

Institut für Tierphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. W. Clauß

**Untersuchungen zum Einfluss von *Eimeria bovis*-Sporozoiten auf
VERO- Zellen und Endothel-Zellen aus dem Rind**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Elmar Schröpfer

Gießen 2003

Dekan	Prof. Dr. J. Janek
1. Gutachter	Prof. Dr. W. Clauß
2. Gutachter	Prof. Dr. H. Zahner

Tag der mündlichen Prüfung:

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Materialien und Methoden	3
2.1.	Verwendete Materialien und Chemikalien	3
2.1.1	Plastik- und Glaswaren	3
2.1.2	Zellkultur	3
2.1.3	Fluoreszenzfärbung	3
2.1.4	Mountingmedium II	4
2.2	Aufnahmen an lebenden Zellen und Sporozoiten	4
2.3	Zellkultur	5
2.3.1	Verwendete Zellarten	5
2.3.2	Haltung	6
2.3.3	Zusammensetzung der Kulturmedien	6
2.3.4	Subkultivierung	7
2.3.5	Einfrieren von Zellen (auch der Parasiten)	7
2.3.6	Auftauen von Zellen	8
2.4	Parasiten	8
2.4.1	Stammbeschreibung <i>Eimeria bovis</i>	8
2.4.2	Gewinnung des Infektionsmaterials	8
2.4.3	Infektion	9
2.5	Zytoskelettfärbung	10
2.6	Membrananfärbung	10
2.7	Apoptose	11
2.8	Geräte	12
2.8.1	Mikroskop	12
2.8.2	Durchflusszytometer	12
2.9	Auswahl der Schizonten	13
2.10	Messen der Fluoreszenzintensität und Statistik	13
2.11	Erstellung der Bilder und Bildverarbeitung	13
3.	Ergebnisse	18
3.1	Beschreibung der Zellen (allgemeine Beobachtungen)	18
3.2	Fluoreszenzintensitäten der Zytoskelettkomponenten	20
3.3	Konfokalaufnahmen	25
3.3.1	Zytoskelettdarstellungen	28
3.3.2	Membrananfärbung	37
3.4	Apoptose	41
4.	Diskussion	49
4.1	Warum wurde <i>Eimeria bovis</i> untersucht?	49
4.2	Warum Zellkultur? Warum wurden BSLEC, BUVEC und VEROs verwendet?	51
4.3	Untersuchungen am Zytoskelett	52
4.3.1	Aktin	53
4.3.2	Mikrotubuli	55
4.3.3	Azetylierte Mikrotubuli	56
4.3.4	Der Farbstoff H33342	57
4.4	Apoptose	57
4.4.1	Induzierung von Apoptosen durch Colchicin und Actinomycin D	59
4.5	Der Farbstoff FM 1-43	59
4.6	Der Einsatz des Laser-Konfokal-Mikroskops	60
4.7	Messungen mit dem Zytometer	61

4.8	Diskussion der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse	61
4.8.1	Veränderung des Zytoskeletts	64
4.8.2	DNA-Darstellung mit dem Farbstoff H33342	66
4.8.3	Apoptose in infizierten Zellen	67
5.	Zusammenfassung / Summary	69
6.	Literaturverzeichnis	71
7.	Danksagung	78
8.	Versicherung	79

1. Einleitung

Kokzidosen sind Infektionserkrankungen, die durch Erreger der Gattungen *Eimeria*, *Isospora*, *Hammondia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* und *Cryptosporidium* hervorgerufen werden (Eckert et al. 1992).

In verschiedenen Wirbeltierarten sind Kokzidosen ein erhebliches Problem. So werden in der Nahrungsmittelproduktion durch die obligat intrazellulären Erreger große ökonomische Schäden verursacht. Allein Infektionen mit rinderpathogenen *Eimeria*-Arten sind für wirtschaftliche Schäden in Zucht und Haltung weltweit in Höhe von mehreren 100 Millionen US Dollar jährlich verantwortlich zu machen (Fitzgerald 1980). Unter den rinderpathogenen Arten spielt dabei *Eimeria bovis* zusammen mit *Eimeria zuernii* die wichtigste Rolle. Durch Infektionen mit diesen *Eimeria*-Arten verlieren erwachsene Rinder an Gewicht, Kühe liefern weniger Milch, Kälber leiden an Durchfall und das Wachstum verlangsamt sich. Bei starken Infektionen verläuft die Infektion für Kälber letal. Todesfälle bei erwachsenen Tieren sind hingegen selten. Die infektiösen Stadien von *Eimeria bovis* befallen dabei zuerst als Sporoziten das Endothel der zentralen Lymphkapillaren des Ileums und des Kolons und nach einer Schizogonie als Merozoiten das Kolon- und Zäkum-Epithel. Dabei entwickeln sich die etwa $5 \times 2 \times 2 \mu\text{m}^3$ großen Sporoziten innerhalb einer parasitophoren Vakuole zu Schizonten, die eine Größe $140 \times 40 \times 20 \mu\text{m}^3$ und mehr erreichen.

Um mehr über diesen ersten Entwicklungsabschnitt von *Eimeria bovis* zu erfahren, wurden Untersuchungen zu der parasitophoren Vakuole, zu dem Zytoskelett der Wirtszellen und zu einer vermuteten Apoptoseunterbindung durch den Parasiten durchgeführt. Als Modell dienten dazu primäre Endothelzelllinien aus dem Rind (BSLEC und BUVEC) und VERO-Zellen, eine Zelllinie, die aus der Niere von Grünen Meerkatzen gewonnen wurde. Diese Zelllinien wurden als Versuchsobjekt deshalb gewählt, weil *Eimeria bovis* Sporoziten in VERO-Zellen zwar eindringen, sich aber im Gegensatz zu den Endothelzellen nicht weiterentwickeln. In den VERO-Zellen entwickelt sich allerdings eine deutlich größere parasitophore Vakuole als in den verwendeten Endothelzellen. In beiden Zellsystemen, den VERO-Zellen und den Endothelzellen, entstehen somit große intrazelluläre Gebilde, die durch den Parasiten in der Wirtszelle verursacht werden. Ob und wie dieser Vorgang Einfluss auf das Zytoskelett der Wirtszelle hat, wurde anhand von Aktin, α -Tubulin und azetyliertem Tubulin untersucht. Von besonderem Interesse war, ob es zu Unterschieden zwischen VERO-Zellen und Endothelzellen kommt.

Da der parasitophoren Vakuole eine zentrale Rolle für die Persistenz in der Zelle zukommt, wurden Versuche mit dem Membranfarbstoff FM 1-43 durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass es offensichtlich nicht zu einer Fusion zwischen Vesikeln mit der Membran der parasitophoren Vakuole kommt.

Für andere Vertreter, die wie *Eimeria* zum Stamm der Apicomplexa gehören, im speziellen *Toxoplasma gondii*, wurde bereits gezeigt, dass die Fähigkeit infizierter Zellen in die Apoptose zu gehen eingeschränkt ist (Nash et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Laser-Konfokal-Mikroskops und Zytometers erste Hinweise gefunden, dass auch *Eimeria bovis* die Apoptose seiner Wirtszelle verhindern kann.

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

2.1.1 Plastik- und Glaswaren

4-Well Platten (Nunclon Multischalen; Nunc, Wiesbaden)

Nunclon Kulturschalen 3 cm Ø (Nunc, Wiesbaden)

Zellkulturflaschen 25 cm² (Nunclon Flaschen mit Filterkappe; Nunc, Wiesbaden)

Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden)

Zentrifugenröhrchen (Nunc, Wiesbaden)

Deckgläser, rund (Menzel-Gläser, Ø 15 mm (neoLab, Heidelberg)

Silikonfett – Baysilone-Paste (Bayer, Leverkusen)

Ethanol reinst (Roth, Karlsruhe)

2.1.2 Zellkultur

DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma, Deisenhofen)

ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) und das dazugehörige Supplement
(Promocell, Heidelberg)

Medium 199 Earl (PromoCell, Heidelberg)

RPMI 1640 Medium (Eurobio, Les Ulis Cedex, Belgien)

Fetales Kälber-Serum (Eurobio, Les Ulis Cedex, Belgien)

L-Glutamin 2 mM (Eurobio, Les Ulis Cedex, Belgien)

Penicillin/Streptomycin (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Eurobio, Les Ulis
Cedex, Belgien)

Gentamycin 50 µg/ml (Eurobio, Les Ulis Cedex, Belgien)

Trypsin EDTA (Versen) 1 x (Eurobio, Les Ulis Cedex, Belgien)

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)

2.1.3 Fluoreszenzfärbung

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

Methanol reinst (Roth)

Triton x-100 (Roth)

3% Paraformaldehyd-Lösung (Sigma)

Anti α -Tubulin Clone DM 1A (Sigma)

Anti acetylated Tubulin Clone 6-11B-1 (Sigma)

FITC-konjugiertes Phalloidin (Sigma)

Alexa 488 goat anti mouse IgG (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Alexa 350 goat anti mouse IgG (Molecular Probes)

FM 1-43 (Molecular Probes)

AnnexinV Alexa 488-Konjugat (Molecular Probes)

Annexin-Bindungspuffer (Molecular Probes)

Propidiumjodid (Molecular Probes)

Annexin-Binding-Buffer (Molecular Probes)

Colchicin (Sigma)

Actinomycin D (Sigma)

Mowiol (Hoechst)

Glycerinlösung (Serva, Heidelberg)

Tris, [Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan] (Sigma)

p-Phenylendiamin (Serva)

Calcium-Ionophor A23187 (Molecular Probes)

Nicotin-di-d-tartrat (Sigma)

Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Lösungen:

PBS:

8 g/l NaCl, 1.15 g/l Na₂HPO₄, 0.2 g/l KCl, 0.2g/l KH₂PO₄ (alle von Fluka, Buchs, Schweiz)

2.1.4 Mountingmedium II

2.4 g Mowiol, 6 g Glycerinlösung 87% in H₂O, 6 ml H₂O, 12 ml 0.2 M Tris. Mit HCl wurde ein pH von 8.5 eingestellt. Das Gemisch wurde 10 min bei 50 - 60° C in Lösung gebracht, ungelöste Reste wurden abzentrifugiert (11000 x g). Zum Überstand kamen 1.5 mg/ml p-Phenylendiamin (Johnson et al. 1982). Das Mountingmedium wurde binnen 5 min bei -20° C eingefroren.

2.2 Aufnahmen an lebenden Zellen und Sporozoiten

Um Aufnahmen an lebenden Zellen und Sporozoiten durchzuführen, wurden bewachsene Deckgläser unter Kulturschalen geklebt, die in der Mitte ein gefrästes Loch enthielten. Die Deckgläser wurden dazu aus den 4-Well herausgeholt und der Rand der Deckgläser mit einem Wattestäbchen trockengerieben. Der Boden der Kulturschale wurde vorab mit Ethanol gereinigt und der Kleber um den Rand des Loches angebracht. Das Deckglas wurde so angedrückt, dass sich der Kleber gleichmäßig verteilte. Das benötigte

Zellmedium wurde dann vorsichtig in die Kulturschale gegeben und die Dichtigkeit der Schale überprüft, bevor sie mit den Zellen in das Mikroskop eingespannt wurde. Zur Überprüfung der Dichtigkeit wurde die gefüllte Kulturschale auf saugfähiges Papier gestellt und so auf auslaufendes Medium untersucht. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht die Zugabe von Detergenzien während oder kurz vor einer Messung an lebenden Zellen (Abbildung M1).

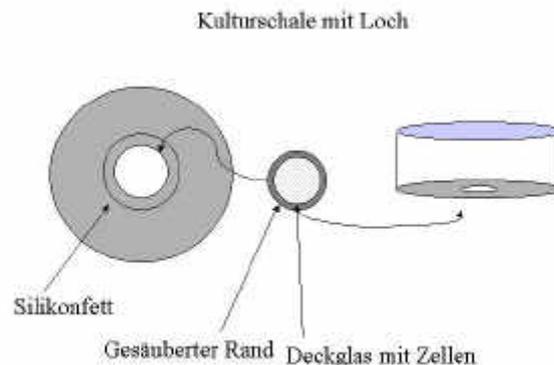


Abb. M1: Skizze einer Lochschale zur Messung an lebenden Zellen. Das mit Zellen bewachsene Deckglas wird von unten mit Silikonfett auf das Loch aufgebracht.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Für diese Arbeit wurden folgende Zellarten verwendet

1. Lymphatische Endothelzellen aus der Milz des Rindes (BSLEC (bovine spleen lymphatic endothelial cells)) (Hermosilla et al. 2002). Gewonnen wurden diese Zellen ursprünglich im Labor von Professor Preissner (Institut für Biochemie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität). Über das Institut für Parasitologie wurden diese Zellen für die Experimente zur Verfügung gestellt.
2. Endothelzellen aus der Nabelschnur des Rindes (BUVEC (bovine umbilical vein endothelial cells)). Verwendete Materialien: 10x Puck's saline A Puffer (PSA) (Gibco, Eggenstein), Collagenase Typ 2 (Worthington Biochemical Corp.), sterile Unterlage und Fäden, Klemme und Schere. Zur Gewinnung dieser Zellen wurde ein Stück Nabelschnur mit einer Klemme an einem Ende verschlossen. In das andere Ende wurde eine Braunüle eingeführt und mit Fäden fixiert. Je nach Größe der Nabelschnüre wurden 10 – 20 ml Collagenase (0,025g Collagenase + 10 ml PSA + 90 ml H₂O) durch eine Nadel in der Braunüle in die Vene gegeben. Nach 25 min Inkubation bei 37°C wurde die Vene leicht massiert und mit RPMI-Medium ausgespült. Zellen, Collagenase

und Medium wurden in einem Röhrchen mit 1-2 ml vorgelegtem FCS aufgefangen und bis 50 ml mit RPMI aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation (10 min bei 1500 UpM) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 6 ml ECGM-Komplettmedium aufgenommen. Diese Suspension konnte auf bis zu 5 Kulturflaschen verteilt werden. Jede Kulturflasche wurde auf 5 ml mit ECGM aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgte stets ein Mediumwechsel.

3. Epitheliale Zelllinie aus der Niere der Grünen Meerkatze (VERO (African green monkey kidney cells)). Diese Zelllinie wurde von der European Collection of Cell Culture (ECACC) bezogen (ECACC 841130001).

BSLEC und BUVEC sind primäre Zelllinien, die für diese Arbeit vom Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Verfügung gestellt wurden.

2.3.2 Haltung

Die genannten Zellarten wurden bei maximaler Luftfeuchte in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luft bei 37°C gehalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen (Nunc) mit einer Bodenfläche von 25 cm². Für die Experimente wurden die Zellen in Kulturschalen (4-Well Nunc) auf runden Deckgläschen (Ø 15 mm) gezogen.

Das Medium wurde bei allen Zellarten 3 x die Woche gewechselt. Vor dem Aussäen der BSLEC und BUVEC wurde das Medium mindestens 20 Minuten vor den Zellen in die entsprechenden Kulturgefäße gegeben. Dies erwies sich als nötig, um eine entsprechende Anhaftung der Zellen am Boden der Kulturgefäße zu gewährleisten (z. B. Chen et al. 1997, Bonfoco et al. 1995, van Engeland et al. 1996), für VERO-Zellen war dies nicht nötig. Zur Wahrung der Sterilität wurden alle Arbeiten, bei denen die Innenseiten der Kulturgefäße und/oder die Zellen der Umgebungsluft ausgesetzt waren, unter einer Sterilbank (Prettl, 7445 Bempflingen Deutschland) ausgeführt. Dabei wurden stets Einmalhandschuhe getragen, die vorher mit 70 %igem Ethanol desinfiziert wurden. Ebenfalls gründlich desinfiziert wurden alle Geräte, die von außen unter die Sterilbank geholt wurden.

2.3.3 Zusammensetzung der Kulturmedien

Das Medium für BSLEC und BUVEC, das nach der Subkultivierung verwendet wurde, setzte sich aus ECGM (Endothelial cell growth medium) und dem dazugehörigen Supplement (beides von PromoCell, Heidelberg) sowie 2% FCS (foetal calf serum, Eurobio) zusammen. Für das weitere Wachstum der Zellen wurde Medium199 (PromoCell) im Verhältnis 50:50 (v/v) zum ECGM Komplettmedium zugesetzt. Auch hier war FCS in einer Endkonzentration von 2% enthalten.

Das Medium für VERO-Zellen bestand aus RPMI 1640 (Eurobio) und 10% FCS.

Diese Medien enthielten zudem Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml (Eurobio), Gentamycin 50 µg/ml (Eurobio) und L-Glutamin 2 mM (Eurobio).

2.3.4 Subkultivierung

Um Zellen vom Boden der Kulturflaschen (25 cm², Nunc) zu lösen und sie dann entweder zur Weiterkultivierung wieder in Flaschen zu säen oder auf die Deckgläschen für die Messungen zu bringen, wurden das alte Medium abgenommen und Reste des Mediums mit 3 ml PBS ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus Trypsin und EDTA (fertige Gebrauchslösung von Eurobio [0,25% Trypsin, B24702915]) vom Boden gelöst. Für eine Kulturflasche wurden 1,5 ml dieser Lösung eingesetzt. Durch leichtes Klopfen wurde dafür gesorgt, dass sich die Zellen rascher ablösten und so das Trypsin nicht länger als maximal 5 min auf den Zellen blieb. Die Wirkung des Trypsins wurde dann durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt, die Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen wurden dann abzentrifugiert (200 – 300 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Kompletmedium aufgenommen und resuspendiert. Je nach gewünschter Dichte wurden aus einer konfluenten Flasche mit BSLEC drei weitere Flaschen mit diesen Zellen ausgesät oder eine Flasche und vier 4-Wells (16 Deckgläschen). Aus einer konfluenten BUVEC-Flasche konnten genug Zellen gewonnen werden um bis zu 6, bei VERO-Zellen bis zu 20 4-Wells zu beschicken. Mehr als fünf 4-Wells pro Flasche wurden in der Praxis aber nicht ausgesät.

2.3.5 Einfrieren von Zellen (auch der Parasiten)

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Dazu wurde in das Kulturmedium DMSO (Dimethylsulfoxid) bis zu einer Konzentration von 7,5% gegeben.

Die mit Trypsin abgelösten Zellen wurden in 10 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMSO-haltigem Medium aufgenommen, resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt. Danach lagerten die Zellen erst 30 min im Kühlschrank, dann 2 Stunden bei -25°C, dann 1 Std. bei -80°C und danach wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.6 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden zum Auftauen in ein Wasserbad bei 37°C gestellt und nach dem Auftauen umgehend in Zentrifugenröhrchen überführt. In die Zentrifugenröhrchen wurde noch die gleiche Menge an Kulturmedium hinzu gegeben. Das Zentrifugieren dauert 5 min bei 200 x g.

Das Pellet wurde in Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und auf die entsprechenden Kulturgefäße verteilt.

Das Auftauen der Parasiten erfolgte nach dem gleichen Prinzip (siehe unten).

2.4 Parasiten

2.4.1 *Eimeria bovis*

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

2.4.2 Gewinnung des Infektionsmaterials (vgl. Bürger et al. (1995), Dissertationsschrift (Hermosilla 1998) und Hermosilla et al. (2002)):

Zur Gewinnung von Sporozoitien wurden Kälber der Rasse Deutsche Schwarzbunte verwendet. Nach Untersuchung auf bakterielle Durchfallerreger sowie Eimerien und nötigenfalls Behandlung wurden diese Tiere in Stoffwechsellkäfigen aus Edelstahl in gekachelten Räumen gehalten. Die Räume waren nur über eine Desinfektionsschleuse zu betreten. Die Ställe wurden vor Gebrauch mit Heißdampf desinfiziert. Eintretende Personen mussten Kittel, Gummistiefel, Schürze und Gummihandschuhe anziehen und eine Desinfektionswanne mit einer 5 %igen (v/v) p-Chlor-m-Kresol-Lösung in Wasser (P3-incicoc®) durchlaufen.

Gefüttert wurden die Kälber anfangs mit Milchaustauscher (Hemofac®) und einem Antidiarrhötikum (Stullmisan®), das in schwarzem Tee suspendiert wurde. Ein Ergänzungsfutter (Raiffeisen Hauptgenossenschaft AG, Frankfurt/M) wurde zusätzlich nach 14 Tagen beigefüttert; ab der dritten Woche außerdem sterilisiertes Heu. Nach der vierten Woche wurden Tee, Milchaustauscher und das Antidiarrhötikum abgesetzt.

Die so aufgezogenen Kälber wurden mit 70000 sporulierter *Eimeria bovis*-Oozysten des Stammes H per os infiziert. Nach etwa 18 Tagen p.i. werden die ersten Oocysten mit dem Kot ausgeschieden. Die Fäzes wurden ab einem Gehalt von etwa 1000 Oozysten pro Gramm Kot gesammelt und dann nacheinander über Siebe der Maschenweiten 300 µm, 150 µm, und 80 µm mit Leitungswasser gespült und in Eimern aufgefangen. Die Oozysten befanden sich danach in der letzten Fraktion. Nach 2 Stunden Sedimentation wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit einer gesättigten Zuckerlösung (Dichte = 1,35

g/cm³) bis zu einer Dichte von 1,15 versetzt und in flache Schalen überführt. Die Schalen wurden bis zum Rand gefüllt und so mit Glasscheiben abgedeckt, dass diese benetzt wurden. Die Oozysten haften an den aufgelegten Glasscheiben und können abgespült werden. Die gewaschenen Oozysten (400 x g, 10min) wurden mit dem gleichen Volumen einer 4% Kaliumdichromatlösung versetzt und eine Woche bei Raumtemperatur gelagert, bis die Sporulation beendet war. Nach der Sporulation wurden die Oozysten in frische 2%ige Kaliumdichromatlösung überführt und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Gewinnung der Sporozoiten wurde die Kaliumdichromatlösung durch Zentrifugieren (400 x g, 10 min) entfernt. Unter Rühren wurde das Pellet mit Hypochloritlösung (4% freies Chlor) aufgenommen und auf Eis 20 min inkubiert. Diese Suspension wurde dann mit destilliertem Wasser verdünnt und nochmals zentrifugiert (400 x g, 10 min). Ein Gradient einer 60% Percoll-Lösung wurde durch Zentrifugieren bei 30000 x g für 20 min hergestellt und das Pellet sodann auf diesen Gradienten aufgetragen und 20 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Band mit den Oozysten wurde dann auf einen 50% Percollgradienten aufgebracht und nochmals bei 400 x g 20 min zentrifugiert. Das Oozystenpellet wurde in steriler 0.002 M L-Cystein HCl (Serva, Heidelberg) und 0.2 M NaHCO₃ Lösung resuspendiert und 20 Stunden bei 37% und 100% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation (10 min, 500 x g) um die Oozysten zu erhalten.

Die Exzystierung erfolgte in zwei Medien.

Medium A bestand aus: 0.25% (w/v) Trypsin (Sigma, Deisenhofen), 4% Natrium Taurodeoxycholate (Calbiochem, Bad Soden) in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Sigma).

Medium B bestand aus 0.4% (w/v) Trypsin (Sigma), 8% (v/v) sterile Rindergalle in HBSS.

Unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle wurden die Oozysten in Medium A 30 bis 90 min inkubiert, in Medium B 4 bis 5 Stunden.

Die freien Sporozoiten wurden mit Oozysten, Sporozysten und Debris in sterilem PBS für 10 min bei 200 x g zentrifugiert und so von diesen getrennt.

2.4.3 Infektion

Eimeria bovis-Sporozoiten wurden nach ihrer Gewinnung entweder bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Kryoröhrchen enthielten 40000 bis 2×10^6 Sporozoiten. Zur Infektion wurde für BSLEC und BUVEC ein Inokulat von 10000 bis 100000 Sporozoiten pro Deckglas verwendet, zur Infektion von VERO-Zellen 40000 bis 100000 Sporozoiten pro Deckglas. Dazu wurden die Parasiten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit 1 ml Kulturmedium in Zentrifugenröhrchen überführt. Die

Zentrifugation erfolgte 5 min bei 2000 U/min (300 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Parasiten in Kulturmedium aufgenommen. Dabei variierte das Volumen des zugesetzten Mediums nach Anzahl der Sporozoiten und der Anzahl der Deckgläschen, die beschickt werden sollten. Nach Möglichkeit wurden 100 µl pro Well gewählt.

2.5 Zytoskelettfärbung

Zur Darstellung des Zytoskeletts wurden die Deckgläschen mit den Zellen in den Wells gewaschen, fixiert, gefärbt, dann aus den Wells entfernt und auf Objektträgern in Mountingmedium II eingebettet (Schröpfer et al. 2000).

Zur Darstellung von Mikrotubuli und azetyliertem Tubulin wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in eiskaltem Methanol fixiert, 2 x mit PBS gewaschen und 20 min lang mit Milchpulver in PBS (3% w/v) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Die Antikörper wurden in der Milchpulverlösung aufgenommen und so auf die Zellen gegeben. Die Konzentrationen waren dabei: Anti- α -Tubulin Clone DM 1A (Sigma) 1:80, Anti-azetyliertes Tubulin Clone 6-11B-1 (Sigma) 1:500. Die Inkubationsdauer betrug je 1 Stunde.

Als sekundäre Antikörper wurden Alexa 488 oder Alexa 350 tragende IgGs aus der Ziege verwandt (Molecular Probes), die gegen Maus-Immunglobuline gerichtet sind. Diese Antikörper wurden ebenfalls in Milchpulverlösung aufgenommen, Alexa 488 im Verhältnis 1:200, Alexa 350 1:100. Nachdem die Zellen dreimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden auch diese Antikörper für eine Stunde auf den Zellen gelassen.

Die Anfärbung der Aktinfilamente erfolgte mit FITC-konjugiertem Phalloidin (Sigma). Dazu wurden die Zellen mit einer 3% Paraformaldehyd-Lösung für 10 min fixiert, 2 x mit PBS gewaschen und mit einer 0,1% Triton-100-Lösung für 3 min permeabilisiert. Pro Deckglas wurden 0,5 µg – 0,75 µg des FITC-Konjugats verwandt. Die Inkubationsdauer betrug hierbei 45 min. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur und alle Inkubationen mit Farbstoffen zusätzlich im Dunkeln durchgeführt.

Zur Darstellung der DNA wurde den Proben der Farbstoff H33342 (Molecular Probes) zugesetzt. Dazu wurden in jedes Well 1 ml PBS vorgelegt und dann 2 µl einer 10 mg/ml-Lösung des Farbstoffes für 10 min zugegeben. Nach dem Anfärben wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und dann mit einem mowiolhaltigen Einbettmedium (Mountingmedium II) auf Objektträgern aufgebracht (Schröpfer et al. 2000). Nachdem sie über Nacht getrocknet waren, wurden die Proben an einem Laser-Konfokal-Mikroskop (MRC 1024 BioRad) untersucht.

2.6 Membrananfärbung

Zur Anfärbung der Zellmembran wurde der Farbstoff FM 1-43 (Molecular Probes) verwendet.

Dieser Farbstoff durchdringt aufgrund seiner Ladung Lipidlayer nicht (Smith und Betz 1996, Schote und Seelig 1998).

Zur Färbung wurde 1 mg des Farbstoffes in 200 μ l DMSO und 800 μ l H₂O gelöst. Davon wurden 1,5 μ l-2 μ l pro Well eingesetzt. Gefärbt wurden entweder bereits infizierte Zellen, Zellen und Parasiten simultan, nur Parasiten oder Zellen vor der Infektion.

Vor der Infektion wurden die Zellen 3 Stunden mit FM 1-43 gefärbt, dann 3 x mit PBS gewaschen und danach die Sporozoitien zugegeben.

Bei der simultanen Färbung wurde der Farbstoff zum gleichen Zeitpunkt wie die Sporozoitien auf die Zellen gegeben.

Sollte mit gefärbten Sporozoitien infiziert werden, wurden diese für eine Stunde gefärbt, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und dann auf die Zellen gegeben.

Zur Kontrolle wurde ein Teil der Sporozoitien ungefärbt auf andere Zellen gegeben.

Zur Färbung infizierter Zellen wurde der Farbstoff frühestens 20 Stunden nach Zugabe der Parasiten appliziert.

2.7 Apoptose

Zur Induktion von Apoptosen wurden Colchicin und Actinomycin D eingesetzt. Generell war die Einwirkzeit der Substanzen eine Stunde bei 37°C.

Nach einer Stunde wurden durch Mediumwechsel und Waschen die Substanzen wieder entfernt. Nach 24, 48 und 72 Stunden im Brutschrank wurden dann die Zellen im Lichtmikroskop auf Veränderungen und nach 72 h mittels Anfärbung des Phosphatidylserins durch Annexin V (Molecular Probes) auf Apoptosen untersucht. Colchicin und Actinomycin D wurden einmal 4 Stunden nach Infektion und einmal 7 Tage nach Infektion zu den Zellen gegeben (Abb. E24-E31B).

Die eingesetzten Konzentrationen von Colchicin und Actinomycin D sind in den Abbildungen im Ergebnisteil angegeben.

Die Färbung des Zytoskeletts erfolgte wie oben beschrieben. Zur Färbung mit Alexa 488 konjugiertem Annexin V wurden die adhärenenten Zellen 1 x mit Annexin-Bindungspuffer (Molecular Probes) gewaschen und jedes Deckglas mit 200 μ l Annexin-Bindungspuffer bedeckt und 10 μ l Annexin V – Konjugat sowie 2 μ l einer 100 mg/ml Propidiumjodid zu je 200 μ l hinzugefügt. Die Inkubation betrug danach 20 min bei Raumtemperatur.

Zusätzlich wurden auf gleiche Weise behandelte Zellen mit einem Zytometer auf Bindung des Apoptosemarkers (Annexin V) und des Nekrosemarkers (Propidiumjodid) untersucht, um eine quantitative Aussage über die apoptotischen Zellen treffen zu können. Dabei wurde der Überstand der Zellen mit allen bereits abgelösten Zellen aufgenommen, die noch angehefteten Zellen mit Trypsin abgelöst (wie beim Subkultivieren siehe oben) und mit dem entsprechenden Überstand vereinigt. Danach folgte die Färbung nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes). Die Zellen wurden in eiskaltem PBS gewaschen, 5 min kalt zentrifugiert ($300 \times g$) und in $1 \times$ Annexin-Bindungspuffer aufgenommen. Die Zellmenge wurde auf etwa $1 \times 10^6 / \text{ml}$ eingestellt. $100 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension wurde mit $5 \mu\text{l}$ Alexa 488 Annexin V - Konjugat und $1 \mu\text{l}$ einer $100 \mu\text{g/ml}$ Propidiumjodid Lösung angefärbt. Die Inkubationsdauer betrug dabei 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden $400 \mu\text{l}$ $1 \times$ Annexin-Bindungspuffer zugegeben, die Proben auf Eis gestellt und innerhalb von 5 min mit der Messung der ersten Probe begonnen.

2.8 Geräte

2.8.1 Mikroskop

Es stand ein Laser-Konfokal-Mikroskop der Marke BioRad, Typ MRC 1024, mit einem Krypton-Ion-Laser zur Verfügung, der Lichtlinien der Wellenlängen 351 nm, 363 nm, 488 nm und 514 nm erzeugt.

Dieses System ist an ein Axiovert-135M-Mikroskop der Firma Zeiss angebaut. Die benutzten Objektive waren ein Plan NeoFluor 63 x NA 1,25 und ein Fluar 40 x NA 1,30.

Die Bilder wurden mit der Software (LaserSharp 3.1) von BioRad aufgenommen und mit dem dazu gehörenden Bildbearbeitungsprogramm und zusätzlich mit dem Programm Confocal Assistant 4.02 überarbeitet.

2.8.2 Durchflusszytometer

Das Zytometer stammte von der Firma Coulter, Typ EPICSTM Elite Analyser und verfügte über einen Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Die zu messenden Zellen liegen vereinzelt im Probengefäß vor und werden durch ein spezielles Verfahren, in dem zwei unterschiedlich schnelle Flüssigkeitsströme die Zellen einzeln am Laserstrahl vorbeiführen, gemessen. Dabei misst das Gerät Größe und Granularität der Zellen sowie die Fluoreszenz. Für Fluoreszenzmessungen standen insgesamt 3 Photomultiplier mit entsprechenden Filtern zur Verfügung, so dass maximal 3 unterschiedliche Fluoreszenzspektren, also 3 verschiedene Farben gemessen werden konnten.

2.9 Auswahl der Schizonten

Da sich nicht alle Schizonten gleich schnell entwickeln und eventuell einige ihre Entwicklung einstellen, aber im Zellverband verbleiben, oder erst später mit der Entwicklung beginnen, wurden an den einzelnen Messtagen die am weitesten entwickelten Schizonten gemessen.

2.10 Messen der Fluoreszenzintensität und Statistik

Um die Veränderungen des Zytoskeletts darzustellen, wurden die Daten digitalisiert aus dem Computer ausgelesen. Das Messprogramm misst, wie viele Helligkeitspunkte in einem angegebenen Areal den eingegebenen Helligkeitsstufen entsprechen. Das Programm verfügt über 255 Helligkeitsstufen, 0 entspricht einem Pixel ohne Fluoreszenz und 254 der höchsten messbaren Intensität eines Pixels. Alle Messpunkte, die den Wert 254 theoretisch überschreiten würden, werden ebenfalls als Wert 254 abgespeichert. So erhält man letztendlich ein Kurve, in der wiedergegeben wird, wie oft der Wert 0,1,2,3..254 in dem gemessenen Areal vorhanden ist. Für Aussagen, ob es zu einer Änderung der Fluoreszenz kommt, wurde für jede einzelne Kurve der Median gebildet. Dazu werden alle Helligkeitspunkte mit ihrer Anzahl multipliziert und danach addiert. Als Bezugswert wurde der Wert ausgewählt, bei dem 50% dieser Summe zum ersten Mal überschritten wurden. Diese Werte wurden für jeden Messtag bei infizierten und nicht infizierten Zellen ermittelt und zusammengestellt. Diese Daten ergaben für jeden Tag eine „rechtsschiefe“ Verteilung. Die Mittelwerte und deren ermittelte Standardabweichung wurden daher zur Ermittlung der Signifikanz logarithmisch transformiert. Die statistische Auswertung wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt. Als statistisches Testverfahren wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse angewendet. Werte mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

Die Auswertung erfolgte an gebildeten Balkendiagrammen (Abb. E1-E6).

2.11 Erstellung der Bilder und Bildverarbeitung

Die in dieser Arbeit gezeigten Fluoreszenzbilder sind mit den Programmen LaserSharp 3.1 (Bio-Rad) erstellt und bearbeitet worden. Zusätzlich wurden die Programme Powerpoint (Microsoft) und Confocal Assistant verwendet. Zur besseren Darstellung wurden die Bilder in Helligkeit und Kontrast verändert. Da dies keinen Einfluss auf die gespeicherten Zahlenwerte der Fluoreszenzintensitäten hat, erfolgten alle Messungen anhand der

Originaldaten. Diese digitale Nachbearbeitung der Bilder wurde immer so durchgeführt, dass weder Information verloren ging noch hinzu kam.

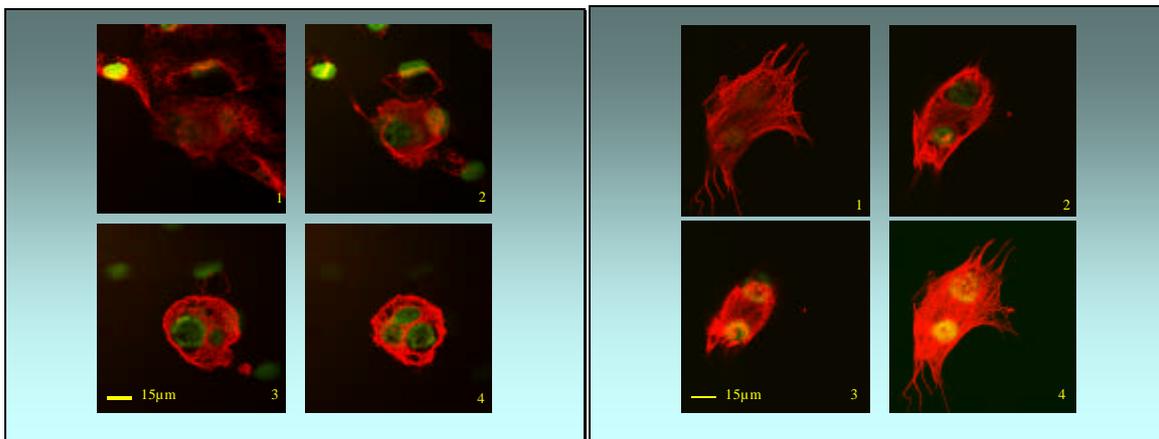


Abb. M2: In der linken Hälfte sind 4 optische Schnitte durch eine infizierte Zelle gezeigt. In der rechten Hälfte sind 3 Schnitte und das aus den Schnitten gebildete Overlay (4) gezeigt. In allen Fällen ist die Schnittfolge von basal nach apikal.

Die konfokale Technik ermöglicht, optische Schnitte durch das Objekt anzufertigen. Die hier in der linken Hälfte der Abbildung M2 gezeigten Bilder sind solche Schnitte, die durch einen Schizonten gelegt wurden. Die Reihenfolge ist von basal, Bild 1, nach apikal, Bild 4. Erst durch diese Schnitte ist es möglich, die insgesamt drei Kammern dieses Schizonten zu erkennen. In der rechten Hälfte der Abb. M2 gibt Bild 4, das Overlay, die Summe der einzelnen übereinander gelegten Schnitte wieder wie sie in den Bildern 1-3 gezeigt sind. Auch hier ist die Schnittfolge von basal nach apikal. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten des Zytoskeletts wurde ausschließlich an solchen Overlays durchgeführt.

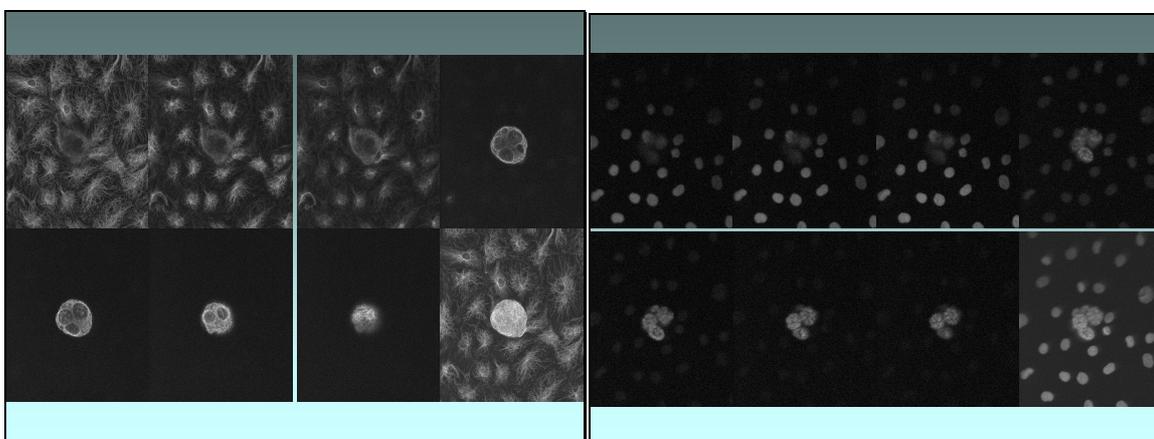


Abb. M3: Gezeigt sind optische Schnitte durch einen Schizonten vor der Zusammensetzung zu einem farbigen Bild. In der linken Hälfte sind die Aufnahmen des ersten Photomultipliers (Zytoskelett), in der rechten Hälfte des zweiten Photomultipliers (DNA) dargestellt.

In einem Overlay waren bis zu 60 einzelne Schnittbilder enthalten. Dabei wurden die Emissionen des Zytoskeletts und der DNA in zwei unterschiedlichen Kanälen respektive Photomultipliern aufgenommen. Hier sind in der linken Hälfte der Abb. M3 von links nach rechts die Schnitte 1, 3, 5, 26, 36, 50, 55 gezeigt und zuletzt das Overlay-Bild. Die gleichen Schnitte desselben Schizonten sind in der rechten Hälfte der Abb. M3 noch einmal dargestellt. Das letzte Bild zeigt wieder das Overlay-Bild, diesmal der DNA. Den Photomultipliern wurden Farben zugeordnet, so dass die Overlay-Bilder rote und grüne Fluoreszenz zeigen. Diese Farben stimmen nicht mit tatsächlichen Farben des emittierten Lichts überein. Tatsächlich emittieren die beiden Farbstoffe, die für die Darstellung der Zytoskelettkomponenten eingesetzt wurden, bei rund 520 nm (Alexa 488) grün und der DNA-Farbstoff (H333342) bei rund 430 nm blau. Der besseren Darstellung wegen wurden aber die Farben rot für das Zytoskelett und grün für die DNA gewählt.

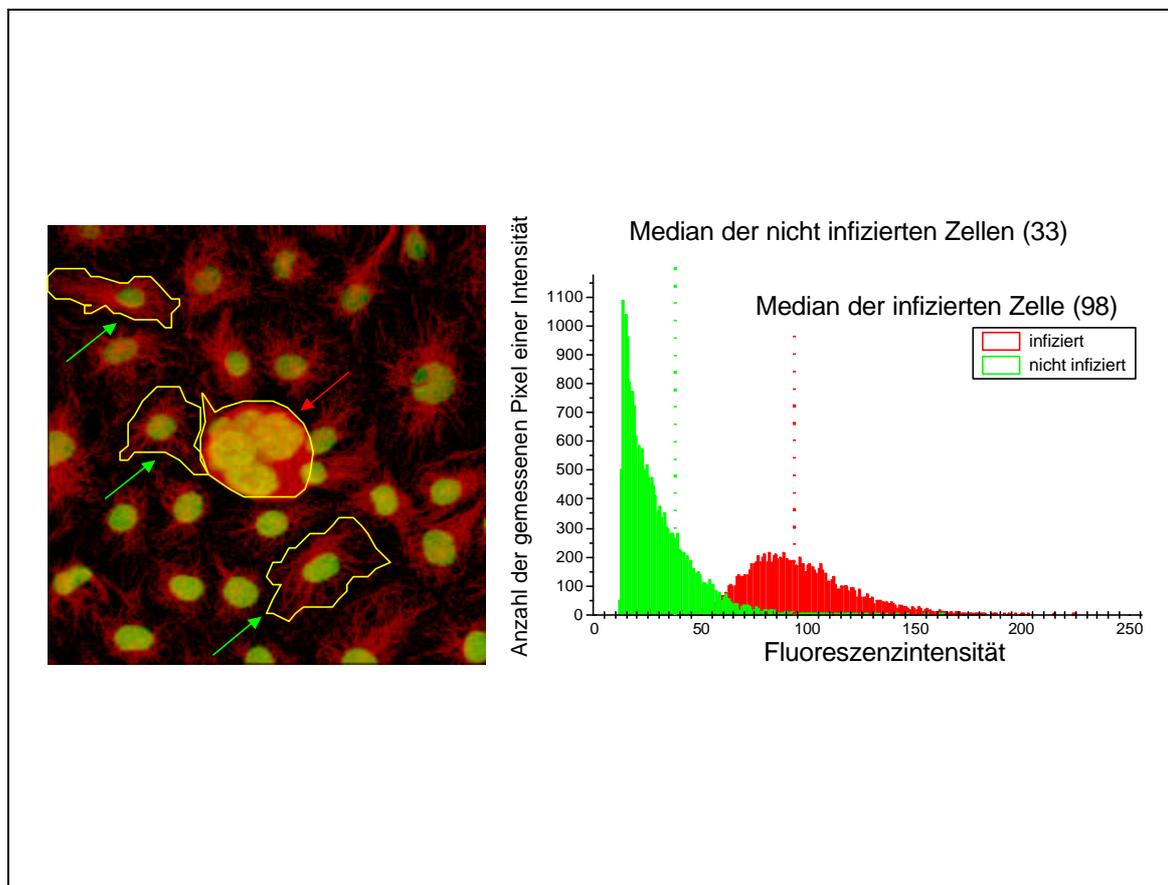


Abb. M4: Beispiel einer Messung einer infizierten Zelle (roter Pfeil) und drei nicht infizierter Zellen (grüne Pfeile). Die Kurven zeigen die gemessenen Werte und die ermittelten Mediane.

Um nun festzustellen, ob sich eine Vermehrung des Zytoskeletts nachweisen lässt, wurden die zu messenden Zellen umfahren und die Intensität der Fluoreszenz gemessen (Abb.

M4). Dies geschah ausschließlich für die Intensität des Zytoskeletts. Pro infizierte Zelle wurden immer 3 nicht infizierte Zellen des gleichen Overlay-Bildes gemessen.

Dabei wird vom Computer der Intensität eines jeden Pixels ein Zahlenwert zwischen 0 und 255 zugeordnet und bei der Messung neben der Intensität auch die Häufigkeit gezählt, mit der diese auftritt. Im Graphen rechts sind diese Pixelverteilungen für die infizierte Zelle (rot und roter Pfeil im Bild links), sowie der drei nicht infizierten Zellen (grün und grüne Pfeile im Bild links) dargestellt. Für jede Kurve wurde der Median ermittelt, die Linie, welche die Hälfte der Fläche unter der gedachten Kurve angibt. Da in den wenigsten Fällen dabei ein Intensitätsmesspunkt genau erreicht wurde, wurde immer der nächst höhere Messpunkt gewertet.

Beispiel einer solchen Tabelle:

Tab. M1: Tabelle zur Ermittlung eines Medians, dem Wert, der auf oder gerade über Summe/2 liegt. In diesem Beispiel ist der Median 100.

Helligkeitsintensitätswert der Pixel	Anzahl der Pixel des entsprechenden Intensitätswertes	Nicht genutzter Kanal	Helligkeitsintensitätswert x Anzahl der entsprechenden Pixel	Addition der Helligkeitswerte	
..	
98	285	0	27930	2213858	
99	272	0	26928	2240786	
100	280	0	28000	2268786	Median
101	257	1	25957	2294743	
102	281	0	28662	2323405	
103	255	0	26265	2349670	
...	
249	10	0	2490	4516555	
250	7	0	1750	4518305	
251	7	0	1757	4520062	
252	8	0	2016	4522078	
253	7	0	1771	4523849	
254	17	0	4318	4528167	
255	0	0	0	4528167	
Summe			4528167		

Summe / 2

2264083,5

Dieser Ausschnitt einer solchen Werte-Tabelle (Tab. M1) zeigt in der linken Spalte die Intensitätswerte (1-255), in der Spalte daneben deren Häufigkeit im Kanal für die Fluoreszenzintensitäten des Zytoskeletts, in der Mitte die der DNA (wird nicht berücksichtigt), Spalte 4 zeigt das Produkt aus Intensität x Häufigkeit, und die rechte Spalte addiert die einzelnen Produkte. Die Hälfte der so erhaltenen Zahl entspricht dem Median der Kurve. Da dieser Punkt einer ganzen Zahl entsprechen muss, wurde immer aufgerundet.

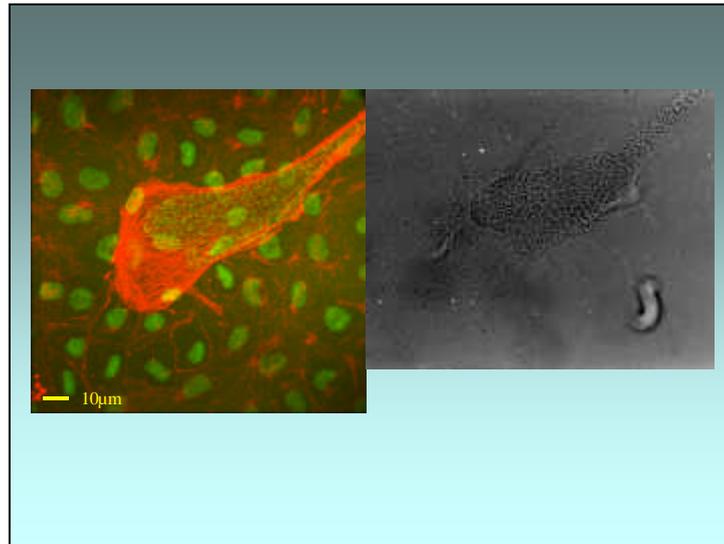


Abb. M5: Fluoreszenzbild und Lichtbild eines Schizonten mit Merozoiten.

Im Idealfall lassen sich die Merozoiten auch in einem Lichtbild (Abb. M5 rechts) erkennen. Die auf Fluoreszenzaufnahmen ausgelegten Objektive zeigen im normalen Durchlicht einige Schwächen. Trotzdem sind hier der Schizont und besonders die dicht gepackten Merozoiten zu erkennen. Der Vergleich dieser beiden Bilder in Abb. M5 zeigt deutlich, wie akkurat die Overlays die Schizonten nachzeichnen, und verdeutlicht die Überlegenheit der konfokalen Methode.

Der hier gezeigte Schizont entstand durch die Infektion von BUVEC mit *Eimeria bovis*-Sporozoen. Er wurde 20 Tage nach der Infektion aufgenommen. Das Durchlichtbild wurde vom bereits fixierten und gefärbten Präparat angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Zellen (allgemeine Beobachtungen)

Die in dieser Arbeit verwendeten BSLEC und BUVEC wuchsen sowohl auf Glas als auch auf dem Kunststoff der Firma Nunc an, allerdings erst, wenn FCS-haltiges Medium mindestens 20 min vorher in die Kulturgefäße ausgebracht wurde.

Beide Zelllinien lassen sich mikroskopisch nicht voneinander unterscheiden. Allerdings mußten BSLEC in einer höheren Dichte in die Kulturgefäße eingebracht werden, um ein Wachstum zu gewährleisten. Den Status eines konfluenten Monolayers (Zellen haben den Untergrund komplett bewachsen, jede Zelle steht mit anderen Zellen in engem Kontakt und sie bilden gemeinsame Zellgrenzen aus) hielten BSLEC allerdings länger aus als BUVEC, bevor sich die Zellen dann großflächig ablösten. Dabei war auffällig, dass die BUVEC dazu neigten, sich wie eine Gummimembran zusammenzuziehen. Wurde der Monolayer zu alt oder an einer Stelle leicht eingerissen, zog sich der Zellverband zu Zellhaufen zusammen, die zumeist eine Spindelform aufwiesen. Diese Gebilde waren dann am Rand der Kulturgefäße zu finden. Dabei spielte es keine Rolle, ob infizierte Zellen dazwischen waren oder nicht.

Als Einzelzellen wiesen BSLEC und BUVEC zumeist eine elongierte Form auf. Das heißt, eine gedachte Achse durch die Zelle ist deutlich länger als eine andere, die im rechten Winkel dazu verläuft. Bei vielen Zellen war diese Form auch noch in einem Monolayer erhalten. Diese dichten elongierten Zellen hatten dabei nur in begrenzten Bereichen dieselbe Ausrichtung. Allerdings wiesen nicht alle Zellen diese elongierte Form auf. Sowohl bei BSLEC als auch bei BUVEC kamen im konfluenten Monolayer auch Zellen mit einer polygonen Form vor.

Mit zunehmender Passagenanzahl - als eine Passage zählt jede Subkultivierung (siehe Materialien und Methoden) - ging bei beiden Zelllinien die elongierte Form verloren und es bildeten sich mehr und mehr sehr große, fast kreisförmige Zellen mit einem zentralen Kern. Der Grad der Vakuolisierung der Zellen nahm dabei stark zu. Diese Erscheinungen hatten anfangs noch keinen Einfluß auf die Infektionsraten, allerdings nahmen letztere später stark ab. Deshalb wurden keine Versuche mit häufiger als 12x passagierten Zellen durchgeführt. Leichte Unterschiede im Wachstumsverhalten gab es zwischen den einzelnen Chargen der Zellen. So gab es, abhängig von der Isolierung des Zellmaterials, BSLEC und BUVEC, die besser oder schlechter anwuchsen als andere Chargen. Für die Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, spielten diese Unterschiede allerdings keine Rolle.

VERO-Zellen benötigten keine Vorbehandlung der Kulturgefäße. Sie wuchsen bei sehr geringer Zellzahl an und bildeten konfluente Monolayer. VERO-Zellen sind sehr viel kleiner als BSLEC oder BUVEC und man erhält in Kulturflaschen mit derselben Größe deutlich mehr Zellen. Ihre typische Zellform ist polygonal. Wird der Monolayer bei VERO-Zellen zu alt, bilden sich auf Glas und Plastik sogenannte Dome (mehrere zusammenhängende Zellen die sich vom Untergrund blasenförmig abheben). Diese Erscheinung ist für andere Zellen bereits beschrieben und auf Ionen und Wassertransport solcher Zellen auf die basale Seite zurückzuführen (Dörrenhaus et al. 2000, Taub und Sato 1980).

Eimeria bovis-Sporozoitien infizieren die drei Zellarten mit unterschiedlicher Effizienz. Am wenigsten anfällig sind VERO-Zellen. Unterschiede zwischen BSLEC und BUVEC sind gering. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Infektionsraten nicht ausgezählt, die Infektionsrate war generell sehr gering und lag bei etwa 1/1000. Bei Inokulaten von 40000 bis 120000 Sporozoitien kam es zur Entwicklung von etwa 20 bis 50 Schizonten. Davon enthielt 20 Tage nach der Infektion auch wieder nur eine geringe Anzahl Merozoiten. In Flaschen können allerdings Infektionsraten von bis zu 12% erreicht werden (Hermosilla et al. 2002). In den hier verwendeten 4-Wellen wurde diese Rate nicht erreicht. Größere Volumina der Kulturgefäße erhöhen die Infektionsraten aus bisher ungeklärten Gründen (Hermosilla et al. 2002). Die besten Infektionsraten erhält man mit Sporozoitien, die vor der Infektion nicht eingefroren waren. Die Infektionsrate hing nicht zuletzt von der Charge der isolierten Sporozoitien ab.

Die schlechtere Infektionsrate bei VERO-Zellen ist hingegen signifikant. Infizierte Zellen sind aufgrund der großen parasitären Vakuole leicht zu erkennen, auch wenn noch viele, nicht in die Zellen eingedrungene Sporozoitien auf den Zellen lagen.

Wurden die Sporozoitien auf die Zellen gegeben, so fingen sie erst nach einer gewissen Zeit an, sich zu bewegen. Das Eindringen in die Zellen erfolgte dann relativ rasch. Die Zeiten dafür reichten von etwa 2 Sekunden bis etwa eine Minute, und sind von Fleyer und Hammund schon 1967 ermittelt worden. Sie konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch dass Sporozoitien die Zellen wieder verließen und in andere Zellen wieder eindrangten, konnte beobachtet werden. Dieses geschah in seltenen Fällen innerhalb der Zeit, in der die Infizierungen beobachtet wurden, und vor allem nach Zugabe des Ionophors A23187 (10 μ mol) und von Nicotin-di-d-tartrat (0,5 - 1 mmol). Nach Zugabe dieser Detergenzien verließen Sporozoitien selbst 20 Tage nach Infektion die BSLEC und

VERO-Zellen. Dies zeigt deutlich, dass erstens die Sporozoiten in VERO-Zellen längere Zeit vital bleiben, auch wenn es zu keiner Weiterentwicklung zum Schizonten kommt, und dass zweitens sich entweder nicht alle vitalen Sporozoiten gleichzeitig in BSLEC entwickeln (Wartestadien) bzw. dass es möglicherweise bewegungsfähige, aber entwicklungsunfähige Sporozoiten gibt (Abb. E22).

In VERO-Zellen war die parasitophore Vakuole bereits nach vier Stunden deutlich zu sehen und blieb über 20 Tage erhalten. Wurde der Zellverband sehr dicht, nahm der Durchmesser der Vakuolen ab. Dabei ist zu bedenken, dass im dichten Zellverband die einzelnen Zellen immer weniger Fläche einnehmen.

3.2 Fluoreszenzintensitäten der Zytoskelettkomponenten

Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten bei BSLEC und BUVEC zeigt deutlich, dass mit zunehmender Infektionsdauer und Reifung des Schizonten die gemessenen Intensitäten sich im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen erhöhten. Damit ist gezeigt, dass es einhergehend mit der Entwicklung des Parasiten zu einer Vermehrung von Aktin, Mikrotubuli und azetylierten Mikrotubuli in den infizierten Zellen kam. Diese Zunahme wurde erst nach dem zehnten Infektionstag deutlich. Bis etwa zum sechsten Tag kam es zu keiner Veränderung des Zytoskeletts. Erst bei der Umwandlung des Sporozoiten zum Trophozoit ließen sich Veränderungen erkennen, aber nicht messen. Da die Messungen immer die ganze Zelle einschlossen, trat das Phänomen auf, dass eine Vermehrung der Zytoskelettkomponenten um den Parasiten herum und die durch den Parasiten gebildete Aussparung sich in den Intensitäten gegenseitig aufhoben (Abb. E12, E14, E17). Häufig kam es zu dieser Zeit zu einer Verformung des Zellkerns. Diese Verformung des Zellkerns ließ sich auch bei VERO-Zellen erkennen und ist hier nur auf die parasitophore Vakuole zurückzuführen.

Die Anzahl der Messungen sind in Tabelle E1 aufgeführt.

Tab. E1: Durchgeführte Messungen

α -Tubulin	20 Tage n=22	15 Tage n=17	8 Tage n=25	3 Tage n=17
azetyliertes Tubulin	20 Tage n=17	15 Tage n=9	8 Tage n=23	3 Tage n=14
Aktin	20 Tage n=19	15 Tage n=12	8 Tage n=22	3 Tage n=17

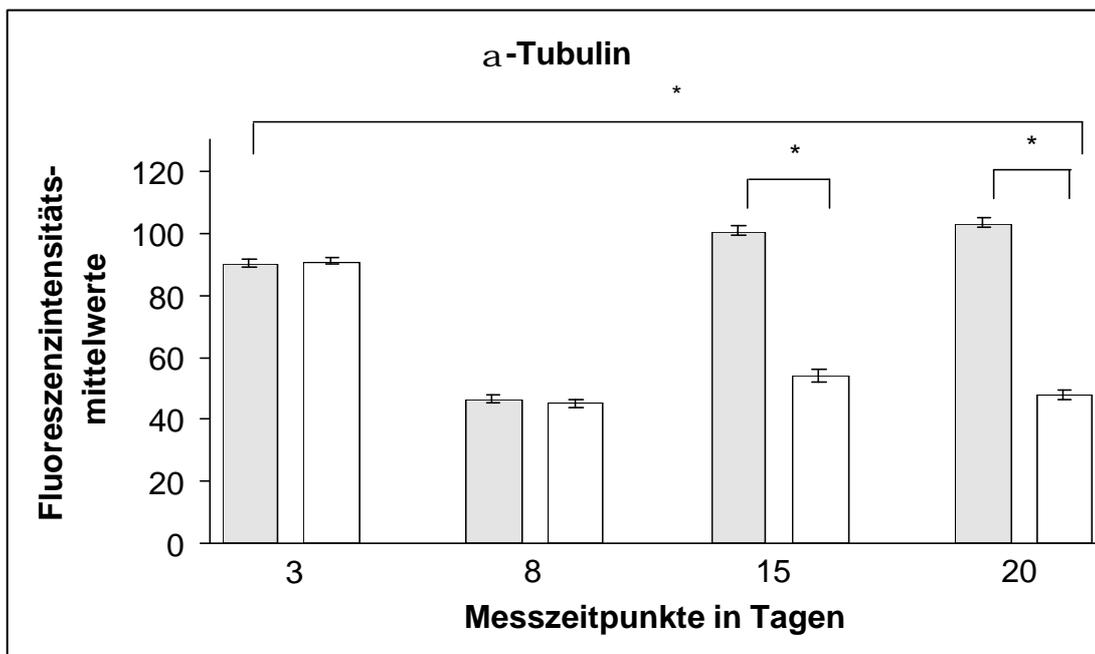


Abb. E1: Fluoreszenzmessung des α -Tubulins infizierter (gestreift) und nicht infizierter (weiß) BSLEC an den Tagen 3, 8, 15, 20 nach der Infektion – post infectionem (p.i.) Sterne und Klammern in dem Balkendiagramm zeigen statistisch relevante Unterschiede.

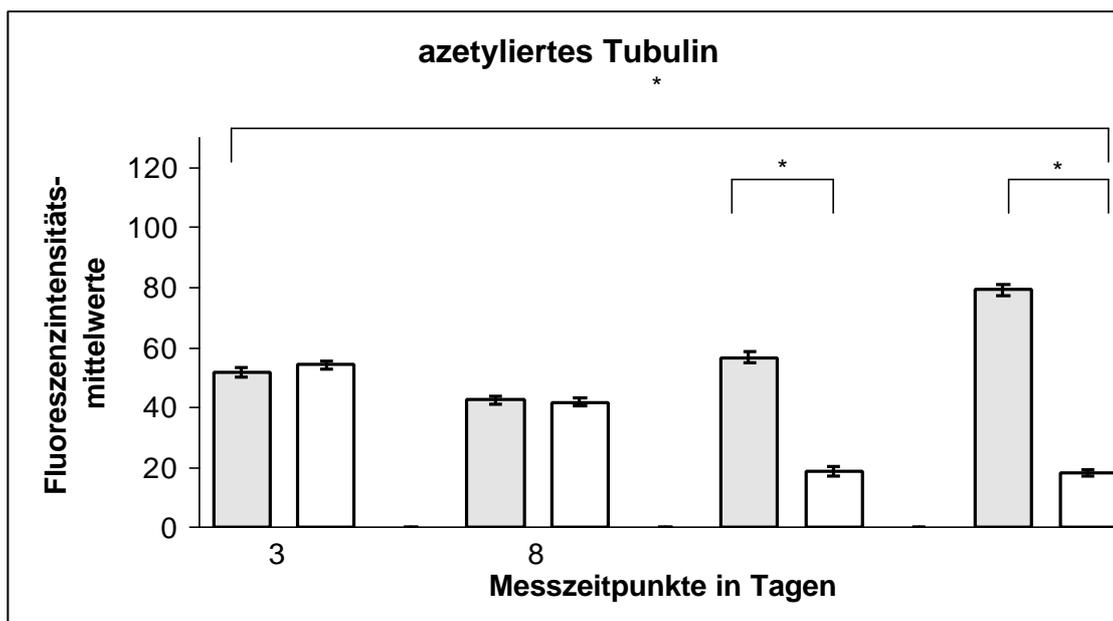


Abb. E2: Fluoreszenzmessung des azetylierten Tubulins infizierter (gestreift) und nicht infizierter (weiß) BSLEC an den Tagen 3, 8, 15, 20 p.i. Sterne und Klammern in dem Balkendiagramm zeigen statistisch relevante Unterschiede.

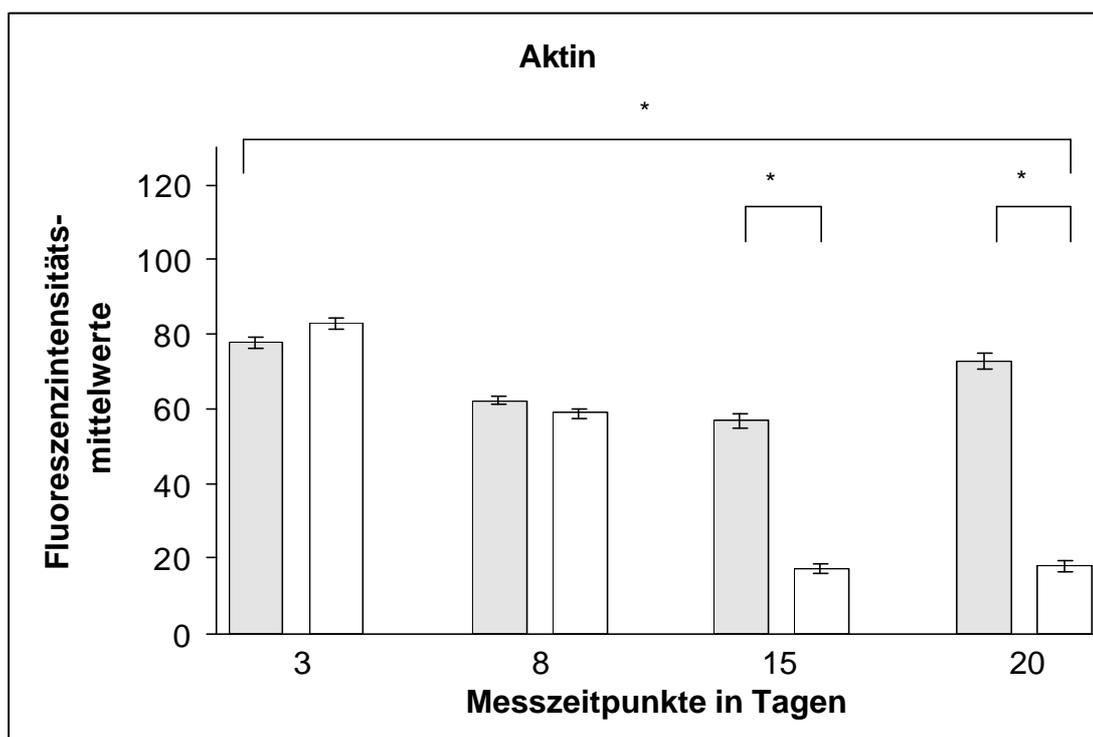


Abb. E3: Fluoreszenzmessung des Aktins infizierter (gestreift) und nicht infizierter (weiß) BSLEC an den Tagen 3, 8, 15, 20 p.i. Sterne und Klammern in dem Balkendiagramm zeigen statistisch relevante Unterschiede.

Die Balkendiagramme zeigen die Fluoreszenzintensitäten von infizierten Zellen (linke Balken) und nicht infizierten Zellen (rechte Balken) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *Eimeria bovis*-Sporozoit. Aufgrund der Anfärbung durch spezifische Antikörper gegen α -Tubulin, azetyliertes Tubulin und des spezifisch an filamentöses Aktin bindenden Phalloidins ließ sich hier eine Zunahme aller drei Komponenten während der Entwicklung des Parasiten vom Sporozoit hin zum Schizonten zeigen. Der Unterschied von infizierten zu nicht infizierten Zellen fiel 20 Tage nach der Infektion am größten aus. Etwas geringer waren die Unterschiede 15 Tage nach der Infektion. Dies galt sowohl für α -Tubulin und azetyliertes Tubulin als auch für die Aktinfilamente.

Am achten Tag der Infektion trat in allen drei Fällen ein Phänomen auf, das sich mit der Messung der Fluoreszenzintensität der ganzen Zelle nicht darstellen ließ: Eine mögliche Vermehrung des Zytoskeletts am Rande der parasitären Vakuole wurde durch die Aussparung im Zytoskelett, die durch die Volumenzunahme der Vakuole verursacht wurde, überdeckt (Abb. E12 und Abb. E14). Von einer zusätzlichen Intensitätsmessung um den Parasiten herum wurde abgesehen, da in jeder Zelle Stellen mit höherer und niedriger Fluoreszenzintensität vorkamen und damit ein Vergleich mit einer nicht infizierten Zelle nicht aussagefähig war.

Die Sterne und Klammern in den Balkendiagrammen zeigen auf, wo es statistisch relevante Unterschiede gab. So sind innerhalb der Messtage 15 und 20 die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen sowie die Zunahme der Fluoreszenzintensität zwischen Tag 20 und Tag 15 gegenüber den Messtagen 3 und 8 statistisch relevant und besitzen eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,0001$. Eine Ausnahme liegt bei den p-Werten für azetyliertes Tubulin vor. Zwischen den Messtagen gilt $p = 0,0079$, für die Unterschiede infizierter und nicht infizierter Zellen ist auch hier $p < 0,0001$.

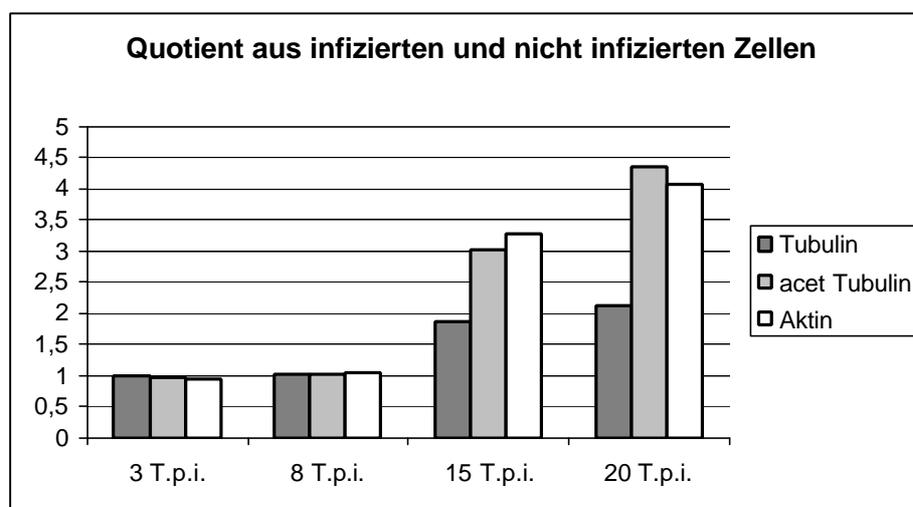


Abb. E4: Quotienten aus den Daten der Abb. E1, E2 und E3.

Die Abb. E4 veranschaulicht den Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Man erkennt, dass die Werte an den Tagen 3 und 8 etwa bei 1 lagen, es also noch keine Unterschiede gab und bei den Tagen 15 und 20 die Unterschiede immer größer wurden.

Im Gegensatz dazu kam es in den VERO-Zellen nicht zu einer Vermehrung von Aktin oder Tubulin.

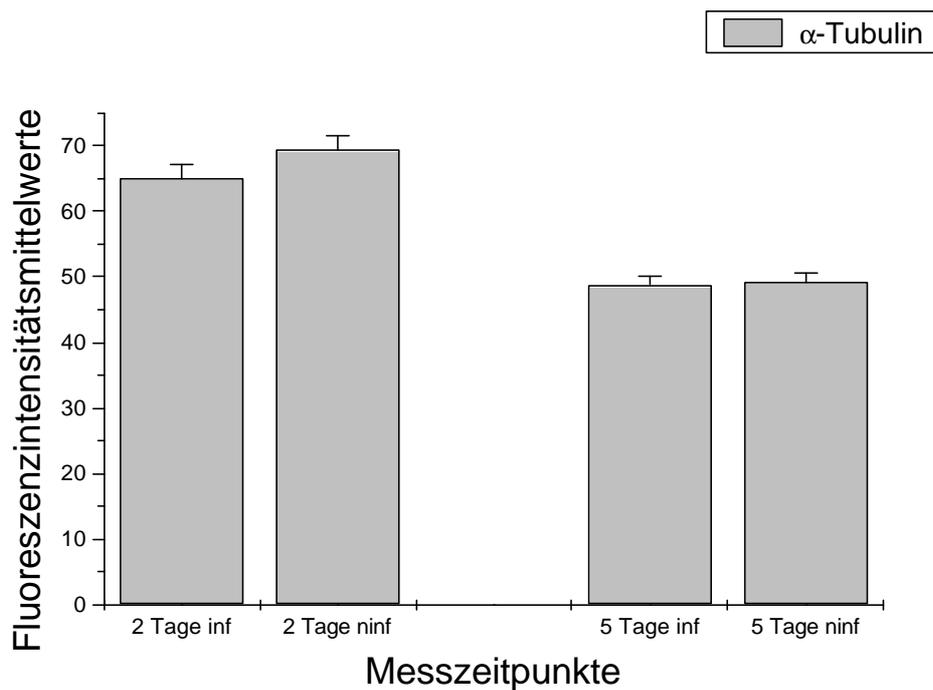


Abb. E5a: Fluoreszenzmessung des α -Tubulins von infizierten (inf) und nicht infizierten (ninf) VERO-Zellen an den Tagen 2,5 p.i.

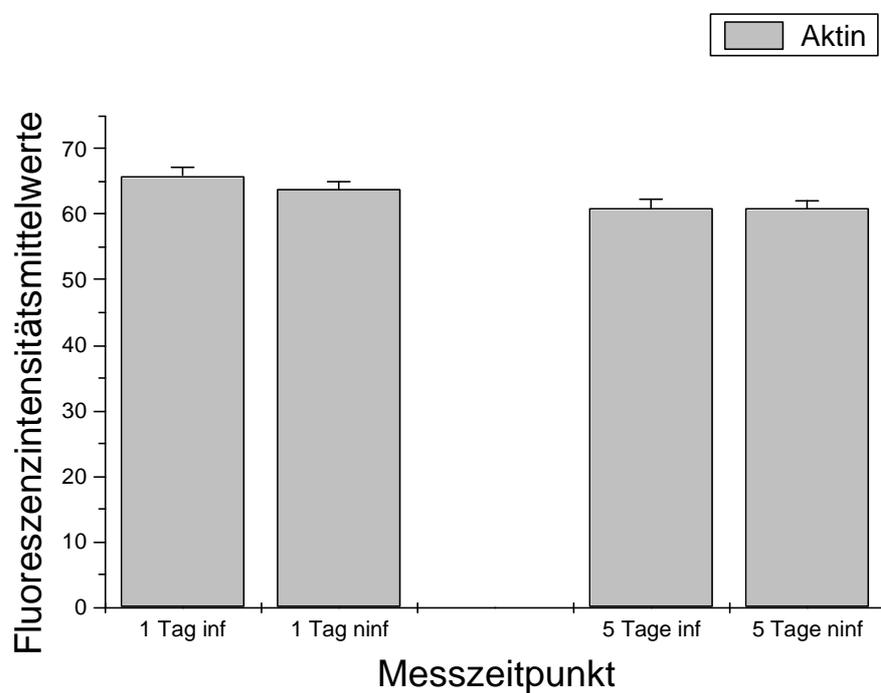


Abb. E5b: Fluoreszenzmessung des Aktins von infizierten (inf) und nicht infizierten (ninf) VERO-Zellen an den Tagen 1,5 p.i.

Azetyliertes Tubulin wurde in VERO-Zellen nur am Tag eins gemessen. Da hier der Vergleich mit einem weiteren Tag fehlt, ist diese Messung nicht statistisch bearbeitet

worden. Die Mittelwerte und deren Standardfehler von infizierten und nicht infizierten Zellen waren aber beinahe identisch.

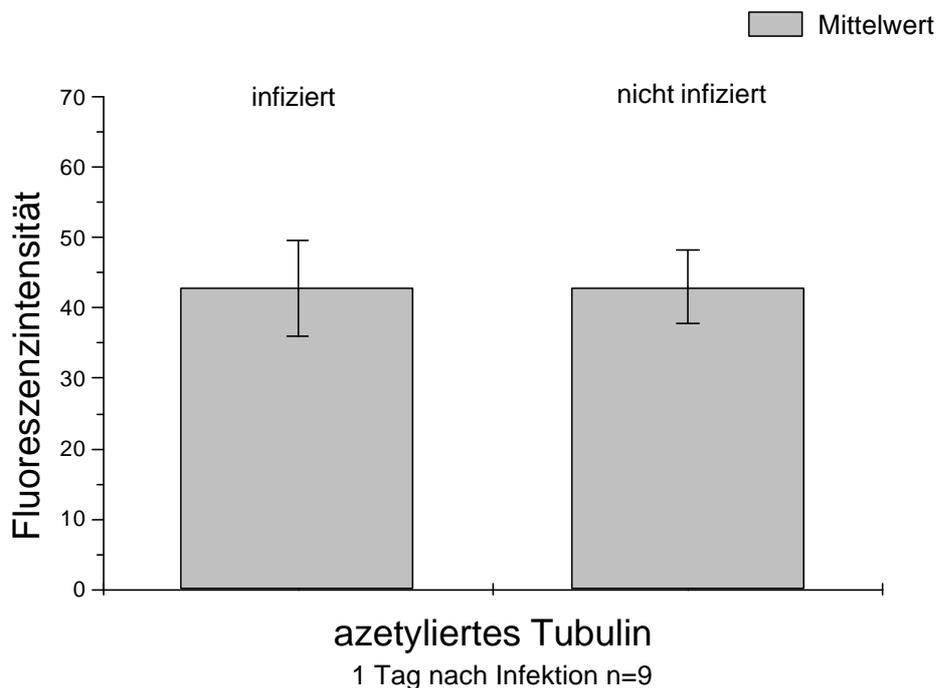


Abb. E5c: Fluoreszenzmessung des azetylierten Tubulins von infizierten und nicht infizierten VERO-Zellen am Tag 1 p.i.

Es sei hier erwähnt, dass es aufgrund der fehlenden Weiterentwicklung von *Eimeria bovis*-Sporozoitin in den VERO-Zellen zu keiner Veränderung der parasitophoren Vakuole (PV) kam. Dies galt für den gesamten Zeitraum der Infektion bis zu Tag 20.

3.3 Konfokalaufnahmen

Die nachfolgenden Abbildungen veranschaulichen die Ergebnisse, die in den Balkendiagrammen dargestellt wurden.

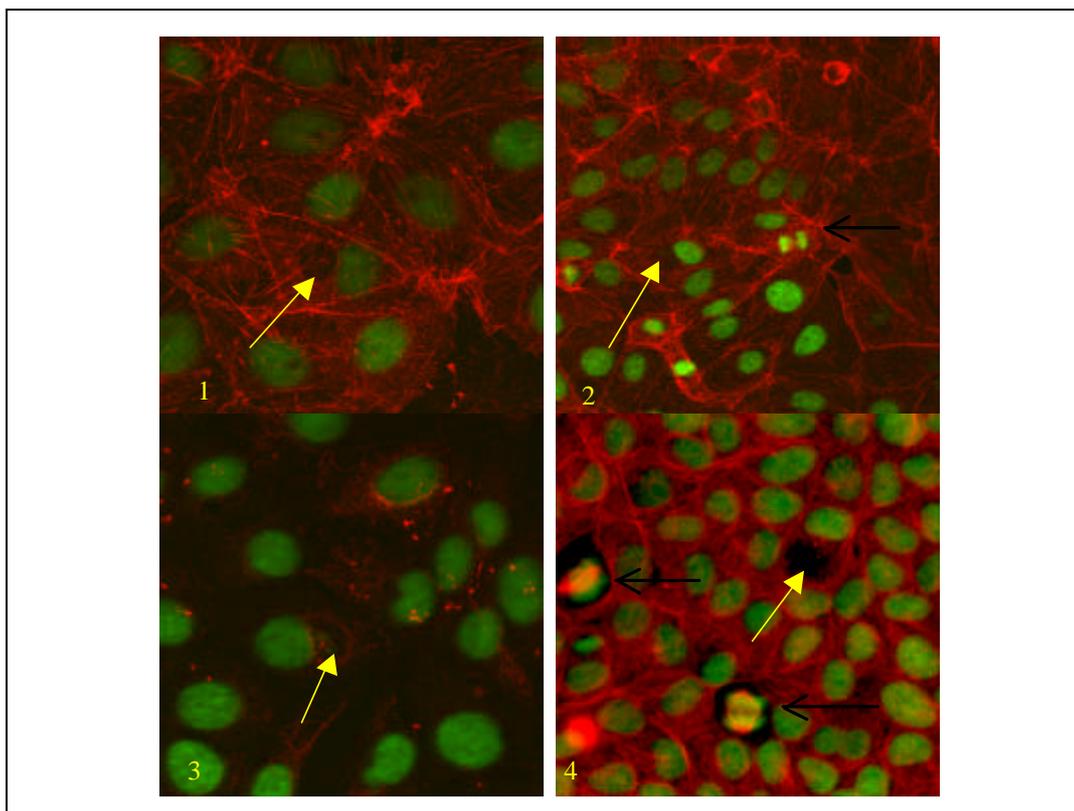


Abb. E6: Infizierte VERO-Zellen mit angefärbten Kernen sowie in Bild 1) Aktin und PV (gelber Pfeil), Bild 2) Aktin, PV (gelber Pfeil) und Mitose (schwarzer Pfeil), Bild 3) azetyliertes Tubulin, PV (gelber Pfeil) mit Sporozoit, Bild 4) Tubulin, PV (gelber Pfeil) und Mitosen (schwarzer Pfeil).

In Abb. E6 zeigt Bild 1 VERO-Zellen einen Tag nach der Infektion. Eine parasitophore Vakuole ist in der Mitte des Bildes sichtbar. Das filamentöse Aktin wurde mit FITC konjugiertem Phalloidin angefärbt. Bild 2 zeigt ebenfalls eine PV in der Zelle links neben der Mitose. Die auseinandergezogenen Chromosomen sind deutlich zu erkennen. Diese Zellen sind ebenso mit Phalloidin gefärbt. Bild 3 zeigt eine PV, wie sie sich bei einer Anfärbung des azetylierten Tubulins darstellt. Innerhalb der PV ist sogar der Sporozoit zu erkennen. Azetyliertes Tubulin liegt in einem dichten Zelllayer nur in geringem Maße vor. Bild 4 zeigt das α -Tubulin der VERO-Zellen. Deutlich sind die große PV und die Mitosen zu erkennen.

In allen Fällen zeigte sich, dass es zu keiner signifikanten Vermehrung des Zytoskeletts bei VERO-Zellen um die parasitäre Vakuole (PV) kam (siehe Abb. E5a, E5b, E5c).

Wie in den VERO-Zellen lagen auch in den BSLEC und BUVEC die eingedrungenen Sporozoitien meist neben dem Zellkern. Allerdings bietet die Vakuole in den VERO-Zellen Platz und Gelegenheit für den Sporozoitien, sich zu bewegen, und so findet man diese Sporozoitien bei längerer Beobachtung an verschiedenen Stellen innerhalb der Vakuole. In den Endothelzellen blieben die Sporozoitien etwa 6 bis 8 Tage deutlich sichtbar. Danach

rundeten sie sich ab, wurden zu Trophozoiten und entwickelten sich weiter zu Schizonten. Sie waren dann in einem normalen Lichtmikroskop nur schwer zu erkennen. Mit fortschreitender Entwicklung erreichten die Schizonten dann Größen von über 100 µm und waren mit bloßem Auge auszumachen.

Die Färbung mit dem DNA Farbstoff H33342, der in der kleinen Furche der DNA α -Helix bindet (Satz et al. 2001, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1999), färbte neben den Zellkernen der Wirtszellen auch den Kern der Sporozoiten (besonders deutlich Abb. E15 und E16). Damit konnte gezeigt werden, dass die Sporozoiten meist in der Nähe des Wirtszellkerns lagen. In infizierten VERO-Zellen war der Wirtszellkern meist halbmondförmig deformiert. In BSLEC oder BUVEC trat eine Deformation des Kerns mit der Entwicklung des Schizonten auf und war dann ebenfalls meist halbmondförmig (z.B. Abb. E31B). Bei fortschreitender Größenzunahme des Schizonten wurde die Position des Wirtszellkerns aus dem zentralen Bereich der Zelle hinaus verlagert. Der Kern konnte sich dann lateral oder basal vom Schizonten befinden. In Ausnahmefällen wurden in dieser Arbeit Kerne apikal von Schizonten entdeckt. Infizierte Zellen, die scheinbar mehrere Wirtszellkerne oder keinen Wirtszellkern aufwiesen, traten ebenfalls auf (Abb. E9, E11). Trotz der konfokalen Lasertechnik ließen sich in diesen seltenen Fällen die Kerne nicht eindeutig zuordnen oder nicht finden. Durch das Anfärben der DNA konnte man Apoptosen und Mitosen eindeutig von infizierten Zellen unterscheiden.

Im Laufe der Entwicklung ließ sich, mit den gewählten Bedingungen, nach der Umwandlung vom Sporozoiten zum Trophozoiten keine DNA innerhalb des Schizonten anfärben. Erst mit der fortschreitenden Entwicklung der Merozoiten innerhalb des Schizonten ließen sich deren Kerne anfärben. So wurde hier am 8. Tag keine DNA in Trophozoiten gefunden (Abb. E12). Am 15. Tag konnte dann in einigen wenigen Schizonten die DNA sichtbar gemacht werden (Abb. E15).

3.3.1 Zytoskelettdarstellungen

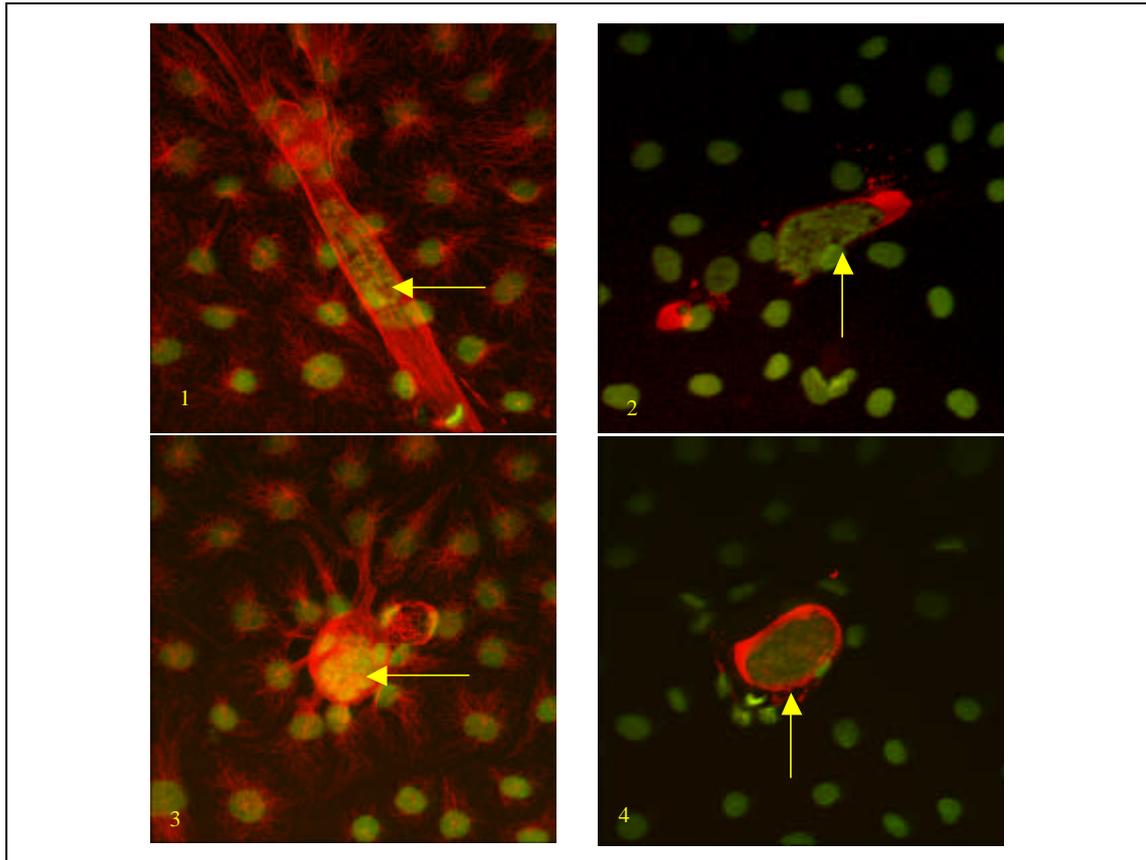


Abb. E7: Schizonten in BSLEC 20 Tage p.i. mit Kernfärbung und Kernfärbung der Merozoiten (gelbe Pfeile), Bild 1) Tubulin, Bild 2) azetyliertes Tubulin, Bild 3) Tubulin, Bild 4) azetyliertes Tubulin.

In Abb. E7 sind jeweils ein länglicher und ein runder Schizont dargestellt. Die BSLEC sind 20 Tage nach der Infektion gegen α -Tubulin (1 und 3) und azetyliertes Tubulin (2 und 4) gefärbt. In allen Fällen ist die DNA des *Eimeria bovis*-Schizonten zu erkennen. Kerne und Schizonten-DNA sind mit H333342 gefärbt. Bei diesen Bildern entspricht eine Seite des Quadrates 184 μm .

Es fällt auf, dass bei der Färbung gegen azetyliertes Tubulin „Kapsel-ähnliche“ Strukturen auftraten, die bei Färbungen gegen α -Tubulin nicht vorkamen.

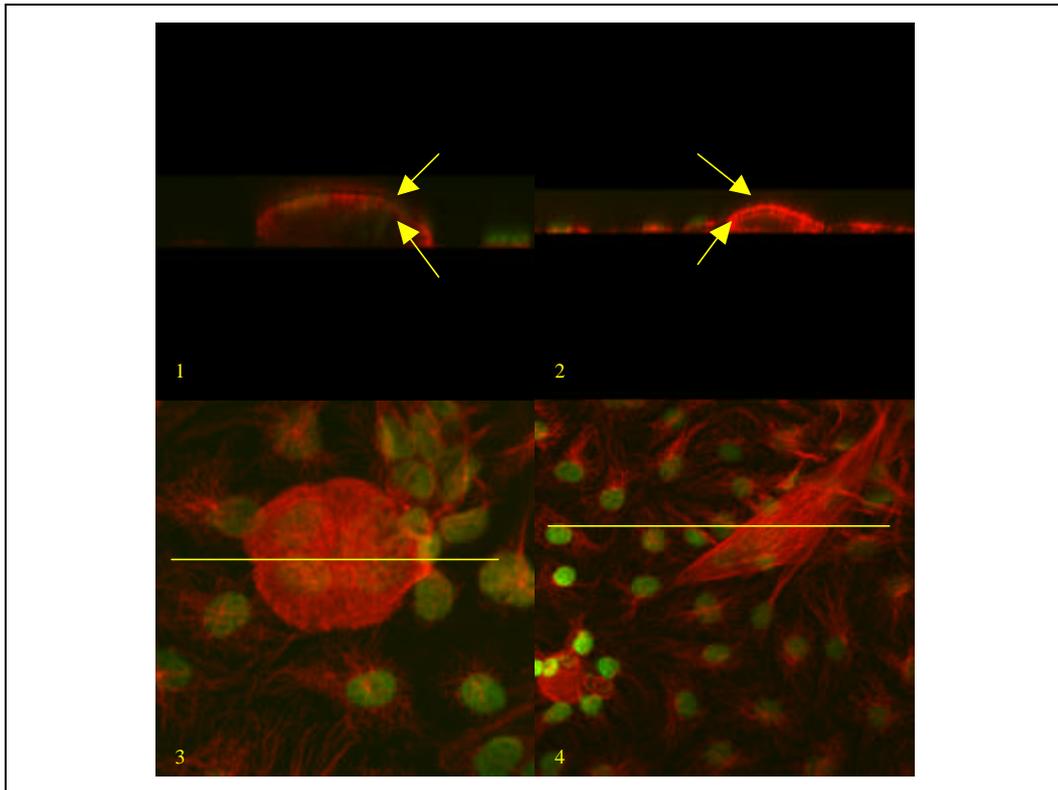


Abb. E8: Schizonten 20 Tage p.i. mit Kernfärbung, im Querschnitt Bild 1) und Bild 2) sowie in Aufsicht Bild 3) und Bild 4). Die gelben Linien repräsentieren die jeweilige Schnittlinie. Die Pfeile deuten auf eine weitere Mikrotubulischicht hin.

Abb. E8: *Eimeria bovis*-Schizonten, wie sie sich 20 Tage nach Infektion darstellen.

Oben ist ein jeweiliger vertikaler Schnitt durch den Schizonten gezeigt. Es fällt auf, dass es eventuell zwei Mikrotubulischichten gibt (Pfeile). Das könnte bedeuten, dass eine von der Wirtszelle stammt und die andere vom Parasiten induziert wäre. Oder dass es einmal Mikrotubuli um die Vakuole herum gibt, und wenn die Zelle noch über genug Zytoplasma oberhalb des Schizonten verfügt, ein „normales“, für die Zelle notwendiges Mikrotubuliskelett erhalten bleibt.

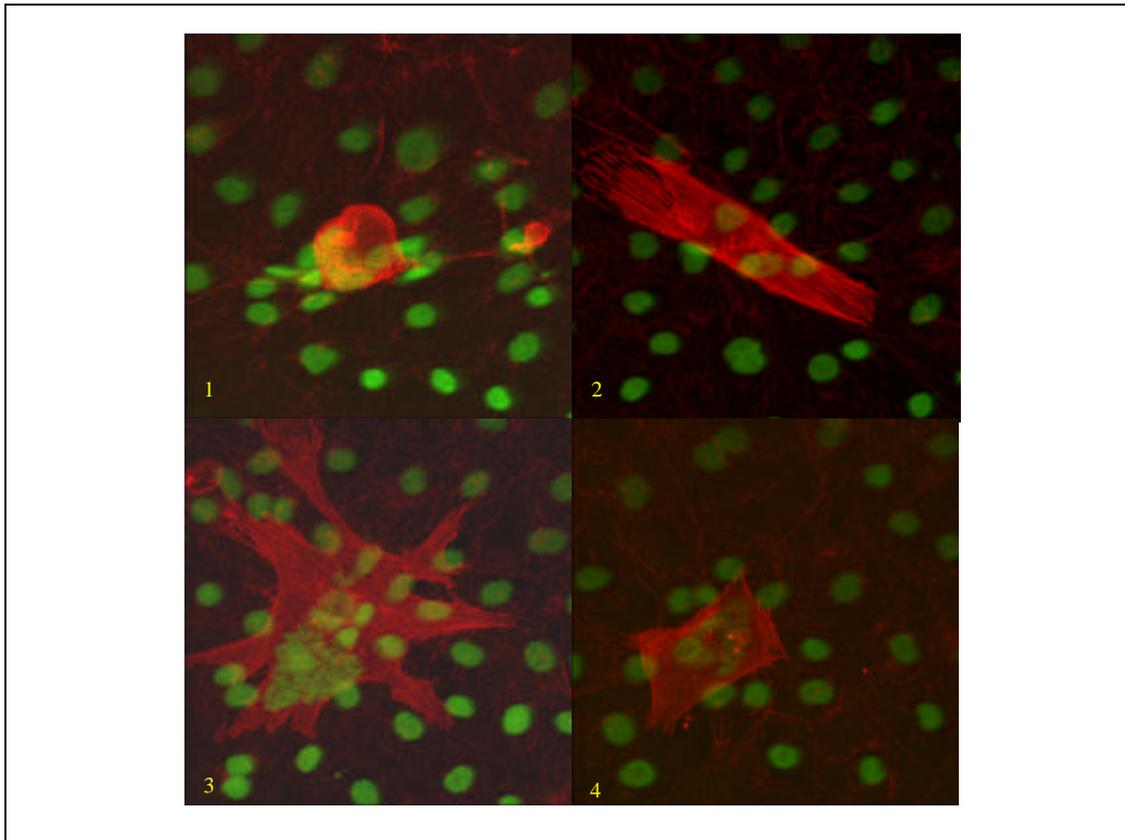


Abb. E9: Schizonten 20 Tage p.i. Kern- und Aktinfärbung. Alle Bilder mit gleicher Vergrößerung. Dies zeigt die vielfältigen Erscheinungsformen der Schizonten. Bild 3) zeigt eine scheinbar mehrkernige infizierte Zelle.

Abb. E9: Aktindarstellung von Schizonten 20 Tage nach Infektion. Diese vier Aufnahmen zeigen deutlich die Vielfältigkeit der Schizontenformen und Größen. Auffällig ist die große Helligkeit der Schizonten. Hier war es nicht möglich, die nicht infizierten Zellen in entsprechender Deutlichkeit darzustellen. Vor allem in den Bildern 3 und 4 (Abb. E9) ist die DNA der Merozoiten innerhalb des Schizonten deutlich zu erkennen. In allen Fällen beträgt die Breite eines Bildes 184 μm .

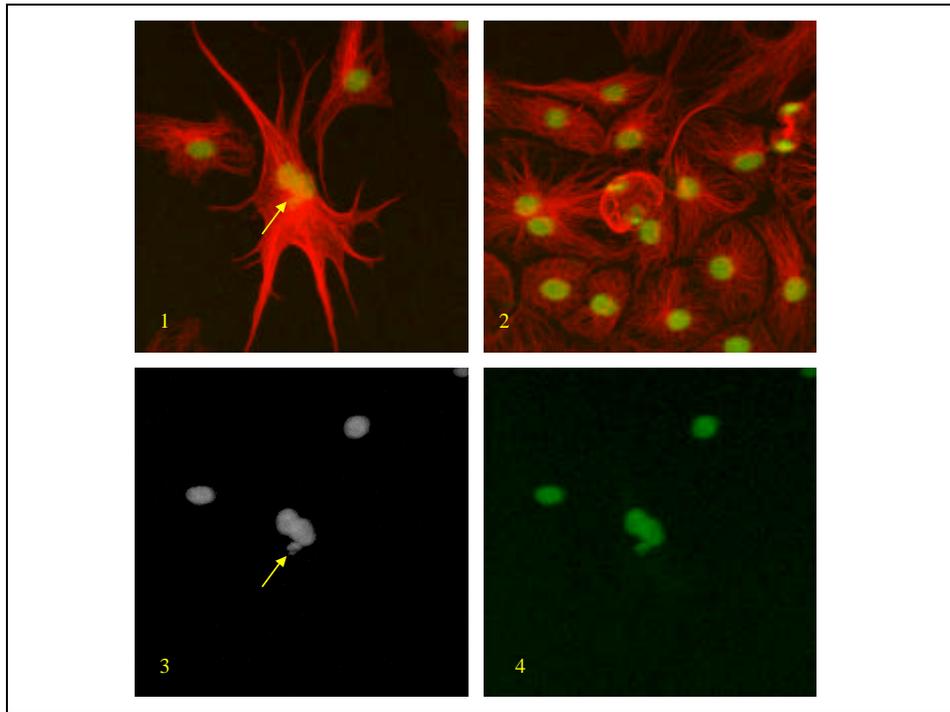


Abb. E10: Schizonten 15 Tage p.i. Tubulin- und Kernfärbung. Die DNA der Merozoiten ist nur im Ansatz zu erkennen.

Bild 1) bei der Projektion beider Kanäle übereinander ist die DNA der Merozoiten kaum zu erkennen. Bild 2) zweikammriger Schizont, Bild 3) Kanal der DNA Fluoreszenz in Grautönen und Bild 4) in der zur Darstellung ausgewählten Farbe.

Abb. E10: *Eimeria bovis*-Schizonten am 15. Tag nach der Infektion. Bereits zu diesem Zeitpunkt ließen sich Schizonten erkennen, in denen die DNA der sich bildenden Merozoiten darzustellen ist. In Bild 1 (Abb. E10) zeigt sich der Schizont in der doppelkernigen Zelle durch eine Vermehrung der Mikrotubuli in der ganzen Zelle und besonders deutlich um den Parasiten herum (Pfeil). Die DNA der Parasiten ist auf dem Bild darunter noch einmal explizit dargestellt (Pfeil). In Bild 2 (Abb. E10) ist ein Schizont mit zwei Kammern dargestellt. Ob solche Kammern auf eine Doppelinfection zurückzuführen sind oder auch von einem Sporozoiten allein erzeugt werden können, ist unbekannt.

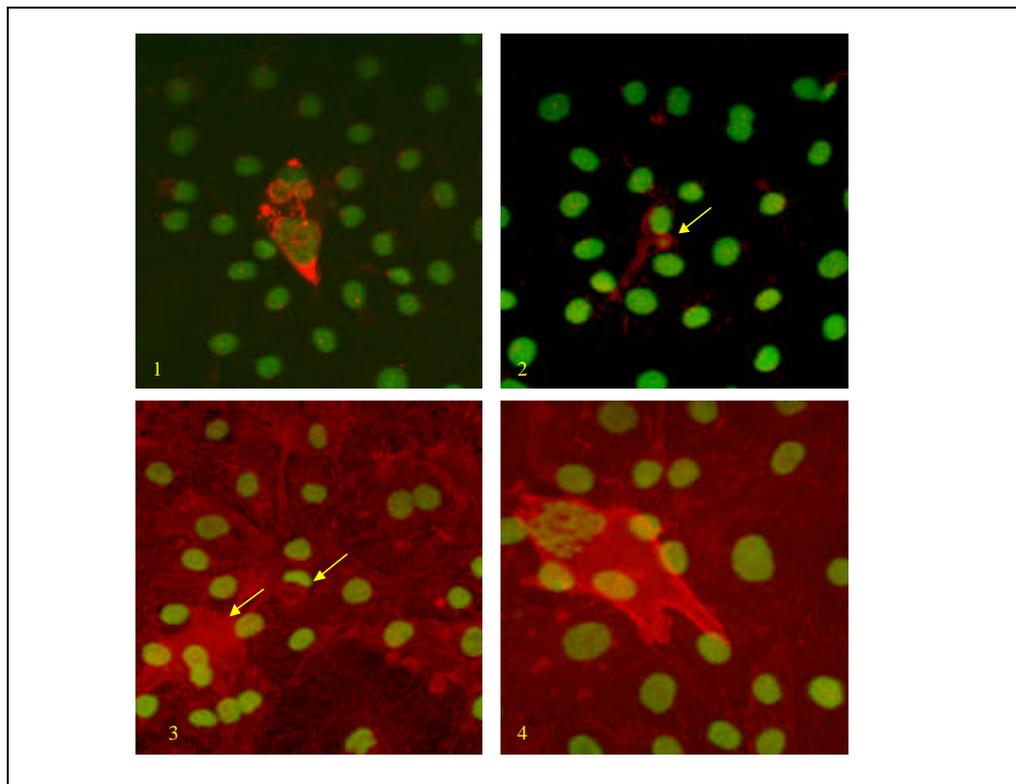


Abb. E11: Schizonten 15 Tage p.i. Angefärbt sind die Kerne und azetyliertes Tubulin in Bild 1) und Bild 2), Kerne und Tubulin in Bild 3) und Bild 4). In Bild 3) ist der Kern der Wirtszelle nicht eindeutig dem Schizonten zuzuordnen. In Bild 4) liegen die Kerne unterhalb des Schizonten. Es sieht auch in den einzelnen Schnitten so aus als hätte dieser Schizont keinen Wirtszellkern.

Abb. E11: Schizonten am 15. Tag nach der Infektion. In der Reihe oben (1 und 2) ist azetyliertes Tubulin gezeigt, darunter (3 und 4) Aktin. Es zeigte sich deutlich, vor allem auch im Vergleich mit α -Tubulin, dass azetyliertes Tubulin eher noch punktuell auftrat. Trotzdem ist die Vermehrung des azetylierten Tubulins besonders deutlich, da in einem dichten Zellverband das azetylierte Tubulin fast nicht mehr anzufärben war.

Die DNA war unterschiedlich in den Schizonten verteilt. So ist auf dem Bild 2) nur ein kleiner grüner Punkt auszumachen, der die Parasiten-DNA darstellt. In Bild 3) sind sowohl bei dem kleinen Schizonten (Mitte) als auch bei dem großen Schizonten keine Parasiten-DNA zu erkennen. Hingegen ist bei den beiden anderen Bildern eine starke Parasiten-DNA Anfärbung zu erkennen.

Die Größe des Schizonten war somit nicht unbedingt ausschlaggebend für den Entwicklungsstand des Parasiten.

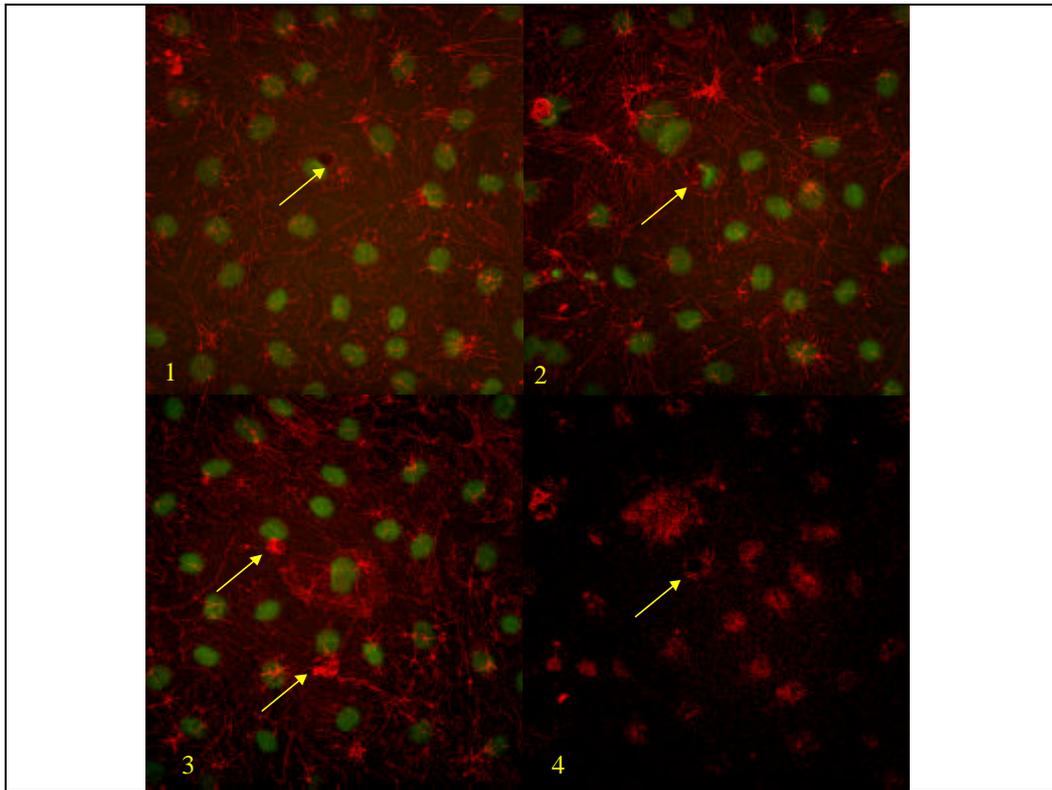


Abb. E12: Bild 1 bis 3 Aktin- und Kernfärbung in BSLEC 8 Tage p.i. Bild 4) nur Aktin eines optischen Schnittes aus Bild 2). Dieser optische Schnitt zeigt die parasitophore Vakuole, die im Overlay nicht erkennbar ist. Die Pfeile weisen auf die Parasiten.

Abb. E12: Unterschiedliche Trophozoiten von *Eimeria bovis* 8 Tage nach der Infektion von BSLEC. Am einfachsten waren diese zu erkennen, wenn sie sich wie im Bild 1) darstellten. Man erkennt hier eine dunkle Aussparung direkt am Kern. Schwieriger wird es, wenn sich Aktin auch über dem Trophozoiten bildet oder verbleibt Bild 2) (Abb. E12). Direkt darunter befindet sich ein optischer Schnitt aus dieser Messung. Auch hier ist diese Aussparung zu erkennen (Bild 4). In einigen Fällen entwickelte sich sogar relativ viel Aktin um den Trophozoiten herum. Trotzdem kam es insgesamt zu keiner eindeutigen Vermehrung des Aktins in solchen Zellen.

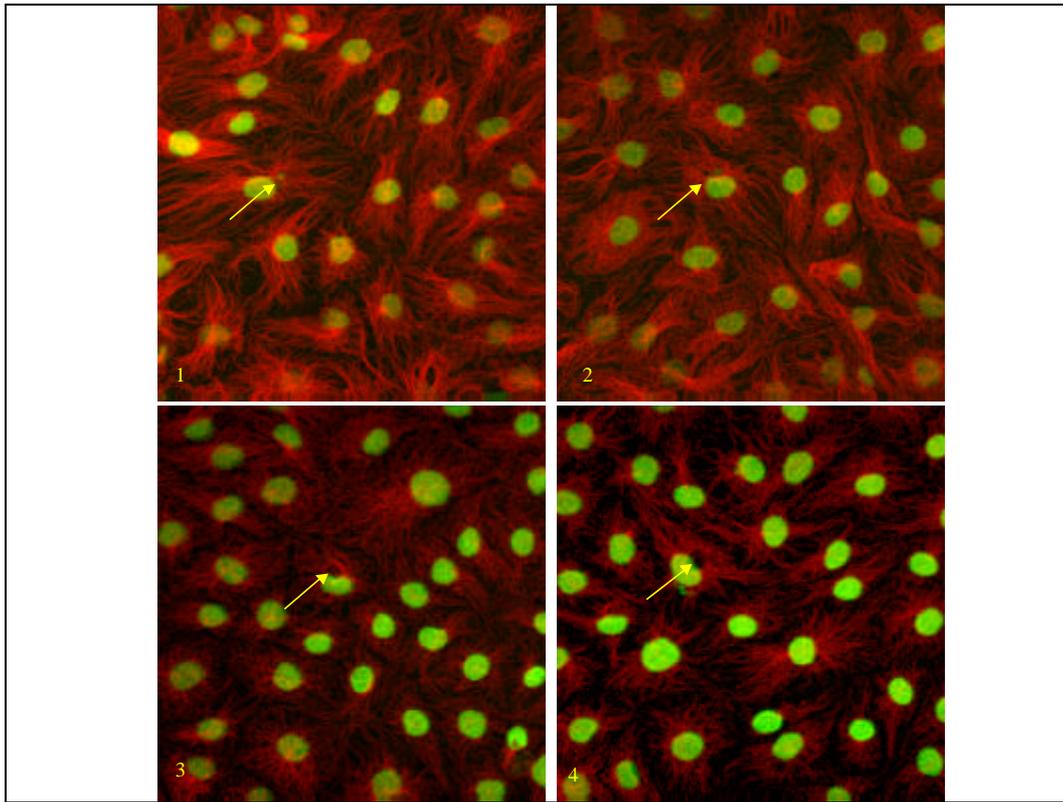


Abb. E13: Sporozoiten 3 Tage p.i. oben und 8 Tage p.i. unten in BSLEC. Alle Bilder Tubulin- und Kernfärbung. Diese Bilder zeigen, dass es zu keiner Vermehrung der Mikrotubuli um die Sporozoiten herum kommt. Sporozoiten sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

Abb. E13: Oben: *Eimeria bovis*-Sporozoiten 3 Tage nach der Infektion. Man erkennt die Sporozoiten an einer Aussparung im Zytoskelett und an ihrem gefärbten Kern.

Darunter die Situation 8 Tage nach Infektion. Die distinkten kleinen Kerne der Sporozoiten waren kaum mehr zu färben, auch bei leicht erhöhter H33342 Konzentration nicht. Es entwickelten sich größere Aussparungen im Zytoskelett, die zum Teil auch überdeckt sein konnten. In dieser Hinsicht unterscheiden sich Mikrotubuli und Aktinfilamente nicht voneinander.

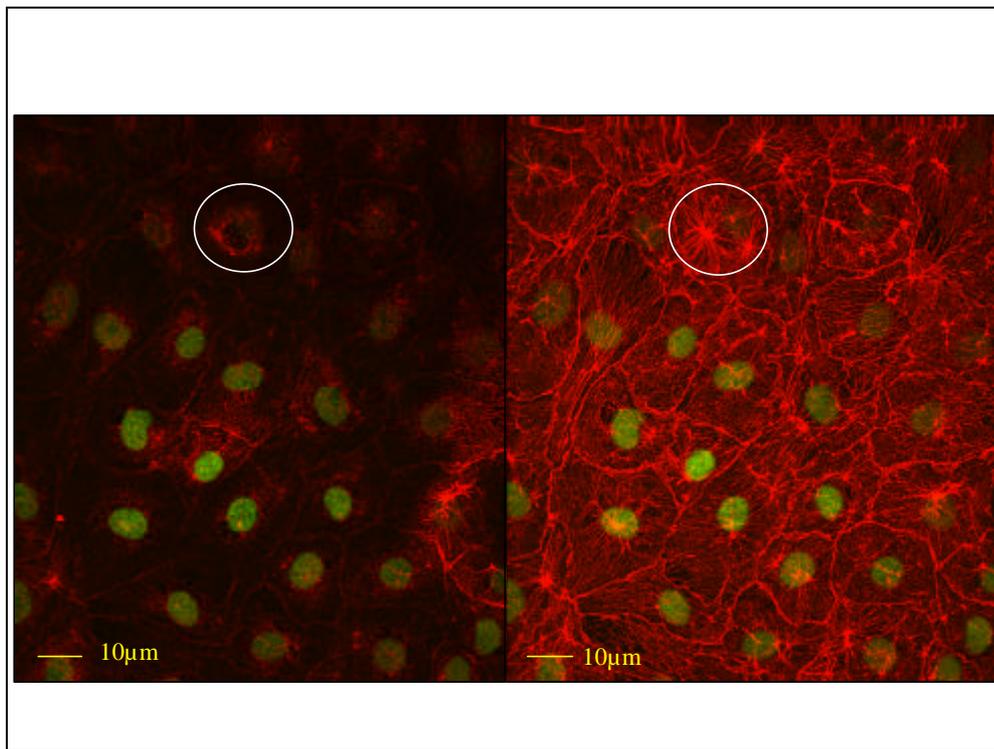


Abb. E14: Aktinfärbung 10 Tage nach Infektion in BSLEC. Nur im Schnitt (links) ist die Vakuole zu erkennen.

Nach zehn Tagen stellen sich die Schizonten noch in der Weise dar wie in Abb. E14 beschrieben. Nur durch die Möglichkeit des Konfokal-Mikroskopes, optische Schnitte anzufertigen, waren diese jungen Schizonten abzubilden.

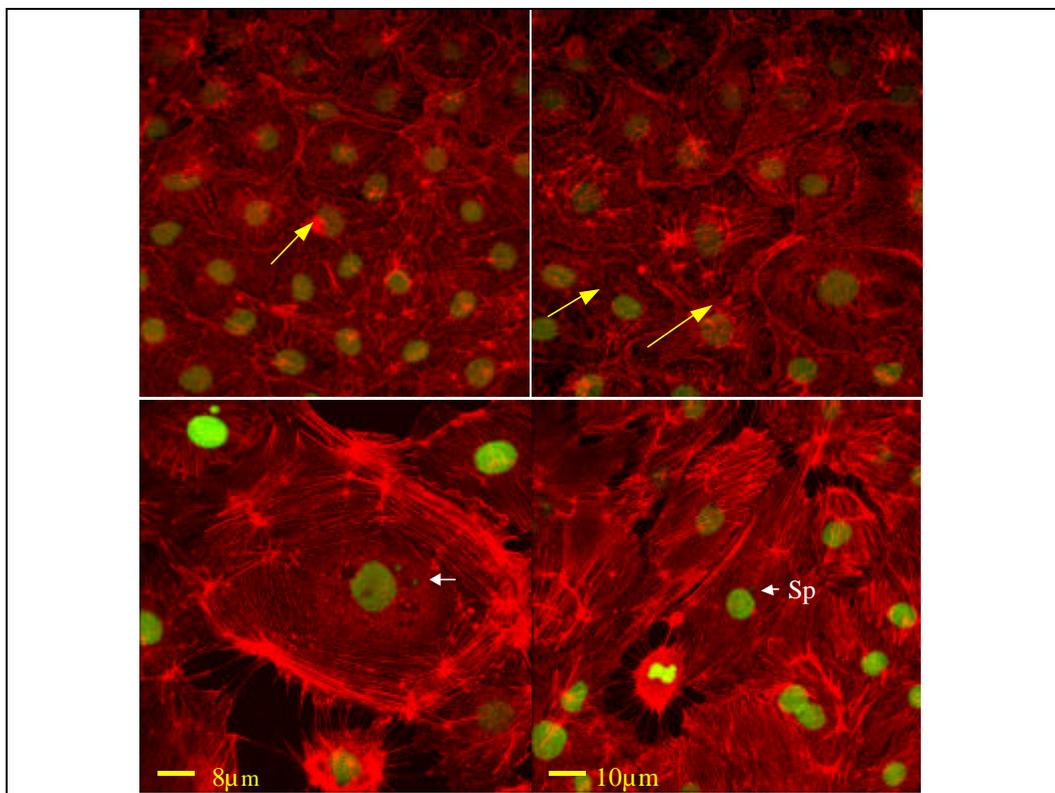


Abb. E15: Aktinfärbung in BSLEC, 8 Tage p.i. oben und 3 Tage p.i. unten. Am 8. Tag sind die Parasiten fast nicht mehr zu erkennen (gelbe Pfeile). Am 3. Tag sind die Sporoziten (weiße Pfeile) noch gut erkennbar.

Abb. E15 zeigt oben 8 Tage unten 3 Tage p.i. Diese Bilder vermitteln den Eindruck, dass die Sporozoiten plötzlich verschwinden um dann bei den Messungen am Tag 15 als Schizonten wieder zu erscheinen. Das Auffinden von Parasiten am 8. Tag war sehr viel schwieriger als die Stadien an den anderen Messtagen aufzufinden. Siehe auch Abb. E14.

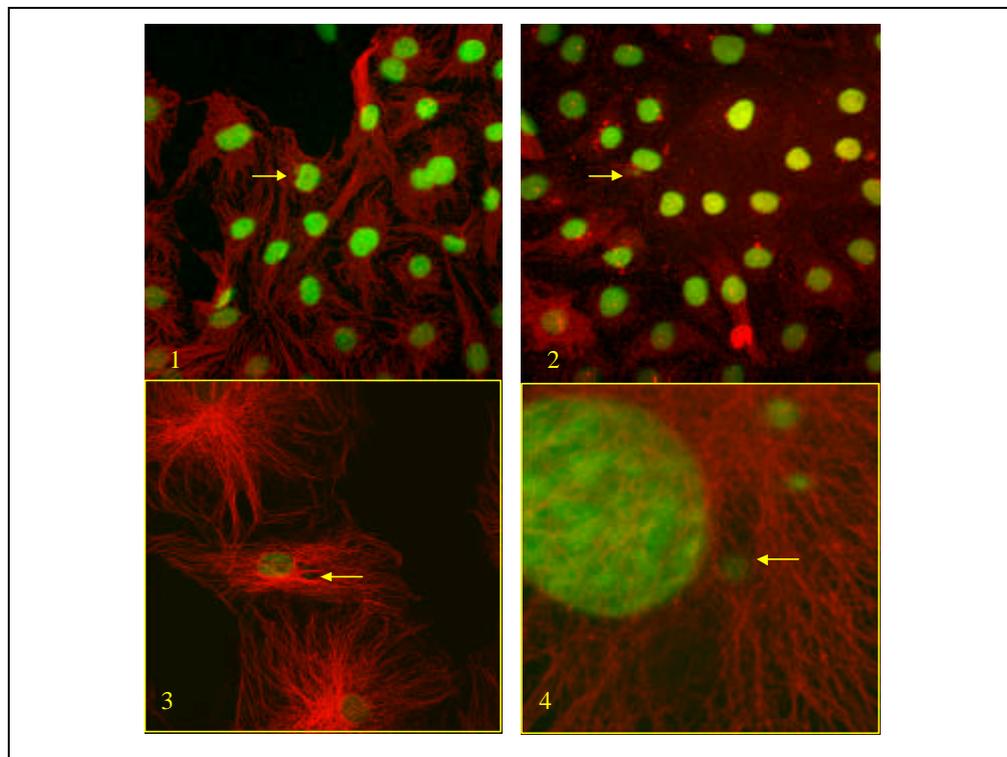


Abb. E16: Azetyliertes Tubulin oben und α -Tubulin unten 3 Tage p.i. in BSLEC. Die Sporozoiten sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Abb. E16: Sporozoiten 3 Tage nach der Infektion. Oben ist azetyliertes Tubulin gefärbt, unten α -Tubulin. In allen Fällen ist der Kern der Sporozoiten zu erkennen (Pfeile). Lagern die Zellen noch nicht in einem dichten Verband vor, war der Anteil des azetylierten Tubulins höher als in dichter gewachsenen Zellen. In einigen Fällen wie in dem Bild 1) war dann das azetylierte Tubulin kaum vom α -Tubulin zu unterscheiden. In Bild 2) sind hingegen kaum tubuläre Strukturen zu erkennen. Das Bild 3) zeigt eine doppelte Infektion. Zwei Sporozoiten haben diese Zelle infiziert und sich parallel angeordnet. Auf Bild 4) ist ein Sporozoit in höherer Vergrößerung zu sehen. Die Mikrotubuli, die man hier über dem Sporozoiten sieht, liegen basal, da die Reihenfolge der Aufnahmen hier von basal nach apikal verläuft.

In keinem der Fälle war eine Vermehrung des Zytoskeletts festzustellen.

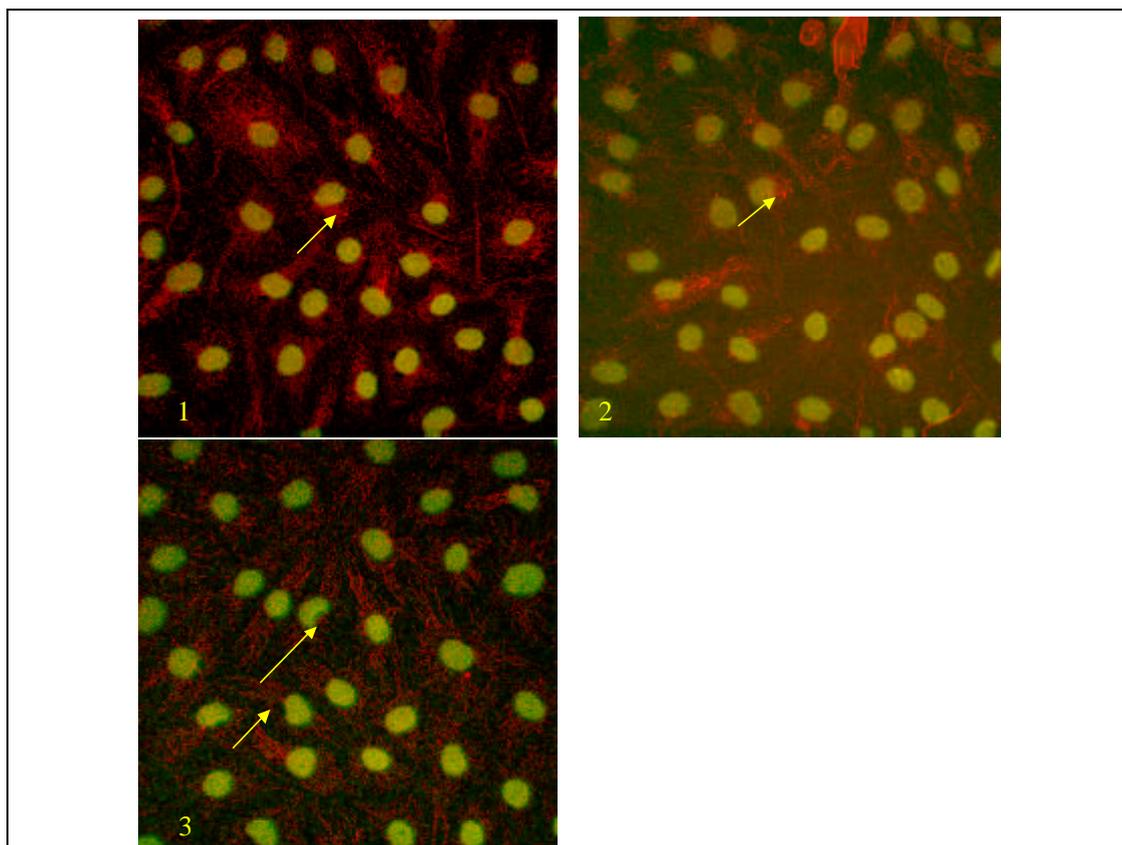


Abb. E17: Azetyliertes Tubulin 8 Tage p.i. Die unterschiedlichen Erscheinungsformen der Trophozoiten sind durch Pfeile markiert.

Abb. E17 zeigt Schizonten am 8. Tag nach Infektion, gleich Trophozoiten. Dargestellt durch Färbung von azetyliertem Tubulin. Die Schizonten stellen sich folgendermaßen dar: als recht kompakte Färbung (Bild 1), als Stelle intensiver gefärbter azetylierter Mikrotubuli, die einzelnen Mikrotubuli sind dabei zu erkennen (Bild 2), oder als Aussparungen wie im Bild 3) zu sehen. Diese unterschiedlichen Erscheinungsformen erschwerten das Auffinden der Parasiten in diesem Entwicklungsstadium.

3.3.2 Membrananfärbung

Beim Anfärben von Zellen mit dem Farbstoff FM 1-43 zeigte sich, dass sich die Vakuolenmembran mit dieser Methode als Trennmembran darstellen lässt. Färbte man bereits infizierte Zellen, ließen sich die *Eimeria*-Sporozoitinnen innerhalb der Vakuole nicht anfärben (Abb. E21). Da die Sporozoitinnen eine sehr hohe Affinität zu diesem Farbstoff zeigten, kann dies als sicherer Hinweis gelten, dass es zu keiner Vesikelschmelzung mit der Vakuolenmembran kam. Mit diesem Farbstoff ließen sich Sporozoitinnen anfärben, ohne dass deren Infektionsfähigkeit verloren ging. Allerdings ließ sich bei Versuchen, bei denen gefärbte Sporozoitinnen zu den VERO-Zellen gegeben wurden, überflüssiger Farbstoff nicht soweit von den Sporozoitinnen entfernen, dass das Anfärben der VERO-Zellen zu unterbinden war. Zum vollständigen Entfernen wären deutlich mehr Zentrifugationsschritte nötig, diese

beeinträchtigen aber die Infektionsfähigkeit der Sporozoiten. Für die sehr eng an den Sporozoiten anliegenden Vakuolen in BSLEC und BUVEC war diese Methode weniger gut geeignet.

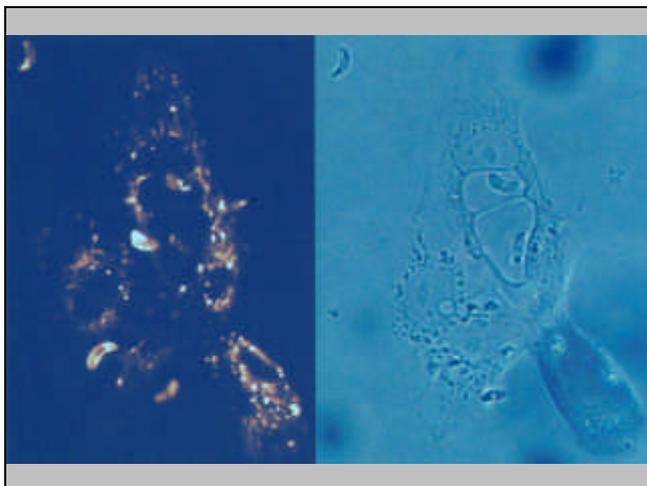


Abb. E18: Fluoreszenzbild von VERO-Zellen und *E. bovis* Sporozoiten nach einer gleichzeitigen Anfärbung mit dem Farbstoff FM 1-43 (links) und rechts ist die selbe Stelle im Lichtbild gezeigt.

Abb. E18: VERO-Zellen und Parasiten sind zeitgleich angefärbt. Man erkennt deutlich, dass die Parasiten angefärbt sind. Daraus ergibt sich, dass die Sporozoiten mit dem Farbstoff auf ihrer Oberfläche in der Lage waren, in die Zelle einzudringen.

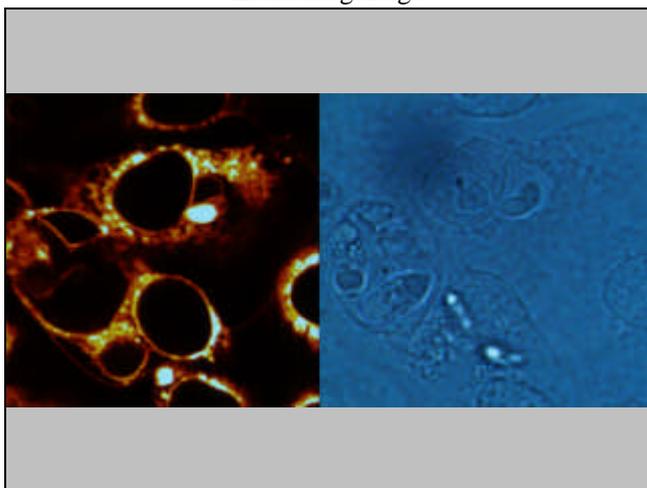


Abb. E19: Fluoreszenzbild von VERO-Zellen und *E. bovis* Sporozoiten nach Zugabe von vorab mit FM 1-43 gefärbten Sporozoiten.

Abb. E19: Hier wurden die Parasiten erst mit FM 1-43 angefärbt und dann zu den Zellen gegeben. Dies zeigt die Vitalität der Parasiten trotz der Anfärbung. Bei dieser Anfärbemethode befand sich offensichtlich genug Farbstoff im System, um die Zellen auch noch anzufärben.

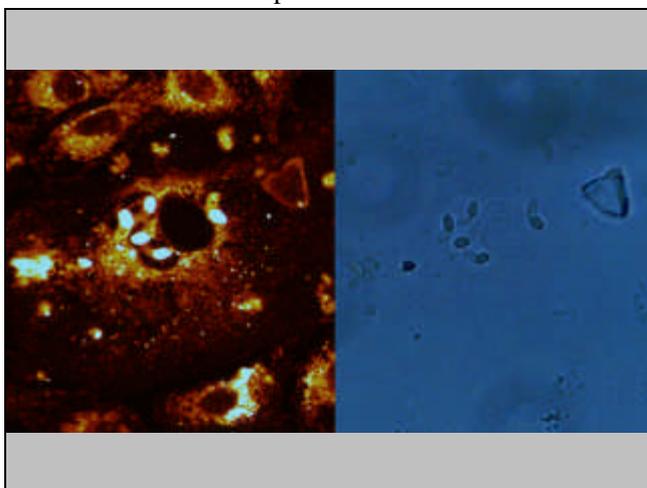


Abb. E20: Infektion von bereits mit FM 1-43 gefärbten VERO-Zellen.

Abb. E20: Wurden die Zellen vor der Infektion gefärbt, nahmen die Sporozoiten beim Eindringen in die Zelle den Farbstoff an und leuchteten daher innerhalb der Vakuole. Die Färbung der Vakuolenmembran erschien allerdings bei allen angewandten Verfahren gleich.

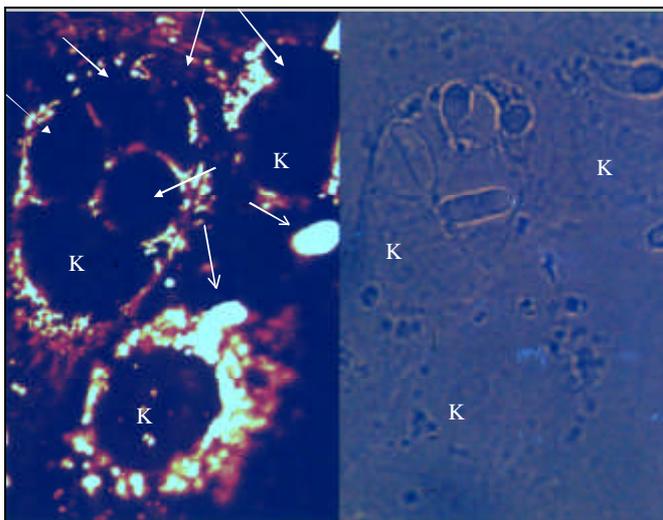


Abb. E21: Färbung von bereits infizierten VERO-Zellen.

Abb. E21: Hier sind die infizierten Zellen gefärbt worden. Die Parasiten lassen sich innerhalb der Vakuole nicht mehr anfärben. Die Pfeile deuten auf die Parasiten. Die zwei Sporozysten, die nicht in einer Vakuole liegen, sind deutlich gefärbt (offene Pfeile). Mit K sind die Kerne der Zellen markiert.

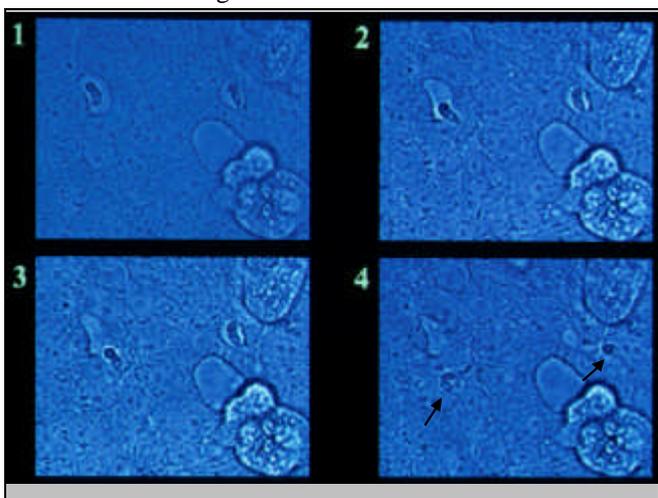


Abb. E22: Egress von Sporozysten nach Gabe des Calciumionophors A23187. Die Pfeile markieren die Sporozysten nach dem Verlassen der Vakuole.

Abb. E22: Diese Abbildung zeigt den Egress von *Eimeria bovis*-Sporozysten nach der Zugabe des Calciumionophors A23187. Man erkennt deutlich, dass die Parasiten sich durch die Vakuolenmembran hindurchzwängen (Bild 3). Dieser Egress konnte noch 20 Tage nach der Infektion induziert werden, ein Beleg, dass die Sporozysten noch lange in den VERO-Zellen lebensfähig waren, obwohl sie sich nicht weiterentwickelten. Die Abbildung zeigt einen Egress 72 Stunden nach Infektion mit gefärbten Sporozysten. Dies ist ein Beleg, dass die Vitalität der Sporozysten nicht wesentlich beeinträchtigt ist. Die Pfeile weisen auf die beiden Sporozysten nach dem Verlassen der Vakuole. Diese bleibt nach dem Egress erhalten. Die gefärbten Sporozysten sind in Abb. E23 zu sehen.

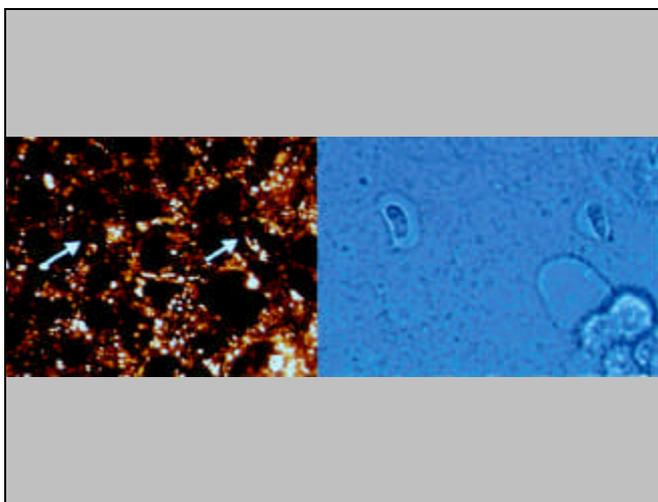


Abb. E23: Fluoreszenzbild der selben Sporozysten wie in Abb. E22 vor dem Egress.

Abb. E23: Gefärbte Parasiten, 72 Stunden nach Infektion. Hier sind die Sporozysten vor Zugabe des Ionophors A23187 gezeigt. Die Pfeile deuten auf die gefärbten Parasiten innerhalb der Vakuole.

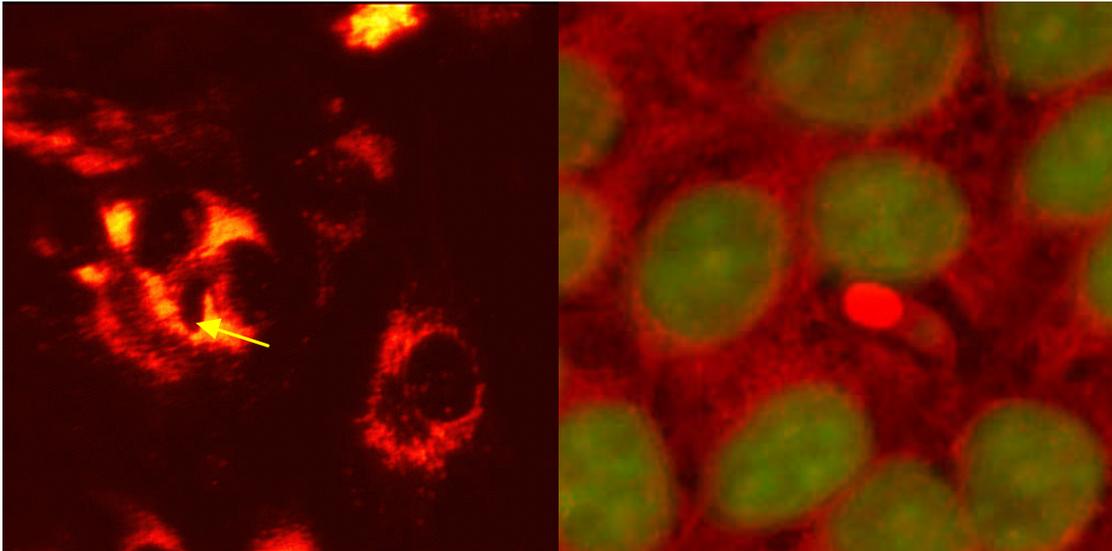


Abb. E24: BSLEC, gefärbt mit dem Membranfarbstoff FM 1-43. Der Pfeil im linken Bild zeigt den nicht gefärbten Sporozoiten. Die großen dunklen Areale sind die Zellkerne. Im rechten Bild sind die Zellkerne grün dargestellt, der Sporozoit ist deutlich gefärbt und in der parasitophoren Vakuole zu erkennen.

Abb. E24 zeigt links mit FM 1-43 gefärbte Membranen von BSLEC und rechts solche, die mit Methanol fixiert wurden. Auch bei BSLEC blieb der Sporozoit in der Vakuole ungefärbt, wenn infizierte Zellen gefärbt wurden (Pfeil). Methanol permeabilisiert die Zellen und so gelangt der Farbstoff auch in das Vakuoleninnere. Daraufhin färbte sich der Parasit, was er in nicht permeabilisierten Zellen nicht tat. Damit ist gezeigt, dass der Farbstoff FM 1-43 in einer lebenden, infizierten Zelle die parasitophore Vakuolenmembran nicht überwinden konnte.

3.4 Apoptose

Durch Colchicin und Actinomycin D ließen sich bei BSLEC und BUVEC Apoptosen induzieren. Hier wurde 7 Tage nach der Infektion Colchicin oder Actinomycin D für eine Stunde den Zellen zugesetzt und dann 3 Tage später gemessen. Die unten angeführten Diagramme geben Hinweise darauf, dass infizierte Zellen einen gewissen Schutz gegenüber der Induzierung der Apoptose durch Actinomycin D besaßen. Das heißt, der Parasit war in der Lage, eine vorzeitige Apoptose der Zellen zu unterbinden. Allerdings reagierten die Zellen auf höhere Dosen Actinomycin D mit dem vollständigen Ablösen aller Zellen. Viele Zellen hatten sich sogar völlig aufgelöst, so dass eine Messung im Zytometer aufgrund der großen Anzahl an Zelltrümmern nicht möglich erschien. Selbst mit Konzentrationen von 1 mmol Colchicin blieben einige Zelle adhären.

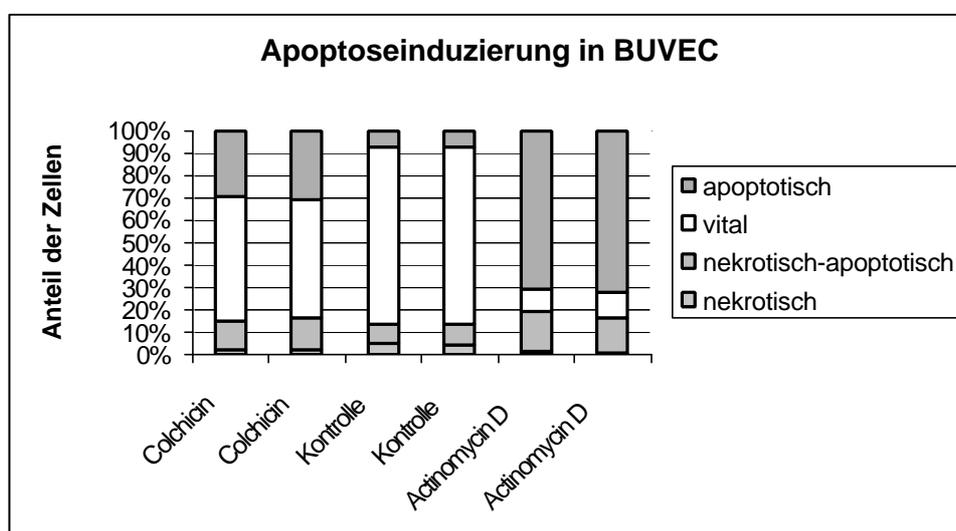


Abb. E25: Alle Zellen mit 60000 *Eimeria bovis*-Sporozoitien infiziert. Die Messungen zeigen infizierte BUVEC, die für 1h mit 1 mmol Colchicin behandelt wurden, Kontrollzellen und BUVEC, die für 18 h mit 1 μ mol Actinomycin D behandelt wurden.

Das Diagramm (Abb. E25) zeigt, dass Colchicin bei einer Wirkungsdauer von einer Stunde bereits Apoptosen induzierte. Beließ man Actinomycin D für 18 h auf den Zellen, blieb ein kleiner Anteil Zellen (etwa 10%) vital.

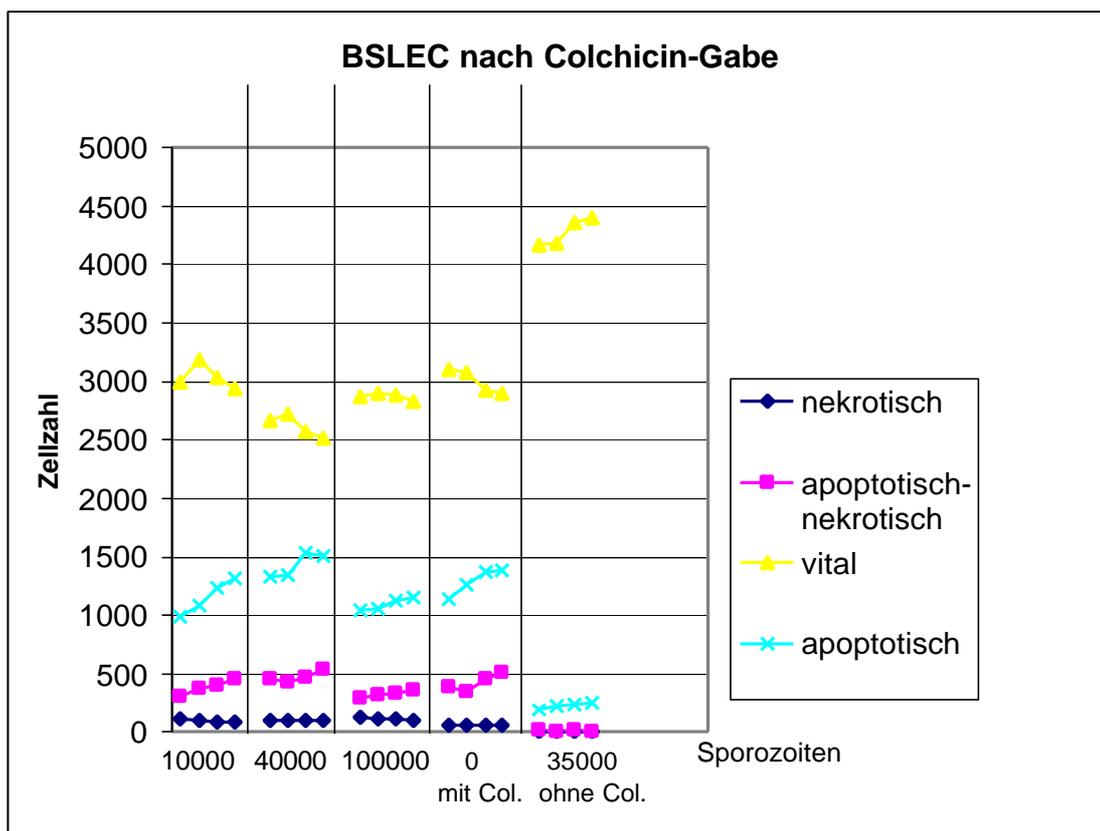


Abb. E26: BSLEC nach 10 mmol Colchicin, die mit unterschiedlicher Anzahl an Sporozoiten infiziert wurden.

Abb. E26 zeigt in Reihe 1 nekrotische Zellen, in Reihe 2 apoptotisch-nekrotische Zellen, in Reihe 3 vitale Zellen und in Reihe 4 apoptotische Zellen.

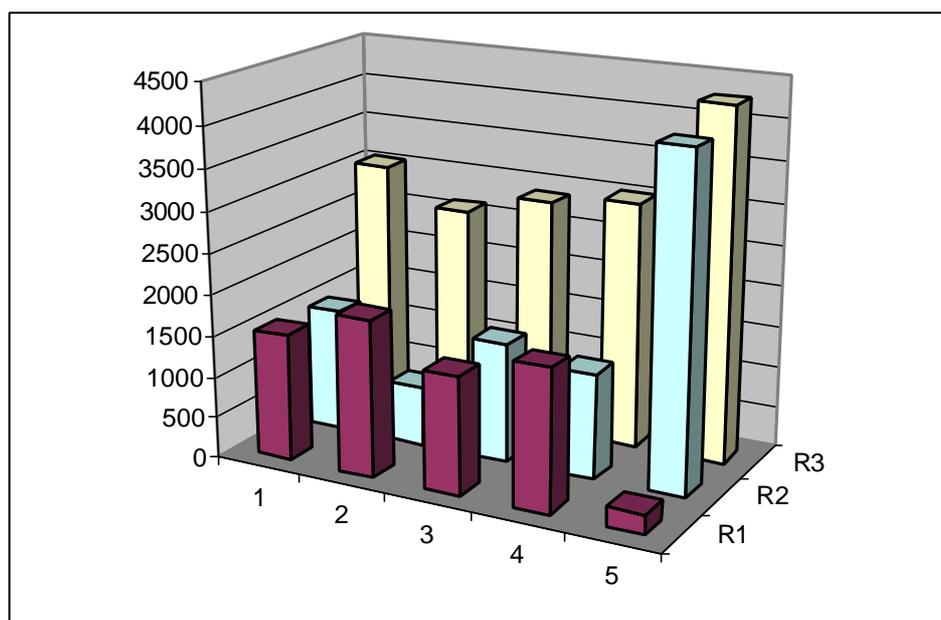


Abb. E27: BSLEC nach 10 mmol Colchicin, die mit unterschiedlicher Anzahl an Sporozoiten infiziert wurden (siehe Abb. E26). Angegeben ist die Differenz (Balken in der Mitte) zwischen den vitalen Zellen (R3) und den nicht vitalen (apoptotisch-nekrotischen und apoptotischen) Zellen (R1).

Das Balkendiagramm (Abb. E27) zeigt in der vorderen Reihe die Summe der apoptotischen und apoptotisch-nekrotischen Zellen. Die hintere Reihe zeigt die vitalen Zellen und die mittlere Reihe die Differenz zwischen den apoptotischen (R1) und vitalen Zellen (R3). Dabei sind in Säule 1 die Zellen mit 10000 Sporozoiten, in Säule 2 mit 40000 und in Säule 3 mit 100000 Sporozoiten infiziert worden. Die Säule 4 zeigt nicht infizierte Zellen, die wie diese mit 10 μmol Colchicin behandelt wurden. Säule 5 zeigt infizierte Zellen, die nicht mit Colchicin behandelt wurden. Es ergibt sich, dass in diesem Versuch 10 μmol Colchicin die Apoptosen unabhängig von den Parasiten induzieren konnte.

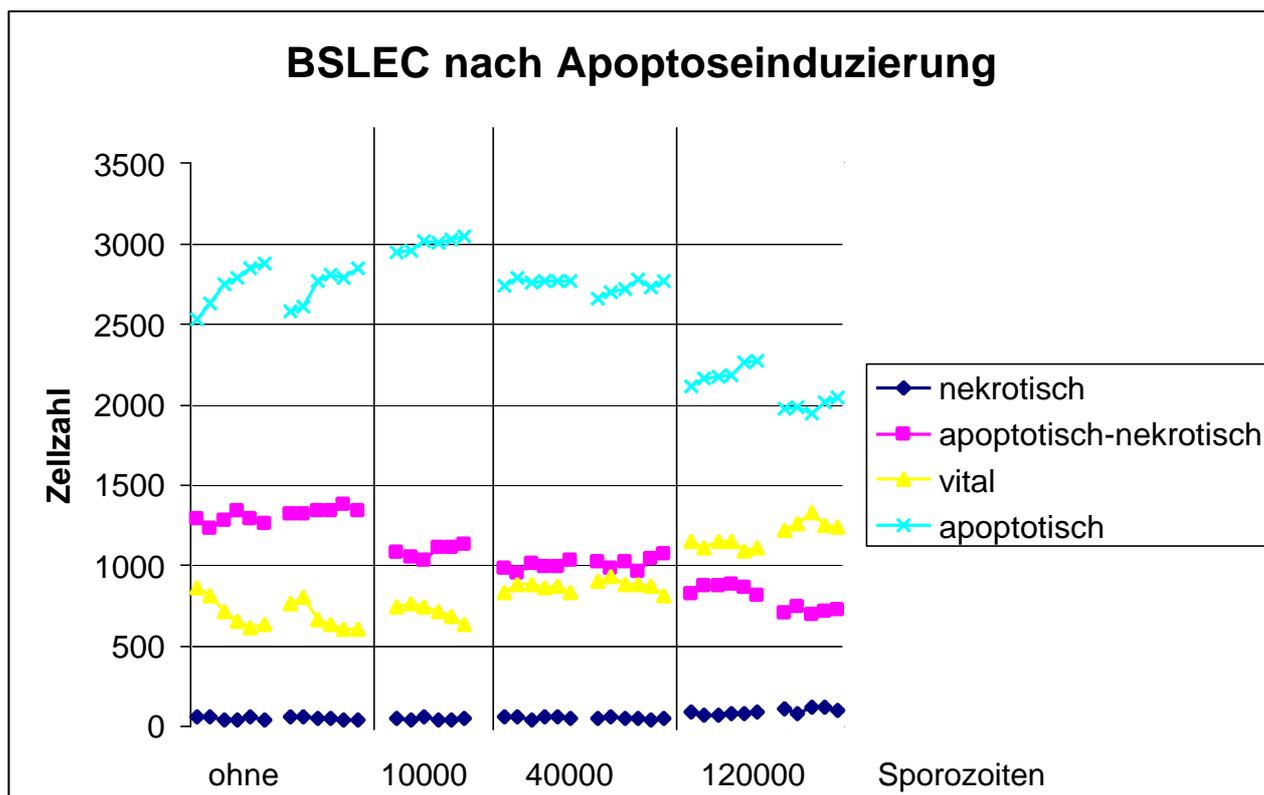


Abb. E28: Anzahl vitaler und nicht vitaler Zellen nach Actinomycin D-Zugabe. Mit zunehmender Sporozoitenzahl nimmt auch der Anteil der vitalen Zellen zu.

Abb. E28: Die Zahlen geben die Anzahl der Sporozoiten wieder, mit denen die Zellen infiziert wurden. Den Zellen wurden in diesem Experiment 3,5 ng Actinomycin D pro Well zugesetzt. Reihe 1 (blau) zeigt die Anzahl der nur PI-positiven Zellen, Reihe 2 (magenta) die Zellen, die für Apoptose und Nekrose positiv sind. Reihe 3 (gelb) zeigt die Zellen, die für Apoptose und Nekrose negativ sind. Reihe 4 (hellblau) zeigt die Zellen, die apoptotisch sind. Jeder Messpunkt entspricht 5000 Zellen und jede Probe wurde hier 6 mal gemessen, ausgenommen die zweite Probe mit 120000 Sporozoiten, da reichten die Zellen nur für 5 Messungen.

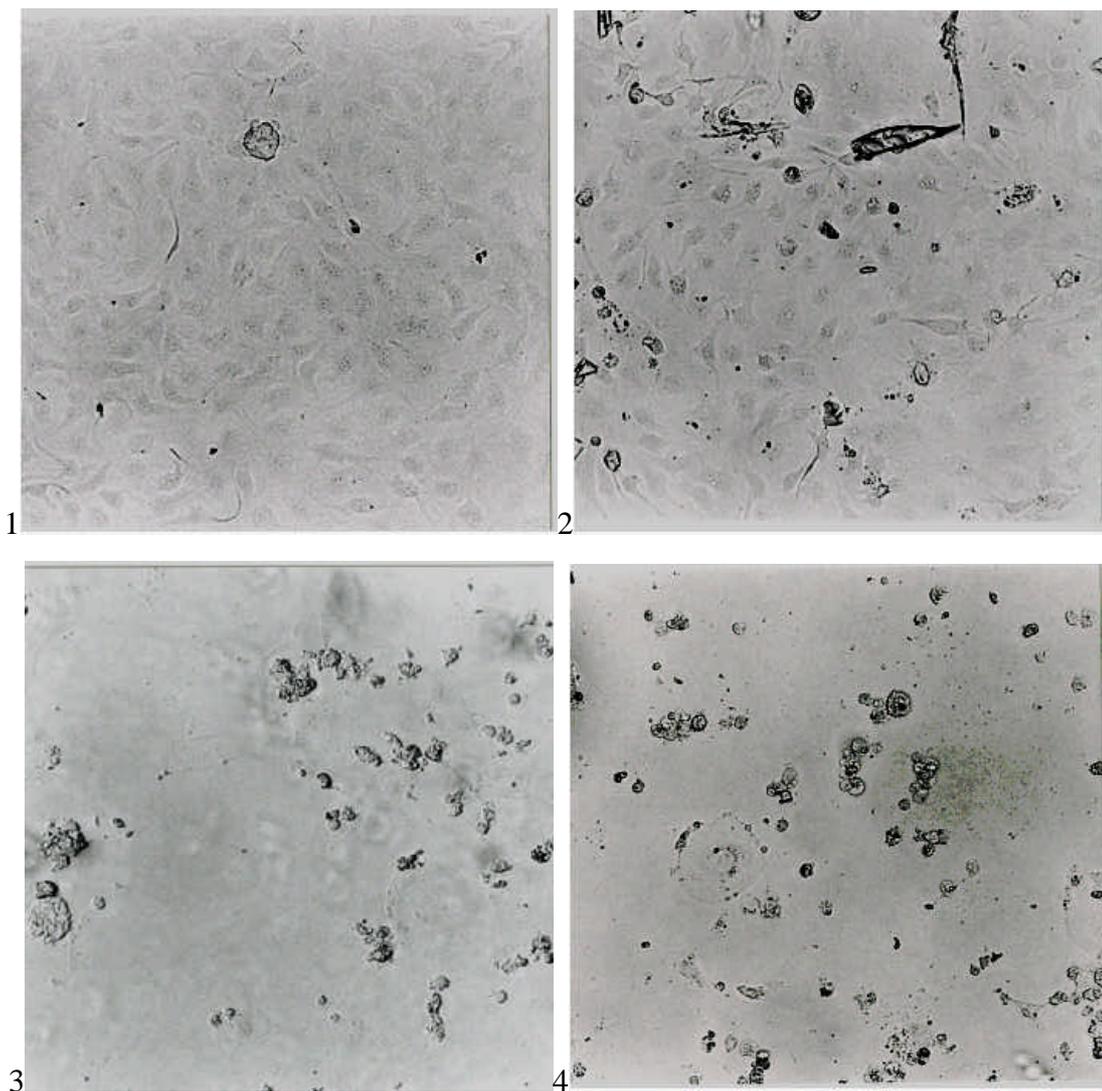


Abb. E29: Bild 1) unbehandelte BSLEC 7 Tage. Bild 2) BSLEC sieben Tage nach der Infektion mit 35000 Sporoziten. Bild 3) BSLEC 3 Tage nachdem Actinomycin D für 1h auf die Zellen gewirkt hat. Bild 4) derselbe Versuch nur mit infizierten Zellen.

Die Einzelbilder der Abb. E29 zeigen gleichaltrige BSLEC. Oben links sind nicht infizierte und nicht mit Actinomycin D behandelte Zellen zu sehen, rechts daneben infizierte Zellen, links unten nicht infizierte, mit Actinomycin D behandelte Zellen und rechts unten infizierte und mit Actinomycin D behandelte Zellen. Hier wurden 7 Tage nach der Infektion die Zellen für 1 Stunde mit Actinomycin D behandelt. Die Aufnahme entstand 3 Tage später. Die Bilder zeigen den deutlichen Einfluss von Actinomycin D auf die Zellen. Während bei den unbehandelten (Abb. E29 Bild 1) und den nur infizierten Zellen (Bild 2) noch alle Zellen adhären sind und keine abgerundete Morphologie aufweisen, ist bei den mit Actinomycin D behandelten (Bild 3) der überwiegende Teil der Zellen nach 3 Tagen abgelöst. Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen (Bild 4) sind

allerdings so nicht darzustellen, allerdings sind diese Zellen auch im Zytometer gemessen worden. Der entsprechende Graph ist oben (Abb. E27) abgebildet. Wie für den Zytometerversuch wurden auch diese Zellen mit 3,5 ng Actinomycin D pro Well behandelt, die Anzahl der Sporozoiten betrug 35000.

Der Einfluss von Colchicin auf Rinderendothelzellen wird in den Abbildungen E30, E31A und 31B gezeigt. Die Bilder in Abb. E30 zeigen in 1, BUVEC, in 2, BUVEC, die mit Colchicin behandelt wurden, in Abb. 31A 1, infizierte und in 2, infizierte VERO-Zellen, die mit Colchicin behandelt wurden. Während bei VERO-Zellen im Lichtmikroskop kein Einfluss zu erkennen ist, ist bei den BUVECs ein deutlicher Einfluss festzustellen. Diese Aufnahmen sind mit 40 facher Vergrößerung aufgenommen. Man erkennt, dass sich auf dem Bild 2 bereits viele Zellen abgerundet und abgelöst haben. Die Bilder 1 und 2 der Abb. 31A zeigen VERO-Zellen in 400facher Vergrößerung. Man sieht deutlich die Sporozoiten in den Vakuolen.

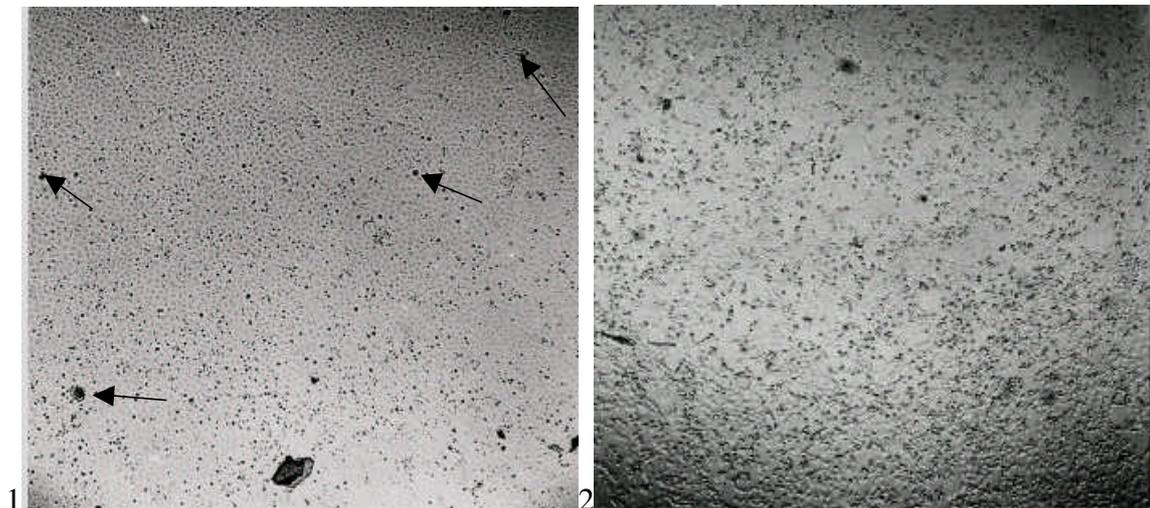


Abb. E30: Bild 1) BUVEC ohne, Bild 2) mit 1 mmol Colchicin nach 70 min Einwirkzeit. In beiden Fällen sind BUVEC 20 Tage vorher infiziert worden. Die dunkleren Punkte (Pfeile) in Bild 1 sind Schizonten. In Bild 2 sind bei dieser Vergrößerung (40x) die Schizonten zwischen den abgelösten Zellen nicht zu erkennen.

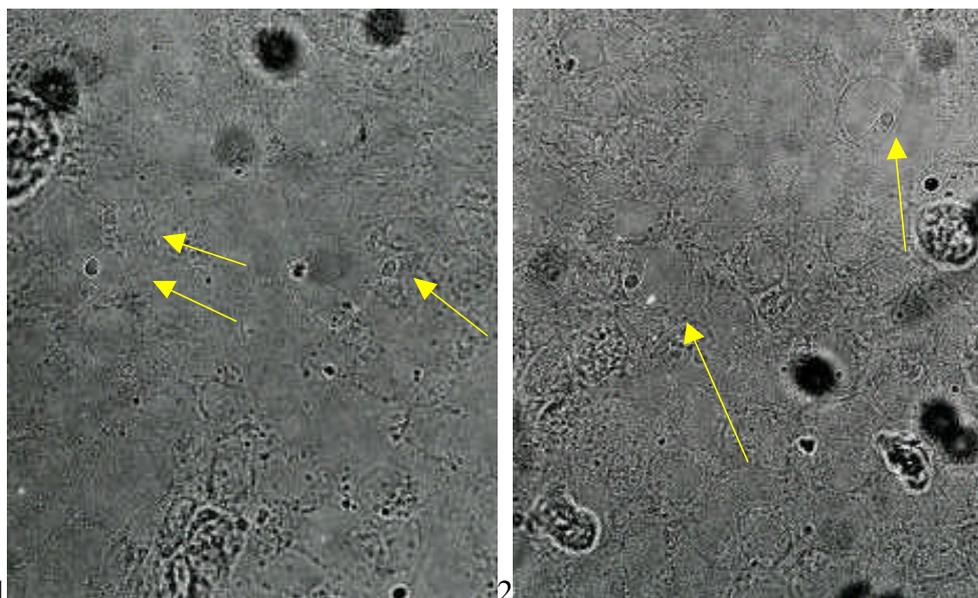


Abb. E31A: Bild 1) VERO-Zellen ohne, Bild 2) nach Einwirkung von Colchicin. Die Zellen sind identisch mit denen aus Abb.E31B. Ein Unterschied ist im Durchlicht nicht zu erkennen.

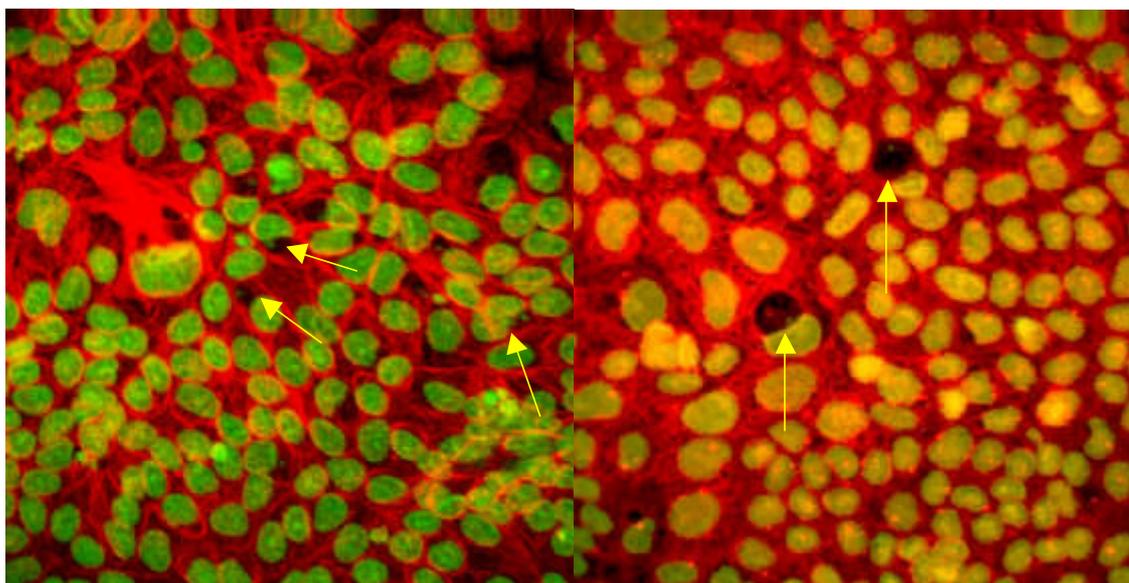


Abb. E31B: infizierte VERO-Zellen gegen α -Tubulin und DNA gefärbt. Links ohne Einwirkung, rechts nach Einwirkung von 70 min 1 mmol Colchicin. Kerne infizierter Zellen zeigen Deformationen, in den Vakuolen sind Sporozoitenkerne zu erkennen und nach Colchicin liegen die Mikrotubuli nicht gerichtet, sondern als Maschenwerk vor.

Betrachtet man das Tubulinskelett dieser Zellen, ist die Veränderung der Mikrotubuli deutlich zu erkennen (Abb. 31B). Die gerichteten Mikrotubuli gehen verloren, stattdessen bildet sich ein Maschenwerk aus. Abweichend von den Apoptoseinduzierungen wurden diese Versuche mit 1 mmol Colchicin durchgeführt, das für 70 min auf die Zellen wirkte, bevor die Aufnahmen entstanden beziehungsweise die Zellen fixiert wurden. Dies verdeutlicht, dass BUVEC sehr viel empfindlicher auf Colchicin reagieren als die VERO-Zellen.

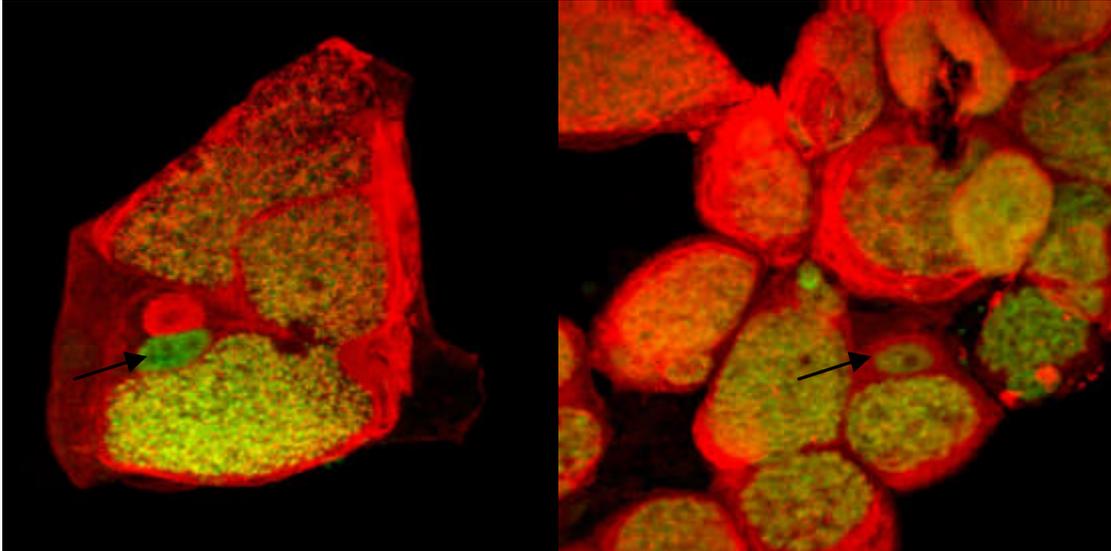


Abb. E32: BSLEC 20 Tage nach Infektion. Colchicin (100 μmol) wurde 10 Tage p.i. für eine Stunde dazugegeben. Mikrotubuli sind nicht mehr zu erkennen.

Abb. E32 zeigt die Weiterentwicklung nach Colchicingabe. Es sind hier nur Schizonten übriggeblieben. Die DNA der Merozoitenkerne ist deutlich zu erkennen. Im Vergleich sind die Areale der Zellkerne sehr viel kleiner (Pfeile), Mikrotubuli sind nicht zu erkennen.

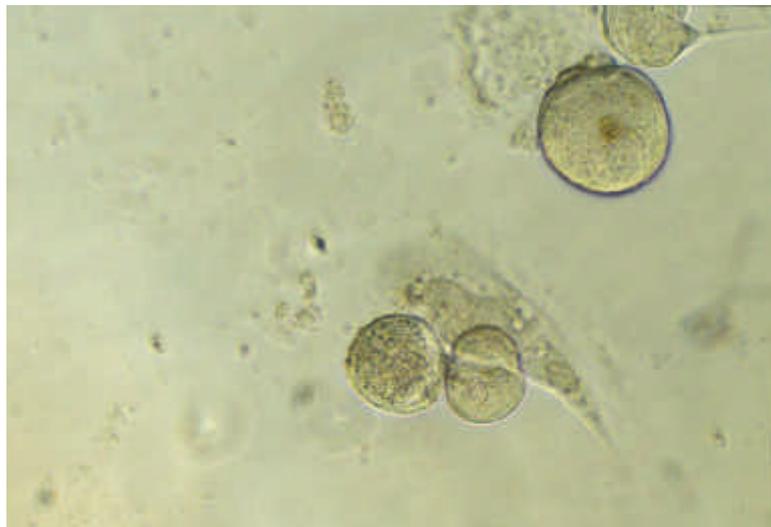


Abb. E33: BSLEC 20 Tage nach Infektion. Colchicin (100 μmol) wurde 10 Tage p.i. für eine Stunde dazugegeben. Nicht infizierte Zellen haben sich abgelöst, es sind überwiegend Schizonten zu erkennen.

Auch im Lichtbild Abb. E33 erkennt man, dass hier nur noch infizierte Zellen übrig geblieben sind. Nicht infizierte Zellen haben sich zum größten Teil abgelöst. Dies zeigt deutlich, dass *Eimeria bovis* offensichtlich in der Lage war, durch Colchicin induzierte Apoptosen zu verhindern und sich innerhalb solcher Zellen weiterzuentwickeln, obwohl kein intaktes Mikrotubuliskelett mehr vorhanden war.

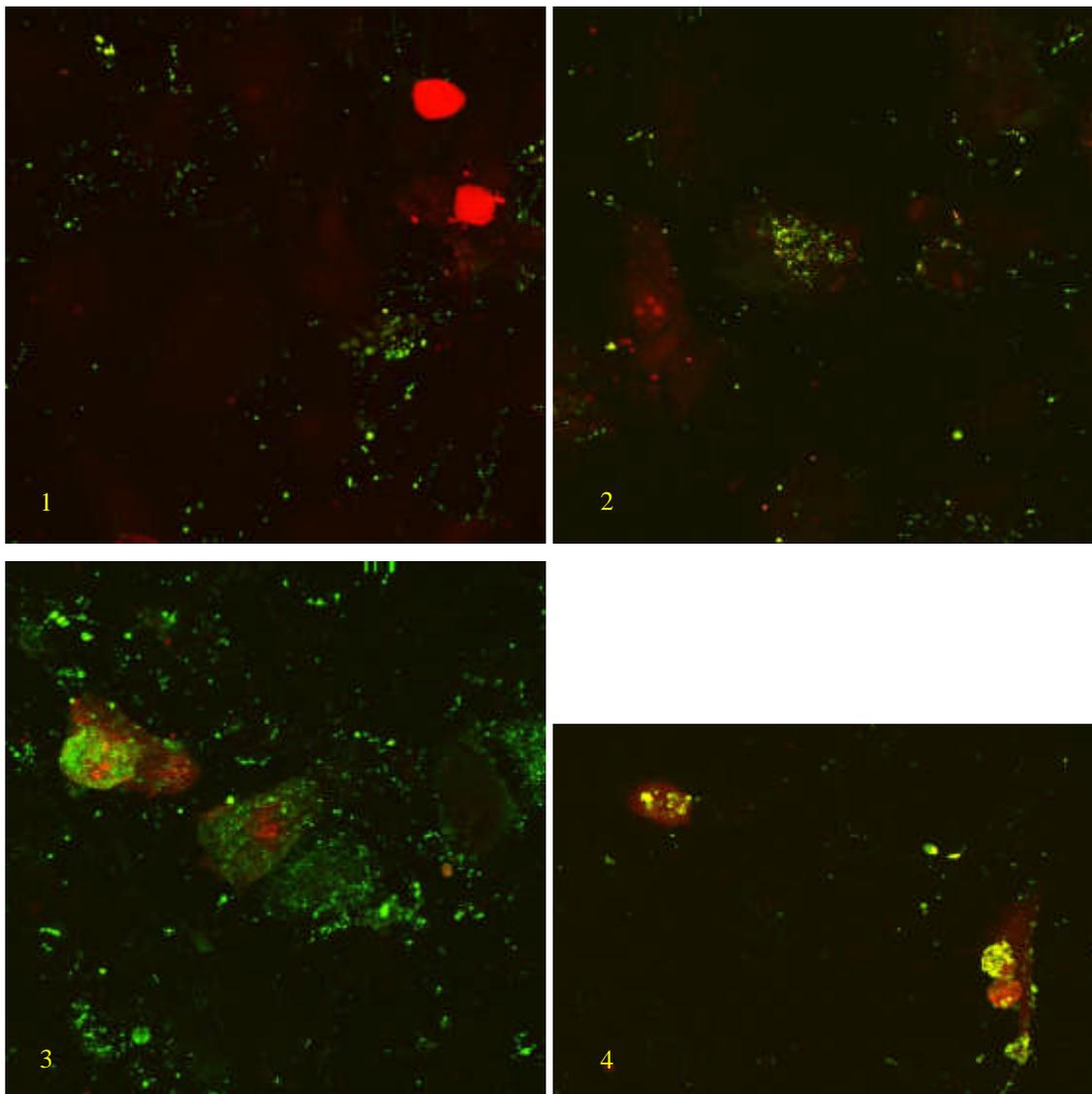


Abb. E34: Durch Annexin V (grün) und Propidiumjodid (rot) gefärbte BUVEC 44 Stunden p.i., Bild 1) Kontrolle, Bild 2) Colchicin 0,1 mmol, Bild 3) 1 mmol Colchicin, Bild 4) 1 μ mol Actinomycin. Die Apoptoseinduktoren wurden für 1 Stunde auf den Zellen gelassen. Die Anfärbung erfolgte 24 Stunden nach der Apoptoseinduktion.

Die bereits am Zytometer angewendete Methode, Apoptosen mit einer Färbung durch Annexin V nachzuweisen, lässt sich am Laser-Konfokal-Mikroskop durchführen. In Abb. E34 ist verdeutlicht, wie sich die Zellen darstellen. An einem Mikroskop lässt sich nicht die große Anzahl Zellen auf Apoptose testen, wie dies im Zytometer möglich ist. Jedoch lassen sich die Anfärbungen verifizieren und man kann darstellen wie sich das Annexin V auf der Zelloberseite verteilt. Mit dem Laser-Konfokal-Mikroskop lassen sich allerdings nicht die bereits abgelösten Zellen erkennen. So sind im Bild 4) nur noch zwei Zellen zu erkennen, die aufgrund ihrer Doppelfärbung schon die Membranintegrität verloren haben, so dass Propidiumjodid in Zellen eindringen konnte und die DNA färbte. Im Bild 1) sind hingegen zwei nekrotische Zellen dargestellt, die durch ihre starke Propidiumjodid-

Färbung auffallen. Nekrotische Zellen weisen keine Annexin V-Färbung auf. Die Bilder 2 und 3 veranschaulichen die Dosisabhängigkeit des Apoptoseinduktors Colchicin.

4. Diskussion

4.1 Warum wurde *Eimeria bovis* untersucht?

Eimerien sind nach dem Schweizer Zoologen Th. Eimer (1843-98) benannt (Herder-Lexikon der Biologie, 1994) und schon 1878 wurde *Eimeria zuernii* von Rivolta beschrieben (Eckert et al. 1992).

Aufgrund der Tatsache, dass Eimerien für hohe ökonomische Schäden in der Tierhaltung verantwortlich sind, wurde einer der häufigsten Vertreter dieser Gattung, *Eimeria bovis*, Gegenstand dieser Untersuchungen. Es sind bis heute über 1000 Eimerienarten bekannt, die in fast allen Wirbeltierarten vorkommen. Während in der Hühnerhaltung unter anderem *Eimeria necatrix* und *E. tenella* von Bedeutung sind, sind es in der Rinderhaltung *Eimeria zuernii* und vor allem *Eimeria bovis*.

Eimerien sind protozoäre, obligat intrazelluläre Parasiten, die folgendermaßen systematisch eingeordnet sind:

Stamm: *Apicomplexa*

Klasse: *Sporozoea*

Unterklasse: *Coccidia*

Ordnung: *Eucoccidia*

Unterordnung: *Eimeriina*

Familie: *Eimeriidae*

Gattung: *Eimeria*

(Eckert et al. 1992)

Ein anderer wichtiger Vertreter der *Eimeriina* ist unter anderem *Toxoplasma gondii* (z.B. Nash et al. 1998), Erreger der Toxoplasmose; andere *Sporozoea* sind *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* (z.B. del Portillo et al. 2001), Erreger der Malaria, und *Theileria parva*, Erreger des Ostküsten-Fiebers bei afrikanischen Rindern (z.B. Heussler et al. 1999). Den *Apicomplexa* sind einige apikale Merkmale der infektiösen Stadien gemein. So besitzen sie Conoide, sowie sekretorische Organellen, Mikronemen, Rhoptrien und dichte Granula, deren Inhalt beim Eindringen in die Wirtszelle sezerniert wird (Rick et al. 1998, Lingelbach und Joiner 1998, Bohne und Groß 1998). Mikronemen sind die entscheidenden Organellen für die Zellerkennung und Bindung an die Zelloberfläche,

Rhoptrien für die Formation der parasitophoren Vakuole, und die dichten Granula, um die Vakuole metabolisch aktiv zu machen (Dubremetz et al. 1998).

Eimeria bovis entwickelt sich eimerientypisch in 3 Phasen: Sporogonie, Schizogonie, Gamogonie. Dabei findet die Sporogonie außerhalb eines Wirtes statt. Die erste Schizogonie weist bei *Eimeria bovis* zwei Besonderheiten auf: sie vollzieht sich 1) in Endothelzellen und nicht in Epithelzellen, wie bei vielen Eimerien, und 2) die erste Schizogonie von *Eimeria bovis* dauert lang. Von der Infektion durch Sporozoiten bis zur Freisetzung der Merozoiten der ersten Generation aus den Schizonten vergehen 14 bis 20 Tage. Hierbei können aus diesen Makroschizonten bis zu 120000 Merozoiten der ersten Generation freigesetzt werden, die in die Epithelzellen von Kolon und Zäkum eindringen (Hammond et al. 1946). Die durch diese Merozoiten gebildeten Schizonten der zweiten Generation sind wesentlich kleiner und enthalten nur 36 Merozoiten. Diese Schizogonie dauert im Gegensatz zu der ersten nur etwa 48 Stunden. Die Merozoiten der zweiten Generation entwickeln sich in den Epithelzellen zu Mikro- und Makrogamonten, aus denen nach der Befruchtung die Oozysten entstehen (Hammond et al. 1963).

Zwar werden die klinischen Symptome einer *Eimeria bovis*-Infektion im wesentlichen durch die Gamonten hervorgerufen (Eckert et al. 1992), doch sind gerade die Schizonten der ersten Generation von besonderem Interesse, da sie sehr lange in einer Zelle persistieren und eine Beeinflussung der Wirtszelle, wie von anderen Apicomplexa bekannt (siehe unten), zu erwarten ist.

Aus der langen Zeitspanne, die für die erste Schizogonie benötigt wird, resultiert, dass eine entscheidende Voraussetzung für *in vitro* Untersuchungen ist, die Wirtszellen auch so lange in Kultur halten zu können. Zu dieser Schwierigkeit kommen noch die geringere Infektionsrate sowie die geringe Anzahl von *Eimeria bovis*-Sporozoiten hinzu, die für die Versuche einsetzbar waren.

Allein in der Rinderhaltung wurde der jährliche Schaden, der durch Eimerien-Kokzidosen verursacht wurde, von Fitzgerald 1980 schon auf über 700 Millionen US Dollar geschätzt. Vor allem Kälber sind davon betroffen (Fitzgerald 1980).

Im Allgemeinen zeigen bei *Eimeria bovis*-Infektionen nur Kälber klinische Symptome wie vor allem Diarrhöe. Die Durchfälle sind bei schwacher Infektion von breiiger Konsistenz, bei sehr starker Infektion mischen sich in den wässrigen Durchfall Blut, Fibrin und Schleimhautfetzen.

Da funktionelle Studien über Eimerien im Vergleich zu anderen *Apikomplexa* wie *Toxoplasma* und vor allem *Plasmodium* eher selten sind, war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss des Parasiten auf das Zytoskelett der Wirtszelle zu untersuchen. Weiterhin wurde geprüft, ob der Membranfarbstoff FM 1-43 die Membran der parasitophoren Vakuole darstellen und durchdringen kann und ob *Eimeria bovis* in der Lage ist, Apoptosen ihrer Wirtszelle zu unterbinden.

4.2 Warum Zellkultur? Warum wurden BSLEC, BUVEC und VEROs verwendet?

Um die Entwicklung von *Eimeria bovis* zu untersuchen, war es nötig, Zellen zu finden, die sich in Kultur halten lassen und in denen die Entwicklung von *Eimeria bovis*-Sporozoiten zu Schizonten erfolgen kann. Solche Untersuchungen *in vivo* durchzuführen ist sehr aufwendig, eine kontinuierliche Beobachtung der Entwicklung und des Eindringens von *Eimeria bovis*-Sporozoiten in die Zellen ist nicht möglich. Isolierte Versuche, wie zum Beispiel die Wirkung von Detergenzien auf infizierte Zellen oder Zytoskelettdarstellungen einzelner Zellen, sind nur in Zellkulturmodellen durchzuführen. Außerdem ist ein Einfluss auf die Untersuchungen durch andere Pathogene *in vivo* nicht auszuschließen oder nur mit größten Anstrengungen zu unterbinden.

Lymphatische Endothelzellen aus der Milz (BSLEC) sowie Endothelzellen aus der Nabelschnur des Rindes (BUVEC) erwiesen sich als geeignet. Beide Zellarten lassen sich in Kultur halten und in beiden Zellarten entwickelt sich *Eimeria bovis* bis zum reifen Schizonten. Die Sporozoiten hingegen dringen zwar in die VERO-Zellen, gewonnen aus der Niere der Grünen Meerkatze, ein, entwickeln sich aber nicht weiter. Es bildet sich aber um den Sporozoiten eine sehr große parasitophore Vakuole (Abb.: E6, E18). In BSLEC und BUVEC liegt diese Vakuole so eng an den Sporozoiten, dass sie nur in Ausnahmefällen zu erkennen und nicht gesondert zu untersuchen ist (Abb.: E16, E24). In VERO-Zellen ist dies allerdings möglich. Der Unterschied zwischen BSLEC und BUVEC liegt in der schnelleren Entwicklung von *Eimeria bovis* zum Schizonten und der höheren Anzahl freigesetzter Sporozoiten. So wurden die ersten freien Merozoiten in BUVEC nach 14 Tagen und in BSLEC nach 20 Tagen gefunden. Dabei entwickelten sich in einer 24-Well Platte bei einem Inokulat von 10^5 Sporozoiten pro Well im Schnitt $20,6 \times 10^5$ Merozoiten in BUVEC und $9,1 \times 10^5$ in BSLEC (Hermosilla et al. 2002).

4.3 Untersuchungen am Zytoskelett

Das Zytoskelett reguliert neben Zellmechanik, Bewegung und Stabilität auch andere wichtige zelluläre Vorgänge. Eine wichtige Aufgabe ist das Erkennen und Weiterleiten von mechanischem Stress (Janmey 1998). Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein intrazelluläres Gebilde wie etwa ein Schizont von 100 μm Länge und mehr die Wirtszelle vor mechanische Probleme stellt. Darum ist das Zytoskelett anhand von Aktin- und Tubulinanfärbung in dieser Arbeit untersucht worden.

Das Zytoskelett spielt weiterhin eine Rolle in der Apoptose. So werden durch Agenzien, die das Zytoskelett depolymerisieren, Apoptosen induziert. Colchicin, das Mikrotubuli depolymerisiert, induziert in einer Vielzahl von Zellen Apoptosen, ebenso wirken Cytochalasine, die Aktinfilamente depolymerisieren (Bonfoco et al. 1995, Janmey 1998).

Das Zytoskelett wurde schon früh in Verbindung mit Zellfunktionen gebracht. So beschreibt Heidenhain schon 1899 Filamente, die nach der mechanischen Belastung des Gewebes verlaufen und nannte sie Tonofibrillen; heute heißen sie Tonofilamente (Bereiter-Hahn 1971) und bestehen überwiegend aus Zytokeratinen. Aufgrund der spezifischen Unterschiede innerhalb der Keratine lassen sich diese nutzen, um Epithelien zu unterscheiden (Sun et al. 1983). Bis heute sind eine Vielzahl von Funktionen bekannt, die direkt oder indirekt mit dem Zytoskelett zu tun haben. Man weiß heute, dass Vesikel intrazellulär entlang von Mikrotubuli transportiert werden, Mikrotubuli in der Mitose die Chromosomen auf Tochterzellen verteilen (Stryer 1990), Zellbewegungen im Allgemeinen durch Veränderungen am Zytoskelett ablaufen, interzelluläre Verbindungen mit dem Zytoskelett zusammenhängen (Ma et al. 1995, Yap et al. 1995), Natriumkanäle durch kurze Aktinfilamente aktiviert werden (Cantiello and Prat 1996) und auch Oberflächenstrukturen durch das Zytoskelett geformt werden (z.B. Bereiter-Hahn et al. 1979, Luxford und Murphy 1993, Satir 1997, Schröpfer et al. 2000).

Nach neueren Untersuchungen gibt es direkte Verbindungen von Zytoskelettkomponenten in den Zellkern hinein. Induzierte Bewegungen an diesen Komponenten rufen bestimmte Veränderungen im Zellkern hervor (Glanz 1997, Janmey 1998). So kommt es zum Beispiel beim Auslenken von Intermediärfilamenten zu einer direkten Verformung der Kernmatrix oder zu einer Öffnung von Kernporen. Die Depolymerisation von Mikrotubuli führt über Zwischenschritte zum Import des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Kern. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen Apoptose und dem Zustand des Zytoskeletts. Ungeklärt ist, was Ursache und Wirkung ist (Janmey 1998), und mag in verschiedenen Zellen unterschiedlich sein. So sind BSLEC und BUVEC gegenüber Colchicin sehr viel empfindlicher als VERO-Zellen. Eine Kondensierung sämtlicher Zytoskelettkomponenten

erfolgt in jeder Apoptose und führt zum sogenannten „blebbing“ der Zellen (Janmey 1998, Bonfoco et al. 1995, van Engeland et al. 1996).

Nicht zuletzt ist das Zytoskelett eine Barriere, die von solch großen Erregern wie zum Beispiel *Eimeria bovis* oder andere *Apicomplexa* erst durchdrungen werden muss. Betrachtet man das in dieser Arbeit dargestellte Zytoskelett nicht infizierter Zellen anhand von Tubulin- und Aktinanfärbung und fügt noch gedanklich die Intermediärfilamente, die dritte Komponente des Zytoskeletts einer eukaryontischen Zelle, hinzu, erhält man ein Bild einer scheinbar überfüllten Zelle. Um so erstaunlicher ist die Fähigkeit dieser Erreger, schnell in die Zellen einzudringen, zu verlassen oder nur zu durchqueren (Mota et al. 2001, Mota und Rodriguez 2001, Behrendt et al. 2000).

4.3.1 Aktin

Bisher wurde davon ausgegangen, dass Aktin eine Zytoskelettkomponente ist, die nur in eukaryontischen Zellen vorkommt, und dass Bakterien kein Aktin besitzen. Jetzt konnte aber gezeigt werden, dass Prokaryonten sowohl über Tubulin- als auch Aktin-Homologe verfügen (van den Ent et al. 2001). Aktin ist vor allem aus Muskelzellen bekannt, in denen es zusammen mit Myosin für die Kontraktion der Zelle, respektive im Zellverband für die Kontraktion des Muskels verantwortlich ist. Allerdings kommt Aktin als Zytoskelettkomponente auch in den meisten eukaryontischen Zellen vor, in denen es bis zu 5% der Proteinmenge der Zelle ausmacht. In Muskelzellen erreicht Aktin einen Anteil von bis zu 20% an der gesamten Proteinmenge (Alberts et al. 1997). Das Aktin besteht aus mehreren gewebespezifischen und durch Entwicklung regulierten Isoformen (Steinmetz et al. 1997). Bei Säugetieren unterscheidet man mindestens 6 Isoformen, die in 3 Klassen unterteilt sind: die α -, β -, γ -Aktine. α -Aktine sind die Isoformen, die in Muskelzellen vorliegen, β - und γ -Aktine die Isoformen der „nicht-Muskelzellen“. Alle Isoformen lagern sich zu Filamenten zusammen, unterscheiden sich aber geringfügig in ihren Eigenschaften. Aktin existiert in zwei Formen in einer Zelle, als polymerisierte Aktinfilamente und als nicht polymerisiertes globuläres Aktin (Gottlieb et al. 1991, Steinmetz et al. 1997). Zwischen diesen beiden Formen besteht ein Gleichgewicht, das durch ständige Polymerisation/Depolymerisation gekennzeichnet ist, ein Vorgang der „treadmilling“ genannt wird. Das polymerisierte Aktin liegt sowohl als diffuses Netzwerk kurzer Mikrofilamente, als auch als viel größere Mikrofilamentbündel, den sogenannten Stressfasern, vor. Die Stressfasern gelten als kontraktile Elemente in „nicht-Muskelzellen“, die überwiegend basal durch die Zellen ziehen, während das Aktin-Netzwerk hauptsächlich am apikalen Zellkortex und in Zellfortsätzen vorkommt (Gottlieb et al.

1991). Ein einzelnes Aktinfilament ist aus zwei Protofilamenten aufgebaut, die sich zu einer Doppelhelix mit einem Durchmesser von etwa 8-9 nm zusammenlagern (Alberts et al. 1997, Volkmann et al. 2001). Zusammen mit den an Aktin bindenden Proteinen (z.B. α -Aktinin, Spektrin und Fimbrin) bilden die Zellen aus den Aktinfilamenten dreidimensionale Strukturen (Volkmann et al. 2001). So ist Aktin in oder an dem Aufbau von „tight junctions“ beteiligt (Mitic und Anderson 1998), Oberflächenstrukturen in Zellen (microridges) werden durch Aktinfilamente gebildet (Bereiter-Hahn et al. 1979, Uehara et al. 1994, Verrey et al. 1995, Schröpfer et al. 2000) und in einigen Zellen lässt sich Aktin auf der Zelloberfläche nachweisen (Moroianu et al. 1993). Auch bei Zellbewegungen und beim Zellwachstum sowie der Zellteilung ist Aktin beteiligt (Steinmetz et al. 1997, Hall 1998, Schaerer-Brodbeck und Riezman 2000). So ist beschrieben, dass Aktin in *Apicomplexa*, speziell *Toxoplasma gondii*, notwendig zur Infektion ist (Dobrowolski und Sibley 1996). Bei Bakterien ist in einigen Fällen das Aktinskelett der Wirtszelle entscheidend für eine Infektion (Dobrowolski und Sibley 1996). Andere Bakterien (*Listeria monocytogenes*) bewegen sich fort, indem sie hinter sich die Polymerisation des Aktins innerhalb ihrer Wirtszelle induzieren (Tilney und Portnoy 1989, Steinmetz et al. 1997).

Aktin kommt überdies eine entscheidende Bedeutung bei der Endozytose und Makropinozytose zu. So sind Cytochalasine, die Aktinfilamente depolymerisieren, als Endozytose/Phagozytose-Blocker beschrieben, durch deren Einsatz die Aufnahme beziehungsweise das Eindringen von Erregern in die Zelle verhindert werden kann (Tujulin et al. 1998, Dobrowolski und Sibley 1996). Bei der Makropinozytose ist von Lee und Knecht (2002) die Beteiligung von Aktin an der Abschnürung der Vesikel in lebenden Zellen gezeigt worden, ebenso wird von diesen Autoren die Beteiligung von Aktin an der Exocytose gezeigt.

Aktin ist somit eine wichtige und entscheidende Zytoskelettkomponente, die hier im Zusammenhang mit der Weiterentwicklung des Parasiten innerhalb der Zelle untersucht wurde.

4.3.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind aus zwei Untereinheiten zu je etwa 50 kDa aufgebaut. Diese Untereinheiten werden als α -Tubulin und β -Tubulin bezeichnet. Der Durchmesser der Mikrotubuli beträgt etwa 30 nm und ist damit deutlich größer als die anderen Zytoskelettkomponenten wie etwa Mikro-(Aktin)-filamente (7 nm Durchmesser) und Intermediärfilamente (7-11 nm Durchmesser) (Stryer 1990). Alle Zytoskelettkomponenten liegen mit ihrem Durchmesser daher deutlich unterhalb des Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen. Sie sind nur ihrer Länge nach, und wenn sie gebündelt vorliegen, im Lichtmikroskop abzubilden. MT sind mehr als nur Zytoskelettkomponenten. Als intrazelluläre Straßen mit ihren assoziierten Proteinen, MAP's, und ihren verschiedenen Modifikationen tragen sie entscheidend zur Polarität der Zellen bei (Lane und Allan 1998, Aroeti et al. 1998). Mikrotubuli bilden ein dynamisches System, sie wachsen und schrumpfen. Dieser Vorgang ereignet sich nicht bei allen Mikrotubuli in gleicher Weise. Kirschner und Mitchison (1986) beschrieben Mikrotubuli, die nebeneinander wachsen und schrumpfen. Dabei können sich Polymerisation und Depolymerisation eines Mikrotubuli mehrfach abwechseln. Die Bedingungen für das Auswachsen oder Schrumpfen werden offensichtlich durch unterschiedliche „Kappen“ geschaffen. Befindet sich an der Spitze des Mikrotubuli eine Kappe aus GTP (Guanin-tri-Phosphat), wächst der Mikrotubulus. Ändert sich die Kappe durch Hydrolysieren in GDP (Guanin-di-Phosphat), schrumpft der Mikrotubulus. Die Längenänderungen hängen von der Bindungsgeschwindigkeit und Hydrolysegeschwindigkeit von GTP ab. Dieses Phänomen wird „dynamische Instabilität“ genannt und ist von besonderer Bedeutung für die Mitosespindel. Die Mikrotubuli der Spindel wachsen von den Centrosomen aus in alle Richtungen. Treffen sie so eher zufällig auf das Kinetochor der Chromosomen, werden diese Mikrotubuli stabilisiert, während die, welche ins Leere gewachsen sind, aufgrund ihres nicht geschützten plus-Endes wieder depolymerisieren (Kirschner und Mitchison 1986, Stryer 1990).

Neben α - und β -Tubulin existiert auch γ -Tubulin. Letzteres kommt in den Mikrotubuli-Organisationszentren vor, aus denen die Mikrotubuli auswachsen (Moritz et al. 1995). Diese Isoformen kommen in den meisten eukariontischen Zellen vor und sind eng miteinander verwandt. Unterschiede kommen hauptsächlich durch unterschiedliche Transkription von α - und β -Tubulin innerhalb enger Familien und

post-translationalen Modifikationen zustande. Stabilisierte MT sind oft detyrosiniert, allerdings scheint dies eher die Konsequenz und nicht die Ursache der stabilen MT zu sein. Nicht tyrosinierbares Tubulin ist oft in den sehr stabilen MT zu finden, die nicht mehr in dem Detyrosinierungs/Tyrosinierungs-Zyklus sind. Diese sind überwiegend in neuronalem Gewebe anzutreffen und bilden etwa 35% des Tubulins im Gehirn. Azetylierte MT sind üblicherweise gegen durch Detergenzien induzierten Abbau resistent, allerdings nicht gegen Kälte, obwohl es auch Kälte resistente MT in einigen Zellarten gibt. Die genaue Bedeutung von azetylierten MT ist noch unklar, da Mutationen von *Chlamydomonas* ohne azetyliertes Tubulin keine Auffälligkeiten zeigen. Allerdings ist bei diesem Versuch ein Restanteil von azetylierten MT nicht ausgeschlossen (MacRae 1997). Neben der Azetylierung und der Detyrosinierung wird auch noch eine Kappe aus GTP als Stabilisator beschrieben (MacRae 1997, Mejillano et al. 1996), ferner auch eine Stabilisierung durch Proteine, die an Tubulindimere gebunden sind (Takemura et al. 1992).

Daher soll hier untersucht werden, ob eine Azetylierung von Mikrotubuli in infizierten Zellen stattfindet, und an welchen Stellen diese mögliche Modifizierung sich manifestiert.

4.3.3 Azetylierte Mikrotubuli

Behandelt man Zellen mit Detergenzien, die Mikrotubuli depolymerisieren, fällt auf, dass nicht alle Mikrotubuli zurückgebildet werden (z.B. Takemura et al. 1992, Gurland und Gundersen 1993, Schröpfer et al. 2000). Diese stabilisierten Mikrotubuli zeichnen sich oft durch einen erhöhten Anteil an azetyliertem Tubulin aus (Takemura et al. 1992). Die Azetylierung von Mikrotubuli wurde erstmals von Sterner et al. 1979 beschrieben, rund 10 Jahre nachdem man erkannte, dass Histone durch eine Azetylierung modifiziert werden (Kouzarides 2000).

Azetylierte Mikrotubuli scheinen allerdings nicht zum Überleben einer Zelle vonnöten zu sein, da sie in PtK2 Zellen (Zellen aus der Känguruhratte), Truthahnerythrocyten und *Plasmodium falciparum* fehlen (MacRae 1997).

Während der Weiterentwicklung des Parasiten bereitete es anfänglich zwischen dem 6. Tag und dem 10. Tag nach der Infektion Schwierigkeiten, Zellen mit Trophozoiten von apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Um zu gewährleisten, dass es sich um parasitäre Strukturen und nicht um rein zelluläre Strukturen handelte, wurden Marker eingesetzt, die

eine Unterscheidung solcher Strukturen zulassen. Im Speziellen wurde den Präparaten bei der Zytoskelettfärbung der DNA färbende Stoff H33342 zugesetzt sowie in getrennten Experimenten Annexin V, konjugiert mit Alexa 488.

Darauf aufbauend wurde dann in Versuchen überprüft, ob *Eimeria bovis* in der Lage ist, Apoptosen in der Wirtszelle zu verhindern.

4.3.4 Der Farbstoff H33342

Um zwischen parasitären Stadien und eventuell apoptotischen Stadien unterscheiden zu können sowie die Position des Kerns innerhalb der infizierten Kerne zu lokalisieren, wurde die DNA mit dem Farbstoff H33342 markiert. In beiden Fällen wäre sonst eine Verwechslung mit infizierten Zellen möglich gewesen. Beide Zellstadien haben eine Deformierung der ganzen Zelle zur Folge; und im Falle einer Mitose kommt es zu einem vakuolenähnlichen Raum, der zwar aufgrund seiner Tubulinanordnung zu erkennen ist, aber bei einer Aktinfärbung die Gefahr der Verwechslung birgt (Abb. E6). Zudem wird durch den Farbstoff die Lokalisierung der Parasiten innerhalb der Zelle erleichtert. Ohne die Färbung des Sporozoitenkerns würde das Erkennen infizierter Zellen in dichten Zellverbänden sehr viel schwieriger.

4.4 Apoptose

Apoptose als programmierter Zelltod spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und der Erhaltung eines Organismus. Die Reduktion des Schwanzes bei Fröschen und die Entwicklung der Hand beim Fötus, respektive die Rückentwicklung der Häute zwischen den Fingern sind die wohl bekanntesten Beispiele für Apoptosen (Duke et al. 1997). Dieser programmierte Zelltod unterscheidet sich von der Nekrose (einem Absterben von Zellen, das nicht von den betroffenen Zellen oder dem Organismus kontrolliert werden kann) und wurde zuerst 1972 von Kerr et al. beschrieben. In einem Organismus werden apoptotische Zellen sehr schnell durch Phagozyten beseitigt, innerhalb von etwa 2 Stunden: ein Grund, warum in histologischen Untersuchungen kaum apoptotische Zelle zu finden sind (Lieberthal und Levine 1996).

In einer Zellkultur fehlen in der Regel die Phagozyten, und apoptotische Zellen sind dort ein vertrautes Phänomen. Bietet man Zellen in Zellkultur keine geeignete Möglichkeit zu adhären, werden diese apoptotisch. Eine Ausnahme sind Suspensionszellen, Zellen die auch *in vivo* keine Gewebe bilden, wie zum Beispiel die Zellen des Blutes. Chen et al. beschreiben 1997 das apoptotisch Werden von humanen und bovinen Endothelzellen aus Kapillaren, wenn diese nicht adhären konnten. Auch die hier verwendeten

Endothelzellen starben, wenn die Kulturgefäße nicht für ein erleichtertes Anheften vorbehandelt wurden (siehe Materialien und Methoden). Man behilft sich dann, indem man den zu bewachsenden Untergrund mit zumeist Fibronectin (z. B. Chen et al. 1997), poly-L-Lysin (z.B. Bonfoco et al. 1995) oder Collagen (z.B. van Engeland 1996) bedeckt, bevor die Zellen in das Kulturgefäß überführt werden.

Die Auslöser für Apoptosen sind vielfältig und müssen von intrazellulären Fremdorganismen umgangen oder verhindert werden, um ihre eigene Entwicklung zu sichern (Goebel et al. 1999). Der Ablauf der Apoptose ist dabei wie folgt: Zuerst erfolgt ein Stimulus, der zur Apoptose führt. Entweder kommt dieser Stimulus von außen und wird über einen Rezeptor vermittelt oder er wird innerhalb der Zelle generiert und ist auf Toxine oder Bestrahlung zurückzuführen. Im nächsten Schritt wird dieses Signal oder der metabolische Zustand der Zelle erkannt und transduziert. Im Anschluss erfolgt die Weiterleitung des transduzierten Signals zur Selbstzerstörungsmaschinerie. Im dritten Schritt werden Apoptose-spezifische Proteasen sowie ihre positiv- und negativ-Regulatoren aktiviert. Im letzten Schritt kondensiert die DNA und wird zerschnitten (Vaux und Strasser 1996).

Für *Toxoplasma gondii* ist von Nash et al. (1998) ein Spektrum an Apoptoseinduktoren beschrieben worden, die in durch *Toxoplasma gondii* infizierten Zellen nicht zur Apoptose führten, die Apoptose also vom Parasiten verhindert werden konnte.

Für die Inhibierung von Apoptosen sind bisher einige Mechanismen beschrieben worden. So bilden pro-apoptotische Proteine wie Bax, Bad und Bcl-X_s mit anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2, Bcl-X_l, und A1/Bfl-1 Komplexe miteinander. Das Verhältnis dieser beiden Gruppen entscheidet, ob die Zelle in die Apoptose geht oder nicht (Heussler et al. 2001). In den Mitochondrien der Zelle kommt es bei einer Abnahme von Bcl-X und Bcl-2 zu einer Veränderung der Mitochondrienmembranpermeabilität. Einige dieser anti-apoptotischen Proteine sind Kanal formende Proteine, die für eine normale Physiologie der Mitochondrien verantwortlich sind. Werden diese Proteine inhibiert, setzen die Mitochondrien Zytocrom-c und den Apoptose induzierenden Faktor (AIF) frei (Joza et al. 2001). Bei Bcl-2 ging man bis dato davon aus, dass seine apoptoseinhibierende Wirkung darin beruht, die Membranintegrität der Mitochondrien zu bewahren. Marsden et al. 2002 beschreiben aber, dass Bcl-2 Caspaseaktivitäten unabhängig von Zytocrom c/Apaf-1/Caspase-9 reguliert. Zytocrom C bindet im Zytosol an Apaf-1. Dieses führt zur einer Aktivierung von bestimmten Caspasen, die die Apoptose der Zelle beschleunigen. AIF induziert die Apoptose unabhängig von Caspasen indem er direkt im Kern die DNA-

Fragmentation induziert. (The cytokine bulletin rndsystems 1998, Joza et al. 2001, Grassme et al. 2001). Einige der Apoptose inhibierenden Proteine werden über den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert. Für *Taxoplasma gondii* wird eine Beeinflussung dieses Regulationsfaktors angenommen (Heussler et al. 2001).

Ob und durch welche Art von Stimulus die Apoptose in der Wirtszelle von *Eimeria bovis* unterbunden werden kann, wurde anhand von Colchicin und Actinomycin D als Induktoren in dieser Arbeit untersucht.

4.4.1 Induzierung von Apoptosen durch Colchicin und Actinomycin D

Actinomycin D blockiert durch Binden an die doppelsträngige DNA die RNA-Polymerase und unterbindet dadurch die RNA-Synthese. Einzelsträngige DNA oder RNA werden nicht blockiert (Sobell 1974, Yu 1980). Ein Blockieren der RNA sollte nicht nur die Zelle schwer schädigen, sondern einen möglichen Hinweis geben, wie ein Block der Apoptose durch *Eimeria bovis* vonstatten geht. Sollte es nach Zugabe von Actinomycin D zu keiner Inhibierung der Apoptose kommen, aber bei Colchicingabe ein solcher Block der Apoptose auftreten, so könnte RNA des Sporozoiten daran beteiligt sein, das Sterben der Zelle zu verzögern oder zu verhindern. Ob Actinomycin D in mit *Toxoplasma gondii* infizierten Zellen zu Apoptosen führt, wurde bereits getestet (Goebel et al. 1999) und sollte als Vergleich dienen.

Dass Colchicin an Untereinheiten von Mikrotubuli bindet, ist vor mehr als 25 Jahren entdeckt worden. Mikrotubuli haben keine oder nur geringe Affinitäten zu freiem Colchicin. Dieses muss erst einen Komplex mit freiem Tubulin bilden. Tubulin ändert dabei wahrscheinlich seine Konformation. Colchicin veranlasst Tubulin, sich zu nicht mikrotubulären Strukturen zusammzusetzen, und verhindert die Polymerisation von Mikrotubuli bei Konzentrationen, die deutlich unter denen des vorhandenen Tubulins liegen. Dies ist von Panda et al. (1995) für Mikrotubuli aus Rinderhirnen bei *in vitro*-Versuchen dargestellt worden. Ebenso werden Mikrotubuli beschrieben, die nicht depolymerisieren und sich als sehr stabil erwiesen. Erklären läßt sich dieses Phänomen mit Mikrotubuli, die schon vor der Colchicingabe unbeweglich sind, und deshalb keine Colchicin-Tubulin-Komplexe mehr eingebaut werden, die zur Depolymerisation führen.

4.5 Der Farbstoff FM 1-43

Um zu untersuchen, ob die parasitophore Vakuole bei *Eimeria bovis* aus Zellmembran-Material besteht oder ein Kompartiment des Parasiten darstellt, sind die Membran der Zellen und/oder die Sporoziten mit dem Farbstoff FM 1-43 gefärbt worden. Dieser

Farbstoff wurde ursprünglich genutzt, um synaptische Vesikel zu untersuchen. Seine Eigenschaft, sich ausschließlich in Lipidmembranen zu verankern (Schote und Seelig 1998, Smith und Betz 1996), sollte hier genutzt werden, um Hinweise auf die Herkunft der Membran der parasitophoren Vakuole zu erlangen. Für *Plasmodium* und *Toxoplasma* wird vermutet, dass die parasitophore Vakuole sowohl aus Zellmembran-Material als auch aus Parasitenproteinen besteht (Lingelbach und Joiner 1998, de-Souza et al. 1998, Sinai und Joiner 2001). Ein Nachweis von Zellmembranbestandteilen in der parasitophoren Vakuolenmembran von *Eimeria bovis* oder ihr Fehlen erschien so möglich.

4.6 Der Einsatz des Laser-Konfokal-Mikroskops

Um Zellen zu untersuchen und vor allem um intrazelluläre Vorgänge zu beobachten, reichen herkömmliche und Fluoreszenz- Mikroskope oft nicht aus.

Diese Mikroskope durchleuchten bei ihrer Anwendung immer die ganze Probe und sind somit auf Proben angewiesen, die entweder lichtdurchlässig sind, oder so dünn geschnitten sind, dass Licht hindurch fallen kann. Mit Auflichtmikroskopen ist dieses Problem zum Teil zu umgehen. Bei lichtundurchlässigen Proben ist aber nur die Oberfläche des Präparates für Untersuchungen zugänglich. Aufgrund der Tatsache, dass immer das ganze Objekt durchleuchtet oder beleuchtet wird, ist es nicht möglich, kleinere Strukturen räumlich einzuordnen. Zudem werden alle Fluoreszenzmoleküle angeregt und ein Ausbleichen der Proben wird begünstigt.

Das Laser-Konfokal-Mikroskop ist in der Lage, einen „Lichtpunkt“ innerhalb der Probe zu erzeugen, und nur dort Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten zu bringen. Mit entsprechender computergesteuerter Technik ist es nun möglich, mit diesem „Lichtpunkt“ gezielt durch das Objekt zu tasten und so Punkt für Punkt den oder die Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten zu bringen. Diese Technik erhöht deutlich das Auflösungsvermögen gegenüber herkömmlichen Mikroskopen und ermöglicht es, optische Schnitte des Präparates zu erzeugen, die aus dem Inneren des Präparates stammen. Damit ist der größte Fortschritt dieser Geräte nicht die bessere laterale Auflösung, sondern das vertikale Auflösungsvermögen (Dunn et al. 1998, Pawley 1995). Natürlich müssen für Untersuchungen intrazellulärer Vorgänge die Präparate für ein Laser-Konfokal-Mikroskop genügend lichtdurchlässig sein und wegen der benötigten Fluoreszenz die zu untersuchenden Zellbestandteile angefärbt sein. So kommt der Qualität des Präparates eine überragende Bedeutung zu.

Die Idee, ein konfokales Mikroskop zu bauen, entstand schon Mitte der 50er Jahre. 1957 wurde das erste Patent angemeldet. Es benötigte aber die Entwicklung leistungsfähiger

Computer, bis die ersten benutzbaren Geräte Ende der 80er Jahre entstanden (Pawley 1995). Die hohe Auflösungsqualität und die Möglichkeit, Fluoreszenzquantitäten zu messen, ermöglichte erst die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen.

4.7 Messungen mit dem Zytometer

Will man große Menge an Zellen untersuchen und Unterschiede quantifizieren, ist dies mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop nur mit sehr großem zeitlichen und materialintensiven Aufwand zu betreiben. Schneller und genauer lassen sich solche Untersuchungen mit einem Zytometer durchführen. Binnen weniger Minuten können mehrere tausend Zellen einzeln am Laserstrahl vorbeigeführt werden und das emittierte Licht entsprechend angefarbter Zellen kann gemessen werden. Der Nachteil dieses Geräts ist allerdings, dass das Zytometer im Prinzip nur die Aussage „gefärbt“ oder „nicht gefärbt“ zulässt und eine Lokalisation der Fluoreszenz auf oder innerhalb der Zelle nicht möglich ist.

4.8 Diskussion der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse

Die Herkunft der Lipide in der Vakuolenmembran konnten nicht ermittelt werden. Die Art und Weise, wie sich die Vakuole bei dieser Färbung darstellt, lässt keine Rückschlüsse zu. Innerhalb der Zellen sind zu viele Membranen gefärbt, als dass man auf die Herkunft der Färbung schließen könnte. Es war nicht möglich, mit den unterschiedlichen Ansätzen der Membranfärbung (gleichzeitiges Anfärben von Zellen und Sporozoiten, Anfärben der Zellen vor der Infektion und Anfärben bereits infizierter Zellen) in infizierten VERO-Zellen die Herkunft des Membranmaterials zu bestimmen (Abb. E18 bis E23). Ob oder zu welchen Anteilen Wirtszelle oder Parasit zur Bildung der Vakuole beitragen, bedarf weiterer Untersuchungen. Mittels des Farbstoffes FM 1-43 konnte hier allerdings gezeigt werden, dass die parasitophore Vakuole offensichtlich nicht mit Vesikeln der Wirtszelle fusioniert, wie es auch für *Toxoplasma gondii* beschrieben ist (Joiner et al. 1990, Lingelbach und Joiner 1998, Bohne und Gross 1998, Mordue et al. 1999). Eine Vesikelfusionsinkompetenz ist für *Eimeria* bisher noch nicht beschrieben worden (Entzeroth et al. 1998). Sie konnte hier gezeigt werden, ansonsten hätten sich die Sporozoiten innerhalb der Vakuole aufgrund der großen Affinität des Farbstoffes zur Sporozoitenmembran anfärben lassen müssen (Abb. E21 und E24). Eine Anfärbung der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Vakuolenmembran ist vermutlich möglich, da der Farbstoff über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann und von der Vesikelmembran abdissoziiert. Somit läge der Farbstoff frei im Zytoplasma vor und wäre

in der Lage, an die Vakuolenmembran zu binden. Wie der Farbstoff aber aus dem Inneren der Vesikel austreten kann, bleibt Gegenstand von Spekulationen.

Der Farbstoff an sich ist aufgrund seiner zweifach positiven Ladung nicht in der Lage, Zellplasmamembranen zu durchdringen (Schote und Seelig 1998, Smith und Betz 1996), bindet an die Membranen aber reversibel (Smith und Betz 1996), so dass ein Austritt beim Öffnen des Vesikels möglich erscheint.

Eine andere Möglichkeit ist, dass die Zelle die Vakuole abschnürt und so nur die Wirtszellmembran gefärbt ist. In allen Fällen wird aber die Form der Vakuole nachgezeichnet und es lässt sich in Übereinstimmung mit Entzeroth et al. 1998 kein Hinweis darauf finden, dass die Vakuole Kontakt zu extrazellulärem Raum hat. Es sind weiterhin keine Fortsätze irgendwelcher Art zu finden wie zum Beispiel bei den Vakuolen von *Plasmodium* (Penny et al. 1998 Lingelbach und Joiner 1998, Lanners et al. 1999). Auch scheint ein „membran duct oder parasitophorous duct“, wie er für die Vakuole von *Plasmodium*, zumindest kontrovers, diskutiert wird (z.B. Penny 1998, Kirk et al. 1999), nicht zu existieren, ebenso, wie es auch dafür Hinweise aus Untersuchungen mit *Eimeria nieschulzi* gibt, dass eine solche Verbindung zum extrazellulären Raum nicht vorkommt (Werner-Meier und Entzeroth 1997). Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass sich die Vakuole genauso darstellt, wenn man vor der Färbung mit FM 1-43 die Zellen mit Methanol fixiert und permeabilisiert (Abb. E24). Sämtliche Strukturen sind so für den Farbstoff zugänglich und werden gefärbt. Dabei unterscheidet sich das Erscheinungsbild nur durch den jetzt in der Vakuole gefärbten Sporozoiten und durch das Fehlen der Vesikel innerhalb der Zelle. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich tatsächlich um Endozytosevesikel handelt, da die schnelle Fixierung keine Endozytose mehr ermöglicht.

Untersuchungen der PV in mit *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten infizierten, vorab mit PKH26 gefärbten VERO-Zellen zeigten, dass *Toxoplasma gondii* in der Vakuole gefärbt erscheint. Dies zeigt, dass ein Teil der Plasmamembran der Wirtszelle internalisiert und in die parasitophore Vakuolenmembran eingebaut wurde und einen möglichen Transfer von Lipiden von der Vakuolenmembran zum Parasiten. Wurde der Versuch mit gefärbten *Toxoplasma gondii* durchgeführt, erschien eine Fluoreszenz nur an der Stelle des Kontaktes mit der Wirtszelle. Innerhalb der Vakuole sowie in der Wirtszelle wurden keine Fluoreszenzen gefunden. Dies deutet darauf hin, dass Oberflächenmoleküle des Parasiten vor der Internalisation ins extrazelluläre Medium abgegeben werden (de-Souza et al. 1998). Für diese Versuche wurde der Farbstoff PKH26 verwendet, der irreversibel an die Membran bindet. Damit färben sich nur Membranen an, die ursprünglich mit dem umgebenden Medium in Kontakt waren. Eine Anfärbung eines Parasiten innerhalb der

parasitophoren Vakuole scheint so nur möglich, mit oder ohne Fusionsblock von Vesikeln mit der PV, wenn wie oben beschrieben ein Transfer von Molekülen aus der PV zum Parasiten erfolgt.

Es sei hier erwähnt, dass *Toxoplasma* in diesen Versuchen 15 oder 30 Sekunden Zeit hatten, um die Zellen zu infizieren oder zumindest an diesen zu adhären. Dann wurden die überschüssigen Parasiten wieder entfernt. Eine solch kurze Exposition führt nach eigenen Beobachtungen bei *Eimeria bovis* zu keiner Infektion. *Eimeria bovis*-Sporozoitien beginnen sich erst einige Zeit nach der Zugabe zu bewegen. Dies liegt daran, dass *Eimeria bovis*-Sporozoitien nicht aus einer ständig laufenden Kultur entnommen werden können. Vor einer Zugabe müssen daher *in vivo* gewonnene Sporozoitien erst aufgetaut und dann von dem Einfriermedium getrennt werden, was Vitalität und Bewegungsfähigkeit einschränkt (siehe Materialien und Methoden). Allerdings ist es in einzelnen Fällen gelungen, in BFGC (fötale Rinderzellen) einige wenige Oozysten zu gewinnen (Hermosilla et al. 2002). Das ganze System mit *Eimeria bovis* ist sehr viel diffiziler als mit *Toxoplasma gondii*. Zudem standen *Eimeria bovis* Sporozoitien nicht in einem Verhältnis von 50 Parasiten pro Zelle zur Verfügung. Ausgerechnet die Zelle zu finden, die von einem Sporozoitien infiziert wird, erschien daher als ein nicht reproduzierbares Unterfangen, auch wenn die Aufnahmen mit FM 1-43 an lebenden Zellen durchgeführt wurden. Die einzige Ausnahme ist das rechte Bild in der Abbildung E24, dort wurde die infizierte Zelle vor der Färbung mit FM 1-43 durch Methanol permeabelisiert und fixiert.

Eine andere Frage muss hier noch gestellt werden. Wenn ein Parasit beim Eindringen in die Wirtszelle eigene Organellen entleert und diese Proteine sich in der Vakuolenmembran nachweisen lassen (z.B. de-Souza et al. 1998, Lingelbach und Joiner 1998), wie schnell kann der Parasit diese Proteine wieder herstellen, um eventuell in einer anderen Zelle erneut eine Vakuole zu bilden? Kann er das nicht, ist ein Egress aus der ersten Wirtszelle nutzlos. Ein solcher Egress ist von Shaw und Tinley (1999), Werner-Meier und Entzeroth (1997) beschrieben worden und kann bei *Eimeria bovis* durch mechanischen Stress (Behrendt et al. 1999) oder aber durch das Ionophor A23187 sowie Nicotin-di-d-tartrat verursacht werden (Abb. E22). Dieser Egress ist vom Zeitpunkt der Infektion bis zu 20 Tagen nach der Infektion möglich. Ein Verlassen der Zelle ohne Einflüsse von außen ist unmittelbar nach einer Infektion möglich. Zu dieser Zeit wurden Sporozoitien beobachtet, die mehrfach in Zellen eindringen, um sie einfach zu durchqueren oder nach kurzer Zeit wieder zu verlassen, um eine andere Zelle zu infizieren. Es scheint durchaus möglich, dass *Eimeria bovis*-Sporozoitien dabei unterschiedliche Mechanismen in Zellen desselben Typs benutzen und es so in einigen dieser Zellen erst gar nicht zu einem Versuch kommt, eine

Vakuole zu bilden. Ähnliches wird auch für *Plasmodium*- und *Toxoplasma*-Sporozoitien diskutiert (Mota und Rodriguez 2001). Dies gilt für Zellen desselben Typs *in vitro*, aber im Falle von *Eimeria bovis* muss der Sporozoit *in vivo* in der Lage sein, das Epithel des Darms zu durchdringen um zu den Endothelzellen, den Ort der Entwicklung, zu gelangen (siehe oben). Auch *Plasmodium*-Sporozoitien müssen in der Lage sein, Zellen zu durchqueren um zu den Zielzellen zu gelangen (Mota et al. 2001). Wie und ob die invasiven Stadien der *Apicomplexa* Zellen erkennen, die zu durchqueren sind, in denen eine Entwicklung und damit die Bildung einer Vakuole sinnvoll ist, und wie „gute und schlechte“ Zellen des Zielorgans erkannt werden, ist meines Wissens noch ungeklärt.

Dass sich auch in BSLEC und BUVEC nicht alle intrazellulär vorliegenden *Eimeria bovis*-Sporozoitien weiterentwickeln, ihre Vitalität aufgrund ihrer Fähigkeit zum Egress aber bewiesen ist, mag an ungünstigen Bedingungen innerhalb der Wirtszelle liegen. Eine andere Möglichkeit ist, dass *Eimeria bovis* einen Vorteil hat, wenn sich nicht alle Sporozoitien gleichzeitig weiterentwickeln. Die Tatsache, dass es *in vitro* auch 20 Tage nach der Infektion Schizonten gibt, die deutlich variieren, zum Beispiel in Größe und Entwicklungsgrad der Merozoiten, ist ein Hinweis, der dies unterstreicht. Ob allerdings vitale Sporozoitien 20 Tage nach der Infektion noch in der Lage wären, sich zu einem Schizonten zu entwickeln, ist ungewiss.

4.8.1 Veränderung des Zytoskeletts

Mit Hilfe des Laser-Konfokal-Mikroskops und dessen Möglichkeit, Fluoreszenzintensitäten zu messen, war es möglich nachzuweisen, dass sich die gemessenen Zytoskelettbestandteile um den Parasiten *Eimeria bovis* deutlich vermehren.

de-Souza et al. (1998) beschreiben bei Infektionen mit *Trypanosoma cruzii* eine Zunahme des Aktins an der Stelle, an der Parasit und Zelle in Kontakt kommen. Allerdings finden sich auch einige Parasiten ohne diese Aktinakkumulation. Da diese Stadien in derselben Zelle vorkommen können, schlossen die Autoren, dass *Trypanosoma cruzii* über einen aktiven und über einen passiven (Phagozytose abhängigen) Infektionsweg verfügt. Ob es in beiden Fällen auch zu einer Weiterentwicklung kommt, wurde nicht beschrieben. Bei den Mikrotubuli kommt es nach den Autoren zu einer möglichen Assoziation mit der Vakuole, aber zu keiner Veränderung im Verteilungsmuster der Mikrotubuli. Erst nach 72 Stunden kam es zu einer Reduktion oder Umorganisation der Mikrotubuli. Im Gegensatz dazu wurden bei *Toxoplasma gondii* keine signifikanten Veränderungen beim Aktin, aber Layer von Mikrotubuli um die Vakuole gefunden (de-Souza et al. 1998).

Bei Infektionen mit *Eimeria bovis* kommt es in den Zellen, in denen sich der Sporozoit weiterentwickelt, zu einer massiven Vermehrung von Aktin, α -Tubulin und azetyliertem Tubulin um die Vakuole des Schizonten. Eine Untersuchung des Zytoskeletts während der Phase des Eindringens wurde nicht durchgeführt, da es nicht möglich war den Ort und die Zeit des Infektionsvorganges vorausszusehen. Aktin und Mikrotubuli sehen aber 3 Stunden nach der Infektion aus wie 3 Tage nach der Infektion. Das heißt, dass, abgesehen von den unterschiedlichen Entwicklungszeiten einer jeden Parasitenart, hier eine völlig andere Modifikation des Zytoskeletts gebildet wird. Ob diese Änderungen allein vom Parasiten hervorgerufen werden, sie ein Schutzmechanismus der Wirtszelle sind, oder Parasit und Wirtszelle daran beteiligt sind, ist noch unklar.

Für *Plasmodium* ist eine Veränderung von Wirtszellfunktionen durch den Erreger beschrieben. So werden die limitierten Transporteigenschaften der Erythrozytenmembran so verändert, dass verschiedene Ionen und kleinere Moleküle zusätzlich die Membran passieren können (Saliba und Kirk 2001). Für *Apicomplexa*, die sich nicht wie *Plasmodium* in kernfreien Erythrozyten entwickeln, ist es deutlich schwieriger, eine Veränderung ausschließlich dem Parasiten zuzuschreiben. Im Falle von *Eimeria bovis*-Sporozoiten muss das intrazelluläre Stadium über 14 bis 20 Tage versorgt werden. Das bedeutet Wachstum der Vakuole und damit einhergehend Vermehrung des Membranmaterials sowie die Zufuhr von metabolisch essentiellen Stoffen und vermutlich Abtransport von schädlichen Stoffwechselprodukten aus der Vakuole heraus. Dies spricht für die Induzierung des Zytoskeletts durch den Parasiten. Mikrotubuli und die azetylierte, stabilisierte Form sind als Transportwege durch die Zellen beschrieben (Takemura et al. 1992, Aroeti et al. 1998, Lane und Allan 1998). Die hier gezeigte massive Vermehrung spricht für diese Theorie auch bei *Eimeria bovis*. Eine Versorgung des Parasiten über Exozytose durch die Zelle muss aber aufgrund der Ergebnisse mit dem Membranfarbstoff FM 1-43 ausgeschlossen werden. Die benötigten Stoffe müssen also über Poren, Kanäle oder Transporter durch die Vakuolenmembran zum Parasiten gelangen. Solche Poren sind für *Toxoplasma gondii* (Schwab et al. 1994) und für *Eimeria nieschulzi* (Werner-Meier und Entzeroth 1997) beschrieben worden.

Eimeria bovis ist allerdings in der Lage, sich trotz einer Behandlung mit Colchicin zum Schizonten weiter zu entwickeln. Diese Entwicklung findet trotz des dadurch deutlich beeinträchtigten Tubulinskeletts statt (Abb. E32).

Bei den Abbildungen, die azetyliertes Tubulin in den Zellen zeigen, fällt auf, dass neben den Schizonten die nicht infizierten Zellen kaum zu erkennen sind. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Bedarf an Mikrotubuli, die durch eine Azetylierung

stabilisiert sind, in einem dichten Zelllayer deutlich geringer ist als in einzeln liegenden Zellen (vergleiche Abb. E17, E16, E11, E7).

Um eindeutig zu klären, ob die induzierte Veränderung des Zytoskeletts vom Parasiten oder der Wirtszelle stammt, müsste ein artifizielles System in einer Zelle zur Ausdehnung gebracht werden, wie etwa ein Ballon. Würde sich das Zytoskelett nach entsprechender Ausdehnung genauso darstellen, wie um einen *Eimeria bovis*-Schizonten, wäre eine Induzierung durch den Parasiten auszuschließen. Ein solcher Versuchsaufbau scheint aber technisch nicht möglich zu sein. So ein kleiner „Ballon“ ist mir nicht bekannt und alleine einen Gegenstand über 2 Wochen in einer Zelle eingeführt zu lassen, ohne dass diese zu Grunde geht oder kontaminiert, scheint ausgeschlossen. Betrachtet man aber die Vakuolen in den VERO-Zellen, die durchaus die Größe eines kleinen Schizonten in BSLEC oder BUVEC erreichen können, stellt man keine Vermehrung des Zytoskeletts fest. Nimmt man an, dass der Parasit aufgrund seiner ausbleibenden Weiterentwicklung auch zu keiner Induzierung der Zytoskelettvermehrung in der Lage ist, könnte man dies als „Ballonexperiment“ ohne Zytoskelettveränderung ansehen, und damit eine Induzierung durch den Parasiten extrapolieren.

4.8.2 DNA-Darstellung mit dem Farbstoff H33342

Durch die Färbung der DNA erkennt man, dass die parasitophore Vakuole stets nahe am Kern liegt, dieser wird dabei vor allem in den VERO-Zellen deutlich deformiert. Ähnliches geschieht, wenn sich in den Rinderendothelzellen die Schizonten bilden. Dies deutet auf ein mechanisches Problem hin. Der durch die Ausdehnung eines Objektes innerhalb einer Zelle benötigte Platz wird offenbar nicht durch eine ausreichende Vermehrung von Membranmaterial erzeugt. Dies ist insofern bemerkenswert, als Verformung des Zellkerns in BSLEC schon bei relativ kleinen Schizonten auftritt (Abb. E11-3, E12-2, E13-3, E16-1, E17-3), diese Zellen aber in der Lage sind, Schizonten zu beherbergen, die ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe ausmachen und trotzdem mit Membran umgeben sind. Offensichtlich ist es einer infizierten Zelle leichter, eine Deformierung des Kerns hinzunehmen, als Membranmaterial zu produzieren. Dass in einer infizierten Zelle Membranmaterial erzeugt und eingebaut werden kann, zeigen die großen Schizonten. In Zellen mit großen Schizonten findet man den Kern aus dem zentralen Bereich der Zelle hinausgedrückt. Im dichten Zellverband ist der Kern der infizierten Zellen manchmal selbst mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop nicht eindeutig zu identifizieren, da benachbarte Zellen scheinbar in der infizierten Zelle mit aufgenommen sind und so mehrkernige Zellen vortäuschen. Gelegentlich kann innerhalb des Schizonten kein Zellkern gefunden werden.

Mit diesem Farbstoff ließ sich die Parasiten-DNA ebenfalls darstellen. Allerdings kommt es im Laufe der Entwicklung zu einem Stadium, in dem sich die Parasiten-DNA unter den verwendeten Messbedingungen, das Zytoskelett abzubilden, nicht nachweisen lässt. Mit zunehmendem Alter des Schizonten lässt sich dann allerdings DNA wieder nachweisen. Dieses Phänomen könnte auf eine erhöhte Replikation der DNA zurückzuführen sein, in der die Bindungsstelle des Farbstoffes, die kleine Grube der DNA-Helix (Satz et al. 2001, Molecular Probes 1999), sterisch verändert oder von DNA-Polymerasen besetzt ist. Erst die DNA der Merozoiten lässt sich wieder anfärben. Die Tatsache, dass sich bis zu 120000 Merozoiten durch Endopolygonie in einem Schizonten bilden (siehe oben), stützt diese Vermutung.

4.8.3 Apoptose in infizierten Zellen

Für *Theileria parva*, einen anderen rinderpathogenen Erreger aus dem Unterstamm der *Apicomplexa*, ist gezeigt, dass dieser Erreger Apoptosen in der Wirtszelle, den T-Lymphozyten, unterdrücken kann (Heussler et al. 1999). Ebenfalls vermag *Toxoplasma gondii*, Apoptosen, die durch Actinomycin D in HL-60 Zellen induziert wurden, zu unterbinden (Goebel et al. 1999).

Das Unterdrücken der Apoptose erscheint essentiell für intrazelluläre Erreger, nicht nur für *Apicomplexa*, sondern auch für einige Bakterien und Viren (Heussler et al. 2001), doch ist für einige intrazelluläre Bakterien und Viren der umgekehrte Weg beschrieben. Diese Organismen scheinen Vorteile aus der Induktion von Apoptosen ihrer Wirtszellen zu ziehen (Goebel et al. 1999, Aepfelbacher et al. 1999, Grassme et al. 2001).

Die bisher zitierten Versuche wiesen eine Unterdrückung der Apoptosen in Zellen immer in Versuchansätzen nach, in denen deutlich mehr Parasiten als Wirtszellen vorhanden waren (Goebel et al. 1999, Heussler et al. 1999). Aufgrund der geringen Infektionsrate und relativ aufwendigen Prozedur, die *Eimeria bovis*-Sporozoitien zu gewinnen, wurde hier die Anzahl der Parasiten variiert, unter der Annahme, dass mehr intrazelluläre Sporozoitien, bei gleicher Zellzahl, auch mehr Zellen vor der Apoptose schützen könnten. Somit konnte mit deutlich geringeren Parasitenzahlen die Versuche durchgeführt werden. Die Möglichkeit, dabei unter die Nachweisgrenze zu fallen, war allerdings nicht auszuschließen. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass auch *Eimeria bovis* in der Lage ist, Apoptosen, die durch Actinomycin D induziert wurden, zu verhindern. Die gewählten Mengen an Sporozoitien, die für diese Experimente eingesetzt wurden, scheinen auszureichen, um eine mengenabhängige Inhibition induzierter Apoptosen nachzuweisen. Aus den Messungen mit Colchicin ist dies nicht zu schließen, allerdings erfolgt in BUVEC nach Zugabe von

Colchicin eine Weiterentwicklung zum reifen Schizonten. Dies ist an den Merozoiten innerhalb des Schizonten zu erkennen (Abb. E32). Soweit bekannt, ist dies hier auch der erste Hinweis, dass nicht nur Apoptosen unterbunden werden konnten, sondern dass es danach auch zu einer Weiterentwicklung kommt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche zu Apoptosen können nur dazu dienen, Hinweise auf eine Inhibierung zu geben. Mit der Kombination aus Mikroskop und Zytometer verdichten sich die Aussagen. Um allerdings einen endgültigen Beweis für die Inhibierung liefern zu können, müssen die hier erstmals für *Eimeria bovis* etablierten Methoden wiederholt werden.

Untersuchungen zu den Interaktionen von Parasiten und ihren Wirtszellen können nicht nur helfen, Infektionen und ihre Auswirkungen zu bekämpfen, sondern auch als Modell für zytologische Untersuchungen genutzt werden. So lassen sich vielleicht noch weitere offene Fragen zu Mechanismen klären, und nicht nur solche zu Membranen, Apoptosen und Zytoskelett.

5. Zusammenfassung

Bei der Infektion von Rinderendothelzellen durch *Eimeria bovis* kommt es zur Entwicklung einer parasitophoren Vakuole. Dabei liegt die Vakuolenmembran bei primären Rinderendothelzellen -gewonnen aus der Nabelschnur und der Milz- sehr eng an Sporozoiten an. Im Gegensatz dazu bildet sich in den VERO-Zellen, einer Zelllinie aus der Niere der Grünen Meerkatze, eine Vakuole, die sehr viel größer als der Sporozoit ist. Durch Anfärben der Zellmembran mit dem reversibel an die Membranen bindenden Farbstoff FM 1-43 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu keiner Fusion zwischen Vesikeln und Vakuolenmembran kommt. Anderenfalls hätte die Anfärbung bereits infizierter Zellen zu einer Bindung des Farbstoffes an die intravakuolären Sporozoiten erfolgen müssen.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass sich das Zytoskelett durch Einwirkung des Parasiten massiv vermehrt, und zwar im Entwicklungsstadium vom Sporozoiten zum Schizonten. Sowohl Tubulin als auch Aktin nehmen um den Schizonten herum stark zu. Dabei kommt es auch zu einer Vermehrung des azetylierten Tubulins.

Im Laufe der Entwicklung lassen sich mit dem DNA-Farbstoff H33342 die Kerne der Merozoiten färben. Aber während der Entwicklung kommt es zu einem Stadium, in dem sich innerhalb des Schizonten keine DNA anfärben lässt.

Für zukünftige Untersuchungen wurde ein sehr starker Hinweis dafür gefunden, dass *Eimeria bovis* Apoptosen verhindern kann, die sonst durch Actinomycin D in den verwendeten Zelllinien induzierbar waren. Bei Gabe von Colchicin kommt es trotz stark veränderten Tubulin zu einer Weiterentwicklung bis hin zum Schizonten mit Merozoiten.

Summary

Upon the infection of bovine endothelial cells through *Eimeria bovis* the development of a parasitophorous vacuole is induced. Within the primary bovine endothelial cells –the cells are developed from umbilical vein or spleen- the parasitophorous vacuole membrane matches the sporozoites very closely. In contrast to this a vacuole several times larger than the sporozoite develops in VERO cells, a cell line from a green monkey kidney. Using the plasma membrane stain FM 1-43, which binds reversibly to plasma membranes, it was possible to show in this work that there is a vesicle fusion block to the parasitophorous vacuole because a staining of infected cells should have resulted in the staining of sporozoites inside the vacuole.

The second result of this work indicates a massive increase of the cytoskeleton in accordance to the progressing development of the parasite from the sporozoite to the schizont. Tubulin and actin increase profoundly around the schizont. An increase of acetylated tubulin occurs as well.

During the development of the parasite the nuclei of merozoites can be stained with the DNA stain Hoechst 33342. However, a stage when no DNA inside the parasitophorous vacuole could be stained was observed in the middle of the development.

For future investigations clues were found that *Eimeria bovis* can prevent apoptosis otherwise induced by actinomycin D in the cell lines used. When cells are treated with colchicine the development of the parasite progresses even though the microtubule based cytoskeleton is disturbed considerably.

6. Literaturverzeichnis

Aepfelbacher M, Zumbihl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C, Heesemann J (1999) The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: A pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem* 380: 795-802

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1997) *Molekularbiologie der Zelle* 3. Auflage, übersetzt von Jaenicke L (Leitung), VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo

Aroeti B, Okhrimenko H, Reich V, and Orzech E (1998) Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1376: 57-90

Behrendt JH, Milde H, Weber WM, Kowalik S, Zahner H, Bürger HJ, Claus W (2000) Intracellular calcium and pH conditions of cultured cells infected with *Eimeria bovis* or *E. seperata*. *Parasitol Res* 86: 294-300

Bereiter-Hahn J (1971) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Funktion von Tonofilamenten in den Epidermiszellen von Fischen. *Cytobiologie* 4 : 73-102

Bereiter-Hahn J, Osborn M, Weber K, Vöth M (1979) Filament organization of microridges at the surface of fish epidermis. *J Ultrastruct Res* 69: 316-330

Bohne W und Groß U (1998) *Toxoplasma gondii* – Strategien eines erfolgreichen Parasiten *Biospektrum* 5: 27- 31

Bonfoco E, Ceccatelli S, Manzo L, Nicotera P (1995) Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res* 218: 189-200

Bürger HJ, Fiege N, Gahr A, Heise A, und Roloff H (1995) Guidelines on techniques in coccidiosis research. Edited by Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P. Published by the European Commission, Brüssel

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* 276: 1425-1428

Cantiello HF und Prat AG (1996) Role of actin filament organization in ion channel activity and cell volume regulation. In: *Membrane protein-cytoskeleton interaction* (Nelson WJ, Ed) *Current topics in membranes* Vol 43, Academic Press, San Diego

del Portillo HA, Fernandez- Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP, Schneider NK, Villalobos JM, Rajandream MA, Harris D, Pereira da Silva LH, Barel B, Lanzer M (2001) A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 410: 839-842

de-Souza W, de-Carvalho TU, de-Melo ET, Soares CP, Coimbra ES, Rosestolato CT, Ferreira SR, Viera M (1998) The use of confocal laser scanning microscopy to analyze the process of parasitic protozoon-host cell interaction. *Braz J Med Biol Res* 31: 1459-1470

- Dobrowolski JM und Sibley LD (1996) *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84: 933-939
- Dörrenhaus A, Müller JIF, Golka K, Jedruski P, Schulze H, Föllman W (2000) Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and renal tubular system. *Arch Toxicol* 74: 618-626
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN (1998) Apical organelles and host-cell invasion by *Apicomplexa*. *Intern J Parasitol* 28: 1007-1013
- Duke RC, Ojcius DM, Young JDE (1997) Die Apoptose – Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft* 2: 26-35
- Dunn K und Maxfield FR (1998) Ratio Imaging Instrumentation. In: *Methods in cell biology Vol.56*, Anonymous p. 217-236.
- Eckert J, Kutzer E, Rommel M, Bürger HJ, Körting W (1992) Veterinärmedizinische Parasitologie, Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg 4. Auflage
- Entzeroth R, Mattig FR, Werner-Meier R (1998) Structure and function of the parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. *Intern J Parasitol* 28: 1015-1018
- Fiege N, Klatte D, Kollmann D, Zahner H, Bürger HJ (1992) *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immun response to experimental infections. *Parasitol Res* 78: 32-38
- Fitzgerald PR (1980) The economic impact of coccidiosis in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 24, 121-143
- Fayer R und Hammond DM (1967) Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. *J Protozool* 14: 764-772
- Glanz J (1997) Force carrying web pervades living cell. *Science* 276: 678
- Goebel S, Lüder CGK, 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
- Gottlieb AI, Langille BL, Wong MKK, Kim DW (1991) Biology of disease Structure and function of endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* 65: 123-137
- Grassme H, Jendrossek V, Gulbins E (2001) Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis* 6: 441-445
- Gurland G und Gundersen GG (1993) Protein phosphatase inhibitors induce the selective breakdown of stable microtubules in fibroblasts and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8827-8831
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514
- Hammond DM, Andersen FL, Miner ML (1963) The occurrence of a second asexual generation in the life cycle of *Eimeria bovis* in calves. *J Parasitol* 49: 428-434

- Hammond DM, Bowman GW, Davis LR, Simms BT (1946) The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*. J Parasitol 32: 409-427
- Herder-Lexikon der Biologie (1994) Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford
- Hermosilla C (1998) T-Zellreaktion bei mit *Eimeria bovis* infizierten Kälbern. Inaug. Diss., Vet. Med., Justus-Liebig-Universität Gießen
- 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
- Heussler VT, Küenzi P, Rottenberg (2001) Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. Intern J Parasitol 31: 1166-1176
- Heussler VT, Machado Jr J, Fernandez PC, Botteron C, Chen CG, Pearse MJ, Dobbelaere DAE (1999) The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 96: 7312-7317
- Janmey PA (1998) The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. Physiol Rev 78: 763-781
- Johnson GD, Davidson RS, McNamee KC, Russel G, Goodwin D, Holborow EJ (1982) Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. J Immunol Meth 55: 231-242
- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I (1990) *Toxoplasma gondii*: Fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. Science 249: 641-646
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HYM, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature 410: 549-554
- Kirk K, Tilley L, Ginsburg H (1999) Transport and trafficking in the Malaria-infected erythrocyte. Parasitol Today 15: 355-357
- Kirschner M und Mitchison T (1986) Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. Cell 45: 329-342
- Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? EMBO J 19: 1176-1179
- Lane J und Allan V (1998) Microtubule-based membrane movement. Biochim Biophys Acta 1376: 27-55
- Lanners HN, Bafford RA, Wiser MF (1999) Characterization of the parasitophorous vacuole membrane from *Plasmodium chabaudi* and implications about its role in the export of parasite proteins. Parasitol Res 85: 349-355

- Lee E und Knecht DA (2002) Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic* 3: 186-192
- Lieberthal W und Levine JS (1996) Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271: F477-F488
- Lingelbach K und Joiner KA (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: An unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111: 1467-1475
- Luxford KA and Murphy CR, (1993) Cytoskeletal control of the apical surface transformation of rat uterine epithelium. *Biol Cell* 79: 111-116
- Ma TY, Hollander D, Tran LT, Nguyen D, Hoa N, Bhalla D (1995) Cytoskeletal regulation of Caco-2 intestinal monolayer paracellular permeability. *J Cell Physiol* 164: 533-545
- MacRae T (1997) Tubulin post-translational modifications Enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244: 265-278
- Marsden VS, O'Conner L, O'Reilly L, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DCS, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Sophie R, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrom c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419: 634-637
- Mejillano MR, Shivanna BD, Himes RH (1996) Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of tubulin. *Arch Biochem Biophys* 336: 130-138
- Mitic LL und Anderson JM (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60: 121-142.
- Molecular Probes (1999) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (seventh edition)
- Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD (1999) *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic trafficking pathways. *Exp Parasitol* 92: 87-99
- Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B, Agard DA (1995) Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378: 638-640
- Moroianu J, Fett JW, Riordan JF, and Vallee BL (1993) Actin is a surface component of calf pulmonary artery endothelial cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3815-3819
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A (2001) Migration of *Plasmodium* Sporozoites through cells before infection. *Science* 291: 141-144
- Mota MM und Rodriguez A (2001) Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Infect* 3 :1123-1128
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curil TJ (1998) *Toxoplasma gondii* - infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol* 160: 1824-1830

Panda D, Daijo JE, Jordan MA, Wilson L (1995) Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state *in vitro* by substoichiometric concentrations of tubulin-colchicine complex. *Biochemistry* 34: 9921-9929

Pawley JB (1995) Handbook of biological confocal microscopy. Second Edition (Pawley JB Ed.) Plenum Press New York.

Penny JI, Hall ST, Woodrow CJ, Cowan GM, Gero AM, Krishna S (1998) Expression of substrate-specific transporters encoded by *Plasmodium falciparum* in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biochem Parasitol* 93: 81-89

Rick B, Dubremetz JF, Entzeroth R (1998) A merozoite-specific 22-kDa rhoptry of the coccidium *Eimeria nieschulzi* (Sporozoa, Coccidia) is exocytosed in the parasitophorous vacuole upon host cell invasion. *Parasitol Res* 84: 291-296

Saliba KJ und Kirk K (2001) Nutrient acquisition by intracellular apicomplexan parasites: staying in for dinner. *Intern J Parasitol* 31: 1321-1330

Satir P (1997) Cilia and related microtubular arrays in the eukaryotic cell. Handbook of physiology Sec. 14 Cell Physiology Ed. Hoffman JF, Jamieson JD Oxford University Press Oxford, New York

Satz AL, White CM, Beerman TA, Bruice TC (2001) Double-stranded DNA binding characteristics and subcellular distribution of a minor groove binding diphenyl ether bisbenzimidazole. *Biochemistry* 40: 6465-6474

Schaerer-Brodbeck C und Riezman H (2000) Interdependence of filamentous actin and microtubules for asymmetric cell division. *Biol Chem* 381: 815-825

Schote U und Seelig J (1998) Interaction of the neuronal marker dye FM 1-43 with lipid membranes thermodynamics and lipid ordering. *Biochim Biophys Acta* 1415: 135-146

Schröpfer E, Soose M, Rehn M, Leiser R, Clauss W (2000) Apical surface and cytoskeleton of epithelial monolayers from the A6 kidney cell culture line. *Zoology* 103: 59-67

Schwab JC, Beckers CJM, Joiner KA (1994) The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 509-513

Shaw MK und Tinley LG (1999) Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: Visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9095-9099

Sinai AP und Joiner K (2001) The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 154: 95-108
Smith CB und Betz WJ (1996) Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature* 380: 531-534

Sobell HM (1974) How actinomycin binds to DNA. *Sci Amer* 231/2: 82-91

- Steinmetz MO, Stoffler D, Hoegner A, Bremer A, Aebi U (1997) Actin: from cell biology to atomic detail. *J Struct Biol* 119: 295-320
- Stryer L, 1990 Biochemie (Übersetzung der 3. amerikanischen Auflage) Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg
- Sun TT, Eichner R; Nelson WG, Tseng SC, Weiss RA, Jarvinen M, Woodcock-Mitchel J (1983) Keratin classes: molecular markers of different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl):109-115
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa Y (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103: 953-964
- Taub M und Sato G (1980) Growth of functional primary cultures of kidney epithelial cells in defined medium. *J Cell Physiol* 105: 369-378
- The cytokine bulletin (1998) Apoptosis: Mitochondria accused of murder; caspases accused of aiding, abetting, and destroying evidence.
www.rndsystems.com/cb/cbsp98/cbsp98a5.html
- Tilney LG und Portnoy DA (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597-1608
- Tujulin E, Macellaro A, Lillienhök B, Norlander L (1998) Effect of endocytosis inhibitors on *Coxiella burnetii* interaction with host cell. *Acta Virol* 42: 125-131
- Uehara K, Miyoshi M, Miyoshi S (1994) Function of the cytoskeleton in cells with microridges from oral epithelium of the carp *Cyprinus carpio*. *Cell Tissue Res* 276: 45-50
- van den Ent F, Amos LA, Löwe J (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413: 39-44
- van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, and Reutelingsperger CPM (1996) A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131-139
- Vaux DL und Strasser A (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2239-2244
- Verrey F, Groscurth P, Bollinger U (1995) Cytoskeletal disruption in A6 kidney cells: impact on endo/exocytosis and NaCl transport regulation by antidiuretic hormone. *J Membr Biol* 145: 193-204
- Volkman N, DeRosier D, Matsudaira P, Hanein D (2001) An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function. *J Cell Biol* 153: 947-956
- Werner-Meier R und Entzeroth R (1997) Diffusion of microinjected markers across the parasitophorous vacuole membrane in cells infected with *Eimeria nieschulzi* (*Coccidia, Apicomplexa*). *Parasitol Res* 83: 611-613

Yap AS, Stevenson BR, Abel KC, Cragoe EJ Jr, Manley SW (1995) Microtubule integrity is necessary for the epithelial barrier function of cultured thyroid cell monolayers. *Exp Cell Res* 218: 540-550

Yu FL (1980) Selective inhibition of rat liver nuclear RNA polymerase II by actinomycin D in vivo. *Carcinogenesis* 1: 577-581

7. Danksagung

Während der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, habe ich vielfältige Hilfe erfahren dürfen, ohne die diese Arbeit so hätte nicht entstehen können.

Rückblickend kann ich sagen, dass mir während dieser Zeit nicht nur wissenschaftliche Ratschläge zu Teil geworden sind, sondern auch Freundschaften entstanden sind, die hoffentlich auch noch bestehen werden, wenn ich über die Zeit der Doktorarbeit in der Vergangenheitsform rede.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Wolfgang Clauß für das Überlassen des Themas, sein ständig offenes Ohr bei Problemen und für die andauernde Bereitschaft, Ideen zu diskutieren.

Ebenso geht mein herzlicher Dank an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Tierphysiologie für die Zusammenarbeit und das fantastische Arbeitsklima. Im Zusammenhang mit der Bearbeitung dieses Themas danke ich besonders Frau Miriam Buß für die Betreuung der Zellkulturen. Nicht vergessen seien die Gäste des Institutes, die in anregenden Diskussionen so manche Idee mit ausbrüteten.

Herausheben möchte ich an dieser Stelle Jan Hillern Behrendt und Ursula Eckstein-Ludwig, die mit mir zusammen in diesem Institut an *Eimeria* forschten. Die Zusammenarbeit und die entstandenen Freundschaften waren und sind etwas ganz besonderes.

In gleichem Maße gilt mein Dank Herrn Professor Horst Zahner und Dr. Carlos Hermosilla aus dem Institut für Parasitologie, Giessen. Ohne die Bereitstellung von Zellen, Parasiten und „Know how“ wäre diese Arbeit nicht zu verwirklichen gewesen. Vor allem die Zusammenarbeit mit Carlos sei hier nochmals hervorgehoben.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie danken, die an der Exzystierung der Parasiten und Gewinnung der BUVEC beteiligt waren.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Professor Georg Baljer und Dr. Christian Menge und allen meinen neuen Arbeitskollegen am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, zuerst einmal für die Bereitstellung des Zytometers und zweitens für die Geduld, die sie aufbringen mussten, bis meine Dissertation endlich fertig war.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Michael Lanzer und Dr. Sigrid Ricken am Hygiene-Institut Heidelberg, und Herrn Professor Rainer Renkawitz, Institut für Genetik Giessen, für die Möglichkeit, in ihren Laboren Experimente durchzuführen, und Herrn Professor Klaus Lingelbach, Fachbereich Biologie/Zoologie Marburg, für fachliche Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Großeltern für ihre finanzielle Unterstützung.

Vielen, vielen Dank an meinen Vater und Carlos für das Korrekturlesen.

Ein ganz, ganz großes Dankeschön für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch während der gesamten Zeit möchte ich an meine Freundin Anke richten, die viel zu lange das „Kreative Chaos“ in unserem Arbeitszimmer ertragen musste.

8.Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen wurden, sind mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gießen, den 26.03. 2003