-chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **67**: 4819-4826
- Andrade, E. F., Stumbo, A. C., Monteiro-Leal, L. H., Carvalho, L., and Barbosa, H. S. (2001). Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion?. *J. Submicrosc. Cythol. Pathol.* **33**: 337-341
- Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J. C. (2004). Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *Int. J. Parasitol.* **34**: 361-368
- Augustine, P. C. (2001). Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int. J. Parasitol.* **31**: 1-8
- Augustine, P. C. and Danforth, H. D. (1984). Use of monoclonal antibodies to locate *Eimeria* sporozoites (Protozoa) in intestinal sections. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **51**: 361-362
- Bando, M., Miyake, Y., Shiina, M., Wachi, M., Nagai, K., Kataoka, T. (2002). Actin cytoskeleton is required for early apoptosis signaling induced by anti-Fas antibody but not Fas ligand in murine B lymphoma A20 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 268-274
- Bart, B. J., and Lussky, R. C. (2005). Bart syndrom with associated anomalies. *Am. J. Perinatol.* **22**: 365-369
- Beck, K. A., Buchanan, J. A., and Nelson, W. J. (1997). Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **110**: 1239-1249
- Begg, G. E., Harper, S. L., Morris, M. B., and Speicher, D. W. (2000). Initiation of spectrin dimerization involves complementary electrostatic interactions between paired triple-helical bundles. *J. Biol. Chem.* **275**: 3279-3287
- Behling-Kelly, E., and Czuprynski, C. J. (2007). Endothelial cells as active participants in veterinary infections and inflammatory disorders. *Anim. Health Res. Rev.* **8**(1): 47-58

- Behrendt, H. J., 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* and *Eimeria separata*. *Parasitol. Res.* **86**: 294-300
- Bekhti, K., and Pery, P. (1992). In vitro interactions between murine neutrophils and *Eimeria falciformis* sporozoites. *Res. Immunol.* **143**: 909-917
- Bennett, V. (1985). The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 273-304
- Bennett, V. (1990). Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol. Rev.* **70**: 1029-1065
- Bennett, V., and Gilligan, D. M. (1993). The spectrin-based membrane skeleton and micro-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 27-66
- Benouchan, M., Do Nascimento, F., Perret, G. T., and Colombo, B. M. (2006). Delivery of the bacterial nitroreductase gene into endothelial cells prolongs the survival of tumour-bearing mice by bystander mechanism. *Int. J. Oncol.* **28**(2): 457-462
- Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S. H. (2003). Myosin A tail interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J. Cell Sci.* **116**: 39-49
- Bhatia, B. B., Pande, B. P., Chauhan, P. P. S., and Arora, G. S. (1968). A study on the sporulated oocysts of twelve eimerian species in Indian buffalo (*Bolbalus bulbalis*). *Acta. Vet. Hungar.* **18**: 115-133
- Blagburn, B. L., and Todd, K. S. (1984). Pathological changes and immunity associated with experimental *Eimeria falciformis* infections in *Mus musculus*. *J. Protozool.* **31**: 556-561
- Bliss, S. K., Marshall, A. J., Zhang, Y., and Denkers, E. Y. (1999a). Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J. Immunol.* **162**: 7369-7375
- Bliss, S. K., Zhang, Y., and Denkers, E. Y. (1999b). Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *J. Immunol.* **163**: 2081-2088
- Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotii, B., Islam, K., Denoulet, P., Larcher, J. C. (2001). Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A1, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylated. *J. Biol. Chem.* **276**: 12839-12848
- Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I., and Storset, A. K. (2006). The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infect. Immun.* **74**: 953-960



- Brenier-Pinchart, M. P., Pelloux, H., Simon, J., Ricard, J., Bosson, J. L., and Ambroise-Thomas, P. (2000). *Toxoplasma gondii* induces the secretion of monocyte chemotactic protein-1 in human fibroblasts, in vitro. *Mol. Cell Biochem.* **209**: 79-87
- Bumstead, J. M., and Tomley, F. (2000). Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**: 311-321
- Bürger, H. J. (1983). *Eimeria*-Infektionen beim Rind. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **69**: 350-357
- Bürger, H. J. (1993). Infection risks in bovine Eimeriosis. 14th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 8th-13th August, Cambridge, UK, Proceedings pp244
- Burgmann, H., Hollenstein, U., Wenisch, C., Thalhammer, F., Looareesuwan, S., and Graninger, W. (1995). Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**: 32-36
- Carey, K. L., Donahue, C. G., and Ward, G. E. (2000). Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, protein-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**: 25-37
- Carlos, T. M., and Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101
- Carruthers, V. B. and Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* **73**: 114-235
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K., and Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma gondii* invasion of host cells. *Cell Microbiol.* **1**: 225-235
- Carruthers, V. B., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. (1999). Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular  $[Ca^{2+}]$  and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem.* **342**: 379-386
- Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* **31**: 421-428
- Carruthers, V. B., Hakansson, S., Giddings, O. K., and Sibley, L. D. (2000). *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect. Immun.* **68**: 4005-4011
- Carruthers, V. B., Sherman, G. D., and Sibley, L. D. (2002). The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J. Biol. Chem.* **275**: 14346-14353
- Cesbron-Delauw, M. F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R. J., Lenzen, G., Cesbron, J. Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J. P. (1989). Molecular characterization of a

- 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 7537-7541
- 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* and *in vivo*. Korean J. Parasitol. **39**: 233-240
- Chen, X., Levine, S. A., Splinter, P. L., Tietz, P. S., Ganong, A. L., Jobin, C., Gores, G. J., Paya, C. V., and Larusso, N. F. (2001). *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor  $\kappa$ B in biliary epithelial cell apoptosis. Gastroenterol. **120**: 1774-1783
- Chobatar, B., and Scholtyseck, E. (1982). Ultrastructure. In: The biology of the Coccidia (Long, P. L.), University Park Press, Baltimore, 101-155
- Chobatar, B., Danforth, H. D., and Entzeroth, R. (1993). Ultrastructural observations of host-cell invasion by sporozoites of *Eimeria papillata* *in vitro*. Parasitol. Res. **79**: 15-23
- Choi, J., Walker, J., Boichuk, S., Kirkiles-Smith, N., Torpey, N., Pober, J. S., and Alexander, L. (2005). Human endothelial cells enhance human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4+ T cells in a Nef-dependent manner *in vitro* and *in vivo*. J. Virol. **79**: 264-276
- Conlogue, G., Foreyt, W. J., and Wescott, R. B. (1984). Bovine coccidiosis: protective effects of low-level infection and coccidiostat treatments in calves. Am. J. Vet. Res. **45**: 863-866
- Cornelissen, A. W. C. A., Verstegen, R., van de Brand, H., Perie, N. M., Eysker, M., Lam, T. J. G. M., and Pijpers, A. (1995). An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. Vet. Parasitol. **56**: 7-16
- Danforth, H. D., and 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
- Danforth, H. D., Chobatar, B., and Entzeroth, R. (1984). Cellular pathology in mouse embryonic brain cells following *in vitro* penetration by sporozoites of *Eimeria papillata*. Zeitschr. Parasitenkd. **70**: 165-171
- Danforth, H. D., Entzeroth, R., and Chobatar, B. (1992). Scanning and transmission electron microscopy of host cell pathology associated penetration by *Eimeria papillata* sporozoites. Parasitol. Res. **78**: 570-573
- Daszak, P., Ball, S. J., Pittilo, R. M., and Norton, C. C. (1993). Ultrastructural evidence for dense granule exocytosis by first-generation merozoites of *Eimeria tenella* *in vivo*. Parasitol. Res. **79**: 256-258
- Dauguschies, A., Akimura, M., and Bürger, H. J. (1986). Experimentelle *Eimeria bovis* Infektionen beim Kalb: 1. Parasitologische und klinische Befunde. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **93**: 393-397

- Dauguschies, A., Bürger, H. J., and Akimura, M. (1998). Apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance during experimental infection of calves with *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* **77**: 93-102
- Dauguschies, A., and Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis in cattle: current understanding. *J. Vet. Med.* **52**: 417-427
- Deckert, M., Sedgwick, J. D., Fischer, E., and Schlüter, D. (2006). Regulation of microglial cell response in murine *Toxoplasma* encephalitis by CD 200/CD200 receptor interaction. *Acta Neuropathol.* **111**: 548-558
- Deckert-Schlüter, M., Schlüter, D., Hof, H., Wiestler, O. D., Lassmann, H. (1994). Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**: 457-468
- Deckert-Schlüter, M., Bluethmann, H., Kaefer, N., Rang, A., Schlüter, D. (1999). Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. *Am. J. Pathol.* **154**: 1549-1561
- De Matteis, M. A., and Morrow, J. S. (1998). The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 542-549
- De Souza, L. S., Lang, T., Prina, E., Hellio, R., Antoine, J. C. (1995). Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell Sci.* **108**: 3219-3231
- Deguercy, A., Hommel, M., and Schrevel, J. (1990). Purification and characterization of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* which cleave erythrocyte cytoskeleton components. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 233-244 A23187
- Del Cacho, E., Gallego, M., López-Bernad, F., Quílez, J., and Sancho-Acedo, C. (2004). Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Vet. Parasitol.* **125**: 287-300
- Denney, C. F., Eckmann, L., and Reed, S. L. (1999). Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* **67**: 1547-1552
- Devarajan, P., Stabach, P. R., De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (1997). Na, K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10711-10716
- Doolan, D. L., and Hoffman, S. L. (2000). The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *J. Immunol.* **165**: 1453-1462
- Downing, K. H., and Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 16-22

- Dubremetz, J. F. (1993). Apical organelles (rhoptries, micronemes, dense granules) and host cell invasion by coccidia: what do we know now? In. Proc. VI<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference; June 21-25, 1993, Guelph, Ontario, Canada
- Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., and Joiner, K. A. (1993). Kinetics and patterns of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. Parasitol. Res. **79**: 402-408
- Dubremetz, J. F. (1998). Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Trends Microbiol. **6**: 27-30
- Durham, P. J. K., Johnson, R. H., and Parker, R. J. (1985). Exacerbation of experimental parvoviral enteritis in calves by coccidian and weaning stress. Res. Vet. Sci. **39**: 16-23
- Dyachenko, V. (2006). Identifizierung einer Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne bei *Eimeria bovis* und Studien zu ihrer Lokalisation im Parasiten. Inaugural-Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, Germany
- Ebnet, K., and Vestweber, D. (1999). Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. Histochem. Cell Biol. **112**: 1-23
- Eller, G. (1991). *Eimeria*-Infektionen bei Kälbern: Vorkommen und Verlauf bei unterschiedlichen Haltungformen. Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen, Diss. med. vet.
- Ellison, S. P., Greiner, E., and Dame, J. B. (2001). *In vitro* culture and synchronous release of *Sarcocystis neurona* merozoites from host cells. Vet. Parasitol. **95**: 251-261
- el-Shazly, A. M., Soliman, M., el-Kalla, M. R., Rezk, H., el-Nemr, H., Handoussa, A. E., el-Aaty, H. E., and Morsy, T. A. (2001). Evaluation of soluble adhesion molecules in the diagnosis of amoebiasis, giardiasis and toxoplasmosis. J. Egypt. Soc. Parasitol. **31**: 691-700
- Endo, T., Sethi, K. K., and Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. Exp. Parasitol. **53**: 179-188
- Ernst, J. V., and Benz, G. W. (1981): Coccidiosis. In: Ristic, M., and Intyre, M. C. (eds.), Diseases of cattle in the tropics: 377-392
- Ernst, J. V., and Benz, G. W. (1986). Intestinal coccidiosis in cattle. Vet. Clinic of North America Food Animal Practice **2**: 283-290
- Faber, J. E. (2000). Untersuchungen zur genetischen Variation von *Eimeria*-Erstinfektionen bei Kälbern. Justus-Liebig-Universität Giessen, Diss. med. vet.
- Faber, J. E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Bürger, H. J., and Zahner, H. (2002). *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst

- excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Vet. Parasitol.* **104**: 1-17
- Fanta, J. (1967). Klinische Beobachtungen bei der Kokzidiose von Jungrindern und Kälbern. *Wien. tierärztl. Mschr.* **54**: 619-623
- Fayer, R. (1989). Epidemiology and control of bovine coccidiosis. In Yvoré, P. (ed.), *Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France, 17-20 October 1989. Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs*, I. N. R. A. Publ.: 445-456
- Feng, H., Nie, W., Bonilla, R., Widmer, G., Sheoran, A., Tzipori, S. (2006). Quantitative tracking of *Cryptosporidium* infection in cell culture with CFSE. *J. Parasitol.* **92**: 1350-1354
- Fernando, M. A. (1990). *Eimeria*: Infections of the intestine. In: Long, P. L. (ed.), *Coccidiosis of man and domestic animals*, CRC Press, Boca Raton, Florida: 63-75
- Fiege, N., Klatte, D., Kollmann, D., Zahner, H., and Bürger, H. J. (1992). *Eimeria bovis* in cattle: colostrum transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol. Res.* **78**: 32-38
- Fitzgerald, P. R. (1967). Results of continuous low-level inoculations with *Eimeria bovis* in calves. *Am. J. Vet. Res.* **28**: 659-665
- Fitzgerald, P. R. (1975). The significance of bovine coccidiosis as a disease in the United States. *Bovine Pract.* **11**: 28-33
- Fitzgerald, P. R., and Mansfield, M. E. (1972). Effects of bovine coccidiosis on certain blood components, feed consumption and body weight changes of calves. *Am. J. Vet. Res.* **33**: 1391-1397
- Föllmann, W., Weber, S., and Birkner, S. (2000). Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicol. In Vitro* **14**: 435-445
- Forney, J. R., DeWall, D. B., Yang, S., Speer, C. A., and Healy, M. C. (1999). A role for host phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal remodelling during *Cryptosporidium parvum* infection. *Inf. Immun.* **67**: 844-852
- Fox, J. E. (1978). Bovine coccidiosis. *Mod. Vet. Pract.* **59**: 599-603
- Fox, J. E. (1985). Coccidiosis in cattle. *Mod. Vet. Pract.* **66**: 113-116
- Fox, J. E. (1987). Coccidiosis: a growing concern. *Bovine Pract.* **22**: 158-159
- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U., and Presky, D. H. (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 495-521
- Ghazali, M., Rodier, M. H., el Moudni, B. E., Babin, P., Fernandez, B., and Jacquemin, J. L. (1995). Detection and immunolocalization of human erythrocyte spectrin

- immunoanalogues in *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Parasite). J. Euk. Microbiol. **42**: 427-433
- Goebel, S., Lüder, C. G., and Gross, U. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from Actinomycin D-induced apoptosis. Med. Microbiol. Immunol. **187**: 221-226
- Giunchetti, R. C., Martins-Filho, O. A., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Marques, M. J., Tafuri, W. L., Corrêa-Oliveira, R., and Reis, A. B. (2007). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. (PMID: 17723246)
- Graat, E. A. M., Henken, A. M., Ploeger, H. W., Noordhuizen, J. P. T. M., and Vertommen, M. H. (1994). Rate and course of sporulation of *Eimeria acervulina* under different environmental conditions. Parasitology **108**: 497-502
- Gräfner, G., Graubmann, H. D., and Kron, A. (1978). Zur Epizootiologie der Rinderkokzidiose in Aufzucht und Mastbetrieben. Monatshefte Vet. Med. **33**: 910-912
- Gräfner, G., and Graubmann, H. D. (1979). Betrachtung zur Pathogenität von *Eimeria*-Arten am Beispiel der Rinderkokzidiose. Angew. Parasitol. **20**: 202-209
- Gräfner, G., Graubmann, H. D., Schwartz, K., Hiepe, T., and Kron (1985). Weitere Untersuchungen zu Vorkommen, Epizootiologie und Bekämpfung der *Eimeria*-Kokzidiose des Rindes unter den Bedingungen der intensiven Stallhaltung. Monatshefte Vet. Med. **40**: 41-44
- Gregory, M. W. (1989). Epidemiology and control of ovine coccidiosis. In: Yvoré, P. (ed.), Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France 17-20 October 1989. Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, I. N. R. A. Publ.: 409-418
- Halonen, S. K., and Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. J. Eur. Microbiol. **41**: 65-71
- Halonen, S. K., Weiss, L. M., and Chiu, F. C. (1998). Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes. Int. J. Parasitol. **28**: 815-823
- Hammond, D., Bowman, G. W., Davis, L. R., and 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., and Miner, M. L. (1963). The occurrence of a second generation in the life cycle of *Eimeria bovis* in calves. J. Parasitol. **49**: 428-434
- Hammond, D. M., Davis, L. R., and Bowmann, L. (1964). Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves. Am. J. Vet. Res. **5**: 303-311
- Hammond, D. M., and Fayer, R. (1967). In vitro cultivation of *Eimeria bovis*. J. Parasitol. **14** [Suppl]: 23

- Hammond, D. M., and Fayer, R. (1968). Cultivation of *Eimeria bovis* in three established cell lines and in bovine tracheal cell line culture. *J. Parasitol.* **54**: 559-568
- Hammond, D. M., Fayer, R., Miner, L. M. (1969). Further studies and attempts on in vitro development of *Eimeria bovis* and attempts to obtain second-generation schizonts. *J. Protozool.* **16**: 298-302
- Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A. H., and Mizuno, A. (2002). *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* **100**: 1048-1054
- Hermosilla, C., Bürger, H. J., Zahner, H. (1999). T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Vet. Parasitol.* **84**: 49-64
- Heussler, V. T., Machado, J. J., Fernandez, P. C., Botteron, C., Chen, C. G., Perse, M. J., and Dobbelaere, D. A. (1999). The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7312-7317
- Heussler, V. T., Küenzi, P., and Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* **31**: 1166-1176
- Hisaeda, H., Nagasawa, H., Maeda, K., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Ito, Y., Good, R. A., Himeno, K. (1995). Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune response against infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **155**: 244-251
- Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Good, R. A., and Himeno, K. (1997). Heat shock protein 65 induced by gamma delta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **159**: 2375-2381
- Hoff, E. F. and Carruthers, V. B. (2002). Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends Parasitol.* **18**: 251-255
- Holleran, E. A., and Holzbaur, E. L. (1998). Speculating about spectrin: new insights into the Golgi-associated cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **8**: 1379-1385
- Hughes, H. P., Whitmire, W. M., and Speer, C. A. (1989). Immunity patterns during acute infection by *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.* **75**: 86-91
- Ibarra-Velarde, F., and Alcala-Canto, Y. (2007). Downregulation of the goat  $\beta$ -defensin-2 gene by IL-4 in caprine intestinal epithelial cells infected with *Eimeria* spp. *Parasitol. Res.* **101**: 613-618
- Joiner, K. A. (1991). Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. *Parasitol. Today* **7**: 226-227
- Khan, I. A., MacLean, J. A., Lee, F. S., Casciotti, L., DeHaan, E., Schwatzman, J. D., and Luster, A. D. (2000). IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity* **12**: 483-494

- Klevar, S., Kulberg, S., Boysen, P., Storset, A. S., Moldal, T., Björkman, C., Olsen, I. (2007). Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int. J. Parasitol.* **37**: 329-339
- Knook, D. L., Blansjaar, N., and Sleyster, E. C. (1977). Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from rat liver. *Exp. Cell Res.* **109**: 317-329
- Kogut, M. H. (1990). Host specificity of the coccidian. In: Long, P. L. (ed.), *Coccidiosis of man and domestic animals*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 43-62
- Kollmann, D. (1993). *Eimeria*-Infektionen bei Kühen und ihren Kälbern während der peripartalen Phase. Justus-Liebig-Universität Giessen, Diss. med. vet.
- Kreis, T. E. (1990). Role of microtubules in the organization of the Golgi apparatus. *Cell Motil Cytoskel.* **15**: 67-70
- Kreitzer, G., Liao, G., and Gundersen, G. G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1105-1118
- Küenzi, P., Schneider, P., Dobbelaere, D. A. E. (2003). *Theileria parva*-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/fas ligand-induced apoptosis. *J. Immunol.* **171**: 1224-1231
- Laurent, F., Eckmann, L., Savidge, T. C., Morgan, G., Theodos, C., Naciri, M., Kagnoff, M. F. (1997). *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun.* **65**: 5067-5073
- Le Bonniec, S., Deregnacourt, C., Redeker, V., Banerjee, R., Grellier, P., Goldberg., D. E., and Schrevel, J. (1999). Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **274**: 14218-14223
- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A., and Cesbron-Delauw, M. F. (1993). Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 143-153
- Levine, N. D. (1970). Taxonomy of sporozoa. *J. Parasitol.* **56**: 208
- Levine, N. D., and Ivens, V. (1970). The Coccidian parasite (*Protozoa, Sporozoa*) of ruminants. *Illinois Biol. Monogr.* **44**: 48-55, University of Illinois Press, Urbana, Chicago, and London
- Levine, N. D., and Ivens, V. (1986). The Coccidian Parasites (Protozoa, Apicomplexa) of Artiodactyla. *Illinois Biol. Monogr.* **55**, University of Illinois Press, Urbana and Chicago.



- Lima, M. F., Zhang, Y., and Villalta, F. (1997). Beta-chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. *Cell Mol. Biol.* **43**: 1067-1076
- Lingelbach, K. (2001). Life in vacuoles- a startegy for parasite survival. *Int. J. Parasitol.* **31**: v-vi
- Lippincott-Schwartz, J. (1998). Cytoskeleton proteins and Golgi dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 52-59
- Lüder, C. G., Lang, T., Beuerle, B., and 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., and Gross, U. (2001). *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1475-1484
- Lüder, C. G., and Gross, U. (2005). Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **289**: 219-237
- Ma, W., and Pober, J. S. (1998). Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **161**: 2158-2167
- Marshall, R. N., Catchpole, J., Green, J. A., and Webster, K. A. (1998). Bovine coccidiosis in calves following turnout. *Vet. Rec.* **143**: 366-367
- Matthews, G., and Allen, M. (2005). Epidermolysis bullosa in cattle in the UK. *Vet. Rec.* **157**: 456
- Methe, H., and Edelman, E. R. (2006). Tissue engineering of endothelial cells and the immune response. *Transplant. Proc.* **38**(10): 3293-3299
- McNeil, P. L., Clarke, M. F. S., and Miyake, K. (1999). Cell wound assays. In: *Current protocols in cell biology*, Bonifacino, I. J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schartz, J., and Yamada, K. M. (eds.). Wiley, New York, pp. 12.4.1-12.4.15
- McQuiston, T. E., and Schurr, K. M. (1978). The effect of *Eimeria nieschulzi* infection on leukocytes levels in the rat. *J. Protozool.* **25**: 374-377
- Mele, R., Gomez Morales, M. A., Tosini, F., and Pozio, E. (2004). *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect. Immun.* **72**: 6061-6067
- Mesfin, G. M., Bellamy, J. E., and Stockdale, P. H. (1978). The pathology changes caused by *Eimeria falciformis var pragensis* in mice. *Can. J. Comp. Med.* **42**: 496-510

- Moll, H. (1997). The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Inst. Mittl.* 73-78
- Mondragon, R., and Frixione, E. (1996). Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**: 120-127
- Moore, K. J., and Matlashewski, G. (1994). Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* **152**: 2930-2937
- Mordue, D. G., and Sibley, L. D. (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* **159**: 4452-4459
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., and Sibley, L. D. (1999a). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* **190**: 1783-1792
- Mordue, D. G., Hakansson, S., Niesman, I., and Sibley, L. D. (1999b). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp. Parasitol.* **92**: 87-99
- Morris, M. T., Coppin, A., Tomavo, S., and Carruthers, V. B. (2002). Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor I. *J. Biol. Chem.* **277**: 45259-45266
- Mota, M. M., and Rodriguez, A. (2000). *Plasmodium yoelii*: efficient *in vitro* invasion and complete development of sporozoites in mouse hepatic cell lines. *Exp. Parasitol.* **96**: 257-259
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C. R., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodriguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* **291**: 141-144
- Mota, M. M., Rodriguez, A. (2001). Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Inf.* **3**: 1123-1128
- Mota, M. M., and Rodriguez, A. (2002). Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *BioEssays* **24**: 149-156
- Moudy, R., Manning, T. J., and Beckers, C. J. (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **276**: 41492-41501
- Naginei, C. N., Detrick, B., and Hooks, J. J. (2000). *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**: 407-410
- Nash, P. B., Purner, M. B., Leon, R. P., Clarke, P., Duke, R. C., and Curiel, T. J. (1998). *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* **160**: 1824-1830

- Natsuga, K., Akiyama, M., Sato-Matsumura, K. C., Tsuchida, K., and Shimizu, H. (2005). Two cases of atypical melanocytic lesions in recessive dystrophic epidermolysis bullosa in infants. *Clin. Exp. Dermatol.* **30**: 636-639
- Neubauer, K., Knittel, T., Aurisch, S., Fellmer, P., and Ramadori, G. (1996). Glial fibrillary acidic protein-a cell type specific marker for Ito cells *in vivo* and *in vitro*. *J. Hepatol.* **24**: 719-730
- Nichols, B. A., and O'Conner, G. R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab. Invest.* **44**: 324-335
- Nichols, B. A., and Rodriguez, A. (2001). Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Infect.* **3**: 1123-1128
- Nishikawa, Y., Mishima, M., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., and Mikami, T. (2001). Interferon gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* **123**: 25-31
- Oliver, R. A., and 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
- Ovington, K. S., and Smith, N. C. (1992). Cytokines, free radicals and resistance to *Eimeria*. *Parasitol. Today* **8**: 422-426
- Ovington, K. S., Alleva, L. M., and Kerr, E. A. (1995). Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *Int. J. Parasitol.* **25** : 1331-1351
- Palmer, G. H., Machado, J. J., Fernandez, P., Heussler, V., Perinat, T., and Dobbelaere, D. A. (1997). Parasite-mediated nuclear factor  $\kappa$ B regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12527
- Pavlassek, J., Celeda, L., Urbanova, Z., Cerny, J., and Raskova, H. (1984). Coccidiosis in periruminating calves. The effects of management and short term treatment on the spread of infection and reinfection. *Exp. Parasitol.* **14**: 7-12
- Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1991). Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Adv. Immunol.* **50**: 261-302
- Pellerdy, L. P. (1974). *Coccidia and Coccidiosis*. Verlag Paul Parey, Berlin, 2. Auflage: 723-761
- Perkins, M. E. (1992). Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol. Today* **8**: 28-32
- Radeke, H. H., Ludwig, R. J., and Boehncke, W. H. (2005). Experimental approaches to lymphocyte migration in dermatology *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Dermatol.* **14**: 641-666

- Radostits, O. M. (1994). Diseases caused by protozoa: coccidian. In: Radostits, O. M., Blood, D. C., and Gay, C.C (eds.), *Veterinary Medicine, A textbook of the diseases in cattle, sheep, pigs and horses*, Bailliere Tindall, London, 8<sup>th</sup> edition: 1181-1191
- Reduker, D. W., and Speer, C. A. (1986). Antigens of in vitro-produced first generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). *J. Parasitol.* **72**: 782-785
- Reduker, D. W., and Speer, C. A. (1987). Effects of sporozoite inoculum size on in vitro production of merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). *J. Parasitol.* **73**: 427-430
- Roberts, W. L., and Hammond, D. M. (1970). Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoite of four *Eimeria* species. *J. Protozool.* **17**: 76-86
- Roberts, W. L., Speer, C. A., and Hammond, D. M. (1971). Penetration of *Eimeria larimerensis* sporozoites into cultured cells as observed with the light and electron microscopes. *J. Parasitol.* **57**: 615-625
- Rommel, M. (1992). Protozoen. In: Eckert, J., Kutzer, E., Rommel, M., Bürger, H. J., and Körting, W. (eds.), *Veterinärmedizinische Parasitologie*, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 4 Auflage: 109-173
- Rose, M. E. (1988). *Eimeria*, *Isospora* and *Cryptosporidium*. In: Soulsby, E. J. L. (ed.), *Immune responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*, Volume III: Protozoa, CRC Press, Boca Raton, Florida: 275-312
- Rose, M. E., Lawn, A. M., and Millard, B. J. (1984). 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
- Rosenberg, B., Juckett, D. A., Aylsworth, C. F., Dimitrov, N. V., Ho, S. C., Jdge, J. W., Kessel, S., Quensen, S., Wong, K. P., Zlatkin, I., Zaltkin, T. (2005). Protein from intestinal *Eimeria* protozoan stimulates IL-12 release from dendritic cells, exhibits antitumor properties *in vivo* and is correlated with low intestinal tumorigenicity. *Int. J. Cancer.* **114**: 756-765
- Salmon, B. L., Oksman, A., and Goldberg, D. E. (2001). Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 271-276
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today* **12**: 308-316
- Scharton-Kersten, T. M., Yap, G., Magram, J., Sher, A. (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* **185**: 1261-1273
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., and Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 509-513

- Shi, M. Q., Huther, S., Burkhardt, E., and Zahner, H. (2000). Immunity in rats against *Eimeria separata*: oocyst excretion, effects on endogenous stages and local tissue response after primary and challenge infections. *Parasitol. Res.* **86**: 891-898
- Shi, M. Q., Huther, S., Burkhardt, E., and Zahner, H. (2001a). Lymphocyte subpopulations in the caecum mucosa of rats after infections with *Eimeria separata*: early response in naïve and immune animals to primary and challenge infections. *Int. J. Parasitol.* **31**: 49-55
- Shi, M. Q., Hirzmann, J., Dafa'alla, T. H., and Zahner, H. (2001b). In vivo expression profiles of cytokine and iNOS mRNAs in rats infected with *Eimeria separata*. *Vet. Parasitol.* **97**: 131-140
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Asai, T., and Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **79**: 301-311
- Soni, S., Dhawan, S., Rosen, K. M., Chafel, M., Chishti, A. H., and Hanspal, M. (2005). Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell. *Blood Cells Mol. Dis.* **35**: 201-211
- Speer, C. A., Davis, L. R., and Hammond, D. M. (1971). Cinematographic observations of the development of *Eimeria larimerensis* in cultured bovine cells. *J. Protozool.* **18**:11
- Speer, C. A., and Hammond, D. M. (1973). Development of second-generation schizonts, gamonts and oocysts of *Eimeria bovis* in bovine kidney cells. *Z. Parasitenkd.* **42**: 105-113
- Speer, C. A., Reduker, D. W., Burgess, D. E., Whitmire, W. M., and Splitter, G. A. (1985). Lymphokine-induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultured bovine monocytes. *Infect. Immun.* **50**: 566-571
- Speer, C. A., Dubey, J. P., Blixt, J. A., Prokop, K. (1997). Time lapse video microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles, and the transformation of sporozoites to tachyzoites of the VG strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **83**: 565-574
- Soldati, D., and Meissner, M. (2004). *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **16**: 32-40
- Stankewich, M. C., Tse, W. T., Peters, L. L., Ch'ng, Y., Jhn, K. M., Stabach, P. R., Devarajan, P., Morrow, J. S. and Lux, S. E. (1998). A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14158-14163
- Steinert, P. M., and Roop, D. R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 593-625
- Stockdale, P. H. G., Bainborough, A., R., Bailey, C. B., and Niilo, L. (1981). Some pathophysiological changes associated with infection of *Eimeria zuernii* in calves. *Can. J. Comp. Med.* **45**: 34-37

- Stommel, E. W., Kenneth, H. E., Schwartzmann, J. D., and Ksaper, L. H. (1997). *Toxoplasma gondii*: dithiol-induced  $\text{Ca}^{2+}$  flux caused egress of parasite from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **87**: 88-97
- Storset, A. K., Kulberg, S., Berg, I., Boysen, P., Hope, J. C., and Dissen, E. (2004). NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur. J. Immunol.* **34**: 669-676
- Stromberg, B. E., Schotthaller, J. E., Armstrong, B. D., Brandt, W. E., and Liss, C. (1982). Efficacy of lasalocid sodium against coccidiosis (*Eimeria zuernii* and *Eimeria bovis*) in calves. *Am J. Vet. Res.* **43**: 583-585
- Sumitran-Holgersson, S., Brevig, T., Widner, H., and Holgersson, J. (2003). Activated porcine embryonic brain endothelial cells induce a proliferative human T-lymphocyte response. *Cell Transplant.* **12**: 637-646
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and Ward, G. E. (1996). *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 2014-2019
- Svensson, C., Hooshmand-Rad, P., Pehrson, B., Törnquist, M., and Uggla, A. (1993). Excretion of *Eimeria*-oocysts in calves during their first weeks after turn-out to pasture. *Acta Vet. Scand.* **34**: 175-182
- Svensson, C., Uggla, A., and Pehrson, B. (1994). *Eimeria alabamensis* infection as a course of diarrhoea in calves at pasture. *Vet. Parasitol.* **53**: 33-43
- Svensson, C. (2000). Excretion of *Eimeria alabamensis* oocysts in grazing calves and young stock. *J. Vet. Med. B* **47**: 105-110
- Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., and Oppenheim, J. J. (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* **117**: 1809-1814
- Taubert, A., Sühwold, A., Hermosilla, C., and Zahner, H. (2004). T cell proliferation and cytokine gene transcription in *Eimeria bovis* infected calves. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 65
- Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., and Engel, P. (1995). The selectins. Vascular adhesion molecules. *Faseb J.* **9**: 866-873
- Thome, M., and Tschopp, J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.* **1**: 50
- Tomley, F. M., and Soldati, D. S. (2001). Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* **17**: 81-88
- Trinchieri, G. (1998). Proinflammatory and immunoregulatory functions of IL-12. *Int. Rev. Immunol.* **16**: 365-396

- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* **8**: 668-678
- Van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lütgehetmann, M., Pollock, J. M., and Heussler, V. T. (2005). The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol. Microbiol.* **58**: 731-742
- von Andrian, U. H., and Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1020-1034
- Wagner, J. G., and Roth, R. A. (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* **52**: 349-374
- Weinandy, H. (1989). Langzeitstudie zur Epizootiologie von Kokzidieninfektionen bei stallgehaltenen Kälbern und Jungrindern. Justus-Liebig-Universität Giessen, Diss. med. vet.
- Williams, G. T. (1994). Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol.* **2**: 463-464
- Wu, M. H., and Yung, B. Y. (1994). Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *Eur. J. Pharmacol.* **270**: 203-212
- Yamikoff, W. L. (1935). Les coccidies des bovidés domestique et demisauvage. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **15**: 606-607
- Yang, G. X., and Hagmann, W. K. (2003). VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocytes migration. *Med. Res. Rev.* **23**: 369-392
- Yeoh, S., O'Donnell, R. A., Koussis, K., Dluzewski, A. R., Ansell, K. H., Osborne, S. A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G. H., Bannister, L. H., Bryans, J. S., Kettleborough, C. A., and Blackman, M. J. (2007). Subcellular discharge of serine protease mediates release of invasive malaria parasites from erythrocytes. *Cell*, **131**: 1072-1083
- Yvoré, P., and Lafont, J. P. (1992). Interactions between gut flora and coccidian. *J. Protozool.* **39**: 28-34





## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Zahner als meinem akademischen Mentor im besten Sinne des Wortes. Er hat mich jahrelang mit seiner konstruktiven Diskussionsbereitschaft unterstützt und entscheidend zum Gelingen dieser wissenschaftlichen Arbeit beigetragen.

Mein vordringlicher Dank gilt meiner Ehefrau und Kollegin Frau Dr. Anja Taubert, die mich über die vielen Jahre fachlich und organisatorisch unterstützt hat. Sie hat es vermocht ein gesundes Gleichgewicht zwischen wissenschaftlicher Arbeit und Privatleben zu schaffen, so dass mir die Verfolgung meiner Habilitation möglich war. Insbesondere danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchsicht, der Formatierung und dem Druck der Habilitationsschrift, für ihre kritische Betrachtungsweise und vor allem Ihre unendliche Geduld mit mir.

Weiterhin danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Christian Bauer für seine vielen wertvollen Ratschläge, langen Diskussionsabende am Institut und sein offenes Ohr bei vielen Fragen und Problemen.

Ganz herzlich möchte ich Frau Brigitte Hofmann, Frau Christina Scheld, Frau Birgit Reinhardt und Frau Christine Henrich für ihr Engagement und ihre zuverlässige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und vor allem für die nette Atmosphäre im Labor danken.

An dieser Stelle möchte ich zudem allen restlichen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie in Giessen dafür danken, dass ich dort jahrelang unter solch freundlicher Atmosphäre meine wissenschaftliche Arbeit verrichten konnte.

Ein Großteil der Arbeiten wurde erst durch die Mitwirkung einer Reihe von Personen möglich, deren angenehme und engagierte Art immer für ein produktives Klima gesorgt haben. An dieser Stelle möchte ich Frau Dr. Andrea Heise, Frau Dr. Barbara Barbisch, Frau Dr. Sabine Kowalik, Herrn Dr. Jan Hillern Behrendt, Herrn Dr. Ahmed Badawy, Herrn Dr. Elmar Schröpfer, Frau Dr. Ursula Eckstein-Ludwig, Herrn Michael Stowasser, Herrn PD Dr. Christian Menge, Frau Dr. Ivonne Stamm, Frau Dr. Mirjam Lang, Frau Kathleen Lutz, Herrn Dr. Viktor Dyachenko, Herrn Prof. Dr. Michael Kann, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss sowie Herrn Dr. Antonio Ruiz sehr herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt zudem dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der mich bei meinen ersten wissenschaftlichen „Gehversuchen“ als Doktorand finanziell unterstützt und wesentlich zum Einschlagen der akademischen Laufbahn beigetragen hat. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die ein Projekt (TA 291/1-1) sowie meine eigene Stelle finanzierte (HE3663/2-1), möchte mich ich ebenso sehr herzlich bedanken.

Ausserdem danke ich ganz besonders meinen Eltern in Chile, ohne deren Hilfe und Unterstützung mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen wären. Ich danke auch meinen Kindern Janis Xaleshen und Banoo Danira dafür, dass sie mir trotz meiner häufigen Abwesenheit von zu Hause immer verziehen haben. Meinen beiden Kindern sowie meiner liebe Frau Anja, die alle eine konstante Motivation in meinem Leben sind, sei an dieser Stelle nochmals herzlichst gedankt.



„Ich erkläre: Ich habe die Habilitationsschrift selbständig und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Arbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäss aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Erstellung der Habilitationsschrift und bei den von mir durchgeführten und in der Arbeit erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ umschrieben sind, eingehalten.“



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5485-7



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 4 8 5 4 1