

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
- Programmbereich Infektionen -

Programmdirektor:
Prof. Dr. Ulrich Schaible

**Identifizierung und Charakterisierung potenzieller Attenuierungsmarker
von *Theileria annulata* Lebendvakzinen**

Betrachtung von Histondeacetylasen hinsichtlich Differenzierung und
Attenuierung von *Theileria annulata*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Susan Grützbach
aus Halle (Saale)

Lübeck 2015

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. Norbert Reiling

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.09.2015

Klaus Grouitz
gewidmet,
dessen Wissensdurst
ich bis heute
bewundere

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	<i>Theileria annulata</i> und Tropische Theileriose	2
2.2	Lebenszyklus von Theilerien	2
2.2.1	Lebenszyklus von <i>Theileria annulata</i> im Rind	3
2.2.2	Lebenszyklus von <i>Theileria annulata</i> im Vektor	4
2.3	Pathogenese	5
2.4	Immunantwort	6
2.5	Bekämpfung der Tropischen Theileriose	7
2.5.1	Vektorkontrolle	7
2.5.2	Chemotherapie	8
2.5.3	Immunisierung	8
2.6	Theilerien induzieren die Wirtszelltransformation	9
2.7	Attenuierung und Reduktion des Differenzierungspotenzials von <i>T. annulata</i>	12
2.7.1	Attenuierung von Virulenzfaktoren	12
2.7.2	Reduktion des Differenzierungspotenzials von <i>T. annulata</i>	14
2.8	Regulation eukaryotischer Genexpression durch epigenetische Modifikationen	15
2.8.1	Attenuierung und Abschwächung des Differenzierungspotenzials in Apicomplexa	16
2.8.2	Regulation der Genexpression in Eukaryota durch Histonacetylierung	18
2.8.3	Klassifikation von Histondeacetylasen	19
2.8.4	Histondeacetylasen der Apicomplexa	19
2.9	Zielsetzung der Arbeit	21
3	Material	23
3.1	Geräte	23
3.2	Chemikalien, Enzyme und Kits	25
3.3	Verbrauchsmaterialien	27

3.4	Lösungen, Puffer und Medien	28
3.5	Bakterienstämme und Plasmide	28
3.6	Zelllinien	29
3.6.1	<i>T. annulata</i> -infizierte Leukozyten der Linie <i>Ta#868</i>	29
3.6.2	<i>T. annulata</i> -infizierte Leukozyten der Linie <i>Ta#173</i>	31
3.7	Synthetische Oligonukleotide	32
3.7.1	Primer	32
3.7.2	Sonden	33
3.8	Antikörper	34
3.9	Computerprogramme, Datenbanken und Webapplikationen	35
4	Methoden	37
4.1	Mikrobiologisches Arbeiten	37
4.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	37
4.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation	37
4.1.3	Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen bzw. Transformanten	38
4.2	Zellbiologische Methoden	38
4.2.1	Zellkultivierung	38
4.2.2	Zellaufbereitung für qRT-PCR und <i>Western Blot</i> -Analyse	40
4.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	41
4.2.4	ICW: <i>In Cell Western</i>	42
4.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren	44
4.3.1	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren	44
4.3.2	Arbeiten mit Ribonukleinsäuren	46
4.3.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	49
4.4	Arbeiten mit Polypeptiden	49
4.4.1	Herstellung von Proteinrohextrakten aus <i>T. annulata</i> -infizierten Zellen	49
4.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	50
4.4.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	50
4.4.4	Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen	51
4.4.5	Proteintransfer mittels eines <i>Tank Blot</i> -Systems	51

4.4.6	Ponceau S Färbung	51
4.4.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen (<i>Western Blot</i> -Analyse)	52
4.5	Handhabung von Daten und statistische Auswertung	52
4.5.1	Auswertung von qRT-PCR-Daten	52
4.5.2	Densitometrische Auswertung	53
4.5.3	Auswertung der <i>In Cell Western</i> -Daten	53
4.5.4	Statistische Analysen	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Bioinformatische Analyse von <i>Theileria annulata</i> Histondeacetylasen	55
5.1.1	Zink(II)-Ion-abhängige HDAC von <i>T. annulata</i>	55
5.1.2	NAD ⁺ -abhängige HDAC von <i>T. annulata</i> - <i>TaSIR2</i>	64
5.2	HDAC-Inhibitionsexperimente mit <i>T. annulata</i> -infizierten Zellen der Linie <i>TaA288</i>	66
5.2.1	Wirkung von Apicidin auf die Merozoitenmarkerexpression <i>T. annulata</i> -infizierter Zellen der Linie <i>TaA288</i>	66
5.2.2	Einfluss von Apicidin auf die Expression verschiedener Parasitengene <i>T. annulata</i> -infizierter Zellen der Linie <i>TaA288</i>	69
5.2.3	Immunfluoreszenzfärbung von differenzierenden <i>TaA288</i> -Schizonten	73
5.2.4	Einfluss des Apicidins auf die Expression des metastaserelevanten Wirtszellfaktors <i>MMP9</i> in <i>T. annulata</i> -infizierten und nicht infizierten Zellen	76
5.3	HDAC-Inhibitionsexperimente mit <i>T. annulata</i> -infizierten Zellen der Linien <i>Ta#868</i> und <i>Ta#173</i>	78
5.3.1	Charakterisierung der <i>MMP9</i> Expression in <i>T. annulata</i> -infizierten Leukozyten der Linie <i>Ta#868</i>	78
5.3.2	Charakterisierung der <i>in vitro</i> Differenzierungsfähigkeit von <i>T. annulata</i> in <i>Ta#868</i> -Zellen	79
5.3.3	Genexpressionsanalyse von <i>T. annulata</i> HDACs in infizierten Zellen unterschiedlicher Passagierung der Linien <i>Ta#868</i> und <i>Ta#173</i>	84
5.3.4	Wirkung von Apicidin auf <i>T. annulata</i> -infizierte Zellen der Linie <i>Ta#868</i> hinsichtlich der Merozoitenmarkerexpression	85
5.3.5	Wirkung von Apicidin auf <i>T. annulata</i> -infizierte Zellen der Linie <i>Ta#173</i> hinsichtlich der Merozoitenmarkerexpression	87
6	Diskussion	91
6.1	Bioinformatische Sequenzanalyse von der NAD ⁺ -abhängigen HDAC <i>TaSIR2</i> und deren Expression in unterschiedlich stark passagierten <i>T. annulata</i> -infizierten Leukozyten	91
6.2	Bioinformatische Sequenzanalyse von Zn ²⁺ -abhängigen HDACs von <i>T. annulata</i> und deren Expression in unterschiedlich stark passagierten <i>T. annulata</i> -infizierten Leukozyten	92
6.3	Hemmung von HDACs beeinflusst die Parasitendifferenzierung	95

6.4	Hemmung von HDACs beeinflusst die Expression des metastaserelevanten Wirtszellfaktors MMP9	99
6.5	Zusammenfassende Betrachtung und Modell	100
7	Ausblick	103
8	Literaturverzeichnis	105
9	Anhang	118
9.1	Ergänzung zum Ergebnisteil	118
9.1.1	Bioinformatische Analyse: Erste Ergänzung zu Abschnitt 5.1	118
9.1.2	Bioinformatische Analyse: Zweite Ergänzung zu Abschnitt 5.1	119
9.1.3	Bioinformatische Analyse: Dritte Ergänzung zu Abschnitt 5.1	119
9.1.4	Bioinformatische Analyse: Vierte Ergänzung zu Abschnitt 5.1	120
9.1.5	ICW: Ergänzung zu Abschnitt 5.2.1	122
9.1.6	qRT-PCR: Erste Ergänzung zu Abschnitt 5.2.2	123
9.1.7	qRT-PCR: Zweite Ergänzung zu Abschnitt 5.2.2	124
9.1.8	qRT-PCR: Ergänzung zu Abschnitt 5.2.4	125
9.1.9	qRT-PCR: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.1	125
9.1.10	qRT-PCR: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.3	126
9.1.11	ICW: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.4	126
9.1.12	ICW: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.5	127
9.2	Übersicht der Tabellen und Abbildungen	128
9.2.1	Tabellenverzeichnis	128
9.2.2	Abbildungsverzeichnis	129
9.2.3	Abkürzungsverzeichnis	131
10	Lebenslauf (nicht in digitaler Version enthalten)	136
11	Danksagung	138
	Eidesstattliche Erklärung	139

1 Zusammenfassung

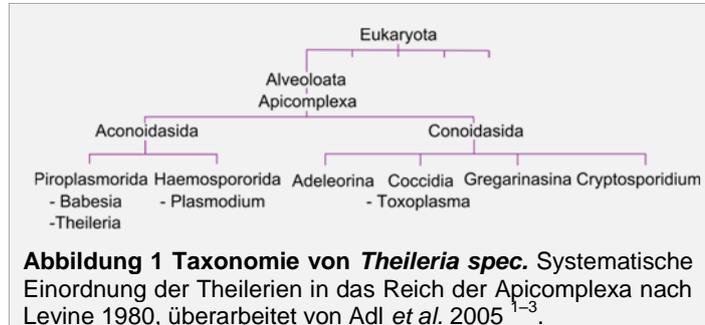
Theileria annulata, der Erreger der Tropischen Theileriose im Rind, durchläuft einen komplexen Lebenszyklus mit mehreren Differenzierungsformen. Die Infektion durch den Parasiten führt zur Transformation von Rinderleukozyten. Dieser Prozess ermöglicht die *In-vitro*-Kultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen. Bei längerer Kultivierung von *T. annulata*-befallenen Zellen kommt es zu einer Reduktion der Differenzierungsfähigkeit des intrazellulären Schizonten und einer Attenuierung des Parasiten. Dies ermöglicht den Einsatz *T. annulata*-infizierter Zellen zur Immunprophylaxe. Histondeacetylasen (HDACs) verwandter Erreger sind in der Lage virulenz- bzw. differenzierungsrelevante Gene zu reprimieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, ob diese Enzymklasse in die Attenuierung bzw. Abschwächung des Differenzierungspotenzials von *T. annulata* involviert ist.

Durch Sequenzvergleiche mit HDACs verwandter Erreger konnten in der vorliegenden Arbeit putative HDACs im Genom von *T. annulata* identifiziert und klassifiziert werden. Detaillierte bioinformatische Analysen legen nahe, dass es sich bei diesen Enzymen um funktionale HDACs handelt. Die eingehende Genexpressionsanalyse von HDACs in *T. annulata*-infizierten Zellen lieferte keine Hinweise, dass im Laufe einer Langzeitkultivierung HDACs verstärkt exprimiert werden. Allerdings scheint die Enzymaktivität Zink(II)-Ion-abhängiger HDACs für die Repression von *T. annulata*-Differenzierungsmarkern und eines metastaserelevanten Wirtszellfaktors von Bedeutung zu sein: In *In-vitro*-Inhibitionsstudien unter Verwendung des HDAC-Inhibitors Apicidin konnte in *T. annulata*-infizierten Zellen eine signifikant erhöhte Expression der Merozoitenmarker *TaMS1* und *TaMR1* nachgewiesen werden. Dies ging mit einer gesteigerten Merozoitenbildung in stark passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen einher. Auf Wirtszellebene führte die Verwendung von Apicidin zu einer signifikanten Induktion von *MMP9*, einer Matrix-Metalloproteinase für die eine zentrale Bedeutung in der Metastasierung *T. annulata*-infizierter Zellen beschrieben ist. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *T. annulata* HDACs bei der, durch Langzeitkultivierung-bedingten, Parasitenattenuierung bzw. Abschwächung der Differenzierungsfähigkeit des Schizonten *in vitro* beteiligt sind. Es ist gut vorstellbar, dass *T. annulata*-Gene, die für die Differenzierung und Virulenz des Parasiten essentiell sind, im Laufe der Langzeitkultivierung durch Histondeacetylierungsreaktionen, d.h. durch epigenetische Veränderungen, reprimiert werden. Da diese Reaktionen reversibel sind, ist aufgrund der vorliegenden Daten zu diskutieren, ob der Einsatz langzeitkultivierter *T. annulata*-infizierter Zellen als Lebendvaccine in allen Fällen als sicher angesehen werden kann.

2 Literaturübersicht

2.1 *Theileria annulata* und Tropische Theileriose

Theileria annulata wurde erstmals im Jahre 1904 von Dschunkowsky und Luhs beschrieben und ist in Südeuropa, Nordafrika und Asien weit verbreitet^{4,5}. Der einzellige, obligat intrazelluläre Parasit ist der Erreger der Tropischen Theileriose

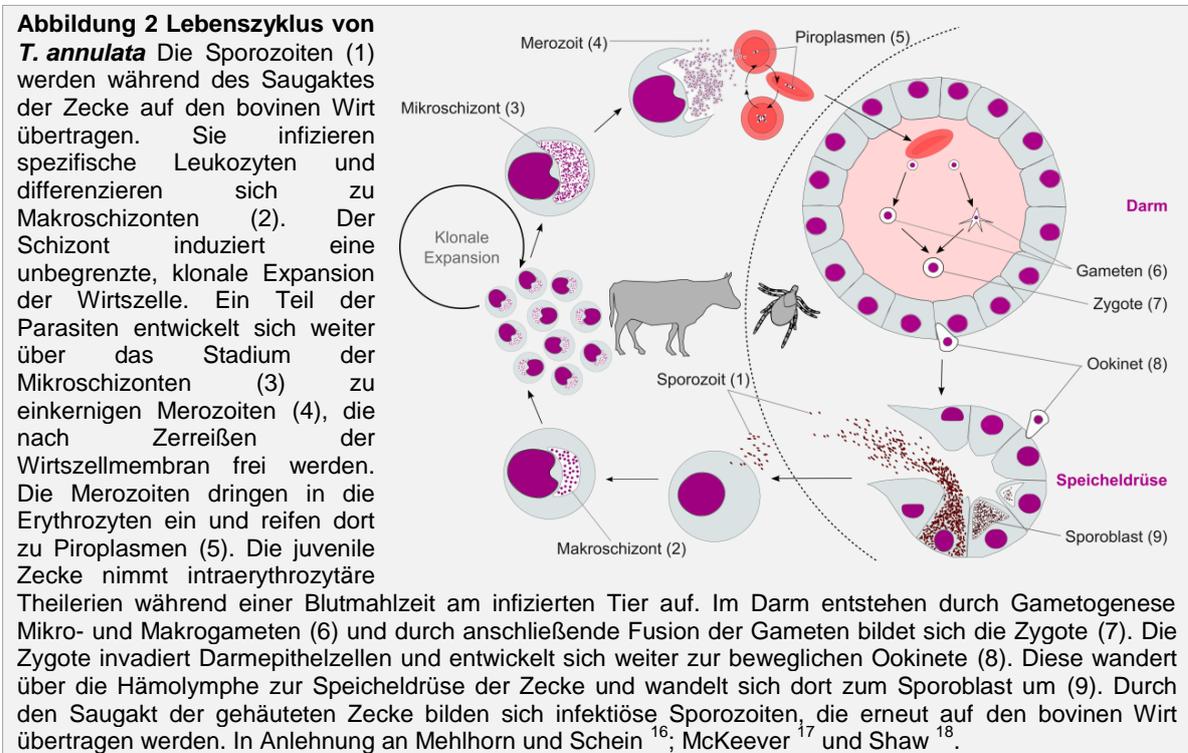


und wird transstadial durch Zecken auf wild lebende Büffel und bovine Nutztiere, wie Rinder und Yaks übertragen^{6,7}. Die Erkrankung ist bei wild lebenden Büffeln in milder Ausprägung zu finden. Dagegen kann *T. annulata* bei bovinen Nutztieren schwere systemische Schäden hervorrufen⁸. Besonders Hochleistungsrinder, wie beispielsweise die Holstein-Friesian Züchtung, die zur Steigerung der Produktivität eingeführt wurden, zeigen eine sehr hohe Anfälligkeit gegenüber der Tropischen Theileriose mit fatalen Folgen. Die Mortalitätsrate kann bei importierten Rindern bis zu 90 % betragen⁹. So bedroht die Tropische Theileriose etwa 250 Millionen Rinder und verursacht erhebliche ökonomische Verluste in tropischen und subtropischen Gebieten der Erde^{10,11}. Taxonomisch gehört der Erreger der Tropischen Theileriose zu den Theilerien. Diese werden wiederum zusammen mit den Babesien, Kryptosporidien, Plasmodien und Toxoplasmen in das Reich der Apicomplexa eingeordnet (Abbildung 1)¹⁻³.

2.2 Lebenszyklus von Theilerien

T. annulata und die verwandten Parasiten *Theileria parva*, Erreger des Ostküstenfiebers, und *Theileria lestoquardi*, Erreger der Malignen Theileriose der Schafe und Ziegen, gehören zu den leukoproliferativen Theilerien. Diese befallen nicht nur bestimmte Leukozyten des Wirts, sondern besitzen auch die einzigartige Fähigkeit diese zu leukoplastoiden Zellen zu transformieren (Abschnitt 2.6)^{12,13}. Der Lebenszyklus dieser Theilerien ist im Wesentlichen identisch. Alle leukoproliferativen Theilerien besitzen einen obligat heteroxenen Lebenszyklus mit mehreren Differenzierungsstadien sowohl im Wiederkäuer als auch in der Zecke. Differenzierung erlaubt die Übertragung des Parasiten zwischen den Wirtsorganismen und dient der Ausbreitung innerhalb des Wirts. Die *Theileria* Parasiten replizieren mittels Sporogonie in der Zecke und durch Schizogonie

und Merogonie in den Leukozyten. In *T. annulata* tritt auch Proliferation innerhalb der bovinen Erythrozyten auf¹⁴. Die sexuelle Fortpflanzung des Parasiten erfolgt im Darm der Zecke¹⁵. Der Lebenszyklus von *T. annulata* ist in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 detailliert beschrieben und in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



2.2.1 Lebenszyklus von *Theileria annulata* im Rind

Beim Saugakt der Zecke gelangen die aus den Speicheldrüsen stammenden, infektiösen Sporozoiten in das Kapillarsystem des Rindes. Danach dringen sie in bestimmte Leukozyten ein. Bei *T. annulata* werden MHC II (*major histocompatibility complex II*)-tragende Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten invadiert^{19,20}. Die Membranen des Leukozyten und des unbeweglichen Sporozoiten gehen eine irreversible Bindung ein. Bei der Anheftung spielt die Ausrichtung des Sporozoiten keine Rolle. Der Sporozoit wird durch einen sogenannten *zipper*-Mechanismus internalisiert. Die Wirtszelle umfließt den Sporozoiten, wobei sein sogenannter *surface coat* verloren geht^{18,21,22}. Nach Eindringen in die Wirtszelle ist der Sporozoit zunächst vollständig von der Wirtszellmembran umgeben²³. Nach der Entladung der Mikrosphären und Rhoptrien wird die Membran, die den Parasiten umgibt, zerstört und der Parasit liegt frei im Zytoplasma. Gleich nach dem Austritt des Parasiten bindet dieser an Wirtszellmikrotubuli^{16,18,24}. Anschließend bildet er sich zum Trophozoiten um, der sich darauf zu einem mehrkernigen Synzytium entwickelt. Der daraus resultierende Schizont hält die Assoziation mit dem Mikrotubulinetzwerk aufrecht und befindet sich normalerweise in der Nähe des Wirtszellkerns. Der reife

Schizont, der Makroschizont genannt wird, induziert die Teilung des Leukozyten. Dabei synchronisiert der Parasit, durch eine enge Assoziation an den mitotischen Spindelapparat des Wirts, seine eigene Teilung mit der der Wirtszelle^{13,18}. Diese Interaktion erlaubt die erfolgreiche Verteilung des wachsenden Makroschizonten auf jede Tochterzelle. Durch die anschließende klonale Vermehrung der befallenen Zellen entsteht rasch eine große Population von mit Theilerien infizierten Leukozyten. Anfänglich vermehrt sich der Parasit in den Lymphknoten nahe dem Zeckenbiss. Dann treten leukoblastoide Zellen im Blutstrom auf und es kommt zur systemischen Invasion durch Metastasierung²⁵. Überdies differenziert sich ein Teil der Makroschizonten, womöglich verursacht durch die Fieberreaktion des Tieres, zu Merozoiten¹⁶. Dieser Differenzierungsprozess heißt Merogonie und schließt zunächst eine Verlangsamung der Proliferation ein. Unterdessen finden verschiedene morphologische Veränderungen des Parasiten statt. Die Kerne teilen sich und werden kompakter, wohingegen der Parasit selbst sich vergrößert (Mikroschizontenstadium)²⁶. Die Rhoptrien werden gebildet und assoziieren mit den Merozoitenkernen. Der reife Merozoit entsteht schließlich durch Abknospung des Kern-Rhoptrien-Komplexes von der Plasmamembran des verbliebenen Synzytiums²⁷. Die Merozoiten kumulieren innerhalb der Wirtszelle, bis die Plasmamembran zerstört wird und somit die reifen Merozoiten in den Blutkreislauf entlassen werden²⁶. Dort invadieren die Merozoiten die Erythrozyten und bilden sich zu Piroplasmen um¹⁶. In *T. annulata* können sich die Piroplasmen innerhalb der Erythrozyten teilen und wieder zu Merozoiten entwickeln^{14,28}. Bei der Blutmahlzeit wird die Zecke durch die befallenen Erythrozyten infiziert. Sobald der Erythrozyt von der Zecke aufgenommen wird, durchlaufen die Piroplasmen die Gametogonie und der Lebenszyklus wird fortgesetzt^{29,30}.

2.2.2 Lebenszyklus von *Theileria annulata* im Vektor

Der Hauptvektor von *T. annulata* ist *Hyalomma anatolicum*³¹. Ein bis zwei Tage nach dem Saugakt entwickeln sich im Zeckendarm die Piroplasmen weiter zu runden Makro- und Mikrogamonten. Die unreifen Mikrogamonten zerfallen nach Kernteilung in fadenförmige Mikrogameten und anschließend fusionieren die Mikro- und Makrogameten zur diploiden Zygote^{29,30}. Nach vollzogener Syngamie dringt die Zygote in die Darmepithelzelle ein und reift dort zur beweglichen Ookinete. Die Kinete migriert, während oder nach der Zeckenhäutung, über die Hämolymphe zu den Speicheldrüsen^{29,32} und dort in eine Zelle der Drüsenendstücke. Nachfolgend bildet sich der Parasit zum Sporoblasten um³³, der wächst und in der Zelle verbleibt, bis die Zecke wieder einen Wirt findet. Der erneute Saugakt der Nymphe bzw. der adulten Zecke induziert die Sporogonie³⁴. Kurz nach Beginn des Saugprozesses erscheinen Sporozoiten in den

Speicheldrüsen der adulten Zecke³⁵. Nach Degeneration der Wirtszellen können aus einer infizierten Azinusdrüse bis zu 50.000 haploide Sporozoiten freigesetzt werden^{31,36,37}.

2.3 Pathogenese

Die Ausprägung der Tropischen Theileriose ist von der Anzahl der aufgenommenen Sporozoiten, der Virulenz des jeweiligen Parasitenstammes und der Suszeptibilität des bovinen Wirts abhängig^{38,39}. Eine Infektion eines suszeptiblen Kalbes mit einem virulenten *Theileria*-Stamm äußert sich in einem klinischen Krankheitsverlauf^{40–42}. Anfänglich schwellen die Lymphknoten nahe dem Zeckenbiss an. Anschließend kommt es zu einer systemischen Lymphadenopathie aufgrund der unbegrenzten Proliferation der infizierten Leukozyten und nachfolgender unspezifischer Immunzellstimulation^{43,44}. Das Tier leidet zudem unter Anorexie und Lethargie. Im weiteren Verlauf der Tropischen Theileriose kommt es zu einer Kachexie – einer starken Abmagerung des Tieres. Weitere Symptome sind Tränen-, Nasenfluss und Diarrhö^{40–42} sowie eine verminderte Milchleistung und Fehlgeburten bei Kühen^{45,46}. Nach ungefähr zwei Wochen setzt ein lang anhaltendes, hohes Fieber ein. Ein Teil der Schizonten differenziert zu Merozoiten. Die Zahl infizierter Erythrozyten nimmt rapide zu und trägt zur hämolytischen Anämie bei. Zudem invadieren die mit Schizonten-infizierten Zellen verschiedene Organe, wie Niere, Herz und Leber und führen dort zu Läsionen und Organvergrößerungen. Nach ungefähr vier Wochen tritt der Tod des Tieres ein, oft aufgrund der Infiltration der Lunge und der Entwicklung eines hochgradigen Lungenödems^{25,47}. Blutuntersuchungen, Lymphknotenbiopsien und Bestimmung der Körpertemperatur des Wirts dienen der Infektionseinschätzung. Folgende Merkmale sind in der Regel charakteristisch für eine starke und letale *T. annulata* Infektion^{48,49}.

- lang anhaltendes Fieber (Rektaltemperatur über 39,5°C für mindestens 5 Tage),
- hoher Anteil an Piroplasmen (über 50 % der Erythrozyten sind infiziert),
- verringerter Hämatokrit (Erythrozytenanteil fällt unter 20 %),
- hoher Anteil an mit Schizonten-infizierten Leukozyten (über 10 % in Präparaten nach Lymphknotenbiopsie),
- Tod des Tieres nach 3–4 Wochen.

Im Gegensatz dazu weist eine nicht letale, schwache Infektion meist nur eine kurze Fieberreaktion, einen Anteil an mit Piroplasmen befallenen Erythrozyten von weniger als 10 %, einen Hämatokritwert von über 25 % sowie in der Lymphknotenbiopsie unter 10 % mit Schizonten-infizierte Leukozyten auf⁴⁸. Die Tiere, die eine *T. annulata* Infektion

überleben, sind zwar immun, aber weniger produktiv, denn in diesen sogenannten Kümmerern bleibt eine kleine Population der Parasiten bestehen^{50,51}.

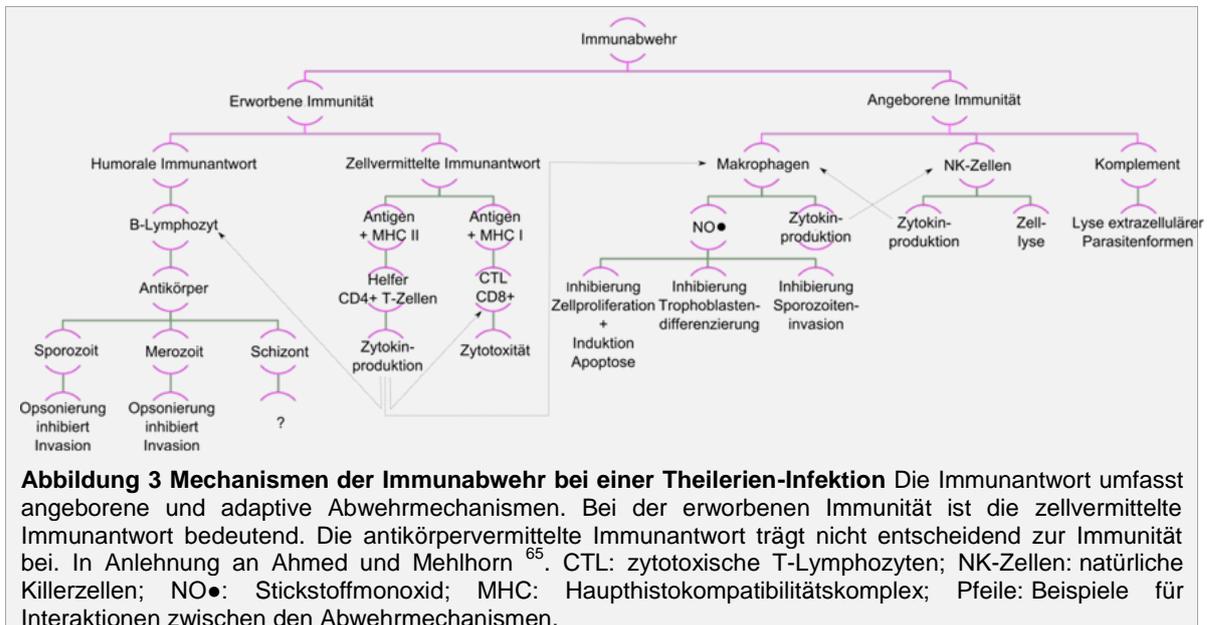
2.4 Immunantwort

Rinder, die eine Infektion mit *T. annulata* überlebt haben, erlangen eine lang anhaltende Immunität gegenüber einem homologen Stamm und zum Teil gegenüber heterologen Parasitenstämmen⁵²⁻⁵⁶. Dabei beruht die gewonnene Immunität auf dem gegenseitigen Wechselspiel der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Abbildung 3).

Bei der angeborenen Immunantwort auf eine Erstinfektion mit Tropischer Theileriose sind wahrscheinlich Komplementproteine beteiligt, die extrazelluläre Parasitenformen lysieren können⁵⁷. Zudem synthetisieren nicht infizierte, durch Zytokine aktivierte Makrophagen das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO●). Dieses Gas ist toxisch für die infizierte Wirtszelle und hemmt die Entstehung von *Theileria*-infizierten Zellen^{58,59}. Außerdem sekretieren aktivierte Makrophagen den *tumor necrosis factor α* (TNF-α). Dieses Zytokin ist in der Lage die Parasitendifferenzierung zu inhibieren³⁸. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass natürliche Killer (NK)-Zellen *T. annulata*-infizierte Zellen lysieren^{60,61}.

Die erworbene Immunantwort gegen *T. annulata* ist zell- und antikörpervermittelt. Im bovinen Wirt konnten nach Erstinfektion Antikörper gegen alle Parasitenstadien nachgewiesen werden^{52,57}. Die Seren immunisierter Tiere haben einen neutralisierenden Effekt auf Sporozoit und Merozoiten^{57,62,63}. Jedoch schützt das Immuserum eines mit Theilerien-infizierten Spenderrindes das Empfängerrind nicht vor einer Infektion⁶⁴. Es besteht also nicht die Möglichkeit einer passiven Immunisierung. Darüber hinaus gibt es bisher keine Hinweise, dass die gebildeten Antikörper die Schizonten-infizierten Leukozyten beeinflussen^{57,65}. Weitaus bedeutender für den Erwerb und Erhalt der Immunität ist die zellvermittelte Immunantwort. T-Zellen erkennen Parasitenantigene, die von den *T. annulata*-infizierten Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex MHC I und II präsentiert werden. *In vitro* wurde gezeigt, dass sowohl CD4+ Leukozyten, als auch CD8+ Immunzellen auf die infizierten Zellen reagieren⁶⁶. Die CD4+ T-Zellen werden über die MHC II-präsentierten Parasitenpeptide aktiviert und differenzieren zu Helfer-T-Zellen. Diese proliferieren und produzieren Zytokine, wie das Interleukin-2 (Interleukin-2; IL-2)⁶⁷. Das IL-2 wiederum veranlasst die durch MHC I aktivierten CD8+ zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) zur klonalen Expansion. Die CTL-abhängige Zerstörung der parasiteninfizierten Zellen trägt entscheidend zur Kontrolle der Infektion bei^{53,61,68}. Kann eine Infektion durch das Immunsystem nicht eingedämmt werden, so trägt die extreme

Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine infizierter und nicht infizierter Zellen erheblich zur Schädigung des Tieres bei ^{39,53,61,68}.



2.5 Bekämpfung der Tropischen Theileriose

Die Bekämpfung der Tropischen Theileriose erfolgt derzeit durch Zeckenbekämpfung, durch frühzeitige medikamentöse Behandlung der erkrankten Tiere und Verabreichung von Schutzimpfungen.

2.5.1 Vektorkontrolle

Eine Präventionsmaßnahme gegen die Tropische Theileriose ist die Bekämpfung der Zecken mittels Akariziden, die gegen Zecken und Milben wirken. Auf diese Weise soll die Übertragung der Theilerien von der *Hyalomma*-Zecke auf den bovinen Wirt verhindert werden ⁶⁹. In den endemischen Gebieten werden Akarizide (Organophosphate, Pyrethroide) als Spray, Tauchbad oder Aufgusslösung appliziert. Der Gebrauch birgt jedoch eine Reihe von Risiken. Es kann zur Toxinakkumulation in der Umwelt und im Tier kommen, was unter anderem ein Risiko von Restkontaminationen in Fleisch und Milch darstellt ^{70,71}. Außerdem gibt es Berichte über eine zunehmende Resistenz der Vektoren gegenüber Akariziden ^{72,73}. Demzufolge ist der Einsatz von Pestiziden keine nachhaltige Maßnahme zur Beschränkung der Tropischen Theileriose.

2.5.2 Chemotherapie

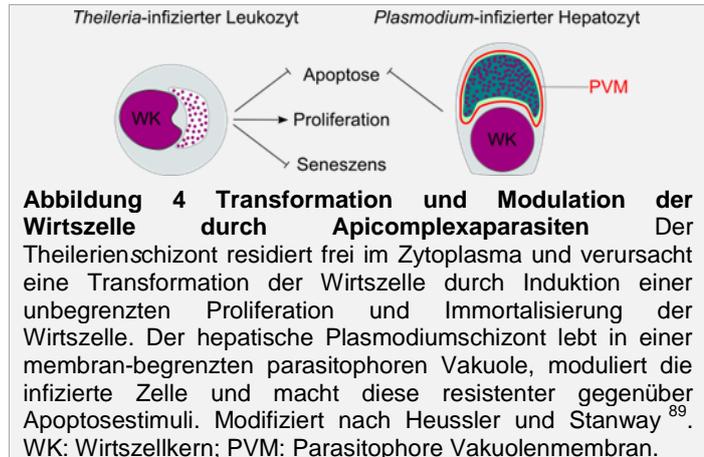
Zur therapeutischen Behandlung der Tropischen Theileriose werden effektive Wirkstoffe wie Halofuginon⁷⁴, Parvaquon⁷⁵ und Buparvaquon⁷⁶ verwendet. Gegenwärtig ist Buparvaquon weit verbreitet und wird erfolgreich eingesetzt, um Infektionen im Frühstadium zu behandeln. Jedoch sind die Behandlungen kostenintensiv und bergen das Risiko einer Resistenzentwicklung. Im Jahr 2010 wurde zum ersten Mal das Auftreten einer Resistenz in *T. annulata* gegenüber Buparvaquon in Tunesien beschrieben⁷⁷. Im Iran gab es weitere Fälle, bei denen die Behandlung mit Buparvaquon fehlschlug und die Tiere verendeten⁷⁸.

2.5.3 Immunisierung

Angesichts des Auftretens von Resistenzen gegenüber vorhandenen Medikamenten beim Rind und gegenüber Pestiziden beim Vektor werden alternative Mittel zur Einschränkung der Tropischen Theileriose benötigt. Die Applikation von Impfstoffen gegen *T. annulata* stellt eine alternative Maßnahme dar. In einigen Ländern Nordafrikas⁷⁹, Südasiens⁸⁰ und des Nahen Ostens⁸¹ werden bereits *T. annulata* Lebendvakzine eingesetzt. Dabei fungieren als Impfstoff attenuierte *T. annulata*-infizierte Leukozyten. Die Attenuierung von *T. annulata* wird durch die Langzeitkultivierung der infizierten Zellen verursacht^{82,83}. Diese wiederum ist nur durch die Theilerien-induzierte Transformation möglich, die es erlaubt *T. annulata*-infizierte Leukozyten unbegrenzt *in vitro* ohne exogene Wachstumsfaktoren zu kultivieren⁸⁴. Diese Schizonten-infizierten Zellen müssen zuvor aus einem erkrankten Tier isoliert oder durch die *In-vitro*-Infektion peripherer Blutlymphozyten (*peripheral blood lymphocytes*; PBL) generiert werden. Zudem sind die Theileria-infizierten Leukozyten nach jeder Subkultivierung von 20 bis 30 Passagen in naive Kälber zu injizieren, um anhand des klinischen Verlaufs den Grad der Attenuierung bestimmen zu können⁸⁵. Zwar ist die Herstellung der Lebendvakzine sehr aufwendig, dafür haben die Impfstoffe eine hohe Wirksamkeit und die gewonnene Immunität kann mehrere Jahre anhalten^{9,86}. Erholt sich ein Tier von einer Sporozoiteninfektion, resultiert dies in der Entwicklung eines lang anhaltenden Trägerstatus (*carrier*) des bovinen Wirts. Obwohl das Tier keine klinischen Symptome zeigt, kann eine kleine Population an Schizonten-infizierten Leukozyten und intraerythrozytären Piroplasmen im Tier bestehen bleiben⁵¹. Jedoch gibt es bisher nur wenige Untersuchungen über den *carrier*-Status nach Immunisierung des Tiers mit attenuierten Zelllinien. Daher wird kontrovers diskutiert, ob mit attenuierten *T. annulata* Erregern vakzinierte Tiere intraerythrozytäre Piroplasmen weiter auf die *Hyalomma*-Zecke übertragen und diese wiederum die *Theileria*-Infektion auf ein anderes Rind transferieren kann^{55,85,87,88}.

2.6 Theilerien induzieren die Wirtszelltransformation

Proliferation, Differenzierung und Überleben einer eukaryotischen Zelle werden durch Signaltransduktionsvorgänge und deren komplexe Vernetzung reguliert. Mutationen sind Schädigungen des Erbguts, die eine veränderte Expression oder Aktivität der Komponenten dieser Signalwege hervorrufen können.



Diese Veränderungen der Zelle können wiederum zur unkontrollierten Zellproliferation führen. Dieser Prozess der Krebszellentstehung wird als Transformation bezeichnet⁹⁰. Apicomplexaparasiten können zelluläre Prozesse der Wirtszelle modulieren. Zur Transformation der Wirtszelle sind jedoch einzig leukoproliferative Theilerien fähig. Die Theilerien-infizierten Leukozyten erhalten Eigenschaften, die ebenfalls für Tumorzellen charakteristisch sind (Abbildung 4). Die transformierten Leukozyten proliferieren unbegrenzt, werden immortalisiert und besitzen die Fähigkeit zur Metastasierung⁹¹. In immundefizienten Mäusen kommt es nach Injektion mit Theilerien-infizierten, bovinen Zellen zu Wucherungen in verschiedenen Geweben und Organen. Demnach ist der Befall verschiedenster Organe des Rindes den „tumorartigen“ Eigenschaften der Schizonten-infizierten Zellen zuzuschreiben^{92,93}. Dennoch ist, im Gegensatz zu den irreversiblen transformationsrelevanten Mutationen der Tumorzellen, die parasiteninduzierte Transformation reversibel. Durch Behandlung der parasitentransformierten Zelle mit dem Medikament Buparvaquon arretiert die ehemals befallene Wirtszelle und vollzieht schließlich den kontrollierten Zelltod^{76,94-96}.

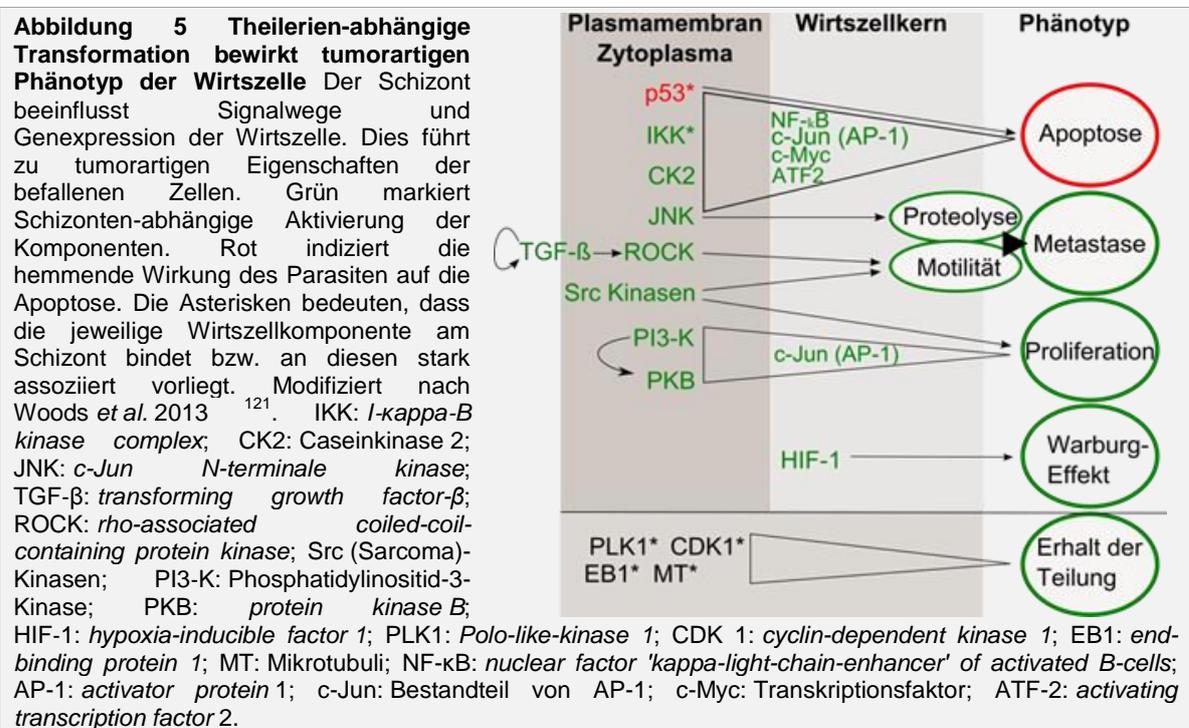
Es ist bekannt, dass der Parasit enge Kontrolle über verschiedenste Signal- und Stoffwechselwege gewinnt (Abbildung 5). So inhibieren leukoproliferative Theilerien apoptotische Vorgänge in der Wirtszelle durch die Sequestrierung von Wirtszellmolekülen. Zum Beispiel lagert der Schizont das Tumorsuppressorprotein p53 um sich herum an, sequestriert diesen im Zytoplasma und verhindert dadurch dessen Translokation in den Kern. Somit wird die Expression von pro-apoptotischen Proteinen verhindert und die Expression von anti-apoptotischen Proteinen begünstigt^{95,96}. Überdies ist die parasitenabhängige konstitutive Aktivierung von mehreren Wirtszellkinasen an der Inhibierung der Apoptose beteiligt^{97,98}.

Für die Proliferation von Theilerien-transformierten Leukozyten sind verschiedene Parasitenproteine und bestimmte Wirtszellproteine von Bedeutung. So ist die Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3-K) parasitenabhängig hochreguliert. Ihre Aktivität ist zusammen mit der Aktivität des nachgeschalteten Effektors PKB (*protein kinase B*; PKB alias AKT) bedeutend für die Zellproliferation^{99,100}. Für die Proliferation verschiedener *T. parva*-infizierter B-Lymphozyten ist auch die Aktivierung von Src (Sarcoma)-verwandten Kinasen wichtig, denn eine Inhibierung dieser Enzyme verursacht eine reduzierte Proliferation^{101,102}. Da die Theilerien-induzierte Transformation in einer permanenten Proliferation der befallenen Zelle resultiert, muss der Schizont in der Lage sein, seine Präsenz in einer sich ständig teilenden Zelle aufrechtzuerhalten. Der Parasit gewährleistet seine Verteilung auf die Tochterzellen über die Synchronisation seiner Kernteilungen mit der Wirtszellteilung und über eine enge Assoziation des wachsenden Synzytiums mit dem mitotischen Apparat der Wirtszelle^{84,103,104}. Vermittelt wird diese Assoziation durch das *T. annulata*-Oberflächenprotein TaSP (*T. annulata surface protein*; TaSP), das mit Mikrotubuli (MT) interagiert^{105,106} und durch das Oberflächenprotein p104, das das MT-assoziierte Protein EB1 (*end-binding protein 1*; EB1) rekrutiert und bindet¹⁰⁷. Des Weiteren könnten auch sezernierte Parasitenproteine, wie das TaSE (*T. annulata Sekretorisches Protein*; TaSE) bei der Regulation der MT-Dynamik beteiligt sein^{108,109}. Generell spielt bei der Regulation des Zellzyklus eine Vielzahl von Kinasen eine Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass der Schizont mit zwei dieser Kinasen interagiert und zwar mit der PLK 1 (*Polo-like-kinase 1*; PLK1)¹¹⁰ und der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (*cyclin-dependent kinase 1*; CDK1)¹¹¹.

Für die Regulation der Zelladhäsion und Migration *T. annulata*-befallener Makrophagen spielen Kinasen der Src-Familie eine Rolle. Deren Aktivitäten sind notwendig für die Bildung von Invadopodien ähnlichen Aktinstrukturen und für die Verlängerung des Lamellipodiums an der Lauffront der infizierten Makrophage¹¹². Zudem ist die Invasivität *Theileria*-transformierter Leukozyten vom Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor- β* ; TGF- β) abhängig. TGF- β aktiviert die GTPase (*small guanosine triphosphate hydrolase*; GTPase)-abhängige Kinase ROCK (*ρ -associated coiled-coil-containing protein kinase*; ROCK) und trägt somit entscheidend zur Beweglichkeit der infizierten Zelle bei¹¹³. Neben Zellmotilität ist der Abbau von extrazellulärer Matrix für die Metastasierung von *T. annulata*-infizierten Zellen erforderlich⁴⁹. Die Fähigkeit der *T. annulata*-infizierten Leukozyten zur Metastasierung ist mit der parasitenabhängigen Induktion von Matrix-Metalloproteasen (*matrix metalloproteinase(s)*; MMP(s)) assoziiert. Im Falle der Matrix-Metalloproteinase 9 wird die Induktion durch die Aktivität des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 (*activator protein 1*; AP-1) gewährleistet^{114,115}. Demnach könnte die konstitutiv aktivierte JNK (c-Jun N-terminale Kinase; JNK) durch

Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun, ein Bestandteil des AP-1, in den Prozess der Metastasierung involviert sein ¹¹⁶.

Umfangreiche Arbeiten hinsichtlich des Überlebens, der Proliferation und der Fähigkeit zur Metastasierung konnten zeigen, dass *Theileria* Parasiten „tumorartige“ Eigenschaften der Wirtszelle induzieren. Darüber hinaus wurde kürzlich ein für Krebszellen typisches Stoffwechselphänomen in *T. annulata*-transformierten Zellen nachgewiesen ^{117,118}. Trotz der Anwesenheit ausreichender Mengen extrazellulären Sauerstoffs betreiben fast alle Krebszellen anaerobe Glykolyse. Diese Stoffwechselveränderung wird auch als Warburg-Effekt bezeichnet ¹¹⁹. In *T. annulata*-infizierten Zellen sowie in den meisten Krebszellen beruht der Wechsel der aeroben zur anaeroben Glykolyse auf einer veränderten Genexpression entsprechender Stoffwechsellzyme. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*; HIF-1) ist in diesen Zellen konstitutiv aktiviert und ausschlaggebend für die veränderte Genexpression ^{117,118}. In nicht entarteten Zellen aktiviert HIF-1 Signalwege, die für die Anpassung an Hypoxie relevant sind. Im Fall der Krebszelle macht HIF-1 den Metabolismus von der Anwesenheit von Sauerstoff weitestgehend unabhängig. HIF-1 fördert ebenfalls die Angiogenese und steigert indirekt die Expression einiger MMPs ^{119,120}. Folglich ist die HIF-1 Aktivität an der Ausprägung des invasiven Potenzials von Tumorzellen und womöglich *T. annulata*-infizierten Zellen beteiligt.



2.7 Attenuierung und Reduktion des Differenzierungspotenzials von *T. annulata*

Unter Attenuierung versteht man die gezielte Abschwächung der krank machenden Eigenschaften eines Erregers, wobei dessen Viabilität und Immunogenität erhalten bleibt¹²². Die Virulenz von *T. annulata* Makroschizonten wird im Laufe einer langen Subkultivierung der infizierten Zellen abgeschwächt, sodass die infizierten Zellen als Lebendvakzine genutzt werden können (Abschnitt 2.5.3). Die experimentelle Injektion von niedrig passagierten, virulenten *T. annulata*-infizierten Leukozyten in einem suszeptiblen Kalb kann in einer starken und letalen Infektion resultieren, die durch eine lang anhaltende Pyrexie, einen hohen Anteil an Schizonten-infizierten Leukozyten in den Lymphknoten sowie durch eine starke Parasitämie gekennzeichnet ist (Abschnitt 2.3). Im Gegensatz dazu verursachen hoch passagierte, abgeschwächte *T. annulata*-infizierte Leukozyten nur eine kurze, milde Fieberreaktion und eine geringe bzw. nicht detektierbare Anzahl an Schizonten-infizierten Zellen und Piroplasmen-befallenen Erythrozyten⁸⁶. Jedoch ist der Mechanismus der Attenuierung und der Abschwächung der Differenzierung weitestgehend ungeklärt. Wahrscheinlich kommt es im Laufe der Subkultivierung zur Selektion bestimmter avirulenter und in der Differenzierungsfähigkeit beeinträchtigter Parasiten-Subpopulationen bzw. zu einer veränderten Genexpression^{123,124}.

2.7.1 Attenuierung von Virulenzfaktoren

Die Virulenz wird definiert als die Fähigkeit eines Erregers sich zu verbreiten, den Abwehrmechanismen des Wirts zu entgehen und den Wirtsorganismus zu schädigen. Dabei werden Eigenschaften, die zur Pathogenität beitragen, als Virulenzfaktoren bezeichnet¹²⁵. Dementsprechend müsste der Prozess der Attenuierung mit einem Verlust bzw. einer Reduktion dieser Faktoren einhergehen.

2.7.1.1 Zytokine

Nach Forsyth *et al.* 1999 sind zytokinproduzierende *T. annulata*-infizierte Leukozyten verantwortlich für die makroskopischen Läsionen in der späten Phase der Theileriose²⁵. Ob in den befallenen Zelle die Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 im Laufe der Attenuierung der Parasitenvirulenz beeinflusst ist, wird allerdings kontrovers diskutiert¹²⁶⁻¹²⁹. Jedoch stellt das Zytokin TGF- β einen potenziellen Attenuierungsmarker dar, denn die parasiten-abhängige Induktion von TGF- β in den Makrophagen aus suszeptiblen Wirten (Holstein-Friesian) ist größer als in Zellen, die aus resistenten Rindern (Sahiwal) isoliert wurden. Darüber hinaus ist die Invasivität der infizierten Holstein-Makrophage von der TGF- β Rezeptoraktivität abhängig. Es ergibt sich die Frage,

ob das abgeschwächte Invasionspotenzial der hoch passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen auf einer reduzierten TGF- β Signalwirkung beruht. Tatsächlich weisen hoch passagierte *T. annulata*-infizierte Vakzinzellen eine geringere TGF- β -Transkription und ein anderes TGF- β Zielgenexpressionsmuster auf als niedrig passagierte Pendanten¹¹³.

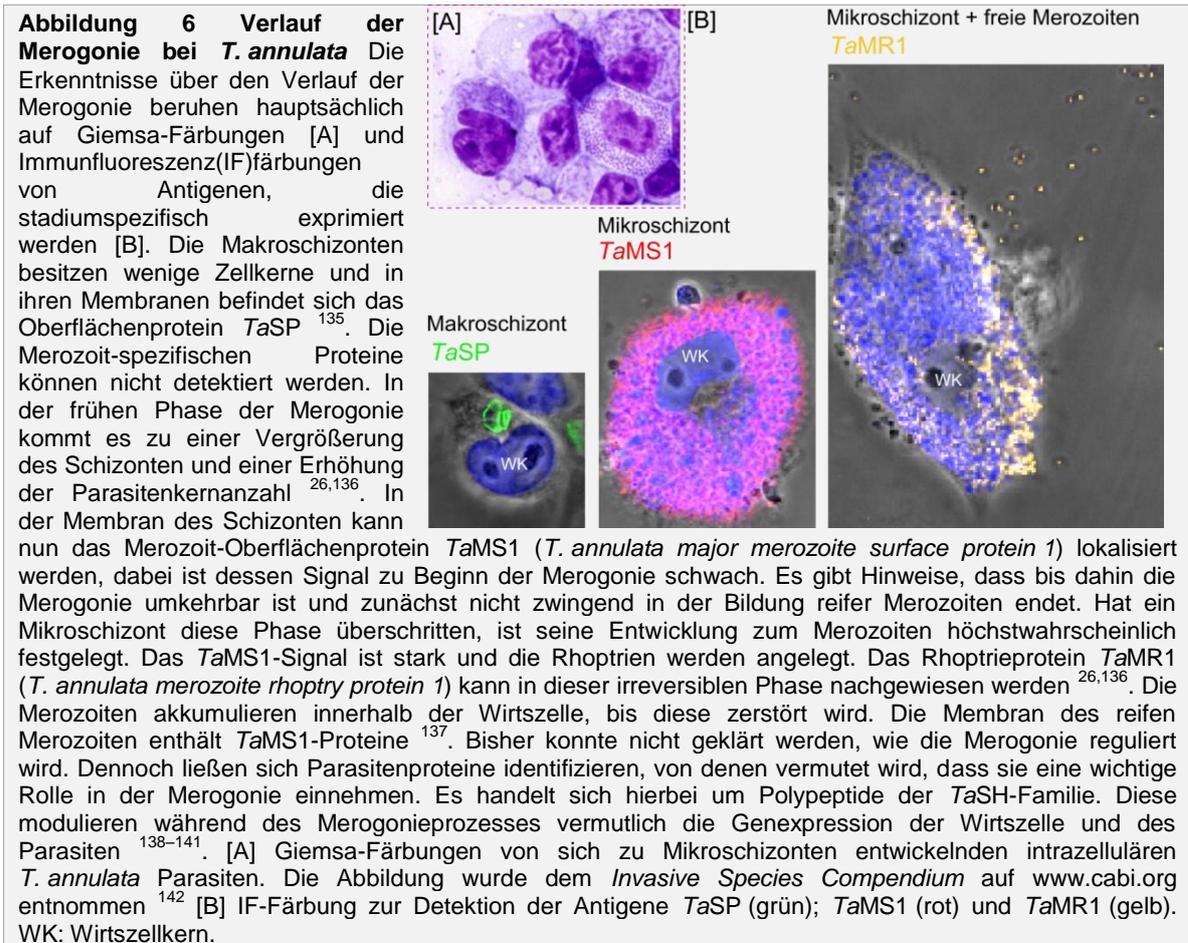
2.7.1.2 Matrix-Metalloproteasen

Maligne Tumore verbreiten sich im ganzen Körper durch Metastasierung. Daran beteiligt sind Matrix-Metalloproteasen, die Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren¹³⁰. In *T. annulata*-infizierten Leukozyten werden MMPs exprimiert, deren Aktivität für die Metastasierung wichtig ist⁴⁹. Es stellt sich die Frage, ob eine längere Zellkultivierung die MMP-Aktivität negativ beeinflusst. Tatsächlich haben Experimente gezeigt, dass die untersuchten hoch passagierten Vakzinzellen einen stark reduzierten proteolytischen Phänotyp aufweisen^{49,115,123,131,132}. Allgemein wird davon ausgegangen, dass Theilerien während der Immunisierung von den Vakzinzellen auf die Leukozyten des Empfängertieres übertragen werden, dieser Vorgang wird auch Schizontentransfer genannt⁵³. Demnach wären Faktoren des Parasiten verantwortlich für den abgeschwächten proteolytischen Phänotyp der befallenen Zelle¹³¹. Dabei beruht der Verlust dieser proteolytischen Eigenschaften nicht zwingend auf der Selektion einer Parasitenpopulation. Bei den meisten *T. annulata*-infizierten Zelllinien trägt MMP9 entscheidend zum Matrixabbau bei¹²³. Zur weiteren Analyse der MMP9-Aktivität in Bezug auf den Attenuierungsprozess wurde eine Vakzinzelllinie verwendet, die keine Anzeichen für eine genetische Selektion zeigte. In diesen hoch passagierten Zellen konnte sowohl eine stark reduzierte MMP9-Aktivität, als auch eine stark reduzierte Präsenz des MMP9-Proteins und der mRNA (*messenger ribonucleic acid*; RNA) nachgewiesen werden. Demnach resultiert die Reduktion der MMP9-Aktivität auf einer stark reduzierten Transkription^{49,114,123}. Für die MMP9-Promotoraktivität in Theilerien-infizierten Zellen ist eine funktionsfähige AP-1-Erkennungsstelle und somit AP-1-Bindung essenziell. In virulenten *T. annulata*-infizierten Zellen bindet viel mehr AP-1 an den MMP9-Promotoren als an den MMP9-Promotoren der attenuierten, infizierten Zellen. Die Faktoren des Parasiten, die für eine starke AP-1-abhängige MMP9-Transkription verantwortlich sind, sind jedoch nicht bekannt¹¹⁴. Shkap *et al.* 2003 zeigten, dass die MMP-Aktivität der *T. annulata*-infizierten Zellen *in vitro* mit den pathologischen Veränderungen, die die Zellen im Kalb nach Inokulation verursachen, weitgehend korreliert. Dabei wies eine getestete hoch passagierte Zelllinie einen attenuierten Phänotyp im Kalb auf, aber immer noch eine proteolytische Aktivität *in vitro*. Die proteolytische *In-vitro*-Aktivität dieser attenuierten Zellen war im Vergleich zur MMP-Aktivität *T. annulata*-infizierter Zellen, die weitaus weniger häufig passagiert waren, ebenfalls reduziert¹³³. Die Attenuierung der

Virulenz nach Langzeitkultivierung lässt sich somit in mancher Hinsicht durch eine verminderte MMP-Aktivität erklären.

2.7.2 Reduktion des Differenzierungspotenzials von *T. annulata*

Somerville *et al.* 1998 beobachteten, dass die Subkultivierung *T. annulata*-infizierter Leukozyten nicht nur mit der Attenuierung der Virulenz, sondern auch mit einer Reduktion der Differenzierungsfähigkeit des Makroschizonten einhergeht. Der Differenzierungsprozess, der vom intrazellulären Schizonten ausgeht, heißt Merogonie (Abbildung 6). Die Autoren induzierten Merogonie *in vitro* durch eine mehrtägige Inkubation der niedrig- und hoch passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen bei 41 °C. Durch diese erhöhte Inkubationstemperatur wurde die Fieberreaktion eines infizierten Tiers simuliert. Anschließend wurden Giemsa-Färbungen durchgeführt und die Anzahl der sich zu Mikroschizonten differenzierenden Makroschizonten bestimmt. Als Indiz für die beginnende Differenzierung diente eine hohe Kernanzahl (> 30) pro Schizont. Die niedrig passagierten, nicht attenuierten *T. annulata*-infizierten Zellen wiesen 20-mal so viele Mikroschizonten auf als die hoch passagierten, attenuierten Zellen¹³⁴. Eine Reduktion der Differenzierungsfähigkeit der Schizonten konnte anhand diverser Vakzinzelllinien bestätigt werden. Somit ist die reduzierte Fähigkeit der Makroschizonten sich nach Langzeitkultivierung zu Merozoiten zu entwickeln höchstwahrscheinlich eine Ursache dafür, dass nach Inokulation von attenuierten *T. annulata*-infizierten Leukozyten keine oder kaum Piroplasmen in den Erythrozyten der Tiere zu finden sind^{115,123,134}. Das reduzierte Vermögen der attenuierten Parasiten im Tier eine hohe Anzahl an Erythrozyten zu befallen, trägt zum Teil zur Attenuierung der Virulenz bei, denn eine hohe Piroplasmenanzahl ist eine Ursache für die Anämie des Tieres. Zwar sind hauptsächlich die Schizonten-infizierten Zellen und nicht die Piroplasmen in den Erythrozyten verantwortlich für die Pathogenität von *T. annulata*⁸³. Dennoch bleiben Fragen hinsichtlich der Differenzierungsfähigkeit von attenuierten *T. annulata*-Parasiten aktuell, da die Piroplasmen die infektiösen Formen für die Zecke darstellen.



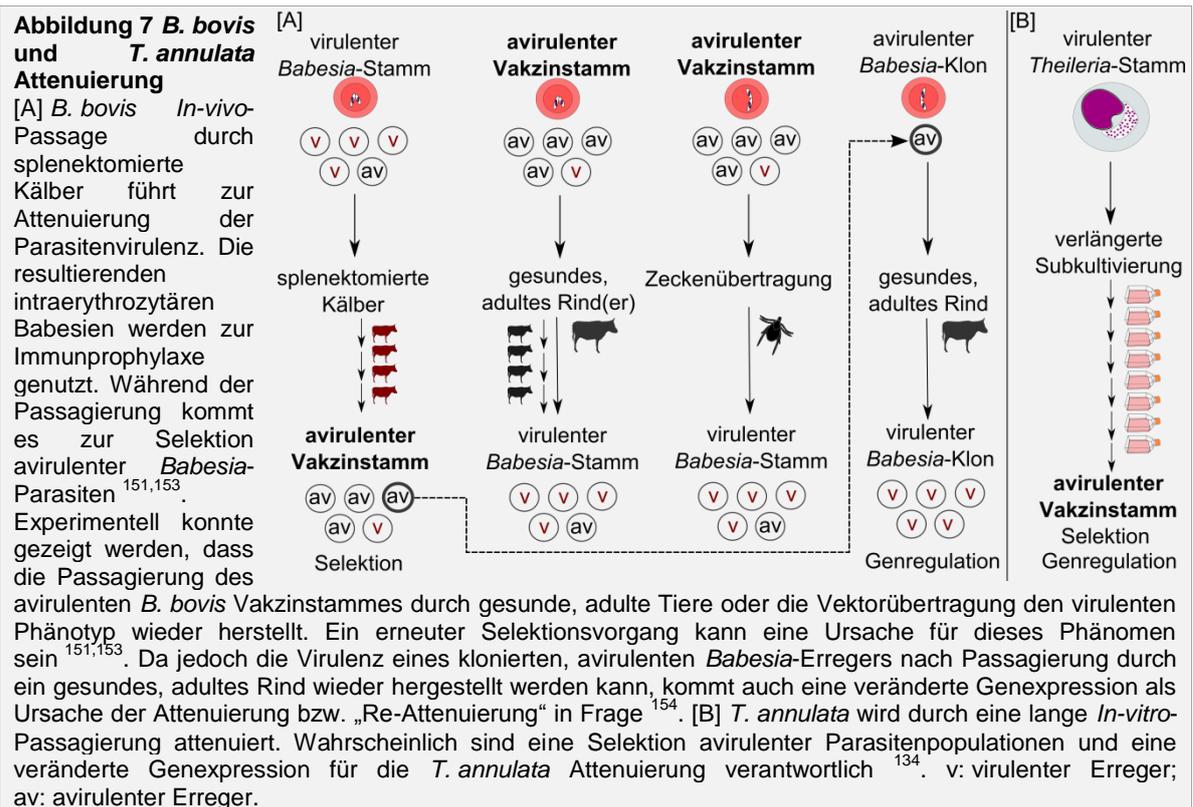
2.8 Regulation eukaryotischer Genexpression durch epigenetische Modifikationen

Innerhalb der eukaryotischen Zelle bilden die dicht gepackte DNA (*deoxyribonucleic acid*; DNA), Histone und Nichthistonproteine das Chromatin. Die Grundorganisationseinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Das Nukleosom besteht aus einem Kern, dem Histonoktamer, das jeweils zwei Einheiten der Histonproteine H2A, H2B, H3, H4 umfasst, und einer 147 bp langen DNA, die 1,65-mal eng um den Histonkern (*histone core*) gewunden ist^{143,144}. Das Chromatin durchläuft einen ständigen Prozess der Kondensation und Dekondensation. Durch diese Dynamik wird der Zugang für die zellulären Maschinerien zu spezifischen DNA-Sequenzen reguliert und somit Prozesse, wie Transkription, Replikation und DNA-Reparatur gelenkt¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Die Aminosäuren der N-terminalen Enden von jedem der *core* Histone können als Substrate für eine Vielzahl von enzymkatalysierten, reversiblen posttranslationalen Modifikationen dienen, einschließlich Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Zudem können Methylgruppen auch direkt auf die DNA übertragen werden. Die Kombinationen dieser sogenannten epigenetischen Modifikationen bedingen die Ausprägung des

Phänotyps über die Zellteilung hinaus, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Somit sind die epigenetischen Modifikationen wichtig für eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie beispielsweise die Zelldifferenzierung. Zudem kann das Muster an epigenetischen Modifikationen durch schädliche Umwelteinflüsse verändert werden (Epimutationen), was die Entstehung von Krankheiten zur Folge haben kann. Zum Beispiel können Tumorsuppressorgene durch bestimmte epigenetische Markierungen stillgelegt werden und nachfolgend die Entstehung von genomischen Mutationen begünstigen. Andererseits sind Epimutationen in Krebszellen oft die Folge von genetischen Mutationen und tragen zur Aggressivität der Tumorzellen bei ^{148–150}.

2.8.1 Attenuierung und Abschwächung des Differenzierungspotenzials in Apicomplexa

Ein besseres Verständnis der Attenuierung und Differenzierungspotenzialabschwächung wäre für die Entwicklung eines zielgerichteten, schnelleren Attenuierungsverfahrens hilfreich bzw. könnte dazu beitragen eine Übertragung der Theileriose-Erreger von einem immunisierten Tier auf Zecken zu verhindern. Wie im Abschnitt 2.1 dargestellt gehören die Theilerien zusammen mit Babesien und Plasmodien zu den Apicomplexa. Für Plasmodiumparasiten und Babesien wurde bisher keine Attenuierung durch *In-vitro*-Kultivierung beschrieben. Jedoch kommt es bei *Babesia bovis* zu einer Attenuierung der Virulenz nach mehreren *In-vivo*-Passagen in splenektomierten Kälbern. Bei der *B. bovis* *In-vivo*-Passagierung wird der komplexe Lebenszyklus abgekürzt, indem die intraerythrozytären Parasiten vom Blut eines splenektomierten Kalbes auf ein anderes Kalb mittels Injektion übertragen werden. Diese Technik wird mehrmals hintereinander durchgeführt. Man spricht auch von einer fortlaufenden Blutpassage (*serial blood passage*). Die so gewonnenen attenuierten Lebendvakzine werden zur Babesiose-Immunprophylaxe eingesetzt. Jedoch kann diese Attenuierung mittels *In-vivo*-Passagierung durch adulte, gesunde Rinder und durch Zeckenübertragung aufgehoben werden. Dieses Phänomen und die Attenuierung der Babesien beruhen auf der Selektion einzelner Parasitenpopulationen und einer veränderten Genexpression ^{151–154}. Die Experimente von Timm *et al.* 1990 deuten darauf hin, dass der virulente Phänotyp nach der Passagierung durch ein gesundes Rind aufgrund einer veränderten Genexpression, die womöglich einer epigenetischen Regulierung obliegt, wiederhergestellt wird (Abbildung 7) ¹⁵⁴.



Eine reziproke Beobachtung wurde beim Nager-Plasmodium, *Plasmodium chabaudi*, gemacht. Hier resultiert eine vermehrte Blutpassage eines „Laborstammes“ von einer Maus auf die andere in einem stärker virulenten Phänotyp. Werden diese intraerythrozytären Plasmodien dagegen mittels Moskitos übertragen, so zeigen die Mäuse nur eine geringe Parasitämie. Die durch Moskitos übertragenen Parasiten lösen eine stärkere Immunreaktion aus als die durch Injektion übertragenen, intraerythrozytären Plasmodien. Verantwortlich dafür sind scheinbar bestimmte Antigene auf der Parasitenoberfläche, denn Genexpressionsanalysen der Plasmodien vor und nach Vektorübertragung zeigten, dass subtelomere VSA (*variant surface antigens*; VSA)-Gene unterschiedlich exprimiert werden¹⁵⁵. Über die Mechanismen, die hinter diesem Phänomen stehen, kann bisher nur spekuliert werden. Vermutlich werden durch Vektortransmission epigenetische Prägungen verändert.

Die im vorherigen Absatz genannten Beispiele zeigen, dass die Bedeutung epigenetischer Modifikationen im Prozess der Virulenz bzw. Attenuierung nur unzureichend aufgeklärt ist. Des Weiteren deuten Untersuchungen an *Toxoplasma gondii* nur an, dass epigenetische Modifikationen mit der abgeschwächten Fähigkeit des Apicomplexaparasiten sich zu differenzieren verknüpft sind^{156,157}. Studien des meist untersuchten Apicomplexaparasiten *P. falciparum* offenbaren aber, dass komplexe epigenetische Mechanismen sich in diesem frühen Zweig des eukaryotischen Stammbaums etabliert haben. In den Plasmodien kann das Chromatin durch enzymkatalysierte Histonmodifikationen und durch

den Einbau von Histonvarianten moduliert werden. DNA-Methylierungen sind in den Plasmodien scheinbar nicht vorhanden^{158,159}. Epigenetische Prozesse in den Piroplasmen (Babesien und Theilerien) wurden bisher nur ansatzweise behandelt. Dennoch konnten in den *T. annulata* Parasitenkernen Histonacetylierungen nachgewiesen werden und das Histonacetylierungsmuster in den Kernen der infizierten Zellen zeigte nach Abtötung des Parasiten auffällige Veränderungen (unveröffentlichte Daten von Ulrike Seitzer).

2.8.2 Regulation der Genexpression in Eukaryota durch Histonacetylierung

Unter den posttranslationalen Histonmodifikationsreaktionen sind besonders die Acetylierung und Deacetylierung der Histone untersucht. Der Acetylierungsstatus der Histone wird dabei von den sich gegenüber stehenden Aktivitäten zweier Enzymklassen gesteuert. Zum einen durch Histonacetyltransferasen (*histone acetyltransferase(s)*; HAT(s)), die Acetylgruppen auf die Lysinreste innerhalb der N-terminalen Enden der Histone übertragen, und zum anderen durch Histondeacetylasen (*histone deacetylase(s)*; HDAC(s)), die diese wiederum entfernen (Abbildung 8)^{161,162}.

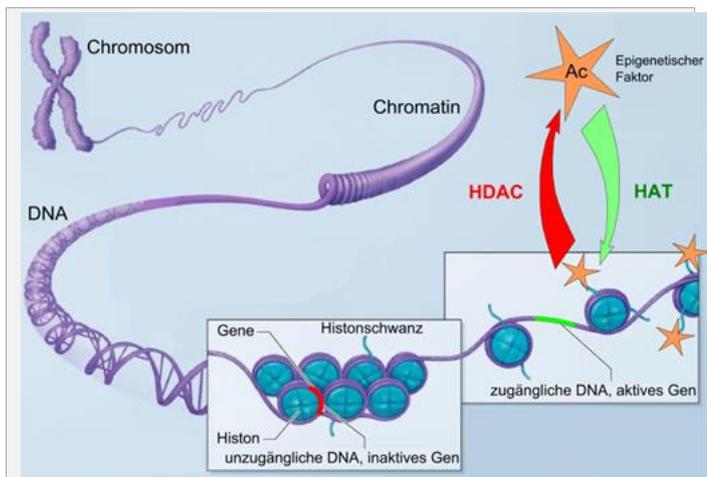


Abbildung 8 Histonacetylierung und Regulation der Genexpression Grün indiziert Genaktivierung und rot markiert Genrepression. Schema modifiziert nach dem *National Institute of Health* aus <http://commonfund.nih.gov>¹⁶⁰
HAT: Histonacetyltransferase; HDAC: Histondeacetylase; Ac: Acetylgruppe.

Generell erhöhen die Histonacetylierungen die Transkriptionsaktivität über zwei Wege. Zum einen durch die Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-Koenzym A durch die Histonacetyltransferasen auf die Lysinreste des Peptidschwanzes der Histone. Dies neutralisiert die positive Ladung der Histone, vermindert somit die Affinität der Histone zur negativ geladenen DNA und folglich wird die Chromatinstruktur gelockert. Dies erleichtert den Zugriff der Transkriptionsmaschinerie auf die DNA und verbessert dadurch die Gentranskription. Zum anderen vermittelt die Histonacetylierung die Rekrutierung von Effektorproteinen, die über ihre Bromodomäne mit den acetylierten Lysinresten spezifisch interagieren. Die Acetylgruppen der Histone können als Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren und Nukleosomen-Umlagerungskomplexe, die die Zugänglichkeit der DNA verbessern, dienen. Somit ist die Acetylierung von Histonen im Allgemeinen mit der Aktivierung der Transkription und mit der Dekondensation von Chromatin assoziiert. Entfernen die HDACs dagegen die Acetylgruppen von den Histonschwänzen, werden die

Auswirkungen der HATs umgekehrt. Histondeacetylierungen gehen vorwiegend mit einer Repression der Transkriptionsaktivität und einer Chromatinkondensation einher (zusammengefasst in Watson *et al.*, 2011) ¹⁶³.

2.8.3 Klassifikation von Histondeacetylasen

Innerhalb der Eukaryoten gibt es zwei Proteinfamilien mit HDAC-Aktivität. Die Sirtuine mit einer NAD⁺(oxidiertes Nicotinamadenindinukleotid; NAD⁺)-abhängigen HDAC-Aktivität und die klassische HDAC-Familie mit einer Zink(II)-Ion(Zn²⁺)-abhängigen katalytischen HDAC-Aktivität. Zudem werden die HDACs entsprechend ihrer Sequenz- und Domänenverwandtschaft zu ihren Homologen aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in vier Klassen eingeteilt. Die Vertreter der Klasse I ähneln dem Transkriptionsregulator RPD3 (*reduced potassium dependency 3*; RPD3) und beinhalten im Säuger die Histondeacetylasen HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8. Die Mitglieder der Klasse II zeigen homologe Bereiche zur *S. cerevisiae* HDA1 (*h*istone *d*eacetylase 1; HDA1) und sind im Säuger mit den Enzymen HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10 vertreten. Die dritte Klasse der HDAC umfasst im Säuger die Sirtuine 1–7, die dem Sirtuin SIR2 (*silent information regulator 2*; SIR2) der Bäckerhefe ähneln ^{164,165}. Einer eigenen vierten Klasse wurde die Säuger HDAC11, die Homologien sowohl zur RPD3 als auch zur HDA1 aufweist, zugeordnet.

2.8.4 Histondeacetylasen der Apicomplexa

Bei den Apicomplexa finden sich Vertreter der HDACs der Klassen I, II und III (Abbildung 9). Einige Apicomplexa HDACs wurden näher charakterisiert. Zum Beispiel ist die Klasse I *Toxoplasma gondii* HDAC (*Tg*HDAC3) mitverantwortlich für eine stadienspezifische Genexpression. *Tg*HDAC3 reprimiert im Tachyzoitenstadium, im Komplex mit anderen Proteinen, die Genexpression Bradyzoiten-spezifischer Gene mittels Histondeacetylierungsreaktionen ¹⁵⁷. Somit scheint *Tg*HDAC3 in die Aufrechterhaltung der Tachyzoitendifferenzierungsform involviert zu sein

YNL330C	Hefe RPD3	▶ Klasse I HDAC
PF11260c	<i>P. falciparum</i> HDAC1	
BBOV_III011020	<i>B. bovis</i> HDAC3	
TGME49_227290	<i>T. gondii</i> HDAC3	
YNL021W	Hefe HDA1	▶ Klasse II HDAC
PF10_0078	<i>P. falciparum</i> IPK1	
cgd8_480	<i>C. parvum</i> HDAC3	
YDL042C	Hefe SIR2	▶ Klasse III HDAC
PF13_0152	<i>P. falciparum</i> SIR2A	
TA20415	<i>T. annulata</i> SIR2B	
PF14_0489	<i>P. falciparum</i> SIR2B	
cgd7_2030	<i>C. parvum</i> SIR2A	

Abbildung 9 Klassifizierung einiger Apicomplexa HDACs Die Einordnung erfolgte aufgrund des Vergleichs der Apicomplexa HDACs mit den HDACs der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenzen wurden den Datenbanken NCBI; *yeast genome*; GeneDB, PiroplasmaDB, ToxoDB, CryptoDB entnommen. Die entsprechenden Akzessionsnummern sind aufgelistet.

und tatsächlich führt eine Inhibition von *Tg*HDAC3 zur Differenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten ¹⁶⁶. Die zur Klasse I gehörende *P. falciparum* HDAC1 (*Pf*HDAC1) kann

ebenfalls inhibiert werden, was wiederum die intraerythrozytäre Entwicklungszyklus-Transkriptionskaskade des Parasiten beeinträchtigt¹⁶⁷. Eine weitere HDAC, die in *Plasmodium* identifiziert wurde, ist die HDAC IPK1 (*inositol phosphate kinase 1*; IPK1), die zur HDAC Klasse II gehört. Ihre biologische Funktion konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden¹⁶⁸. Eine andere Apicomplexa HDAC der Klasse II ist die *Cryptosporidium parvum* HDAC3 (*CpHDAC3*). Von ihr wird vermutet, dass sie an Histondeacetylierungsvorgängen, die die DNA-Replikation begleiten, beteiligt ist.¹⁶⁹ Die Kryptosporidien besitzen auch eine HDAC der Klasse III, das Sirtuin *ChSIR2A*. In einem heterologen System konnte gezeigt werden, dass *ChSIR2A* die Zellproliferation fördert¹⁷⁰. In *Plasmodium* sind zwei Vertreter der Sirtuin HDACs zu finden, das *PfSIR2A* und das *PfSIR2B*. Diese *Plasmodium* SIR2-Proteine reprimieren mittels Histondeacetylierungsreaktionen und in Kooperation mit anderen histonmodifizierenden Enzymen in der Regel bis auf einen Vertreter die Expression von pathogenitätsrelevanten, meist subtelomeren Genen, den sogenannten *var* (*variant*)-Genen¹⁷¹. Die Produkte dieser Gene vermitteln die Adhäsion infizierter Erythrozyten an Kapillarendothelien und führen zur Anreicherung befallener Erythrozyten in viszeralen Organen. Eine daraus resultierende Störung der Mikrozirkulation führt u. a. zu Ödembildung und Blutungen. Des Weiteren wird durch die Sequestrierung befallener roter Erythrozyten in Kapillarendothelien deren Abbau in der Milz verhindert. Um der Opsonierung infizierter Erythrozyten durch Antikörper zu entgehen, findet ein Genexpressionswechsel zwischen der aktiven und einer inaktiven Variante der *var*-Genfamilie statt. Aus diesem Grund sind die Plasmodiumsirtuine nicht nur bei der Pathogenität des Erregers involviert, sondern auch bei der Fähigkeit des Erregers zur Immunevasion^{172,173}.

Wie der vorangegangene Absatz zeigt, scheinen Apicomplexa HDACs in wichtige biologische Prozesse involviert zu sein, wobei die Beteiligung der *Toxoplasma* HDAC der Klasse I an Prozessen der Differenzierung und die Rolle der *Plasmodium* HDAC der Klasse III bei der Expression von Virulenzgenen bisher am besten untersucht wurde. Für *T. annulata* wurde bisher keine HDAC näher charakterisiert.

Dennoch konnte mithilfe von bioinformatischen Analysen eine putative HDAC der Klasse III identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das Sirtuin *TaSIR2*¹⁷⁴. Wie bereits erwähnt reprimieren Plasmodiumsirtuine die Expression von pathogenitätsrelevanten, meist subtelomeren VSA-Genen¹⁷¹. Auch *T. annulata* verfügt über subtelomere Genfamilien. Die Bedeutung dieser Gene ist jedoch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass diese für Wirtszelltransformation bzw. Immunevasion relevant sind¹⁷⁵. Es ist also denkbar, dass auch das *T. annulata* Sirtuin wichtig für die Parasitenvirulenz ist. Zudem ist bisher nicht bekannt, dass *T. annulata* über weitere HDACs verfügt. Eine HDAC der Klasse I konnte aber im Theilerien-verwandten, intraerythrozytären *B. bovis*-

Erreger detektiert werden. Dazu wurde ein Antiserum gegen *BbHDAC3* verwendet. Dieses Antiserum zeigte auch eine Kreuzreaktivität gegen *Theileria equi*. Dieser Erreger der Equinen Piroplasmose gehört zu den nicht leukoproliferativen Theilerien und lässt aufgrund einer nahen Verwandtschaft zu den leukoproliferativen Theilerien ebenfalls das Vorhandensein von zumindest einer HDAC der Klasse I in *T. annulata* vermuten. Jedoch ist die Bedeutung dieser Piroplasmen HDAC für die Parasitenbiologie nicht geklärt¹⁷⁶. Es bedarf demnach weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob diese Enzyme wie die HDACs der Klasse I aus *Toxoplasma* und *Plasmodium* in Prozesse der Differenzierung involviert sind.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

Zur Bekämpfung der Tropischen Theileriose werden lebende *T. annulata*-infizierte Leukozyten zur Immunprophylaxe eingesetzt. Die in diesen Vakzinzellen enthaltenen Parasiten wurden durch eine *In-vitro*-Langzeitkultivierung abgeschwächt. In welcher Form sich eine Langzeitkultivierung auf die Eigenschaften des intrazellulären Parasiten bzw. der befallenen Wirtszelle auswirkt und welche Mechanismen dahinter stehen, sind nur ansatzweise aufgeklärt. Dennoch konnte bisher gezeigt werden, dass eine Langzeitkultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen mit folgenden Veränderungen einhergeht:

- Abschwächung des proteolytischen Potenzials befallener Wirtszellen; eine Ursache, warum eine starke und letale Infektion im Tier nach Injektion *T. annulata*-infizierter Zellen ausbleibt
- reduzierte Differenzierungsfähigkeit des intrazellulären Makroschizonten extrazelluläre Merozoiten zu bilden.

Ebenfalls aus der Literaturübersicht ist bekannt, dass bei Theilerien-verwandten Apicomplexaparasiten eine Gruppe von histonmodifizierenden Enzymen, die

HDAC	→ Virulenzgene	■ <i>P. falciparum</i>
HDAC	→ stadiumspezifische Gene (Differenzierung)	■ <i>T. gondii</i>
HDAC	→ Attenuierung (Abschwächung Virulenz) Abschwächung der Differenzierung	<i>T. annulata</i> ?

Abbildung 10 Bedeutung von Apicomplexa HDACs HDACs anderer Apicomplexa können Virulenzgene und stadiumspezifische Gene reprimieren. Infolgedessen wurde vermutet, dass *T. annulata* HDACs während der Langzeitkultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen zur Attenuierung bzw. Abschwächung der Differenzierungsfähigkeit des Schizonten beitragen.

Histondeacetylasen in Prozesse der Differenzierung und Virulenz involviert sind. HDACs deacetylieren Histone, reduzieren die Zugänglichkeit der DNA zur

Transkriptionsmaschinerie und sind für die Repression von stadiumspezifischen Apicomplexagenen und Virulenzfaktoren verantwortlich (Abbildung 10).

Daraus ergibt sich folgende Hypothese: Die Attenuierung bzw. Abschwächung des Differenzierungspotenzials entsteht durch eine HDAC-vermittelte Repression von Genen, die in die Virulenz und Differenzierung (hier Merogonie) von *T. annulata* involviert sind.

Zur Bestätigung dieser Hypothese sollten im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Verfügt *T. annulata* über funktionale HDACs?
 - a. Identifizierung von *T. annulata* HDACs und Bestimmung konservierter, funktionaler Sequenzabschnitte anhand bioinformatischer Analyse.
2. Wenn ja, welche Rolle spielen Sie in der *T. annulata* Attenuierung und Differenzierung?
 - a. Untersuchung der Expression der Parasiten-HDACs in *T. annulata*-infizierten Zellen im Laufe der Langzeitkultivierung.
 - b. Untersuchung des Einflusses eines HDAC-Inhibitors auf Marker der Parasitendifferenzierung und Metastasierung in *T. annulata*-infizierten Zellen.

3 Material

3.1 Geräte

Im Verlauf dieser Promotionsarbeit verwendete Geräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Geräte und deren Hersteller

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegelkammern	Mini	G&P Kunststofftechnik (Kassel, D)
Analysewaage	Research	Sartorius AG (Göttingen, D)
Autoklav		Westima Sauter KG (Köln, D)
Brutschrank, Bakterien	B 5025	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode, D)
Brutschrank, Zellkultur	HERAcell® 150	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
CCD-Videokamera mit UV-Filter	K65HM/KP65HM	iNTAS Science Imaging GmbH (Göttingen, D)
Echtzeit Thermocycler	LightCycler® 480 Instrument II	Roche (Rotkreuz, CH)
Elektrophoresekammer	Mini XCell	Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, D)
Gefrierschrank (-70 °C)	Revco* Value* PLUS	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Geltrockner	Gel Dryer Model 543	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, D)
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Heiz-Rührgerät	RCT IKAMAG®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Hitzesterilisator	T 5060 E	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode, D)
Hochgeschwindigkeits- zentrifuge	Sorvall RC-5C Plus mit SS-34 Rotor	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Infrarotscanner	Odyssey®	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Konfokales Laserscanmikroskop	TCS SP5	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Kühl-/Gefrierschränke	Diverse	Privileg (Stuttgart, D)
Kühl-/Gefrierschränke	Diverse	Liebherr (Biberach an der Riss, D)
Kühlschrank	Cool Head	NordCap GmbH & Co. KG (Bremen, D)
Membran-Vakuumpumpe	Typ MZ 2C	Vacuubrand GmbH & Co. (Wertheim, D)
Mikroskop, Durchlicht	Wilovert®	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, D)
Mikroskop, Fluoreszenz	Diaphot 300 mit Quecksilberlampe HB 10101 AF	Nikon Instruments Europe BV (Amsterdam, NL)
Mikrozentrifuge	5418	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikrozentrifuge, gekühlt	5424 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Multifunktionsgerät (Drucker & Scanner)	HP Officejet Pro 8500	Hewlett-Packard GmbH (Böblingen, D)

Netzgerät	Model 200/2.0	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Netzgerät	Model 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Netzgerät	E802	Consort bvba (Turnhout, B)
Netzgerät	EV202	Consort bvba (Turnhout, B)
pH-Meter	Calimatic® 761	Knick GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetten 10, 100, 200, 1000 µl	Research / reference	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann® GmbH & Co. KG (Eberstadt, D)
Präzisionswaage	MC-1 LC4800P	Sartorius AG (Göttingen, D)
Schüttelwasserbad, Bakterien	SW-20C	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach, D)
Schüttler, horizontal	GFL 3016	GFL GmbH (Burgwedel, D)
Schüttler, orbital	IKA-Vibrax®-VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Schüttler, vertikal	Rocking Platform WT15	Biometra GmbH (Göttingen, D)
SDS-PAGE Gellaufkammern und Gießstände	Mini / Maxi	G&P Kunststofftechnik (Kassel, D)
SDS-PAGE Silikonkämme	Diverse	G&P Kunststofftechnik (Kassel, D)
Spectrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Sterilwerkbank	ScanLaf Mars safety class 2	LaboGene ApS (Lynge, DK)
Sterilwerkbank, Bakterien	LaminAir® HLB 2448	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode, D)
Sterilwerkbank, Zellkultur	LaminAir® HLB 2472	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode, D)
Thermocycler	T3	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Thermodrucker	Sony UP-D890	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Transfersystem	Mini Trans-Blot®	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Ultraschallwasserbad	Sonorex RK 102	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Vortex	Paramix II	JULABO Labortechnik GmbH (Seelbach, D)
Vortex	VF2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Wasserbad, Zellkultur	M20	LAUDA GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, D)
Zählkammer	Neubauer	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D)
Zellzählgerät	Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Zentrifuge	Biofuge 28 RS	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode, D)
Zentrifuge, Bakterien	GS-6KR	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)
Zentrifuge, Zellkultur	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech GmbH (Osterode, D)
Zentrifuge, Zellkultur	Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, D)

3.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Chemikalien, Enzyme, Kits und deren Hersteller

Chemikalien, Enzyme, Kits	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid-Rotiphoese® Gellösung 30 Agar Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Agarosegel Ladungspuffer (6 x)	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Apicidin	Enzo, VWR (West-Chester, USA)
APS; Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Beta-Mercaptoethanol	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
Bio-Rad DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, USA)
Borsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
BSA; Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
Calciumchlorid	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Carbenicillin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Crystal Agarose	Biolabproducts GmbH (Gödenstorf, D)
DABCO; 1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-octan	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
DAPI; 4',6-Diamidino-2-Phenylindol	Roche (Mannheim, D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Millipore (Darmstadt, D)
DMSO; Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
DNA Polymerase DreamTaq	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
DNA Taq-Polymerase	Peqlab (Erlangen, D)
DNase I (1 U/µl)	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
EDTA; Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Essigsäure	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Ethanol	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
FKS; Fötales Kälberserum	Biochrom AG (Berlin, D)
GeneJET™ PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Glycerin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Bäckerhefeextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG (Jena, D)
IPTG; Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab Biotechnology Gmb (Erlangen, D)
Isopropanol	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Kaliumacetat	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore (Darmstadt, D)
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
LightCycler® 480 Probes Master	Roche (Mannheim, D)
Magermilchpulver	Fluka (Buchs, CH)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Magnesiumsulfat	Merck Millipore (Darmstadt, D)
MOPS; 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
NEAS; Nicht essenzielle Aminosäuren, 100 x Stammlösung	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
NTPs; Nukleosidtriphosphate	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
PageBlue Protein Staining Solution	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
PCR Cloning Kit	QIAGEN (Hilden, D)
Penicillin-Streptomycin-Mix	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
PFA; Paraformaldehyd	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Ponceau S Färbelösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Purgene DNA Blood Kit	QIAGEN (Hilden, D)
Pyronin Y	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Restriktionsenzyme FastDigest®	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Revert Aid First™ Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Bonn, D)
Roti®-ImmunoBlock (10 x)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
RPMI-1640	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
SDS; Natriumdodecylsulfat	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)

TEMED; Tetramethylethylendiamin	Merck Millipore (Darmstadt, D)
TO-PRO [®] -3 Iodid	Invitrogen GmbH (Darmstadt, D)
Tris-Base	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Triton X-100	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Trypanblau (0,4 % w/v) Countess [®]	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Trypanblau (0,5 % w/v)	Biochrom AG (Berlin, D)
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Versene-Lösung (EDTA in Ca ²⁺ und Mg ²⁺ -freien 1x PBS)	Biochrom AG (Berlin, D)
X-Gal; 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	Peqlab (Erlangen, D)

3.3 Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cellophanfolie	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Deckgläschen; rund	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, D)
Filterpapier (0,8 und 1,5 mm)	Whatman GmbH (Dassel, D)
Filterspitzen Biosphere [®] (10; 100; 1000 μ l)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Flaschenaufsatzfilter Steritop-GP (0,2 μ m)	Merck Millipore (Darmstadt, D)
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc (Glostrup, DK)
Kulturflaschen (25; 75; 175 cm ²)	Corning Inc. Life Sciences (Lowell, USA)
Küvetten (Einweg; 2,5 ml)	Brand GmbH + CO. KG (Wertheim, D)
Mikrotiterplatten Costar [®] (24; 96 well)	Corning Inc. Life Sciences (Lowell, USA)
Mikrotiterplatten LightCycler [®] 480 (96 well)	Roche (Mannheim, D)
Mikrotiterplatten Nunc MaxiSorp [®] (96 well)	Nunc (Glostrup, DK)
Mikrotiterplatten, flacher Boden, Nunc-Nunclon [®] Surface, (48; 96 well)	Nunc (Glostrup, DK)
Multitips Ritips [®] (0,5; 2,5; 12,5 ml)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Objektträger SuperFrost [®] Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
Petrischalen (\varnothing 92 mm)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen (100 μ l)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)

Pipettenspitzen epT.I.P.S (2,5; 5 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen Ultratip (10; 1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Reaktionsgefäß Multiply [®] -Pro (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Reaktionsgefäß SafeSeal (2 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Verschlussfolie für LightCycler [®] -Mikrotiterplatten	Roche (Mannheim, D)
Immunblotpapier (Grade 3MM Chr Zellulose)	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
Zählkammer, Countess [®]	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Zentrifugenflaschen (Polyallomer; 50 ml; 29 x 104 mm)	Beckman Coulter Inc. (Brea, CA)

3.4 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden in durch die Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Academic (Merck Millipore, Darmstadt, D) aufgereinigtem Wasser angesetzt. Die Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C im Autoklaven dampfdrucksterilisiert bzw. temperaturinstabile Lösungen mittels einer 0,2 µm Membran sterilfiltriert (Flaschenaufsatzfilter Steritop-GP oder Spritzenfilter Filtropur S). Die Bestandteile der Lösungen sind im Abschnitt 4 jeweils in Klammern aufgeführt.

3.5 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Klonierung wurde der *E. coli*-Stamm *DH5α* von der Firma BioDynamics Laboratory Inc. (Tokyo, JPN) verwendet. Der Genotyp besitzt folgende Charakteristika: *supE44*, $\Delta lacU169(\phi 80 lacZ \Delta M15)$, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*. Des Weiteren wurden in Tabelle 4 aufgelisteten Plasmide verwendet.

Tabelle 4 Plasmide und ihre Herkunft

Bezeichnung	Charakterisierung	Herkunft
pdrive	Klonierungsvektor; <i>LacZ</i> , <i>T7</i> RNA Polymerase Promoter, <i>SP6</i> RNA Polymerase Promoter, <i>AmpR</i> , <i>KanR</i> , pUC origin, Phage f1 origin	QIAGEN (Hilden, D)
pdrive- <i>TaMR1</i>	Das mit den Primerpaar TAMR1_67_FW / TAMR1_8_RV generierte Amplifikationsprodukt wurde in pdrive kloniert, als <i>template</i> fungierte <i>TaA288</i> cDNA	diese Arbeit

3.6 Zelllinien

Einen Überblick über verwendete Zelllinien gibt die Tabelle 5.

Tabelle 5 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft; Referenz
BoMac	Bovine Makrophagenzelllinie: Primäre peritoneale Makrophagen wurden mit SV40 (Simian Virus 40) Plasmid-DNA transformiert.	Stabel und Stabel, 1995 ¹⁷⁷
TaA288	Bovine Lymphozytenzelllinie: Periphere Blutlymphozyten eines gesunden Kalbes wurden 1985 <i>in vitro</i> mit <i>T. annulata</i> Sporozoiten infiziert. Die Sporozoiten stammen aus der Ankara Region.	Ahmed <i>et al.</i> , 1989 ⁶⁸
Ta#868	Bovine Leukozytenzelllinie: Zellen wurden aus einem <i>T. annulata</i> -infizierten Tier (Nr. 868) isoliert. Der Erreger stammt aus Israel.	Erhalten und beschrieben von Varda Shkap; Veterinary Services and Animal Health (Bet Dagan; ISR)
Ta#173	Bovine Leukozytenzelllinie: Zellen wurden aus einem <i>T. annulata</i> -infizierten Tier (Nr. 173) isoliert. Der Erreger stammt aus Israel.	Erhalten und beschrieben von Varda Shkap; Veterinary Services and Animal Health (Bet Dagan; ISR)

Die *T. annulata*-infizierten Leukozyten der Linie *Ta#868* und *Ta#173* wurden von Varda Shkap generiert, in suszeptiblen Kälbern getestet und freundlicherweise für diese Arbeit bereitgestellt. Diese Zelllinien wurden bisher nicht in der Literatur beschrieben und werden daher im folgenden Abschnitt vorgestellt.

3.6.1 *T. annulata*-infizierte Leukozyten der Linie *Ta#868*

Varda Shkap und Mitarbeiter inokulierten das suszeptible Kalb#842 mit 0,7 ml einer Zeckensuspension, die *T. annulata* Sporozoiten enthielt (hergestellt aus einer weiblichen und einer männlichen Zecke pro ml). Die Herstellung der Zeckensuspension erfolgte nach Samish *et al.* 1983¹⁷⁸. Anschließend wurden die pathophysiologischen Auswirkungen im Kalb untersucht, die erhaltenen Werte sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Daten wurden von Varda Shkap zur Verfügung gestellt; Veterinary Services and Animal Health (Bet Dagan; ISR).

Tabelle 6 Krankheitsverlauf eines 10 Monate alten Kalbes nach Injektion infektiöser Sporozoiten (Tier#842)

Tag	Körpertemperatur [°C]	Hämatokrit [%]	Piroplasmen-befallene Erythrozyten [%]	Schizonten-infizierte Leukozyten [%]*
0	38,7	31,0	n.b.	n.b.
8	40,0	29,0	n.b.	n.b.
9	40,7	35,0	n.b.	n.b.
10	40,9	32,0	n.b.	n.b.
11	40,3	29,0	n.b.	n.b.
12	39,6	26,0	n.b.	n.b.
13	39,4	29,0	< 0,01	n.b.
14	40,0	30,0	1,5	1,0
15	40,0	28,0	11,0	n.b.
16	40,0	n.b.	19,0	n.b.
17	41,0	24,0	23,0	3,5
18	40,4	25,0	31,0	n.b.
19	40,1	21,0	34,0	n.b.
20	39,7	22,0	33,0	n.b.
21	40,1	22,0	30,0	n.b.
22	40,2	20,0	19,0	n.b.
23	40,1	17,0	12,0	n.b.
24	39,5	22,0	7,0	n.b.
25	39,2	22,0	3,5	n.b.
29	39,0	26,0	n.a. (+ - -)	n.b.
36	38,7	27,0	n.a. (+ - -)	n.b.
38	38,7	32,0	n.a. (+ - -)	n.b.

n.a.: nicht (näher) angegeben; n.b.: nicht bestimmt; * [%] Schizonten-befallene Zellen in Präparaten nach Leberpunktion und Lymphknotenbiopsie.

Die aus der zweiten Leberpunktion isolierten *T. annulata*-infizierten Leukozyten wurden *in vitro* über zwei Passagen (Passage; p) vermehrt und anschließend 3×10^6 Ta#842 Zellen in das Kalb#868 subkutan injiziert. Die Parameter des klinischen Krankheitsverlaufs sind in der Tabelle 7 aufgeführt. Die Angaben wurden von Varda Shkap zur Verfügung gestellt; Veterinary Services and Animal Health (Bet Dagan; ISR).

Tabelle 7 Krankheitsverlauf eines 3 Monate alten Kalbes (Tier#868) nach Injektion *T. annulata*-infizierter Zellen der Passage 2, die zuvor aus dem Kalb#842 isoliert wurden

Tag	Körpertemperatur [°C]	Hämatokrit [%]	Piroplasmen-befallene Erythrozyten [%]	Schizonten-infizierte Leukozyten [%]*
0	38,8	43,0	n.b.	n.b.
14	39,2	40,0	n.b.	<1,0
15	39,7	43,0	n.b.	n.b.
16	39,6	43,0	n.a. (+ - -)	n.b.
17	40,5	38,0	n.a. (+ - -)	5,0
18	41,0	34,0	n.a. (+ -)	n.b.
20	41,0	24,0	n.a. (+ -)	n.b.
21	39,6	19,0	80,0	40,0
22†	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.a.: nicht (näher) angegeben; n.b.: nicht bestimmt; * [%] Schizonten-befallene Zellen in Präparaten nach Leberpunktion und Lymphknotenbiopsie; † Euthanasie

Die aus der dritten Leberpunktion erhaltenen, stark virulenten *T. annulata*-infizierten Leukozyten wurden *in vitro* über zwei Passagen in Israel vermehrt, kryokonserviert und anschließend unserer Arbeitsgruppe übergeben. Diese *T. annulata*-infizierten Leukozyten erhielten die Abkürzung Ta#868-Zellen.

3.6.2 *T. annulata*-infizierte Leukozyten der Linie *Ta#173*

Das suszeptible Kalb#173 wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Varda Shkap mit *T. annulata* Erregern infiziert. Nachfolgend wurden *T. annulata*-infizierte Leukozyten (im Folgenden bezeichnet als *Ta#173*-Zellen) isoliert, in Kultur vermehrt sowie anschließend die *Ta#173*-Zellen der Passagen 21 und 113 in suszeptiblen Kälbern getestet. Das Kalb#860, dem die *Ta#173*-Zellen der Passage 21 injiziert wurden, wies schwache Anzeichen einer Tropischen Theileriose auf (Tabelle 8; Daten von V. Shkap). Dagegen zeigte das Kalb#847, dem die *Ta#173*-Zellen der Passage 113 injiziert wurden, keine Symptome. Die Körpertemperatur des Tieres betrug durchgängig 38,8–39,1 °C, der Hämatokrit 32–37 % (Tabelle 9; Daten von V. Shkap). Zudem konnten keine Schizontenformen (Koch'sche Körperchen) nach Lymphknotenbiopsie und Leberpunktion detektiert werden (persönliche Mitteilung von V. Shkap).

Tabelle 8 Krankheitsverlauf eines Kalbes (Tier#860) nach Injektion *T. annulata*-infizierter Leukozyten der Linie *Ta#173* aus Passage 20

Tag	Körpertemperatur [°C]	Hämatokrit [%]	Piroplasmen-befallene Erythrozyten [%]	Schizonten-infizierte Leukozyten [%]*
0	39,1	27,0	keine Detektion	n.b.
6	39,3	n.b.	keine Detektion	n.b.
7	39,6	n.b.	keine Detektion	n.b.
8	39,3	40,0	keine Detektion	n.b.
9	39,5	35,0	keine Detektion	n.b.
10	40,5	37,0	keine Detektion	n.b.
11	40,5	37,0	< 0,01	n.b.
12	40,7	34,0	< 0,01	n.b.
13	40,6	31,0	< 0,01	< 0,01
14	40,1	28,0	< 0,5	n.b.
15	40,0	27,0	< 0,5	0,5
16	40,1	27,0	< 0,01	0,1
17	40,0	31,0	keine Detektion	n.b.
18	39,5	28,0	n.b.	n.b.
19	39,5	27,0	n.b.	n.b.
20	39,4	30,0	n.b.	n.b.
21	39,5	34,0	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt; * [%] Schizonten-befallene Zellen in Präparaten nach Leberpunktion und Lymphknotenbiopsie.

Tabelle 9 Durch Injektion *T. annulata*-infizierter Leukozyten der Linie *Ta#173* aus Passage 113 verursachte physiologische Auswirkungen im Kalb (Tier#847)

Tag	Körpertemperatur [°C]	Hämatokrit [%]
0	38,9	30,0
6	38,8	n.b.
7	38,8	n.b.
8	38,8	34,0
9	38,6	32,0
10	39,0	33,0
11	38,7	34,0
12	38,8	34,0
14	39,1	32,0
15	38,8	37,0
16	38,6	33,0

n.b.: nicht bestimmt

3.7 Synthetische Oligonukleotide

3.7.1 Primer

Für PCR bzw. Sequenzierreaktionen verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10 Verwendete Primer

Bezeichnung und Sequenz	Ursprung	Funktion	Angewendet für
TaHDAC1_10_FW 5'-GGATCTTCAAAAACAAATATTCGAC-3'	<i>T. annulata</i> HDAC I (TA12690)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173, TaA288
TaHDAC1_10_RV 5'-CACGCTTTCTTGTTGACAAAGT-3'	<i>T. annulata</i> HDAC I (TA12690)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173, TaA288
TaHDAC-Ank_13_FW 5'-TGGCACTTTTTACCCTGGTACT-3'	<i>T. annulata</i> HDAC II ^{ANK} (TA17590)	qRT-PCR	TaA288
TaHDAC-Ank_13_RV 5'-GGACGGTTCCTCCATGT-3'	<i>T. annulata</i> HDAC II ^{ANK} (TA17590)	qRT-PCR	TaA288
TaHDAC-Ank_8_FW 5'-AACTGAGCTCCTGGTTACGG-3'	<i>T. annulata</i> HDAC II ^{ANK} (TA17590)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173
TaHDAC-Ank_8_RV 5'-AACCACCCTCGAGAACACTAAC-3'	<i>T. annulata</i> HDAC II ^{ANK} (TA17590)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173
TaHDAC-IPK_20_FW 5'-CAAGCAAAAACAAAGTTCCTCTAAA-3'	<i>T. annulata</i> HDAC II ^{PK} (TA18230)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173, TaA288
TaHDAC-IPK_20_RV 5'-CCGTTTGAAAACCTGGAGCTTA-3'	<i>T. annulata</i> HDAC II ^{PK} (TA18230)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173, TaA288
TaSIR2_2_FW 5'-AGGAAATGCAACAGATAACAGAACT-3'	<i>T. annulata</i> SIR2 (TA20415)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173, TaA288
TaSIR2_2_RV 5'-TCCACTTTAACTTTATGCACTTGTTT-3'	<i>T. annulata</i> SIR2 (TA20415)	qRT-PCR	Ta#868, Ta#173, TaA288
TaSP_17_FW 5'-AACAAAAACACGAAGAACCTGAA-3'	<i>T. annulata</i> TaSP (TA17315)	qRT-PCR	TaA288
TaSP_17_RV 5'-ACTGCGGGTTCATCAACTG-3'	<i>T. annulata</i> TaSP (TA17315)	qRT-PCR	TaA288
TaActin_31_FW 5'-CGGAAGGGACCTGACTGAG-3'	<i>T. annulata</i> ACT (TA15750)	qRT-PCR (Referenz)	TaA288
TaActin_31_RV 5'-CTCGGCTGTAGTGGTGAATG-3'	<i>T. annulata</i> ACT (TA15750)	qRT-PCR (Referenz)	TaA288
Nukleoporin_59_FW 5'-GGAAACCAGTATGGTGCTTCA-3'	<i>T. annulata</i> NUP (TA10260)	qRT-PCR (Referenz)	Ta#868, Ta#173
Nukleoporin_59_RV 5'-TGCATTTGATTGTAAATTGAGTTG-3'	<i>T. annulata</i> NUP (TA10260)	qRT-PCR (Referenz)	Ta#868, Ta#173
RPL11_73_FW 5'-TGTTGGAAATGTAACCCCTAAAGA-3'	<i>T. annulata</i> RBL11 (TA05670)	qRT-PCR (Referenz)	Ta#868, Ta#173, TaA288

RPL11_73_FW 5'-TCCCGATAATTCGCTTACAAA-3'	<i>T. annulata</i> <i>RBL11</i> (TA05670)	qRT-PCR (Referenz)	<i>Ta#868</i> , <i>Ta#173</i> , <i>TaA288</i>
MMP9_82_FW 5'-GCTCATGTACCCCATGTACAGAT-3'	<i>B. taurus</i> <i>MMP9</i> (BT11364)	qRT-PCR	<i>Ta#868</i> , <i>TaA288</i> , <i>BoMac</i>
MMP9_82_RV 5'-TGAACATCGTCCCTATGCAG-3'	<i>B. taurus</i> <i>MMP9</i> (BT11364)	qRT-PCR	<i>Ta#868</i> , <i>TaA288</i> , <i>BoMac</i>
ACTR3_10_FW 5'-TCGTAAAATTGGCTTCATAGTTATTG-3'	<i>B. taurus</i> <i>ACTR3</i> (BT26681)	qRT-PCR (Referenz)	<i>Ta#868</i> , <i>TaA288</i> , <i>BoMac</i>
ACTR3_10_RV 5'-CAGACAAAACAGGTAATCAGAAAGAC-3'	<i>B. taurus</i> <i>ACTR3</i> (BT26681)	qRT-PCR (Referenz)	<i>Ta#868</i> , <i>TaA288</i> , <i>BoMac</i>
GAPDH_80_FW 5'-CACTCCCAACGTGTCTGTTG-3'	<i>B. taurus</i> <i>GAPDH</i> (BT11420)	qRT-PCR (Referenz)	<i>Ta#868</i> , <i>TaA288</i> , <i>BoMac</i>
GAPDH_80_RV 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'	<i>B. taurus</i> <i>GAPDH</i> (BT11420)	qRT-PCR (Referenz)	<i>Ta#868</i> , <i>TaA288</i> , <i>BoMac</i>
TAMR1_12_FW 5'-CCACTCCTGTAGCGGGTAAA-3'	<i>T. annulata</i> <i>TaMR1</i> (TA16685)	qRT-PCR	<i>TaA288</i>
TAMR1_12_RV 5'-TTGTGGAGGTAAGTACCCAAA-3'	<i>T. annulata</i> <i>TaMR1</i> (TA16685)	qRT-PCR	<i>TaA288</i>
TashHN_82_FW 5'-GTGCCTCTGGAACGAAGAAT-3'	<i>T. annulata</i> <i>TaSH-HN</i> (TA20083; TA20090)	qRT-PCR	<i>TaA288</i>
TashHN_82_RV 5'-AATTCAGGTTCTAGTTCTTCCTGAT-3'	<i>T. annulata</i> <i>TaSH-HN</i> (TA20083; TA20090)	qRT-PCR	<i>TaA288</i>
TAMR1_67_FW 5'-CGATCCTCAACGTGTTTCAC-3'	<i>T. annulata</i> <i>TaMR1</i> (TA16685)	Klonierung	<i>TaA288</i>
TAMR1_8_RV 5'-CGACTACTTGTTTCGTAACAGATGG-3'	<i>T. annulata</i> <i>TaMR1</i> (TA16685)	Klonierung	<i>TaA288</i>
M13 uni (-21) 5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'	Eurofins MWG Operon	Sequenzier- primer	pDrive
M13 uni (-29) 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	Eurofins MWG Operon	Sequenzier- primer	pDrive

qRT-PCR: *quantitative, real-time polymerase chain reaction*

3.7.2 Sonden

Zur relativen Quantifizierung der zu untersuchenden Zieltranskripte mittels qRT-PCR (*quantitative, real-time polymerase chain reaction*; qRT-PCR) wurden Universal Probe Library (UPL)-Sonden (Tabelle 11) des Herstellers Roche (Mannheim, D) eingesetzt. Diese kurzen Oligonukleotide sind zu einem, zwischen dem jeweiligen Primerpaar liegenden Abschnitt des PCR-Produktes komplementär. Das 5`-Ende der Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff und das 3`-Ende mit einem fluoreszenzlöschenden Molekül (*quencher*) konjugiert. Im Laufe der Amplifikation baut die Taq-Polymerase mittels 5`-3`-Exonuklease-Aktivität die Sonden-DNA ab und als Resultat werden die fluoreszierenden Moleküle von den *quencher*-Molekülen befreit.

Tabelle 13 Sekundärantikörper: Herkunft und Verwendung

Spezifität	Immunkonjugat	Herkunft	Hersteller	Anwendung
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor® 488	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)	IFAT 1:500
Anti-Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor® 488	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)	IFAT 1:500
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor® 568	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)	IFAT 1:500
Anti-Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor® 568	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)	IFAT 1:500
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	IRDye® 680RD	Ziege	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	ICW 1:1.200 WB 1:20.000
Anti-Maus IgG (H+L)	IRDye® 800CW	Ziege	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)	ICW 1:1.200 WB 1:20.000

WB: *Western Blot*; IFAT: Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test; ICW: *In Cell Western*; Ig: Immunglobulin

3.9 Computerprogramme, Datenbanken und Webapplikationen

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Computerprogramme sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Verwendete Computerprogramme

Programme	Verwendung	Firma
Biometra® BioDoc Analyzer GraphPad Prism	Dokumentation von DNA-Agarosegelen Datensvisualisierung	Biometra (Göttingen, D) GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA)
ImageJ (<i>open source</i>)	Densitometrie	http://imagej.nih.gov/ij/ National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Inkscape (V.0.48.2) (<i>open source</i>)	Erstellung und Bearbeitung von skalierbaren Vektorgrafiken	http://www.inkscape.org/en/ Software Freedom Conservancy, Inc. (New York, USA)
Leica Application Suite AF (V.1.8.2)	Bildgebungsprogramm für das konfokale Mikroskop (Leica SP5)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
LightCycler® Programm	Datenerfassung nach qRT-PCR (Bestimmung Cp-Wert)	Roche (Mannheim, D)
Microsoft® Office Professional 2010	Textverarbeitung (Word) Tabellenkalkulation und Datensvisualisierung (Excel) Präsentation (Power Point)	Microsoft® Corporation (Redmond, USA)
MicroWin 2000	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen	Mikrotek Laborsysteme GmbH (Overath, D)
Odyssey® (V.2.1.12)	Detektion von Infrarot(IR)-Signalen nach Immunblot bzw. ICW	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
REST® (<i>freeware</i>)	Paarweiser Vergleich der qRT-PCR Rohdaten und statistische Analyse	http://www.REST.de.com ¹⁸¹ QIAGEN (Hilden, D)
SigmaPlot™ (V.11)	Statistische Analyse	Systat Software GmbH (Erkrath, D)
Zotero (<i>open source</i>)	Verwaltung von Literaturangaben	http://www.zotero.org/ Roy Rosenzweig Center for History and New Media (Fairfax, USA)

Sequenzvergleiche und andere spezielle Abfragen erfolgten mithilfe der in Tabelle 15 aufgeführten Webanwendungen und der Datenbanken GeneDB, PiroplasmaDB, ToxoDB, CryptoDB, der yeastgenome und der bovinegenome-Datenbank, den Datenbanken des National Center for Biotechnology Informations (NCBI) und der European Biology Laboratories (EMBL).

Tabelle 15: Datenbanken und Webapplikationen

Anwendung	Verwendung	Quelle
BoxShade 3.21	Zum Hervorheben von identischen bzw. von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften nach multiplem Proteinsequenzvergleich	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
ClustalW2	Programm zum multiplen Vergleich von DNA- bzw. Proteinsequenzen	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Pfam	Identifizierung von Proteindomänen und -motiven	http://pfam.sanger.ac.uk/
Phylogeny.fr	Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen	Dereeper <i>et al.</i> 2008 ¹⁸²
UniProt	Datenbank zur Abfrage von Proteincharakteristika	http://www.uniprot.org/
Universal Probe Library Assay Design Center	Abfrage von qRT-PCR Primersequenzen und UPL-Sondensequenzen	http://www.roche-applied-science.com Roche (Mannheim, D)

4 Methoden

4.1 Mikrobiologisches Arbeiten

4.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die *E. coli*-Kulturen wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium (1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Bäckerhefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl) angezogen. Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte die Anzucht in SOC-Medium (*super optimal broth with catabolic repressor*, SOC) (2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose; pH 7,0). Die Selektion von Ampicillin-resistenten Transformanten erfolgte in LB-Medium mit dem Ampicillinanalogon Carbenicillin (Carb; Endkonzentration: 50 µg/ml). Zu den Festmedien wurde zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar gegeben. Die Inkubation der Bakterien auf Festmedium erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Die Flüssigkulturen wurden unter Schütteln im Wasserbad (SW-20C, 160 U/min) bei 37 °C inkubiert.

4.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation

Zur Herstellung kompetenter *DH5α*-Bakterienzellen wurden 100 ml SOC-Medium mit 1 ml Übernachtkultur inokuliert. Anschließend wurden die Bakterien unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600 nm}) von ungefähr 0,3 angezogen (SW-20C, 160 U/min) und daraufhin die Zellen für 5 min bei 4.000 xg pelletiert (GS-6KR). Dann wurde jedes 50 ml Pellet in 15 ml TFBII-Puffer (30 mM KAc; 50 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert und 8 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakteriensuspensionen vereint, bei 4.000 xg zentrifugiert und anschließend die pelletierten Bakterien in 4 ml TFBII-Puffer (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % (v/v) Glycerol; pH 7,0) vorsichtig mit der Pipette resuspendiert. Schließlich erfolgte die Inkubation der Bakteriensuspension im Eis-Wasserbad für 20 min. Danach wurden die kompetenten *DH5α* in 200 µl Portionen aliquotiert, in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert. Eine Portion an *DH5α* genügte für vier Transformationsansätze. Zur Transformation wurden 1-200 ng der Plasmid-DNA bzw. 1/10 Volumen (vol) des Ligationsansatzes auf die gefrorenen *DH5α*-Zellen gegeben und danach der Transformationsansatz für 20 min auf Eis gestellt. Zwischendurch wurde der Ansatz gemischt, abschließend für 45 s bei 42 °C inkubiert und wieder durch eine 2-minütige Inkubation auf Eis abgekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl vorgewärmtem SOC-Medium auf den Ansatz. Die

Bakteriensuspension wurde anschließend bei 37 °C für 1 h unter Schütteln inkubiert (SW-20C, 160 U/min). Darauf folgten das Ausplattieren von 50–100 µl des Transformationsansatzes auf LB Carb Nährboden und die Inkubation über Nacht (üN) bei 37 °C.

4.1.3 Lagerung von *E. coli* Stämmen bzw. Transformanten

Nach Plasmidtransformation wurden die Platten, bedarfsweise, mit einem Parafilmstreifen verschlossen und bei 4 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung erfolgte das Einfrieren der *E. coli*-Bakterienzellen als Glycerol-Kultur bei –70 °C. Dazu wurden die Bakterien in selektivem LB Medium hochgezogen und davon 500 µl mit 500 µl einer 50 %igen (v/v) Glycerol-Lösung vermischt und in ein Kryoröhrchen transferiert.

4.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellen der im Abschnitt 3.6 beschriebenen Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit Belüftungskappen als *monolayer*-Kulturen gehalten. Die Kultivierung erfolgte standardmäßig in einem 37 °C Brutschrank mit 5 % CO₂-Sättigung und 95 % Luftfeuchte (Zellkulturinkubator HERAcell® 150). Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank (ScanLaf Mars safety class 2 bzw. LaminAir® HLB 2472). Zudem fanden ausschließlich sterile Materialien, Medien und Lösungen Verwendung. Dazu wurden die entsprechenden Substanzen, wenn nicht steril erworben, entweder bei 121 °C für 20 min dampfdrucksterilisiert bzw. sterilfiltriert. Die für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Deckgläschen wurden für 4 h bei 180 °C hitzesterilisiert (Hitzesterilisator T 5060 E).

4.2.1 Zellkultivierung

4.2.1.1 Reaktivierung von kryokonservierten Zellen

Zur Vorbereitung der Reaktivierung von kryokonservierten Zellen wurde zunächst ein Zentrifugenröhrchen mit 50 ml komplettiertem RPMI-1640 Medium (20 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS; 100 U/ml Penicillin und Streptomycin; 4 mM L-Glutamin; 1× NEAS; 1 mM Natriumpyruvat; 0,1 mM β-Mercaptoethanol) auf Eis gestellt. Dann wurde das Kryoröhrchen mit den gewünschten Zellen aus dem Stickstofftank geholt, auf Eis transportiert und der Inhalt in das vorgekühlte Medium überführt. Um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen, wurden die Zellen bei 800 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5810 R), der Überstand dekantiert, das erhaltene Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Kompletmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche

gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (Abschnitt 4.2). Nach 12–24 h wurde, abhängig von der Dichte des Zellrasens (Konfluenz), entweder das Medium gewechselt oder die Zellen in eine größere Kulturflasche transferiert.

4.2.1.2 Erhalt der Zellkultur und kontinuierliche Subkultivierung

Die Zellen wurden in komplettiertem U/MINI-1640 Medium (20 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS; 100 U/ml Penicillin und Streptomycin; 4 mM L-Glutamin; 1× NEAS; 1 mM Natriumpyruvat; 0,1 mM β -Mercaptoethanol) unter Standardbedingungen kultiviert. Vitalität und Morphologie der jeweiligen Zellen wurden dabei regelmäßig unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte abhängig von der Konfluenz der adhärennten Zellen 2- bis 3-mal wöchentlich. Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das verbrauchte Medium dekantiert, der Zellrasen mit 1× PBS (154 mM NaCl; 8,03 mM Na_2HPO_4 ; 1,98 mM KH_2PO_4 ; pH 7,2–7,4) gewaschen und schließlich durch die Zugabe kalter 0,02 %iger Versene-Lösung (Biochrom-Stammlösung: 1 % EDTA in Ca^{2+} und Mg^{2+} -freiem 1× PBS) abgelöst. Die vollständige Ablösung der adhärennten Zellen vom Flaschenboden erfolgte nach Schwenken der Kulturflasche bzw. Klopfen an die Flaschenwand. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde anschließend in eine neue Kulturflasche mit frischem Kulturmedium transferiert (Tabelle 16). Bei Bedarf erfolgte vorher eine FKS-Dichtezentrifugation (Abschnitt 4.2.1.4) und Bestimmung der Zellzahl (Abschnitt 4.2.1.3).

Tabelle 16: Subkultivierung von *T. annulata*-infizierten Leukozyten und BoMac-Zellen bei einer Konfluenz von annähernd 90 % und hoher Zellvitalität

Fläche des Flaschenbodens	Versene-Lösung [ml]	Transferierte <i>Ta#173</i> , <i>TaA288</i> und BoMac Zellsuspension [μ l]	Transferierte <i>Ta#868</i> Zellsuspension [μ l]	RPMI-1640 [ml]
25 cm ²	2	100	200	10
75 cm ²	5	250	500	25
175 cm ²	7	350	700	50

4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen, wie im Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben, geerntet, in 1× PBS resuspendiert und, sofern nicht anders angegeben, in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dafür wurden 10 μ l Zellsuspension mit 190 μ l Trypanblaulösung (0,5 % (w/v) Biochrom Stammlösung; 1:3 mit 1× PBS verdünnt) vermischt und davon 10 μ l zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop (Hund) vier Großquadrate ausgezählt. Die abgestorbenen Zellen färbten sich durch Trypanblau dunkelblau.

Die Berechnung der ungefärbten, lebenden Zellen erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen in 4 Großquadraten}}{4} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$

Die verschiedenen Experimente wurden mit einer definierten Zelldichte initiiert.

4.2.1.4 FKS-Inaktivierung und FKS-Dichtezentrifugation

Zunächst wurde das fötale Kälberserum (FKS) bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Dann erfolgte die Inaktivierung durch Inkubation des FKS im Wasserbad bei 56 °C für 30-45 min. Beim Auftauen und bei der Inaktivierung des FKS wurde die Flasche gelegentlich manuell rotiert, abschließend das FKS aufgeteilt und bei –20 °C gelagert. Für die FKS-Dichtezentrifugation wurden die Zellen in 1× PBS mit 30 % (v/v) FKS aufgenommen, für 5 min bei 800 U/min und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5810 R) und danach der Überstand vorsichtig dekantiert.

4.2.1.5 Ernte von Zellen zur Kryokonservierung

Die Zellen wurden, wie im Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben, gewaschen, abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit RPMI-1640 Komplettmedium transferiert. Anschließend wurden das Pellet in 1× PBS resuspendiert, die Zellzahl und Vitalität bestimmt (Abschnitt 4.2.1.3), danach 1×10^7 Zellen in ein 1,5 ml Kryoröhrchen gegeben und erneut bei 1.200 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5810 R). Dann wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (90 % (v/v) FKS; 10% (v/v) DMSO) resuspendiert und graduell eingefroren, d. h. die Proben wurden zunächst in Zellstoff verpackt üN bei –70 °C eingefroren und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff deponiert.

4.2.2 Zellaufbereitung für qRT-PCR und *Western Blot*-Analyse

Zu Beginn eines Experiments wurden einer „Erhaltkultur“ vitale Zellen entnommen und in eine Kulturflasche mit frischem Medium überführt. Dafür wurden die Zellen, wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben, gewaschen und abgelöst. Anschließend folgte eine FKS-Dichtezentrifugation (Abschnitt 4.2.1.4). Nach Resuspension der Zellpellets in 1× PBS und Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden die Zellen entsprechend der Tabelle 17 in frisches Medium gegeben. Zur Bestimmung der mRNA-Expression in *T. annulata*-infizierten Leukozyten unterschiedlicher Passagen wurden die *Ta#868* und *Ta#173*-Zellen unter den Standardbedingungen bei 37 °C für 2 Tage inkubiert. Bei den *TaA288*-Zellen, in denen der Effekt einer chemischen Substanz auf die Expression untersucht wurde, erfolgte die Inkubation der Zellen für 2 Tage bzw. 6 Tage unter den entsprechenden Bedingungen. Gegebenenfalls erfolgte nach drei Tagen entweder eine Passagierung,

wobei alle Zellen in die nächstgrößere Flasche transferiert wurden, oder ein Mediumwechsel.

Wie im Abschnitt 2.7.1 bereits beschrieben wurde, können sich *T. annulata*-Schizonten *in vitro* zu Merozoiten differenzieren und somit Kulturüberstände extrazelluläre Merozoiten enthalten. Um diese in die Analysen mit einzubeziehen, wurden die Zellen im RPMI-1640 Medium mithilfe eines Zellschabers abgetragen, die Zellsuspension in 25 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und anschließend für 10 min bei 20.201 xg und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC-5C Plus). Zum Waschen der Zellen wurde das Zellpellet mit 10 ml 1x PBS resuspendiert und erneut für 10 min bei 20.201 xg und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl auf 1×10^7 /ml eingestellt, 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10 min bei 20.201 xg und 4 °C pelletiert (Eppendorf, 5424 R). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets bei -20 °C (Abschnitt 4.4.1) bzw. -70 °C (Abschnitt 4.3.2.1) eingefroren.

Tabelle 17 Ausgesäte Zellzahl für qRT-PCR und Western Blot

	Zellzahl/Fläche des Flaschenbodens
Ta#868	$4,8 \times 10^5$ /cm ²
Ta#173	$2,4 \times 10^5$ /cm ²
TaA288	$2,4 \times 10^5$ /cm ²

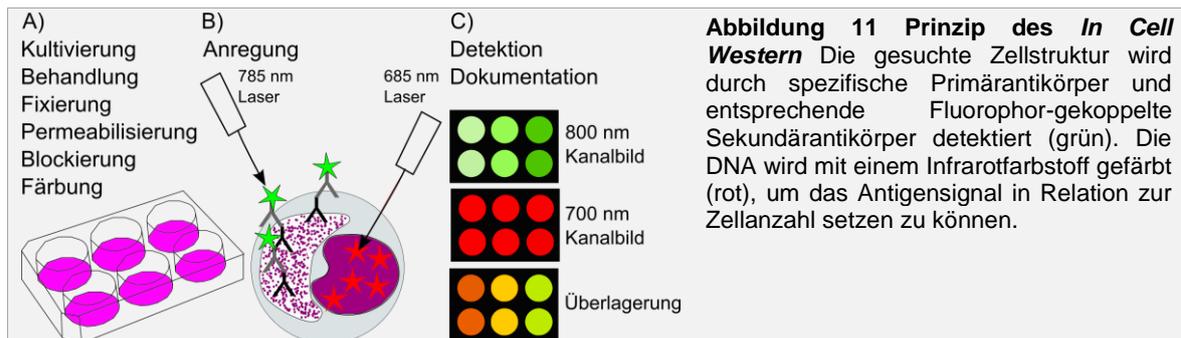
4.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden 24 h vor Ende der chemischen bzw. thermischen Behandlung wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben gewaschen und abgelöst. Nach einer Dichtezentrifugation und Resuspension der Zellen in RPMI-1640 wurde eine bestimmte Zellzahl (2×10^5 Ta#868-Zellen / ml; 1×10^5 TaA288-Zellen / ml) auf ein steriles, zuvor in einer Vertiefung einer 24er Mikrotiterplatte platziertes, Deckgläschen gegeben. Anschließend wurden die Zellen unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen bei 37 °C bzw. 41 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ weiter inkubiert (HERAcell® 150). Nach der Inkubation wurden dem Kulturmedium 1 ml PFA-Lösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS) hinzugefügt. Dadurch lassen sich die adhärenen Zellen auf dem Deckgläschen weitestgehend schonend fixieren. Die Fixierung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Zellpräparate dreimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei RT mit TritonX -100-Lösung (0,25 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS) permeabilisiert. Nach drei erneuten Waschschrritten wurden die Zellen für 30 min bei RT in einer BSA-Blockierungslösung (10 % (w/v) BSA in 1x PBS) inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde der Primärantikörper in einer BSA-Blockierungslösung (5 % (w/v) BSA in 1x PBS), gemäß der Tabelle 12, verdünnt. Nachfolgend wurden 200 µl der Antikörperverdünnung auf die

Zellen appliziert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit 1× PBS gewaschen. Zur Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die anstatt der Primärantikörperlösung lediglich reines Blockierungsreagenz erhielten (Sekundärantikörperkontrolle; 2. AK Kontr.). Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper wurden im Blockierungsreagenz (5 % (w/v) BSA in 1× PBS), gemäß der Tabelle 13; verdünnt. Zusätzlich wurde der DNA-Farbstoff DAPI (finale Konzentration: 1 µg/ml) zu der Lösung gegeben, der Mix auf die Zellen appliziert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Es folgte erneut ein dreimaliges Waschen der Zellen mit 1× PBS. Im Falle einer Doppelfärbung wurde das Zellpräparat in einer zweiten Primärantikörperlösung und nachfolgender Sekundärantikörperlösung inkubiert. Durch die Zugabe einer 2 %igen PFA-Lösung wurden die Zellpräparate für 2 min nachfixiert, die Zellen schließlich ein letztes Mal mit 1× PBS gewaschen und in DABCO Einbettmedium eingeschlossen. Die Betrachtung und Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mithilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops (TCS SP5).

4.2.4 ICW: *In Cell Western*

Die *In Cell Western* (ICW)-Technik erlaubt die Detektion intrazellulärer Proteine und basiert auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. Sie umfasst zunächst die Kultivierung der Zellen unter den zu testenden Bedingungen. Anschließend können die Zellen innerhalb einer Mikrotiterplatte fixiert, permeabilisiert und mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert werden. Die Detektion Fluorophor-tragender Antigen-Antikörper-Komplexe und eines DNA-Farbstoffs kann mittels eines Infrarotscanners erfolgen. Die ICW-Methode ermöglicht die Quantifizierung des Zielproteins relativ zur Zellanzahl. Dieses Verfahren erlaubt einen hohen Probendurchsatz, gibt wenig Hintergrundsignal - zumindest unter Verwendung monoklonaler Antikörper - und kann auf verschiedenste Zelllinien und Zielproteine angewendet werden. Des Weiteren wird die Expression der Zielproteine im zellulären Kontext erfasst und nicht wie bei der *Western Blot*-Methode nach Lysis der zellulären Strukturen, elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der erhaltenen Proteine (Abschnitt 4.4)¹⁸³. Zudem wird im Vergleich zur Immunblotmethode eine geringere Menge an Primärantikörpern benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik zur Observierung verschiedener Differenzierungsmarker von *T. annulata*-infizierten Leukozyten angewendet. Die Funktionsweise des ICW ist in Abbildung 11 dargestellt.



Eine definierte Anzahl von Zellen (Tabelle 18) wurde 24 h vor Ende der Behandlung in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit entsprechendem Medium gesetzt und bei 37 °C bzw. 41 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert (HERAcell® 150). Die folgenden Schritte wurden nach Ende des Behandlungszeitraums bei RT durchgeführt. Zu den Zellen wurde eine PFA-Fixierlösung (4 % (w/v) PFA in 1× PBS) gegeben, sodass sich eine finale Konzentration von 2 % ergab. Darin wurden die Zellen für 10 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Präparate mit 1× PBS wurden die Zellmembranen für 10 min mit einer Tensiden-Lösung (0,25 % (v/v) Triton X-100 in 1× PBS) permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte eine 1½-stündige Inkubation mit dem Blockierungsreagenz (1× Roti®-ImmunoBlock in 1× PBS), um freie Bindungsstellen abzusättigen. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Primärantikörper im Blockierungsreagenz verdünnt und auf die Zellen appliziert. Die verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnungen sind in der Tabelle 12 aufgelistet. Darüber hinaus wurden Sekundärantikörperkontrollen generiert, indem auf die Zellen, an Stelle einer Primärantikörperlösung, das Blockierungsreagenz gegeben wurde. Nach 1 h folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit 1× PBS, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Ein Fluorophor-konjugierter Sekundärantikörper IRDye® 800CW wurde mit dem Blockierungsreagenz gemäß Tabelle 13 verdünnt und zu dieser Lösung zusätzlich der fluoreszierende Kernfarbstoff TO-PRO®-3 Iodid (1 mM Stammlösung in DMSO) im Verhältnis 1:2.500 gegeben. Anschließend wurde der Mix auf die Zellen appliziert und der Ansatz für 1 h im Dunkeln inkubiert. Der Kernfarbstoff diente zur Normierung der Fluoreszenzsignale der detektierten Proteine relativ zur Zellzahl. Schließlich wurden die überschüssigen Sekundärantikörper durch viermaliges Waschen mit 1× PBS entfernt und die Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch trocken geklopft. Die Messung erfolgte mit einem Infrarotscanner (Odyssey®).

Tabelle 18 Ausgesäte Zellzahl für die ICW-Analyse

	Ta#868	TaA288
48er Mikrotiterplatte (Zellen pro well)	2×10 ⁵ /500 µl	1×10 ⁵ /500 µl
96er Mikrotiterplatte (Zellen pro well)	2×10 ⁴ /150 µl	1×10 ⁴ /150 µl

4.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.3.1 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren

4.3.1.1 Isolation genomischer DNA aus Leukozytenzelllinien

Die Isolation der genomischen DNA aus Leukozyten erfolgte mittels des Gentra Purgene DNA Blood Kits von QIAGEN entsprechend der Herstellerangaben. Dazu wurden $1\text{--}2 \times 10^6$ Zellen durch die mitgelieferten Detergenzien aufgeschlossen, danach die Proteine präzipitiert und die mitisolierte RNA verdaut. Abschließend wurde die DNA mittels alkoholischer Fällung präzipitiert und das getrocknete DNA-Pellet in nukleasefreies Wasser aufgenommen.

4.3.1.2 Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion

Für analytische Zwecke, bspw. zur Überprüfung von komplementärer DNA (cDNA), wurde eine Amplifikation von DNA mithilfe der Taq-DNA Polymerase von Peqlab bzw. dem Dream Taq Master Mix von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden nach den Empfehlungen der Hersteller zusammengesetzt und sind in der Tabelle 19 aufgeführt. Als Template wurden 2 μl cDNA bzw. 10–500 ng doppelsträngige DNA eingesetzt. Die Amplifikation fand im Thermocycler unter den in der Tabelle 20 gelisteten Bedingungen statt.

Tabelle 19 Reaktionsansätze für konventionelle PCR

Substanz	Endkonzentration	Hersteller
<i>yield</i> -Reaktionspuffer	1x	Peqlab
<i>enhancer</i> -Lösung	1x	
dNTPs	200 μM	
Primer <i>forward</i>	0,4 μM	
Primer <i>reverse</i>	0,4 μM	
Taq-Polymerase	0,9 U	
DNA	x μl	
Nukleasefreies H ₂ O	ad 35 μl	
Dream Taq Master Mix	1x	Thermo Fisher Scientific
Primer <i>forward</i>	0,3 μM	
Primer <i>reverse</i>	0,3 μM	
DNA	x μl	
Nuklease-freies H ₂ O	ad 33 μl	

Tabelle 20 Temperatur- und Zeitparameter einer konventionellen PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	95	3 min
<u>Amplifikation</u>		
Denaturierung	95	30–45 s
<i>Annealing</i>	x; z. B. 58	30–45 s
Elongation	72	mind. 30 s; bzw. 1 kb/min x 35 Zyklen
Finale Elongation	72	10 min
Kühlung	4	∞

4.3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in einem Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Bestimmung der Größe und Reinheit von DNA-Molekülen (genomische DNA, Plasmid-DNA und PCR-Produkte). Zur Vorbereitung wurden die Proben mit 1/6 vol 6x Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenol-Blau, 40 % (v/v) Glycerol in 1x TBE) versetzt. Während der Gelelektrophorese wurden die Nukleinsäuren im Agarosegel nach ihrer Masse aufgetrennt. Als Elektrolytlösung diente 1x TBE-Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8,0). Je nach erwarteter Größe der Moleküle fanden 0,8–4 %ige Agarosegele Verwendung. Dazu wurden entsprechende Mengen an Agarose in 1x TBE-Puffer aufgeköcht. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde im Agarosegel eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid eingestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 20–45 min bei 75 V. Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden durch ultraviolettes Licht sichtbar gemacht und mit einer Videoanlage dokumentiert. Als Größenmarker dienten die DNA-Leiter GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, GeneRuler™ 50bp Ladder bzw. GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder.

4.3.1.4 Aufreinigung und Einengung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des Gene Jet™ PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der doppelsträngigen DNA wurde bestimmt und diese anschließend kloniert (Abschnitt 4.3.1.5).

4.3.1.5 Klonierung eines PCR-Produktes und Sequenzierung

Die verwendete Taq-Polymerase hatte die Eigenschaft ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende des Amplifikats zu synthetisieren. Dies wurde bei der Klonierung des PCR-Produktes mithilfe des QIAGEN PCR *cloning* Kits ausgenutzt. Der vom Hersteller linearisierte Vektor besitzt am 3'-Überhang ein Desoxyuridin; an diesen Überhang wird das PCR Produkt ligiert. Hierfür wurden zum aufgereinigten PCR Produkt 5 µl 2x Ligation Master Mix und 1 µl pDrive Klonierungsvektor (50 ng/µl) gegeben und der Reaktionsansatz anschließend auf 10 µl mit nukleasefreiem H₂O aufgefüllt. Die Menge des eingesetzten PCR-Produktes richtete sich nach folgender Formel:

$$\text{ng PCR-Produkt} = \frac{\text{Masse pDrive (50 ng)} \times \text{Länge PCR-Produkt (bp)} \times \text{molares Verhältnis (5)}}{\text{Größe pDrive (3851 bp)}}$$

Die Ligationsreaktion erfolgte im Thermocycler zunächst für 2 h bei 4 °C, dann für 12 h bei 16 °C, daran schloss sich die Transformation der ligierten Plasmide in *E. coli* an. Die Selektion wurde auf Carbenicillin haltigen LB-Nährböden mit IPTG (50 µM) und X-Gal (80 µg/ml) im Brutschrank durchgeführt. Das IPTG veranlasst die Bakterien eine gentechnisch modifizierte β-Galaktosidase zu exprimieren und so den

Farbstoff IPTG in ein blaues Produkt umzuwandeln. Nur die selbstligierten Leervektoren erlauben die Synthese des, für die β -Galaktosidase funktionswichtigen, LacZ-Fragmentes. Folglich färbten sich die Bakterienkolonien mit dem Leervektor blau. Die weißen Bakterienklone enthalten im *LacZ*-Gen ein inseriertes DNA-Fragment. Diese Transformanten stellten erfolgreich klonierte Kandidaten dar und wurden folglich gepickt, in 5 ml LB-Selektionsmedium transferiert und üN unter Schütteln bei 37 °C im Wasserbad (SW-20C, 160 U/min) herangezogen. Die Bakterienkultur wurde dann bei 4.000 \times g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und aus dem Bakterienpellet die Plasmid-DNA unter Verwendung des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits isoliert. Die Isolierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Nach Bestimmung der Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde das Plasmid mittels eines Restriktionsverdau auf das inserierte Amplikon überprüft (Abschnitt 4.3.1.6). Das erfolgreich eingebaute PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Eurofins MWG Operon. Dazu wurde die in nukleasefreies H₂O eluierte Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 50–100 ng / 15 μ l eingestellt und anschließend verschickt. Die Sequenzierprimer wurden von der genannten Firma gestellt.

4.3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen wurde nach den Angaben des Herstellers Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Zu analytischen Zwecken wurde maximal 1 μ g DNA einer Plasmidpräparation in einem 20 μ l Ansatz mit 1 U FastDigest® Restriktionsenzym und 2 μ l FastDigest®-Puffer für 1 h bei 37 °C im Heizblock hydrolysiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Hitzeinaktivierung der Enzyme für 5 min bei 80 °C gestoppt. Die Restriktionsprodukte wurden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (Abschnitt 4.3.1.3).

4.3.2 Arbeiten mit Ribonukleinsäuren

4.3.2.1 Isolierung der Gesamtzell-RNA mit dem innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena)

Die Methode beinhaltet den Aufschluss der Zellen mit einem Lysispuffer, der die Isolation intakter Ribonukleinsäure (ribonucleic acid; RNA) gewährleistet und RNasen inaktiviert. Weitere Schritte sind die Entfernung der genomischen DNA über einen Vorfilter, die Bindung der totalen RNA an einen zweiten Filter sowie die Waschung und die Elution der RNA unter Nutzung einer Mikrozentrifuge. Die *Theileria*-infizierten Zellen wurden wie im Abschnitt 4.2.2 beschrieben kultiviert, geerntet und als Zellpellet bei –70 °C gelagert. Schließlich erfolgte die Isolierung der totalen RNA aus 4 \times 10⁶ Zellen gemäß den Herstellerangaben. Hierbei wurden die Zellpellets langsam auf Eis aufgetaut und

anschließend das Pellet durch Antippen des 1,5 ml Reaktionsgefäßes gelöst. Daraufhin erfolgte die Zellyse durch Zugabe von 400 µl RL-Puffer für 5 min bei RT, wobei nach 2 min das Pellet durch Pipettieren vollständig resuspendiert wurde. Die Mischung wurde anschließend auf den Zentrifugenfilter D gegeben und für 2 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Das Filtrat wurde nun mit 70 % (v/v) Ethanol im Verhältnis 1:2 gemischt, auf den Zentrifugenfilter R transferiert und für 2 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Die an den Filter gebundene RNA wurde mit 500 µl HS-Puffer und daraufhin mit 750 µl LS-Puffer durch Zentrifugation gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte dabei jeweils für 1 min bei 10.000 xg. Nach Trockenzentrifugation der Säulen für 3 min bei 10.000 xg wurden 30 µl RNasefreies Wasser auf den Filter gegeben und dieser für 1 min bei RT inkubiert. Schließlich erfolgte die Elution der RNA durch Zentrifugation bei 6.000 xg für 1 min. Nach Messung der RNA-Konzentration (Abschnitt 4.3.3) wurde die RNA bei -70 °C gelagert.

4.3.2.2 DNase I Verdau nach RNA-Präparation

Nach der RNA-Isolation erfolgte der Verdau verbliebener genomischer DNA-Verunreinigungen. Dabei wurde die DNase I von Thermo Fisher Scientific verwendet und die Reaktion, wie in Tabelle 21 dargestellt, angesetzt:

Tabelle 21 Reaktionsansatz für den DNase I Verdau

Bestandteil	Volumen
10x Reaktionspuffer	1 µl
DNase I (1 U/µl)	1 µl
RNA	x µl (≅ 900 ng)
RNasefreies Wasser	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für 1 h bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65 °C ebenfalls im Thermocycler.

4.3.2.3 cDNA-Synthese aus RNA

Für die cDNA-Synthese fand das Revert Aid First™ Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific Verwendung. Nach der DNase I-Behandlung wurden für die reverse Transkription zunächst 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer zum Reaktionsansatz (Tabelle 21) gegeben und für 5 min bei 65°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und die cDNA-Synthese erfolgte für 1 h bei 42 °C. Die Reaktion wurde schließlich durch eine 5-minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Parallel dazu wurden sogenannte RT-Minuskontrollproben generiert, d. h. in den entsprechenden Ansätzen

wurde keine Reverse Transkriptase hinzugefügt. Für die verschiedenen Inkubationsschritte kam ein Thermocycler zum Einsatz. Nach der Synthese wurde die cDNA im Verhältnis 1:3 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und zur Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zuvor wurde die Qualität der cDNA mittels einer konventionellen PCR überprüft (Abschnitt 4.3.1.2).

4.3.2.4 Relative Quantifizierung von mRNA

Die Messung der mittels Reverse Transkriptase in cDNA konvertierten mRNA-Transkripte erfolgte anhand der sogenannten *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Dabei wurden, wie bei einer konventionellen PCR, genspezifische Primer und eine DNA-Polymerase genutzt, um ein bestimmtes *template* zu amplifizieren. Durch den Einsatz eines fluoreszenten Reporters konnte der Verlauf der Amplifikation in Echtzeit verfolgt werden (Abschnitt 3.7.2). Dabei korrelierte die Fluoreszenzintensität mit der Menge des generierten Amplifikats. Damit die Anregung und anschließende Detektion der Fluoreszenz erfolgen konnte, wurden spezielle Mikrotiterplatten und Verschlussfolien der LightCycler[®] 480-Produktreihe von Roche verwendet. Zur Anfertigung des Reaktionsansatzes wurde der LightCycler[®] 480 Probe Master eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in der Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22 Zusammensetzung eines qRT-PCR Ansatzes

Substanz	Volumen [μl]
cDNA <i>template</i>	2
Nukleasefreies H_2O	2,5
Primer <i>forward</i> (10 μM)	0,2
Primer <i>reverse</i> (10 μM)	0,2
UPL-Sonde	0,1
LightCycler [®] 480 Probe Master (2x)	5

Die Amplifikationsreaktion, die Messung der mRNA-Transkriptionsmenge und ein Teil der Auswertung erfolgten anhand des Thermocyclersystems von LightCycler[®] 480 (Abschnitt 4.5.1). Beim Einstellen der zyklusabhängigen Reaktionsbedingungen wurden die Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt (Tabelle 23).

Tabelle 23 Temperatur- und Zeitparameter einer qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit
Initiale Denaturierung	95	10 min
Amplifikation		
Denaturierung	95	10 s
<i>Annealing</i>	58	30 s
<i>Elongation</i>	72	1 s
Kühlung	4	∞

x 35–40
Zyklen

Alle Analysen erfolgten in Duplikaten. Zudem wurden entsprechende RT-Minuskontrollen und eine *no template*-Kontrolle, die nukleasefreies H_2O anstatt cDNA enthielt, mitgeführt. Einige Primerpaare binden innerhalb eines Exons. Dementsprechend wurde eine cDNA

nur zur Analyse verwendet, wenn kein Amplikon in der RT-Minuskontrolle gebildet wurde bzw. wenn die Amplifikation bei dieser Kontrolle erst weitaus später als die cDNA-Amplifikation einsetzte ($\Delta C_p = C_p \text{ Kontrolle} - C_p \text{ cDNA} \geq 20$ Zyklen; C_p : *crossing point*).

4.3.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die DNA-Messung erfolgte photometrisch im BioPhotometer von Eppendorf. Nach der Kalibrierung des Geräts mit ddH₂O als Leerprobe wurden 2 µl DNA zusammen mit 98 µl ddH₂O in eine für Ultraviolett(UV)-Strahlung durchlässige Küvette gegeben und in den Lichtschacht des Messgerätes eingesteckt. DNA und andere Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der DNA ergibt sich nach folgender Formel:

Nukleinsäure [µg/ml] = Optische Dichte ($OD_{260 \text{ nm}}$) × Extinktionskoeffizient × 50 (Verdünnungsfaktor)

1 Unit $OD_{260 \text{ nm}} \triangleq 50 \text{ µg/µl}$ doppelsträngige DNA

1 Unit $OD_{260 \text{ nm}} \triangleq 33 \text{ µg/µl}$ einzelsträngige DNA

1 Unit $OD_{260 \text{ nm}} \triangleq 40 \text{ µg/µl}$ einzelsträngige RNA

Proteinkontaminationen und phenolische Verunreinigungen im Isolat zeigen Absorptionen bei 280 nm, einige Salzkontaminationen können Absorptionen bei 230 nm aufweisen. Reine DNA hat einen $A_{260}/280 \text{ nm}$ -Quotienten von $1,8 \pm 0,1$; reine RNA einen Quotienten aus $A_{260}/280 \text{ nm}$ von $2,0 \pm 0,1$ und beide Nukleinsäuren ergeben einen $A_{260}/230 \text{ nm}$ -Quotienten von 1,8–2,2.

Die RNA-Quantifizierung erfolgte bei 260 nm mit dem NanoDrop-Photometer von Thermo Fisher Scientific. Hierzu wurden 2 µl auf die Probenhalterung gegeben und gegen die Wasserkontrolle gemessen. Es wurde überprüft, ob die Messwerte der Proben folgende Werte ergaben:

- RNA-Konzentration: mindestens 500 ng/µl
- $A_{260}/280 \text{ nm}$ - Quotient: 1,9–2,1
- $A_{260}/230 \text{ nm}$ - Quotient: 1,8–2,2

4.4 Arbeiten mit Polypeptiden

4.4.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus *T. annulata*-infizierten Zellen

Zur Herstellung der Zellextrakte für die *Western Blot*-Analysen wurden zunächst 5×10^6 *T. annulata*-infizierte Zellen pelletiert und in 100 µl ddH₂O resuspendiert. Der

Zellaufschluss erfolgte in einem Ultraschallwasserbad (Sonorex RK 102), viermal für 1 min, unter Abkühlung des Ansatzes jeweils für 1 min auf Eis. Die Zelltrümmer wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 20.800 $\times g$ und 4 °C präzipitiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot zur Proteinbestimmung (Abschnitt 4.4.2) eingesetzt. Das restliche Gesamtzellproteinlysate wurde mit 4 \times SDS Probenpuffer (Endkonzentration: 62,5 mM Tris; 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8) versetzt und bei 95 °C für 5 min im Heizblock (Thermomixer 5436 compact) aufgeköcht. Sofern das Lysat nicht unmittelbar gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde, erfolgte eine Lagerung der denaturierten und reduzierten Proteine bei 4 °C.

4.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry mittels des Bio-Rad DC™ Protein Assays. Für die Farbreaktion wurden 5 μ l der zu testenden Probe in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte (Costar®) pipettiert und dann 25 μ l Reagent A und 200 μ l Reagent B zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min im Dunkeln bei RT. Danach wurde die OD_{550 nm} anhand des Expert 96-Detektionsgerätes eingelesen. Die Messung des Proteingehalts erfolgte dabei gegen eine BSA-Eichkurve, die sich von 0,04–0,4 μ g/ μ l erstreckte. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde reines Wasser eingesetzt. Die BSA-Standardlösungen sowie der Nullwert wurden dreifach bestimmt, die zu testenden Proteinverdünnungen zweifach. Die Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte anhand der BSA-Absorptionswerte durch die Umrechnung der Proben-Absorptionswerte mithilfe einer linearen Regressionsgleichung unter Beachtung der eingesetzten Verdünnung (Microwin V.4.2.).

4.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte nach dem von Laemmli beschriebenen Prinzip der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)¹⁸⁴. Dazu wurde ein Gel aus Polyacrylamid verwendet, bestehend aus einem 3 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel. Zur Herstellung des Sammelgels wurde ein 4-fach konzentrierter Sammelgelpuffer (500 mM Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8) und des Trenngels ein 4-fach konzentrierter Trenngelpuffer (1,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8) eingesetzt. Das Sammelgel wurde auf eine einfache Konzentration mit ddH₂O unter Berücksichtigung der zu zugegebenen

Acrylamid / Bisacrylamid-Gellösung (30 % (v/v)) eingestellt und zusätzlich mit Pyronin Y angefärbt, um die Geltaschen besser sichtbar zu machen. Die Polymerisation des Polyacrylamid(PAA)-Gels erfolgte mit einer Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (finale Konzentration: 10 % (v/v)) nach Zugabe von TEMED auf eine Endkonzentration von 0,08 % (v/v) und von APS auf 0,8 % (v/v). Nach der Polymerisation wurde das SDS-PAA-Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingebaut und mit 1× Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3) befüllt. Anschließend wurden die in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekochten Proben aufgetragen. Als Laufstandard dienten 3 µl des Markers Page Ruler Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific. Letztendlich erfolgte die elektrophoretische Auftrennung zunächst für 5 min bei einer Spannung von 50 V, dann für 10 min bei 100 V und schließlich für 60 min bei 200 V. Die maximale Stromstärke während dieses Prozesses betrug 300 mA.

4.4.4 Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen

Die Rohextrakte des Gesamtzellproteins wurden auf Anzeichen einer möglichen Degradation untersucht. Dazu erfolgte zur Visualisierung der Proteine eine Coomassie-Färbung mittels der PageBlue Proteinfärbelösung entsprechend den Herstellerangaben.

4.4.5 Proteintransfer mittels eines *Tank Blot-Systems*

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Rohextraktproteine erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine synthetische Membran, um die Zielproteine anschließend immunologisch nachzuweisen. Nach Auslösung des SDS-PAA-Gels und Entfernung des Sammelgels wurde das Trenngel zusammen mit einer 0,2 µm dicken Nitrocellulose(NC)membran, zwei Lagen Immunblotpapier und zwei Schwämmen in die Transferkassette eingelegt. Dann wurde die Kassette in die mit 1× Transferpuffer (0,1 % (w/v) SDS; 150 mM Glycin; 20 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) gefüllte Immunblotapparatur eingebaut und die gesamte Apparatur in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gestellt. Damit der Transfer bei niedrigen Temperaturen für 12 h bei 100 mA und bei einer maximalen Spannung von 25 V erfolgen konnte.

4.4.6 Ponceau S Färbung

Nach dem Proteintransfer auf die NC-Membran erfolgte eine reversible Färbung der immobilisierten Proteine durch eine gebrauchsfertige Ponceau S-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S; 5,0 % (w/v) Essigsäure). Zur Färbung wurde die NC-Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung bei RT auf dem Kippschüttler inkubiert und anschließend mit ddH₂O abgespült. Mithilfe der Färbung wurde überprüft, ob die Auftrennung als auch

der Transfer der Proteine erfolgreich war. Des Weiteren konnte abgeschätzt werden, ob die Geltaschen gleichmäßig beladen wurden. Anschließend wurde die Membran durch die dreimalige Inkubation in frischem 1× TBS (10 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5) für 5 min bei RT gewaschen.

4.4.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (*Western Blot-Analyse*)

Unter geeigneten Bedingungen bleibt die Immunreaktivität der auf einer NC-Membran immobilisierten Proteine erhalten, sodass bestimmte Proteine anhand Antigen-spezifischer Antikörper identifiziert und quantifiziert werden können. Dazu wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt, indem die Membran für 1 h im Blockierungsreagenz (1× Roti[®]-ImmunoBlock in 1× TBS) auf dem vertikalen Schüttler (Rocking Platform WT15) bei RT inkubiert wurde. Daraufhin wurde die Membran zweimal mit 1× TBST (0,1 % (v/v) Tween[®]20 in 1× TBS) und einmal mit 1× TBS für jeweils 10 min gewaschen. Die Antigenbindung erfolgte anschließend durch Inkubation der Membran mit einer Primärantikörperlösung 1:1000 bei 4 °C auf dem vertikalen Schüttler. Die Primärantikörper wurden dafür, gemäß der Tabelle 12, im Blockierungsreagenz verdünnt und danach die ungebundenen Primärantikörper durch Waschen der Membran entfernt. Der Waschschriff beinhaltete erneut eine zweimalige Inkubation der Membran in 1× TBST und eine einmalige Inkubation in 1× TBS. Nach der Verdünnung der IRDye[®]-Sekundärantikörper im Blockierungsreagenz gemäß der Tabelle 13 wurde die Lösung auf die Membran appliziert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 45 min bei RT auf dem vertikalen Schüttler. Daraufhin wurde die Membran dreimal mit 1× TBST und einmal mit 1× TBS für jeweils 10 min gewaschen. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Infrarotscanner (Odyssey[®]) verwendet.

4.5 Handhabung von Daten und statistische Auswertung

4.5.1 Auswertung von qRT-PCR-Daten

Um Rückschlüsse auf die Startmenge des cDNA *templates* und somit auf die mRNA-Expression ziehen zu können, wurde der sogenannte *crossing point* (Cp) mithilfe des LightCycler[®] 480-Programms (*second derivative maximum*-Methode) ermittelt¹⁸⁵. Der Cp-Wert beschreibt den Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Je weniger cDNA im Reaktionsansatz enthalten war, umso höher war der Cp-Wert, da mehr PCR-Zyklen benötigt wurden, damit die Intensität des Fluoreszenzsignals des Amplifikats das Signalrauschen überschreitet. Neben der Zielgen-PCR wurde für alle Proben eine PCR für ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen

(*housekeeping gene*) durchgeführt. Die Cp-Werte (Rohdaten) wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und daraufhin wurden mittels Tabellenkalkulation die relative Expression des Zielgens bestimmt, unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Cp}$ -Methode nach Livak und Schmittgen *et al.* 2001. Bei dieser Analyse wird von einer optimalen PCR-Effizienz ausgegangen, d. h. für die exponentielle Phase der PCR wurde eine exakte Verdopplung des Amplifikats angenommen¹⁸⁶.

$$\Delta\text{Cp} = \text{Cp Zielgen} - \text{Cp Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Cp} = \Delta\text{Cp (Fallgruppe)} - \Delta\text{Cp (Kontrollgruppe)}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$$

Nach Berechnung der Mittelwerte der einzelnen Zielgenexpressionswerte und der dazugehörigen Standardabweichungen (Standardabweichung; StdAbw) wurden die Ergebnisse, sofern nicht anders angegeben, in einem Säulendiagramm grafisch dargestellt. Für die statistische Analyse fand das Computerprogramm REST[®] (*Relative Expression Software Tool*) Verwendung, das auf einem renommierten und von einer Normalverteilung unabhängigen Algorithmus basiert. Das statistische Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,05$ ¹⁸¹.

4.5.2 Densitometrische Auswertung

Für die Quantifizierung der Farbdichte von Proteinbanden auf Immunblots kam das Programm ImageJ zum Einsatz. Bestimmt wurde die Menge an Pixeln pro Zielprotein- bzw. Haushaltsproteinbande, wobei das Hintergrundsignal der Membran subtrahiert wurde. Anschließend wurde die relative optische Dichte des Zielproteins bestimmt, indem die Pixelmenge des Zielproteins durch die Pixelmenge des Haushaltsproteins dividiert wurde.

4.5.3 Auswertung der *In Cell Western*-Daten

Die Signalerfassung beim ICW erfolgte mittels des Odyssey[®] Classic Infrarotscanners. Dabei wurden zur Datenerfassung folgende Parameter eingestellt: Resolution: 169 μm ; Fokus: 3,0; Qualität: medium; Intensität: 5/5. Die Anregung der infraroten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte über zwei Dioden-Laser bei 785 nm und 685 nm. Die resultierende Detektion der Emission fand über zwei Kanäle statt. Dabei gab die Emission bei 800 nm das Signal des Primärantikörper-Sekundärantikörper-Fluorophor-Komplexes und die Emission bei 700 nm das Signal des DNA-Farbstoffs wieder. Beide Signale wurden getrennt über ein Flächenraster mittels des Odyssey[®] 2.1 Programms quantifiziert

und die so erhaltenen Rohdaten in Excel transferiert. Zur Berechnung der relativen Zielproteinfluoreszenz wurden das Fluoreszenzsignal der Sekundärantikörperkontrolle vom Antigen-Antikörper-Fluoreszenzsignal subtrahiert und anschließend die Werte durch das DNA-Signal dividiert^{187,188}.

4.5.4 Statistische Analysen

Die nach *Western Blot*-Analyse oder ICW-Analyse erhaltenen Werte wurden als arithmetisches Mittel gemeinsam mit der Standardabweichung grafisch dargestellt. Zur Erstellung der Balkendiagramme wurde das Excel-Programm verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe der Computeranwendung SigmaPlot™ 11.0. Zunächst wurden dabei die Messwerte auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) überprüft. Waren die Stichproben der Gruppen normalverteilt, so wurden unter Verwendung des ungepaarten Student'schen t-Tests die Mittelwerte von Interesse verglichen, um signifikante Differenzen zu identifizieren. Wurden die Kriterien einer Normalverteilung nicht erfüllt, so erfolgte die statistische Analyse mithilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests. In beiden Fällen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ toleriert und signifikante Unterschiede wurden entsprechend folgender Definitionen gekennzeichnet:

- $p \leq 0,05$; signifikant *
- $p \leq 0,01$; sehr signifikant **
- $p \leq 0,001$; höchst signifikant ***

5 Ergebnisse

5.1 Bioinformatische Analyse von *Theileria annulata* Histondeacetylasen

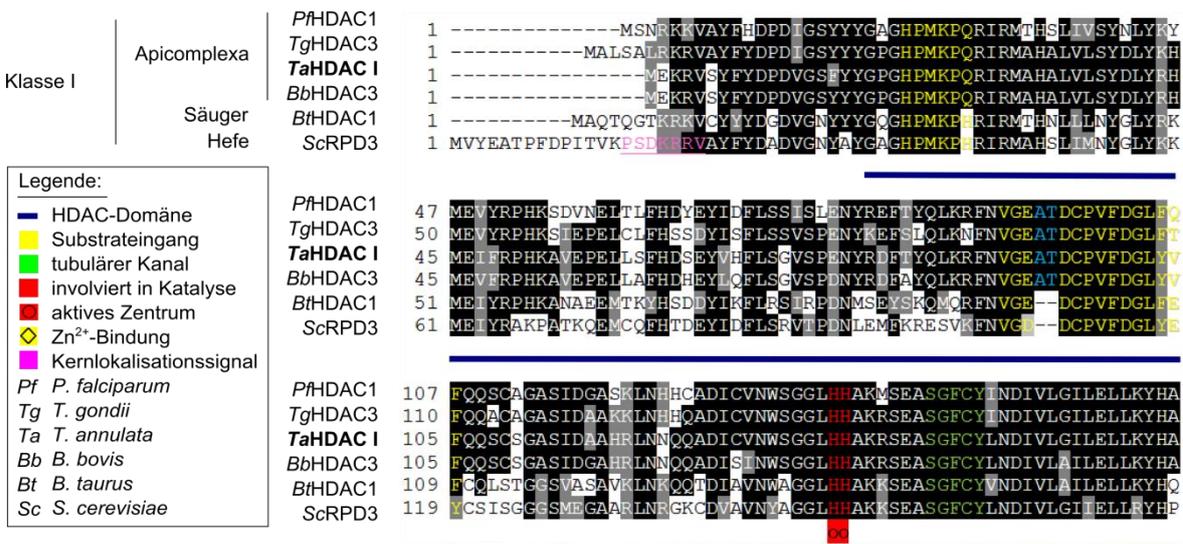
Im Abschnitt 2.8.4 wurde die Nicotinamidadenindinukleotid-Ion(NAD^+)-abhängige Histondeacetylase (HDAC) von *T. annulata* vorgestellt (*TaSIR2*; Akzessionsnummer: TA20415). Die Datenbank von *T. annulata* (geneDB)¹⁸⁹ weist drei weitere putative HDACs auf (Akzessionsnummern: TA12690, TA18230, TA17590), die bisher nicht näher beschrieben sind. Um diese zu klassifizieren und ihre Funktion und Lokalisation beurteilen zu können, wurden die vorhandenen *T. annulata* HDAC-Aminosäuresequenzen mit den Aminosäuresequenzen anderer Apicomplexa HDACs der entsprechenden *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) HDACs und einiger boviner HDACs unter Zuhilfenahme des Onlineprogrammes ClustalW2 vergleichend angeordnet. Anschließend wurden Domänensequenzen sowie konservierte und funktionale Aminosäurereste mit den Datenbanken Pfam, UniProt und der Webanwendung PSORTII prognostiziert. Ergänzend dazu wurden die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Aminosäuren bzw. Motive in die Analyse mit einbezogen.

5.1.1 Zink(II)-Ionen-abhängige HDAC von *T. annulata*

Die putativen HDACs mit den Akzessionsnummern TA12690, TA18230 und TA17590 konnten durch die Verwendung der BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)-Webapplikation in das Klassifizierungssystem der HDAC eingeordnet werden. Die Analyse zeigte, dass alle drei putativen HDACs zu den Zn^{2+} -abhängigen HDACs gehören. Dabei konnte die HDAC mit der Akzessionsnummer TA12690 der Klasse I zugeordnet werden, d. h. sie wies homologe Sequenzen zur HDAC RPD3 der Bäckerhefe auf. Wohingegen die HDACs mit den Akzessionsnummern TA18230 und TA17590 in ihren Sequenzen ähnliche Abschnitte zu der Sequenz der Bäckerhefe HDAC HDA1 aufzeigten und somit der Klasse II zugeordnet werden konnten. Da diese HDACs in der geneDB-Datenbank nicht spezifisch benannt wurden, erfolgt die Bezeichnung der putativen HDACs entsprechend ihrer Klassenzugehörigkeit in dieser Arbeit als *TaHDAC I* (römisch I für Klasse I) und *TaHDAC II* (römisch II für Klasse II). *T. annulata* verfügt über zwei putative HDACs der Klasse II, deshalb wurde diesen jeweils ein weiteres Abkürzungszeichen hinzugefügt, um diese Enzyme unterscheiden zu können (Abschnitt 5.1.1.2).

5.1.1.1 Charakterisierung der *T. annulata* HDAC der Klasse I: TaHDAC I

Das aus der Kodierungssequenz übersetzte Polypeptid TaHDAC I besteht aus 446 Aminosäuren (*amino acid*; aa) und weist eine konservierte putative HDAC-Domäne der Klasse I auf. Diese konnte anhand von übereinstimmenden Abschnitten zu anderen Apicomplexa HDACs, zur Bäckerhefe RPD3 und zur Säuger HDAC1 mithilfe der erwähnten Datenbanken und von Veröffentlichungen von Salvador und Luesch 2012 und Smith und Denu 2009^{190,191} näher charakterisiert werden. Die katalytischen Aminosäuren bekannter HDACs der Klasse I befinden sich am Boden einer Proteintasche, zu der ein tubulärer Kanal hinführt. Die Aminosäuren, die den Rand dieses Tubus bilden, können von HDAC zu HDAC verschieden sein und tragen zur Substraterkennung bei. Anhand des Vergleichs der *T. annulata* TA12690 Proteinsequenz mit der Säuger HDAC1 konnten in der TaHDAC I-Sequenz Bereiche identifiziert werden, die zum Eingang der Substrattasche, zum Tubus und zum katalytischen Zentrum gehören. Diese Bereiche wurden in der Abbildung 12 farblich hervorgehoben. Die TaHDAC I Aminosäuren, die wahrscheinlich im Tubusrand zu finden sind, sind mit den entsprechenden Aminosäuren der Säuger HDAC1 nahezu identisch. Auffällig ist jedoch eine Insertion von zwei Aminosäuren (Alanin 93; Threonin 94). Des Weiteren konnten drei Aminosäuren identifiziert werden, die vermutlich das für die Katalyse notwendige Zink(II)-Ion(Zn²⁺) binden. Es handelt sich hierbei um zwei Aspartate und ein Histidin innerhalb des Zn²⁺-Bindungsmotivs DXHX₈₂₋₉₀D. Zusätzlich konnte eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*; NLS) in der TaHDAC I prognostiziert werden. Das Ausmaß der TaHDAC I Sequenzidentität zur BbHDAC3 beträgt 83 %, zur TgHDAC3 74 %; zur PfHDAC1 72 %, zur Bäckerhefe RPD3 56 % und zur bovinen HDAC8 42 % (Anhang 9.1.1).



Legende:

- HDAC-Domäne
- Substrateingang
- tubulärer Kanal
- involviert in Katalyse
- aktives Zentrum
- Zn²⁺-Bindung
- Kernlokalisationssignal

Pf *P. falciparum*
Tg *T. gondii*
Ta *T. annulata*
Bb *B. bovis*
Bt *B. taurus*
Sc *S. cerevisiae*

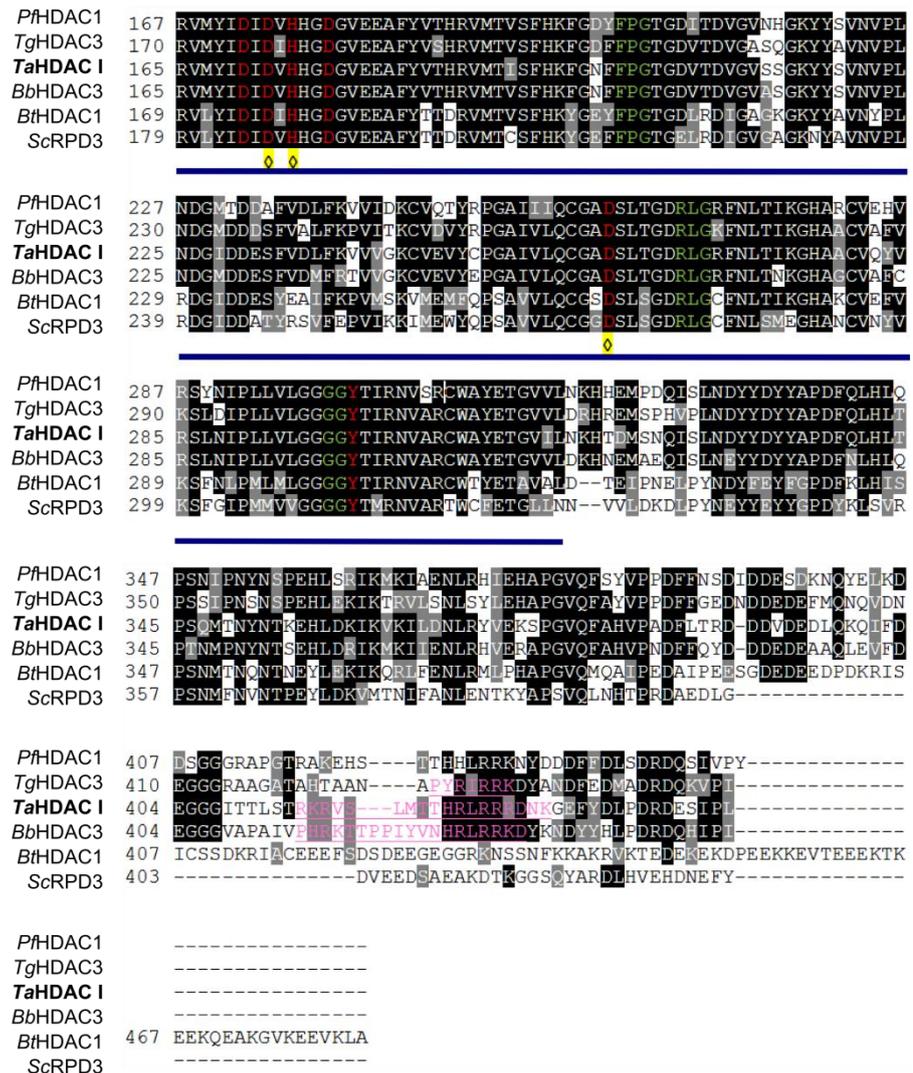
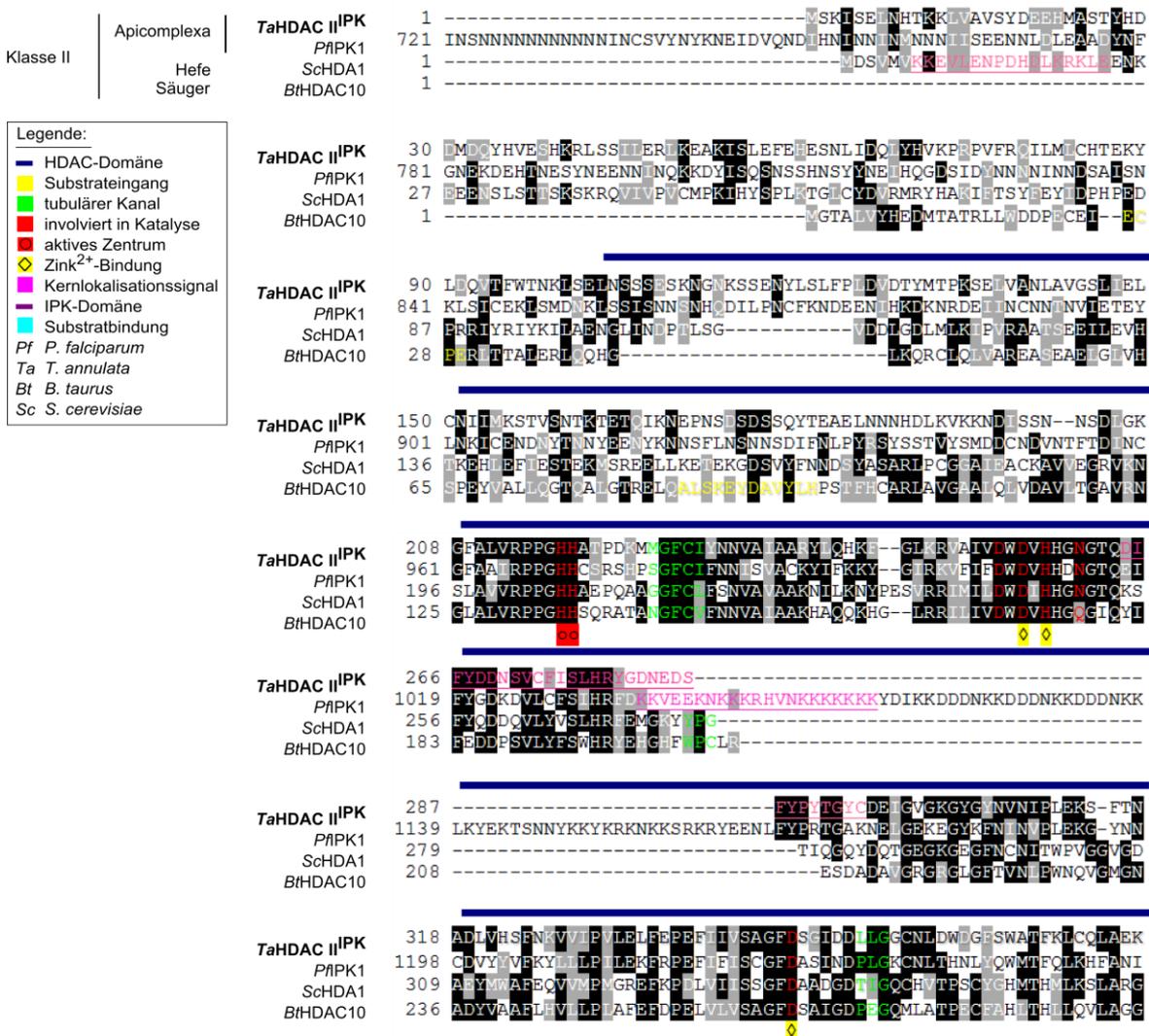


Abbildung 12 Theileria annulata HDAC der Klasse I – TaHDAC I Der Vergleich von Proteinsequenzen einiger Apicomplexa HDACs der Klasse I, der Bäckerhefe RPD3 und der bovinen HDAC1 erfolgte mithilfe der Onlineanwendung ClustalW2. Die konservierten Aminosäuren wurden mit schwarz und Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften mit grau mittels der Webapplikation Boxshade hervorgehoben. Die putative HDAC-Domäne der TaHDAC I wurde dunkelblau unterstrichen. Die grünen Bereiche geben Aminosäurepositionen an, die bei der Säuger HDAC1 im Tubus zu finden sind, der zum aktiven Zentrum der HDAC-Domäne führt (rot markiert). Die gelben Rauten zeigen Aminosäurereste an, die in die Bindung des Kofaktors Zn²⁺ involviert sind. Die mit einem roten Kreis markierten Histidine stellen das aktive Zentrum der Säuger HDAC1 dar. Die hellblaue Markierung zeigt eine für Apicomplexa charakteristische Insertion von zwei Aminosäuren innerhalb des Bereiches an, die im Tubusrand (gelb hinterlegt) lokalisiert sein könnte¹⁶⁶. In pink hervorgehoben wurden prognostizierte Kernlokalisierungssignale (PSORT II). Für diesen multiplen Sequenzvergleich wurden folgende Aminosäuresequenzen benutzt: *PfHDAC1* (PF11260C); *TgHDAC3* (TGME49_227290); *TaHDAC I* (TA12690); *BbHDAC3* (BBOV_II1011020); *ScRPD3* (YNL330C); *BtHDAC1* (NP_001032521.1).

5.1.1.2 T. annulata HDAC der Klasse II: TaHDAC II^{IPK} und TaHDAC II^{ANK}

Die bioinformatische Analyse der *T. annulata* HDAC-Vertreter der Klasse II ergab, dass beide neben der HDAC-Domäne eine weitere mögliche Proteindomäne bzw. weitere Motive enthalten. Die *T. annulata* HDAC mit der Akzessionsnummer TA18230 weist N-terminal eine putative HDAC-Domänensequenz und C-terminal eine vermeintliche Inositolphosphat-Kinase(IPK)-Domänensequenz auf und wird deswegen in dieser Arbeit als TaHDAC II^{IPK} bezeichnet. Die aus der kodierenden Sequenz abgeleitete 878 aa lange TaHDAC II^{IPK}-Proteinsequenz weist Aminosäurereste auf, die für eine HDAC-Aktivität

relevant sein könnten. Es konnten drei Zn²⁺-Bindungsstellen und ein katalytisches Zentrum prognostiziert werden. Die Prognose erfolgte durch den Vergleich der TaHDAC II^{IPK} mit der Bäckerhefe HDA1 und der Säuger HDAC10 unter Verwendung der UniProt-Datenbank und den Angaben von Salvador und Luesch 2012 und Smith und Denu 2009^{190,191}. Wie der Abbildung 13 entnommen werden kann, sind Bereiche der Aminosäuresequenzen zueinander identisch bzw. weisen Aminosäurereste mit vergleichbaren Eigenschaften auf. Die Gesamtsequenz der TaHDAC II^{IPK} stimmt dagegen nur zu 17 % mit der bovinen HDAC10, zu 16 % mit der Bäckerhefe HDA1 und zu 12 % mit der PfPK1 überein (Anhang 9.1.1). Des Weiteren konnte eine putative Kernlokalisationssequenz in der TaHDAC II^{IPK}-Sequenz lokalisiert werden. Ein Teil der TaHDAC II^{IPK} Sequenz weist zur Säuger Inositolhexakisphosphat-Kinase 3 (IP6K3) übereinstimmende Bereiche auf. In diesen konnten für die katalytische Aktivität der IPK-Domäne vermutlich essenzielle Aminosäuren und Aminosäuren, die für die Substratbindung wichtig sein könnten, ausgemacht werden.



Legende:

- HDAC-Domäne
- Substrateingang
- tubulärer Kanal
- involviert in Katalyse
- aktives Zentrum
- Zink²⁺-Bindung
- Kernlokalisationssignal
- IPK-Domäne
- Substratbindung

Pf *P. falciparum*
 Ta *T. annulata*
 Bt *B. taurus*
 Sc *S. cerevisiae*

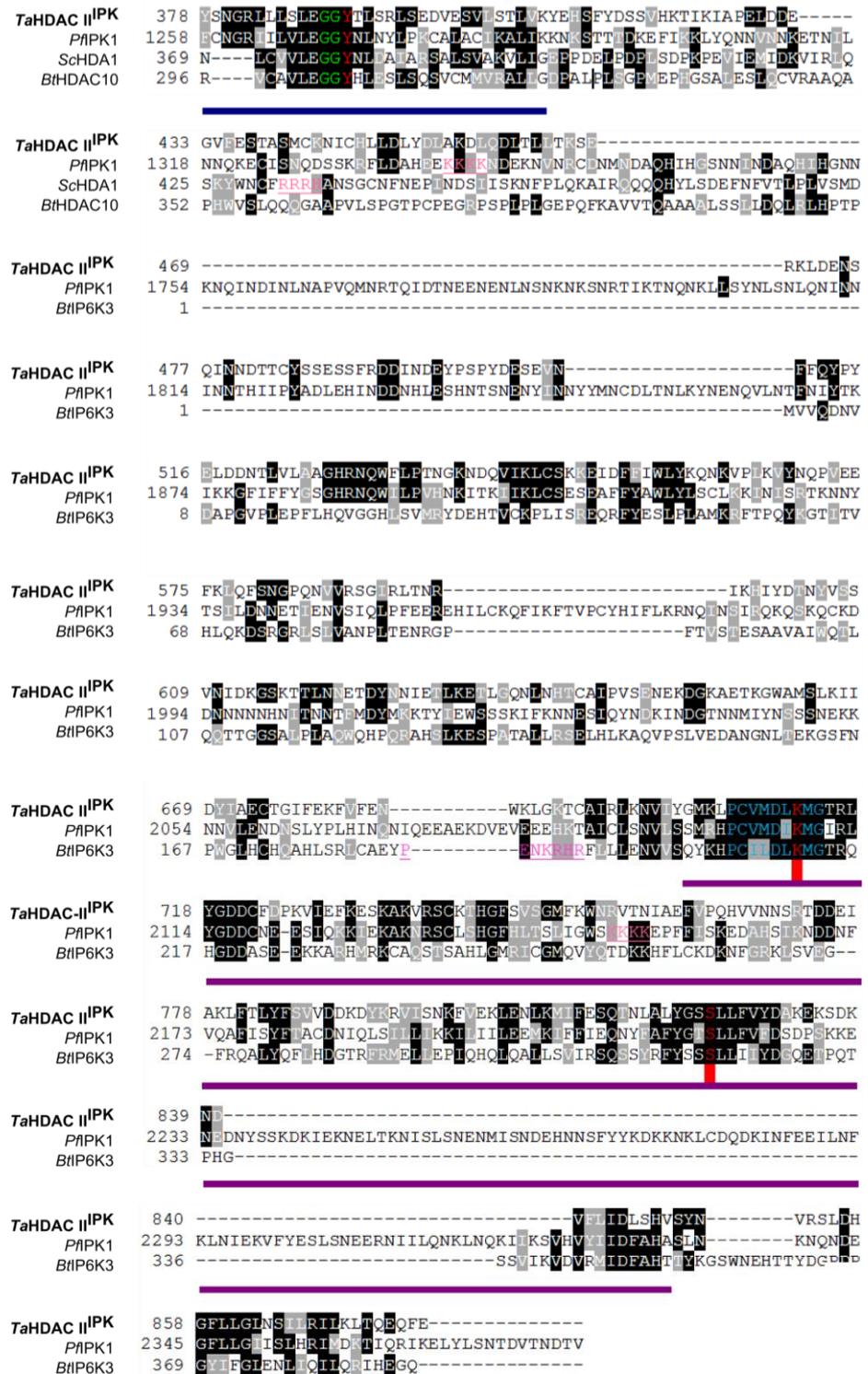
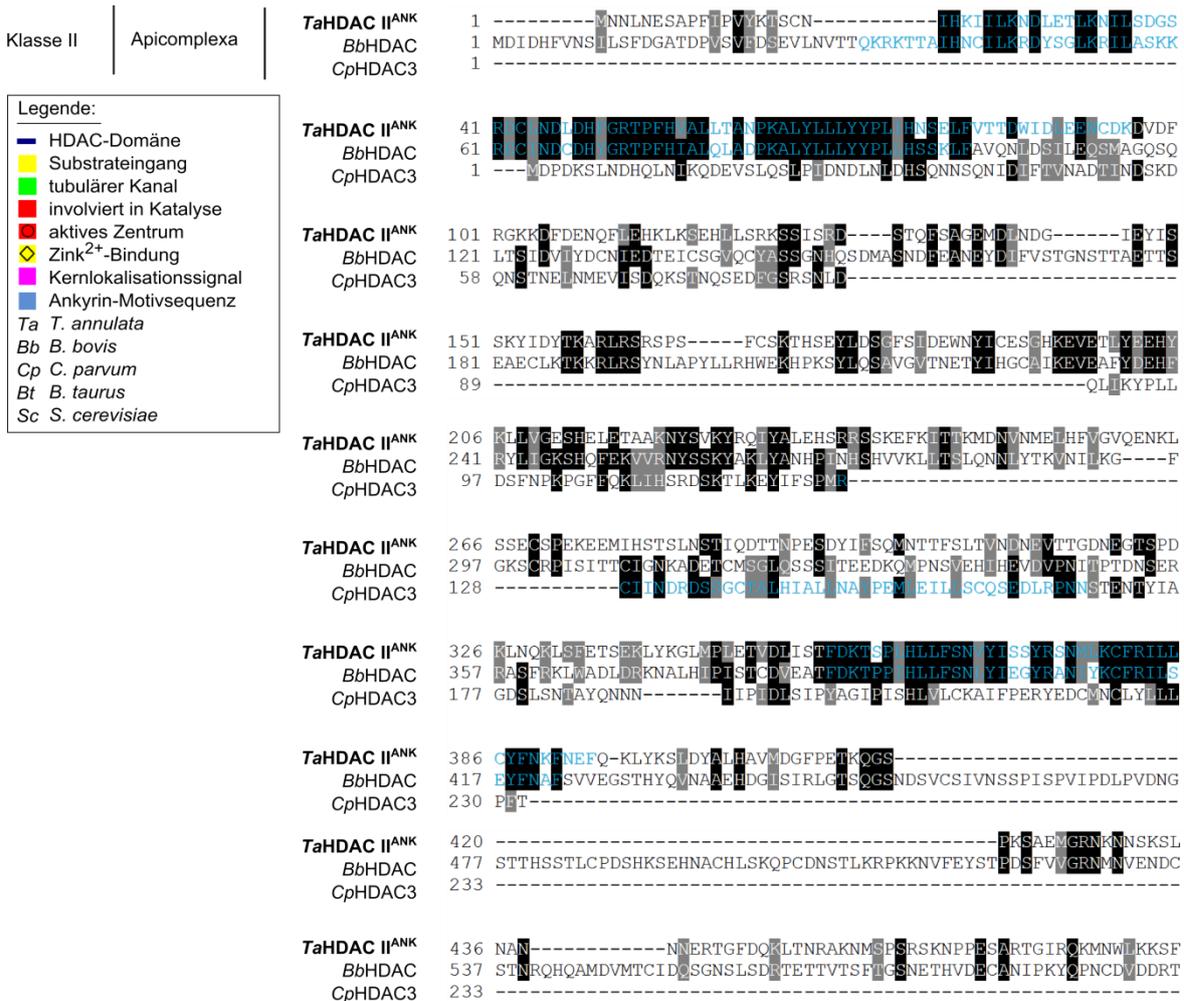


Abbildung 13 Theileria annulata HDAC der Klasse II – TaHDAC II^{IPK} Der Vergleich von Proteinsequenzen zweier Apicomplexa HDACs der Klasse II, der Bäckerhefe HDA1, der bovinen HDAC10 und der bovinen IP6K3 erfolgte mithilfe des Webprogrammes ClustaW2. Die identischen Aminosäuren wurden mittels Boxshade Webapplikation durch eine schwarze Markierung und ähnliche in grau hervorgehoben. Der dunkelblau unterstrichene Bereich stellt die putative HDAC-Domäne der TaHDAC II^{IPK} dar. Die gelb gekennzeichneten Bereiche gehören bei der Säuger HDAC10 zum Substrateingang und die grün markierten Aminosäuren gehören zum Tubus, der zum aktiven Zentrum führt. Für die Katalyse wichtigen Aminosäuren wurden mit rot hervorgehoben. Die gelben Rauten zeigen Aminosäurenpositionen an, die für die Bindung des Kofaktors Zn²⁺ relevant sind. Die mit einem roten Kreis markierten Histidine kennzeichnen in der Säuger HDAC10 das aktive Zentrum. Der hellblau markierte Bereich der IPK-Domäne dient eventuell der Inositolpolyphosphat-Bindung. Die Kernlokalisierungssequenzen wurden in pink hervorgehoben. Für diesen multiplen Sequenzvergleich wurden folgende Proteinsequenzen verwendet: PfIPK1 (PF10_0078); TaHDAC II^{IPK} (TA18230); ScHDA1 (YNL021W); BtHDAC10 (XP_005207569.1); BtIP6K3 (AAI40545.1).

Die Analyse der *T. annulata* HDAC-Proteinsequenz mit der Akzessionsnummer TA17590 ergab, dass N-terminale Sequenzen teilweise den Proteinsequenzen der *ankyrin repeat*(ANK)-Familie ähneln. Ein nachfolgender Sequenzabschnitt gleicht der HDAC-Domäne der Bäckerhefe HDA1. Zur besseren Übersicht wurde deswegen diese HDAC als *Ta*HDAC II^{ANK} bezeichnet. Aus der Kodierungssequenz des *Ta*HDAC II^{ANK}-Gens ergab sich eine 1598 aa lange Proteinsequenz, in deren putative HDAC-Domäne drei Zn²⁺-Bindestellen, eine aktive Stelle und mehrere Tubus formende Bereiche lokalisiert werden konnten (Abbildung 14). Die Analyse erfolgte durch den Vergleich der *Ta*HDAC II^{ANK} mit der Hefe HDA1 und der Säuger HDAC6 anhand kurzer, aber übereinstimmender Sequenzabschnitte. Die Gesamtsequenz der *Ta*HDAC II^{ANK} zur bovinen HDAC6 ist jedoch lediglich zu 14 % und zur Bäckerhefe HDA1 zu 7 % identisch. Die Sequenzen der aufgezeigten Apicomplexa HDACs sind einander ähnlicher. Das Ausmaß der *Ta*HDAC II^{ANK} Identität zur *B. bovis* HDAC der Klasse II beträgt 38 % und zur *Cp*HDAC3 21 % (Anhang 9.1.1). Darüber hinaus konnte innerhalb der *Ta*HDAC II^{ANK} eine putative Kernlokalisationssequenz identifiziert werden.



		TaHDAC II^{ANK}	484	NDGKRSMKDDFNDFENGKROKKYGSQGLNYPNNTLCSDFLGMETLDGRMNELINCNSNT
		<i>Bb</i> HDAC	597	LSDKNVFATNARLNPSVITITKTVCSQDVETMGNSTKLRGIGAFGDVAGLPSKNKWHSSSE
		<i>Cp</i> HDAC3	233	-----
		TaHDAC II^{ANK}	544	QTSNESDSIGPYDECFLRSNDLHKMMTSFTLWKKPKASWETFTIKDRDFRSTILLHVCVTK
		<i>Bb</i> HDAC	657	DISTNSSDPSICQFDQKVLSDTIWASSKWLKETHHNRFINSRDSTESNILLHVCVTK
		<i>Cp</i> HDAC3	233	-----LTHGTSQNVSWLD-----LNATDQLGTHALHLACSFQ
		TaHDAC II^{ANK}	604	EINNVLLILASGFSFVVNETIGDMPHLSSVAADKDFYFLLTLHSTLKHLLHSHYKNNITLN
		<i>Bb</i> HDAC	717	NAELTQWILLECCGNPQVNEAGDAPHLAVYKDPICITLTIFHATNSGLFVHMLGSSDSN
		<i>Cp</i> HDAC3	265	ESKIVSLILEYALANSIDLNNPEEHAHLSLDFDTLSVSLSSGGADPLKEITCAN--
		TaHDAC II^{ANK}	664	TRNKNSLNSAIDGFAFELFTISLCKRLLGGSKKGGFKWYQRKSDSEFEWNSPVSIKLFLD
		<i>Bb</i> HDAC	777	QQHMDGQPHVDNSAIEKIMS----ALRLNRDKIVADLSVVGHATMPSLGAADSLSFIE
		<i>Cp</i> HDAC3	323	-----
		TaHDAC II^{ANK}	724	EELMTEEQLVCRSISKASSWECLLALFYSNAITVYHLLSNPHFMHRFINFASMNNSGEBL
		<i>Bb</i> HDAC	833	EMVFLLEQLTYRAIKVSAWDLVLAAMYTYNEVLSAHLMTNPHYHRFINMSVHGNSTQEM
		<i>Cp</i> HDAC3	323	-----LKKCDLDSAWRCHHTLTHDSEYQQHPHSESEYDLSFHAQKGLG
		TaHDAC II^{ANK}	784	NLVNEMVLTHLFDNP-----
		<i>Bb</i> HDAC	893	TTMNYMTTRVLHVDPADVRSIKYLDEIRNEICCSNEALNQNFNISTAMDKDLKSLRDC
		<i>Cp</i> HDAC3	369	-----
		TaHDAC II^{ANK}	798	NIITAEKHNYKNQNKQEEYFKGYGIPHSGLRSSVMRPEIGPKNYNETNSALSLITHY
		<i>Bb</i> HDAC	953	INETLASCNSKYRGVKSSRHSVCLPHREGTQIKWDKVEETCSLQSSRCRLQRRSY
		<i>Cp</i> HDAC3	369	-----SEERVESTAVEIATNDESEQRRVGINESLAD--GPSMG--
Klasse II	Apicomplexa	TaHDAC II^{ANK}	857	K--RSERIQENLNLK--TWIITHPTCLHHLALPEPTDAPNRRHLIVT--IPENPTRLEVI
		<i>Bb</i> HDAC	1013	VSVYKASAEHPNKQ--TWIITHPTCLHHLALPEPTDAPNRRHRLIMS--IPENPTRLEVI
		<i>Cp</i> HDAC3	407	-----LAS--TRIFTHGCCIDHLSLPEPMDERESLWLNK--IPENPTRLEVI
		<i>Sc</i> Hda1	1	-----MRHAKIFTSYFEYIDFHPED--PRRIVRYKI--LAENGLINPT
		<i>Bt</i> HDAC6	56	MKKLSQTAEQDLIMLQGLN--NLE--RTLSTGLVFD--QLNEFFCLWDDSLPERPRRHAI
		TaHDAC II^{ANK}	914	ISNDNGILRSFTLENVKLIH--
		<i>Bb</i> HDAC	1073	VSNENITLRSDTLENVKLIH--
		<i>Cp</i> HDAC3	455	VKPNVGLISNEFSLQWTE--
		<i>Sc</i> Hda1	43	ISG-----VDDIGDMLK--
		<i>Bt</i> HDAC6	116	KEQLIQEGLLDRCVS-----
		<i>Bb</i> HDAC	1090	-SPPPAITADVLRVHWSYIEISLQKVVQTAQSKWEQNPWPVLADQDTPPTPHSWSAALY
TaHDAC II^{ANK}	931	-SPPPAIMADILRVHDWAYIDKLEQVQAQKRWITNPWPVLADGDTPTPHSWSAALY		
<i>Cp</i> HDAC3	472	-SCKPAITSDILRVHDWAYIRLQHKWEE SRLIWDQREPLTGSIDDDTQITPGSKWKAALH		
<i>Sc</i> Hda1	56	IPVPAATSEIILEVHTKEHEDEFESTEKVSRELLK---ETEKGSVYFNNDSTASARL		
<i>Bt</i> HDAC6	153	FQARFARKEELMVFHSLLEYIDLLETQYVNEEELHV---LADTYDSVYIEENSTGACL		
		<i>Bb</i> HDAC	1150	AAGSVIATAVDAVCKGQQRNVFCAVRPPGHHLGTWGAACSKGFEDDEDAAC-----S----
TaHDAC II^{ANK}	991	AAGSVIATAVDAVCTNQQRNVFCAVRPPGHHLGTWGAACNNFDEDEDAFSFYTYNSISYS		
<i>Cp</i> HDAC3	529	ASGSVINAVDVCRCGENRNVFCARPPGHHLGTWGAACVGTDEGIPSC-----S----		
<i>Sc</i> Hda1	112	PCGGALEACHAVVECRVINSLAVRPPGHA-----EPGAA-----		
<i>Bt</i> HDAC6	187	ASGSVRLVDAVLEAEIRNEMAIRPPGHA-----QHSIM-----		
		<i>Bb</i> HDAC	1200	-----GGFCLINNVAVGAAYAAYMYAKEGIRRIAVDFDHHGNGTHQIVSNIGPRTFK
TaHDAC II^{ANK}	1050	IVKLVVGGFCLINNVAVGAAYAAYMYASKGIRRIAVDFDHHGNGTEQIVRNIGPKNVK		
<i>Cp</i> HDAC3	581	-----GGFCLINNVAVGAAYCYTYSNLGISITAIIDFVHHGNGTEQIVRNASPGNRK		
<i>Sc</i> Hda1	149	-----GGFCLINNVAVAKNILKNYP-ESVRRIMIIDMHHGNGTQKSF-----		
<i>Bt</i> HDAC6	223	-----DGCINFNHVAVARYAQKHD---ICRILIVDQVHHGNGTQAFD-----		
		<i>Bb</i> HDAC	1254	T--IAHHSADDPNRI---VNRIP--AVFGWRDTHDKDVEFSSSIHAYD--GVFYPGTGE
TaHDAC II^{ANK}	1100	INNTSYKVDNEGNINIQEPTTQIHKKQFGWRDENRDLVLEASIHAYD--GVFYPGTGR		
<i>Cp</i> HDAC3	635	IK-TLFP--VPGINLD--EEDLS--YKIVRDELDAENFSSSIHAYD--GVFYPGTGP		
<i>Sc</i> Hda1	192	-----YQD-----DQVLVVSIRFDMGKYPGTIQ		
<i>Bt</i> HDAC6	136	-----QD-----PSVLEFSIHRYEQGFEVVAVKA		
		<i>Bb</i> HDAC	1255	TCSRY-EPSEERLIINVGIP---QTTSENFRIIPETRIEYLLHFDPLIEISAGFDGHY
TaHDAC II^{ANK}	1170	QSTIYMEENREIINVAVP---QTTSTEFRIIPETRIEYLLHFDPLIEISAGFDGHY		
<i>Cp</i> HDAC3	688	DCCTIS---RPNIIINIGLS---EKTTSKIERNKIKRFLPKLLQFRNIEISAGFDGHV		
<i>Sc</i> Hda1	218	GQYDQTGEGEGEHCNITWVVGCVGDAPMWAFEQVVMPMGRFVKPDLVISSGFLAAD		
<i>Bt</i> HDAC6	266	SNWSTTGLGCGYGTINFPWVQGMQDADIAAHLHVLEVAFFEQQLVLAAGFALQ		

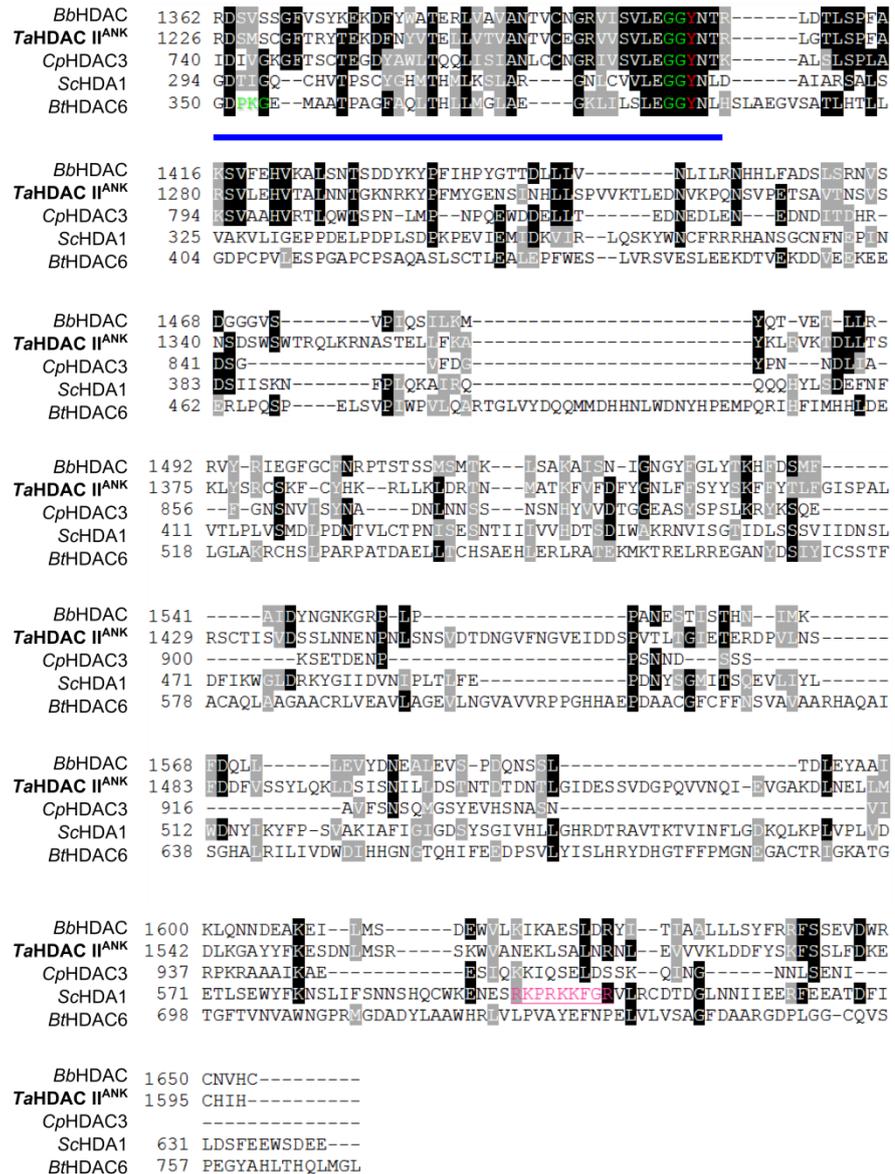


Abbildung 14 Theileria annulata HDAC der Klasse II – TaHDAC II^{ANK} Der Vergleich von Proteinsequenzen einiger Apicomplexa HDACs der Klasse II, der Bäckerhefe HDA1 und der bovinen HDAC6 anhand der Webapplikation ClustaW2. Mithilfe der Webanwendung Boxshade wurden identische Aminosäuren mit schwarz unterlegt und ähnliche mit grau. Die putative HDAC-Domäne wurde dunkelblau unterstrichen. Die grünen Markierungen indizieren einen Tubus formenden Bereich. Prognostizierte katalyserelevante Aminosäuren wurden rot markiert. Die mit einem roten Kreis gekennzeichneten Histidine in der TaHDAC II^{ANK} könnten als aktives Zentrum fungieren. Die gelben Rauten geben Aminosäurenpositionen an, die für die Bindung des Kofaktors Zn²⁺ relevant sind bzw. sein könnten. Die prognostizierten Kernlokalisierungssignale wurden pink hervorgehoben. Aminosäuren, die zum Tubusrand der Säuger HDAC6 gehören, wurden gelb markiert. Die Abschnitte, die den Motiven der *ankyrin repeat-Proteine* ähneln, wurden blau hervorgehoben. Für diesen multiplen Sequenzvergleich wurden folgende Aminosäuresequenzen benutzt: TaHDAC II^{ANK} (TA17590); BbHDAC (BBOV_IV001800); CpHDAC3 (cgd8_480); ScHDA1 (YNL021W); BtHDAC6 (NP_001092430.1).

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.1.1

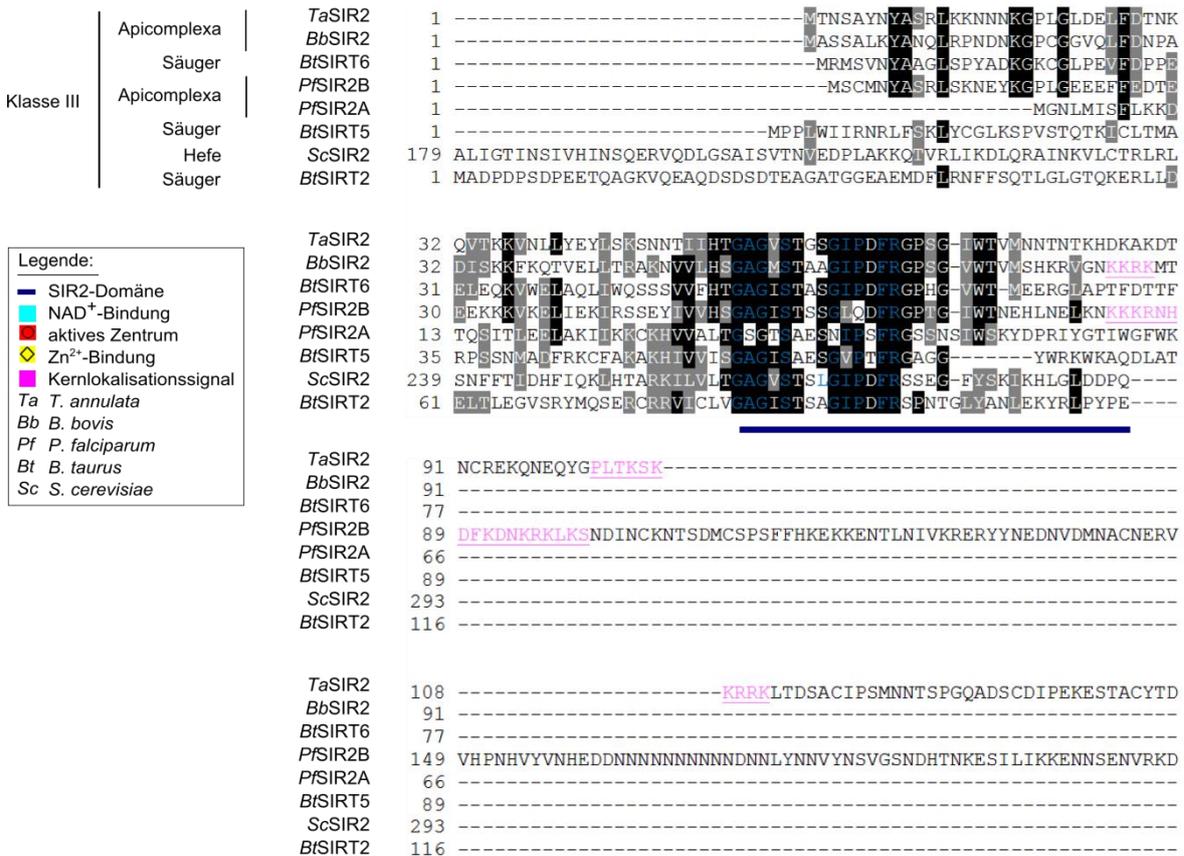
1. Die *T. annulata*-Datenbank offenbart eine putative HDAC der Klasse I.
 - 1.1. *Ta*HDAC I besitzt eine vergleichsweise kurze Aminosäuresequenz, wobei der Großteil der Proteinsequenz die putative katalytische Domäne bildet.
 - 1.2. *Ta*HDAC I stimmt besonders in konservierten, funktionalen Bereichen mit anderen eukaryotischen HDACs überein und somit ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um eine funktionale HDAC handelt.
 - 1.3. *Ta*HDAC I enthält eine für Apicomplexaparasiten charakteristische Insertion von zwei Aminosäuren, die sich am Substrateingang befinden könnte.

2. Es wurden zwei putative HDACs der Klasse II gefunden: *Ta*HDAC II^{IPK} und *Ta*HDAC II^{ANK}.
 - 2.1. *Ta*HDAC II^{IPK} und *Ta*HDAC II^{ANK} stellen putative Multidomänen-Proteine dar, d. h. sie besitzen neben einer HDAC Domäne eine weitere Domänensequenz bzw. weitere Motive, was eine bifunktionale Aktivität der Enzyme vermuten lässt.
 - 2.2. Beide *Ta*HDACs der Klasse II verfügen über Aminosäurereste, die bei anderen eukaryotischen HDACs das aktive Zentrum bilden, inklusive Bindungsstellen für den Kofaktor Zn²⁺. Daher ist zu vermuten, dass es sich um funktionelle HDACs handelt.

3. Alle *T. annulata* HDACs der Klasse I und II sind vermutlich kernlokalisiert, da jeweils eine Kernlokalisationssequenz prognostiziert werden konnte.

5.1.2 NAD⁺-abhängige HDAC von *T. annulata* - TaSIR2

Die *T. annulata* Genomdatenbank verfügt über eine putative NAD⁺-abhängige HDAC, der TaSIR2¹⁷⁴. Die prognostizierte funktionale Domäne dieser HDAC mit der Akzessionsnummer TA20415 ähnelt der funktionalen Domäne der Bäckerhefe HDAC SIR2, die zur Klasse III gehört. Der paarweise Vergleich der TaSIR2 Aminosäuresequenz ergab eine Aminosäureidentität von 13–30 % für drei bovine Sirtuine (SIRT 2, 5, 6), 18 % mit dem Hefe SIR2, 35 % mit dem *B. bovis* SIR2 und 22 % bzw. 17 % für die *P. falciparum* Sirtuine SIR2A und SIR2B (Anhang 9.1.1). Innerhalb der putativen TaSIR2-Domäne kommen Sequenzabschnitte vor, die sowohl in den Säugersirtuinen als auch im SIR2 der Bäckerhefe vorhanden sind. So konnten unter Verwendung von Datenbanken und den Angaben von Avalos *et al.* 2004 und Chen *et al.* 2010^{192,193} ein aktives Zentrum (Histidin 231), drei NAD⁺-Bindungsmotive (GAGXS; GIPXFR und TQN(I/V)DXL) und vier Zn²⁺-bindende Aminosäurereste prognostiziert werden. Das Zn²⁺-Bindungsmotiv CX₂₋₄CX₁₅₋₄₀CX₂₋₄C ist charakteristisch für eine strukturgebende Zn²⁺-Bindestelle. Innerhalb des TaSIR2 konnten zusätzlich zwei Kernlokalisationssequenzen ausgemacht werden (Abbildung 15).



Legende:

- SIR2-Domäne
- NAD⁺-Bindung
- aktives Zentrum
- ◆ Zn²⁺-Bindung
- Kernlokalisationssignal

Ta *T. annulata*
 Bb *B. bovis*
 Pf *P. falciparum*
 Bt *B. taurus*
 Sc *S. cerevisiae*

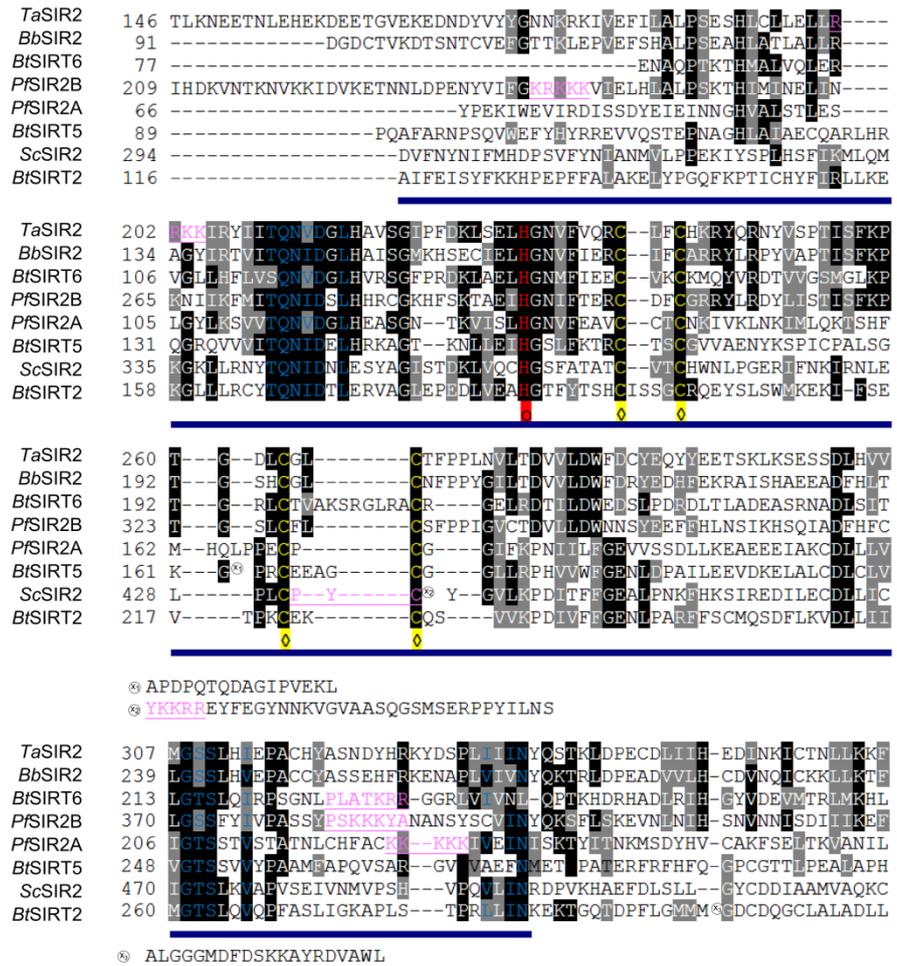


Abbildung 15 Theileria annulata HDAC der Klasse III – TaSIR2 Vergleichende Gegenüberstellung der Proteinsequenzen einiger Apicomplexa HDACs der Klasse III, des Bäckerhefe SIR2 und der bovinen Sirtuine SIRT2, SIRT5 und SIRT6 unter Verwendung des Onlineprogramms ClustalW2. Die schwarze bzw. graue Untermauerung identischer bzw. Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften erfolgte mithilfe der Webapplikation Boxshade. Die putative HDAC-Domäne der Klasse III wurde dunkelblau unterstrichen. Die blau gekennzeichneten Proteinabschnitte können in die NAD⁺-Bindung involviert sein. Die mit einem roten Kreis markierte Aminosäureposition indiziert das prognostizierte aktive Zentrum des TaSIR2. Die gelben Rauten zeigen putative Zn²⁺-Bindungsstellen an. Die putativen Kernlokalisationssequenzen wurden pink hervorgehoben. Für den Vergleich wurden folgende Aminosäuresequenzen verwendet: TaSIR2 (TA20415); PfSIR2A (PF13_0152); PfSIR2B (PF14_0489); BbSIR2 (BBOV_I003070); BtSIR2 (XP_005209016.1); BtSIR5 (ACS66701.1); BtSIR2 (NP_001107003.1) und ScSIR2 (YDL042C). Die Sequenzen sind nur teilweise dargestellt. Ein vollständiger Sequenzvergleich kann dem Anhang 9.1.4 entnommen werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.1.2

1. TaSIR2 weist eine konservierte, putative HDAC-Domäne der Klasse III auf, in der katalyserelevante Aminosäuren identifiziert werden konnten. TaSIR2 enthält, wie die anderen eukaryotischen SIR2-Proteine, ein strukturgebendes Zn²⁺-Bindungsmotiv. Demzufolge ist diese HDAC wahrscheinlich funktionell.
2. TaSIR2 verfügt über zwei putative Kernlokalisationssequenzen, demnach ist das Enzym vermutlich kernlokalisiert.

5.2 HDAC-Inhibitionsexperimente mit *T. annulata*-infizierten Zellen der Linie TaA288

In den folgenden Abschnitten ist die Wirkung eines HDAC-Inhibitors (*histone deacetylase inhibitor*; HDACi) auf die Expression zweier Merozoitenmarker in *T. annulata*-infizierten Zellen der Linie TaA288 dargestellt.

5.2.1 Wirkung von Apicidin auf die Merozoitenmarkerexpression *T. annulata*-infizierter Zellen der Linie TaA288

Fritsch *et al.* 1988 konnten *in vitro* zeigen, dass in den *T. annulata* Schizonten durch Inkubation der infizierten Zellen bei 41 °C, was die Fieberreaktion eines erkrankten Tieres simulieren soll, Merogonie induziert werden kann¹⁹⁴. Zudem konnte mithilfe dieser *In-vitro*-Technik verdeutlicht werden, dass im Laufe der Langzeitkultivierung die Fähigkeit des Schizonten sich zu Merozoiten zu differenzieren abnimmt (Abschnitt 2.7.1)¹³⁴. Da HDACs der Apicomplexa die Expression einiger differenzierungsrelevanter Gene modulieren^{166,167}, stellt sich die Frage, ob eine Inhibition von HDACs in *T. annulata* das Differenzierungspotenzial hoch passagierter *T. annulata* Schizonten *in vitro* verändern kann. Für diese Inhibitionsstudien wurde Apicidin als HDACi eingesetzt. Dieses zyklische Tetrapeptid ist nachweislich ein Inhibitor von Parasiten-HDACs^{166,169,176,195,196}. Zur Untersuchung des Effektes des HDACi auf den Prozess der Merogonie wurden hoch passagierte, stark attenuierte *T. annulata*-infizierte Leukozyten der Linie TaA288 verwendet (Tabelle 5). Diese Leukozyten werden im nachfolgenden Text kurz als TaA288-Zellen bezeichnet. Diese Abkürzung bezieht sich immer auf die Gesamtheit aus Parasit und Wirtszelle. Nach dem Austesten verschiedener Konzentrationen an Apicidin (Abbildung 18) wurden im Kulturmedium der TaA288-Zellen eine Endkonzentration von 25 nM Apicidin eingestellt und die Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C für 6 Tage inkubiert. Zur Kontrolle wurden TaA288-Zellen mitgeführt und in deren Kulturmedium die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO gegeben (Lösungsmittelkontrolle, LMK). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Expression des frühen Merozoitenmarkers TaMS1 (*T. annulata* major merozoite surface protein 1; TaMS1) mittels der *In Cell Western* (*In Cell Western*; ICW)-Methode (Abschnitt 4.2.4). Diese Methode erlaubt, im Gegensatz zur *Western Blot*-Methode, die Quantifizierung des Zielproteins im zellulären Kontext und benötigt lediglich kleine Mengen an Zellmaterial und Reagenzien. Für die TaMS1 Detektion wurden ein Maus-Hybridomakulturüberstand, der spezifische monoklonale Antikörper gegen TaMS1 enthält, und Infrarot(IR)-Fluorophor-gekoppelte anti-Maus Antikörper verwendet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte durch einen Odyssey Infrared Imager von LI-COR (Abschnitt 4.2.4 und 4.5.3). Zur Normalisierung der einzelnen

Kammern auf die darin enthaltene Zellzahl erfolgte eine DNA-Färbung mittels TO-PRO[®]-3-Iodid. Die Ergebnisse können der Abbildung 16 entnommen werden. Die Analyse ergab, dass Apicidin die *TaMS1*-Expression in den *TaA288*-Zellen, die bei 41 °C kultiviert wurden, signifikant um den Faktor 3,05 steigerte. Ein vergleichbarer Effekt von Apicidin konnte in den *TaA288*-Zellen, die bei 37 °C angezogen wurden, nicht festgestellt werden.

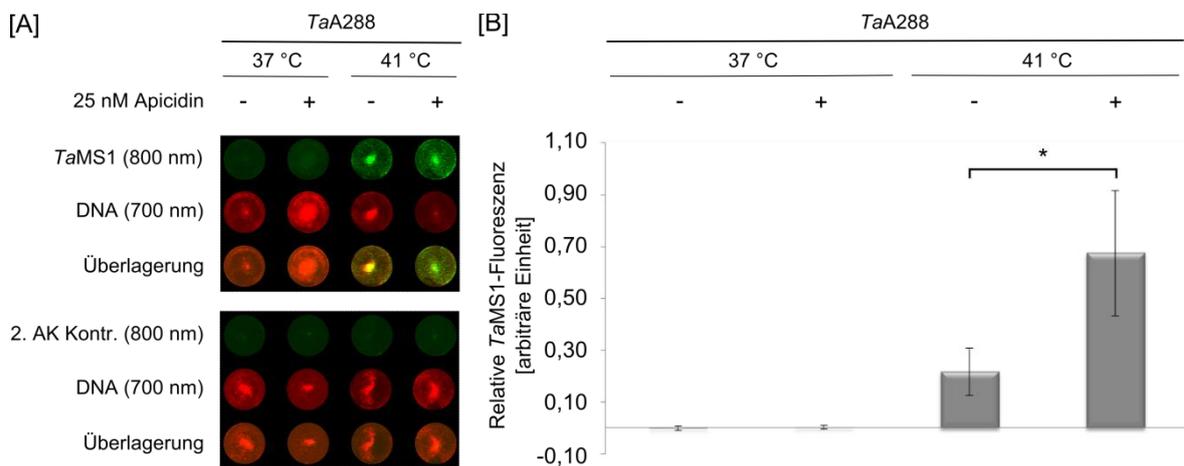


Abbildung 16 Untersuchung der Apicidin-abhängigen *TaMS1*-Expression in attenuierten *TaA288*-Zellen bei 37 °C und 41 °C [A] Repräsentative *wells* einer ICW-Analyse zum Nachweis des Merogoniemarkers *TaMS1* in Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen und in Zellen der Lösemittelkontrolle nach Inkubation bei 37 °C bzw. 41 °C für die Dauer von 6 Tagen. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Abschluss der Behandlung in eine 48er Mikrotiterplatte transferiert. Anschließend wurden die Zellen mit α *TaMS1* und α M IRDye[®] 800CW gefärbt. Darunter sind die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörperkontrollen (2. AK Kontr.) abgebildet. [B] Aus den resultierenden Fluoreszenzsignalen für *TaMS1* bei 800 nm und des DNA-Farbstoffs bei 700 nm wurden, wie im Abschnitt 4.5.3 beschrieben, die relativen *TaMS1*-Fluoreszenzen berechnet. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm StdAbw sind im Histogramm dargestellt. Die Stichproben waren nach Shapiro-Wilk nicht normalverteilt und somit wurde zur statistischen Auswertung der Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet. Signifikanz: $p \leq 0,05$ (*).

Simultan zur ICW-Analyse bezüglich der *TaMS1*-Expression wurden die Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen hinsichtlich der Expression vom späten Merogoniemarker *TaMR1* (*T. annulata* merozoite rhoptry protein 1; *TaMR1*) untersucht. Die erhaltenen Expressionswerte verdeutlichen, dass Apicidin die Expression von *TaMR1* in den *TaA288*-Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C steigert. Die *TaMR1*-Expression war nach Apicidin-Behandlung um das 4-fache signifikant erhöht (Abbildung 17). In den 37 °C Kulturen der Apicidin-behandelten und unbehandelten *TaA288*-Zellen konnte kein *TaMR1*-Signal nachgewiesen werden (Abbildung 17[A]).

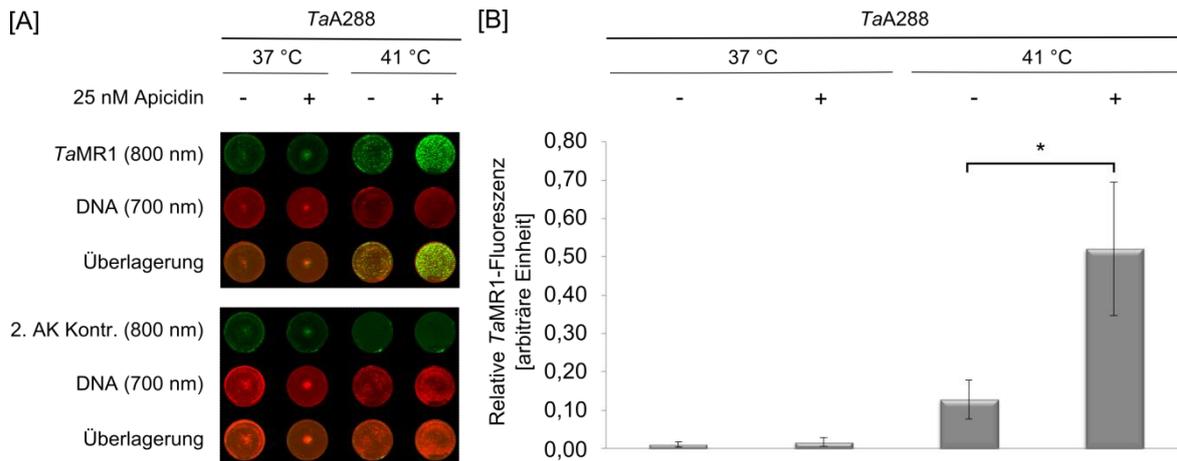


Abbildung 17 Untersuchung der Apicidin-abhängigen TaMR1-Expression in attenuierten TaA288-Zellen bei 37 °C und 41 °C [A] Repräsentative *wells* einer ICW-Analyse zum Nachweis des Merogoniemarkers TaMR1 in Apicidin-behandelten TaA288-Zellen und in Kontrollzellen nach einer Inkubation bei 37 °C bzw. 41 °C für die Dauer von 6 Tagen. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 48er Mikrotiterplatte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit Ma TaMR1 und ZαM IRDye® 800CW gefärbt. Zur Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die anstatt der Primärantikörper-Lösung reines Blockierungsreagenz erhielten (Sekundärantikörperkontrolle; 2. AK Kontr.) [B] Die relativen TaMR1-Fluoreszenzen wurden, wie im Abschnitt 4.5.3, beschrieben aus den TaMR1-Fluoreszenzsignalen bei 800 nm und den Fluoreszenzsignalen des DNA-Farbstoffs bei 700 nm berechnet. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm StdAbw sind im Histogramm dargestellt. Die Stichproben waren gemäß Shapiro-Wilk normalverteilt und somit wurde zur statistischen Auswertung der Student'sche t-Test verwendet. Signifikanz: $p \leq 0,05$ (*).

Bougdoor *et al.* 2009 zeigten, dass die Apicomplexa HDAC der Klasse I *in vitro* konzentrationsabhängig inhibiert werden kann ¹⁶⁶. Zur Überprüfung, ob die Apicidin-bedingte Expression des Merogoniemarkers TaMS1 in *T. annulata*-infizierten Zellen ebenfalls von der Konzentration des Inhibitors abhängig ist, wurden TaA288 bei 37 °C bzw. 41 °C für 6 Tage inkubiert, wobei im Medium Apicidin-Konzentrationen von 5 nM bis 50 nM eingestellt wurden. Die in Abbildung 18 dargestellten Daten verdeutlichen, dass bereits bei dem Einsatz von 5 nM Apicidin die TaMS1-Expression in den TaA288-Zellen der 41 °C Kultur gegenüber den Kontrollzellen signifikant erhöht werden konnte. Des Weiteren steigt die TaMS1-Expression mit der Zugabe der Apicidin-Konzentration. Eine TaMS1-Expression in den TaA288-Zellen der 37 °C Kultur konnte bei keiner der eingesetzten Apicidin-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abbildung 18; 2. AK. Kontr.: Anhang 9.1.5).

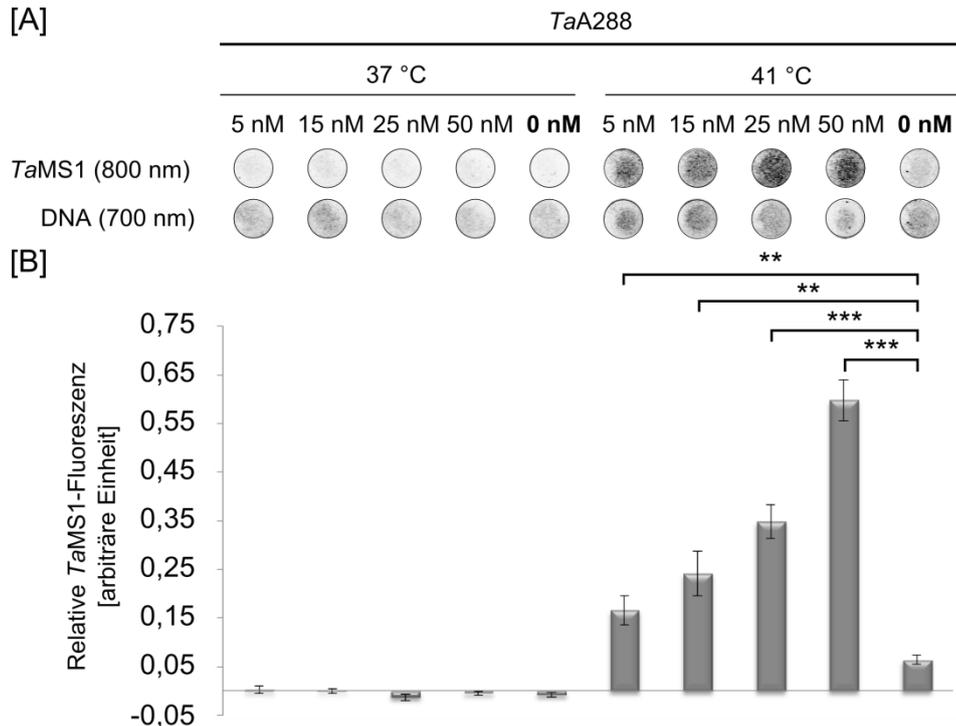


Abbildung 18 Konzentrationsabhängigkeit der TaMS1-Expression in attenuierten TaA288-Zellen bei 37 °C und 41 °C [A] Repräsentative *wells* eines ICW zum Nachweis des Merogonimarkers TaMS1 in mit unterschiedlichen Apicidin-Konzentrationen behandelten TaA288-Zellen. Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in der Legende indiziert, für 6 Tage mit 5 nM, 15 nM, 25 nM und 50 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO bei 37 °C oder 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte transferiert. Anschließend wurden die Zellen mit MoTaMS1 und ZcM IRDye® 800CW gefärbt. [B] Aus den resultierenden Fluoreszenzsignalen für TaMS1 (800 nm) und des DNA-Farbstoffs (700 nm) wurde, wie im Abschnitt 4.5.3 beschrieben, die relative TaMS1-Fluoreszenz berechnet. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm StdAbw sind im Histogramm dargestellt. Nach Überprüfung der Stichprobe auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk) wurde zur statistischen Auswertung der Student'sche t-Test verwendet. Signifikanz: $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.2.1

1. Apicidin erhöht bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C die Expression der Merozoitenmarker TaMS1 und TaMR1 in TaA288-Zellen, nicht aber in Zellen, die bei 37 °C angezogen wurden.
2. Am Beispiel des TaMS1 konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Expression von der eingesetzten Konzentration des Apicidins abhängig ist.

Vermutlich verstärkt der Einsatz von Apicidin die Merozoitenbildung aus Schizonten einer TaA288-Zellkultur bei 41 °C.

5.2.2 Einfluss von Apicidin auf die Expression verschiedener Parasitengene *T. annulata*-infizierter Zellen der Linie TaA288

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse zur Untersuchung einer Apicidin-bedingten mRNA-Expression von differenzierungsassoziierten Genen und der *T. annulata*-HDACs dargestellt.

5.2.2.1 Einfluss von Apicidin auf die Transkription differenzierungsassoziierter Gene

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass Apicidin bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C die Expression von Markern, die während der Merogonie hochreguliert werden, in *TaA288*-Zellen steigert (*TaMS1* und *TaMR1*). Dies spricht für eine erhöhte Merozoitenbildung. Um zu überprüfen, wie sich Apicidin auf während der Merogonie herunterregulierte Expression auswirkt, wurde die Apicidin-abhängige Transkriptionsrate des *TaSP* und der *TaSH-HN-Gene* untersucht^{135,140}. Des Weiteren wurde zum Vergleich die Apicidin-abhängige Transkriptionsrate des *TaMR1* bestimmt. Für die Messung der mRNA-Expressionen wurden die *TaA288*-Zellen, mit gleicher Zellanzahl ausgesät in Apicidin-haltigem bzw. lösemittelhaltigem Medium, bei 37 °C bzw. 41 °C inkubiert. Nach 2 bzw. 6 Tagen wurden die Zellen geerntet, wie im Abschnitt 4.2.2 beschrieben, aufgeschlossen und die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA wurde eine *quantitative, real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR)-Analyse durchgeführt (Abschnitt 4.3.2). Die erhaltenen relativen mRNA-Expressionsunterschiede sind in Abbildung 19 dargestellt. Die relative Quantifizierung der Transkripte erfolgte nach der Berechnung von Livak und Schmittgen *et al.* 2001¹⁸⁶. Dabei wurde die Expression der untersuchten mRNA in den Apicidin-behandelten Zellen immer in Relation zur Transkriptionsrate in Zellen der Lösemittelkontrolle angegeben. Die Inkubation der *TaA288*-Zellen für 2 Tage und 6 Tage bei 37 °C in Medium mit 25 nM Apicidin resultierte nicht in einer veränderten mRNA-Expression der Gene *TaMR1*, *TaSH-HN* und *TaSP*. Nach zweitägiger Behandlung der *TaA288*-Zellen mit 25 nM Apicidin bei 41 °C lassen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Zielgenexpression beobachten. Dagegen war nach einer sechstägigen Inkubation der *TaA288*-Zellen in 25 nM Apicidin bei 41 °C die *TaMR1* mRNA-Expression im Vergleich zur Transkriptionsrate in den Zellen der Lösemittelkontrolle um den Faktor 8,83 signifikant erhöht. In den gleichen Zellen war die Transkriptionsrate der *TaSH-HN-Gene* signifikant um den Faktor 3,03 reduziert. Jedoch konnte in diesen Zellen kein Unterschied im Expressionsverhalten des *TaSP*-Gens ausgemacht werden. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt, zur Normalisierung diente die Transkriptionsrate des *T. annulata* Referenzgens *RBL11*. Die statistische Analyse erfolgte nach der Methode von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ und die Ergebnisse konnten unter Verwendung eines zweiten *T. annulata* Referenzgens bestätigt werden (Anhang 9.1.6).

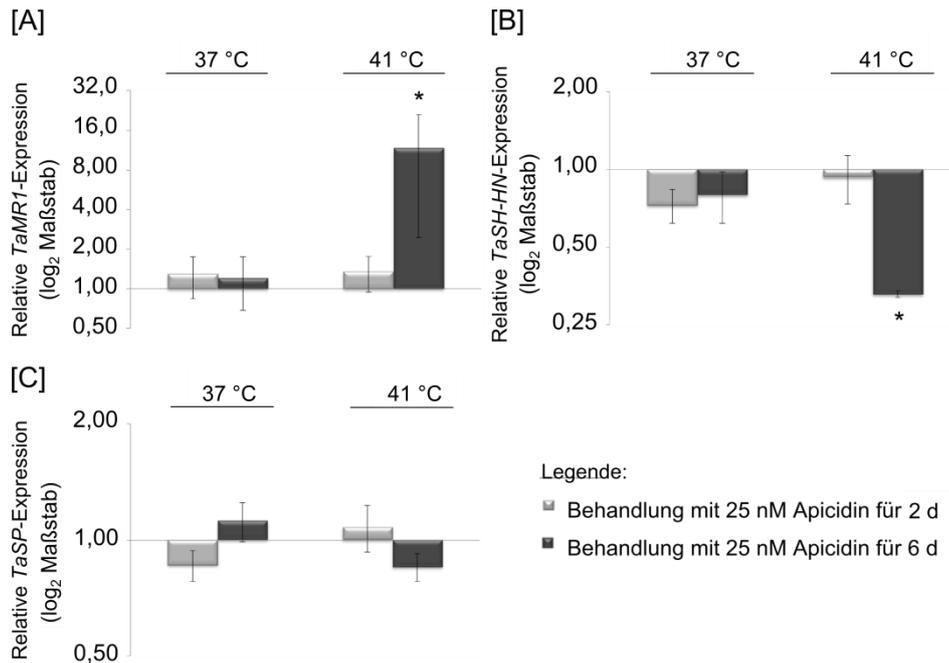


Abbildung 19 Relative Quantifizierung der *TaMR1*-, *TaSH-HN*- und *TaSP*-Transkription in Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen Die Histogramme stellen die mit *quantitative, real-time* PCR (qRT-PCR) gemessenen Expressionen der Gene *TaMR1* [A], *TaSH-HN* [B] und *TaSP* [C] in Apicidin-behandelten Zellen relativ zu den Expressionen in unbehandelten Zellen (Lösungsmittelkontrolle; "1") dar. Die Transkriptionsrate dieser Zielgene wurde gegen das mRNA-Level des *T. annulata RBL11*-Referenzgens normalisiert. Die Messungen erfolgten nach 2 tägiger (2 d) und nach 6 tägiger (6 d) Inkubation der Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C. Die qRT-PCR-Analyse wurde dreimal wiederholt und die Mittelwerte der relativen Expression sowie die entsprechende Standardabweichungen dargestellt. Der signifikante Unterschied nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ wurde durch einen Asterisk dargestellt.

5.2.2.2 Einfluss von Apicidin auf die Transkription der *T. annulata* Histondeacetylasen

Eine Literaturanalyse zeigte, dass durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren die Expression von HDACs verändert werden kann^{197,198}. Um zu untersuchen, ob Apicidin die Transkription der HDACs in *T. annulata* beeinflusst, wurden die Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen und die Zellen der Kontrollansätze auf die Transkriptionsraten der Gene *TaHDAC I*, *TaHDAC II^{IPK}*, *TaHDAC II^{ANK}* und *TaSIR2* überprüft. Verwendet wurde das cDNA Material, welches ebenfalls für die Analyse der *TaMR1*, *TaSP* und *TaSH-HN* mRNA-Expression eingesetzt wurde. Zur Quantifizierung wurde erneut die Methode von Livak und Schmittgen *et al.* 2001¹⁸⁶ angewendet und die resultierenden mRNA-Expressionsraten der vier Zielgene sind in Abbildung 20 immer in Relation zur Transkriptionsrate in Zellen der Lösungsmittelkontrolle angegeben. Die Analyse ergab keine alternierte Transkriptionsrate für die *T. annulata* HDACs in den mit Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt und konnten unter der Verwendung eines zweiten Referenzgens bestätigt werden (Anhang 9.1.7).

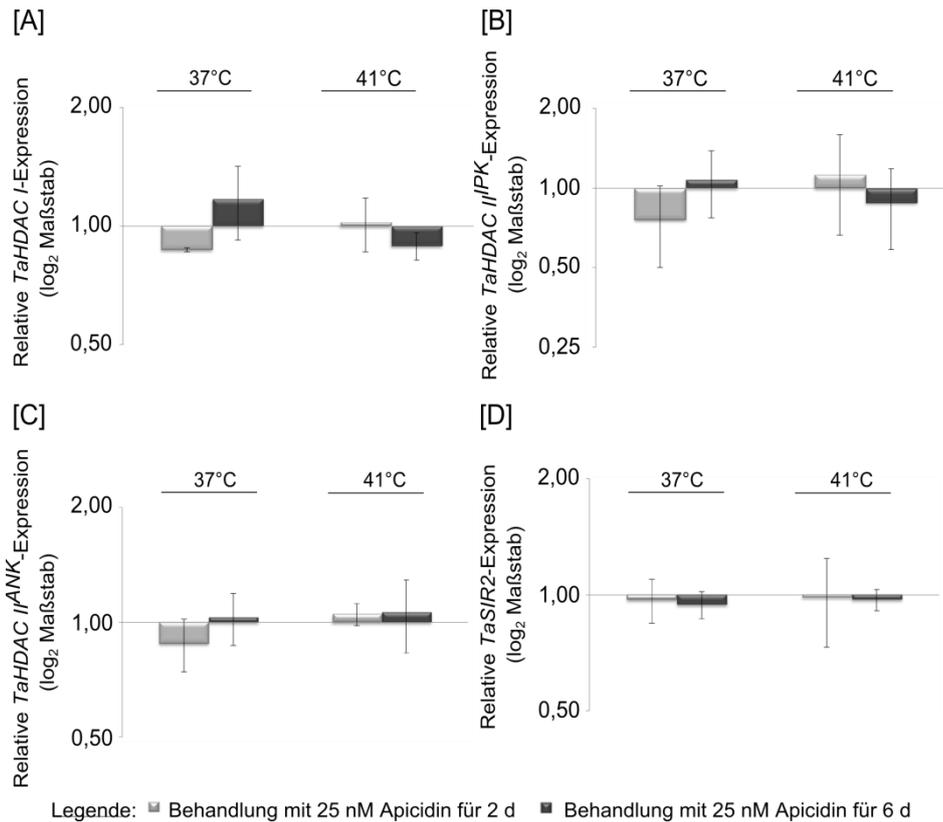


Abbildung 20 Relative Quantifizierung der *TaHDAC I*-, *TaHDAC II^{IPK}*-, *TaHDAC II^{ANK}*- und *TaSIR2*-Transkription in Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen Die Histogramme stellen die mit qRT-PCR gemessenen mRNA-Expressionsraten der Gene *TaHDAC I* [A], *TaHDAC II^{IPK}* [B], *HDAC II^{ANK}* [C] und *TaSIR2* [D] in Apicidin-behandelten Zellen relativ zu den Expressionen in unbehandelten Zellen (Lösungsmittelkontrolle; "1") dar. Der Gehalt dieser Transkripte (Zielgene) wurde gegen den Gehalt an *T. annulata RBL11* mRNA (Referenz) normalisiert. Die Messungen erfolgten nach 2-tägiger (2 d) und nach 6-tägiger (6 d) Inkubation der Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C. Die qRT-PCR-Analyse wurde dreimal wiederholt und die Mittelwerte der relativen Expression sowie die entsprechende Standardabweichungen dargestellt. Nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.2.2

1. Der HDACi Apicidin erhöht die mRNA-Expression an *TaMR1* und reduziert die Transkription des differenzierungsassoziierten Gens *TaSH-HN* in *TaA288*-Zellen, die für 6 d bei 41 °C inkubiert wurden. Dies spricht für eine Apicidin verursachte erhöhte Merozoitenbildung.
2. Es konnte kein Einfluss des HDACi auf die Transkription des *TaSP*-Gens nachgewiesen werden. *TaSP* ist ein Makroschizontenmarker. Demnach scheint Apicidin die Merozoitenbildung nicht zu beeinflussen.
3. Apicidin beeinflusst nicht die Transkription der *T. annulata* HDACs.

5.2.3 Immunfluoreszenzfärbung von differenzierenden *TaA288*-Schizonten

Die Daten aus den Abschnitten 5.2.1–5.2.2 sprechen teilweise dafür, dass Apicidin den Anteil an sich zu Merozoiten differenzierenden *T. annulata* Parasiten nach einer sechstägigen Inkubation bei 41 °C erhöht. Jedoch ist es diskutabel, ob stark attenuierte bzw. hoch passagierte *T. annulata* Parasiten in der Lage sind, reife Merozoiten zu produzieren^{55,85,87,88}. In der Literatur wurde bisher beschrieben, dass der Anteil der Schizonten mit einer hohen Kernanzahl (Mikroschizonten) mit Zunahme der Passagierung abnimmt. Die strukturellen Veränderungen sowie das Vorkommen des Makroschizonten-spezifischen Proteins *TaSP* und der Merozoiten-spezifische Proteine *TaMS1* und *TaMR1* in hoch passagierten bzw. stark attenuierten *T. annulata* Parasiten nach Merogonie-Induktion ist jedoch nicht detailliert beschrieben worden. Aus diesem Grund wurden die mit Apicidin behandelten und bei 41 °C inkubierten *TaA288*-Zellen, bei denen aufgrund der erzielten Ergebnisse ein hohes Maß an Merogonie vermutet werden konnte, mit anti-*TaSP* und anti-*TaMS1* bzw. anti-*TaMR1* Antikörpern und sekundären Antikörpern gefärbt. Ein repräsentatives Ergebnis der *TaSP/TaMS1*-Doppelfärbung ist in Abbildung 21 dargestellt. Die resultierenden Immunfluoreszenz(IF)färbungen bestätigen die ICW-Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.1. Die *TaA288* Zellkultur enthielt nach einer sechstägigen Inkubation bei 41 °C und unter Einwirkung von 25 nM Apicidin mehr Makroschizonten, die in das Merozoitenstadium übergehen, als die Zellen der Kontrolle. Zudem ergaben die IF-Färbungen des sich entwickelnden Mikroschizonten ein diffuses *TaMS1*-Signal innerhalb des vergrößerten Parasiten mit hoher Kernanzahl (weißer Pfeil; Abbildung 21[B]). Auf der Oberfläche des sich zu Mikroschizonten entwickelnden Makroschizonten konnten *TaSP*-Proteine nachgewiesen werden. *T. annulata* Schizonten, die bereits abknospende Merozoiten gebildet haben, wiesen *TaMS1*-Signale auf der Oberfläche des Mikroschizonten bzw. der freien Merozoiten auf (weißer Pfeil; Abbildung 21[D]), nicht aber auf der Oberfläche des Makroschizonten-„Restkörpers“. Dieser zeigte auf der Oberfläche eine deutliche *TaSP*-Färbung (gelber Pfeil; Abbildung 21[D]). Die *TaSP/TaMR1*-IF-Färbungen bestätigen ebenfalls das Vorkommen von mehr zu Merozoiten differenzierenden *T. annulata*-Parasiten in einer 41°C Kultur unter Einwirkung von 25 nM Apicidin nach sechs Tagen. Innerhalb des differenzierenden, vergrößerten Schizonten mit hoher Kernanzahl konnte ein „körniges“ *TaMR1*-Signal (weißer Pfeil; Abbildung 22[B]) nachgewiesen werden. Die Intensität des Membranproteins *TaSP* war partiell reduziert (gelber Pfeil; Abbildung 22[B]). In den reifen Merozoiten wurde jeweils ein punktförmiges *TaMR1*-Signal, das mit einem Parasitenkern assoziiert war, erhalten (weißer Pfeil; Abbildung 22[D]).

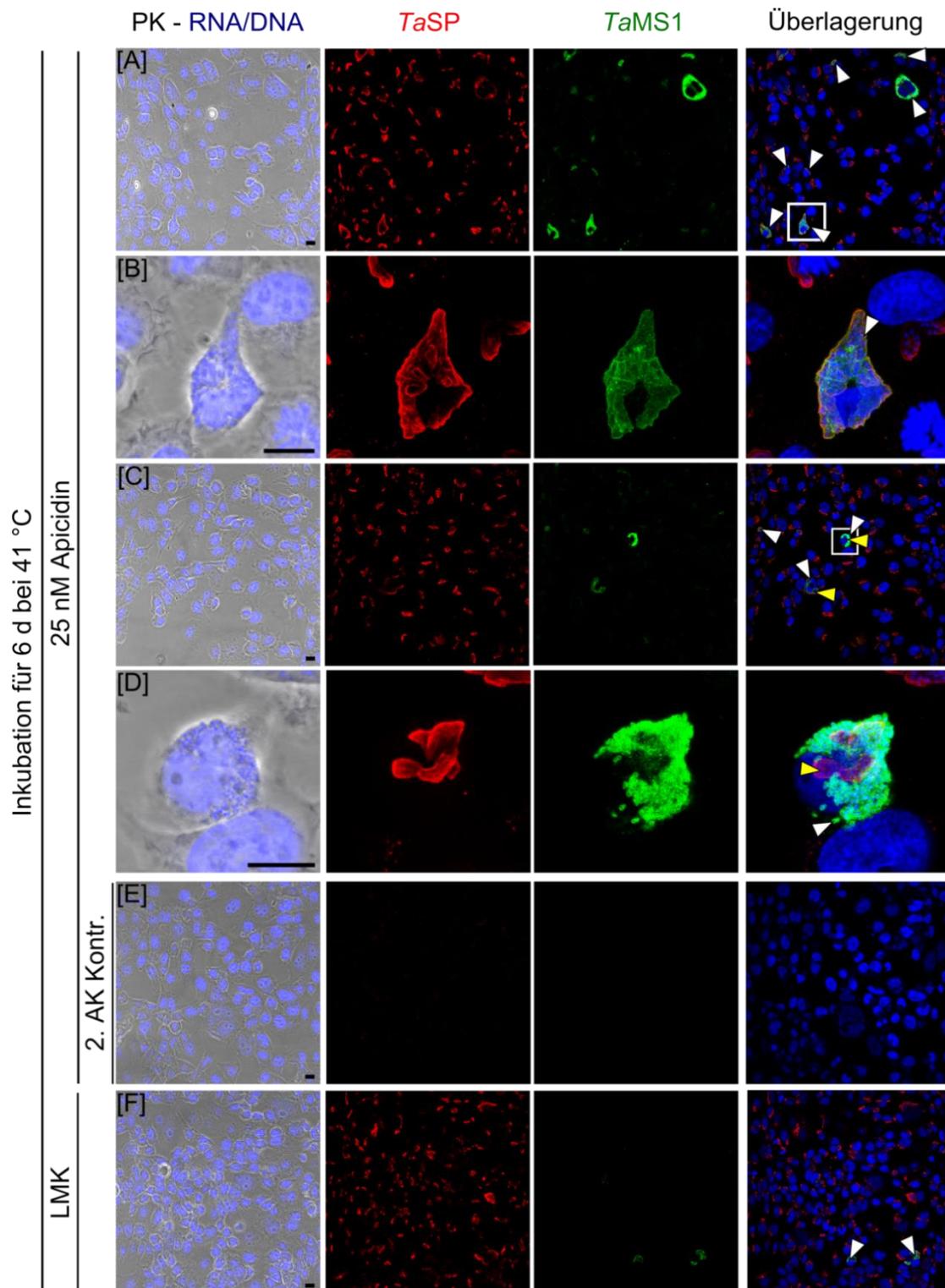


Abbildung 21 TaMS1 Nachweis in TaA288-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 6 Tage bei 41 °C mittels indirekter Immunfluoreszenz TaA288-Zellen wurden 24 h vor Abschluss der Behandlung auf runde Deckgläschen in eine 24er Mikrotiterplatte ausgesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bei 41 °C [A]-[E]. Als Kontrolle wurden TaA288-Zellen bei denselben Inkubationsbedingungen mit dem Lösungsmittel DMSO versetzt [F]. Anschließend wurden alle Präparate im Medium fixiert, permeabilisiert und wie folgt gefärbt: TaSP (K α TaSP; Z α K Alexa Fluor[®] 568), TaMS1 (M α TaMS1; Z α M Alexa Fluor[®] 488) und Nukleinsäuren (DAPI). Bei der Sekundärantikörperkontrolle (2. AK Kontr.) wurden lediglich die genannten Sekundärantikörper und DAPI in Blockierungsreagenz appliziert [E]. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Detailaufnahme [B] zeigt einen Bildausschnitt aus [A] und die Aufnahme [D] zeigt einen Ausschnitt aus [C]. Diese Detailaufnahmen geben die Maximalprojektion eines Bildstapels wieder. Größenbalken entspricht 10 μ m. PK: Phasenkontrast; \blacktriangleright TaMS1 (Mikroschizont/Merozoiten); \blacktriangleright TaSP (Makroschizonten-„Restkörper“); LMK: Lösemittelkontrolle.

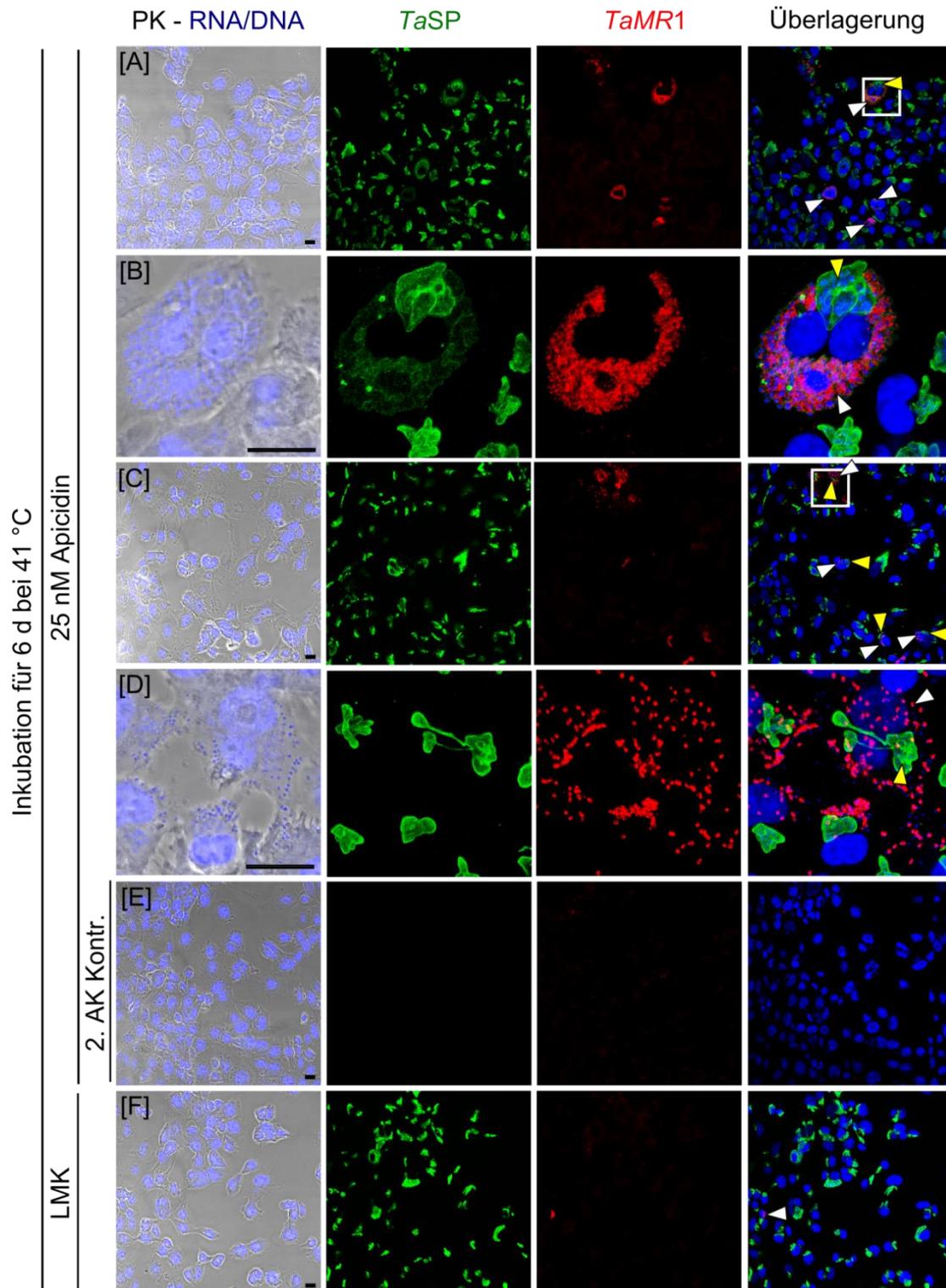


Abbildung 22 TaMR1 Nachweis in TaA288-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 6 Tage bei 41 °C mittels indirekter Immunfluoreszenz TaA288-Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes auf runde Deckgläschen in eine 24er Mikrotiterplatte übertragen. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bei 41 °C [A]-[E]. Als Kontrolle wurden TaA288-Zellen bei denselben Inkubationsbedingungen mit dem Lösungsmittel DMSO versetzt [F]. Anschließend wurden alle Präparate im Medium fixiert, permeabilisiert und wie folgt gefärbt: TaMR1 (KaTaMR1; ZaK Alexa Fluor® 568), TaSP (MaTaSP; ZaM Alexa Fluor® 488) und Nukleinsäuren (DAPI). Bei der Sekundäntikörperkontrolle (2. AK Kontr.) wurden nur Blockierungsreagenz, die genannten Sekundäntikörper und DAPI eingesetzt [E]. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Detailaufnahme [B] gibt einen Bildausschnitt aus [A] und die Aufnahme [D] einen Ausschnitt aus [C] wieder. Diese Detailaufnahmen stellen die Maximalprojektion eines Bildstapels dar. Größenbalken entspricht 10 µm. PK: Phasenkontrast; ▷ TaMR1 (Mikroschizont/Merozoiten); ▸ TaSP (Makroschizonten-„Restkörper“); LMK: Lösemittelkontrolle.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.2.3

1. IF-Färbungen gegen *TaMS1* und *TaMR1* bestätigen, dass der HDACi Apicidin die Bildung von Merozoiten aus einer *TaA288* Zellkultur bei 41°C erhöht.
2. Die Doppelfärbungen gegen *TaSP1* und den jeweiligen Merozoitenmarkern, verdeutlichen, dass *TaSP1* in der Oberfläche des Makroschizonten-„Restkörper“ enthalten ist, nicht aber in der Merozoitenoberfläche.

5.2.4 Einfluss des Apicidins auf die Expression des metastaserelevanten Wirtszellfaktors *MMP9* in *T. annulata*-infizierten und nicht infizierten Zellen

Es sollte überprüft werden, ob durch den Einsatz des HDACi Apicidin die Expression des Metastase-relevanten Wirtszellfaktors *MMP9* beeinflusst wird. Dazu wurde anhand von qRT-PCR-Analysen die Transkriptionsrate des *MMP9*-Gens in Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen in Relation zur mRNA-Expressionsrate in Zellen des Kontrollansatzes ermittelt und als Referenz die Transkriptionsrate des bovinen Gens *ACTR3* herangezogen. Die aus drei Experimenten erhaltenen Werte sind in Abbildung 23 dargestellt und zeigen, dass durch die sechstägige Einwirkung von 25 nM Apicidin die Transkription des *MMP9*-Gens gesteigert wurde. Des Weiteren konnte unter Verwendung eines zweiten, bovinen Referenzgens ebenfalls eine erhöhte *MMP9* mRNA-Expression in den Apicidin-behandelten Zellen detektiert werden (Anhang 9.1.8).

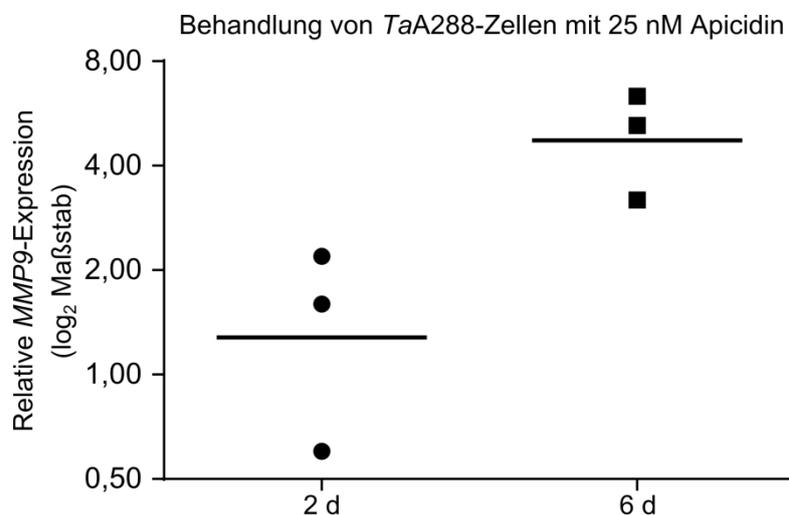


Abbildung 23 Relative Expressionsanalyse des *MMP9*-Gens in *TaA288*-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 2 Tage bzw. 6 Tage bei 37 °C Das *MMP9* mRNA-Level wurde gegen das mRNA-Level des Referenzgens *ACTR3* normalisiert. Das Diagramm stellt die mit qRT-PCR gemessenen mRNA-Expressionsraten des *MMP9*-Gens in den Apicidin-behandelten Zellen relativ zu den Expressionen in den Kontrollzellen („1“) der Lösemittelkontrolle aus drei Experimenten dar.

Zudem wurde untersucht, ob Apicidin einen Effekt auf die *MMP9* mRNA-Expression in einer bovinen Zelllinie ausübt, die keine *T. annulata* Parasiten enthält. Dazu wurden BoMac (*bovine macrophage*; BoMac)-Zellen bei 37 °C in Apicidin-haltigem Medium für zwei bzw. sechs Tage inkubiert, geerntet und aus den RNA-Isolaten die cDNA generiert.

Anschließend wurde versucht mittels PCR-Analyse die *MMP9* mRNA in den BoMac-Zellen nach Apicidin-Behandlung und in den Kontrollansätzen nachzuweisen. Dies gelang weder mittels Amplifikationsreaktionen im Lightcycler® (qRT-PCR) noch mithilfe konventioneller PCR-Technik. Das Ergebnis einer konventionellen PCR kann der Abbildung 24 entnommen werden. Die Detektion der mRNA des Referenzgens *ACTR3* in den BoMac cDNA-Ansätzen erfolgte problemlos und der entsprechende genomische Abschnitt des *MMP9*-Gens konnte mithilfe der für die qRT-PCR verwendeten *MMP9* Primer (binden innerhalb eines Exons) amplifiziert werden. Daher wurde vermutet, dass die BoMac-Zellen der Kontrollansätze keine detektierbaren Mengen an *MMP9* mRNA transkribiert und der Gehalt an *MMP9* mRNA nicht durch Einwirkung des Apicidins erhöht werden kann.

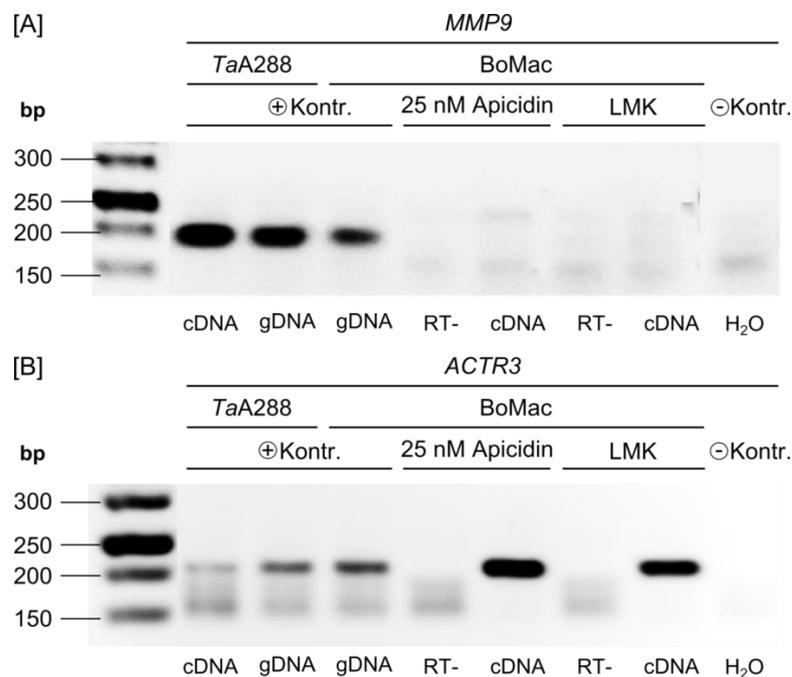


Abbildung 24 *MMP9* mRNA Nachweis in Apicidin-behandelten und unbehandelten BoMac-Zellen Die Behandlung der BoMac-Zellen erfolgte für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel bei 37 °C. Nach Isolation und Umschreiben der RNA wurden eine konventionelle PCR unter Verwendung von *MMP9* [A]- bzw. *ACTR3* [B]-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt und anschließend wurden die resultierenden PCR-Produkte gelelektrophoretisch in einem 4 % HighPure Agarosegel aufgetrennt. Als Laufreferenz wurde der 50 bp Größenmarker von Invitrogen® verwendet. Als Positivkontrolle wurde als Template genomische DNA von unbehandelten TaA288- bzw. BoMac-Zellen eingesetzt sowie TaA288 cDNA. Als Negativkontrollen wurden in die PCR bidestilliertes Wasser bzw. cDNA-Ansätze ohne Reverse Transkriptase appliziert. LMK: Lösemittelkontrolle; gDNA: genomische DNA; cDNA: komplementäre DNA; RT-: RT-Minuskontrolle; ⊕ Kontr.: Positivkontrolle; ⊖ Kontr.: Negativkontrolle; bp: Basenpaare.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.2.4

Apicidin erhöht die Transkription des bovinen *MMP9*-Gens in *T. annulata*-infizierten Zellen (TaA288), jedoch nicht in bovinen Kontrollzellen (BoMac). Wahrscheinlich beeinflusst die Behandlung mit Apicidin die parasitenabhängige Expression des bovinen *MMP9*-Gens.

5.3 HDAC-Inhibitionsexperimente mit *T. annulata*-infizierten Zellen der Linien Ta#868 und Ta#173

Aus dem Abschnitt 5.2 wird ersichtlich, dass der HDAC-Inhibitor Apicidin die Expression von Differenzierungsmarkern und eines virulenzassoziierten Wirtszellfaktor in *T. annulata*-infizierten Zellen beeinflussen kann. Demnach lässt sich vermuten, dass HDACs im Attenuierungsprozess bzw. bei der Abschwächung des Differenzierungspotenzials des *T. annulata* Parasiten eine Funktion einnimmt und während der Langzeitkultivierung einer veränderten Genexpression unterliegt. Um die durch eine Langzeitkultivierung bedingte Expression an Parasiten-HDACs in *T. annulata*-infizierten Zellen untersuchen zu können, wurden Zellen niedriger und höherer Passagen (Passage; p) benötigt. Da für die TaA288-Zellen keine niedrig passagierten oder intermediären Passagen zur Verfügung standen, wurden niedrig passagierte und hoch passagierte *T. annulata*-infizierte Zellen der Linien Ta#868 und Ta#173 verwendet (Abschnitt 3.6.1-3.6.2)

5.3.1 Charakterisierung der *MMP9* Expression in *T. annulata*-infizierten Leukozyten der Linie Ta#868

Die Gruppe um V. Shkap (Veterinary Services and Animal Health; Bet Dagan; ISR) isolierte *T. annulata*-infizierte Zellen aus einem mit einem virulenten Parasitenstamm infizierten Tier (Kalb #868), das starke Anzeichen einer Tropischen Theileriose zeigte (Tabelle 7). Diese *T. annulata*-infizierten Leukozyten wurden freundlicherweise für die vorliegende Arbeit bereitgestellt und werden im folgenden Text kurz als Ta#868-Zellen bezeichnet. Jedoch standen zur Untersuchung des Attenuierungsprozesses keine hoch passagierten, attenuierten Ta#868-Zellen zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Zellen, wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben, kontinuierlich in Zellkultur gehalten und nach fünf bis fünfzehn Passagen ein Aliquot kryokonserviert. Die so nach Langzeitkultivierung selbst hergestellten höher passagierten Ta#868-Zellen wurden nicht im Kalb getestet. Um dennoch abschätzen zu können, ob sich die höher passagierten Ta#868-Zellen in einem Attenuierungsprozess befinden, wurde der *MMP9* mRNA-Gehalt bestimmt, denn im Laufe der Attenuierung wird die Transkription des bovinen *MMP9*-Gens reduziert¹¹⁴. Dazu wurden die Ta#868-Zellen der Passagen 10, 41 und 106 zwei Tage vor der Ernte mit gleicher Zellanzahl ausgesät und unter herkömmlichen Bedingungen angezogen. Nach der Zellernte wurde aus den Zellen die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine qRT-PCR durchgeführt (Abschnitt 4.3.2). Die erhaltenen relativen mRNA-Expressionsunterschiede des bovinen *MMP9*-Gens sind in Abbildung 25 dargestellt. Die relative Quantifizierung der Transkripte erfolgte nach der Berechnung von Livak und Schmittgen *et al.* 2001¹⁸⁶, wobei die *MMP9* mRNA-

Expressionsänderungen in *Ta#868*-Zellen der Passagen 41 und 106 immer im Verhältnis zur mRNA-Expression in den Zellen der niedrigen Passage 10 aufgeführt wurden. Die Transkriptionsrate des *MMP9*-Gens in Zellen der niedrigen Passage war im Vergleich zur Transkriptionsrate in höher passagierten Zellen 12-mal (p41) bzw. 15-mal (p104) höher. Die Messung wurde viermal durchgeführt und zur Normalisierung diente die Transkriptionsrate des bovinen Referenzgens *ACTR3*. Eine statistische Analyse ergab, dass die *MMP9*-Transkription in den *Ta#868*-Zellen der Passagen 41 und 106 relativ zur Transkription in den Zellen der Passagen 10, signifikant reduziert war. Des Weiteren konnte diese signifikante Reduktion unter Einbeziehung eines zweiten, bovinen Referenzgens bestätigt werden. Die Daten sind im Anhang 9.1.9 dargestellt.

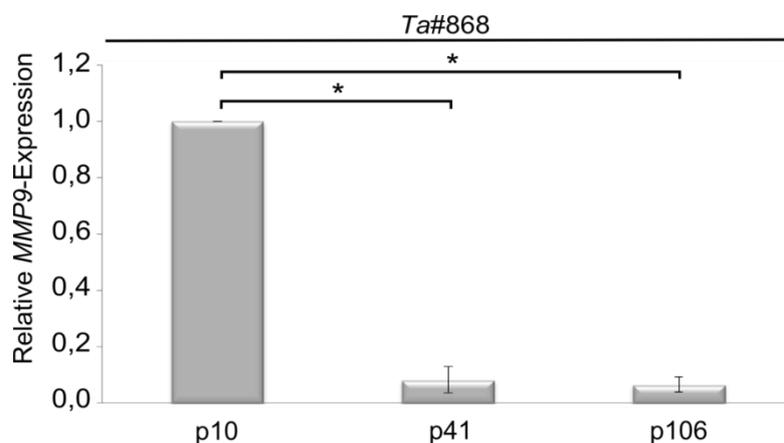


Abbildung 25 Relative Quantifizierung der bovinen *MMP9*-Transkripte in *Ta#868*-Zellen der Passagen 10 (p10), 41 (p41) und 106 (p106) Das *MMP9* mRNA-Level wurde gegen das mRNA-Level des bovinen *ACTR3* Referenzgens normalisiert. Im Histogramm dargestellt sind die Mittelwerte \pm StdAbw der bovinen *MMP9* mRNA-Expression in den Zellen der Passagen 41 und 106, relativ zur mRNA-Expression in den Zellen der Passage 10 ("1") aus vier unabhängigen Experimenten. Der signifikante Unterschied nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ wurde durch einen Asterisk dargestellt.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.3.1

Während dieser Arbeit eigens höher passagierte, befallene Zellen zeigten eine reduzierte *MMP9* mRNA-Expression. Somit kann angenommen werden, dass sich die *T. annulata*-infizierten Zellen der Linie *Ta#868* (p41, p106) in einem Attenuierungsprozess befinden.

5.3.2 Charakterisierung der *in vitro* Differenzierungsfähigkeit von *T. annulata* in *Ta#868*-Zellen

Im Abschnitt 2.7.1 wurde bereits verdeutlicht, dass im Laufe der Langzeitkultivierung die Fähigkeit des Schizonten sich zu Merozoiten zu differenzieren abnimmt¹³⁴. Die Schizonten der *Ta#868*-Zellen einer hohen Passage müssten demnach ein reduziertes Differenzierungspotenzial aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden die Schizonten der Passagen 13 und 85 hinsichtlich ihrer Fähigkeit sich zu Merozoiten zu differenzieren

analysiert. Dazu wurde für beide Passagen die gleiche Anzahl von Ta#868-Zellen ausgesät und für 6 Tage bei 37 °C bzw. 41 °C inkubiert. Es wurde bereits erwähnt, dass durch die Inkubation niedrig passagierter *T. annulata*-infizierter Leukozyten bei 41 °C (simuliert die Fieberreaktion eines infizierten Tieres) die Merogonie des Schizonten ausgelöst werden kann (Abschnitt 2.7.1)¹⁹⁴. Bereits nach 6 Tagen konnten Shiels *et al.* 1994 ein Merozoiten-spezifisches Protein, das TaMR1, mittels *Western Blot*-Analyse nachweisen¹³⁶. Aus diesem Grund wurden die Zellen entsprechend der Beschreibung in den Abschnitten 4.2.2 und 4.4.1 geerntet und aufgeschlossen und die erhaltenen Rohextrakte in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 4.4.3–4.4.6). Zur Detektion des TaMR1 diente ein Kaninchenantiserum (Abschnitt 4.4.7). Die Ergebnisse der Immunblots sind in Abbildung 26 dargestellt. Es wurden neben dem spezifischen TaMR1-Signal auch unspezifische Signale detektiert, vermutlich aufgrund des Einsatzes von nicht aufgereinigtem TaMR1-Antiserum. Dennoch ergab die Analyse der Ta#868-Zellen nach einer 6-tägigen Inkubation bei 41 °C, dass die Präparate der Passage 13 ein signifikant stärkeres TaMR1-Signal aufwiesen als die der Passage 85. Der Gehalt an TaMR1 in Ta#868-Zellen der Passage 85 war gegenüber niedrig passagierten, virulenten Ta#868-Zellen fünffach reduziert. Für die Ta#868 Zellpräparate der Passage 13 wurde ein zweites Signal erhalten, wobei es sich um ein Degradationsprodukt von TaMR1 handeln könnte. In den Präparaten der Ta#868-Zellen der Passagen 13 und 85, die bei 37 °C angezogen wurden, ließ sich dagegen nur ein sehr schwaches TaMR1 bzw. kein TaMR1-Signal detektieren. Die *Western Blots* wiesen bei den Zellpräparaten der Passage 13 eine dünne Bande für TaMR1 auf. Anscheinend fand Merogonie in den Schizonten der niedrig passagierten Ta#868-Zellen *in vitro* auch bei 37 °C statt. Dabei lag die TaMR1-Signalstärke dicht an der Nachweisgrenze. Nach einer densitometrischen Bestimmung der Bandendichte und anschließender statistischer Auswertung ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen dem TaMR1-Signal der Ta#868 p13 Zelllysate und den Signalen der Ta#868 p85 Zellpräparate bei 37 °C.

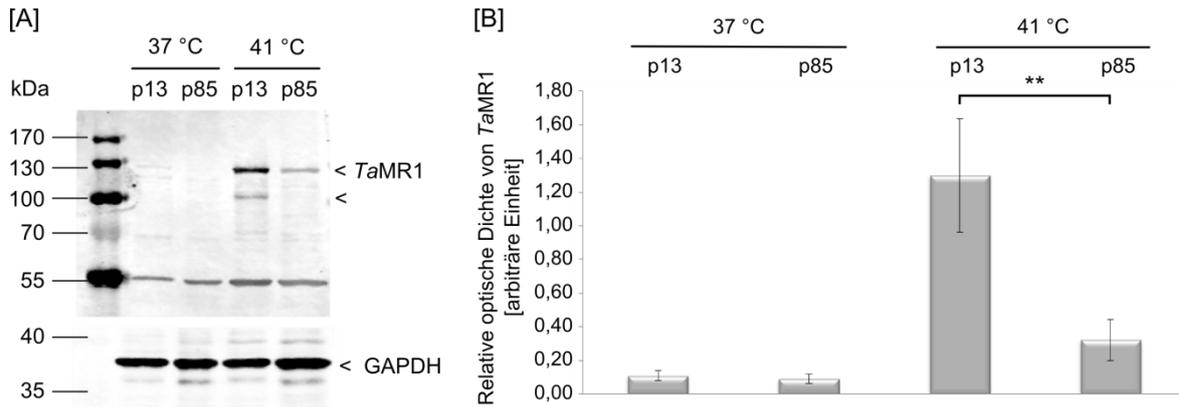


Abbildung 26 Untersuchung der *TaMR1*-Expression in niedrig und hoch passagierten *Ta#868*-Zellen bei 37 °C und nach einer *in vitro* simulierten Fieberreaktion (41 °C) [A] Die *Ta#868*-Zellen der Passagen 13 (p13) und 85 (p85) wurden bei 37 °C bzw. für 6 d bei 41 °C inkubiert. Diese Zellen wurden mittels SDS PAGE und *Western Blot* auf die Expression des Merogoniemarkers *TaMR1* getestet. Die Immundetektion des *TaMR1* erfolgte mittels α *TaMR1* und α K IRDye[®] 680RD. Die Detektion der Referenzzielstruktur erfolgte mittels α GAPDH und α M IRDye[®] 800CW. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils 12,5 μ g des Gesamtproteins in einem 10 % SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. [B] Die densitometrische Auswertung der *TaMR1*-Expression erfolgte mithilfe des ImageJ-Programms. Im Histogramm dargestellt sind die Mittelwerte \pm StdAbw aus den Quotienten der optischen Dichte des *TaMR1*-Signals relativ zum Signal der GAPDH-Referenz. Die Werte waren nach Shapiro-Wilk normalverteilt und wurden mittels des Student'schen t-Tests statistisch ausgewertet. Signifikanz: $p \leq 0,01$ (**).

Shiels *et al.* 1992, 1994 hatten gezeigt, dass die Ausbildung der Rhoptrienanlagen der Merozoiten und somit die Expression des *TaMR1* zu einem späten Zeitpunkt der Merogonie erfolgt. Dagegen wird ein anderes Merozoiten-spezifisches Protein, das *TaMS1*, zu einem früheren Zeitpunkt der Merogonie verstärkt exprimiert^{26,136}. Um zu überprüfen, ob in den niedrig passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen die *TaMS1*-Expression bei 37 °C und 41 °C höher ist als bei den hoch passagierten *Ta#868*-Zellen, wurde die gleiche Anzahl an *Ta#868*-Zellen ausgesät und für 6 Tage bei 37 °C bzw. 41 °C inkubiert. Anschließend wurden die *Ta#868*-Zellen mithilfe der ICW-Methodik hinsichtlich ihrer *TaMS1*-Expression analysiert. Die erhaltenen relativen *TaMS1*-Fluoreszenzen sind in Abbildung 27 wiedergegeben. Die Intensität des *TaMS1*-Fluoreszenzsignals in den bei 41 °C inkubierten *Ta#868*-Zellen der Passage 15 war signifikant stärker als in den entsprechenden Pendanten (*Ta#868* p90; 41 °C). Bei 41 °C war die *TaMS1*-Expression in den Zellen der Passage 15 gegenüber den hoch passagierten *Ta#868*-Zellen etwa dreimal so hoch. Die Zellen der Passage 15, die bei 37 °C inkubiert wurden, wiesen ein schwaches *TaMS1*-Signal auf. Dieses Signal war im Durchschnitt dreimal höher als in den Zellen der Passage 90. Zudem ähnelt das *TaMS1*-Fluoreszenzsignal der Zellen der Passagen 90, die bei 37 °C inkubiert wurden, dem Hintergrundsignal der Sekundärantikörperkontrolle. Dies wird in der Abbildung 27[A] verdeutlicht. Jedoch ergab sich nach einer statistischen Analyse der scheinbaren *TaMS1*-Signale kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der *Ta#868*-Zellen der Passage 15 und 90, die bei 37 °C kultiviert wurden.

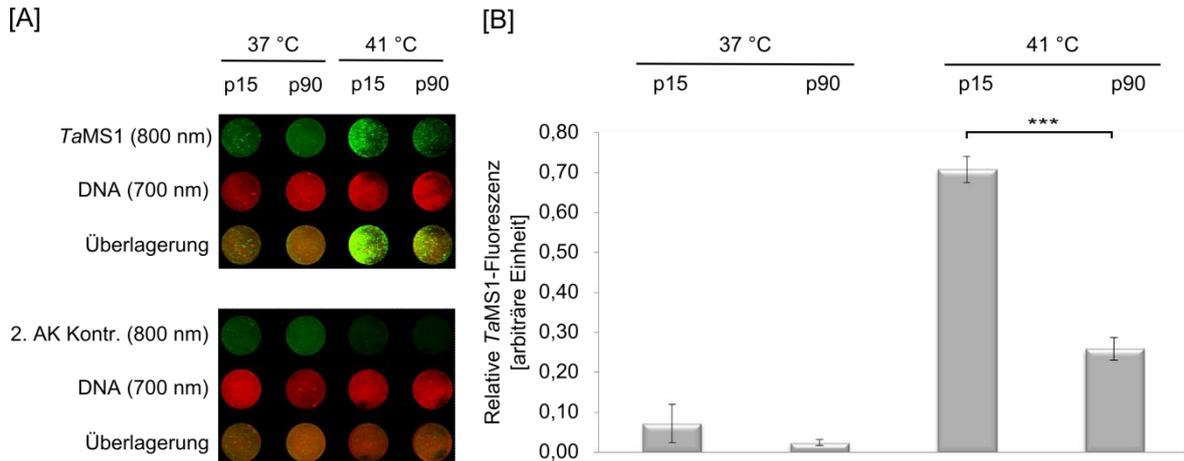


Abbildung 27 Untersuchung der TaMS1-Expression in niedrig und hoch passagierten Ta#868-Zellen bei 37 °C und 41 °C [A] Repräsentative *wells* einer ICW-Analyse zum Nachweis des Merogoniemarkers TaMS1 in Ta#868-Zellen der Passagen 15 (p15) und 90 (p90) nach Inkubation bei 37 °C bzw. 41 °C für die Dauer von 6 Tagen. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte transferiert. Anschließend wurden die Zellen mit α TaMS1 und α M IRDye[®] 800CW gefärbt. Darunter sind die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörperkontrollen (2. AK Kontr.) abgebildet. [B] Aus den resultierenden Fluoreszenzsignalen für TaMS1 bei 800 nm und des DNA-Farbstoffs bei 700 nm wurde, wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben, die relative TaMS1-Fluoreszenz ermittelt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm StdAbw sind im Histogramm dargestellt. Die resultierenden Daten waren nach Shapiro-Wilk normalverteilt, deswegen wurde zur statistischen Auswertung der Student'sche t-Test verwendet. Signifikanz: $p \leq 0,001$ (***).

Die in der Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellten Daten deuten darauf hin, dass einige Ta#868 Schizonten der niedrigen Passage (p15) sich *in vitro* selbst unter für die Merogonie nicht induzierenden Bedingungen, d. h. bei 37 °C zu Merozoiten differenzieren. Um dies bestätigen zu können, wurden Ta#868-Zellen der Passage 20 und der Passage 90 auf sterile Deckgläschen ausgesät und über Nacht wie gewohnt bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend, wie im Abschnitt 4.2.3 beschrieben gefärbt, um das Merozoitenprotein TaMR1 und das für den Makroschizonten typische TaSP zu detektieren. Ein repräsentatives Ergebnis der IF-Färbungen ist in Abbildung 28 dargestellt und zeigt das Vorkommen von zu Merozoiten differenzierenden Ta#868 Schizonten in einer 37 °C Kultur. Im sich entwickelnden Mikroschizonten kann das TaMR1-Protein nachgewiesen werden (weißer Pfeil). Im Gegensatz dazu wies der verbliebene, durch das TaSP angefärbte Makroschizont kein TaMR1-Fluoreszenzsignal auf (gelber Pfeil).

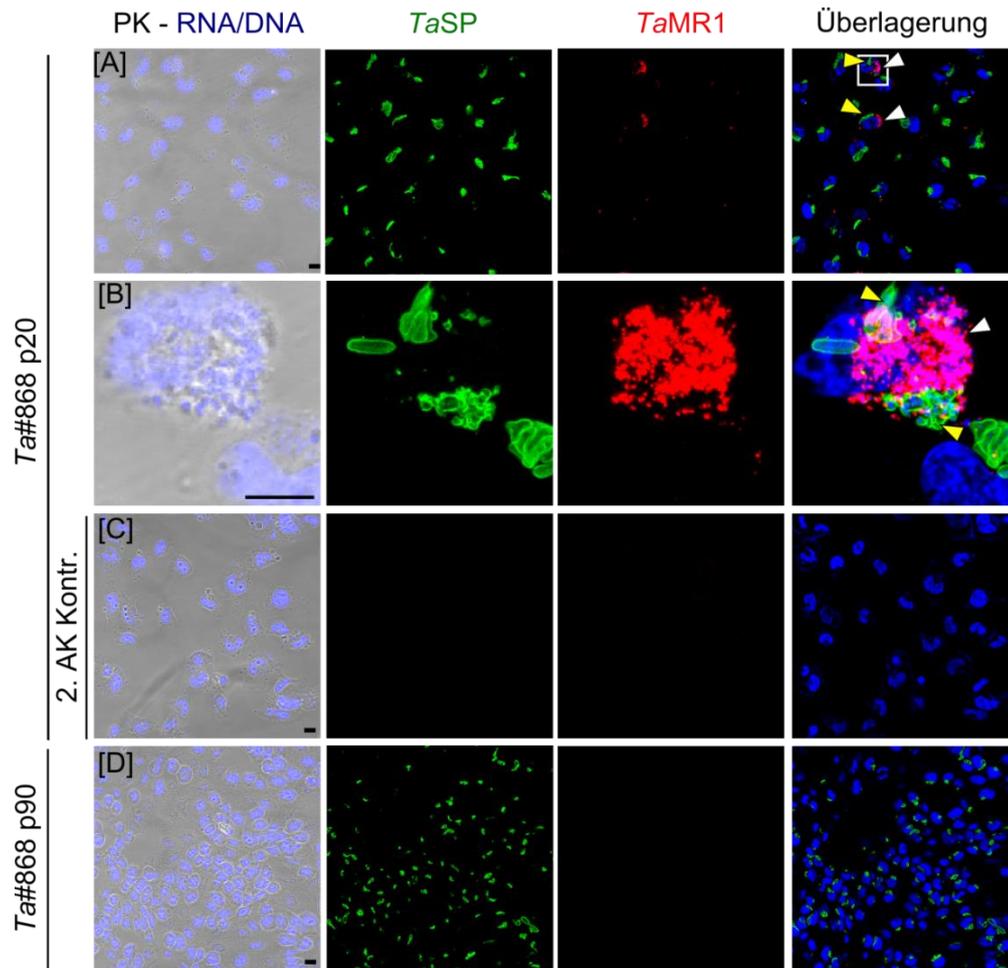


Abbildung 28 TaMR1 Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz in Ta#868-Zellen bei 37 °C
 Verwendet wurden Ta#868-Zellen der Passagen 20 [A]-[C] und 90 [D], die bei 37 °C angezogen wurden. Die Ta#868-Zellen wurden auf runde Deckgläschen in eine 24er Mikrotiterplatte ausgesät. Anschließend wurden alle Präparate im Medium fixiert, permeabilisiert und folgende Zielstrukturen angefärbt: TaMR1 (M α TaMR1; Z α M Alexa Fluor[®] 568), TaSP (K α TaSP; Z α K Alexa Fluor[®] 488) und Nucleinsäuren (DAPI). Bei der Sekundärantikörperkontrolle (2. AK Kontr.) wurden nur Blockierungsreagenz, die genannten Sekundärantikörper und DAPI zur Färbung verwendet [C]. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Der Größenbalken entspricht 10 μ m. Die Detailaufnahme [B] gibt die Maximalprojektion eines Bildstapels wieder und zeigt einen Bildausschnitt aus [A]. PK: Phasenkontrast; \blacktriangleright TaMR1 (Mikroschizont/Merozoiten); \blacktriangleright TaSP (Makroschizonten-„Restkörper“).

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.3.2

1. Ta#868-Zellen einer niedrigen Passage zeigten eine hohe Expression an TaMR1 und TaMS1 nach Inkubation bei 41 °C. Im Vergleich dazu war die Expression an TaMR1 und TaMS1 in den Ta#868-Zellen einer höheren Passage geringer.
2. Im Gegensatz zu den hoch passagierten Zellen konnte in den niedrig passagierten Zellen bei 37 °C ein schwaches TaMR1 bzw. TaMS1-Signal nachgewiesen werden. Zudem ließ sich anhand der IF-Färbungen zeigen, dass Merozoitenbildung auch bei einer 37 °C Kultur aus niedrig passagierten Ta#868-Zellen vorkommt.

Durch die Langzeitkultivierung wird anscheinend das Potenzial des intrazellulären Ta#868 Makroschizonten, *in vitro* in Merozoiten überzugehen, abgeschwächt.

5.3.3 Genexpressionsanalyse von *T. annulata* HDACs in infizierten Zellen unterschiedlicher Passagierung der Linien Ta#868 und Ta#173

Die mRNA-Expressionen von Apicomplexa HDACs können auf transkriptioneller Ebene reguliert werden^{169,199}. Aufgrund dessen wurde die mRNA-Expression von *T. annulata* HDACs im Laufe der Langzeitkultivierung der *T. annulata*-infizierten Zellen der Linien Ta#868 und Ta#173 untersucht. Die *T. annulata*-infizierten Zellen der Linien Ta#173 wurden ebenfalls freundlicherweise von V. Shkap (Veterinary Services and Animal Health; Bet Dagan; ISR) bereitgestellt. Es wurden nicht attenuierte, niedrig passagierte *T. annulata*-infizierte Zellen und attenuierte, hoch passagierte *T. annulata*-infizierte Zellen der Linie Ta#173 erhalten (Tabelle 8, Tabelle 9). Für die qRT-PCR Analyse wurden die Ta#868 und die Ta#173-Zellen zwei Tage vor der Ernte mit gleicher Zellanzahl ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die mRNA aus den geernteten Zellen isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 4.2.2 und 4.3.2). Die Gene der Histondeacetylasen *TaHDAC I*, *TaHDAC II^{PK}*, *TaHDAC II^{ANK}* und *TaSIR2* wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich bestehender Unterschiede in ihrer mRNA-Expression zwischen Schizonten von niedrig passagierten bis hoch passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen der Linie Ta#868 bzw. Ta#173 untersucht. Zur Berechnung der Expressionsunterschiede wurde gegen das *T. annulata* *RBL11* Gen normalisiert. Die relative Quantifizierung der HDAC-Transkripte und die statistische Auswertung nach mindestens drei Messungen erfolgte nach der Methode von Livak und Schmittgen *et al.* 2001 bzw. Pfaffl *et al.* 2002^{181,186}. Die Ergebnisse können der Abbildung 29 entnommen werden, dort sind die Expressionsänderungen der HDAC mRNA in Ta#868 bzw. Ta#173-Zellen der höheren Passagen, immer in Relation zur Expression in Zellen der niedrigen Passage (Ta#868 p10 bzw. Ta#173 p26), angegeben. Die roten Linien indizieren eine Hochregulation bzw. Runterregulation um den Faktor zwei. Demnach wiesen die HDACs, bis auf eine HDAC, keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Zellen der niedrigen und hohen Passagen auf. Lediglich die Histondeacetylase *TaHDAC II^{PK}* war in den Ta#868-Zellen der Passage 106 im Vergleich zur Passage 10 signifikant um den Faktor 2,2 reduziert. Diese signifikante Reduktion der *TaHDAC II^{PK}* mRNA-Expression konnte unter Einbeziehung eines zweiten *T. annulata* Referenzgens bestätigt werden. Die Daten sind im Anhang 9.1.10 aufgeführt.

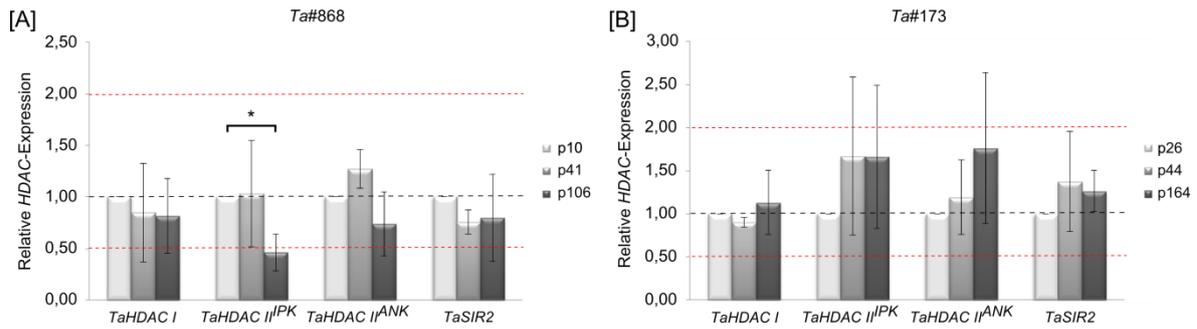


Abbildung 29 Relative Quantifizierung der *T. annulata* HDACs mRNA Relative Quantifizierung der *TaHDAC I*, *TaHDAC II^{IPK}*, *TaHDAC II^{ANK}*- und *TaSIR2*-Transkripte in *Ta#868*-Zellen der Passagen 10 (p10), 41 (p41) und 106 (p106) [A] und *Ta#173*-Zellen der Passagen 26 (p26), 44 (p44), 164 (p164) [B]. Der mRNA-Gehalt der vier HDACs wurde jeweils gegen das mRNA-Level des *T. annulata* Referenzgens *RBL11* normalisiert. Im Histogramm dargestellt sind die Mittelwerte \pm StdAbw der Transkriptionsänderungen der *T. annulata* HDACs aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Der signifikante Unterschied nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ wurde durch einen Asterisk dargestellt. --- Expressionsänderung um den Faktor 2; --- kein Unterschied in der mRNA-Expression.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.3.3

Die Untersuchungen der *T. annulata* HDACs-Transkripte in niedrig passagierten bis zu hoch passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen zeigten bis auf eine Ausnahme keine Änderungen. Lediglich die *TaHDAC II^{IPK}* war in den *Ta#868* p106 Zellen im Vergleich zu den *Ta#868* p10 signifikant reduziert.

5.3.4 Wirkung von Apicidin auf *T. annulata*-infizierte Zellen der Linie *Ta#868* hinsichtlich der Merozoitenmarkerexpression

Die *T. annulata*-infizierten Leukozyten verschiedener Isolate können sich in ihren Merkmalen unterscheiden und Erkenntnisse, die auf Experimenten mit nur einer *T. annulata* Zelllinie basieren, gelten nicht zwingend für ein anderes Isolat. Aus diesem Grund wurde der Effekt des HDACi Apicidins auf die Expression der Merozoitenantigene *TaMS1* und *TaMR1* in *T. annulata*-infizierten Leukozyten der Linie *Ta#868* untersucht, um die Beobachtungen der Inhibitionsstudie, bei der *TaA288*-Zellen verwendet wurden, zu bestätigen (Abschnitt 5.2). Hierfür wurden in dem Medium eine Endkonzentration von 25 nM Apicidin eingestellt und anschließend die *Ta#868*-Zellen der Passagen 20 und 118 bei 37 °C bzw. 41 °C für 6 Tage inkubiert. Als Lösemittelkontrolle dienten *Ta#868*-Zellen, in deren Kulturmedium die entsprechende Menge DMSO gegeben wurde. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Expression des Merozoitenmarkers *TaMS1* mittels ICW (Abbildung 30). Die Analysen ergaben, dass Apicidin die *TaMS1*-Expression in *Ta#868* p20 Zellen der 37 °C Kultur um den Faktor 1,64 signifikant steigerte. Die Expression von *TaMS1* in *Ta#868*-Zellen der Passage p118 bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C war nach Behandlung mit 25 nM Apicidin um den Faktor 1,57 ebenfalls signifikant erhöht. Darüber hinaus ergab sich kein signifikanter *TaMS1*-Expressionsunterschied für die *Ta#868*-Zellen der Passage 20 bei 41 °C durch die Behandlung mit Apicidin. In den

Ta#868-Zellen der Passage 118, die bei 37 °C angezogen wurden, konnte kein TaMS1 nachgewiesen werden. Dies veranschaulichen die Sekundärantikörperkontrollen, die im Anhang 9.1.11 dargestellt sind.

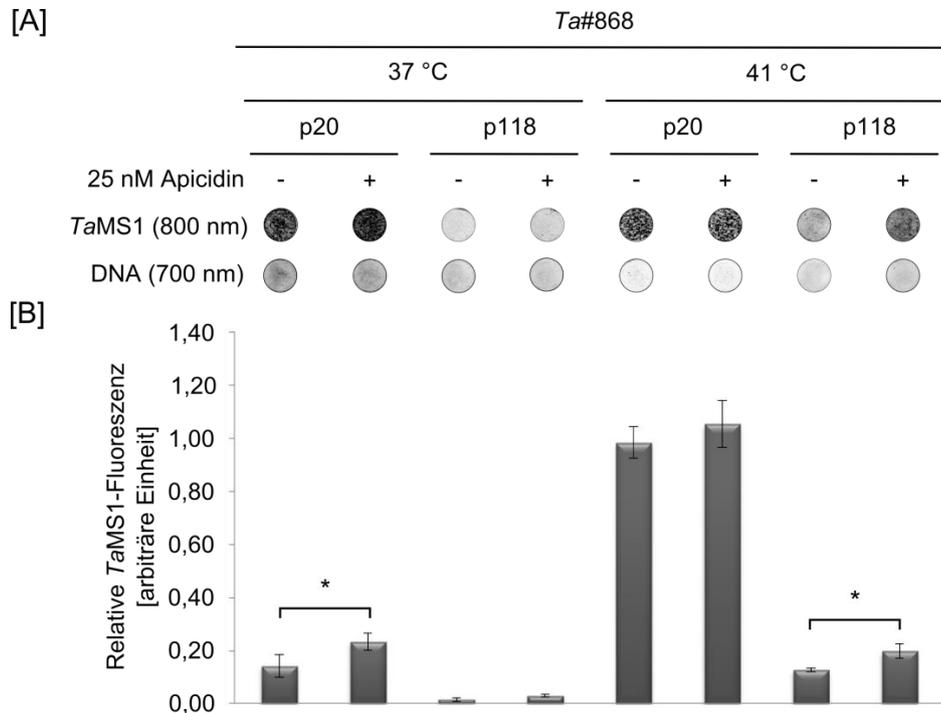


Abbildung 30 Untersuchung der Apicidin-abhängigen TaMS1-Expression in niedrig und hoch passagierten Ta#868-Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C [A] Repräsentative wells eines ICW zum Nachweis des Merogoniemarkers TaMS1 in Apicidin-behandelten Ta#868-Zellen der Passagen 20 (p20) und 118 (p118). Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in der Legende indiziert, für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO bei 37 °C oder 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte transfertiert. Anschließend wurden die Zellen mit α TaMS1 und Z α M IRDye[®] 800CW gefärbt. [B] Aus dem resultierenden 800 nm Fluoreszenzsignal (TaMS1) und der 700 nm Fluoreszenz (DNA) wurde, wie im Abschnitt 4.5.3 beschrieben, die relative TaMS1-Fluoreszenz ermittelt. Die Mittelwerte \pm StdAbw aus drei unabhängigen Experimenten sind im Histogramm dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der Student'sche t-Test verwendet, nachdem mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests die Normalverteilung der Stichproben ermittelt wurde. Signifikanz: $p \leq 0,05$ (*).

Synchron zur TaMS1-Expressionanalyse wurden die Apicidin-behandelten Ta#868-Zellen hinsichtlich ihrer TaMR1-Expression analysiert. Die erhaltenen relativen TaMR1-Fluoreszenzen sind in Abbildung 31 dargestellt und zeigen, dass Apicidin die TaMR1-Expression in Ta#868-Zellen der Passage 20 bei herkömmlicher Inkubationstemperatur (37 °C) signifikant anhub und zwar um das 2,87-fache. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der TaMR1-Expression Apicidin-behandelter Ta#868-Zellen der Passage 20 einer 41 °C Kultur zur Lösemittelkontrolle. Nach Berücksichtigung der Sekundärantikörperkontrollen konnte weder in den Apicidin-behandelten noch in den unbehandelten Ta#868 p118 Zellen ein TaMR1-Signal in den 37 °C bzw. 41 °C Kulturen detektiert werden (2. AK. Kontr.: Anhang 9.1.11).

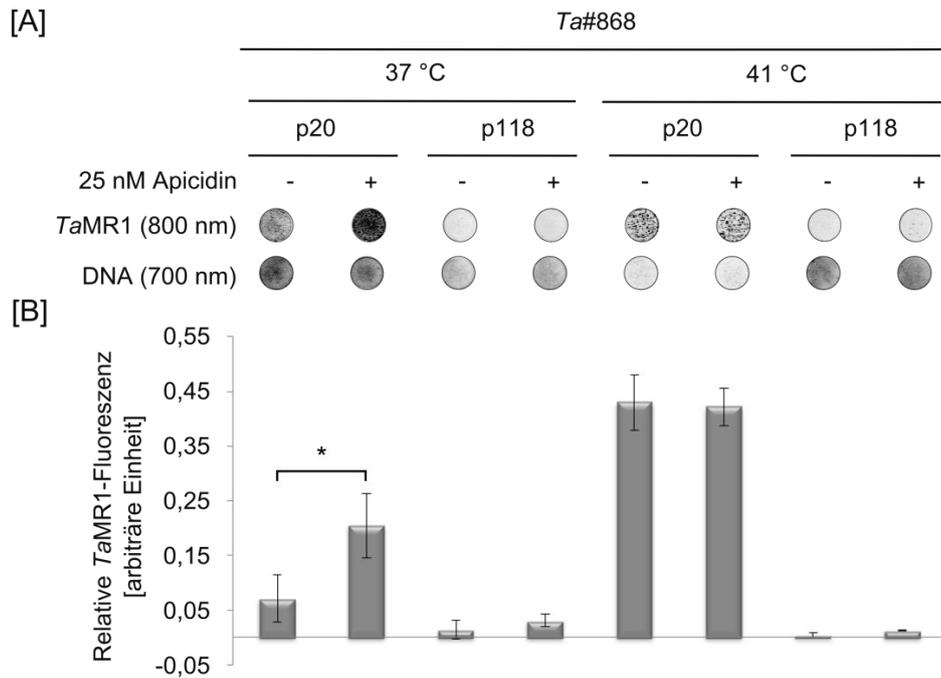


Abbildung 31 Untersuchung der Apicidin-abhängigen TaMR1-Expression in niedrig und hoch passagierten Ta#868-Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C [A] Repräsentative wells einer ICW-Analyse zum Nachweis des Merogoniemarkers TaMR1 in Apicidin-behandelten Ta#868-Zellen der Passagen 20 (p20) und 118 (p118). Die Behandlung der Zellen erfolgte bei 37 °C bzw. 41 °C, wie in der Legende angezeigt, für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Abschluss der Behandlung in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte umgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit α TaMR1 und ZαM IRDye® 800CW gefärbt. [B] Aus dem resultierenden Fluoreszenzsignal für TaMR1 bei 800 nm und des DNA-Farbstoffs bei 700 nm wurde, wie im Abschnitt 4.5.3 beschrieben, die relative TaMR1-Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sowie deren StdAbw sind im Histogramm dargestellt. Da die Stichproben nach Shapiro-Wilk normalverteilt waren, wurde zur statistischen Auswertung der Student'sche t-Test verwendet. Signifikanz: $p \leq 0,05$ (*).

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.3.4

1. Apicidin erhöht die Expression der Merozoitenmarker TaMS1 und TaMR1 in Ta#868 p20 Zellen, die bei 37 °C angezogen wurden. Jedoch nicht in Ta#868 p20 Zellen, die zusätzlich einer erhöhten Temperatur (41 °C) ausgesetzt waren.
2. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurde durch Apicidin keine TaMS1 und TaMR1-Expressionsänderung in den Ta#868-Zellen der hohen Passage herbeigeführt. Dennoch führte Apicidin bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C in hoch passagierten Ta#868-Zellen zu einer gesteigerten TaMS1 Expression. Allerdings war die TaMR1-Expression unverändert.

Anscheinend erhöht Apicidin nur bedingt die Merozoitenbildung in den experimentellen Ansätzen der Ta#868-Zellen.

5.3.5 Wirkung von Apicidin auf *T. annulata*-infizierte Zellen der Linie Ta#173 hinsichtlich der Merozoitenmarkerexpression

Ergänzend zu den HDAC-Inhibitionsexperimenten an *T. annulata*-infizierten Zellen der Linie TaA288 und Ta#868 wurde die Apicidin-abhängige TaMS1- und TaMR1-Expression

in *T. annulata*-infizierten Leukozyten der Linie Ta#173 der Passagen 32 und 170 untersucht. Um den Effekt des HDACi zu überprüfen, wurde im Medium erneut eine Endkonzentration von 25 nM Apicidin eingestellt und zum Vergleich entsprechende Lösemittelkontrollen mitgeführt. Die Ta#173-Zellen wurden bei 37 °C bzw. 41 °C für 6 Tage inkubiert. Zur Bestimmung des Expressionsverhaltens wurde wiederum die ICW-Methode angewendet (Abbildung 32). Die Untersuchungen zeigten, dass bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C Apicidin die Expression von TaMS1 in den Ta#173 p32 Zellen um den Faktor 1,4 tendenziell steigerte. Die TaMS1-Expression in den Apicidin-behandelten Ta#173 p170 Zellen der 41 °C Kultur war ebenfalls gegenüber den entsprechenden Kontrollzellen erhöht und zwar um den Faktor 2,2. Eine statistische Analyse zeigte, dass es sich dabei um einen marginal signifikanten Unterschied handelte. In den 37 °C Kulturen der Apicidin-behandelten und unbehandelten Zellen konnte kein TaMS1-Signal nachgewiesen werden (2. AK. Kontr.: Anhang 9.1.12).

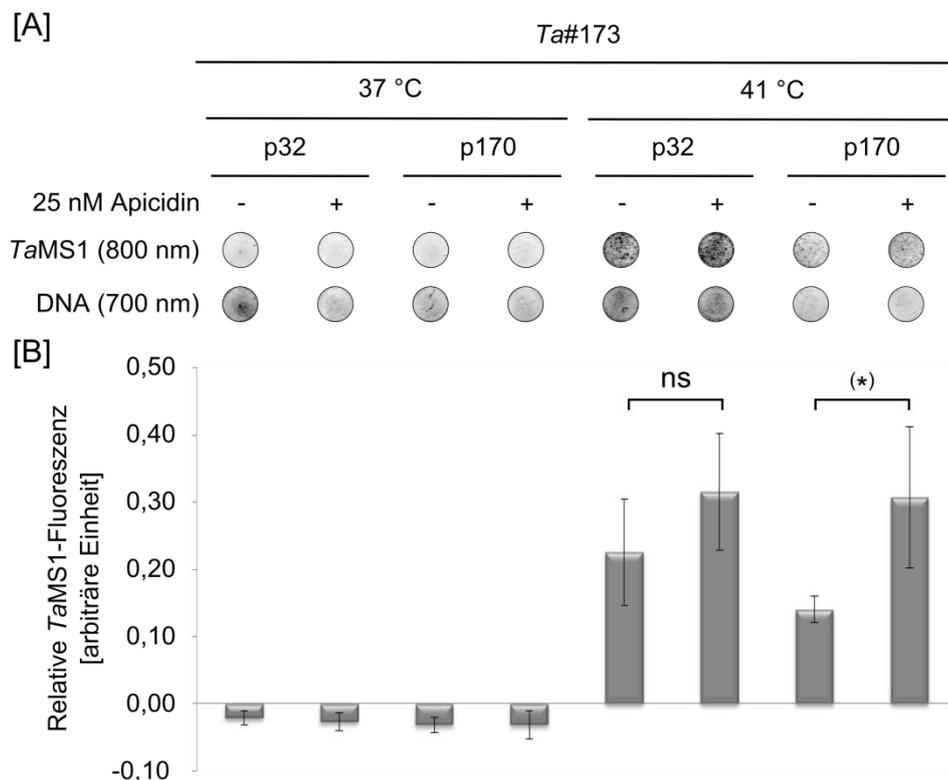


Abbildung 32 Untersuchung der Apicidin-abhängigen TaMS1-Expression in niedrig und hoch passagierten Ta#173-Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C [A] Repräsentative wells eines ICW zum Nachweis des Merogoniemarkers TaMS1 in Apicidin-behandelten Ta#173-Zellen der Passagen 32 (p32) und 170 (p170). Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in der Legende indiziert, für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel bei 37 °C bzw. 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte übertragen. Anschließend wurden die Ta#173-Zellen mit $M\alpha$ TaMS1 und $Z\alpha M$ IRDye® 800CW gefärbt. [B] Aus dem resultierenden Fluoreszenzsignal für TaMS1 bei 800 nm und des DNA-Farbstoffs bei 700 nm wurde, wie im Abschnitt 4.5.3 beschrieben, die relative TaMS1-Fluoreszenz berechnet. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm StdAbw sind im Histogramm dargestellt. Die Stichproben waren nach Shapiro-Wilk normalverteilt und zur statistischen Auswertung wurde der Student'sche t-Test verwendet. Signifikanz: $p = 0,054$ (*).

Des Weiteren wurde die TaMR1-Expression in den Ta#173-Zellen mittels ICW-Analysen untersucht. Die erhaltenen TaMR1-Expressionswerte können der Abbildung 33

entnommen werden und verdeutlichen, dass die *TaMR1*-Expression durch die sechstägige Apicidinbehandlung von *Ta#173*-Zellen bei 41 °C Kultur signifikant erhöht wurde. Die *T. annulata*-infizierten Zellen der Passage 32 zeigten nach Inkubation mit Apicidin bei 41 °C eine 2,29-fache und Zellen der Passage 170 eine 2,2-fache *TaMR1*-Expression gegenüber Zellen der Kontrollansätze. Das vermeintliche *TaMR1*-Fluoreszenzsignal der *Ta#173*-Zellen der 37 °C Kultur unterschied sich nicht vom Hintergrundsignal der Sekundärantikörperkontrollen (Anhang 9.1.12).

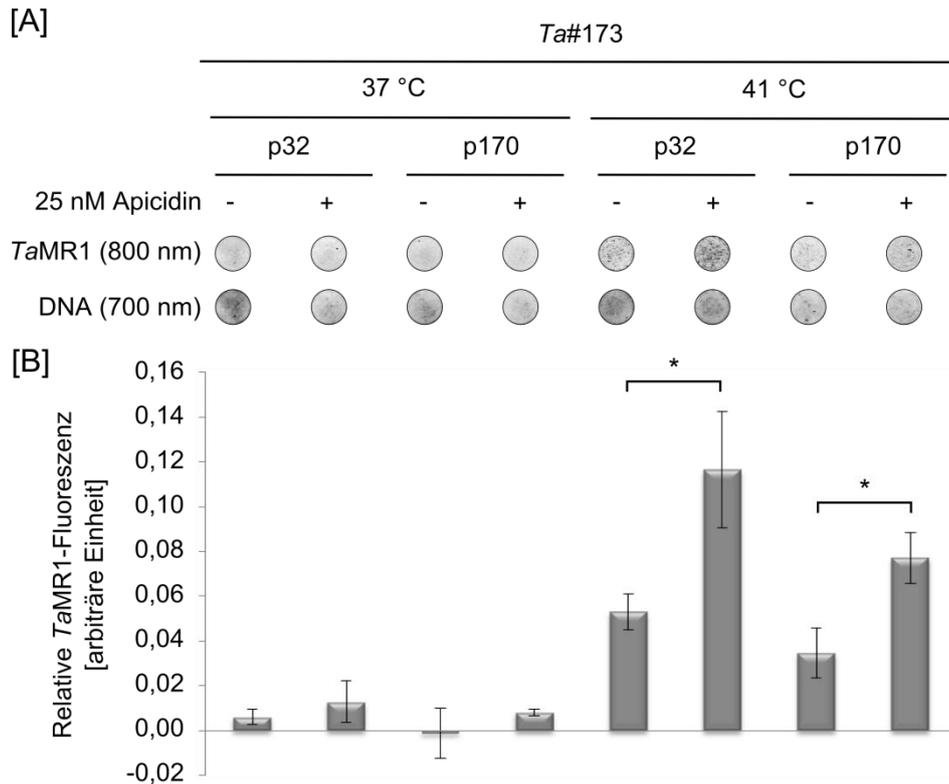


Abbildung 33 Untersuchung der Apicidin-abhängigen *TaMR1*-Expression in niedrig und hoch passagierten *Ta#173*-Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C [A] Repräsentative *wells* eines ICW zum Nachweis des Merogoniemarkers *TaMR1* in Apicidin-behandelten *Ta#173*-Zellen der Passagen 32 (p32) und 170 (p170). Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in der Legende angedeutet, für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel bei 37 °C oder 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte übertragen und mit α *TaMR1* und α M IRDye[®] 800CW gefärbt. [B] Aus dem resultierenden Fluoreszenzsignal für *TaMR1* bei 800 nm und des DNA-Farbstoffs bei 700 nm wurde die relative *TaMR1*-Fluoreszenz errechnet (Abschnitt 4.5.3). Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm StdAbw sind im Histogramm gezeigt. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet, da die Stichproben nach Shapiro-Wilk nicht normalverteilt waren. Signifikanz: $p \leq 0,05$ (*).

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 5.3.5

1. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurde durch Apicidin keine *TaMS1* und *TaMR1*-Expressionsänderung in den *Ta#173*-Zellen der niedrigen und hohen Passage herbeigeführt.
2. Bei einer erhöhten Inkubationstemperatur (41 °C) führte Apicidin zu einer tendenziell gesteigerten *TaMS1*-Expression und signifikant erhöhten *TaMR1* Expression in den *Ta#173*-Zellen der Passage 32.
3. Der Effekt des HDACi auf die attenuierten, hoch passagierten *Ta#173*-Zellen (p170) bei 41 °C gleicht dem Effekt des Apicidin auf die stark passagierten, attenuierten *TaA288*-Zellen, d. h. die Expression an *TaMS1* und *TaMR1* war stark tendenziell bis signifikant erhöht.

Eine Apicidin-Behandlung führt somit wahrscheinlich zu einer erhöhten Merozoitenbildung in einer 41 °C Zellkultur, bestehend aus nicht attenuierten, niedrig passagierten *Ta#173*-Zellen und hoch passagierten, attenuierten *Ta#173*-Zellen.

6 Diskussion

Der Apicomplexaparasit *Theileria annulata* verursacht die Tropische Theileriose im Rind. Dabei ist der Parasit im Säugerwirt in drei Differenzierungsstadien zu finden⁶. Eine Differenzierungsform, der intrazelluläre Schizont, induziert die permanente Proliferation der Wirtszelle und erlaubt die *In-vitro*-Kultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen¹³. Dabei führt eine Langzeitkultivierung von *Theileria*-infizierten Zellen zu einer Attenuierung der Parasitenvirulenz⁸² und abgeschwächten Fähigkeit des intrazellulären Schizonten sich zu Merozoiten zu differenzieren¹³⁴. Die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen sind bisher nur wenig verstanden. Diese Arbeit basiert auf der Hypothese, dass dabei epigenetische Veränderungen involviert sind. Da Histondeacetylasen (*histone deacetylase(s)*; HDAC(s)) in anderen Apicomplexa fähig sind Histone zu deacetylieren und dadurch Virulenzgene und Gene späterer Differenzierungsstadien zu reprimieren^{157,166,171,195}, wurde vermutet, dass diese Enzymgruppe bei der Attenuierung bzw. Abschwächung des Differenzierungspotenzials in *T. annulata* beteiligt ist.

6.1 Bioinformatische Sequenzanalyse von der NAD⁺-abhängigen HDAC TaSIR2 und deren Expression in unterschiedlich stark passagierten *T. annulata*-infizierten Leukozyten

Für *T. annulata* existieren vier Sequenzen, die als putative HDACs gekennzeichnet sind (geneDB). Bislang wurde jedoch erst eine putative Sequenz einer der drei vorhandenen HDAC-Klassen zugeordnet. Dabei handelt es sich um TaSIR2, eine NAD⁺-abhängige HDAC, die der Klasse III zugehört¹⁷⁴. Da es bisher keine weiteren Analysen zum TaSIR2 gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe bioinformatischer Analyse überprüft, ob es sich bei diesem Sirtuin um eine funktionale HDAC der Klasse III handeln kann. Obwohl die Sirtuin-Domäne, die die katalytische Funktion der HDAC ausmacht, innerhalb der Sirtuin-Familie variabel ist, gibt es konservierte Aminosäuren, die für den Reaktionsmechanismus und die strukturelle Integrität des Enzyms wichtig sind^{192,193,200}. Diese konnten in der Tat für TaSIR2 identifiziert werden (Abbildung 15). Im Speziellen handelte es sich um drei NAD⁺-Bindungsmotive, ein konserviertes Histidin, das laut Analyse das aktive Zentrum darstellt, und ein Sequenzmotiv, das charakteristisch für eine strukturegebende Zn²⁺-Bindestelle ist. Aufgrund von Sequenzhomologien der Motive zu *Plasmodium*-Sirtuinen, für die bereits eine Funktionalität nachgewiesen werden konnte^{171,201}, lässt sich davon ausgehen, dass auch TaSIR2 Histone deacetylieren kann.

Sirtuine spielen bei dem Apicomplexaparasiten *Plasmodium* unter anderem eine Rolle in der Regulation von Virulenzgenen, indem sie die Transkription der sogenannten *var* Gene reprimieren¹⁷¹. Da *Plasmodium* und Theilerien eine nahe Verwandtschaft aufweisen, lässt sich vermuten, dass das *TaSIR2* in der Regulation der Parasitenvirulenz involviert ist. Die Parasitenvirulenz lässt sich durch Langzeitkultivierung infizierter Zellen abschwächen, was als Attenuierung bezeichnet wird⁸². Veränderte Expressionslevel von *TaSIR2* im Laufe der Langzeitkultivierung könnten auf Deacetylierungsprozesse hinweisen, die zur Repression von Virulenzgenen führen.

Genexpressionsanalysen von niedrig bis hoch passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen (*Ta#868*, *Ta#173*) zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede für *TaSIR2* (Abbildung 29). Demzufolge führt eine verlängerte Kultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen nicht zu einer veränderten *TaSIR2* Transkription. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass es während einer Langzeitkultivierung zu einer gesteigerten HDAC-Aktivität kommt, die folglich zur Repression von Virulenzfaktoren führt, denn Sirtuine können auch auf translationaler Ebene reguliert und ihre Aktivität durch chemische Modifikationen, wie Phosphorylierung, beeinflusst werden^{202,203}.

6.2 Bioinformatische Sequenzanalyse von Zn²⁺-abhängigen HDACs von *T. annulata* und deren Expression in unterschiedlich stark passagierten *T. annulata*-infizierten Leukozyten

Neben *TaSIR2* existieren drei weitere putative HDACs für *T. annulata* (GeneDB), die bislang nicht weiter charakterisiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese putativen Enzyme den Zink(II)-Ionen(Zn²⁺)-abhängigen Histondeacetylasen zugeordnet werden, die zu den Klassen I und II gehören. Entsprechend ihrer HDAC-Klasse wurden diese wie folgt benannt: *TaHDAC I* (TA12690), *TaHDAC II^{ANK}* (TA17590) und *TaHDAC II^{IPK}* (TA18230) (Abschnitt 5.1.1; Anhang 9.1.2). Zur Identifikation funktionaler Abschnitte wurden diese HDACs mittels bioinformatischer Analyse näher charakterisiert. In jeder dieser Enzymsequenzen konnte eine Kernlokalisationssequenz identifiziert werden (Abbildung 12 - Abbildung 14). Demnach kann angenommen werden, dass diese HDACs im Parasitenkern zu finden sind, wie es bei anderen Apicomplexa HDACs der Fall ist^{157,176,199}. Da ein *shuttling* von HDACs zwischen Zytoplasma und Kern besonders für HDACs der Klasse II charakteristisch ist und auch für Apicomplexa beschrieben wurde, könnte dies auch bei *Theileria* auftreten^{169,204}.

Weiterhin zeigen die Sequenzvergleiche im Abschnitt 5.1.1, dass alle Zn²⁺-abhängigen *T. annulata* HDACs über die für den beschriebenen Deacetylierungsmechanismus

relevanten Aminosäuren verfügen^{190,191}. Demnach könnte es sich bei *TaHDAC I*, *TaHDAC II^{ANK}* und *TaHDAC II^{IPK}* um funktionale HDACs handeln. Im Falle der *T. annulata* HDAC der Klasse I spricht ebenfalls die Aminosäuresequenzidentität von über 70 % zu anderen Apicomplexa (Abschnitt 5.1.1.1) dafür, dass sie Histone deacetylieren kann, denn für *Babesia* und *Toxoplasma* wurden bereits enzymatische Aktivitäten nachgewiesen^{166,176}. Auch für die *TaHDAC II^{ANK}* gibt es homologe Apicomplexa Enzyme, deren Funktionalität bei einem Vertreter beschrieben ist¹⁶⁹.

Des Weiteren offenbaren die bioinformatischen Daten aus Abschnitt 5.1.1.2, dass die *T. annulata*-Vertreter der HDAC Klasse II neben einer prognostizierten HDAC-Domäne über weitere Motive bzw. eine weitere Domäne verfügen. Vor Kurzem wurden diese für andere Apicomplexa HDACs der Klasse II beschrieben^{168,169,205}.

So weist die *TaHDAC II^{IPK}*, ähnlich der *Plasmodium* HDAC IPK1, eine Inositolphosphatkinase(IPK)-Domäne auf. Die IPK-Domänen beider Vertreter stimmen zu 40 % überein und in der putativen IPK-Domäne des *TaHDAC II^{IPK}* lassen sich eine Substratbindestelle und katalyserelevante Aminosäuren lokalisieren (Abbildung 13, Anhang 9.1.3). Daher ist es möglich, dass dieses Enzym nicht nur Histone deacetyliert, sondern auch polyphosphorylierte Inositol (*inositol polyphosphatase(s)*; IP(s)) generiert, denn das *TaHDAC II^{IPK}* Homolog in *Plasmodium* kann aus IP₃ durch Phosphorylierung IP₄ und weitere Inositolpolyphosphate herstellen. Jedoch ist die biologische Bedeutung der *Plasmodium* IPK1 nicht aufgedeckt¹⁶⁸. So lässt sich nur vermuten, welche Aufgaben diese Domäne bzw. die gebildeten IPs bei *T. annulata* einnehmen könnten. Möglicherweise modulieren IPs die Aktivität der *T. annulata* HDACs sowie weiterer Transkriptionsmodulatoren, denn neuerdings konnte für IP₄ gezeigt werden, dass dieses Molekül die Histondeacetylaseaktivität von Säuger HDAC-Korepressorkomplexen steigern kann²⁰⁶. Des Weiteren ist bekannt, dass IPs die Aktivität von Chromatinumlagerungskomplexen beeinflussen²⁰⁷, was sich sowohl positiv als auch negativ auf Transkriptionsvorgänge auswirken kann.

Die *TaHDAC II^{ANK}* besitzt, zusätzlich zur HDAC-Domäne, am N-Terminus Motive, die in den sogenannten *ankyrin repeat* (ANK)-Proteinen vorkommen (Abbildung 14). Welche Funktion diese Motive bei Apicomplexa HDACs ausüben, ist bislang nicht beschrieben. Allerdings ist bekannt, dass *ankyrin repeat*-Module an Histonmethylierungen binden, die von Histonmethyltransferasen generiert werden²⁰⁸. Somit könnten diese ANK-Motive eine Rolle bei der Bindung von *TaHDAC II^{ANK}* an weitere epigenetische Markierungen spielen und zur Vernetzung von HDAC-Aktivität und anderen Chromatinmodifikationen beitragen.

Durch den Vergleich der Proteinsequenzen von *T. annulata* HDACs mit entsprechenden HDACs anderer Apicomplexa und Säugerenzymen konnten die putativen

Enzymaktivitäten der einzelnen Zn²⁺-abhängigen *T. annulata* HDACs identifiziert werden (Abschnitt 5.1).

Des Weiteren könnten die aufgezeigten Homologien zu anderen Apicomplexa HDACs Hinweise auf die biologische Funktion von *T. annulata* HDACs geben. Zum Beispiel reprimiert die Toxoplasma HDAC *TgHDAC3* durch Histondeacetylierungsreaktionen die Expression von Genen, die für das vorliegende Toxoplasmastadium (Tachyzoiten) nicht benötigt werden, aber dafür im darauffolgenden (Bradyzoiten)¹⁵⁷. Auch bei *T. annulata* werden Gene stadiumspezifisch exprimiert. Dies zeigt sich z. B. anhand der Merozoitenmarker (*TaMS1* und *TaMR1*), deren Expression im Makroschizontenstadium nicht nachweisbar, jedoch stark erhöht im folgenden Merozoitenstadium zu finden ist^{26,136}. Das Merozoitenstadium wird in der Regel durch die Fieberreaktion eines erkrankten Tieres induziert. Diese induktive Bedingung lässt sich in Zellkulturen durch Inkubation bei 41 °C simulieren. Auf diesem Wege konnte bei *T. annulata*-infizierten Zellen gezeigt werden, dass eine Langzeitkultivierung mit einem verringerten Differenzierungspotenzial der Schizonten einhergeht¹³⁴. Wird davon ausgegangen, dass *TaHDAC I* analog zur *TgHDAC3* Gene, welche für das vorliegende Parasitenstadium nicht benötigt werden, reprimiert, so könnte *TaHDAC I* zur Reduktion des Makroschizonten-Differenzierungspotenzials beitragen.

Vergleichende *TaHDAC I* Genexpressionsanalysen zeigten in *T. annulata*-infizierten Zellen (*Ta#173* und *Ta#868*), dass die Langzeitkultivierung keinen Einfluss auf die Expression von *TaHDAC I* hat (Abbildung 29). Da jedoch die Enzymaktivität von HDACs durch bspw. posttranslationale Modifikationen gesteigert werden kann²⁰⁹, ist es denkbar, dass durch die Langzeitkultivierung die *TaHDAC I* Enzymaktivität dennoch erhöht wird und dadurch Merogonie-assoziierte oder -fördernde Gene reprimiert werden.

Obwohl es bislang keine Hinweise gibt, ob HDACs der Klasse II in die Differenzierung als auch Regulation der Virulenz bei Apicomplexaparasiten involviert sind, zeigten sich im Verlauf der Langzeitkultivierung *T. annulata*-infizierter Zellen Unterschiede in der *TaHDAC II^{IPK}* mRNA-Expression. Der Gehalt an *TaHDAC II^{IPK}*-mRNA in hoch passagierten *Ta#868*-Zellen zeigte gegenüber niedrig passagierten *Ta#868*-Zellen eine signifikante Reduktion (Abbildung 29). Eine verringerte Genexpression lässt in der Regel nicht auf eine erhöhte HDAC-Aktivität schließen, die jedoch zu erwarten wäre, davon ausgehend, dass HDACs die Transkription merogonie- bzw. virulenzrelevanter Gene reprimieren (Abschnitt 2.9). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass *TaHDAC II^{IPK}* einer Attenuierung bzw. Abschwächung der Differenzierungsfähigkeit entgegenwirkt; denn es gibt Fälle, wo sich HDACs positiv auf Transkriptionsvorgänge auswirken²¹⁰. Um den Effekt der Langzeitkultivierung auf die Expression von *TaHDAC II^{IPK}* zu bekräftigen, wurde der mRNA-Gehalt in niedrig passagierten, intermediär und hoch passagierten Zellen einer

weiteren Zelllinie (*Ta#173*) bestimmt. Hierbei ergaben sich jedoch keine signifikanten Expressionsänderungen (Abbildung 29).

Bei der *Ta#173* Zelllinien handelt es sich, wie bei der *Ta#868* Zelllinie, um Schizonten tragende *T. annulata*-infizierte Leukozyten, die aus infizierten Rindern gewonnen wurden. Für die Zelllinie *Ta#173* standen zum einen niedrig passagierte als auch hoch passagierte Zellen zur Verfügung. *Ta#173*-Zellen der niedrigen Passagen verursachen im Tier eine geringe Anzahl an intraerythrozytären Piroplasmen (Merozoiten-Folgestadium) und einen mild-virulenten Phänotyp. Dahingegen zeigen Zellen hoher Passagen einen attenuierten Phänotyp im Tier, bei dem sich keine Piroplasmen detektieren lassen (persönliche Kommunikation: V. Shkap; Abschnitt 3.6.2). Im Gegensatz zur Zelllinie *Ta#173* standen für *Ta#868* nur niedrig passagierte Zellen zur Verfügung, die im Tier eine hohe Anzahl an intraerythrozytären Piroplasmen und einen stark virulenten Phänotyp verursachen (persönliche Kommunikation: V. Shkap; Abschnitt 3.6.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese *Ta#868*-Zellen durch Langzeitkultivierung hoch passagiert. Zudem konnte bestätigt werden, dass sich die Schizonten der hoch passagierten Zellen in einem Attenuierungsprozess befinden (Abschnitt 5.3.1) und ein abgeschwächtes Differenzierungspotenzial (Abschnitt 5.3.2) aufweisen.

Womöglich basieren die verschiedenen relativen *TaHDAC II^{IPK}* Expressionswerte beider Linien darauf, dass niedrig passagierte Zellen der Zelllinien *Ta#173* und *Ta#868* einen unterschiedlichen Phänotyp im Kalb verursachen. Die Parasiten der Linie *Ta#173* zeigten bereits zu Beginn eine scheinbar verminderte Differenzierungsfähigkeit und Virulenz im Vergleich zu den Parasiten der *Ta#868*-Linie. Möglicherweise verfügen die *Ta#173*-Zellen über ein geringeres *TaHDAC II^{IPK}* mRNA-Ausgangslevel, da sich deren Parasiten unter Umständen bereits in einem Attenuierungsprozess befinden und somit keine Reduktion der HDAC mehr zu erkennen ist. In Zukunft sollten weitere Zelllinien mit unterschiedlichen Parasitengenotypen analysiert werden, um diese Differenzen weitergehend zu untersuchen.

6.3 Hemmung von HDACs beeinflusst die Parasitendifferenzierung

Wie bereits erwähnt spielen bei den Apicomplexa mindestens die HDACs der Klasse I eine Rolle in der Parasitendifferenzierung. Dies wurde durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren (*histone deacetylase inhibitor*, HDACi) experimentell nachgewiesen^{166,167}. Die verwendeten Substanzen gehören zur Gruppe der zyklischen Tetrapeptide, wie bspw. Apicidin. Apicidin ist ein Stoffwechselprodukt eines Pilzes, das eine Reihe von

Apicomplexa HDACs der Klasse I beim Einsatz nanomolarer Konzentrationen inhibiert^{166,176,195,196}. Es wird angenommen, dass zyklische Tetrapeptide anstelle des Lysinsubstrats mit dem Zn^{2+} -Kofaktor, innerhalb der katalytischen Tasche, interagieren und somit die HDAC-Aktivität reversibel und kompetitiv hemmen^{196,211}. Die Effektivität der Inhibition ist bei HDACs der Klasse I von einer Apicomplexaparasiten-spezifischen Insertion von zwei Aminosäuren (Alanin-Threonin-Insertion) am putativen Substrateingang des Enzyms abhängig. Eine Mutation dieser Position in der Toxoplasma-HDAC *TgHDAC3* macht die Parasiten resistenter gegenüber HDAC inhibierenden zyklischen Tetrapeptiden¹⁶⁶. Die HDACs der Klasse I aus *P. falciparum* und *B. bovis* verfügen ebenfalls über diese Insertion (Abbildung 12) und können *in vitro* durch Apicidin inhibiert werden^{176,195}. Aufgrund der sehr starken Homologie von *TaHDAC I* zu anderen Apicomplexa HDACs der Klasse I (Abschnitt 5.1.1.1; Anhang 9.1.1) wurde Apicidin als Inhibitor gewählt. Apicidin kann jedoch auch einen Effekt auf HDACs der Klasse II haben. Zum einen verursachen hohe Dosen an Apicidin eine Verminderung der Enzymaktivität von *CpHDAC3* und zum anderen wird die *PfHDAC2* Expression durch Apicidin beeinflusst^{167,169}.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel einer Zelllinie untersucht, ob Apicidin die mRNA-Expression der *T. annulata* HDACs beeinflusst. Die qRT-PCR Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.2.2 zeigen, dass die Transkription der *T. annulata* HDACs nicht beeinflusst ist. Apicidin bedingte Effekte würden demnach auf der Hemmung der enzymatischen Aktivität von Zn^{2+} -abhängigen *T. annulata* HDACs beruhen.

Um die Rolle von HDACs bei der Differenzierung vom Schizonten zum Merozoiten näher zu beleuchten, wurden verschiedene Zelllinien mit dem HDACi Apicidin behandelt. Bei *T. annulata*-infizierten Zellen der Linie *TaA288*, die aufgrund Langzeitkultivierung eine ausgeprägte Attenuierung aufweisen, resultierte die Apicidin-Behandlung in einer erhöhten Expression der Merozoitenmarker *TaMS1* und *TaMR1* bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C (Abschnitt 5.2.1). Dies könnte bedeuten, dass Zn^{2+} -abhängige HDACs bei der Regulation der Merozoitenbildung involviert sind, d. h. dem Übertritt ins nächste Differenzierungsstadium entgegenwirken. Ob eine Expression der Merozoitenmarker tatsächlich mit einer Merozoitenbildung einhergeht, muss in diesem Fall jedoch bestätigt werden, da HDAC-Inhibitoren eine genomweite Histonhyperacetylierung verursachen können. In Plasmodien zum Beispiel führt eine HDAC-Inhibition zu einer solchen Histonhyperacetylierung und einer damit verbundenen Hochregulation einer Vielzahl an Genen, was in einer dysregulierten differenzierungsassoziierten Genregulation resultiert¹⁶⁷.

Aus diesem Grund wurde zunächst anhand von Genexpressionsanalysen untersucht, ob die beobachtete Apicidin bedingte erhöhte Merozoitenmarkerexpression gleichzustellen

ist mit einer erhöhten Merozoitenbildung. Dafür wurde die durch Apicidin beeinflusste Genexpression von Faktoren (*TaSP*; *TaSH-HN*), die während der Merogonie negativ reguliert sind, in *T. annulata*-infizierten Leukozyten am Beispiel der *TaA288* Zelllinie bestimmt. Gleichzeitig wurde die Transkription des Merozoitenmarkers *TaMR1* überprüft (Abschnitt 5.2.2.1). Die mRNA-Expression von *TaSP* und *TaSH-HN* sollte eine inverse Korrelation zur Expression von Merozoitenmarkern aufweisen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Hemmung der HDACs die Transkription des *TaMR1* nach 6 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 41°C erhöht und die Transkription des putativen Transkriptionsmodulators *TaSH-HN* reduziert (Abschnitt 5.2.2.1). Dies spricht für eine spezifisch erhöhte Merozoitenmarkerexpression, denn gemäß den Beobachtungen von Shiels *et al.* 1994 und Swan *et al.* 2003 wird die Transkription des *TaMR1*-Gens im Laufe der Merogonie induziert und die der *TaSH-HN*-Gene reduziert^{136,140}. Eine Reduktion der *TaSP* mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte für eine unspezifisch erhöhte Merozoitenmarkerexpression oder eine abnorme Merozoitenbildung sprechen, denn die Daten von Schnittger *et al.* 2002 und Schmuckli-Maurer *et al.* 2008 ließen eine Merogonie-assoziierte *TaSP* Transkriptionsreduktion erwarten^{135,212}. Immunfluoreszenzfärbungen belegten jedoch, dass freie Merozoiten kein *TaSP* mehr aufwiesen. *TaSP* konnte auf der Oberfläche des Makroschizonten-„Restkörpers“ detektiert werden und lediglich partiell in den Bereichen mit *TaMS1* bzw. *TaMR1* Färbung, die für den sich entwickelnden Mikroschizonten charakteristisch sind (Abbildung 21, Abbildung 22)²¹². Die Färbungen gegen *TaMS1* und *TaMR1* bestätigen zudem, dass eine Hemmung von HDACs die Merozoitenbildung in einer *TaA288* Zellkultur bei 41 °C erhöht. Diese Kultur enthielt aber weiterhin eine hohe Anzahl von Makroschizont-haltigen Zellen (Abbildung 21, Abbildung 22). Möglicherweise ist eine *TaSP* mRNA-Reduktion nur unter Verwendung isolierter Merozoiten nachzuweisen.

Bei Betrachtung der Daten, die bei 37 °C Inkubationstemperatur erhalten wurden, resultiert eine Inhibition von HDACs nicht in einer Merozoitenbildung. Ist die Expression der Merozoitenmarker aber bereits induziert, in diesem Fall durch eine Inkubationstemperatur von 41 °C, kann diese Expression durch eine HDAC-Hemmung erleichtert werden (Abbildung 16, Abbildung 17). Womöglich erhöht die Inhibition der *T. annulata* HDACs das Histonacetylierungslevel, was die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zum aktiven Promoter der Merozoitenmarker und möglicherweise zu anderen Merogonie-fördernden Genen erleichtert.

Die Beobachtungen, die mit hoch passagierten, attenuierten Zellen der Linie *TaA288* gemacht wurden, konnten mithilfe eines *In Cell Western* anhand der Zelllinie *Ta#173* bestätigt werden. Zudem zeigten *Ta#173*-Zellen geringerer Passagierung, die im Tier

zuvor milde Anzeichen einer Tropischen Theileriose hervorriefen, bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C durch die Einwirkung des HDACi Apicidins eine erhöhte Merozoitenmarkerexpression (Abbildung 32, Abbildung 33). Deswegen scheint durch die Inhibition der HDACs die Transkription der Merozoiten-assoziierten Gene unter induktiven Bedingungen nicht nur bei attenuierten, hoch passagierten sondern auch bei mild-virulenten, niedrig passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen erleichtert zu werden.

Eine Hemmung von HDACs durch Apicidin führt bei niedrig passagierten, virulenten Zellen der Linie *Ta#868* zu einer erhöhten Expression von Merozoitenmarkern bei 37 °C (Abschnitt 5.3.4). Unbehandelte *Ta#868* Pendants weisen jedoch generell eine basale Merozoitenmarkerexpression (Abbildung 30, Abbildung 31) bzw. Merozoitenbildung (Abbildung 28) auf. Demnach scheint auch hier die Hemmung von HDACs die Transkription Merogonie-assoziiierter Gene zu begünstigen. Die bei einer herkömmlichen Umgebungstemperatur stattfindende Merozoitenbildung lässt sich durch eine erhöhte Temperatur von 41 °C steigern (Abbildung 26, Abbildung 27). Bei 41 °C ergab sich nach 6 Tagen in niedrig passagierten, virulenten *Ta#868*-Zellen jedoch kein Unterschied zwischen den HDACi-Ansätzen und den Kontrollansätzen (Abbildung 30, Abbildung 31), was möglicherweise auf einer sehr starken Merozoitenbildung basiert. Ein kontinuierliches Monitoring der Merozoitenmarkerexpressionswerte über den gesamten Inkubationszeitraum würde helfen, erwartungsgemäße Unterschiede zu erfassen.

Der Einsatz des HDACi auf die hoch passagierten *Ta#868*-Zellen führte zu einer Erhöhung der Expression des frühen Merozoitenmarkers *TaMS1* (Abbildung 30), jedoch nicht des späten Merozoitenmarkers *TaMR1* (Abbildung 31). Womöglich war der Zeitpunkt für eine erhöhte Apicidin-bedingte Merozoitenbildung, aufgrund der dynamischen Natur des Merogonieprozesses¹³⁶, noch nicht gekommen.

Alles in allem sprechen die Daten dafür, dass HDACs die Expression der Merozoitenmarker *TaMS1* und *TaMR1* erschweren könnten, denn eine Inhibition von HDACs steigert eine bereits induzierte Merozoitenmarkerexpression und führt somit zu einer stärkeren Merozoitenbildung. Es wurde bereits vermutet, dass die Differenzierungsfähigkeit von *T. annulata* durch epigenetische Prozesse abgeschwächt werden kann^{136,213}. Bislang ist jedoch nicht klar, welche epigenetischen Regulatoren dabei involviert sein könnten. Doch diese Arbeit macht deutlich, dass *T. annulata* HDACs bei der Regulation der Differenzierung beteiligt zu sein scheinen. Im Laufe der Passagierung könnte es zu einem veränderten epigenetischen Muster, in diesem Fall fehlende Histonacetylierungen, kommen, was die Fähigkeit des Parasiten zur Merozoitenbildung vermindert. Für *Toxoplasma* wurde eine ähnliche Beteiligung der HDACs bei der Differenzierung zum Bradyzoiten dokumentiert, wo differenzierungsschwache Tachyzoiten hypoacetylierte Bradyzoiten-Gene aufweisen¹⁵⁶.

Bislang wird kontrovers diskutiert, inwiefern attenuierte, intrazelluläre *T. annulata*-Parasiten, die als Lebendimpfstoff verwendet werden, Merozoiten ausbilden, sich zu Piroplasmen differenzieren und übertragen werden^{55,85,87,88}. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass attenuierte Parasiten aus *TaA288*-Zellen durchaus die Fähigkeit besitzen, Merozoiten auszubilden (Abbildung 21, Abbildung 22). Demnach ist es denkbar, dass auch attenuierte Schizonten im immunisierten Tier den Prozess der Merogonie durchlaufen und das Tier somit als *Carrier* fungieren kann (Erregerreservoir). In der Tat wurde bereits gezeigt, dass attenuierte, intrazelluläre *T. annulata*-Parasiten Blutstadien ausbilden können, die auf den Vektor übertragen werden und sich zu infektiösen Sporozoiten entwickeln⁸⁸. Es ist bekannt, dass äußere Veränderungen die epigenetische Programmierung einer Zelle modifizieren können²¹⁴. Da die Fähigkeit zur Merozoitenbildung durch Hemmung von HDACs erhöht werden kann, ist es gut denkbar, dass unter bestimmten Umständen bei - mit Lebendvakzin immunisierten - Rindern die Anzahl an Merozoiten erhöht wird und somit das Risiko steigt, dass das Rind Theileriose-Erreger auf Zecken überträgt.

6.4 Hemmung von HDACs beeinflusst die Expression des metastaserelevanten Wirtszellfaktors *MMP9*

Die Langzeitkultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen geht, neben einer Abschwächung der Makroschizonten-Differenzierungsfähigkeit, mit einer Abschwächung der Virulenz des parasitären Erregers einher^{82,134}. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Hinweisen gesucht, ob eine Hemmung von HDACs die Virulenz einer attenuierten *T. annulata*-infizierten Zelllinie erhöht. Dabei wurde der Effekt des HDACi Apicidins auf den virulenzassoziierten Wirtszellfaktor *MMP9* in stark attenuierten *TaA288*-Zellen untersucht (Abschnitt 5.2.4). Tatsächlich wurde die Transkription des bovinen *MMP9*-Gens in *T. annulata*-infizierten Zellen gesteigert, wohingegen in bovinen Kontrollzellen (BoMac) kein Unterschied festgestellt wurde. Eine erhöhte *MMP9*-Transkription und folglich Proteinexpression geht mit einer stärkeren Metastasefähigkeit *T. annulata*-infizierter Zellen, aufgrund gesteigerter proteolytischer Eigenschaften, einher^{49,114,134}. Es kann also geschlossen werden, dass durch die Einwirkung des HDACi Apicidins die Fähigkeit zur Metastasierung der attenuierten *TaA288*-Zellen erhöht wurde. Neuste Daten zeigten, dass die Transkriptionsrate des bovinen *MMP9*-Gens in *T. annulata*-infizierten Zellen durch Histonmodifikationen beeinflusst wird. Jedoch scheinen Histonacetylierungen am bovinen *MMP9*-Promotor nicht bei der Geninduktion involviert zu sein²¹⁵. Wie kann die Apicidin-bedingte Erhöhung der *MMP9* mRNA-Expression erklärt werden? Die *MMP9*-Transkription wird durch den Parasiten

induziert²¹⁶. Die Faktoren von parasitärer Seite, die dazu führen, dass in niedrig passagierten *T. annulata*-infizierten Zellen die Transkription an *MMP9* hoch ist und die Transkription in hoch passagierten, attenuierten Zellen gering, konnten bisher nicht identifiziert werden^{114,123,131}. Es kann aber spekuliert werden, dass die Aktivität dieser unbekannt Parasitenfaktoren (PF; Abbildung 34) während der Langzeitkultivierung abnimmt. Diese Abnahme wiederum könnte durch eine reprimierte Genexpression bedingt sein und ist möglicherweise durch HDACs vermittelt. Demnach würde eine Hemmung von HDACs den Effekt umkehren. Entgegen der bisherigen Meinung, dass der Phänotyp einer reduzierten MMP-Aktivität hoch passagierter, attenuierter *T. annulata*-infizierter Zellen „stabil“ ist¹²³, wäre der Phänotyp somit reversibel. Die vorliegenden Daten (Abschnitt 5.2.4) sprechen für eine reversible Metastasefähigkeit, denn die *MMP9* mRNA-Expression in attenuierten *T. annulata*-infizierten Zellen ist nicht unveränderlich und konnte wahrscheinlich durch Veränderung der epigenetischen Programmierung im Parasiten erhöht werden. Die Metastasierung ist nicht nur von der proteolytischen Aktivität, sondern auch von der Motilität der infizierten Zellen abhängig. Dabei spielt der Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor*- β , TGF- β) eine entscheidende Rolle, seine Expression nimmt mit der Attenuierung ab¹¹³. Da die TGF- β Produktion der *T. annulata*-infizierten Zelle wiederum vom Parasiten abhängig ist, könnte in Zukunft untersucht werden, ob durch die Hemmung von Parasiten-HDACs die TGF- β Produktion und *In-vitro*-Invasionsfähigkeit attenuierter Vakzinzellen wiederhergestellt werden kann.

Würde die Vermutung bestätigt werden, dass die Invasionsfähigkeit attenuierter *T. annulata*-infizierter Zellen durch die Beeinflussung des Histonacetylierungsmusters wiederhergestellt werden kann, könnte die Sicherheit von Lebendimpfstoffen in Frage gestellt werden. Wird bedacht, dass der Attenuierung eine reversible, epigenetische Konstitution des Parasiten zugrunde liegen könnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch veränderte Einflüsse *in vivo* erneut virulente *T. annulata*-Erreger auftreten und weiter übertragen werden.

6.5 Zusammenfassende Betrachtung und Modell

Die HDAC-Inhibitionsexperimente der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass Parasiten-HDACs während einer längeren Kultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen zur Abschwächung der *MMP9*-Expression beitragen. Vermutlich reduzieren Parasiten-HDACs durch reprimierende Histondeacetylierungsreaktionen die Expression von Faktoren parasitären Ursprungs, die im Wirt die Transkription des bovinen metastaserelevanten *MMP9*-Gens induzieren. Sodass die Expression dieser unbekannt

Faktoren durch eine Hemmung der HDACs erhöht und metastatische Eigenschaften der infizierten Zellen begünstigt werden können (Abbildung 34[B]). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der HDACi Apicidin direkt auf Wirtszellfaktoren, wie beispielsweise Säuger-HDACs wirkt und somit den Phänotyp bedingt. Denn eine Behandlung von Tumorzelllinien mit höheren Dosen an Apicidin beeinflusst die Eigenschaften von Säugerkrebszellen. In diesen Fällen reduziert Apicidin jedoch das metastatische Potenzial der Krebszellen^{217,218}.

Des Weiteren führt der Einsatz des HDACi Apicidin in der Regel bei gleichzeitiger *In-vitro*-Simulation einer Fieberreaktion (41 °C) zu einer gesteigerten Differenzierungshäufigkeit in einer Zellkultur aus *T. annulata*-infizierten Zellen. Es gehen mehr Schizonten in freie Merozoiten über. Wahrscheinlich führt eine verlängerte *In-vitro*-Kultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen zu einer erhöhten, repressiven Aktivität von Parasiten-HDACs (Klasse I und II) auf Gene, die Merogonieprozesse fördern bzw. während der Merogonie induziert werden. In diesem Fall resultiert eine Inhibition von HDACs wahrscheinlich in einem erhöhten Histonacetylierungslevel an entsprechenden Genen (unter anderem *TaMS1* und *TaMR1*) und führt zu einer erleichterten Transkription bzw. gesteigerten Induktionsfähigkeit, denn eine Acetylierung von Histonen lockert in der Regel die Chromatinstruktur auf und verbessert somit die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zur DNA (Abbildung 34[A])²¹⁹.

Es gibt eine Klasse von Parasitenproteinen, die in den Parasitenkern und zudem in den Wirtszellkern wandern und möglicherweise die Expression des Parasiten und/oder durch direkten Eingriff in die Wirtszell-Genexpression den Phänotyp der infizierten Zelle modifizieren. Diese Proteine gehören zur sogenannten *TaSH*-Familie^{138–141,220,221}. Eine Gruppe dieser Genfamilie, die *SUAT*-Gene sollen in unmittelbarer Nähe des Zentromers liegen^{189,222}. Da zentromerproximale Regionen als heterochromatisch gelten, ist dort eine hohe Aktivität von HDACs zu erwarten²²³. Demnach könnten HDACs die Genexpression der *SUAT*-Vertreter reprimieren. Die mRNA und Proteinexpression von *SUAT1* wird im Merogonieverlauf hochreguliert und ist sowohl im Kern des Parasiten als auch im Wirtszellkern lokalisiert¹⁴¹. Da *SUAT*-Proteine als putative Transkriptionsmodulatoren angesehen werden, könnte eine Repression zu einer Reduktion der Merogonie führen, was eine Abschwächung der Differenzierungsfähigkeit bedeuten würde. *SUAT*-Gene sollen zudem die Genexpression der Wirtszelle beeinflussen¹⁴¹ und könnten demnach im Zusammenhang mit der Attenuierung stehen.

Die durch die Langzeitkultivierung bedingte Attenuierung und Abschwächung der Differenzierungsfähigkeit von *T. annulata* innerhalb der Wirtszellen erlauben den Einsatz von Lebendvakzinen zur Bekämpfung der Tropischen Theileriose. Diese Art der Immunprophylaxe wird vorwiegend als sicher angesehen^{85,87,224}. Da den Mechanismen der Attenuierung und der Differenzierungspotenzialabschwächung, gemäß den Daten der vorliegenden Arbeit, epigenetische Prägungen zugrunde liegen könnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach erfolgreicher Immunisierung eines Tieres mit *T. annulata* Lebendimpfstoffe unter bestimmten Bedingungen übertragbare Erreger entstehen, dessen virulente Eigenschaften reversibel sind. Denn epigenetische Modifikationen in einer Zelle sind veränderlich, im Gegensatz zu irreversiblen, genetischen Veränderungen²²⁵. Demnach sollten zur Gewährleistung sicherer Lebendimpfstoffe deren Attenuierung und reduziertes Differenzierungspotenzial auf genetischen Veränderungen beruhen.

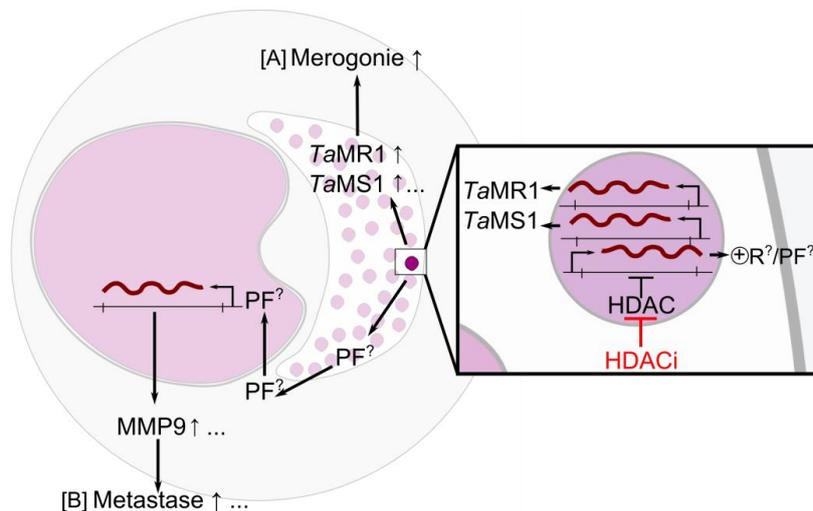


Abbildung 34 Modell zur Wirkung von HDACs bzw. Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf, durch Langzeitkultivierung, abgeschwächte Prozesse, wie Merogonie und Metastase [A] Während einer Langzeitkultivierung von *T. annulata*-infizierten Zellen könnten Parasiten-HDACs via Histondeacetylierung zur Repression von Merozoitenmarkern beitragen bzw. zur Repression von unbekanntem Merogonie-fördernden Faktoren und somit das Differenzierungspotenzial des Parasiten herabsetzen. Denn eine HDAC-Hemmung resultiert in einer gesteigerten Merozoitenmarkerexpression (*TaMS1* und *TaMR1*) und erhöht die Merozoitenbildung in attenuierten *T. annulata*-infizierten Zellen unter induzierenden Bedingungen. [B] Des Weiteren könnten Parasiten-HDACs während einer Langzeitkultivierung zur Abschwächung der Metastasierungsfähigkeit von *T. annulata*-infizierten Zellen beitragen, indem diese mittels Histondeacetylierung in die Repression von nicht identifizierten Faktoren parasitärer Herkunft involviert sind. Denn eine HDAC-Inhibition erhöht die parasiteninduzierte mRNA-Expression des metastaserelevanten Wirtszellfaktors *MMP9*. HDACi: Histondeacetylase-Inhibitor; ⊕R[?]: putative(r) Merogonie-induzierende(r) Faktor(en); PF[?]: putative(r) Faktor(en) parasitären Ursprungs.

7 Ausblick

Nach dem im Abschnitt 6.5 beschriebenen Modell führt eine Inhibition von *T. annulata* HDACs an den für die Differenzierung und Virulenz wichtigen Promotoren zur Histonacetylierung und erleichtert daher die jeweilige Transkription. Zur Bestätigung des Modells könnten Histonacetyltransferase (HAT)-Inhibitoren bzw. HDAC-Aktivatoren eingesetzt werden. Hier wären gegenteilige Effekte auf die Merogonie-Induktion bzw. *MMP9*-Transkription zu erwarten.

Alternativ könnte mithilfe von Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen unter Verwendung von Antikörpern, die gegen acetylierte Histone bzw. HATs gerichtet sind, überprüft werden, ob bestimmte Promotoren nach Histondeacetylase-Inhibitor(HDACi)-Einwirkung hyperacetyliert sind. Promotoren von Interesse wären beispielsweise die Promotoren der *TaMR1*, *TaMS1* und *SUAT*-Gene.

Um eine durch den HDACi Apicidin verursachte bessere Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zur DNA der Promotoren der Merogoniemarker *TaMS1*, *TaMR1* und womöglich *SUAT1* zu untersuchen, könnte die Chromatinerreichbarkeit mithilfe eines PCR-basierten Systems (*PCR Assay for Chromatin Accessibility*) untersucht werden.

Da Apicidin in hohen Dosen, mittels einen unzureichend aufgeklärten Mechanismus, auch einen Effekt auf verschiedene Säugerkrebszelllinien ausüben kann ²²⁶, könnten Mutageneseexperimente Hinweise über die Spezifität bzw. Isoformselektivität des HDACi Apicidin geben. Jedoch konnten *T. annulata*-Parasiten bisher nicht zielgerichtet genetisch manipuliert werden. Als Alternative ließen sich einkernige Sporoziten durch die Einwirkung von Mutagenen zufällig genetisch verändern. Anschließend könnte nach *In-vitro*-Infektion peripherer Blutleukozyten und Selektion von befallenen Zellen auf solide, Apicidin-haltige Nährböden nach resistenten Mutanten gesucht werden. Eine anschließende Sequenzierung von Kandidaten-HDACs könnte zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus beitragen.

Eine Inhibition von HDACs durch Apicidin verursacht eine erhöhte Transkription des virulenzassoziierten Wirtszellfaktor *MMP9* in attenuierten *T. annulata*-infizierten *TaA288*-Zellen. Demnach könnte eine gehemmte HDAC-Aktivität zu einer verstärkten Metastasefähigkeit von attenuierten Zellen führen. Durch die Anwendung von *In-vitro*-Zellinvasionssystemen bzw. durch Infektionsexperimente mit HDACi-behandelten

T. annulata-infizierten Zellen am Mausmodell oder direkt unter Verwendung susceptibler Kälber könnte diese Annahme bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten Ta#868-Zellen wiesen eine durch Langzeitkultivierung bedingte reduzierte *MMP9* mRNA-Expression auf. Demnach könnte zur weiteren Bestätigung untersucht werden, ob durch den Einsatz des HDACi das *MMP9*-Transkriptionslevel in hoch passagierten *T. annulata*-infizierten Ta#868-Zellen auf das Niveau der niedrig passierten, virulenten Ta#868-Zellen angehoben werden kann.

Gemäß den Daten der vorliegenden Arbeit scheinen die Mechanismen der Attenuierung und der Abschwächung der Fähigkeit zur Merozoitenbildung von *T. annulata* einer epigenetischen Regulation zu unterliegen. Demnach besteht das Risiko, dass die Eigenschaften von Lebendvakzinen veränderlich sind. Diese Möglichkeit sollte in Anbetracht dessen, dass Lebendvakzine bisher als sichere Maßnahmen zur Bekämpfung der Tropischen Theileriose galten, weiter untersucht werden. Sollte sich in Zukunft zeigen, dass eine Übertragung der Tropische Theileriose von einem immunisierten Tier auf ein naives Tier nicht immer ausgeschlossen werden kann, muss an einer Optimierung von Lebendimpfstoffen gearbeitet werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Adl, S. M. *et al.* The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–514 (2012).
2. Adl, S. M. *et al.* The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399–451 (2005).
3. Levine, N. D. *et al.* A Newly Revised Classification of the Protozoa*. *J. Protozool.* 27, 37–58 (1980).
4. Dschunkowsky, E. *Entwicklungsformen von Piroplasmen in Zecken: 9. Int. tierärztl. Kongress, Haag 1909.* (1909).
5. Norval, R. A. I., Perry, B. D. & Young, A. S. 4 Tick Vectors of Theileriosis in *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
6. Norval, R. A. I., Perry, B. D. & Young, A. S. 5 Development of Theileria in *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
7. Robinson, P. M. Theileriosis annulata and its transmission—A review. *Trop. Anim. Health Prod.* 14, 3–12 (1982).
8. Norval, R. A. I., Perry, B. D. & Young, A. S. 3 Origins, Classification and Nomenclature of Theileria in *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
9. Zablotsky, V. T. in *Recent developments in the research and control of Theileria annulata: proceedings of a workshop held at ILRAD 29–31* (International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD), 1992).
10. Gharbi, M., Sassi, L., Dorchies, P. & Darghouth, M. A. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Vet. Parasitol.* 137, 231–241 (2006).
11. Norval, R. A. I., Perry, B. D. & Young, A. S. 13 Economic Impact of Theileriosis and its Control in africa in *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
12. Hooshmand-Rad, P. *Cultivation of Theileria hirci in sheep lymphoid cells.* Cultivation of *Theileria hirci* in sheep lymphoid cells. *Trop. Anim. Health Prod* (1975).
13. Hulliger, L. Cultivation of Three Species of *Theileria* in Lymphoid Cells in vitro. *J. Protozool.* 12, 649–655 (1965).
14. Conrad, P. A., Kelly, B. G. & Brown, C. G. Intraerythrocytic schizogony of *Theileria annulata*. *Parasitology* 91 (Pt 1), 67–82 (1985).
15. Shaw, M. K. *Theileria development and host cell invasion in Theileria* (Springer, 2002).
16. Mehlhorn, H. & Shein, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23, 37–103 (1984).
17. McKeever, D. J. Bovine immunity – a driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends Parasitol.* 25, 269–276 (2009).
18. Shaw, M. K. Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends Parasitol.* 19, 2–6 (2003).
19. Spooner, R. L., Innes, E. A., Glass, E. J. & Brown, C. G. *Theileria annulata* and *T. parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. *Immunology* 66, 284–288 (1989).

20. Glass, E. J., Innes, E. A., Spooner, R. L. & Brown, C. G. Infection of bovine monocyte/macrophage populations with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 355–368 (1989).
21. Jura, W. G., Brown, C. G. & Kelly, B. Fine structure and invasive behaviour of the early developmental stages of *Theileria annulata* in vitro. *Vet. Parasitol.* 12, 31–44 (1983).
22. Shaw, M. K. The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells. *Int. J. Parasitol.* 27, 457–474 (1997).
23. Webster, P., Dobbelaere, D. A. & Fawcett, D. W. The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes in vitro. Immunoelectron microscopic observations. *Eur. J. Cell Biol.* 36, 157–162 (1985).
24. Fawcett, D., Musoke, A. & Voigt, W. Interaction of sporozoites of *Theileria parva* with bovine lymphocytes in vitro. I. Early events after invasion. *Tissue Cell* 16, 873–884 (1984).
25. Forsyth, L. M. G. *et al.* Tissue Damage in Cattle Infected with *Theileria annulata* Accompanied by Metastasis of Cytokine-producing, Schizont-infected Mononuclear Phagocytes. *J. Comp. Pathol.* 120, 39–57 (1999).
26. Shiels, B. *et al.* Disruption of synchrony between parasite growth and host cell division is a determinant of differentiation to the merozoite in *Theileria annulata*. *J. Cell Sci.* 101, 99–107 (1992).
27. Shaw, M. K. & Tilney, L. G. How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa). *J. Cell Sci.* 101, 109–123 (1992).
28. Fawcett, D. W., Conrad, P. A., Grootenhuis, J. G. & Morzaria, S. P. Ultrastructure of the intra-erythrocytic stage of *Theileria* species from cattle and waterbuck. *Tissue Cell* 19, 643–655 (1987).
29. Levine, N. D. *Veterinary Protozoology*. (Iowa State University Press, 1985).
30. Schein, E., Büscher, G. & Friedhoff, K. T. Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung von *Theileria annulata* (Dschunkowsky und Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). *Z. Für Parasitenkd.* 48, 123–136 (1975).
31. Bishop, R. *et al.* *Theileria* Life cycle stages associated with the ixodid tick vector in (Cambridge University Press, 2008)
32. Schein, E. & Friedhoff, K. T. Light microscopic studies on the development of *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904) in *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844). II. The development in haemolymph and salivary glands (author's transl)]. *Z. Für Parasitenkd. Berl. Ger.* 56, 287–303 (1978).
33. Shaw, M. K. in *Theileria* (eds. Dobbelaere, D. A. E. & McKeever, D. J.) 1–22 (Springer US, 2002).
34. Samish, M. Infective *Theileria annulata* in the tick without a blood meal stimulus. *Nature* 270, 51–52 (1977).
35. Singh, D. K., Jagdish, S., Gautam, O. P. & Dhar, S. Infectivity of ground-up tick supernates prepared from *Theileria annulata* infected *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Trop. Anim. Health Prod.* 11, 87–90 (1979).
36. Shaw, M. K. & Young, A. S. in *Advances in Disease Vector Research* (ed. Harris, K. F.) 23–63 (Springer New York, 1994).
37. Gauer, M. *et al.* DNA measurements and ploidy determination of developmental stages in the life cycles of *Theileria annulata* and *T. parva*. *Parasitol. Res.* 81, 565–574 (1995).

38. Preston, P. M., Brown, C. G. D., Bell-Sakyi, L., Richardson, W. & Sanderson, A. Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Res. Vet. Sci.* 53, 230–243 (1992).
39. Preston, P. M. *et al.* Innate and Adaptive Immune Responses Co-operate to Protect Cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol. Today* 15, 268–274 (1999).
40. Bansal, G. C., Gill, B. S., Bhattacharyulu, Y. & Singh, A. Comparative pathogenicity of *Theileria annulata* strains. *Vet. Q.* 9, 189–191 (1987).
41. Gill, B. S., Bhattacharyulu, Y. & Kaur, D. Symptoms and pathology of experimental bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection). *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 52, 597–608 (1977).
42. Srivastava, A. K. & Sharma, D. N. Studies on the occurrence, clinical features and clinicopathological and pathomorphological aspects of theileriasis in calves. *Vet. Res. J.* 4, 22–29 (1981).
43. Branco, S. *et al.* Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *J. Vet. Sci.* 11, 27–34 (2010).
44. Brown, D. J., Campbell, J. D., Russell, G. C., Hopkins, J. & Glass, E. J. T cell activation by *Theileria annulata*-infected macrophages correlates with cytokine production. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 507–514 (1995).
45. Guo, G. *et al.* Research on the schizont cell culture vaccine against *Theileria annulata* infection in Xinjiang, China. *Trop. Anim. Health Prod.* 29, 98S–100S (1997).
46. Waltschowski, J. & Pawlov, N. Abortions of cows after invasion by *Theileria annulata* (Dschunkowsky and Luhs, 1904). *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B J. Vet. Med. Ser. B* 17, 895–903 (1970).
47. Norval, R. A. I., Perry, B. D. & Young, A. S. 9 The Reporting, Diagnosis and Surveillance of Theileriosis in *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
48. Adamson, R. & Hall, R. Virulence and Attenuation in *Theileria Annulata* in *Theileria* (eds. Dobbelaere, D. A. E. & McKeever, D. J.) 55–67 (Springer US, 2002).
49. Somerville, R. P., Adamson, R. E., Brown, C. G. & Hall, F. R. Metastasis of *Theileria annulata* macroschizont-infected cells in scid mice is mediated by matrix metalloproteinases. *Parasitology* 116 (Pt 3), 223–228 (1998).
50. Institute, I. L. R. *Meeting the Challenges of Livestock Diseases: ILRAD in the 1990's*. (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1990).
51. Norval, R. A. I., Perry, B. D. & Young, A. S. 8 Parasite Population Dynamics in *The Epidemiology of Theileriosis in Africa* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
52. Ilhan, T., Williamson, S., Kirvar, E., Shiels, B. & Brown, C. g. D. *Theileria annulata*: Carrier State and Immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 849, 109–125 (1998).
53. Innes, E. A., Millar, P., Brown, C. G. & Spooner, R. L. The development and specificity of cytotoxic cells in cattle immunized with autologous or allogeneic *Theileria annulata*-infected lymphoblastoid cell lines. *Parasite Immunol.* 11, 57–68 (1989).
54. Pipano, E. Basic Principles of *Theileria annulata* Control in *Theileriosis: Report of a Workshop Held in Nairobi, Kenya, 7-9 December 1976* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1977).
55. Shkap, V. & Pipano, E. Culture-Derived Parasites in Vaccination of Cattle against Tick-Borne Diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 154–171 (2000).

56. Darghouth, M. A. *et al.* A preliminary study on the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. *Parasitol. Res.* 82, 647–655 (1996).
57. Ahmed, J. S., Diesing, L., Oechtering, H., Ouhelli, H. & Schein, E. The role of antibodies in immunity against theileria annulata infection in cattle. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, Supplementum, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten, Virologie, Parasitologie*. 267, 425–431 (1988).
58. Visser, A. E., Abraham, A., Sakyi, L. J., Brown, C. G. & Preston, P. M. Nitric oxide inhibits establishment of macroschizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast fever. *Parasite Immunology*. 17, 91–102 (1995).
59. Richardson, J. O., Forsyth, L. M., Brown, C. G. & Preston, P. M. Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Veterinary Research, Communications*. 22, 31–45 (1998).
60. Ahmed, J. S., Glass, E. J., Salih, D. A. & Seitzer, U. Review: Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity*. 14, 5–12 (2008).
61. Preston, P. M., Brown, C. G. & Spooner, R. L. Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. *Clinical Experimental Immunology*. 53, 88–100 (1983).
62. Gray, M. A. & Brown, C. G. D. In Vitro Neutralization of Theilerial Sporozoite Infectivity With Immune Serum in *Advances in the Control of Theileriosis* (eds. Irvin, A. D., Cunningham, M. P. & Young, A. S.) 127–131 (Springer Netherlands, 1981).
63. Preston, P. M. & Brown, C. G. Inhibition of lymphocyte invasion by sporozoites and the transformation of trophozoite infected lymphocytes in vitro by serum from *Theileria annulata* immune cattle. *Parasite Immunology*. 7, 301–314 (1985).
64. Muhammed, S. I., Lauerman, L. H., Jr & Johnson, L. W. Effect of humoral antibodies on the course of *Theileria parva* infection (East Coast fever) of cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 36, 399–402 (1975).
65. Ahmed, J. S. & Mehlhorn, H. Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* 85, 539–549 (1999).
66. Campbell, J. D., Howie, S. E., Odling, K. A. & Glass, E. J. *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation in vitro and in vivo. *Clinical Experimental Immunology*. 99, 203–210 (1995).
67. Ahmed, J. S., Hartwig, H., Rothert, M., Steuber, S. & Schein, E. Cytotoxicity and production of interleukin-2 and gamma interferon by peripheral blood lymphocytes of *T. annulata* infected cattle. *Immunobiology* (1989).
68. Ahmed, J. S., Rothert, M., Steuber, S. & Schein, E. In vitro proliferative and cytotoxic responses of PBL from *Theileria annulata*-immune cattle. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin, Reihe B, Journal of Veterinary Medicine, Small Animal Clinician*. 36, 584–592 (1989).
69. Jongejans, F. & Uilenberg, G. Ticks and control methods. in 13, 1201–1226 (Office International des Epizooties, 1994).
70. De Castro, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*. 71, 77–97 (1997).
71. Eisler, M. C., Torr, S. J., Coleman, P. G., Machila, N. & Morton, J. F. Integrated control of vector-borne diseases of livestock – pyrethroids: panacea or poison? *Trends Parasitology*. 19, 341–345 (2003).
72. Shyma, K. P., Kumar, S., Sharma, A. K., Ray, D. D. & Ghosh, S. Acaricide resistance status in Indian isolates of *Hyalomma anatolicum*. *Experimental Applied Acarology*. 58, 471–481 (2012).

73. George, J. E., Pound, J. M. & Davey, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129 Suppl, S353–366 (2004).
74. Schein, E. & Voigt, W. P. Chemotherapy of Theileriosis in Cattle in *Advances in the Control of Theileriosis* (eds. Irvin, A. D., Cunningham, M. P. & Young, A. S.) 212–214 (Springer Netherlands, 1981).
75. McHardy, N., Hudson, A. T., Morgan, D. W., Rae, D. G. & Dolan, T. T. Activity of 10 naphthoquinones, including parvaquone (993C) and menoctone, in cattle artificially infected with *Theileria parva*. *Res. Vet. Sci.* 35, 347–352 (1983).
76. McHardy, N., Wekesa, L. S., Hudson, A. T. & Randall, A. W. Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. *Res. Vet. Sci.* 39, 29–33 (1985).
77. Mhadhbi, M. *et al.* In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. *Vet. Parasitol.* 169, 241–247 (2010).
78. Sharifiyazdi, H., Namazi, F., Oryan, A., Shahriari, R. & Razavi, M. Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure. *Vet. Parasitol.* 187, 431–435 (2012).
79. Ouhelli, H. *et al.* Investigations on vaccination against theileriosis in Morocco. *Trop. Anim. Health Prod.* 29, 103S–103S (1997).
80. Beniwal, R. K. *et al.* Responses in animals vaccinated with the *Theileria annulata* (Hisar) cell culture vaccine. *Trop. Anim. Health Prod.* 29, 109S–113S (1997).
81. Hashemi-Fesharki, R. Recent development in control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasite Paris Fr.* 5, 193–196 (1998).
82. Pipano, E. Immunization of calves with attenuated wild strains of *Theileria annulata* in *Comptes-Rendus Ier Multicolloque Europeen de Parasitologie* 202 (1971).
83. Pipano, E & Israel, V. Absence of erythrocyte forms of *Theileria annulata* in calves inoculated with schizonts from a virulent field strain grown in tissue culture. *J. Protozool.* 18 (Supplement): 37, (1971).
84. Dobbelaere, D. & Heussler, V. Transformation of Leukocytes by *Theileria Parva* and *T. Annulata*. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 1–42 (1999).
85. OIE (World Organisation for Animal Health). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: OIE - World Organisation for Animal Health. (2008).
86. Pipano, E. Vaccination of cattle against *Theileria annulata* using culture-derived schizonts in *Recent Developments in the Research and Control of Theileria Annulata* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
87. Kachani, M., El Haj, N. & Kahouache & Ouhelli, H. Vaccin vivant contre la theilériose bovine constitué par des macroschizontes de *Theileria annulata* : innocuité, durée de l'immunité et absence de portage. *Rev. Méd Vet* 155, 467–471 (2004).
88. Grewal, A. S. Research developments in diagnosis and control of bovine tropical theileriosis in India in *Recent Developments in the Research and Control of Theileria Annulata* (ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1992).
89. Heussler, V. T. & Stanway, R. R. Cellular and molecular interactions between the apicomplexan parasites *Plasmodium* and *Theileria* and their host cells. *Parasite* 15, 211–218 (2008).
90. Wagener, C. & Müller, O. in *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen* (Georg Thieme Verlag, 2010).

91. Shiels, B. *et al.* Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *Int. J. Parasitol.* 36, 9–21 (2006).
92. Fell, A. H. & Preston, P. M. Growth of *Theileria annulata* and *Theileria parva* macroschizont-infected bovine cells in immunodeficient mice: Effect of irradiation and tumour load on lymphocyte subsets. *Int. J. Parasitol.* 22, 491–501 (1992).
93. Fell, A. H. & Preston, P. M. Proliferation of *Theileria annulata* and *Theileria parva* macroschizont-infected bovine cells in scid mice. *Int. J. Parasitol.* 23, 77–87 (1993).
94. Guergnon, J., Dessauge, F., Langsley, G. & Garcia, A. Apoptosis of *Theileria*-infected lymphocytes induced upon parasite death involves activation of caspases 9 and 3. *Biochimie* 85, 771–776 (2003).
95. Haller, D. *et al.* Cytoplasmic sequestration of p53 promotes survival in leukocytes transformed by *Theileria*. *Oncogene* 29, 3079–3086 (2010).
96. Haller, D. *Untersuchung des Tumorsuppressorproteins p53 in Theileria-annulata-infizierten, leukoblastoiden Zellen [Elektronische Ressource] / vorgelegt von Daniel Haller.* (2004).
97. Schmuckli-Maurer, J. *et al.* Modulation of NF- κ B activation in *Theileria annulata*-infected cloned cell lines is associated with detection of parasite-dependent IKK signalosomes and disruption of the actin cytoskeleton. *Cell. Microbiol.* 12, 158–173 (2010).
98. Heussler, V. T. *et al.* Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science* 298, 1033–1036 (2002).
99. Baumgartner, M. *et al.* Constitutive PI3-K activity is essential for proliferation, but not survival, of *Theileria parva*-transformed B cells. *Cell. Microbiol.* 2, 329–339 (2000).
100. Heussler, V. T. *et al.* The Akt/PKB pathway is constitutively activated in *Theileria*-transformed leukocytes, but does not directly control constitutive NF- κ B activation. *Cell. Microbiol.* 3, 537–550 (2001).
101. Baumgartner, M. *et al.* Constitutive exclusion of Csk from Hck-positive membrane microdomains permits Src kinase-dependent proliferation of *Theileria*-transformed B lymphocytes. *Blood* 101, 1874–1881 (2003).
102. Fich, C., Klauenberg, U., Fleischer, B. & Bröker, B. M. Modulation of enzymatic activity of Src-family kinases in bovine T cells transformed by *Theileria parva*. *Parasitology* 117 (Pt 2), 107–115 (1998).
103. Hulliger, L., Wilde, J. K. H., Brown, C. G. D. & Turner, L. Mode of Multiplication of *Theileria* in Cultures of Bovine Lymphocytic Cells. *Nature* 203, 728–730 (1964).
104. Stagg, D. A., Chasey, D., Young, A. S., Morzaria, S. P. & Dolan, T. T. Synchronization of the division of *Theileria* macroschizonts and their mammalian host cells. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 74, 263–265 (1980).
105. Gerber, S. Assoziation mit dem Wirtszell-Mikrotubulinnetzwerk und zytoplasmatische Arretierung von p53 [Elektronische Ressource]: Untersuchungen zur Überlebensstrategie von *Theileria annulata* in transformierten Rinderleukozyten / vorgelegt von Silke Gerber. (2008).
106. Seitzer, U. *et al.* Schizonts of *Theileria annulata* interact with the microtubuli network of their host cell via the membrane protein TaSP. *Parasitol. Res.* 106, 1085–1102 (2010).
107. Woods, K. L. *et al.* Recruitment of EB1, a Master Regulator of Microtubule Dynamics, to the Surface of the *Theileria annulata* Schizont. *PLoS Pathog* 9, e1003346 (2013).

108. Schneider, I. *Identifizierung und Charakterisierung eines sekretorischen Theileria-annulata-Proteins.* (2005).
109. Schneider, I. *et al.* Identification, molecular characterization and subcellular localization of a Theileria annulata parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitol. Res.* 101, 1471–1482 (2007).
110. Von Schubert, C. *et al.* The Transforming Parasite Theileria Co-opts Host Cell Mitotic and Central Spindles to Persist in Continuously Dividing Cells. *PLoS Biol* 8, e1000499 (2010).
111. Mackiewicz, M. Die tumorartige Proliferation Theileria-infizierter Rinderleukozyten: Zellzyklusabhängige Phosphorylierung des Theileria annulata Surface Protein (TaSP) durch die bovine Cyclin-Dependent Kinase 1 (CDK1). (Universität zu Lübeck, 2013).
112. Baumgartner, M. Theileria annulata promotes Src kinase-dependent host cell polarization by manipulating actin dynamics in podosomes and lamellipodia. *Cell. Microbiol.* 13, 538–553 (2011).
113. Chaussepied, M. *et al.* TGF- β 2 Induction Regulates Invasiveness of Theileria-Transformed Leukocytes and Disease Susceptibility. *PLoS Pathog.* 6, (2010).
114. Adamson, R., Logan, M., Kinnaird, J., Langsley, G. & Hall, R. Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in Theileria annulata-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106, 51–61 (2000).
115. Baylis, H. A., Megson, A., Brown, C. G., Wilkie, G. F. & Hall, R. Theileria annulata-infected cells produce abundant proteases whose activity is reduced by long-term cell culture. *Parasitology* 105 (Pt 3), 417–423 (1992).
116. Lizundia, R. *et al.* c-Jun NH2-Terminal Kinase/c-Jun Signaling Promotes Survival and Metastasis of B Lymphocytes Transformed by Theileria. *Cancer Res.* 66, 6105–6110 (2006).
117. Medjkane, S. & Weitzman, J. B. A reversible Warburg effect is induced by Theileria parasites to transform host leukocytes. *Cell Cycle* 12, 2167–2168 (2013).
118. Medjkane, S., Perichon, M., Marsolier, J., Dairou, J. & Weitzman, J. B. Theileria induces oxidative stress and HIF1 α activation that are essential for host leukocyte transformation. *Oncogene* (2013).
119. Berg, F. van den. in *Angewandte Physiologie: Komplementäre Therapien verstehen und integrieren / Frans van den Berg ...* (Georg Thieme Verlag, 2005).
120. Schelter, F. Der Hypoxia-inducible Factor-1-Signalweg fördert die Metastasierung von Tumorzellen unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion. (Universitätsbibliothek der TU München, 2011).
121. Woods, K., von Schubert, C. & Dobbelaere, D. Hijacking of Host Cell Signaling by Theileria in *Protein Phosphorylation in Parasites* (eds. Doerig, C., Späth, G. & Wiese, rtin) 179–198 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013).
122. Stück, B. 4. Impfungen in *Infektionskrankheiten* (Georg Thieme Verlag, 2004).
123. Hall, R. *et al.* Mechanism(s) of attenuation of Theileria annulata vaccine cell lines. *Trop. Med. Int. Health* 4, A78–A84 (1999).
124. Sutherland, I. A. *et al.* Theileria annulata: Altered Gene Expression and Clonal Selection during Continuous in Vitro Culture. *Exp. Parasitol.* 83, 125–133 (1996).
125. Georgi, P. & Bierbach, E. 1.3 Pathogenität und Virulenz in *Infektionskrankheiten und Infektionsschutzgesetz: allgemeine und spezielle Infektiologie, kommentierte Gesetzestexte, Prüfungsfragen* (Elsevier, Urban&FischerVerlag, 2007).

126. Graham, S. P. *et al.* Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause in vivo. *Vaccine* 19, 2932–2944 (2001).
127. Ali, A. M. *et al.* Influence of subculturing on gene expression in a *Theileria lestoquardi*-infected cell line. *Vaccine* 26, Supplement 6, G17–G23 (2008).
128. Ali, A. M. Identification of attenuation markers of a *Theileria lestoquardi* cell line to be used for the development of live vaccine against malignant ovine theileriosis. (Imu, 2010).
129. McGuire, K. *et al.* Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in *Theileria annulata*-infected cell lines derived from resistant and susceptible cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 87–98 (2004).
130. Kurschat, P. & Mauch, C. in *Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie ; 167 Tabellen* (Georg Thieme Verlag, 2010).
131. Adamson, R. & Hall, R. A role for matrix metalloproteinases in the pathology and attenuation of *Theileria annulata* infections. *Parasitol. Today* 13, 390–393 (1997).
132. Adamson, R. E. & Hall, F. R. Matrix metalloproteinases mediate the metastatic phenotype of *Theileria annulata*-transformed cells. *Parasitology* 113, 449–455 (1996).
133. Shkap, V. *et al.* Proteolytic enzyme activity and attenuation of virulence in *Theileria annulata* schizont-infected cells. *Vet. Parasitol.* 115, 247–255 (2003).
134. Somerville, R. P. T. *et al.* Phenotypic and genotypic alterations associated with the attenuation of a *Theileria annulata* vaccine cell line from Turkey. *Vaccine* 16, 569–575 (1998).
135. Schnittger, L. *et al.* Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 247–256 (2002).
136. Shiels, B. R. *et al.* A stoichiometric model of stage differentiation in the protozoan parasite *Theileria annulata*. *Mol Cell Differ* 2, 101–125 (1994).
137. Glascodine, J., Tetley, L., Tait, A., Brown, D. & Shiels, B. Developmental expression of a *Theileria annulata* merozoite surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 105–112 (1990).
138. Swan, D. G. *et al.* Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. *J. Cell Sci.* 114, 2747–2754 (2001).
139. Swan, D. G., Phillips, K., Tait, A. & Shiels, B. R. Evidence for localisation of a *Theileria* parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 101, 117–129 (1999).
140. Swan, D. G. *et al.* TashHN, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. *Cell. Microbiol.* 5, 947–956 (2003).
141. Shiels, B. R. *et al.* A *Theileria annulata* DNA Binding Protein Localized to the Host Cell Nucleus Alters the Phenotype of a Bovine Macrophage Cell Line. *Eukaryot. Cell* 3, 495–505 (2004).
142. ISC. Invasive Species Compendium - *Theileria annulata*. (2014).
143. Kornberg, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868–871 (1974).
144. Kornberg, R. D. Structure of Chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931–954 (1977).

145. Liu, B., Yip, R. K. & Zhou, Z. Chromatin Remodeling, DNA Damage Repair and Aging. *Curr. Genomics* 13, 533–547 (2012).
146. Morales, V. *et al.* Chromatin structure and dynamics: Functional implications. *Biochimie* 83, 1029–1039 (2001).
147. Workman, J. L. & Kingston, R. E. Alteration of Nucleosome Structure as a Mechanism of Transcriptional Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545–579 (1998).
148. Horsthemke, B. Epimutationen bei menschlichen Erkrankungen. (2005).
149. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705 (2007).
150. Vaissière, T., Sawan, C. & Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 659, 40–48 (2008).
151. Callow, L. L., Mellors, L. T. & Mcgregor, W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int. J. Parasitol.* 9, 333–338 (1979).
152. Callow, L. L., Dalgliesh, R. J. & De Vos, A. J. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis—The longest field trial? *Int. J. Parasitol.* 27, 747–767 (1997).
153. Carson, C. A., Timms, P., Cowman, A. F. & Stewart, N. P. *Babesia bovis*: Evidence for selection of subpopulations during attenuation. *Exp. Parasitol.* 70, 404–410 (1990).
154. Timms, P., Stewart, N. P. & De Vos, A. J. Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. *Infect. Immun.* 58, 2171–2176 (1990).
155. Spence, P. J. *et al.* Vector transmission regulates immune control of *Plasmodium* virulence. *Nature* 498, 228–231 (2013).
156. Behnke, M. S., Radke, J. B., Smith, A. T., Sullivan, W. J. & White, M. W. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol. Microbiol.* 68, 1502–1518 (2008).
157. Saksouk, N. *et al.* Histone-Modifying Complexes Regulate Gene Expression Pertinent to the Differentiation of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10301–10314 (2005).
158. Choi, S.-W., Keyes, M. K. & Horrocks, P. LC/ESI-MS demonstrates the absence of 5-methyl-2'-deoxycytosine in *Plasmodium falciparum* genomic DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150, 350–352 (2006).
159. Duffy, M. F., Selvarajah, S. A., Josling, G. A. & Petter, M. Epigenetic regulation of the *Plasmodium falciparum* genome. *Brief. Funct. Genomics* elt047 (2013).
160. NIH. Epigenomics - Epigenetic Mechanisms. <http://commonfund.nih.gov/epigenomics/figure> (2014).
161. Marks, P. A., Miller, T. & Richon, V. M. Histone deacetylases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 344–351 (2003).
162. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone Acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 81–120 (2001).
163. Watson, J., D. 7.5 Regulation der Chromatinstruktur in *Molekularbiologie* (Pearson Deutschland GmbH, 2011).
164. Gregoretti, I., Lee, Y.-M. & Goodson, H. V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.* 338, 17–31 (2004).

165. Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C. & Seigneurin-Berny, D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 162–166 (2001).
166. Bougdour, A. *et al.* Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J. Exp. Med.* 206, 953–966 (2009).
167. Chaal, B. K., Gupta, A. P., Wastuwidyaningtyas, B. D., Luah, Y.-H. & Bozdech, Z. Histone Deacetylases Play a Major Role in the Transcriptional Regulation of the Plasmodium falciparum Life Cycle. *PLoS Pathog* 6, e1000737 (2010).
168. Stritzke, C., Nalaskowski, M. M., Fanick, W., Lin, H. & Mayr, G. W. A Plasmodium multi-domain protein possesses multiple inositol phosphate kinase activities. *Mol. Biochem. Parasitol.* 186, 134–138 (2012).
169. Rider Jr., S. D. & Zhu, G. An apicomplexan ankyrin-repeat histone deacetylase with relatives in photosynthetic eukaryotes. *Int. J. Parasitol.* 39, 747–754 (2009).
170. Yasukawa, H. & Yagita, K. Silent information regulator 2 proteins encoded by Cryptosporidium parasites. *Parasitol. Res.* 107, 707–712 (2010).
171. Tonkin, C. J. *et al.* Sir2 Paralogues Cooperate to Regulate Virulence Genes and Antigenic Variation in Plasmodium falciparum. *PLoS Biol* 7, e1000084 (2009).
172. Pasternak, N. D. & Dzikowski, R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1463–1466 (2009).
173. Smith, J. D. *et al.* Switches in Expression of Plasmodium falciparum var Genes Correlate with Changes in Antigenic and Cytoadherent Phenotypes of Infected Erythrocytes. *Cell* 82, 101–110 (1995).
174. Religa, A. A. & Waters, A. P. Sirtuins of parasitic protozoa: In search of function(s). *Mol. Biochem. Parasitol.* 185, 71–88 (2012).
175. Hayashida, K. *et al.* Comparative Genome Analysis of Three Eukaryotic Parasites with Differing Abilities To Transform Leukocytes Reveals Key Mediators of Theileria-Induced Leukocyte Transformation. *mBio* 3, (2012).
176. Munkhjargal, T. *et al.* Cloning and characterization of histone deacetylase from Babesia bovis. *Vet. Parasitol.* 190, 423–433 (2012).
177. Stabel, J. R. & Stabel, T. J. immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 211–220 (1995).
178. Samish, M., Ziv, M. & Pipano, E. Preparation of suspensions of Hyalomma excavatum ticks infected with Theileria annulata. *Vet. Parasitol.* 13, 267–272 (1983).
179. Shiels, B. R., McDougall, C., Tait, A. & Brown, C. G. Identification of infection-associated antigens in Theileria annulata transformed cells. *Parasite Immunol.* 8, 69–77 (1986).
180. Renneker, S. *et al.* Development of a Competitive ELISA for Detection of Theileria annulata Infection. *Transbound. Emerg. Dis.* 55, 249–256 (2008).
181. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36 (2002).
182. Dereeper, A. *et al.* Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469 (2008).
183. licor in cell western - Google-Suche. at <http://www.licor.com/bio/applications/in-cell_western_assay/> (2014)

184. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
185. Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E. & Cumps, J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *BioTechniques* 38, 287–293 (2005).
186. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
187. Hannoush, R. N. Kinetics of Wnt-Driven β -Catenin Stabilization Revealed by Quantitative and Temporal Imaging. *PLoS ONE* 3, e3498 (2008).
188. Chène, P. *et al.* Catalytic inhibition of topoisomerase II by a novel rationally designed ATP-competitive purine analogue. *BMC Chem. Biol.* 9, 1 (2009).
189. GeneDB. Homepage for *Theileria annulata* - GeneDB. <<http://www.genedb.org/Homepage/Tannulata>> (2014).
190. Salvador, L. A. & Luesch, H. Discovery and Mechanism of Natural Products as Modulators of Histone Acetylation. *Curr. Drug Targets* 13, 1029–1047 (2012).
191. Smith, B. C. & Denu, J. M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 45–57 (2009).
192. Avalos, J. L., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Structural Basis for the Mechanism and Regulation of Sir2 Enzymes. *Mol. Cell* 13, 639–648 (2004).
193. Chen, L. *et al.* Dual role of Zn²⁺ in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity of SIRT1. *J. Inorg. Biochem.* 104, 180–185 (2010).
194. Fritsch, F. M., Mehlhorn, H., Schein, E. & Hauser, M. The effects of drugs on the formation of *Theileria annulata* merozoites in vitro. *Parasitol. Res.* 74, 340–343 (1988).
195. Patel, V. *et al.* Identification and Characterization of Small Molecule Inhibitors of a Class I Histone Deacetylase from *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* 52, 2185–2187 (2009).
196. Darkin-Rattray, S. J. *et al.* Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13143–13147 (1996).
197. Dangond, F. & Gullans, S. R. Differential Expression of Human Histone Deacetylase mRNAs in Response to Immune Cell Apoptosis Induction by Trichostatin A and Butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 833–837 (1998).
198. Liu, H. *et al.* Inhibition of class II histone deacetylase blocks proliferation and promotes neuronal differentiation of the embryonic rat neural progenitor cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 72, 365–376 (2012).
199. Joshi, M. B. *et al.* Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 11–19 (1999).
200. Sanders, B. D., Jackson, B. & Marmorstein, R. Structural Basis for Sirtuin Function: What We Know and What We Don't. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1604–1616 (2010).
201. Merrick, C. J. & Duraisingh, M. T. *Plasmodium falciparum* Sir2: an Unusual Sirtuin with Dual Histone Deacetylase and ADP-Ribosyltransferase Activity. *Eukaryot. Cell* 6, 2081–2091 (2007).
202. Kanfi, Y. *et al.* Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* 582, 2417–2423 (2008).

203. Nasrin, N. *et al.* JNK1 Phosphorylates SIRT1 and Promotes Its Enzymatic Activity. *PLoS ONE* 4, (2009).
204. De Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737–749 (2003).
205. Vanagas, L. *et al.* Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 1189–1201 (2012).
206. Millard, C. J. *et al.* Class I HDACs Share a Common Mechanism of Regulation by Inositol Phosphates. *Mol. Cell* 51, 57–67 (2013).
207. Shen, X., Xiao, H., Ranallo, R., Wu, W.-H. & Wu, C. Modulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes by Inositol Polyphosphates. *Science* 299, 112–114 (2003).
208. Collins, R. E. *et al.* The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 245–250 (2008).
209. Seto, E. & Yang, X.-J. Regulation of histone deacetylase activities and functions by phosphorylation and dephosphorylation in *Regulation of Organelle and Cell Compartment Signaling: Cell Signaling Collection* (Academic Press, 2011).
210. Zupkovitz, G. *et al.* Negative and Positive Regulation of Gene Expression by Mouse Histone Deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7913–7928 (2006).
211. Kaur, K., Jain, M., Kaur, T. & Jain, R. Antimalarials from nature. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 3229–3256 (2009).
212. Schmuckli-Maurer, J., Shiels, B. & Dobbelaere, D. A. Stochastic induction of *Theileria annulata* merogony in vitro by chloramphenicol. *Int. J. Parasitol.* 38, 1705–1715 (2008).
213. Shiels, B. *et al.* Directing differentiation in *Theileria annulata*: old methods and new possibilities for control of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 28, 1659–1670 (1998).
214. Turner, B. M. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 3403–3418 (2009).
215. Cock-Rada, A. M. *et al.* SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* 72, 810–820 (2012).
216. Baylis, H. A., Megson, A. & Hall, R. Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69, 211–222 (1995).
217. Park, C. Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncol. Rep.* (2011).
218. Ahn. Anti-tumor effect of apicidin on Ishikawa human endometrial cancer cells both in vitro and in vivo by blocking histone deacetylase 3 and 4. *Int. J. Oncol.* 36, (2009).
219. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074–1080 (2001).
220. Oura, C. A., Tait, A. & Shiels, B. R. *Theileria annulata*: identification, by differential mRNA display, of modulated host and parasite gene expression in cell lines that are competent or attenuated for differentiation to the merozoite. *Exp. Parasitol.* 98, 10–19 (2001).
221. Oura, C. A. L., McKellar, S., Swan, D. G., Okan, E. & Shiels, B. R. Infection of bovine cells by the protozoan parasite *Theileria annulata* modulates expression of the ISGylation system. *Cell. Microbiol.* 8, 276–288 (2006).

222. Hayashida, K. *et al.* Whole-Genome Sequencing of *Theileria parva* Strains Provides Insight into Parasite Migration and Diversification in the African Continent. *DNA Res.* 20, 209–220 (2013).
223. Aygun, O., Mehta, S. & Grewal, S. I. S. HDAC mediated suppression of histone turnover promotes epigenetic stability of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 547–554 (2013).
224. Pipano, E. & Shkap, V. Vaccination against Tropical Theileriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 484–500 (2000).
225. McGowan, P. O., Meaney, M. J. & Szyf, M. Epigenetics, Phenotype, Diet, and Behavior in *Handbook of Behavior, Food and Nutrition* (eds. Preedy, V. R., Watson, R. R. & Martin, C. R.) 17–31 (Springer New York, 2011)
226. Han, J.-W. *et al.* Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, Inhibits Proliferation of Tumor Cells via Induction of p21WAF1/Cip1 and Gelsolin. *Cancer Res.* 60, 6068–6074 (2000).

9 Anhang

9.1 Ergänzung zum Ergebnisteil

9.1.1 Bioinformatische Analyse: Erste Ergänzung zu Abschnitt 5.1

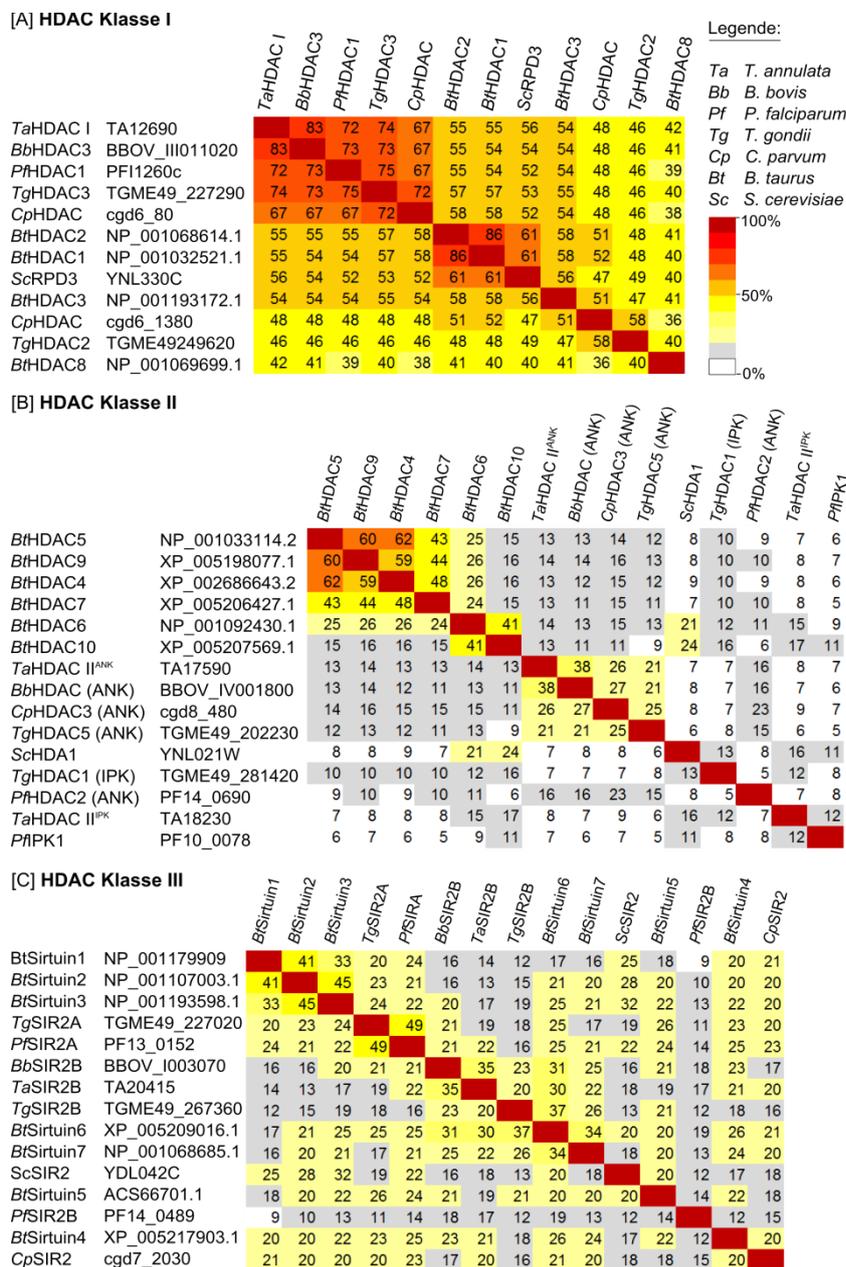


Abbildung 35 Einheitsmatrix einiger Apicomplexa HDACs, der bovinen HDACs und ausgewählter HDACs der Bäckerhefe Von Proteinsequenzen generierte Sequenzidentitätsmatrix einiger Apicomplexa HDACs, der bovinen HDACs und einiger *Saccharomyces cerevisiae* HDACs, die der Klasse I [A], der Klasse II [B] und der Klasse III [C] angehören. Die prozentuale Identität ergab sich durch den paarweisen Vergleich der Aminosäuresequenzen unter Nutzung des ClustalW2-Programms. Die Akzessionsnummern der verwendeten Aminosäuresequenzen sind in der grafischen Darstellung aufgelistet.

9.1.2 Bioinformatische Analyse: Zweite Ergänzung zu Abschnitt 5.1

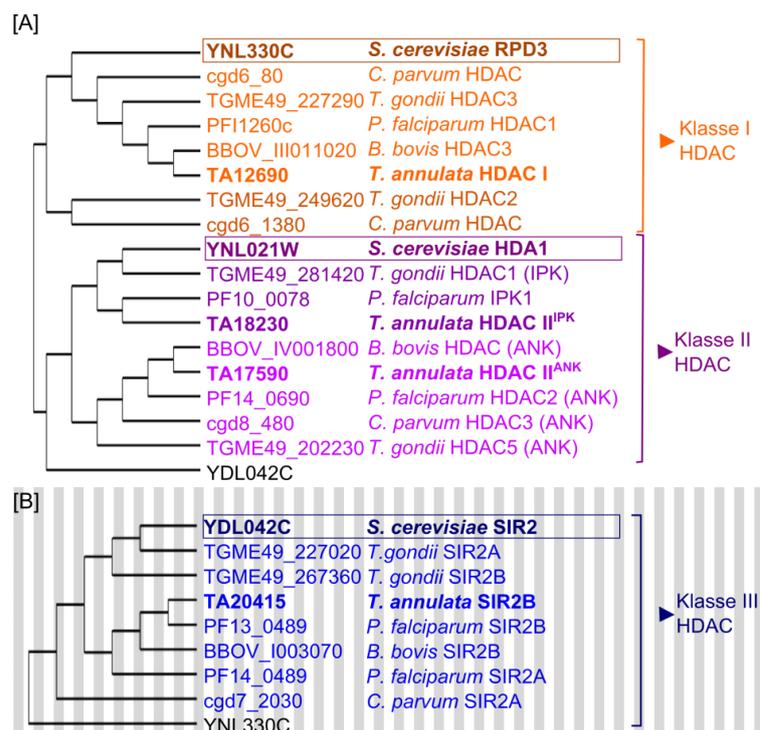


Abbildung 36 Clusteranalyse von Apicomplexa HDACs Die Analyse erfolgte mithilfe der Webanwendung auf Phylogeny.fr unter Verwendung der Aminosäuresequenzen aus den Datenbanken *yeastgenome*; GeneDB, PiroplasmaDB, ToxoDB, CryptoDB. Die entsprechenden Akzessionsnummern sind aufgelistet. Zum einen diente die HDAC SIR2 [A], zum anderen die HDAC RPD3 [B] der Bäckerhefe als *outgroup*. Die Analyse zeigt deutlich, dass die *Ta*HDAC I zu der HDAC Klasse I gehört und die *Ta*HDAC II^{IPK} und *Ta*HDAC II^{ANK} der HDAC Klasse II angehören. Zudem können die Apicomplexa HDACs der Klasse II in zwei Gruppen eingeordnet werden. Die Vertreter der einen Gruppe weisen Sequenzen auf, die den Sequenzen der *ankyrin repeat*-Proteinfamilie ähneln und die Vertreter der anderen Gruppe haben eine IPK-Domänensequenz. Der Vollständigkeit halber ist die Eingruppierung der *Ta*SIR2 in die dritte Klasse der HDACs dargestellt, dabei erfolgte die Zuordnung der HDAC *Ta*SIR2 bereits durch Religa und Waters 2012¹⁷⁴.

9.1.3 Bioinformatische Analyse: Dritte Ergänzung zu Abschnitt 5.1

<i>Pk</i> IPK1	1868	LSKMRHPCVMDIKMGVRLYGDDCDE--DSIQKIKAKRSRSLSHGFHLTSVIGWDKKKEE
<i>Pf</i> IPK1	2096	LSSMRHPCVMDIKMGIRLYGDDCNE--DSIQKIKAKNRSLSHGFHLTSVIGWSKKKKE
<i>Ta</i> HDAC II ^{IPK}	710	LYGMKLLPCVMDIKMGIRLYGDDCFDLPKVIIEFKESKAKVRSCKTHGFEVSGMFRWNEVTNI
<i>Pk</i> IPK1	1927	PPFISKEDAHSIKTDDEDFVDAFMSYFLACDNVHLSKMLIKKLLLVLEHMKRAFFESQQLFA
<i>Pf</i> IPK1	2155	PPFISKEDAHSIKNDNEVQAFISYFLACDNIQLSILLIKKLLILEEMKIFTEQNYFA
<i>Ta</i> HDAC II ^{IPK}	771	AEEVLPQHVVNNSRITDDEIAKLEFLYFVVDKDKYKRVISNKEVEKLENLKMIFESQNLNA
<i>Pk</i> IPK1	2046	FYGTSLFLVFVSDPSK--NKGDGEADAEVAKNSTNEVIDLTDVNSASLGIHPE----EER
<i>Pf</i> IPK1	2274	FYGTSLFLVFVSDPSKKNEDNYSSKDKIKKNEELTKNISLSNENMISNDBHNNSFYKDK
<i>Ta</i> HDAC II ^{IPK}	892	LYGTSLLFVVD-----AKDKSDKN-----
<i>Pk</i> IPK1	2219	SNK---TEKGDHEDIENFKKMKOKIFEDSLISEEREITVMQKKNYKILK--SANIYIIDFA
<i>Pf</i> IPK1	2453	KNKLCDDQKINFEELNFKLNIEKVEYESLSNEERNIILQNKLNQKILKKSVEVYIIDFA
<i>Ta</i> HDAC II ^{IPK}	1032	-----DVFLLDLS-----
<i>Pk</i> IPK1	2448	HASLN
<i>Pf</i> IPK1	2692	HASLN
<i>Ta</i> HDAC II ^{IPK}	1180	HVSMN

Abbildung 37 Vergleich der IPK-Domäne von *T. annulata* HDAC II^{IPK} und Plasmodium HDAC IPK1 Durch den paarweisen Vergleich der Aminosäuresequenzen unter Nutzung des ClustalW2-Programms ergab sich eine prozentuale Identität von 40 %. Für diesen multiplen Sequenzvergleich wurden folgende Proteinsequenzen verwendet: *Pk*IPK1 (PKH_080680); *Pf*IPK1 (PF10_0078) und *Ta*HDAC II^{IPK} (TA18230).

9.1.4 Bioinformatische Analyse: Vierte Ergänzung zu Abschnitt 5.1

Klasse III	Apicomplexa	<i>TaSIR2</i>	1	-----MINSAYNYASRLKKNNNKGPLGLDELFFITNK
	Säuget	<i>BbSIR2</i>	1	-----MASSALKYANQLRPNDNKGPCGGVQLFDNPA
	Apicomplexa	<i>BtSIR2</i>	1	-----MRMSVNYAAGLSPYADKKGKGLPEVFDLPPPE
	Säuget	<i>PfSIR2B</i>	1	-----MSCMNYASRLSKNEYKGPLGEEFFDDETE
	Säuget	<i>PfSIR2A</i>	1	-----MGNLMISFLKKK
	Hefe	<i>ScSIR2</i>	179	ALIGTINSIVHINSQERVQDLGSAISVTNVEDPLAKKQIVRLIKDLQRAINLVLCTRLRL
	Säuget	<i>BtSIR2</i>	1	MADDPSPDPEETQAGKQVEAQDSDSDTEAGATGGEAEMDFLRNFFSQTLGLGTQKERLLL

Legende:

- █ SIR2-Domäne
- █ NAD⁺-Bindung
- █ aktives Zentrum
- ◇ Zn²⁺-Bindung
- █ Kernlokalisationsignal

Ta *T. annulata*
Bb *B. bovis*
Pf *P. falciparum*
Bt *B. taurus*
Sc *S. cerevisiae*

```

TaSIR2      32 QVTRKVNLIYEYLSKSNNTLIHTGAGVSTGSGIPDFRGPSSG-IWTVMNNTNTKHDKAKDT
BbSIR2      32 DISKRFKQTVELITRAKNVVLHSSAGMSTAAGIPDFRGPSSG-VWTVMSHKRVGNKRRKMT
BtSIR2      31 ELECKVWELAQLIWQSSVVEHTGAGISTASGIPDFRGPSSG-VWTVMEERGLAPTFTDTTF
PfSIR2B     30 EEKRVKELIEKIRSEYIVVHSSGAGISTSSGLQDFRGPSSG-IWTVNEHLNELKNKRRKRNH
PfSIR2A     13 TQSITLERELAKIHKCKHVVALTSSGTSABSNITSFRRGSSNSHWSKYDPRITYGTIWFQFW
BtSIR2      35 RPSNMALFRKCFARAKHTVVLISGAGISABSGVITFRGAGG-----YWRKWAQDLAT
ScSIR2     239 SNFFTIDHFIQKILHTARKILVLTGAGVSTSLGIPDFRSGEG-FYSKIKHLGLDDPQ----
BtSIR2      61 ELTLEGVSRYMQSERCRVRVCLVAGISTASGIPDFRSENTGLYANLEKYRLLPYPE----
    
```

```

TaSIR2      91 NCREKQNEQYGPLTKSK-----
BbSIR2      91 -----
BtSIR2      77 -----
PfSIR2B     89 DFKDNKRKLSNDINCKNTSDMCSPSFFHKEKKENTLNIVKRERYNEDNVDMMACNERV
PfSIR2A     66 -----
BtSIR2      89 -----
ScSIR2     293 -----
BtSIR2     116 -----
    
```

```

TaSIR2     108 -----KRRKLTDSACIPSMNNTSPGQADSCDIPEKESTACYTD
BbSIR2      91 -----
BtSIR2      77 -----
PfSIR2B    149 VHPNHVYVNHEDDNNNNNNNNNNNLYNNVYNSVGSNDHTNKESILIKKENNENVRKD
PfSIR2A     66 -----
BtSIR2      89 -----
ScSIR2     293 -----
BtSIR2     116 -----
    
```

```

TaSIR2     146 TLKNEETNLEHEKDEETGVEKEDNDYVYVGNRRKRIVEFILLALPSESHICLLLELR-----
BbSIR2      91 -----DGDCTVKDTSNTCVEEGTTKLEPVEFSSHALPSEAHATLALLR-----
BtSIR2      77 -----ENAOPTKTHMALVOLER-----
PfSIR2B    209 IHDKVNTKNVKIDVKETNNLDPENYVIFGKRKKVIELHLALPSKTHMNLIN-----
PfSIR2A     66 -----YPEKIWEVIRDISSDYETEINNGHVALSTLES-----
BtSIR2      89 -----PQAFARNPSQVVEFYHYRREVQVSTEPNAGHIALAECQARLHR
ScSIR2     294 -----DVFNYNIFMHPVSVFYNTANMLPPEKIYSPHLSFTKMLQM
BtSIR2     116 -----AIFEISYFKKHPEPPFALAKELYPGQFKPTICHYFIRLLKE
    
```

```

TaSIR2     202 RKKIRYTIQONIDGLHAVSGIPFDKISELHGNVVFQRC--LFCRRYQRYNYVSTIISFKP
BbSIR2     134 AGYIRTVIQONIDGLHAISGMKHSELELHGNVFIERC--LFCARRYRPPYVAPTIIISFKP
BtSIR2     106 VGLLEHLVSONIDGLHVRSGFPRDKLAELEHGNVFIEEC--VKCKMQYVYRDTVVGSMGLKPK
PfSIR2B    265 KNIIKEMIQONIDSLHHRGCKHFSKTAELHGNVFIERC--DRCGRYRLDYLSTIISFKP
PfSIR2A    105 IGYLRSVVQONIDGLHEASGN--TKVLSLHGNVFEAVC--CICNKIVKLNKIMLQKISHF
BtSIR2     131 QGRQVVVIQONIDELHRKACT--KNLLELHGLSFKTRC--TSCGVVAENYKSPICPALSG
ScSIR2     335 RKKLLRNYIQONIDNLESYAGISTDKLVQCHGSAFATATC--VTCWHNLPGERIENKIRNLE
BtSIR2     158 KGLLLRCYIQONIDTERRVAGLEPDLVEAGTFFITSHCIISSGCRQEYSLWSMKEKIIISFE
    
```

```

TaSIR2     260 T--G--DLCGL-----CTFPPLNVLTDVVLDFWFCYEQYEEETSKLSESSDLHVV
BbSIR2     192 T--G--SHCGL-----CNFPPYGLTDVVLDFWFDREYDFEKKRAISHAEADFHIT
BtSIR2     192 T--G--RLCTWAKSRGLRA--GELRDTILDWEISLDPDLT LADEASRNADISIT
PfSIR2B    323 T--G--SLCFL-----CSFPPIGVCTDVLWLNNSYEFELHLSNKSQSIADEHFHC
PfSIR2A    162 M--HQLPEECP-----CG--GIEKPNILFGEVVSDDLKEAEEIEAKCDLLLV
BtSIR2     161 K--C*PRCEEAG-----CG--GILRPHVWVWEGENLPAILEEVDKELALCDLCLV
ScSIR2     428 L----PLCP--Y-----C*Y--GVLKPDITFEGEALPNKFKHSIREDDILECDLLIC
BtSIR2     217 V----TEKCEK-----CQS--VVKPDLVFEWGENLPAFFSCMQSDFLKVDLLII
    
```

⊗ APDPQTQDAGIPVEKL
 ⊗ YKKRREYFEGYNNKVGVAASQGSMSERPPYILNS

```

TaSIR2     307 MGSLSLHEPACHMASNDYHRKYSPLTILINYSSTKRLDPECDLIIH-EDLNKICTNLLKFK
BbSIR2     239 LGSLSLHEPACCMASSEFERKENAPLVIVNYOKTRLDPEADVVLH-CDVNQICCKLLKTF
BtSIR2     213 LGTSLQIRPSGNLPLATKRR--GGRIVVNL--QFTKHDRHADRIH--GYVDEVVTRLMKHL
PfSIR2B    370 LGSLSFYVPEASSVPSKPKKYANANSYSYCVINYSKSELKSEVNNIHL-SNVNNTSDIILKEF
PfSIR2A    206 LGTSLVSTATNLCHFACKR--KKKIVFINLSKTYLNNKMSDYHV--CAKSEITKVANIL
BtSIR2     248 VGTSSVYVPEAMAPQVSAR--GVVAEFNMETPATERFRHFHQ--GPCGTTPEAMAPH
ScSIR2     470 LGTSLKVAIPVSEIVNMVPSI--VQVILINRDPVKHAEFDLSSL--GYCDDIAAMVAQKC
BtSIR2     260 MGTSLQVQPEFASLIGKAPLS--TERLILNKEKIGQIDFFLGMMSGDCDQGLCALADLL
    
```

⊗ ALGGGMDFDSKAYRDVAWL

```

TaSIR2 366 -----
BbSIR2 298 -----
BtSIR2 281 -----
PpSIR2B 429 SLNPLSIRSARITIVRCPINTLDVICDKLIS IHN IKMKHKS MRQHS IDYSQMGNKDEKYN
PpSIR2A 549 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----
BtSIR2 336 -----

TaSIR2 366 -----
BbSIR2 298 -----
BtSIR2 281 -----
PpSIR2B 489 NEKYVKRNMTECLYYNKEGECYEKRKYKLMKKFFPNNQONEFIPNRINIFEQKFHEHNN
PpSIR2A 549 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----
BtSIR2 336 -----

TaSIR2 366 -----NLKVPTFFKKSHLFILKYNHTANV
BbSIR2 298 -----NIEAPTFIRKYYMVALRHGNSG--
BtSIR2 281 -----
PpSIR2B 549 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNSSSIDSSCSINSYHI SKNINPDFS FV
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----
BtSIR2 336 -----

TaSIR2 390 TTKTNEQNIRLVVIMKSSCIKSVFELSDSAEYRPKCN IHVINKLQGVYKITIKETIRLKL
BbSIR2 320 -----SNTLLRFPCIKSVMVDG--MYTMASGVTHRCLDITRGLHEFSYTNFEMSL
BtSIR2 281 -----PHMVERALP
PpSIR2B 609 ENQSN IYENYKEQTFLICPMI INIKTVRLE SFHKVYIKLDDIKGLWFKTNFSCILEV
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----
BtSIR2 336 -----GWKKELE

TaSIR2 450 TTFHDTELYFEIPYERIVLFGKEIWELDICATNGRRLVKSSKTFYNPDYDHSNSYRDS
BbSIR2 370 QWFEAEMKTKVVYSKEPILNGTVWQISLAATCGKYGNQ-----NTEPLLEFCEVYDQ
BtSIR2 290 FIPRPPAPKLEPKKEEASPOLNSPVPANPKQEP TAE PCTQHNGSGPTS PKRERPLSPSPHR
PpSIR2B 699 FFWYHSFILKLD FNKSDPFIQLNAWVNVA YTYGDDIDDFYFKNDENIKKPFNLKYNK
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----
BtSIR2 343 DTVRKEHASDAQS-GSGASNPATSASPR-----NSPPPPTKEEPRTTEGEK

TaSIR2 510 FEKHEKSSLI GNGVNLINIEKMVVYFNSNLYQEQQLPFRLVGYLDLIRKHNNFTEVKLNK
BbSIR2 424 FVTVSSSLTAHNNAN-----MIPKSEVCRIVGILDCT--
BtSIR2 350 FPKRVKTEVVPS-----
PpSIR2B 729 YISNMRREGHVNNLYTLDNEKVKSN TSNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----
BtSIR2 389 EQ-----

TaSIR2 570 SLTVLSYLWYHKFIQQHQYHLEPKQEDGKYSKRRYRESYELRKTGNFTLYKMEE SFLTS
BbSIR2 455 -----DRVIPDYEQSMP-----MHVKRLEYELYSKLNDSG-----
PpSIR2B 789 NNNNNNNNDNNNNNISDHN IYDDHNNNNKNNHNYDKDNSNESYYCSEILNEHVHVGYNP
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----

TaSIR2 630 PNLDMNTLDYEETKNLKI KFENLTEDSYEKV LNMSESYSFGDEKMEFEKRNMGKSSDSSE
BbSIR2 485 -----KVN IQGLLDVKVEDI LDTLDAIDNVEVLPDITKASIRVGLLELNL
PpSIR2B 849 NNYEPNCKVYILAYLDNLRTRN INNNVNNNNFSR FNLTQSCKLLYNIYCVLNKDNEQKKN
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----
ScSIR2 537 -----

TaSIR2 690 STFDEPHNPNSYNSFNSKEYNL VAMLENYYDNYI INTNTVSESGNTTDRNTRRINMWD
BbSIR2 529 GSVDR-----NQFCIDVDALVDATPG-----
PpSIR2B 909 STIKET YDKLDYFIKNFDFNRDSCLYTNNF INMLIQNERHGNQSR YKFRERKRLLNDYS
PpSIR2A 550 -----
BtSIR2 305 -----ETETVS-----
ScSIR2 537 -----

```

<i>TaSIR2</i>	750	E I F N S S K F N K I I L N K C I K L K W I N M S N N K I I M N K R V D I S D F M L S V K S S L P L K L F V V D N Y Q L
<i>BbSIR2</i>	550	-----NTFTVQAKRFHHMQLLCLSGHEF-----
<i>PfSIR2B</i>	969	SCSSDDDDQSGKNI F I F Y N L Y M N Q Y K K E D N E I N D I Y K K Y D V H E K N I Y D E S K Q Y V H K V R V R
<i>PfSIR2A</i>	549	-----
<i>ScSIR2</i>	537	-----
<i>TaSIR2</i>	810	G Q L L T E I P A H L Q Q N N Y N Y K L F K F N T L Y E F Y T N S A P C G M Y N A S G L E D E D A E Q M K S I N V F E L
<i>BbSIR2</i>	573	G E L V S N V T K V M R L C L E -----R K I K P V T S S R L
<i>PfSIR2B</i>	1029	T D L I N H K S V Y K I L K N N Y L V N I N N M K L M E K K N N S E K L F L I N D K D N N S L L S I N N K E N F N C I P
<i>PfSIR2A</i>	549	-----K G S S E-----
<i>ScSIR2</i>	525	-----G W T I P H K K W N D L-----
<i>TaSIR2</i>	870	L V F N T I N Y I L K L N T L D S Y Y Y S N S H N I G E D K I E H Y V T I K I F H Q F L P L W I I K Y L S D L F E C R -
<i>BbSIR2</i>	600	T T I N T M E R L T H Y A I Q C S V E R V M Q H R D V T P P M V N - - V L K I F T T Q F P L W I L S Y L T D M F E C R -
<i>PfSIR2B</i>	1089	S R Q N N V K K N S E Y M H E E E N N K T N S N E N I A R L N N N D F I Q V E T E K Q K K Y N S F D K Y N S D R S S I
<i>PfSIR2A</i>	549	-----K N K K I M-----
<i>ScSIR2</i>	537	-----K N K N F K C Q E K D K G-----V Y V T S D E H P K T L-----
<i>PfSIR2B</i>	1149	N D T F D E I K Y N K N N D N N N D D N N Y D D N K N D D D N N N D D N N N D D N N N D D N N N D D N N N D D N N N G Y I Y
<i>PfSIR2B</i>	1209	S P V L F I N K K F K L G E L V Y K I P K Y V K P Q K I Y T P Y K K I S R N K K Y S N T L Q K D R Y E K W K M L Y E E L

Abbildung 38 *Theileria annulata* HDAC der Klasse III - *TaSIR2* Vergleichende Gegenüberstellung der vollständigen Proteinsequenzen ausgewählter HDACs der Klasse III. Dabei enthalten sind Vertreter der Apicomplexa SIR2-Proteine, das SIR2 der Bäckerhefe und die bovinen Sirtuine SIRT2, SIRT5 und SIRT6 unter Verwendung des Onlineprogramms ClustalW2. Die schwarze bzw. graue Untermauerung identischer bzw. ähnlicher Aminosäuren erfolgte mithilfe der Webapplikation Boxshade. Die putative HDAC-Domäne der Klasse III wurde dunkelblau unterstrichen. Die hellblau gekennzeichneten Proteinabschnitte können in die NAD⁺-Bindung involviert sein. Die mit einem roten Kreis markierte Aminosäureposition indiziert das prognostizierte aktive Zentrum des *TaSIR2*. Die gelben Rauten zeigen putative Zink(II)-Ion-Bindungsstellen an. Die putativen Kernlokalisationssequenzen wurden pink hervorgehoben. Für den Vergleich wurden folgende Aminosäuresequenzen verwendet: *TaSIR2* (TA20415); *PfSIR2A* (PF13_0152); *PfSIR2B* (PF14_0489); *BbSIR2* (BBOV_1003070); *BtSIRT6* (XP_005209016.1); *BtSIRT5* (ACS66701.1); *BtSIRT2* (NP_001107003.1) und *ScSIR2* (YDL042C).

9.1.5 ICW: Ergänzung zu Abschnitt 5.2.1

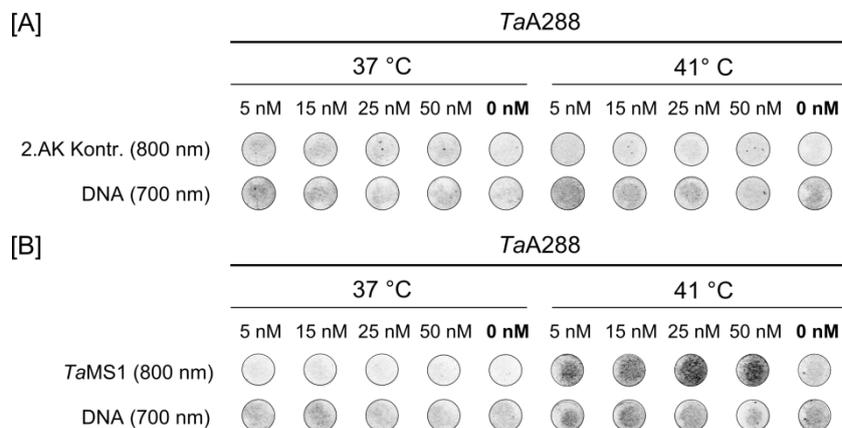


Abbildung 39 Sekundäntikörperkontrollen der ICW-Versuche, die zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von Apicidin auf die *TaMS1* Expression in *TaA288*-Zellen durchgeführt wurden Die Behandlung der Zellen erfolgte für 6 d mit 5 nM bis 50 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO bei 37 °C bzw. 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte transferiert. [A] Als Kontrollen fungierten *TaA288*-Zellen, auf die lediglich Blockierungsreagenz und Sekundäntikörperlösung mit dem DNA-Farbstoff TO-PRO®-3-Iodid gegeben wurden. Dargestellt sind repräsentative *wells* der Sekundäntikörperkontrollen aus drei unabhängigen ICW-Experimenten [B] Zum Vergleich sind repräsentative *wells* darstellt, in denen die Zellen mit *TaMS1* und *ZaM IRDye*® 800CW gefärbt wurden.

9.1.6 qRT-PCR: Erste Ergänzung zu Abschnitt 5.2.2

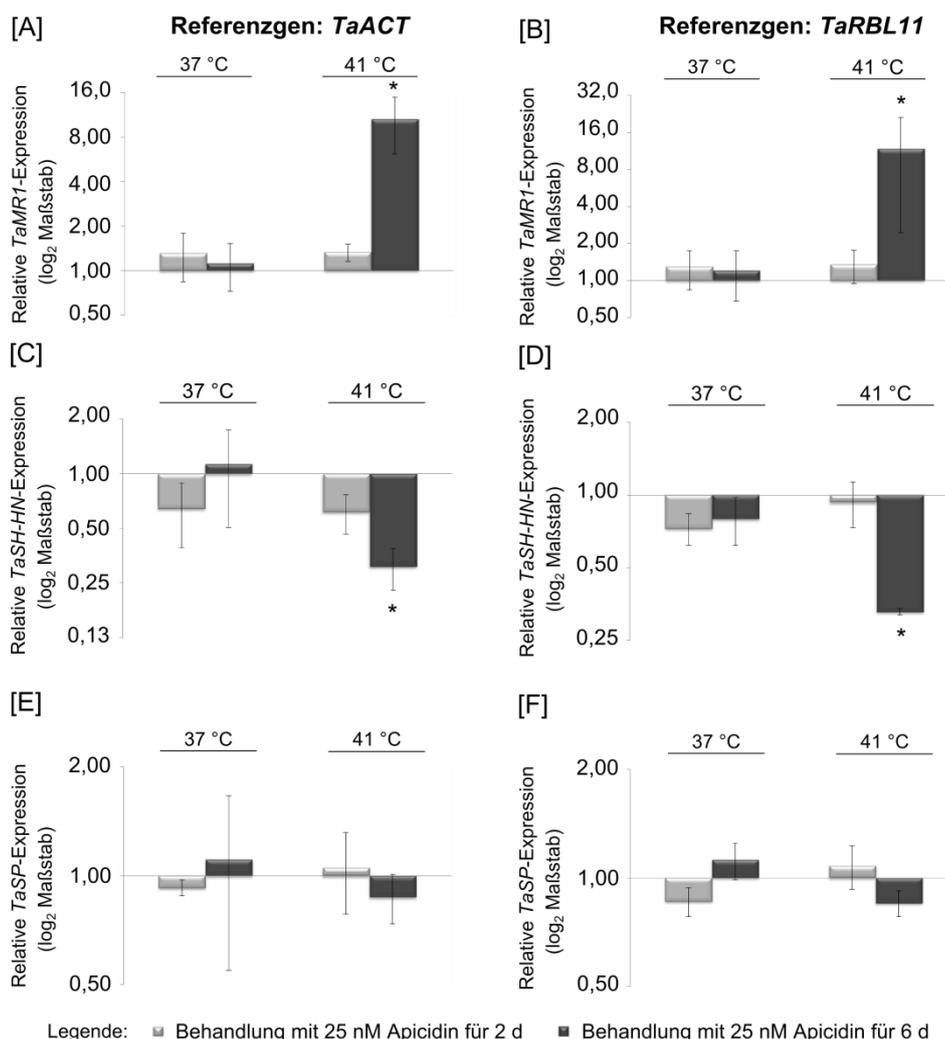


Abbildung 40 Relative Quantifizierung der *TaMR1*-, *TaSH-HN*- und *TaSP*-Transkripte in Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen Die Histogramme stellen die mit qRT-PCR (*quantitative, real-time polymerase chain reaction*; qRT-PCR) gemessenen Expressionen der Gene *TaMR1* [A] + [B], *TaSH-HN* [C] + [D] und *TaSP* [E] + [F] in den Apicidin-behandelten Zellen relativ zu den Expressionen in den unbehandelten Zellen (Lösemittelkontrolle) dar. Das mRNA-Level dieser Transkripte wurde gegen das mRNA-Level des *T. annulata* *ACT*- [A; C; E] bzw. *T. annulata* *RBL11*-Referenzgens [B; D; F] normalisiert. Die Messungen erfolgten nach 2- bzw. 6-tägiger Inkubation der Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C. Die Real-Time PCR Analyse wurde dreimal wiederholt und die Mittelwerte der relativen Expressionswerte sowie die entsprechenden Standardabweichungen im Histogramm dargestellt. Der signifikante Unterschied nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ wurde durch einen Asterisk markiert.

9.1.7 qRT-PCR: Zweite Ergänzung zu Abschnitt 5.2.2

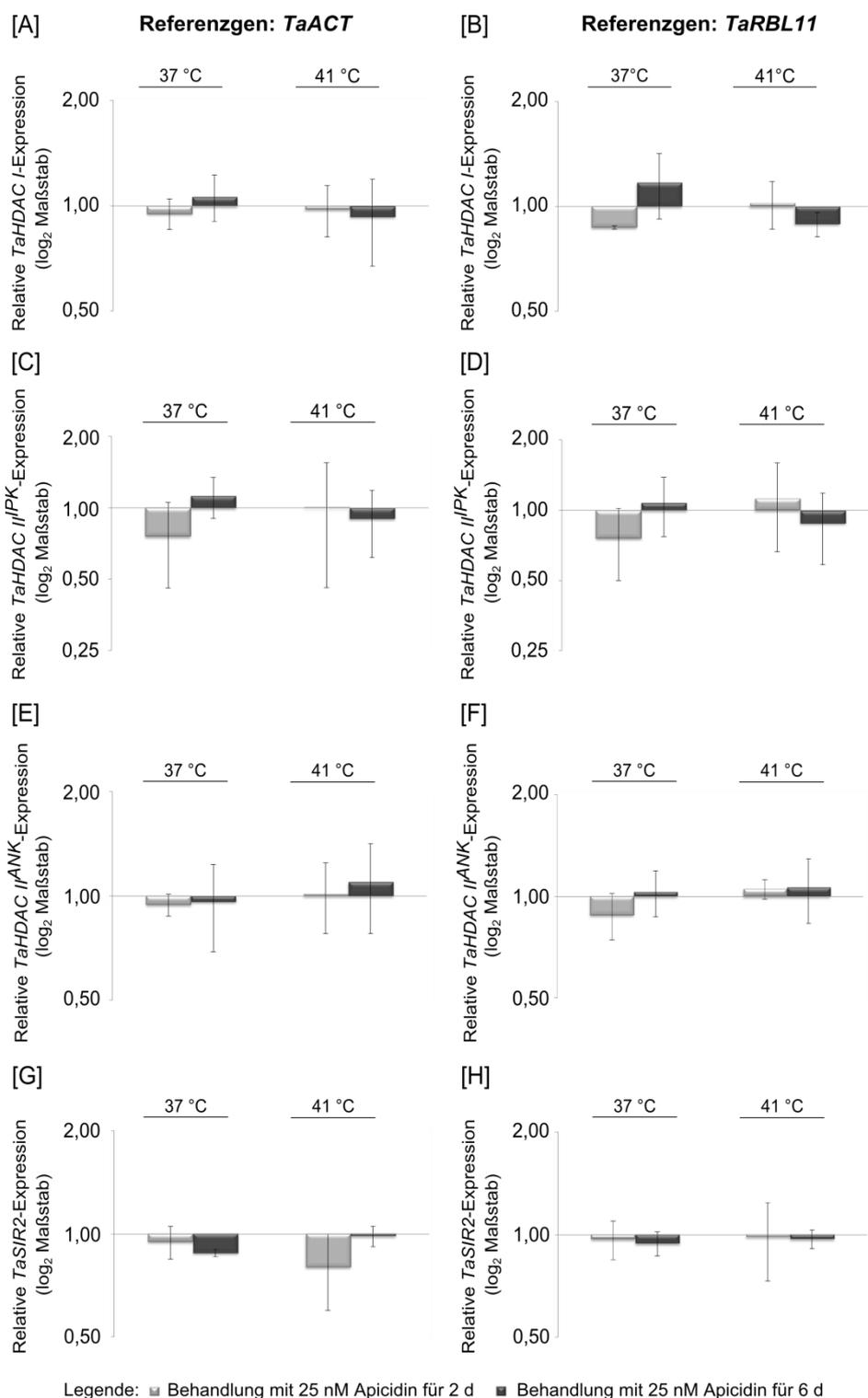


Abbildung 41 Relative Quantifizierung der *TaHDAC I*-, *TaHDAC II^{IPK}*-, *TaHDAC II^{ANK}*- und *TaSIR2*-mRNA in Apicidin-behandelten *TaA288*-Zellen Die Histogramme stellen die mit qRT-PCR -Methodik gemessenen Expressionen der Gene *TaHDAC I* [A] + [B], *TaHDAC II^{IPK}* [C] + [D], *TaHDAC II^{ANK}* [E] + [F] und *TaSIR2* [G] + [H] in den Apicidin-behandelten Zellen relativ zu den Expressionen in den unbehandelten Zellen (Lösemittelkontrolle) dar. Das mRNA-Level dieser Transkripte wurde gegen das mRNA-Level des *T. annulata* *ACT*- [A; C; E; G] bzw. *RBL11*-Referenzgens [B; D; F; H] normalisiert. Die Messungen wurden nach einer Inkubationsdauer von 2 d bzw. 6 d durchgeführt. Die Inkubation erfolgte entweder bei 37 °C bzw. 41 °C. Die qRT-PCR-Analyse wurde dreimal wiederholt und die Mittelwerte der relativen Expression sowie die entsprechenden Standardabweichungen im Histogramm dargestellt.

9.1.8 qRT-PCR: Ergänzung zu Abschnitt 5.2.4

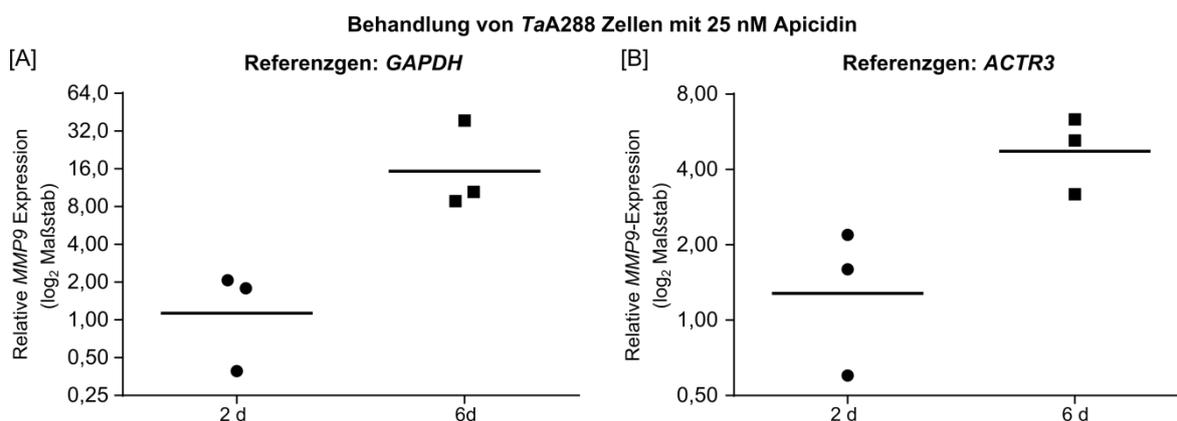


Abbildung 42 Relative Expressionsanalyse des *MMP9* Gens in *TaA288*-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 2 bzw. 6 Tage bei 37 °C Das *MMP9* mRNA-Level wurde gegen das mRNA-Level des bovinen Referenzgens *GAPDH* [A] bzw. *ACTR3* [B] normalisiert. Das Diagramm stellt die mit Real-Time PCR-Verfahren gemessenen mRNA-Expressionsraten des *MMP9*-Gens in den Apicidin-behandelten Zellen relativ zu den Expressionsraten in den Zellen der Lösemittelkontrolle, aus drei Experimenten, dar. Die Datenvisualisierung erfolgte mittels des GraphPad Prism-Programms.

9.1.9 qRT-PCR: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.1

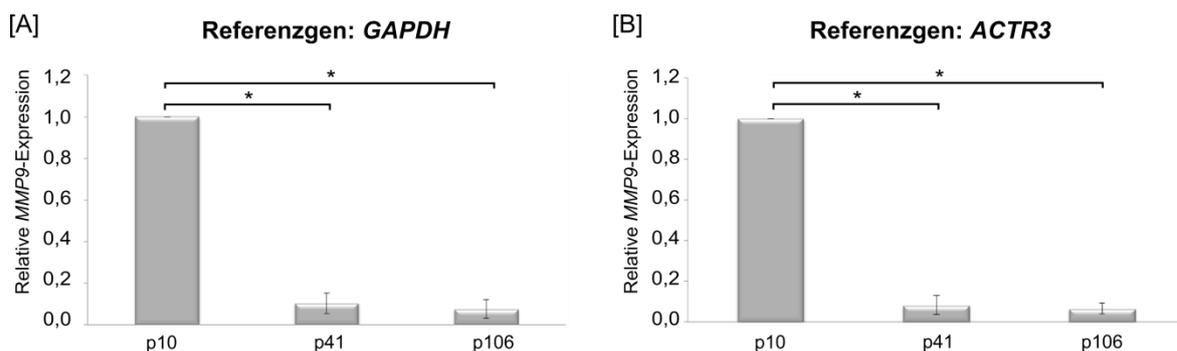


Abbildung 43 Relative Quantifizierung der bovinen *MMP9*-Transkripte in *Ta#868*-Zellen der Passagen 10 (p10), 41 (p41) und 106 (p106) Das *MMP9* mRNA-Level wurde gegen das mRNA-Level des bovinen *GAPDH*-Referenzgens [A] und *ACTR3*-Referenzgens [B] normalisiert. Im Histogramm dargestellt sind die Mittelwerte \pm StdAbw der bovinen *MMP9* mRNA-Expression in den Passagen 41 und 106 relativ zur Passage 10 ("1") aus vier unabhängigen Experimenten. Ein signifikanter Unterschied wurde nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ durch einen Asterisk hervorgehoben.

9.1.10 qRT-PCR: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.3

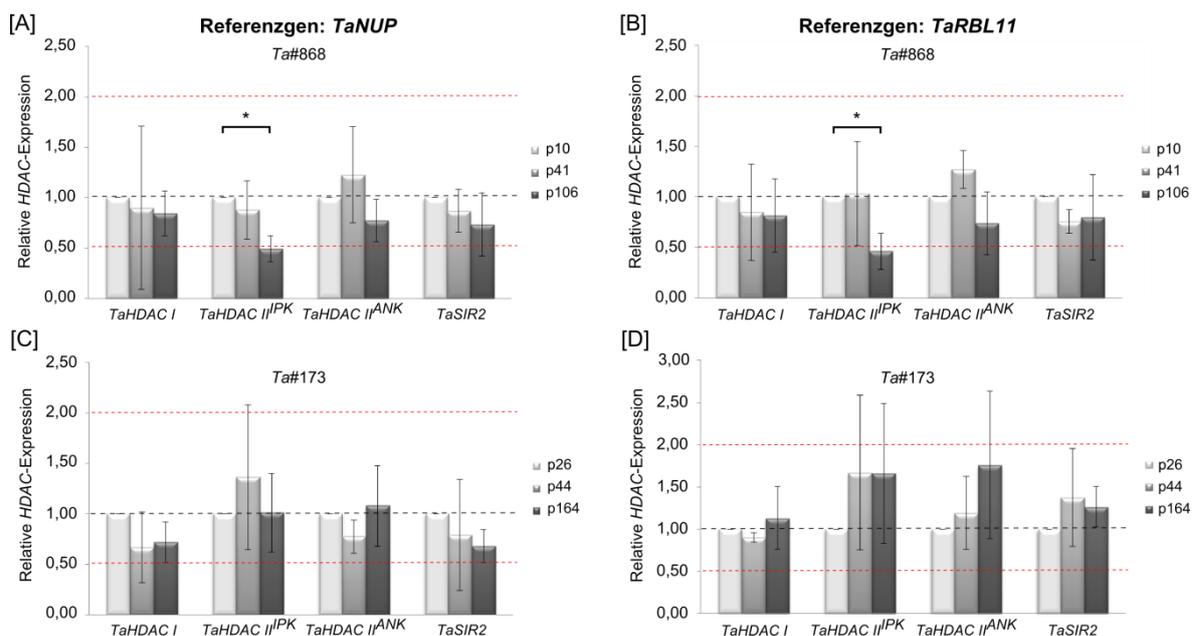


Abbildung 44 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von *T. annulata* HDACs Relative Quantifizierung der *TaHDAC I*, *TaHDAC II^{IPK}*, *TaHDAC II^{ANK}* und *TaSIR2*-Transkripte in *Ta#868*-Zellen der Passagen 10 (p10), 41 (p41) und 106 (p106) [A] + [B] und *Ta#173*-Zellen der Passagen 26 (p26), 44 (p44), 164 (p164) [C] + [D]. Das HDACs mRNA-Level wurde gegen das mRNA-Level des *T. annulata NUP*- [A] + [C] bzw. *RBL11*-Referenzgens [B] + [D] normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm StdAbw der Transkriptionsänderungen der *T. annulata* HDACs aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Der signifikante Unterschied nach der Berechnung von Pfaffl *et al.* 2002¹⁸¹ wurde durch einen Asterisk dargestellt. --- Expressionsänderung um den Faktor 2; --- kein Unterschied in der mRNA-Expression.

9.1.11 ICW: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.4

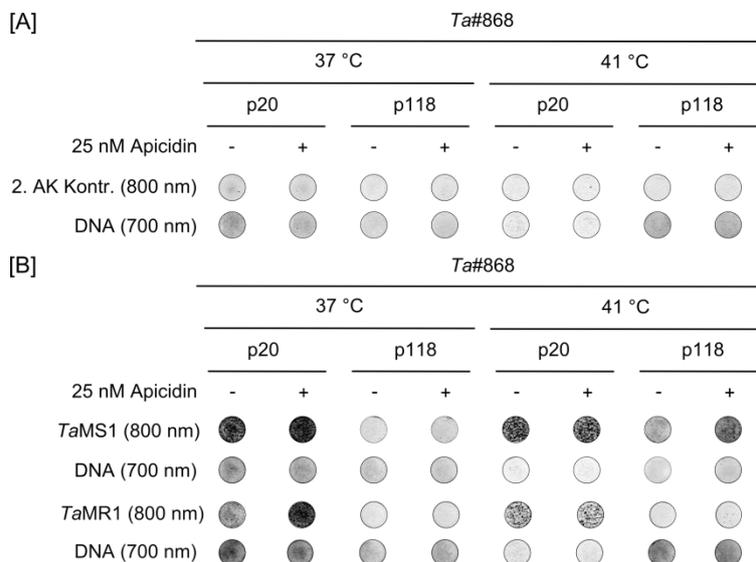


Abbildung 45 Sekundärantikörperkontrollen der ICW-Analysen, die zum Nachweis der Merogoniemarker *TaMS1* und *TaMR1* in Apicidin-behandelten *Ta#868*-Zellen der Passagen 20 (p20) und 118 (p118) durchgeführt wurden Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in der Legende indiziert, für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO bei 37 °C bzw. 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten *Ta#868*-Zellen wurden 24 h vor Ende des Behandlungszeitraumes in eine 96er Mikrotiterplatte übertragen. [A] Zur Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, auf die keine Primärantikörper appliziert wurden, sondern lediglich Blockierungsreagenz und TO-PRO[®]-3-Iodid-Sekundärantikörper-Mix. Dargestellt sind repräsentative *wells* der Sekundärantikörperkontrollen aus drei unabhängigen ICW-Experimenten [B] Zum Vergleich sind repräsentative *wells* darstellt, in denen die Zellen mit α *TaMS1* und α *TaMR1* und Z α M IRDye[®] 800CW gefärbt wurden.

9.1.12 ICW: Ergänzung zu Abschnitt 5.3.5

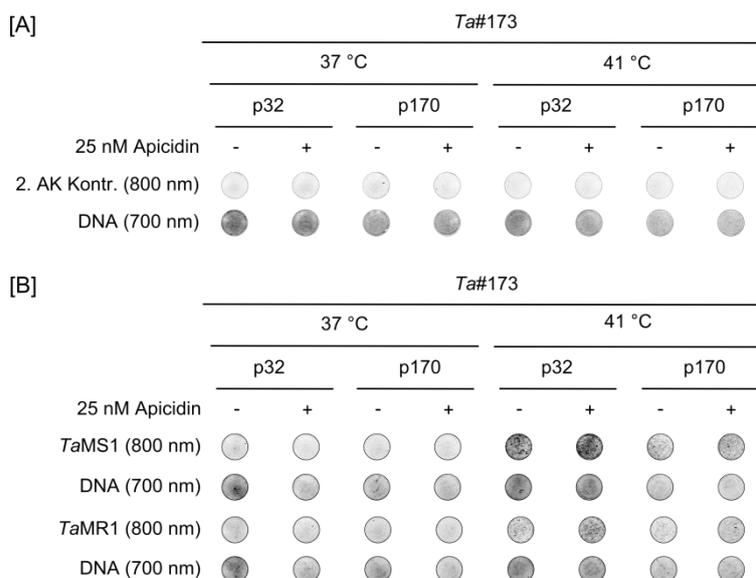


Abbildung 46 Sekundärantikörperkontrollen der ICW-Versuche, die zum Nachweis der Merogoniemarker *TaMS1* und *TaMR1* in Apicidin-behandelten *Ta#173*-Zellen der Passagen 32 (p32) und 170 (p170) durchgeführt wurden Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in der Legende angedeutet, für 6 Tage mit 25 nM Apicidin bzw. mit dem Lösungsmittel bei 37 °C oder 41 °C. Die *T. annulata*-infizierten *Ta#173*-Zellen wurden 24 h vor Abschluss der Inkubation in eine 96er Mikrotiterplatte übertragen. [A] Dargestellt sind repräsentative *wells* der Sekundärantikörperkontrollen aus drei unabhängigen ICW-Experimenten. Auf die entsprechenden Zellen wurden keine Primärantikörper aufgetragen, jedoch Blockierungsreagenz und Sekundärantikörperlösung mit dem DNA-Farbstoff TO-PRO[®]-3-Iodid. [B] Dem gegenübergestellt wurden repräsentative *wells*, in denen die Zellen mit $M\alpha TaMS1$ und $M\alpha TaMR1$ und $Z\alpha M$ IRDye[®] 800CW gefärbt wurden.

9.2 Übersicht der Tabellen und Abbildungen

9.2.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Geräte und deren Hersteller	23
Tab. 2 Chemikalien, Enzyme, Kits und deren Hersteller	25
Tab. 3 Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	27
Tab. 4 Plasmide und ihre Herkunft	28
Tab. 5 Verwendete Zelllinien	29
Tab. 6 Krankheitsverlauf eines 10 Monate alten Kalbes nach Injektion infektiöser Sporozoiten (Tier#842)	30
Tab. 7 Krankheitsverlauf eines 3 Monate alten Kalbes (Tier#868) nach Injektion <i>T. annulata</i> -infizierter Zellen der Passage 2, die zuvor aus dem Kalb#842 isoliert wurden	30
Tab. 8 Krankheitsverlauf eines Kalbes (Tier#860) nach Injektion <i>T. annulata</i> -infizierter Leukozyten der Linie <i>Ta#173</i> aus Passage 20	31
Tab. 9 Durch Injektion <i>T. annulata</i> -infizierter Leukozyten der Linie <i>Ta#173</i> aus Passage 113 verursachte physiologische Auswirkungen im Kalb (Tier#847)	31
Tab. 10 Verwendete Primer	32
Tab. 11 Verwendete UPL-Sonden	34
Tab. 12 Primärantikörper: Herkunft und Verwendung	34
Tab. 13 Sekundärantikörper: Herkunft und Verwendung	35
Tab. 14 Verwendete Computerprogramme	35
Tab. 15 Datenbanken und Webapplikationen	36
Tab. 16 Subkultivierung von <i>T. annulata</i> -infizierten Leukozyten und BoMac-Zellen bei einer Konfluenz von annähernd 90 % und hoher Zellvitalität	39
Tab. 17 Ausgesäte Zellzahl für qRT-PCR und <i>Western Blot</i>	41
Tab. 18 Ausgesäte Zellzahl für die ICW-Analyse	43
Tab. 19 Reaktionsansätze für konventionelle PCR	44
Tab. 20 Temperatur- und Zeitparameter einer konventionellen PCR	44
Tab. 21 Reaktionsansatz für den DNase I Verdau	47
Tab. 22 Zusammensetzung eines qRT-PCR Ansatzes	48
Tab. 23 Temperatur- und Zeitparameter einer qRT-PCR	48

9.2.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Taxonomie von <i>Theileria spec.</i>	2
Abb. 2 Lebenszyklus von <i>T. annulata</i>	3
Abb. 3 Mechanismen der Immunabwehr bei einer Theilerien-Infektion	7
Abb. 4 Transformation und Modulation der Wirtszelle durch Apicomplexaparasiten	9
Abb. 5 Theilerien-abhängige Transformation bewirkt tumorartigen Phänotyp der Wirtszelle	11
Abb. 6 Verlauf der Merogonie bei <i>T. annulata</i>	15
Abb. 7 <i>B. bovis</i> und <i>T. annulata</i> Attenuierung	17
Abb. 8 Histonacetylierung und Regulation der Genexpression	18
Abb. 9 Klassifizierung einiger Apicomplexa HDACs	19
Abb. 10 Bedeutung von Apicomplexa HDACs	21
Abb. 11 Prinzip des <i>In Cell Western</i>	43
Abb. 12 <i>Theileria annulata</i> HDAC der Klasse I – TaHDAC I	57
Abb. 13 <i>Theileria annulata</i> HDAC der Klasse II – TaHDAC II ^{IPK}	59
Abb. 14 <i>Theileria annulata</i> HDAC der Klasse II – TaHDAC II ^{ANK}	62
Abb. 15 <i>Theileria annulata</i> HDAC der Klasse III – TaSIR2	65
Abb. 16 Untersuchung der Apicidin-abhängigen TaMS1-Expression in attenuierten TaA288-Zellen bei 37 °C und 41 °C	67
Abb. 17 Untersuchung der Apicidin-abhängigen TaMR1-Expression in attenuierten TaA288-Zellen bei 37 °C und 41 °C	68
Abb. 18 Konzentrationsabhängigkeit der TaMS1-Expression in attenuierten TaA288-Zellen bei 37 °C und 41 °C	69
Abb. 19 Relative Quantifizierung der TaMR1-, TaSH-HN- und TaSP-Transkription in Apicidin-behandelten TaA288-Zellen	71
Abb. 20 Relative Quantifizierung der TaHDAC I-, TaHDAC II ^{IPK} -, TaHDAC II ^{ANK} - und TaSIR2-Transkription in Apicidin-behandelten TaA288-Zellen	72
Abb. 21 TaMS1 Nachweis in TaA288-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 6 Tage bei 41 °C mittels indirekter Immunfluoreszenz	74
Abb. 22 TaMR1 Nachweis in TaA288-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 6 Tage bei 41 °C mittels indirekter Immunfluoreszenz	75
Abb. 23 Relative Expressionsanalyse des MMP9-Gens in TaA288-Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 2 Tage bzw. 6 Tage bei 37 °C	76
Abb. 24 MMP9 mRNA Nachweis in Apicidin-behandelten und unbehandelten BoMac-Zellen	77
Abb. 25 Relative Quantifizierung der bovinen MMP9-Transkripte in Ta#868-Zellen der Passagen 10 (p10), 41 (p41) und 106 (p106)	79
Abb. 26 Untersuchung der TaMR1-Expression in niedrig und hoch passagierten Ta#868-Zellen bei 37 °C und nach einer <i>in vitro</i> simulierten Fieberreaktion (41 °C)	81

Abb. 27 Untersuchung der <i>TaMS1</i> -Expression in niedrig und hoch passagierten <i>Ta#868</i> -Zellen bei 37 °C und 41 °C	82
Abb. 28 <i>TaMR1</i> Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz in <i>Ta#868</i> -Zellen bei 37 °C	83
Abb. 29 Relative Quantifizierung der <i>T. annulata HDACs</i> mRNA	85
Abb. 30 Untersuchung der Apicidin-abhängigen <i>TaMS1</i> -Expression in niedrig und hoch passagierten <i>Ta#868</i> -Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C	86
Abb. 31 Untersuchung der Apicidin-abhängigen <i>TaMR1</i> -Expression in niedrig und hoch passagierten <i>Ta#868</i> -Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C	87
Abb. 32 Untersuchung der Apicidin-abhängigen <i>TaMS1</i> -Expression in niedrig und hoch passagierten <i>Ta#173</i> -Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C	88
Abb. 33 Untersuchung der Apicidin-abhängigen <i>TaMR1</i> -Expression in niedrig und hoch passagierten <i>Ta#173</i> -Zellen bei 37 °C bzw. 41 °C	89
Abb. 34 Modell zur Wirkung von HDACs bzw. Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf, durch Langzeitkultivierung, abgeschwächte Prozesse, wie Merogonie und Metastase	102
Abb. 35 Einheitsmatrix einiger Apicomplexa HDACs, der bovinen HDACs und ausgewählter HDACs der Bäckerhefe	118
Abb. 36 Clusteranalyse von Apicomplexa HDACs	119
Abb. 37 Vergleich der IPK-Domäne von <i>T. annulata HDAC II^{IPK}</i> und Plasmodium HDAC IPK1	119
Abb. 38 <i>Theileria annulata HDAC</i> der Klasse III - <i>TaSIR2</i>	122
Abb. 39 Sekundärantikörperkontrollen der ICW-Versuche, die zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von Apicidin auf die <i>TaMS1</i> Expression in <i>TaA288</i> -Zellen durchgeführt wurden	122
Abb. 40 Relative Quantifizierung der <i>TaMR1</i> -, <i>TaSH-HN</i> - und <i>TaSP</i> -Transkripte in Apicidin-behandelten <i>TaA288</i> -Zellen	123
Abb. 41 Relative Quantifizierung der <i>TaHDAC I</i> -, <i>TaHDAC II^{IPK}</i> -, <i>TaHDAC II^{ANK}</i> - und <i>TaSIR2</i> -mRNA in Apicidin-behandelten <i>TaA288</i> -Zellen	124
Abb. 42 Relative Expressionsanalyse des <i>MMP9</i> Gens in <i>TaA288</i> -Zellen nach Behandlung mit 25 nM Apicidin für 2 bzw. 6 Tage bei 37 °C	125
Abb. 43 Relative Quantifizierung der bovinen <i>MMP9</i> -Transkripte in <i>Ta#868</i> -Zellen der Passagen 10 (p10), 41 (p41) und 106 (p106)	125
Abb. 44 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von <i>T. annulata HDACs</i>	126
Abb. 45 Sekundärantikörperkontrollen der ICW-Analysen, die zum Nachweis der Merogoniemarker <i>TaMS1</i> und <i>TaMR1</i> in Apicidin-behandelten <i>Ta#868</i> -Zellen der Passagen 20 (p20) und 118 (p118) durchgeführt wurden	126
Abb. 46 Sekundärantikörperkontrollen der ICW-Versuche, die zum Nachweis der Merogoniemarker <i>TaMS1</i> und <i>TaMR1</i> in Apicidin-behandelten <i>Ta#173</i> -Zellen der Passagen 32 (p32) und 170 (p170) durchgeführt wurden	127

9.2.3 Abkürzungsverzeichnis

Abbiaviatur

A	Adenin
A_{nm}	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge
aa	Aminosäure, <i>amino acid</i>
ACT	Aktinprotein von <i>T. annulata</i> (TA15750)
ACTR3	<i>actin related protein 3</i> von <i>Bos taurus</i> (BT26681)
ad	<i>addiere</i> ; auffüllen
AK	Antikörper
ANK	<i>ankyrin repeat</i> -Proteinmotiv
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATF-2	<i>activating transcription factor 2</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>Bb</i>	<i>Babesia bovis</i>
BoMac	<i>bovine macrophages</i> ; bovine Makrophagen-Zelllinie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>Bt</i>	<i>Bos taurus</i>
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Carb	Carbenicillin
CDK 1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
<i>Ch</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>
c-Jun	Bestandteil von AP-1
CK2	Casein Kinase 2
c-Myc	Transkriptionsfaktor, benannt nach <u>Myelocytomatose</u>
Cp	qRT-PCR <i>crossing point</i>
<i>Cp</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> ; zytotoxische T Zellen
d.h.	das heißt
Da	Dalton; atomare Masseneinheit
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddH₂O	Millipore-Q deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>double-stranded</i> ; doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB1	<i>end-binding protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

et al.	<i>et alia</i> ; und andere
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase von <i>Bos taurus</i> (BT11420)
gDNA	Genomische DNA
GTPase	<i>small guanosine triphosphate hydrolase</i>
H2A; H2B; H3; H4	Histonproteine H2A; H2B; H3; H4
HAT(s)	<i>histone acetyltransferase(s)</i> ; Histonacetyltransferase(n)
HDA1	<i>histone deacetylase 1</i> von <i>S. cerevisiae</i>
HDAC(s)	<i>histone deacetylase(s)</i> ; Histondeacetylase(n)
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
i. d. F.	In diesem Fall
ICW	<i>In Cell Western</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IgG; IgM	Immunglobulin G; Immunglobulin M
IKK	<i>I-kappa-B kinase complex</i>
IL	Interleukin
IP(s)	<i>inositol polyphosphatase(s)</i> ; Inositolpolyphosphat
IP6K3	<i>inositol hexakisphosphate kinase</i>
IPK	<i>inositol phosphate kinase</i> ; Inositolphosphatkinase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
JNK	<i>c-Jun N-terminale kinase</i>
K	Kaninchen
Kontr.	Kontrolle
LacZ	Gen des Lactose-Operons von <i>Escherichia coli</i>
LB	Luria-Bertani; Bakterien-Kulturmedium
LMK	Lösemittelkontrolle
M	Maus
MHC I + II	<i>major histocompatibility complex I + II</i> ; Haupthistokompatibilitäts-Komplex I + II
MMP 9	Matrix-Metalloproteinase 9
MMP(s)	<i>matrix metalloproteinase(s)</i> ; Matrix-Metalloprotease(n)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Mikrotubuli
n.a.	nicht angegeben
n.b.	nicht bestimmt
NAD⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NC	Nitrocellulose
NEAS	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisierungssignal

NO•	<i>nitrogen oxide</i> ; Stickstoffmonoxid
NTPs	Nukleosidtriphosphate (ATP, GTP, CTP, TTP)
NUP	Nucleoporin von <i>T. annulata</i> (TA10260)
OD_{nm}	Optische Dichte einer bestimmten Wellenlänge
p	Anzahl der durchgeführten Zellpassagen
p	p-Wert; Signifikanzwert
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
p104	Oberflächenprotein von <i>T. annulata</i>
p53	Tumorsuppressor 53kDa
PAA	Polyacrylamid
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i> ; periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3-K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
<i>Pk</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
PK	Phasenkontrast
PKB	<i>protein kinase B</i> ; PKB alias AKT
PLK 1	<i>Polo-like-kinase 1</i>
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
qRT-PCR	<i>quantitative, real-time polymerase chain reaction</i>
RBL11	ribosomales Protein L11 von <i>T. annulata</i> (TA05670)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROCK	<i>rho-associated coiled-coil-containing protein kinase</i>
RPD3	<i>reduced potassium dependency 3</i> ; HDAC von <i>S. cerevisiae</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur; ≈ 25°C
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIR2	<i>silent information regulator 2</i> ; Sirtuin von <i>S. cerevisiae</i>
SIRT	Säugersirtuin
SOC	<i>super optimal broth with catabolic repressor</i> ; Bakterienkultur-Medium
Src	<i>Sarcoma</i>
ss	<i>single-stranded</i> ; einzelsträngig
StdAbw	Standardabweichung
SUAT1	<i>T. annulata</i> kodiertes Wirtszellkernprotein (TA03135)
T	Thymin
<i>T. annulata</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. lestoquardi</i>	<i>Theileria lestoquardi</i>
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>

Ta	<i>Theileria annulata</i>
Ta#173	<i>T. annulata</i> -infizierte Leukozyten der Linie Ta#173
Ta#846	<i>T. annulata</i> -infizierte Leukozyten der Linie Ta#846
Ta#868	<i>T. annulata</i> -infizierte Leukozyten der Linie Ta#868
TaA288	<i>T. annulata</i> -infizierte Leukozyten der Linie TaA288
TaHDAC I	<i>T. annulata</i> HDAC (TA12690); Klasse I
TaHDAC II^{ANK}	<i>T. annulata</i> HDAC (TA17590); Klasse II
TaHDAC II^{PK}	<i>T. annulata</i> HDAC (TA18230); Klasse II
TaMR1	<i>T. annulata</i> merozoite rhoptry protein (TA16685)
TaMS1	<i>T. annulata</i> major merozoite surface protein (TA17050)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TaSE	<i>T. annulata</i> Sekretorisches Protein (TA20205)
TaSH	<i>T. annulata</i> kodierte Wirtszellkernproteine
TaSH-HN	<i>T. annulata</i> kodierte Wirtszellkernproteine TaSH-HN1 (TA20083) und TaSH-HN2 (TA20090)
TaSIR2	<i>T. annulata</i> HDAC (TA20415); Klasse III
TaSP	<i>T. annulata</i> surface protein (TA17315)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Detergenz Tween [®] 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB I + II	transformation buffer I + II
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF-β	transforming growth factor-β; Transformierender Wachstumsfaktor
TNF-α	tumor necrosis factor α; Tumornekrosefaktor-α
u. a.	unter anderem
ün	über Nacht
UPL	Universal Probe Library
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
var	<i>P. falciparum</i> variant genes
vol	Volumen
VSA	variant surface antigens
w/v	weight per volume
WB	Western Blot
WK	Wirtszellkern
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z. T.	zum Teil

Sonderzeichen

α	anti
©	Copyright
Δ	Differenzzeichen
∅	Durchmesser
≅	entspricht
%	Prozent
®	Registered Trade Mark
α	Signifikanzniveau
∞	unendlich
≈	ungefähr
™	Unregistered Trade Mark

Einheiten

A	Ampère, Einheit der Stromstärke
°C	Grad Celsius
g	Gramm
k	Kilo
l	Liter
m	Meter
μ	Micro
m	Milli
min	Minute
M	Molarität
n	Nano
p	Pico
m²	Quadratmeter
s	Sekunde
h	Stunde
d	Tag
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
V	Volt, Einheit der Spannung

Aminosäuren mit Drei- bzw. Einbuchstabencode

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin
Ile	I	Isoleucin	Val	V	Valin

10 Lebenslauf

11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jabbar Ahmed und Frau Prof. Dr. Ulrike Seitzer für ihre Anleitung und dafür, dass Sie es mir ermöglicht haben am Forschungszentrum Borstel diese Doktorarbeit anzufertigen. Ebenso geht mein Dank an Herrn PD Dr. Norbert Reiling für die Übernahme der Betreuung und anschließende Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes bin ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft verpflichtet.

Ebenso geht mein Dank an meine ehemaligen Kollegen, die mich in den vergangenen Jahren durch wertvolle Tipps und Diskussionsbeiträge unterstützt haben. Dankbar bin ich auch für die schöne, gemeinsame Zeit in Bortsel, auf auswärtigen Konferenzen und in der Freizeit. Hervorzuheben ist Dr. Monika Mackiewicz, die mich im Labor und besonders in der Endphase dieser Arbeit sehr unterstützt hat. Ein herzliches Dankeschön geht auch an die lieben Helferlein; Kulli, Beti, Anja, Britta und Doreen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Varda Shkap und Prof. Dr. Brian Shiels für die Bereitstellung von *T. annulata*-infizierten Zellen bzw. von Antikörperlösungen.

Einen herzlichen Dank geht an meine Familie, die immer für mich da war und mir mein Studium überhaupt ermöglicht hat, dabei danke ich besonders meinen Mann, der mich zuletzt immer wieder motiviert hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin