

***Neospora caninum* GRA9:
molekularbiologische und funktionelle
Charakterisierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Margret Leineweber

aus Höxter

Düsseldorf, Januar 2013

aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Walter Däubener
Korreferent: Prof. Dr. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2013

Für Nike

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Eidesstattliche Erklärung	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Die taxonomische Einordnung von <i>Neospora caninum</i>	1
1.2. Der Lebenszyklus von <i>Neospora caninum</i>	2
1.3. Die Pathogenese der Neosporose in End- und Zwischenwirten und die Übertragungswege	4
1.4. Die Diagnose der Neosporose in End- und Zwischenwirten	5
1.5. Unterscheidung von verschiedenen <i>Neospora caninum</i> -Isolaten	6
1.6. Vergleich von <i>Neospora caninum</i> Tachyzoiten und Bradyzoiten	7
1.7. Invasionsprozess von <i>Neospora caninum</i> in die Wirtszelle	9
1.8. Vermehrung von <i>Neospora caninum</i> in der parasitophoren Vakuole und Evasion aus der Wirtszelle	13
1.9. Die Proteine der sekretorischen Organellen von <i>Neospora caninum</i>	15
1.9.1 Die Mikronemen-Proteine von <i>Neospora caninum</i>	15
1.9.2. Die Rhoprien-Proteine von <i>Neospora caninum</i>	16
1.9.3. Die dichte Granula-Proteine von <i>Neospora caninum</i>	17
1.10. Der gerichtete Transport sekretorischer Proteine in ihre Zielorganellen	20
1.11. Die Motilität von Apicomplexa-Parasiten	21
1.12. Das <i>Neospora caninum</i> -Genom ist für molekulargenetische Methoden zugänglich	22
1.13. Zielsetzung	23
2. Material	25
2.1. Chemikalien	25
2.2. Medien und Puffer	26
2.3. Geräte	29
2.4. Verbrauchsmaterialien	29
2.5. Antikörper	30
2.5.1. Primäre Antikörper	30
2.5.2. Sekundäre Antikörper	31
2.6. Enzyme	31
2.6.1. Restriktionsendonukleasen	31
2.7. Größenstandards	32
2.8. Kits	32
2.9. Oligonukleotide	32
2.9.1. Oligonukleotide für PCR	32
2.9.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen	33
2.9.3. Oligonukleotide und Sonde für qPCR	33
2.10. Plasmide	33
2.11. Zelllinien	33
2.12. Bakterienstämme	33
2.13. Parasitenstämme	34
3. Methoden	35
3.1. Mikrobiologische Methoden	35
3.1.1. Bakterien	35
3.1.1.1. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	35
3.1.1.2. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	35

3.2. Zellkulturmethoden	36
3.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
3.2.2. Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten	36
3.2.3. Kultivierung von Parasiten	36
3.3. Molekularbiologische Methoden	37
3.3.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	37
3.3.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus <i>Neospora caninum</i>	37
3.3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	37
3.3.1.3. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	37
3.3.1.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Neospora caninum</i>	38
3.3.1.5. cDNA-Synthese	38
3.3.1.6. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	39
3.3.1.7. Sequenzierungen von DNA	39
3.3.2. Southern Blot-Analyse	39
3.3.3. Enzymatische Methoden	40
3.3.3.1. DNA-Restriktion mit Restriktionsendonukleasen	40
3.3.3.2. DNA-Ligation	40
3.3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion	40
3.3.3.4. Quantitative Real-Time PCR	41
3.3.3.5. Dephosphorylierung von Proteinen	42
3.3.3.6. Deglykosylierung von Proteinen	42
3.4. Gelelektrophoretische Methoden	42
3.4.1. Auftrennung von DNA in Agarosegelen	42
3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.5. Proteinbiochemische Methoden	43
3.5.1. <i>In vitro</i> -Induktion von exkretierten/sekretierten Antigenen	43
3.5.2. Herstellung von <i>Neospora caninum</i> - und <i>Toxoplasma gondii</i> -Lysatantigen	44
3.5.3. Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen	44
3.5.4. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein-Assay	45
3.5.5. Zellfraktionierung von <i>Neospora caninum</i> durch Ultrazentrifugation	45
3.5.6. Triton X-Partionierung	46
3.5.7. Ko-Immunpräzipitation	46
3.5.8. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	48
3.5.9. Western Blot-Analyse	48
3.5.10. Immunchemischer Nachweis von Proteinen	48
3.5.11. Immunfluoreszenzanalyse	49
3.5.11. Denaturierende Proteinaufreinigung aus <i>Escherichia coli</i>	50
3.5.12. Massenspektroskopische Analysen	51
3.6. Herstellung von <i>Neospora caninum</i> und <i>Toxoplasma gondii</i> Mutanten	51
3.6.1. Transfektion und Selektion von <i>Neospora caninum</i> und <i>Toxoplasma gondii</i>	51
3.6.2. Klonierung von stabilen Klonlinien	51
3.7. Computerprogramme	52
4. Ergebnisse	53
4.1. Charakterisierung von NcGRA9	53
4.1.1. Analyse von <i>Ncgra9</i> auf genomischer Ebene	53
4.1.2. Analyse der Proteinstruktur von NcGRA9	57
4.2. Expression von rekombinantem NcGRA9 in <i>Escherichia coli</i> und Herstellung von polyklonalen Antiseren	58
4.3. Lokalisierung von NcGRA9 in <i>Neospora caninum</i>	63
4.4. Immunologische Kreuzreaktivität von GRA9-spezifischen Antiseren	69
4.5. Posttranslationale Modifizierungen von NcGRA9	70
4.6. Untersuchung der Targeting-Eigenschaften von NcGRA9	72
4.6.1. Untersuchung der exkretierten/sekretierten Antigene von <i>N. caninum</i>	72
4.6.2. Analyse des Verhaltens von NcGRA9 in den dichte Granula	73

4.6.3. Analyse der subzellulären Verteilung von NcGRA9	74
4.7. Expression von rekombinantem NcGRA9 in <i>Neospora caninum</i>	77
4.8. Heterologe Expression von NcGRA9 in <i>Toxoplasma gondii</i>	81
4.9. Analyse funktioneller Domänen im NcGRA9 Protein	82
4.9.1. Expression von C-terminalen trunkierten NcGRA9-Proteinen in <i>Neospora caninum</i>	82
4.9.2. Lokalisierung von C-terminal trunkierten NcGRA9-Proteinen in <i>Neospora caninum</i>	85
4.9.3. Einfluss der Expression von verkürzten Varianten des NcGRA9-Proteins auf die Viabilität der Parasiten	87
4.9.4. Analyse des Sekretionsverhaltens der C-terminal verkürzten NcGRA9-Proteine	88
4.10. Identifikation möglicher Interaktionspartner von NcGRA9	90
5. Diskussion	93
5.1. Beschreibung der genomischen Organisation von NcGRA9	94
5.2. Charakterisierung funktioneller Domänen des Proteins NcGRA9	95
5.3. Kreuzreaktion polyklonaler Antiseren gegen NcGRA9 und TgGRA9	96
5.4. Lokalisierungsverhalten von NcGRA9 in <i>Neospora caninum</i> -Tachyzoiten	98
5.5. Lokalisierungsverhalten von NcGRA9 in <i>Neospora caninum</i> -Bradyzoiten	99
5.6. Posttranslationale Modifikationen von NcGRA9	101
5.7. Analyse des Löslichkeitsverhaltens von NcGRA9 in den dichte Granula	102
5.8. Analyse des Löslichkeitsverhaltens von NcGRA9 innerhalb der parasitophoren Vakuole	104
5.9. Identifikation möglicher Interaktionspartner von NcGRA9	105
5.10. Heterologe Expression von NcGRA9 in <i>Toxoplasma gondii</i>	107
5.11. Analyse funktioneller Domänen von NcGRA9 mittels C-terminal trunkierter Proteine	108
5.12. Untersuchung des Sekretionsverhaltens der C-terminal trunkierten NcGRA9-Proteine	110
6. Zusammenfassung	113
7. Summary	114
8. Literaturverzeichnis	115
9. Danksagung	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Phylogenetischer Baum der Apicomplexa.	2
Abbildung 1.2 Lebenszyklus von <i>Neospora caninum</i> .	3
Abbildung 1.3 Stadienkonverion in <i>Neospora caninum</i> .	8
Abbildung 1.4 Zytoskelett des Apicalkomplexes.	10
Abbildung 1.5 Invasion von <i>Neospora caninum</i> in die Wirtszelle.	11
Abbildung 1.6 Endodyogenie der Coccidia Tachyzoiten.	14
Abbildung 1.7 <i>Neospora caninum</i> Tachyzoit.	16
Abbildung 4.1 Abgleich der genomischen DNA-Sequenz gegen die cDNA-Sequenz von <i>Ncgra9</i> .	54
Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der genomischen Sequenz und der cDNA-Sequenz von <i>Ncgra9</i> .	55
Abbildung 4.3 Analyse der Exon-Intron-Struktur von <i>Ncgra9</i> mittels Polymerasekettenreaktion.	55
Abbildung 4.4 Schema der Position von <i>Ncgra9</i> auf Chromosom XII mit den flankierenden Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen.	56
Abbildung 4.5 Southern Blot-Analyse des DNA-Verdaus mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen.	56
Abbildung 4.6 Sequenzvergleich des Proteins NcGRA9 mit dem Protein TgGRA9.	57
Abbildung 4.7 Schematische Darstellung der Alphahelices und des hydrophilen Profils von NcGRA9.	58
Abbildung 4.8 Darstellung der Alphahelix, die von den Aminosäuren 82 bis 101 gebildet wird, als „Helical Wheel“.	58
Abbildung 4.9 Coomassie-gefärbte SDS-PAGE, auf der ein Eluat der denaturierenden Protein-aufreinigung von NcGRA9 aufgetrennt wurde.	59
Abbildung 4.10 Austestung der Antiseren gegen das rekombinante NcGRA9 mittels Western Blot-Analyse.	62
Abbildung 4.11 Die Antiseren gegen rekombinantes NcGRA9 erkennen die rekombinanten Proteine NcGRA9 und TgGRA9.	63
Abbildung 4.12 Lokalisationsstudie von NcGRA9 in extrazellulären <i>N. caninum</i> mittels Immunfluoreszenzanalyse.	64
Abbildung 4.13 Analyse der Lokalisation von NcGRA9 nach Wirtszellinvasion des Parasiten mittels Immunfluoreszenztest.	64
Abbildung 4.14 Immunfluoreszenzanalysen von NcGRA9 im Vergleich zu NcGRA7, NcMIC1 und NcSAG1 in extrazellulären <i>N. caninum</i> -Tachyzoiten.	65
Abbildung 4.15 Immunfluoreszenzanalyse von NcGRA9 im Vergleich zu NcGRA7, NcMIC1 und NcSAG1.	66
Abbildung 4.16 Auswertung der SNP-induzierten Stadienkonversion von Tachyzoiten in Bradyzoiten.	68
Abbildung 4.17 Bestätigung der Kreuzreaktivität des anti-TgGRA9-Antiserums gegen Lysatantigene von <i>T. gondii</i> und <i>N. caninum</i> .	69
Abbildung 4.18 Darstellung der Kreuzreaktivität von anti-NcGRA9 beziehungsweise anti-TgGRA9 mittels Immunfluoreszenzanalyse.	69
Abbildung 4.19 Seren von <i>N. caninum</i> infizierten Rindern wurden auf Reaktivität gegen rekombinantes NcGRA9 und TgGRA9 getestet.	70
Abbildung 4.20 <i>In silico</i> Analyse der potentiellen Phosphorylierungsstellen in der Proteinsequenz von NcGRA9.	71
Abbildung 4.21 Behandlung von <i>N. caninum</i> Lysaten mit Lambda Proteinphosphatase zum Nachweis von Phosphorylierungen.	71
Abbildung 4.22 <i>In silico</i> -Analyse der mutmaßlichen O-Glykosilierungsstellen in der Proteinsequenz von NcGRA9.	72

Abbildung 4.23 Analyse der exkretierten-sekretierten Antigene von <i>N. caninum</i> .	73
Abbildung 4.24 Partionierung von <i>N. caninum</i> durch Triton X-114-Behandlung.	74
Abbildung 4.25 Zellfraktionierung von <i>N. caninum</i> mittels Ultrazentrifugation.	75
Abbildung 4.26 Analyse der Interaktionsart zwischen NcGRA9 und dem intravakuolären Netzwerk.	76
Abbildung 4.27 Analyse der Interaktionsart von NcGRA9 in extrazellulären <i>N. caninum</i> .	76
Abbildung 4.28 Expressionsnachweis von NcGRA9-HA in transfizierten <i>N. caninum</i> mittels Western Blot-Analyse.	78
Abbildung 4.29 Lokalisierung des transfizierten NcGRA9-HA innerhalb von extrazellulären <i>N. caninum</i> -Tachyzoiten.	78
Abbildung 4.30 Analyse der Lokalisation des transfizierten NcGRA9-HA nach Wirtszellinvasion.	79
Abbildung 4.31 Expression von rekombinantem NcGRA9-HA in Tachyzoiten und Bradyzoiten.	80
Abbildung 4.32 Analyse des Interaktionsverhaltens von NcGRA9-HA.	80
Abbildung 4.33 Nachweis des HA-markierten NcGRA9 in transfizierten <i>T. gondii</i> .	81
Abbildung 4.34 Analyse der Lokalisation von transfiziertem NcGRA9-HA in <i>T. gondii</i> .	82
Abbildung 4.35 Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von NcGRA9.	83
Abbildung 4.36 Reverse Transkriptase-PCR zum Nachweis, dass die NcGRA9-HA-Varianten in das <i>N. caninum</i> Genom integriert und auch transkribiert wurden.	84
Abbildung 4.37 Nachweis der HA-markierten NcGRA9-Varianten mittels Western Blot-Analyse.	85
Abbildung 4.38 Lokalisationsanalyse der transfizierten NcGRA9-HA-Varianten in <i>N. caninum</i> infizierten Wirtszellen.	86
Abbildung 4.39 Lokalisationsverhalten von $\Delta 280$ NcGRA9-HA in der PV beziehungsweise den intrazellulären Parasiten.	87
Abbildung 4.40 Wachstumsverhalten der transfizierten <i>N. caninum</i> im Vergleich zu Wildtyp- <i>N. caninum</i> .	87
Abbildung 4.41 Kinetik der Sekretion von Vollängen NcGRA9-HA.	88
Abbildung 4.42 Sekretionsverhalten von $\Delta 280$ NcGRA9-HA zu verschiedenen Zeitpunkten.	89
Abbildung 4.43 Analyse der Lokalisation von $\Delta 201$ NcGRA9-HA über einen Zeitraum von 24 h.	89
Abbildung 4.44 Analyse der ESA-Präparation von Parasiten, die verschiedene NcGRA9-HA-Varianten exprimieren.	90
Abbildung 4.45 Analyse der Kolokalisation von NcGRA9 und NcMAG1 nach Wirtszellinvasion.	92
Abbildung 4.46 Auswertung der Ko-Immunitätspräzipitation mittels Western Blot-Analyse.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektroskopieanalyse von Bande 1.	60
Tabelle 4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektroskopieanalyse von Bande 2.	60
Tabelle 4.3 Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation, die mittels Massenspektroskopie ausgewertet wurde.	91

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	M	molar
ATP	Adenosin-Triphosphat	MBq	Megabecquerel
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MJ	Moving Junction
bp	Basenpaare	mM	millimolar
BCIP-T	5-Brom-4-Chloro-3- Idolyphosphat- Dinatriumsalz	min	Minute
BSA	bovines Serumalbumin	ml	Milliliter
bzw.	beziehungsweise	MOPS	3- Morpholinopropansulfon- säure
cDNA	komplementäre Desoxyri- bonukleinsäure	MW	Molekulargewicht
Cy2	Cyanine	µl	Mikroliter
Cy3	Indocarbocyanine	µM	Mikromolar
DAPI	4'6-Diamidino-2- Phenylindol- Dihydrochloridhydrat	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
dATP	Desoxyadenosin- Triphosphat	NLA	<i>Neospora caninum</i> Lysatan- tigen
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat	OD	optische Dichte
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ORF	offener Leserahmen
dGTP	Desoxyguanosin- Triphosphat	PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
DNase	Desoxyribonuklease	PBS	Phosphate Buffered Saline
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dNTP	Desoxynukleosid- Triphosphat	PV	parasitophore Vakuole
DTT	Dithiothreitol	PVM	parasitophore Vakuolen- membran
dTTP	Desoxythymidin- Triphosphat	qPCR	quantitative Real-Time Pol- ymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RNA	Ribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	RT	Raumtemperatur
ER	Endoplasmatisches Retiku- lum	RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
FCS	fötales Kälberserum	s	Sekunde
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
HSP	„high speed“ Pellet	SNP	Natriumnitroprussid
HSÜ	„high speed“ Überstand	SSC	Citrat-gepufferte Salzlösung
IMC	Innerer Membrankomplex	TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
IPTG	Isopropyl-Beta-D- Thiogalactopyranosid	TCA	Trichloressigsäure
kb	Kilobasen	TEMED	N, N, N, N,- Tetramethylethylendiamin
kDa	Kilodalton	TLA	<i>Toxoplasma gondii</i> Lysatan- tigen
l	Liter	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
LB	Luria-Bertani	UpM	Umdrehungen pro Minute
LSP	„low speed“ Pellet	ü. N.	über Nacht
LSÜ	„low speed“ Überstand	v/v	Volumenprozent
		w/v	Gewichtsprozent
		z. B.	zum Beispiel

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertationsarbeit von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, Januar 2013

Margret Leineweber

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit *Neospora caninum* (*N. caninum*), einem 1984 erstmalig beschriebenen, obligat intrazellulären Parasiten. Obwohl *N. caninum* kein zoonotischer Erreger ist, hat er große wirtschaftliche Bedeutung aufgrund der Infektion von Nutztieren. Insbesondere bei Rindern gilt *N. caninum* als Erreger von chronischen Infektionen und ist einer der häufigsten Verursacher von Aborten.

1.1. Die taxonomische Einordnung von *Neospora caninum*

Taxonomisch ist *Neospora caninum* dem Stamm der Apicomplexa zu zuordnen. Apicomplexa sind mit den Ciliata und Dinoflagellata nah verwandt und umfassen etwa 4500 einzellige, obligat intrazelluläre Parasiten. Die Apicomplexa-Parasiten haben einen komplexen Lebenszyklus, der ungeschlechtliche und geschlechtliche Vermehrungsformen einschließt (Marechal und Cesbron-Delauw, 2001). Die Parasiten dieses Stammes haben eine einzigartige und auffallende strukturelle Besonderheit, den Apikalkomplex. Dieser Apikalkomplex ist namensgebend für den Stamm der Apicomplexa und ist am anterioren Ende des Parasiten lokalisiert. Zudem sind in den Parasiten des Stammes Apicomplexa zwei extrachromosomale genetische Elemente im Apikoplasten und im Mitochondrium vorhanden. Der Apikoplast ist ein Plastid, welches keine photosynthetische Aktivität mehr besitzt (Marechal und Cesbron-Delauw, 2001). Es wird angenommen, dass sich die Apicomplexa entweder aus den Dinoflagellata entwickelt haben oder dass die beiden Stämme einen gemeinsamen Vorläufer besitzen (Cavalier-Smith, 1993; Wolters, 1991).

Der obligat intrazelluläre Parasit *N. caninum* gehört zum Stamm der Apicomplexa und wird der Unterklasse der Coccidia und der Unterordnung der Eimerina zugeordnet (Abbildung 1.1). Analysen der 18S rRNA von *N. caninum* und *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) haben gezeigt, dass die beiden Parasiten phylogenetisch sehr nah miteinander verwandt sind (Ellis et al., 1994). *N. caninum* wurde 1984 erstmals als unbekanntes, zystenbildendes Sporozoon in Hunden beschrieben, welche an Enzephalomyelitis beziehungsweise Myositis litten (Bjerkas et al., 1984). 1988 wurde *N. caninum* benannt und konnte das erste Mal isoliert und kultiviert werden (Dubey et al., 1988a; Dubey et al., 1988b). Inzwischen wurde eine Infektion mit *N. caninum* in diversen Spezies beschrieben, darunter sind zum Beispiel Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde und Rehe (Dubey, 2003; Dubey und Lindsay, 1996; Dubey und Schares, 2011; Hemphill, 1999). Eine Infektion mit *N. caninum* wird als einer der Hauptgründe für Fehlgeburten bei Rindern angesehen, was zu enormen wirtschaftlichen Verlusten in der Milch- und

Fleischindustrie führt (Dubey et al., 2002; Gondim et al., 2004a; Hemphill und Gottstein, 2000; Innes et al., 2005).

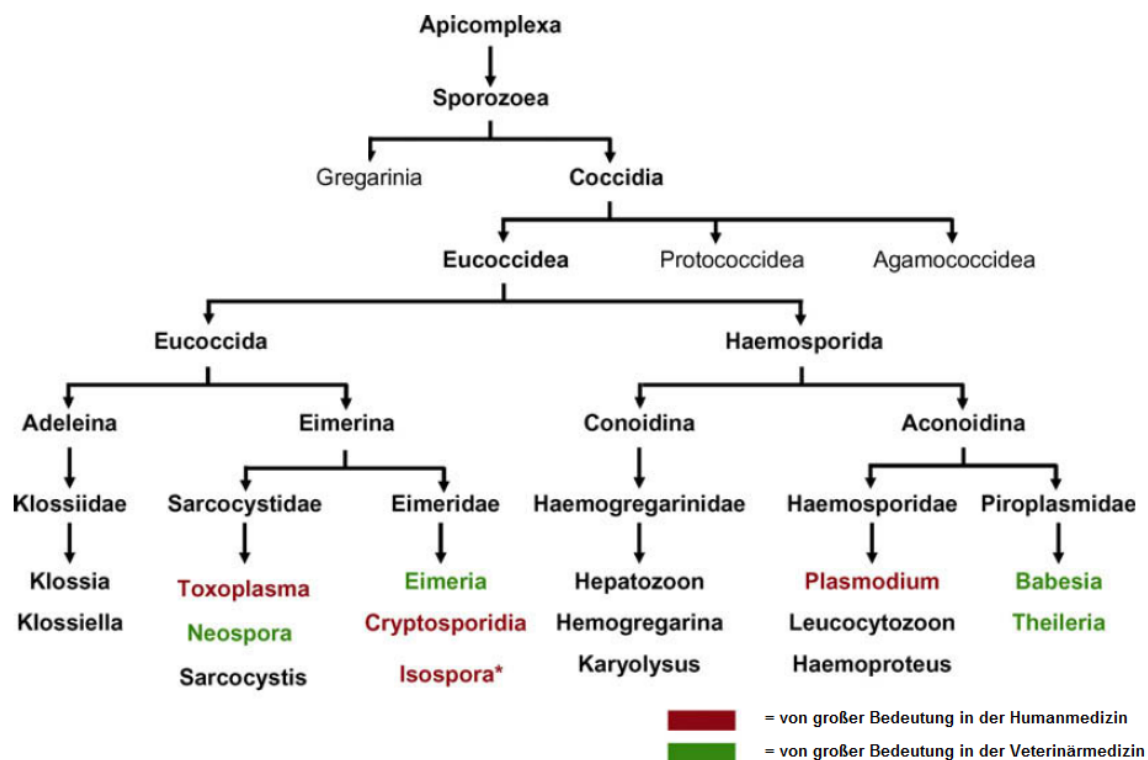


Abbildung 1.1 Phylogenetischer Baum der Apicomplexa. Die Abbildung zeigt, dass *N. caninum* zur Unterklasse der Coccidia, der Unterordnung der Eimerina und der Familie der Sarcocystidae gehört (modifiziert nach (Beck et al., 2009)).

1.2. Der Lebenszyklus von *Neospora caninum*

N. caninum durchläuft während des Lebenszyklus verschiedene Stadien (Abbildung 1.2). Die geschlechtliche Vermehrung von *N. caninum* findet ausschließlich im Endwirt statt. Es ist bekannt, dass die Endwirte aus der Familie der Canidae stammen und es wurden der Haushund (*Canis domesticus*), der australische Dingo (*Canis lupus dingo*), der Kojote (*Canis latrans*) und der Grauwolf (*Canis lupus*) als Endwirte von *N. caninum* identifiziert (Dubey et al., 2011; Gondim et al., 2004b; King et al., 2010; McAllister et al., 1998). Nichtsporulierte Oozysten werden mit dem Kot des Endwirtes ausgeschieden und sporulieren innerhalb von drei Tagen. In dieser Form kann der Parasit lange überdauern, da die Oozysten, wie die Oozysten anderer zystenbildender Coccidia, relativ umweltresistent sind (Alves Neto et al., 2011; Uzeda et al., 2007). Die Oozysten enthalten zwei Sporozysten, welche jeweils vier Sporozoiten und ein Residuum einschließen (McAllister et al., 1998). Die Größe von Oozysten beträgt 11,7 x 11,3 µm. Die Oozystenwand ist farblos und 0,6 – 0,8 µm dick. Die beiden

Sporozysten sind 8,4 µm lang und 6,1 µm breit. Die Sporozoiten haben eine eher längliche Form mit den Maßen 6,5 x 2 µm (Dubey et al., 2002).

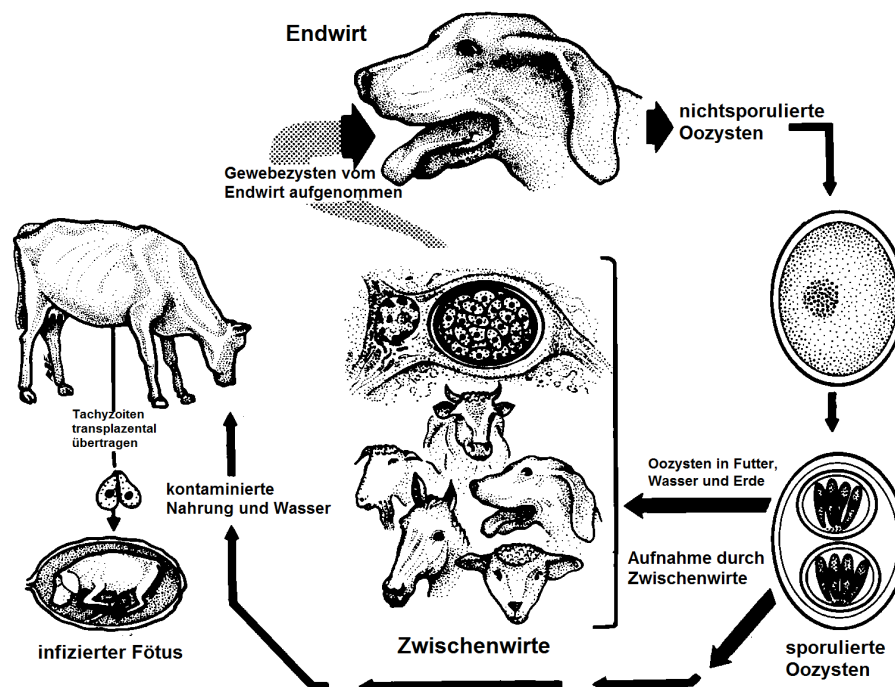


Abbildung 1.2 Lebenszyklus von *Neospora caninum*. Der Lebenszyklus von *N. caninum* ist in eine Phase der geschlechtlichen Vermehrung, welche nur in den Endwirten stattfindet, und eine Phase der ungeschlechtlichen Vermehrung geteilt. Die ungeschlechtliche Vermehrung findet sowohl im Endwirt als auch in den Zwischenwirten statt (modifiziert nach (Dubey, 2003)).

Durch die Aufnahme von Oozysten über Futtermittel und Wasser durch Zwischenwirte, welche z. B. Rinder, Schafe, Ziegen oder Hunde sein können, wird eine *N. caninum*-Infektion weitergeben (De Marez et al., 1999). Nach oraler Aufnahme werden die Sporozoiten aus der Oozyste freigesetzt und infizieren intestinales Gewebe, woraufhin eine Verteilung der Parasiten im gesamten Körper der Zwischenwirte erfolgt (Gondim et al., 2004a; Trees et al., 2002). Die Sporozoiten durchlaufen eine Stadienkonversion und die daraus resultierenden, schnell proliferierenden Tachyzoiten sind charakteristisch für die akute Phase der Infektion. Tachyzoiten vermehren sich ungeschlechtlich und sind 7,5 µm lang und 2 µm breit (Dubey et al., 2002). *N. caninum*-Tachyzoiten können zellkernhaltige Zellen einschließlich Makrophagen und Lymphozyten infizieren.

Der Stress, der vom Immunsystem auf die Parasiten ausgeübt wird, wird als ein Faktor angesehen, der die Stadienkonversion in Bradyzoiten auslöst (Buxton et al., 2002; Eastick und Elsheikha, 2010). Bradyzoiten sind 8 µm lang und 2 µm breit und befinden sich in Gewebezysten (Dubey et al., 2002). Bradyzoiten sind die ruhende Form von *N. caninum*, sind stress-tolerant und können lange in den Gewebezysten im Wirt überdauern (Eastick und Elsheikha,

2010). Die Gewebezysten sind vor allem im Zentralen Nervensystem und in der Skelettmuskulatur zu finden (Peters et al., 2001). Trächtige Zwischenwirte können *N. caninum* vertikal auf den Fötus übertragen, denn durch eine Schwangerschaft kommt es zu Veränderungen im Immunsystem, damit der allogene Fötus akzeptiert werden kann. Diese Immunsuppression bewirkt außerdem, dass die ruhenden Bradyzoiten in den Gewebezysten reaktiviert werden und zu Tachyzoiten differenzieren (Innes et al., 2005). Wenn Tachyzoiten über die Plazenta auf den Fötus übertragen werden (McAllister et al., 1998), kann dies zum Abort des Fötus führen oder es wird ein chronisch infizierter Nachkomme geboren (Dubey, 2003).

Eine horizontale Verbreitung findet statt, wenn Gewebezysten durch fleischfressende Endwirte aufgenommen werden und diese sich so mit *N. caninum* infizieren (Dubey und Schares, 2011). Dadurch, dass Endwirte Gewebezysten aufnehmen, wird der Lebenszyklus von *N. caninum* geschlossen. In den Endwirten vollziehen die Bradyzoiten eine Stadienkonversion in ein sich geschlechtlich vermehrendes Parasitenstadium, sodass wiederum Oozysten ausgeschieden werden können.

1.3. Die Pathogenese der Neosporose in End- und Zwischenwirten und die Übertragungswege

Hunde sind einer der Endwirte von *N. caninum* und dieser Parasit ist für Hunde jeden Alters pathogen. In den häufigsten Fällen erkranken die Hunde an Neosporose, die intrauterin infiziert wurden. Diese Tiere werden meistens ohne Symptome geboren und entwickeln drei oder mehr Wochen nach der Geburt eine symptomatische Erkrankung. Nicht alle Tiere eines Wurfs sind gleichermaßen von der Krankheit betroffen (Dubey und Lindsay, 1996). Ein allgemeines Merkmal der neonatalen Neosporose ist die Paralyse der Hinterläufe (Dubey et al., 2007). Eine große Anzahl an klinischen Symptomen wurde auch in älteren Hunden beschrieben, die vorher oft einer immunsupprimierenden Therapie unterzogen wurden (Crookshanks et al., 2007; Fry et al., 2009; Galgut et al., 2010; Garosi et al., 2010; Holmberg et al., 2006).

Infizierte Hunde scheiden als Endwirt von *N. caninum* Oozysten aus, durch deren Aufnahme die Zwischenwirte infiziert werden können (McAllister et al., 1998). Diese Übertragung über Kot spielt jedoch sehr wahrscheinlich keine Rolle für die Infektion der Endwirte (Dubey und Schares, 2011). Die wahrscheinlichste Infektionsquelle für Hunde ist die Aufnahme von infiziertem, zystenhaltigem Gewebe, vorzugsweise der Plazenta eines Zwischenwirtes. Dieser Übertragungsweg führt dazu, dass Hunde, die auf dem Land leben, häufiger infiziert sind als Hunde in der Stadt. Außerdem kann der Parasit selten auch vertikal von der trächtigen Hündin auf die Föten übertragen werden. Die vertikale Übertragung in Hunden ist eine Rarität und *N. caninum* persistiert wahrscheinlich nicht in Hunden ohne horizontale Übertragung (Dubey und Schares, 2011).

Rinder sind einer der häufigsten Zwischenwirte von *N. caninum* und eine Infektion mit *N. caninum* ist einer der Hauptursachen für Aborte bei Kühen (Dubey und Schares, 2011). Dabei ist die vertikale Übertragung von *N. caninum* in Rindern sehr effizient. Eine vertikale Übertragung findet statt, wenn die Verbreitung einer *N. caninum*-Infektion von einer chronisch infizierten Kuh auf den Fötus während der Trächtigkeit stattfindet (Dubey et al., 2006). *N. caninum* persistiert in Kühen lebenslang (Trees et al., 1999) und kann in mehreren aufeinander folgenden Trächtigkeiten mit oder ohne Unterbrechungen auf die Nachkommen übertragen werden (Boulton et al., 1995; Guy et al., 2001; Piergili Fioretti et al., 2003; Wouda et al., 1998). Eine direkte Übertragung von *N. caninum* von Kuh zu Kuh findet jedoch nicht statt (Anderson et al., 1997). Der Fötus kann nach vertikaler Übertragung des Parasiten im Uterus sterben, resorbiert werden, mumifizieren oder totgeboren werden. Außerdem kann das Kalb mit Symptomen oder ohne Symptome, aber immer chronisch infiziert, zur Welt kommen (Dubey und Schares, 2011). Andere Symptome als Aborte können nur in Kälbern, die jünger als zwei Monate sind, beobachtet werden. Dazu gehörten neurologische Anzeichen, wie zum Beispiel das Unvermögen aufzustehen oder Untergewicht. Außerdem können die Hinter- und/oder Vorderbeine pathologisch geknickt oder überstreckt sein und eine neurologische Untersuchung kann Ataxie und/oder verminderte Kniescheibenreflexe zeigen. Gelegentlich können bei Kälbern auch Geburtsfehler wie Hydrozephalus und eine Verengung des Rückenmarkkanals auftreten (Dubey und Schares, 2011).

Neben dem vertikalen Übertragungsweg ist auch die horizontale Übertragung bei Rindern wichtig und wesentlich für das Überleben des Parasiten. *N. caninum* wird horizontal auf Rinder übertragen, wenn sporulierte Oozysten über Nahrung und Wasser aufgenommen werden (Dubey et al., 2006). Hier ist eine symptomatische Neosporose eher die Ausnahme, jedoch führt jede Primärinfektion zu einer chronischen Infektion mit dem nachfolgenden Risiko der manifesten Erkrankung bei einer Immunsuppression oder einer vertikalen Übertragung.

1.4. Die Diagnose der Neosporose in End- und Zwischenwirten

Zur Diagnose der Neosporose in Hunden werden serologische Tests durchgeführt (Dubey et al., 1998a; Dubey et al., 2007). Eine Behandlung der Neosporose mit derzeit zur Verfügung stehenden Medikamenten wie Clindamycin ist nur teilweise effektiv. Keines der nutzbaren Arzneimittel kann *N. caninum*-Gewebezysten abtöten (Dubey et al., 2004; Dubey et al., 2007).

In adulten Rindern ist die Diagnose einer akuten gegenüber einer chronischen *N. caninum*-Infektion epidemiologisch wichtig. Aviditätstests werden eingesetzt, um die akute von der chronischen Phase der Infektion zu unterscheiden. Dabei deutet eine geringe Avidität auf eine akute Infektion hin, die nur wenige Wochen lang dauert (Basso et al., 2010). Des Weiter-

ren werden „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISAs), die auf den rekombinanten Proteinen NcGRA7 und NcSAG4 basieren, eingesetzt. Wenn Antikörper gegen NcGRA7 detektiert werden, handelt es sich um eine eher akute Infektion, in der Tachyzoiten replizieren. Die Detektion von NcSAG4 deutet auf eine chronische Infektion hin, da während dieser Phase das Bradyzoitenstadium von *N. caninum* vorhanden ist und NcSAG4 bradyzoitenspezifisch ist. Falls Antikörper gegen beide rekombinanten Proteine nachgewiesen werden, deutet dies auf eine reaktivierte *N. caninum*-Infektion hin (Aguado-Martinez et al., 2008). Außerdem werden zur Diagnose der bovinen Neosporose auch immunhistologische und molekularbiologische Diagnosemethoden wie zum Beispiel PCR eingesetzt. Dies ist besonders wichtig zur Klärung von Aborten aufgrund einer *N. caninum*-Infektion (Dubey und Schares, 2006).

Eine Behandlung der Neosporose in Rindern ist unwirtschaftlich, da sie nur als vorbeugende Maßnahme eingesetzt werden kann und daher langfristig erfolgen müsste. Außerdem würden unzulässige Rückstände der Medikamente in Milch und Fleisch zurückbleiben. Zurzeit gibt es keine sinnvolle Chemotherapie gegen bovine Neosporose, die sicher und effektiv wäre (Dubey und Schares, 2011). Eine Impfung gegen Neosporose wäre eine Alternative, allerdings ist im Augenblick keine kommerzielle Vakzine erhältlich. Einige Studien konnten jedoch bereits zeigen, dass Rinder eine humorale und zelluläre Immunantwort nach Impfung mit attenuierten *N. caninum*, abgetöteten Tachyzoiten, Peptiden oder nativen Antigenen entwickelten (Baszler et al., 2008; Innes et al., 2007; Moore et al., 2011).

1.5. Unterscheidung von verschiedenen *Neospora caninum*-Isolaten

Der Nachweis, dass *N. caninum* eine ernstzunehmende Krankheit in Rindern und Hunden und gelegentlich in anderen Tieren auslösen kann, ist mehrfach erbracht. Eine Infektion ist häufig, aber die Ausbildung eines Krankheitsbildes ist selten. Diese Beobachtung könnte *N. caninum*-Isolat spezifisch sein (Dubey und Schares, 2011). Mittels Multilokus-Mikrosatellit-Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen *N. caninum*-Isolate genetisch ähneln, dabei haben aber viele Isolate ihre eigene genetische Signatur (Al-Qassab et al., 2010; Al-Qassab et al., 2009; Basso et al., 2009; Basso et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2006). Über die Virulenz der verschiedenen Isolate ist wenig bekannt. In verschiedenen Studien in Mausmodellen waren einigen *N. caninum*-Isolate virulenter als andere (Pereira Garcia-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Rojo-Montejo et al., 2009). Zum Beispiel konnte beim Vergleich von NC-Liverpool und NC-1 im Mausmodell gezeigt werden, dass die Mäuse, die mit NC-Liverpool infiziert wurden, öfter Symptome einer Neosporose zeigten als NC-1 infizierte Mäuse. Außerdem starben deutlich mehr Mäuse an einer Infektion mit NC-Liverpool (Collantes-Fernandez et al., 2006). Auch im Vergleich mit dem Isolat NC-

SweB1 zeigt NC-Liverpool eine höhere Pathogenität in Mäusen (Atkinson et al., 1999). Des Weiteren konnten auch bei der *in vitro*-Kultivierung Unterschiede zwischen den Isolaten festgestellt werden (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Rojo-Montejo et al., 2009). Allerdings ist nicht bekannt, ob die Virulenz im Mausmodell einen Einfluss auf den Verlauf einer *N. caninum*-Infektion in anderen Wirten widerspiegeln kann.

1.6. Vergleich von *Neospora caninum* Tachyzoiten und Bradyzoiten

N. caninum kann in Zwischenwirten zwischen zwei phänotypisch und funktionell unterschiedlichen Parasitenstadien wechseln. Die Tachyzoiten und Bradyzoiten enthalten die sekretorischen Organellen, welche typisch für Coccidien sind. In *N. caninum*-Tachyzoiten sind 6 bis 16 vorwiegend apikal lokalisierte, elektronendichte Rhoptrien, von denen auch 4 bis 6 posterior des Zellkerns nachgewiesen werden können (Speer et al., 1999). Die Mikronemen sind zahlreich im anterioren Bereich des Parasiten vorhanden und teilweise senkrecht zur Pellikula ausgerichtet. Außerdem sind sogenannte dichte Granula im gesamten Zytoplasma verteilt, wobei im posterioren Bereich des Tachyzoiten mehr zu finden sind als im anterioren Bereich (Speer et al., 1999). Des Weiteren sind ein Mitochondrium, der Apikoplast, der Zellkern, der Golgi-Komplex und das Endoplasmatische Retikulum in Tachyzoiten und Bradyzoiten vorhanden.

N. caninum-Bradyzoiten besitzen im Vergleich zu den Tachyzoiten weniger elektronendichte Rhoptrien (6 – 12) und eine deutlich höhere Anzahl an Amylopektingranula (Speer et al., 1999), welche Polysaccharide speichern und als Energiespeicher dienen (Guerardel et al., 2005). Im Zytoplasma der Bradyzoiten sind mehr als 40 Mikronemen zu finden, von denen viele ebenfalls senkrecht zur Pellikula orientiert sind. Der Zellkern ist etwas weiter posterior als in den Tachyzoiten lokalisiert. In Bradyzoiten sind Mikronemen, dichte Granula, Amylopektingranula, Endoplasmatisches Retikulum und gelegentlich auch das Mitochondrium zwischen dem Zellkern und dem posterioren Ende lokalisiert (Speer et al., 1999). Bradyzoiten bilden in den Wirten von *N. caninum* Gewebezysten aus, die 20 – 100 Bradyzoiten enthalten. Der Rand einer Gewebezyste ist unregelmäßig und die Dicke der Zystenwand variiert zwischen 0,5 und 4 µm. Die primäre Zystenwand besteht aus der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) und einer granulären Schicht. Diese granuläre Schicht enthält elektronendichte Granula und Vesikel, die in einer Matrix eingebettet sind. Diese Vesikel wirken morphologisch wie Abschnürungen von den Ausbuchtungen der PVM. Das Innere der Gewebezysten ist mit einer feingranulären Matrix gefüllt, welche Vesikel enthält (Speer et al., 1999). Die Zystenwand bildet eine physische Barriere, welche die Bradyzoiten vor dem Immunsystem und physiologischen Reaktionen des Wirtes schützt (Vonlaufen et al., 2002).

Die phänotypische Transformation vom Tachyzoiten- zum Bradyzoitenstadium ist häufig bei Organismen mit einem komplexen Lebenszyklus zu finden und ist für das Überleben der Parasiten im Wirt essentiell. Durch den Stadienwechsel sind diese Organismen in der Lage, sich schnell einer Mikroevolution zu unterziehen und sich so an eine sich verändernde Umgebung anzupassen (Ferreira da Silva Mda et al., 2008; Schwan und Hinnebusch, 1998). Der schnell replizierende *N. caninum*-Tachyzoit kann, wenn er Stressfaktoren wahrnimmt, in Bradyzoiten differenzieren, welche Gewebezysten bilden, die stressresistent sind (Abbildung 1.3) (Eastick und Elsheikha, 2010). In dieser Form kann *N. caninum* jahrelang im Wirt persistieren ohne klinische Symptome zu verursachen. Wenn das Immunsystem des Wirtes geschwächt ist, wie zum Beispiel während der Schwangerschaft, können die Bradyzoiten in den Gewebezysten reaktiviert werden, was zu einer Bradyzoit – Tachyzoit – Stadienkonversion führt (Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002).

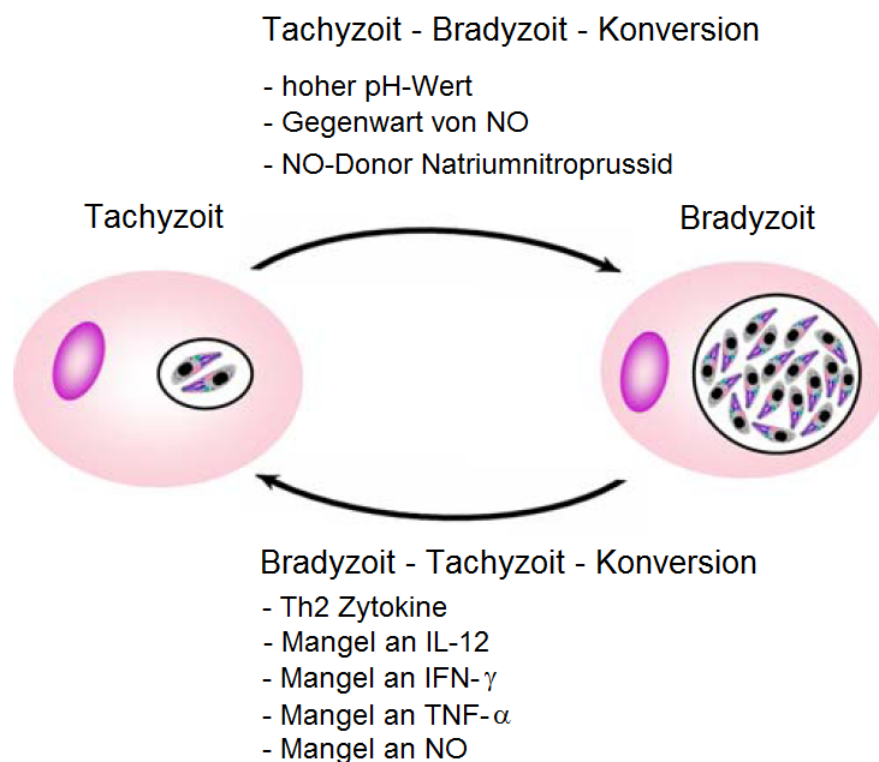


Abbildung 1.3 Stadienkonversion in *Neospora caninum*. In der Abbildung sind verschiedene Faktoren aufgeführt, die in *N. caninum* zu einer Stadienkonversion in Bradyzoiten beziehungsweise Tachyzoiten führen können (modifiziert nach (Eastick und Elsheikha, 2010)).

Tachyzoiten und Bradyzoiten exprimieren stadienspezifische Proteine, wodurch eine Unterscheidung der Parasitenstadien vorgenommen werden kann. Als *N. caninum* Tachyzoiten-spezifische, immundominante Oberflächenantigene wurden NcSAG1 und NcSRS2 beschrieben (Fuchs et al., 1998; Schares et al., 1999; Vonlaufen et al., 2002), wohingegen in Bradyzoiten zum Beispiel NcBAG1 stadienspezifisch exprimiert wird (McAllister et al., 1996).

Um eine Differenzierung von Tachyzoiten in Bradyzoiten *in vitro* auszulösen, wurden verschiedene Stressfaktoren getestet. So kann ein pH-Wert von 8,1 zur Induktion der Stadienkonversion von *N. caninum*-Tachyzoiten in Bradyzoiten führen (Weiss et al., 1999). Auch chemischer Stress, der durch den Stickstoffmonoxid-Donor Natriumnitroprussid (sodium nitroprusside, SNP) entsteht, kann die Expression von tachyzoitenspezifischen Oberflächenantigenen reduzieren und führt letztendlich zu einer verringerten Energieproduktion und einem anaeroben Milieu (Vonlaufen et al., 2004; Vonlaufen et al., 2002).

Durch die Stadienkonversion wird die Beziehung zwischen Wirt und Parasit verändert, da die verschiedenen Stadien unterschiedliche Antigene exprimieren und so dem Immunsystem ausweichen können. Die Stadienkonversion ist eine Art von Mikroevolution, die ohne eine erhöhte Mutationsrate auskommt. Auf diese Art wird eine Anhäufung von Mutationen, die nachteilig für den Parasiten sein könnten, reduziert (Eastick und Elsheikha, 2010). Die Stadienkonversion leitet den Übergang von einer akuten in eine chronische Infektion ein und ist für die lebenslange Persistenz des Parasiten im Wirt essentiell.

Die genauen Mechanismen, die eine Tachyzoiten – Bradyzoiten – Konversion *in vivo* auslösen, sind nicht bekannt. Aber es wird vermutet, dass Stressfaktoren und die Immunantwort des Wirtes zu einer Stadienkonversion führen (Buxton et al., 2002; Dubey und Lindsay, 1996; Lyons et al., 2002).

1.7. Invasionsprozess von *Neospora caninum* in die Wirtszelle

N. caninum-Tachyzoiten können sich ausschließlich innerhalb einer parasitophoren Vakuole (PV) vermehren, die während der Invasion in die Wirtszelle entsteht (Hemphill et al., 2004). Die Invasion der Wirtszelle ist ein aktiver Prozess, der bei allen Apikomplexa ähnlich verläuft. Entscheidend für die erfolgreiche Invasion ist dabei insbesondere der Apikalkomplex (Abbildung 1.4). Dieser Apikalkomplex besteht aus dem zentralen Conoid, welches aus spiralförmig angeordneten Tubulinfasern besteht. Am distalen Ende des Conoids befinden sich die präconoidalen Ringe und von dort entstammen die Conoidfasern. Das Conoid assoziiert außerdem mit den Polarringen, von denen 22 subpellikuläre Mikrotubuli entspringen. Des Weiteren enthält der Apikalkomplex zwei kurze intraconoidale Mikrotubuli, welche für den Transport der sekretorischen Vesikel genutzt werden könnten (Carruthers und Sibley, 1997; Nichols und Chiappino, 1987). Das Ausfahren und Einziehen des Conoids ist mit der Wirtszellinvasion assoziiert (Mondragon und Frixione, 1996).

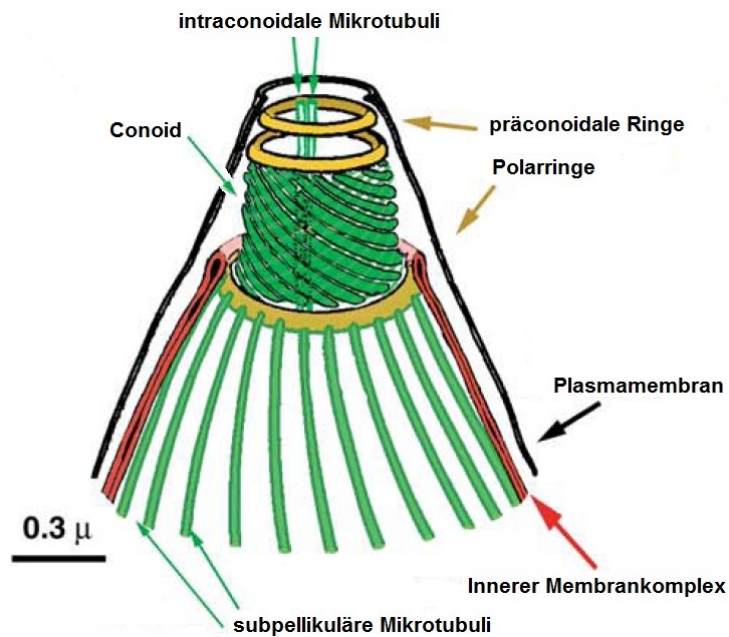


Abbildung 1.4 Zytoskelett des Apicalkomplexes. In grün ist das Conoid dargestellt, welches aus 14 Tubulinfasern besteht, die eine linksgewundene Spirale bilden. Außerdem sind in grün die intraconoidalen und die subpellikulären Mikrotubuli dargestellt. Die präconoidalen Ringe und die Polarringe sind in gelb dargestellt. Der Innere Membrankomplex, mit dem die subpellikulären Mikrotubuli assoziieren, ist rot und die Plasmamembran schwarz gefärbt (modifiziert nach (Hu et al., 2006)).

Der Invasionsprozess gliedert sich in mehrere Schritte (Abbildung 1.5) und der initiale Schritt der Invasion ist die Anlagerung des Parasiten an die Wirtszelle. Die Anlagerung ist aufgrund einer niedrigen Affinität reversibel und wird durch Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankerte Oberflächenantigene wie NcSAG1 und NcSRS2 vermittelt (Howe et al., 1998; Schares et al., 2000; Sonda et al., 1998). *N. caninum*-Tachyzoiten sind polare Zellen und vor der Wirtszellinvasion orientieren sie sich mit dem apikalen Pol in Richtung Wirtszellmembran (Hemphill et al., 2004).

Sobald ein Kontakt mit niedriger Affinität zwischen *N. caninum* und der Wirtszelle hergestellt wurde, setzen die Tachyzoiten die Inhalte ihrer sekretorischen Organellen frei. Als erstes werden die Mikronemen-Proteine sekretiert, welche adhäsive Domänen besitzen und dadurch mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle interagieren können (Hemphill et al., 2004). Es sind verschiedene adhäsive Motive in *N. caninum* Mikronemen-Proteinen zu finden: eine Thrombospondin- (TSP-) ähnliche Domäne in NcMIC1 (Keller et al., 2002), Integrin- und TSP-Typ I-ähnliche Domänen in NcMIC2 (Lovett et al., 2000) und epidermale Wachstumsfaktor- (EGF-) ähnliche Domänen in NcMIC3 (Sonda et al., 2000). *N. caninum* bindet an die Wirtszellmembran, indem Mikronemen-Proteine mit sulfatierten Glykosaminoglykanen der Wirtszelloberfläche interagieren. NcMIC3 bleibt nach der Sekretion aus den Mikronemen an die Tachyzoitenoberfläche gebunden und interagiert zum Beispiel mit Chondroitinsulfaten der Wirtszellmembran (Naguleswaran et al., 2002; Naguleswaran et al., 2001). Allerdings gelangen nur 50 – 80 % der Tachyzoiten, die an ihre Wirtszelle gebunden haben, letztendlich in die Wirtszelle, was bedeutet, dass Adhäsion und Invasion zwei verschiedene Prozesse sind (Naguleswaran et al., 2003).

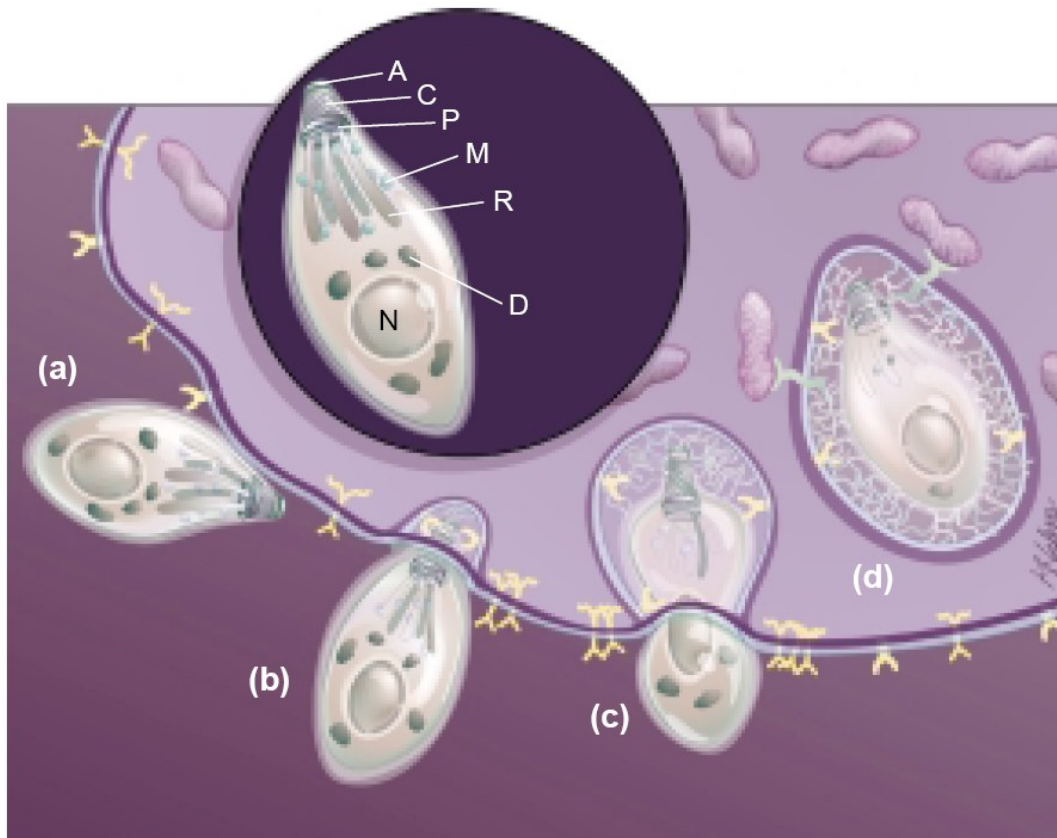


Abbildung 1.5 Invasion von *Neospora caninum* in die Wirtszelle. (a) Anlagerung: Beim initialen Kontakt hat der Tachyzoit eine zufällige Orientierung zur Wirtszellmembran. (b) Initiierung der Invasion: Der Tachyzoit hat sich selbst reorientiert, sodass das apikale Ende an die Wirtszelle angelagert ist. Eine starke, flexible Verbindung (Moving Junction) entsteht zwischen der Parasitenpellikula und der Wirtszellmembran. Die sekretorischen Organellen setzen ihre Inhalte über das ausgefahrne Conoid in die entstehende parasitophore Vakuole (PV) frei. (c) Penetration: Der Tachyzoit wandert durch die Moving Junction und die Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) entsteht aus der Einstülpung der Wirtszellmembran. Oberflächenproteine der Wirtszelle (gelb), die eine zytoplasmatische Domäne haben, werden durch die Moving Junction von der PVM ausgeschlossen. Oberflächenproteine der Wirtszelle, die keine Transmembrandomänen haben, werden nicht von der Moving Junction ausgesiebt und ragen in die PV aber nicht ins Wirtszellzytoplasma. Innerhalb der PV bildet sich ein tubulovesikuläres Membrannetzwerk aus. (d) Etablierte parasitophore Vakuole: Die PVM hat sich von der Wirtszellmembran separiert. Proteine des Parasiten (grün) durchspannen die PVM und erzeugen eine Assoziation der PVM mit Organellen der Wirtszelle. Die vergrößerte Tachyzoitenabbildung zeigt die wichtigsten ultrastrukturellen Merkmale: A: Apikalring, C: Conoid; D: dichte Granula; M: Mikronemen; N: Nukleus; P: Polarring; R: Rhoptrien (aus (Buxton et al., 2002)).

Nach Sekretion der Mikronemen-Proteine werden auch die Inhalte der Rhoptrien von den Tachyzoiten sekretiert und zwar zunächst die „rhoptry neck proteins“ (RONS), welche in der Halsregion der keulenförmigen Rhoptrien gespeichert sind. Zusammen mit einem Mikronemen-Protein (apical membrane antigen 1, AMA1) bilden die RONS einen stabilen Komplex und formen die Moving junction (MJ) (Mordue et al., 1999). Diese ringähnliche Struktur erinnert an eine „tight junction“ in Säugetierzellen (Carruthers und Boothroyd, 2007). Während der Invasion der Parasiten in die Wirtszelle wandert die MJ vom apikalen zum posterioren Pol des Parasiten und die PV entsteht um den Parasiten herum, wobei die PVM aus der Wirtszellplasmamembran entsteht (Suss-Toby et al., 1996). Während der Invasion werden

viele Transmembranproteine der Wirtszelle selektiv aus der späteren PVM herausgesiebt, wohingegen GPI-verankerte Wirtspoteine und Wirtspoteine ohne eine zytoplasmatische Domäne in der entstehenden PVM verbleiben (Mordue et al., 1999). Durch diese Modifikationen wird eine spätere Fusion der PVM mit Lysosomen oder Endosomen der Wirtszelle verhindert und *N. caninum* kann in diesem Kompartiment überleben (Mordue und Sibley, 1997). Kurz vor und auch während des Invasionsprozesses werden die Proteine des Rhoptrien-Bulbus (ROP) direkt in das Wirtszellzytoplasma oder in die entstehende PV sekretiert (Carruthers und Sibley, 1997; Hakansson et al., 2001). ROPs haben Funktionen bei der Etablierung und Modifizierung der PV und können auch Signalwege der Wirtszelle modifizieren (Bradley und Sibley, 2007; Sinai und Joiner, 2001).

Nachdem der komplette Parasit innerhalb der Wirtszelle liegt, schließt sich die MJ und dabei werden oberflächenexponierte Überreste außen auf der Wirtszelle zurückgelassen. Die entstandene PVM trennt sich von der Wirtszellmembran ab und eine PV ist entstanden (Carruthers und Boothroyd, 2007). Diese letzten Schritte der Invasion dauern zwei Minuten, was deutlich langsamer ist, als die vorherigen Schritte (Suss-Toby et al., 1996).

Nach der Wirtszellinvasion werden das Lumen der Vakuole und die Membranen der PV umfassend durch weitere sekretorische *N. caninum*-Proteine modifiziert. Diese Proteine stammen hauptsächlich aus den Rhoptrien und den dichten Granula (Hemphill et al., 1998). Rhoptrien- und dichte Granula-Proteine bilden ein tubulovesikuläres Membrannetzwerk im Lumen der PV aus, wodurch die Oberfläche erheblich vergrößert wird (Speer et al., 1999). *N. caninum* modifiziert auch die Wirtszelle nach der Invasion, indem Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum des Wirtes zur PV rekrutiert werden (Buxton et al., 2002; Speer et al., 1999). Die Organisation des Zytoskeletts der Wirtszelle wird durch die Invasion von *N. caninum* allerdings nicht verändert (Coppens et al., 2006; Walker et al., 2008).

N. caninum und *T. gondii* sind phylogenetisch sehr eng miteinander verwandt, haben aber unterschiedliche Wirtsspektren inklusive verschiedener Endwirte. Worin diese Unterschiede begründet sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Hypothesen. Die eine Hypothese besagt, dass *N. caninum* eine größere Anzahl an Genen, die für Oberflächenantigene kodieren, besitzt als *T. gondii*. Diese Oberflächenproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung des Parasiten an die Wirtszelle. Dadurch könnte eine höhere Wirtszellspezifität und damit ein engeres Wirtszellspektrum von *N. caninum* begünstigt werden (Reid et al., 2012). Reid et al. konnten beim Vergleich der Transkriptome der beiden Parasiten außerdem zeigen, dass Gene, die für Proteine kodieren, welche direkt mit dem Wirt interagieren, größere Unterschiede zwischen *N. caninum* und *T. gondii* aufweisen als Gene, die für andere Proteingruppen kodieren. Eine andere Hypothese bezieht sich auf die Mikronemen-Proteine von *N. caninum* und *T. gondii* (Cowper et al., 2012). Die Mikronemen sekretieren Adhäsine, die nach der Sekretion auf der Parasitenoberfläche lokalisieren, Gly-

kanrezeptoren der Wirtszelle binden können und eine spezifische, hoch affine Interaktion des Parasiten mit der Wirtszelle ermöglichen (Carruthers und Tomley, 2008). Mikronemen-Proteine bilden Komplexe miteinander aus, allerdings sind die gebildeten Komplexe in *N. caninum* und *T. gondii* unterschiedlich (Keller et al., 2004; Reiss et al., 2001), sodass verschiedene Kombinationen von adhäsiven Domänen entstehen. Dies könnte zu der unterschiedlichen Wirtsspezifität der beiden nah verwandten Parasiten beitragen (Cowper et al., 2012).

1.8. Vermehrung von *Neospora caninum* in der parasitophoren Vakuole und Evasion aus der Wirtszelle

Nach der erfolgreichen Invasion von *N. caninum* in die Wirtszelle und der Etablierung der PV, befindet sich der Parasit in einer lag-Phase, die für das NC-1 Isolat etwa 10 bis 12 Stunden dauert. Danach beginnt *N. caninum* sich zu teilen und die Generationszeit beträgt circa 14 bis 15 Stunden (Sundermann und Estridge, 1999).

Bei der Replikation des Tachyzoiten-Stadiums der Coccidia bilden sich zwei Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle (Abbildung 1.6). Durch diese ungeschlechtliche Vermehrung entstehen innerhalb der Mutterzelle zwei Parasiten je Mitosezyklus und dieser Prozess wird als Endodyogenie bezeichnet (Sheffield und Melton, 1968). Die Endodyogenie ist sehr gut bei *T. gondii* untersucht und es wird davon ausgegangen, dass die Zellteilung von *N. caninum*-Tachyzoiten vergleichbar abläuft (Hemphill et al., 2006). Das Gerüst für die Bildung der Tochterzellen wird durch den Inneren Membrankomplex (inner membrane complex, IMC) bereitgestellt. Der IMC besteht aus flachen Membranvesikeln, die vermutlich vom Golgiapparat entstammen. Der IMC ist mit subpelliculären Microtubuli und weiteren Elementen des Zytoskeletts assoziiert (Morrissette und Sibley, 2002; Nichols und Chiappino, 1987; Tilney und Tilney, 1996). Die Organellen der Mutterzelle degenerieren entweder während der Zellteilung oder werden zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt. Die Plasmamembranen der Tochterzellen werden von der Mutterzelle übernommen und nur ein schmaler Bereich, der residual body, bleibt zurück und verbindet die Tochterzellen miteinander (Sheffield und Melton, 1968; Striepen et al., 2000).

Die ersten morphologisch erkennbaren Ereignisse bei der Zellteilung von Coccidia sind die Verdopplung und die Trennung des Golgiapparates und der Centrosomen, welche das Zentrum der Mikrotubulusorganisation darstellen (Sheffield und Melton, 1968; Striepen et al., 2000). Die DNA-Replikation wird etwa zur selben Zeit eingeleitet (Hu et al., 2002). Das Gerüst des IMC bildet sich kurz bevor die DNA-Replikation abgeschlossen ist und wird innerhalb der folgenden 1,5 Stunden fertiggestellt (Hu et al., 2002). Die Zellkernteilung erfolgt, wenn die DNA-Replikation abgeschlossen ist. Der Apikoplast teilt sich vor der Zellkernteilung (Striepen et al., 2000). Erst wenn die Bildung des IMC der Tochterzellen fast abgeschlossen

ist, erfolgt die Teilung des Mitochondriums. Der Apikalkomplex, die Mikronemen und die Rhoptrien werden in jeder Tochterzelle *de novo* ausgebildet (Sheffield und Melton, 1968).

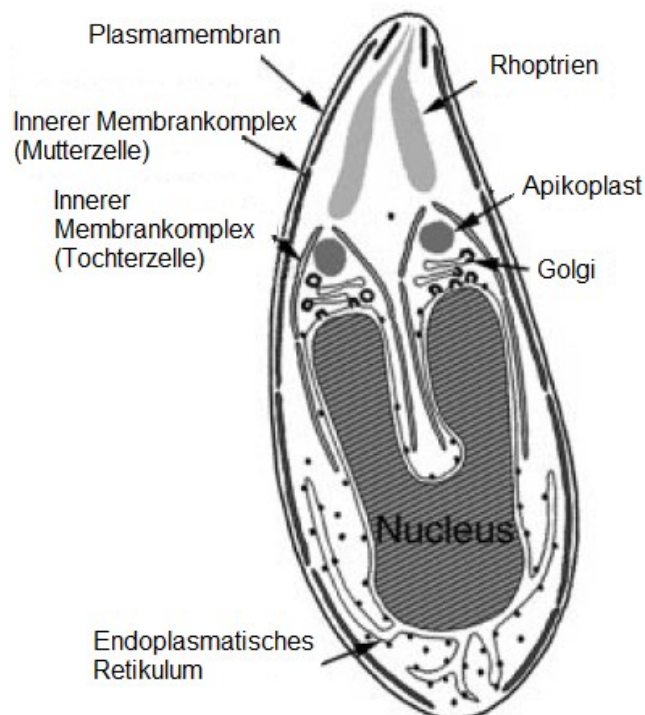


Abbildung 1.6 Endodyogenie der Coccidia Tachyzoiten. Die inneren Membrankomplexe der Tochterzellen entstehen während der Zellteilung in der Mutterzelle. Mehrere Organellen werden zwischen den Tochterzellen aufgeteilt. Zu dem dargestellten Zeitpunkt der Zellteilung ist der innere Membrankomplex der Mutterzelle noch vorhanden (modifiziert nach (Hu et al., 2002)).

Die Evasion der Coccidia aus ihrer Wirtszelle scheint ähnlich abzulaufen wie die Invasion. Die Freisetzung der Parasiten aus der Wirtszelle wird durch die Akkumulation des wie bei Pflanzen vorkommenden Hormons Abscisinsäure ausgelöst und ist kalziumabhängig (Nagamune et al., 2008). Es werden dann wie bei der Invasion Inhalte der Mikronemen und Rhoptrien ausgeschüttet. Eines der frühen Ereignisse während des Egress ist die Freisetzung von Mikronemen-Proteinen. Während des Evasionsprozesses von *T. gondii* wird das Perforin-ähnliche Protein (TgPLP1) sekretiert, welches dafür sorgt, dass die PVM und die Wirtszellmembran perforiert werden und so die Parasiten die Wirtszelle verlassen können. Es wird vermutet, dass auch andere Apikomplexa ein homologes Protein exprimieren, welches zur Evasion der Parasiten beiträgt (Kafsack et al., 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* während des Verlassens der Wirtszelle eine Moving Junction (MJ) ausbildet. Die Parasiten passieren eine Verengung in der PVM beziehungsweise der Wirtszellmembran, an der TgRON4 detektiert werden konnte, welches auch an der MJ während der Invasion beteiligt ist (Alexander et al., 2005). Für *N. caninum* wurden noch keine ähnlichen Mechanismen beschrieben, allerdings verhalten sich *T. gondii* und *N. caninum* bei der Wirtszellinvasion sehr ähnlich, sodass der Evasionsprozess wahrscheinlich ebenfalls vergleichbar ablaufen wird.

1.9. Die Proteine der sekretorischen Organellen von *Neospora caninum*

Die Apicomplexa weisen charakteristische sekretorische Vesikel auf. Es lassen sich die drei bereits erwähnten, morphologisch distinkten Organellen Mikronemen, Rhoptrien und dichte Granula unterscheiden (Abbildung 1.7). Diese Organellen enthalten komplexe Zusammensetzungen an Proteinen, welche sowohl viele Homologien als auch Unterschiede in der molekularen Struktur zwischen den Spezies aufweisen. Diese Proteine sind, wie oben beschrieben, wichtig für die Invasion in die Wirtszelle, die Etablierung der PV, das Überleben in der PV und die Freisetzung aus der Wirtszelle.

1.9.1 Die Mikronemen-Proteine von *Neospora caninum*

N. caninum-Tachyzoiten enthalten viele Mikronemen, welche zumeist apikal lokalisiert sind (Speer et al., 1999). Mikronemen-Proteine sind für die Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle wichtig und vermitteln eine spezifische, hochaffine Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle (Carruthers und Boothroyd, 2007). Viele der Mikronemen-Proteine weisen Homologien in ihrer Sequenz zu adhäsiven Proteinen von höheren Eukaryonten auf wie zum Beispiel: „thrombospondin Type I like“ (TSR) repeats, „epidermal growth factor“ (EGF) repeats, „von Willibrand factor type A“ (vWA) Domäne, Galektine und Apple/PAN Domänen. Fast alle Mikronemen-Proteine enthalten mindestens eine adhäsive Domäne, welche die Interaktion mit Polysacchariden auf der Wirtszelloberfläche oder Proteinen, zum Beispiel einem anderen Mikronemen-Protein, steuert. Viele Mikronemen-Proteine enthalten auch mögliche Transmembrandomänen und zytoplasmatische Sequenzen, welche Sortierungssignale enthalten (Di Cristina et al., 2000; Sheiner et al., 2010), oder über Aldolase, ein aktinbindendes Protein, mit dem Glidosom, welches die Fortbewegung der Apicomplexa vermittelt, assoziiert sind (Jewett und Sibley, 2003; Starnes et al., 2009).

In *N. caninum* wurden bisher fünf klassische Mikronemen-Proteine identifiziert und beschrieben: NcMIC1 (Keller et al., 2002), NcMIC2 (Lovett et al., 2000), NcMIC3 (Sonda et al., 2000), NcMIC4 (Keller et al., 2004) und NcAMA1 (Zhang et al., 2007). Außerdem wurden sechs weitere Mikronemen-Proteine von *N. caninum* identifiziert, welche eine MAR-Domäne (micro-neme adhesive repeat) enthalten und deshalb als MCP-Proteine (MAR-domain containing proteins) bezeichnet werden. Folgende *N. caninum*-Proteine gehören zu dieser Gruppe: NcMCP2, NcMCP3, NcMCP4, NcMCP5, NcMCP6 und NcMCP7. MAR-Domänen sind auf die zystenbildenden Coccidien beschränkt und sind wichtig bei der Wirtszellerkennung. MAR-Domänen interagieren selektiv mit Glykokonjugaten, welche Sialinsäure beinhalten (Friedrich et al., 2010). Des Weiteren konnten die Sequenzen von NcMIC10, NcMIC11 und NcMIC17B beschrieben werden, die Funktion dieser Mikronemen-Proteine ist jedoch noch unbekannt (Harper et al., 2004b; Hoff et al., 2001; Sohn et al., 2011).

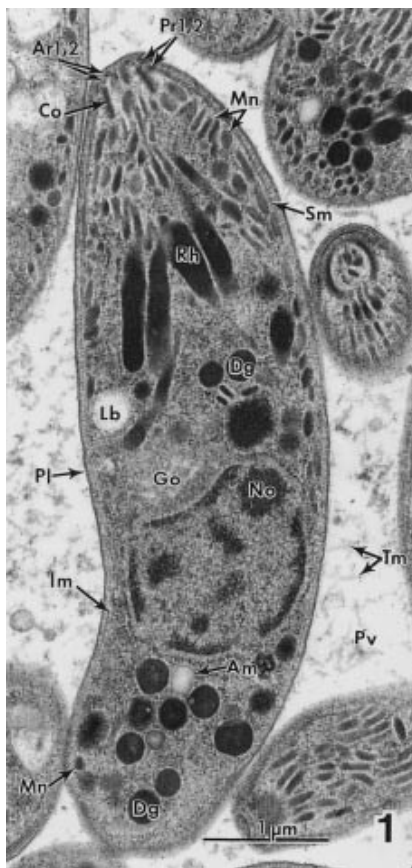


Abbildung 1.7 *Neospora caninum* Tachyzoit. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Tachyzoiten des *N. caninum* Isolates NC-5 kultiviert in M617-Zellen. Es sind die verschiedenen Organellen zu erkennen. Einige der Mikronemen (Mn) sind senkrecht zur Pellikula orientiert. Die Rhoptrien (Rh) sind elektronendicht. Etwa zehn dichte Granula (DG) sind posterior und drei anterior des Zellkerns lokalisiert. Abkürzungen: Am: Amylopectin; Ar 1,2: Apikalringe 1 und 2; Co: Conoid; Go: Golgikomplex; Im: innerer Membrankomplex der Pellikular; Lb: Lipidkörperchen; Mi: Mitochondrium; No: Nukleolus; Nu: Nukleus; PI: Plasmalemma; Pr 1, 2: Polarringe 1 und 2; Pv: parasitophore Vakuole; Sm: subpellikuläre Mikrotubuli; Tm: tubulovesikuläres Membrannetzwerk (aus (Speer et al., 1999))

1.9.2. Die Rhoptrien-Proteine von *Neospora caninum*

Die als Rhoptrien bezeichneten sekretorischen Organellen sind ausschließlich in Apicomplexa zu finden (Marugan-Hernandez et al., 2011). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheinen die Rhoptrien von *N. caninum* gleichmäßig elektronendicht (Speer et al., 1999). In den Rhoptrien werden Proteine gespeichert, welche wichtig für die Wirtszellinvasion und das Überleben des Parasiten in der PV sind. Die Rhoptrien-Proteine werden direkt, nachdem eine feste Bindung zwischen Parasit und Wirtszelle entstanden ist, innerhalb weniger Minuten sekretiert (Carruthers und Sibley, 1997) und sind unerlässlich für die Bildung der PV (Bradley und Sibley, 2007).

Das Organell kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Im Halsbereich des keulenförmigen Organells befinden sich Proteine, die als „rhoptry neck“-Proteine (RONs) bezeichnet werden und in ähnlicher Form in allen Apicomplexa-Parasiten vorkommen. Dies deutet auf konservierte Funktionen der RONs während der Invasion der Apicomplexa hin (Bradley und Sibley, 2007). In *N. caninum* wurden bisher vier verschiedene RONs identifiziert. Für NcRON2, NcRON4, NcRON5 und NcRON8 konnte gezeigt werden, dass diese Proteine einen Komplex bilden und an der Formation der Moving Junction (MJ) beteiligt sind. Daher sind RON-Proteine besonders während des Invasionsprozesses von *N. caninum* in die Wirtszelle wich-

tig. Dabei zeigt RON8 eine Besonderheit, da homologe Proteine im Gegensatz zu den anderen RONs nur in den zystenbildenden Coccidia, nicht jedoch in allen Apicomplexa-Parasiten zu finden sind (Straub et al., 2009). Der zweite morphologisch erkennbare Bereich der Rhoptrien ist der Bulbus, welcher die ROP-Proteine enthält, die sehr stark an die Wirtszellen der jeweiligen Parasiten angepasst sind. Nur zwischen phylogenetisch nah verwandten Parasiten sind homologe ROP-Proteine zu finden (Bradley und Sibley, 2007). Alle bisher identifizierten ROPs werden in das Wirtszellzytoplasma sekretiert und tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Infektion bei (Bradley und Sibley, 2007). So können zum Beispiel Subtypen von TgROP18 die Wirksamkeit antiparasitärer Wirtszellmoleküle, zum Beispiel „immunity-related GTPases“ (IRGs), aufheben (Fentress et al., 2010; Steinfeldt et al., 2010). Für TgROP16 konnte gezeigt werden, dass diese Kinase STAT3 und STAT6 (signal transducer and activator of transcription) aktiviert und so Signalwege in der Wirtszelle modifizieren kann (Butcher et al., 2011). Die genauen Funktionen der meisten ROP-Proteine in *N. caninum* sind noch unbekannt. NcROP2 scheint für die Immunantwort gegen *N. caninum* wichtig zu sein und wurde als Vakzin-Kandidat beschrieben (Debache et al., 2009; Debache et al., 2008). Ferner wird vermutet, dass NcROP9 besonders in Bradyzoiten von Bedeutung ist, denn NcROP9 wird in Tachyzoiten nur vergleichsweise schwach exprimiert (Marugan-Hernandez et al., 2010). Durch Aufreinigung von Rhoptrien und nachfolgender massenspektroskopischer Analyse wurden vier weitere *N. caninum* ROPs identifiziert, die homolog zu *T. gondii* ROPs sind (NcROP1, NcROP5, NcROP8 und NcROP30) und deren Funktion noch vollständig ungeklärt ist (Marugan-Hernandez et al., 2011).

1.9.3. Die dichte Granula-Proteine von *Neospora caninum*

Die dichte Granula sind der dritte Typ sekretorischer Organellen, die nur in Apicomplexa zu finden sind. Diese Organellen sind durch eine Membran begrenzt und enthalten dicht gepackte, granuläre Bestandteile (Blackman und Bannister, 2001). Der Durchmesser der dichte Granula liegt zwischen 275 und 400 nm. In *N. caninum*-Tachyzoiten sind die dichte Granula im gesamten Zytoplasma verteilt, allerdings sind sie am posterioren Ende gehäuft zu finden (Speer et al., 1999). Nach der Wirtszellinvasion werden die Inhalte der dichte Granula von *N. caninum* ausgeschüttet und die dichte Granula-Proteine assoziieren dann mit der PVM oder den intravakuolären Membranen (Dubremetz et al., 1998). Wahrscheinlich sind die enthaltenen Proteine für die Reifung der PV zuständig (Mercier et al., 2005) und werden besonders während der intrazellulären Phase ausgeschüttet (Coppens et al., 1999).

Alle dichte Granula-Proteine haben strukturelle Gemeinsamkeiten. Dazu zählt ein N-terminales Signalpeptid, welches ausreicht, um diese Proteine in die dichte Granula zu rekrutieren. Außerdem wurde für dichte Granula-Proteine beschrieben, dass das theoretische Mo-

lekulargewicht, welches aus der primären Proteinsequenz hervorgeht, nicht mit dem höheren, in SDS-PAGE beobachteten Molekulargewicht übereinstimmt, was auf posttranslationalen Modifikationen oder auf prolinreichen Sequenzbereichen beruhen könnte (Mercier et al., 2005).

Die dichte Granula-Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe besteht aus Proteinen, für welche noch keine eindeutige Funktion bekannt ist und welche keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweisen, und die zweite Gruppe besteht aus Proteinen mit enzymatischen Aktivitäten (Mercier et al., 2005).

Im Folgenden sind die dichte Granula-Proteine von *N. caninum* aufgeführt, die bereits beschrieben wurden.

NcGRA1 zeigt in Tachyzoiten eine typische Verteilung für dichte Granula-Proteine. NcGRA1 kann in *in vitro* induzierten, bradyzoitenhaltigen Zysten im peripheren Bereich detektiert werden und dem Protein wird eine mögliche Rolle in der Ausbildung der Zystenwand zugeschrieben (Vonlaufen et al., 2004). Die Lokalisierung in Bradyzoiten passt zu dem Befund, dass NcGRA1 während einer chronischen Infektion eine Immunantwort auslöst und diese Antikörper können als Marker verwendet werden, um Tiere zu identifizieren, die eine chronische *N. caninum*-Infektion haben (Atkinson et al., 2001). Des Weiteren enthält die genomische Sequenz von NcGRA1 in Intron und für das Protein wurde ein Molekulargewicht von 15 kDa vorhergesagt. In Western Blot-Analysen war NcGRA1 mit einem Molekulargewicht von 20 kDa zu detektieren (Atkinson et al., 2001).

NcGRA2 ist in Tachyzoiten in den dichte Granula lokalisiert. Nach *in vitro*-Stadienkonversion wurde eine verstärkte Detektion von NcGRA2 im peripheren Bereich, also der Zystenwand, detektiert (Vonlaufen et al., 2004). NcGRA2 wird von einer genomischen Sequenz kodiert, die aus zwei Exons besteht. Auch das theoretische Molekulargewicht des Proteins (24 kDa) wich von dem in Western Blot-Analysen detektierten (29 kDa) ab, wie es auch für die anderen *N. caninum* dichte Granula-Proteine gezeigt wurde. Die Analyse der Sekundärstruktur deutet darauf hin, dass NcGRA2 drei Alphahelices mit amphipathischem Charakter aufweist (Ellis et al., 2000).

Über NcGRA3 ist bisher nur bekannt, dass es sich um ein homologes Protein zu TgGRA3 handelt. Außerdem weist die Proteinsequenz ein N-terminales Signalpeptid, eine Transmembranregion und ein C-terminales „dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum retrieval“-Motiv auf. Dadurch könnte NcGRA3 an der Rekrutierung des Wirtszell-ER an die PVM beteiligt sein. Das theoretische Molekulargewicht liegt bei 24 kDa (Henriquez et al., 2005).

NcGRA6 wurde ursprünglich als NCDG2 beschrieben. In *N. caninum*-Tachyzoiten ist NcGRA6 in den dichte Granula zu detektieren. Das Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 24 kDa, zeigt aber in der Western Blot-Analyse ein Molekulargewicht von 37 kDa. Die Proteinsequenz enthält zwei hydrophobe Regionen und die N-terminale Region repräsentiert das Signalpeptid. Die zweite hydrophobe Domäne ist eine Transmembrandomäne (Liddell et al., 1998).

NcGRA7 wurde zuerst als NCDG1 beschrieben und konnte in den dichte Granula von *N. caninum*-Tachyzoiten detektiert werden (Lally et al., 1997). Dieses Protein wurde ein Jahr später erneut beschrieben und als Nc-p33 bezeichnet. Nach der Wirtszellinvasion ist NcGRA7 an der PVM und dem intravakuolären Membrannetzwerk lokalisiert (Hemphill et al., 1998). Nach einer *in vitro*-Stadienkonversion von Tachyzoiten in Bradyzoiten wurde NcGRA7 in der Peripherie der Zysten detektiert. Diese Lokalisierung könnte darauf deuten, dass NcGRA7 an der Bildung der Zystenwand beteiligt ist (Vonlaufen et al., 2004). Das Molekulargewicht von NcGRA7 in der SDS-PAGE liegt bei 33 kDa, wobei das theoretische Molekulargewicht 26 kDa beträgt. Das Protein enthält drei hydrophobe Regionen, wobei die hydrophobe Region am N-Terminus ein Signalpeptid darstellt (Lally et al., 1997).

NcMAG1 (matrix antigen 1) ist in extrazellulären Tachyzoiten in den dichte Granula lokalisiert und nach Wirtszellinvasion hauptsächlich im Lumen der PV zu finden. In *in vitro* induzierten Bradyzoiten wurde für NcMAG1 eine deutliche Detektion in der Zystenwand und der Zystenmatrix beobachtet. Auch in Western Blot-Analysen wird NcMAG1 im Lysat von Bradyzoiten in größeren Mengen gefunden als in einem vergleichbaren Tachyzoiten-Lysat. NcMAG1 enthält ein N-terminales Signalpeptid und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 52,9 kDa. In Western Blot-Analysen weist NcMAG1 jedoch ein Molekulargewicht von 67 kDa auf (Guionaud et al., 2010).

In *N. caninum* konnte eine Typ I Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase) identifiziert werden, die homolog zur TgNTPase ist und als NcNTPase bezeichnet wird. In extrazellulären Tachyzoiten ist NcNTPase in den dichte Granula zu finden und es wird vermutet, dass das Protein nach Wirtszellinvasion in die PV sekretiert wird. NcNTPase zeigt in verschiedenen *N. caninum*-Isolaten enzymatische Aktivität, indem das Protein Nukleotidtriphosphate hydrolysiert. Allerdings war in *N. caninum* keine enzymatische Aktivität gegen Nukleotiddiphosphate zu finden (Asai et al., 1998). In Western Blot-Analysen zeigt das Protein ein Molekulargewicht von 67 kDa. Im Genom von *N. caninum* sind drei *NTP*-Gene vorhanden (Asai et al., 1998).

In den dichten Granula von *N. caninum*-Tachyzoiten wurde ferner ein Proteaseinhibitor (PI) der Kazal-Familie identifiziert, welcher nur eine Inhibitor-domäne enthält (NcPI-S). NcPI-S wird nach Wirtszellinvasion in die PV sekretiert. Es wurde herausgefunden, dass NcPI-S eine starke Inhibition von Subtilisin vermittelt, allerdings nicht von Elastase oder Chymotrypsin. Deshalb könnte NcPI-S proteolytische Aktivitäten supprimieren und so die Inhalte der PV vor Degradationen bewahren. Es wurde auch beschrieben, dass NcPI-S als Homodimer vorliegt, auch in Western Blot-Analysen zeigte NcPI-S ein Molekulargewicht von 11 kDa, was in etwa dem Doppelten des vorhergesagten Molekulargewichts von 6 kDa entspricht. Außerdem weist die Proteinsequenz ein N-terminales Signalpeptid auf (Morris et al., 2004).

1.10. Der gerichtete Transport sekretorischer Proteine in ihre Zielorganellen

In den Apicomplexa ist der Sortierungsmechanismus, um Proteine in ihre Zielorganellen zu rekrutieren, evolutionär konserviert. Alle bekannten sekretorischen Proteine werden entweder in die Mikronemen, die Rhoptrien oder die dichten Granula transportiert (Kaasch und Joiner, 2000). Die Proteine, die eine der sekretorischen Organellen zum Ziel haben, durchlaufen einen Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Komplex (Coppens et al., 1999; Hager et al., 1999; Karsten et al., 1998). Dabei ist eine klassische, hydrophobe N-terminale Signalsequenz für die Translokation dieser Proteine in das ER verantwortlich. Dort wird die Signalsequenz abgespalten. Vom ER aus werden die Proteine in den Golgi-Komplex transportiert und anschließend erfolgt die gezielte Verteilung der sekretorischen Proteine in ihre verschiedenen Zielorganellen (Kaasch und Joiner, 2000).

Alle Proteine, die ein tyrosinreiches SYHYY- oder/und ein EXEY/FE-Motiv enthalten, werden in die Mikronemen transportiert. Ein SYHYY-Motiv ist in der Proteinsequenz von allen bekannten *N. caninum* Mikronemen-Proteinen vorhanden. Das EXEY/FE-Motiv ist in den Proteinen TgMIC2 und NcMIC2 zu finden (Di Cristina et al., 2000).

Für *T. gondii* wurde beschrieben, dass alle Rhoptrien-Proteine ein YXX Φ -Motiv enthalten müssen, um in ihre Zielorganelle zu gelangen. Damit ist auch dieses Targeting tyrosinabhängig. Dieses Motiv ist hochkonserviert und es wird vermutet, dass es auch in den anderen Parasiten der Apicomplexa wie zum Beispiel *N. caninum* für das Rhoptrien-Targeting zuständig ist (Hoppe et al., 2000).

Die dichten Granula-Proteine besitzen ein Signalpeptid, haben aber keine zusätzlichen Targeting-Motive (Joiner und Roos, 2002). Der Transport von Proteinen in die dichten Granula wird in *T. gondii* als „alternativer Weg“ angesehen, da jedes lösliche Protein, welches mit einem Signalpeptid fusioniert wird, in die dichten Granula gelangt (Joiner und Roos, 2002). Außerdem werden auch sekretorische Proteine, in deren Sequenzen die organellenspezifischen

Sortierungssignale depletiert wurden und somit nur noch das Signalpeptid enthalten, in die dichte Granula umgeleitet (Reiss et al., 2001; Striepen et al., 1998; Striepen et al., 2001).

T. gondii-Proteine, die heterolog in *N. caninum* exprimiert wurden, sind in ihren erwarteten Zielorganellen zu finden und werden demnach richtig prozessiert (Beckers et al., 1997; Hoppe et al., 2000; Howe et al., 1997; Zhang et al., 2010). Das bedeutet, dass die Sortierungsmechanismen der sekretorischen Proteine in *N. caninum* und in *T. gondii* vergleichbar ablaufen.

1.11. Die Motilität von Apicomplexa-Parasiten

Die Parasiten des Stammes Apicomplexa bewegen sich durch einen Prozess fort, der „gliding motility“ genannt wird. Bei dieser Fortbewegungsart gleiten die Parasiten über das Substrat ohne größere Veränderungen in ihrer Gestalt. Diese Fortbewegung unterscheidet sich von amöboiden Bewegungen und beruht nicht auf Zilien oder Flagellen (Sibley, 2004). Ein Komplex, der Glideosom genannt wird, ist der Motor für diese Fortbewegungsart. Myosin A bewegt den Parasiten relativ zu den Aktinfilamenten, die zum Beispiel zu Beginn der Invasion an Mikronemen-Protein – Wirtszellrezeptor – Komplexen verankert sind (Keeley und Soldati, 2004).

Die Mikronemen-Proteine werden am apikalen Pol des Parasiten sekretiert, bleiben an der Parasitenoberfläche gebunden und werden durch das Aktin-Myosin-System an das posteriore Ende des Parasiten verlagert. Dort werden sie zum Beispiel von der Intramembranprotease Rhomboid 4 (ROM4) durch Proteolyse entfernt. So entsteht die Vorwärtsbewegung des Parasiten und dieser Prozess ist auch wesentlich an der Invasion in die Wirtszelle beteiligt (Buguliskis et al., 2010; Opitz et al., 2002).

Die Mikronemen-Proteine, die während der Fortbewegung den Parasiten mit dem Substrat verankern, gehören zu den Thrombospondin-verwandten (thrombospondin-related anonymous proteins, TRAP) Proteinen. Die Funktion der zytoplasmatischen Domäne (cytoplasmic domain, C Domäne) ist in den TRAP-Proteinen der verschiedenen Apicomplexa konserviert und essentiell für deren Fortbewegung (Sibley, 2004). Für TgMIC2 und TRAP (von *P. falciparum*) wurde gezeigt, dass die C Domäne an einen Komplex bindet, der Aldolase beinhaltet. Somit verbindet die Aldolase Zelloberflächenadhäsine mit dem Aktinzytoskelett der Parasiten (Jewett und Sibley, 2003). Zudem wird Aldolase für die Energieproduktion benötigt und ist für die Wirtszellinvasion unentbehrlich (Starnes et al., 2009). Proteine der TRAP-Familie besitzen außerdem eine Integrin A-ähnliche Domäne (A Domäne), welche Interaktionen mit Glykosaminoglykanen vermittelt, die wichtig für die Erkennung der Wirtszelle durch den Parasiten sind (Harper et al., 2004a). Dieser Mechanismus der Wirtszellerkennung ist wahrschein-

lich auch in *N. caninum* konserviert und wird unter anderem durch NcMIC2 ausgeführt (Cowper et al., 2012).

1.12. Das *Neospora caninum*-Genom ist für molekulargenetische Methoden zugänglich

Das Genom von *N. caninum* besteht aus 14 Chromosomen und die Genomgröße beträgt 61 Megabasenpaare. Die *N. caninum*-Gene kodieren für etwa 7121 Proteine, was etwa 29,7 % des gesamten Genoms entspricht (Reid et al., 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass das Genom von *N. caninum* zugänglich für molekulargenetische Methoden ist. Aufgrund der nahen phylogenetischen Verwandtschaft mit *T. gondii* wurden aus diesem Parasiten bekannte Methoden auf *N. caninum* übertragen. Offensichtlich sind einige der Plasmide, die für eine Transfektion von *T. gondii* verwendet werden, auch für *N. caninum* nutzbar. *N. caninum* konnte bereits transient und stabil mit verschiedenen Plasmidsystemen transfiziert werden (Howe und Sibley, 1997). So konnten zum Beispiel TgSAG1 und TgGRA2 nach transients Transfektion heterolog in *N. caninum* exprimiert werden (Howe et al., 1997). Es konnte auch ein neues *T. gondii* Rhoptrien-Protein identifiziert werden, nachdem ein unbekannter offener Leserahmen von *T. gondii* in *N. caninum* exprimiert wurde (Beckers et al., 1997). Die Transfektion von *N. caninum* mit *T. gondii*-Genen wurde auch eingesetzt, um einen Lebendimpfstoff gegen Toxoplasmen herzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass TgSAG1-exprimierende *N. caninum*-Tachyzoiten im Mausmodell eine protektive Immunität gegen eine ansonsten tödliche Toxoplasmose induzierten (Zhang et al., 2010).

N. caninum kann unter anderem mit einem Plasmid transfiziert werden, welches eine Resistenz gegen Pyrimethamin verleiht. Diese Resistenz ist ursprünglich in *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) zu finden und wird von dem Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase-Gen (DHFR-TS) vermittelt. Durch zwei Punktmutationen in der kodierenden Sequenz des *dhfr-ts*-Gens von *T. gondii* konnte eine entsprechende Resistenz in *T. gondii* erhalten werden (Donald und Roos, 1993). Auch *N. caninum* prägt nach Transfektion mit einem Plasmid, das die *dhfr-ts*^{m2m3}-Sequenz enthält, eine Resistenz gegen Pyrimethamin aus. Wichtig ist auch, dass *N. caninum* noch nach vier Wochen ohne Selektionsdruck resistent gegen Pyrimethamin blieb, was darauf hindeutet, dass die Plasmid-DNA stabil in das *N. caninum*-Genom integriert wurde (Beckers et al., 1997; Zhang et al., 2010). Durch die Verwendung von Plasmiden, die zum Beispiel das *T. gondii* Gen *dhfr-ts*^{m2m3} enthalten, besteht somit die Möglichkeit, *N. caninum* stabil zu transfizieren.

1.13. Zielsetzung

Neospora caninum (*N. caninum*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) hat (Ellis et al., 1994). Beide sind obligat intrazelluläre Parasiten, weisen einen komplexen Lebenszyklus auf und bilden ähnliche parasitäre Stadien (Tachyzoiten, Bradyzoiten, Sporozoiten) aus. Neben diesen Ähnlichkeiten gibt es aber auch große Unterschiede. Endwirte bei *N. caninum* sind Canidae, während Felidae Endwirte für *T. gondii* sind (Dubey et al., 1998b; Lindsay et al., 1991; McAllister et al., 1998). *T. gondii* ist ein wichtiges Pathogen bei Mäusen und beim Menschen und kommt auch in anderen Vertebraten häufig vor (Sibley und Howe, 1996). *N. caninum* hingegen wird in hoher Frequenz besonders in Rindern gefunden, die jedoch selten mit Toxoplasmen infiziert sind. *N. caninum* kann auch in vielen Vertebraten gefunden werden, jedoch handelt es sich hier meist um Einzelfallbeschreibungen (Dubey und Schares, 2011). Allgemein wird *N. caninum* im Vergleich zu *T. gondii* als weniger virulent betrachtet, die Ursache für diesen Virulenzunterschied ist unbekannt. Es gibt jedoch verschiedene Hypothesen, die die Unterschiede zwischen *T. gondii* und *N. caninum* erklären sollen. So ist in *T. gondii* das Protein ROP18 für die Virulenz verschiedener Isolate entscheidend. Stämme, die eine „virulente“ Form von ROP18 besitzen, können Abwehrmechanismen gegen *T. gondii* antagonisieren. So kann virulentes ROP18 „immunity-related GTPases“ (IRGs) durch Phosphorylierung inaktivieren (Fentress et al., 2010; Steinfeldt et al., 2010). In eigenen Arbeiten konnten wir nachweisen, dass *N. caninum* jedoch durch die Aktivierung von IRGs in murinen Zellen gehemmt wird (Spekker et al., 2012). Das passt gut zu den Daten von Reid et al. (2012), die zeigen, dass *N. caninum* nur eine ROP18-Isoform besitzt, die IRGs nicht phosphorylieren kann. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Hypothese aufgestellt, dass in verschiedenen Spezies unterschiedliche Abwehrmechanismen an der Parasitenabwehr beteiligt sind. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits mehrmals zeigen, dass in humanen Zellen die Induktion des Tryptophan-abbauenden Enzyms Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) einen Abwehrmechanismus gegen *N. caninum* darstellt (Spekker et al., 2009). Damit kann eine unterschiedliche IDO-Aktivität den Virulenzunterschied der beiden Parasiten im Humansystem nicht erklären. Eine unterschiedliche Wirtsspezifität von Erregern ist häufig durch das Erkennen verschiedener Oberflächenmoleküle auf der Wirtszelle zu erklären. Für die Adhäsion und die Invasion von *N. caninum* und *T. gondii* sind insbesondere die Mikronemen-Proteine verantwortlich. So gibt es zum Beispiel *N. caninum*-spezifische Mikronemen-Proteine, für die in *T. gondii* keine homologen Proteine nachweisbar sind (Friedrich et al., 2010). Eine andere Hypothese besagt, dass multimere Komplexe, die von den Mikronemen-Proteinen gebildet werden, in *T. gondii* anders zusammengesetzt sind als in *N. caninum*. Auch dies könnte dafür verantwortlich sein, dass jeweils verschiedene Wirtszelloberflächenstrukturen erkannt werden (Cowper et al., 2012).

Neben Rhoptrien- und Mikronemen-Proteinen spielen auch dichte Granula-Antigene bei *T. gondii* eine bedeutende Rolle für die Virulenz unterschiedlicher Isolate. So wird zum Beispiel TgGRA15 in verschiedenen Isoformen in unterschiedlich virulenten *T. gondii*-Stämmen exprimiert. Funktionell unterscheiden sich diese TgGRA15-Isoformen in Ihrer Fähigkeit NF- κ B zu aktivieren und greifen daher unterschiedlich stark in die antiparasitäre Immunabwehr ein (Rosowski et al., 2011). Im Gegensatz zu den Rhoptrien- und Mikronemen-Proteinen ist über die eigentliche Funktion der dichte Granula-Proteine in *T. gondii* und *N. caninum* bisher wenig bekannt.

Vor einigen Jahren wurde in unserer Arbeitsgruppe TgGRA9 als immundominantes Antigen von *T. gondii* beschrieben (Nockemann et al., 1998). Zu Beginn meiner Arbeit konnte ich das dichte Granula-Protein NcGRA9 von *N. caninum* als homologes Protein zu TgGRA9 identifizieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, funktionelle Eigenschaften von NcGRA9 in *N. caninum* mit bekannten Eigenschaften von TgGRA9 zu vergleichen. Dazu wurden zum Beispiel molekularbiologische Methoden eingesetzt, die jedoch speziesspezifisch adaptiert werden mussten. So waren unter anderem Expressionssysteme, die in *T. gondii* verwendet werden, in *N. caninum* nicht funktionell und mussten ersetzt werden. Zur genauen Erfassung der Lokalisation von GRA9 in Tachyzoiten und Bradyzoiten von *N. caninum* wurden Immunfluoreszenzanalysen mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Die dazu notwendigen spezifischen Antikörper wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Durch Depletion putativer funktioneller Proteindomänen wurde die Bedeutung dieser Bereiche für das Lokalisations- und Sekretionsverhalten von NcGRA9 bestimmt. Die Interaktion von NcGRA9 mit membranösen Strukturen in den dichte Granula und in der parasitophoren Vakuole wurde mittels differentieller Ultrazentrifugation und Behandlung mit destabilisierenden Agentien untersucht. Da dichte Granula-Proteine innerhalb der PV zumeist als Multiproteinkomplexe vorliegen, wurde das Ko-Immunpräzipitationsverfahren angewendet und mittels Western Blot-Analyse und Massenspektrometrie nach potentiellen Interaktionspartnern von NcGRA9 gesucht.

Zusammenfassend wird in der vorliegenden Arbeit das dichte Granula-Protein NcGRA9 von *N. caninum* charakterisiert, welches sich in einigen Bereichen von seinem homologen Protein in *T. gondii* unterscheidet. Somit konnte ein weiterer Unterschied zwischen *N. caninum* und *T. gondii* aufgedeckt werden, der zur unterschiedlichen Wirtsspezifität, Replikationsrate und Virulenz beitragen könnte.

2. Material

2.1. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Lonza, Rockland, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Adenosin-Triphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BCIP-T	Fermentas, Ipswich, USA
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloramphenicol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
complete Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg Deutschland
DAPI	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Fluka Chemie AG, St. Gallen, Schweiz
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Enhanced Chemiluminescence System	Amersham, GE Healthcare, Buckingham- shire, UK
Entwickler	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixierer	AGFA, Leverkusen, Deutschland
Fluoromount-G SBA	Southern Biotech, Birmingham, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Lonza, Rockland, USA
Glutathion	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
IMDM	Lonza, Rockland, USA
Imidazol	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	Fermentas, Ipswich, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Riedel-deHaën, Seelze, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, entrahmt	Oxoid, Microbiology Products, Hampshire, England
MOPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Nitroprussid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
n-Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Roti Phenol/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tri Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-114	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Urea	Marck, Darmstadt, Deutschland

2.2. Medien und Puffer

<u>5x DNA-Ladepuffer</u>	0,025 g Bromphenolblau 0,025 g Xylencyanol 25 ml 10x TAE 25 ml Glycerin
<u>5x SDS-Probenpuffer</u>	10% SDS 0,4 M Tris / HCl pH 6,8 25% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau
<u>20x MOPS-Puffer</u>	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7,7
<u>20x SSC</u>	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl pH 7,0
<u>Alkalische Phosphatase Puffer</u>	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	0,5 g Coomassie 250 100 ml Eisessig 500 ml Ethanol 500 ml Wasser
<u>Cytomix</u>	0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 25 mM Hepes, pH 7,6 2 mM EDTA 5 mM MgCl ₂ 2 mM ATP, frisch zugesetzt 5 mM Glutathion, frisch zugesetzt
<u>DEPC-H₂O (autoklaviert)</u>	2 l destilliertes Wasser 2 ml DEPC
<u>dNTP-Mix</u>	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
<u>Einfrriermedium</u>	FCS 10 % DMSO
<u>Entfärbelösung</u>	74,5 ml Eisessig 200 ml Ethanol 725,5 ml Wasser
<u>Laird's Tail Buffer</u>	100 mM Tris / HCl, pH 8,5 5 mM EDTA, pH 8 0,2% SDS 200 mM NaCl
<u>LB-Festmedium</u>	LB-Medium 1,2 % Bacto-Agar 100 µg/ml Ampicillin
<u>LB-Medium</u>	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O pH 7; autoklaviert
<u>Minimal TE-Puffer</u>	50 µl 1 M Tris/HCl pH8 1 µl 0,5 M EDTA ad 50 ml Wasser
<u>NuPAGE[®] Transfer Puffer</u>	50 ml NuPAGE [®] Transfer Puffer (20x) 200 ml Methanol 750 ml Wasser
<u>Phosphate-buffered saline</u>	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4

<u>Proteinase K-Aufarbeitungspuffer</u>	5 mg Proteinase K 45 ml M-TE Puffer
<u>Proteinaufreinigungspuffer A</u>	6 M Guanidinhydrochlorid 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl pH 8
<u>Proteinaufreinigungspuffer B</u>	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl pH 8
<u>Proteinaufreinigungspuffer C</u>	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl pH 6,3
<u>Proteinelutionspuffer E</u>	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M Tris / HCl 0,25 M Imidazol pH 6,3
<u>RF1-Puffer</u>	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid 30 mM Kaliumacetat 10 mM Kalziumchlorid 15 % (w/v) Glyzerin pH 5,8
<u>RF2-Puffer</u>	10 mM MOPS 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Kalziumchlorid 15 % (w/v) Glyzerin pH 6,8
<u>TAE (10x)</u>	400 mM Tris 10 mM EDTA 400 mM Essigsäure
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris/HCl, pH 8 1mM EDTA
<u>Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer</u>	60 g Tris 288 g Glycin 0,1% SDS ad 10 l mit H ₂ O

2.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Blottingkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland
Cawomat 2000 IR	CAWO Photochemisches Werk GmbH, Schrobenhausen, Deutschland
Drehrad Model L28	Labinco BV, Breda, Niederlande
Elix Advantage 3	Millipore, Billerica, USA
Gel Dok XR ⁺	Bio-Rad, Hercules, USA
Gelkammer Novex Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Geltrockner Model 583	Bio-Rad, Hercules, USA
GenePulser II	Bio-Rad, Hercules, USA
Hamilton-Spritze X035.1	Hamilton Company, Reno, USA
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungssofen OV3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham, USA
J2-21 Zentrifuge	Beckman, Brea, USA
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Works, Wilmington, USA
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
pH-Messgerät MP 225	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Photometer Rainbow	Tecan, Männedorf, Schweiz
Röntgenfilmkammer	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules, USA
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Thermozykler PTC-200	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA
Ultraschallbad Bransonic 32	Branson,
Ultraschallgerät Labsonic U	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	IKA Works, Wilmington, USA
Waage Precisa 400	Oehmen Labortechnik, Essen, Deutsch- land
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zeiss LSM 780	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-10, JA-20)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutsch- land
Zentrifuge TL-100 (Rotor TLA45)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

2.4. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser (Ø 13 mm)	VWR International, West Chester, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, GE Healthcare, Buckingham- shire, UK
Einmalspritzen Omnifix (verschiedene Größen)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegpipetten Stripette (verschiedene Größen)	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Gene Pulser [®] Küvette, 0,4 cm Elektrode	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Hyperfilm ECL	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Kanüle Microlane™ 3 (verschiedene Größen)	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kodak Film BioMax MR	Kodak, Rochester, USA
Nylonmembrane Hybond N ⁺	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Objekträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pipetten Finnpipette	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipettenspitzen TipOne®	StarLab, Hamburg, Deutschland
pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Polypropylen-Säulen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Präzisions-Küvetten	Hellma, Müllheim, Deutschland
Protran Nitrocellulose Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Chromatographie-Papier	Whatman, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75, 165 cm ²)	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

2.5. Antikörper

2.5.1. Primäre Antikörper

Bezeichnung	Quelle	Verwendung
Kaninchen anti-NcGRA9-Antiserum	Eurogentec	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Kaninchen anti-TgGRA9-Antiserum	Eurogentec	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Kaninchen anti-NcGRA6-Antiserum	Marc Jenkins, USA	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Kaninchen anti-NcGRA7-Antiserum	Marc Jenkins, USA	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Maus monoklonaler Antikörper anti-NcGRA7	Gereon Schares, Deutschland	1:100 Western Blot, Immunfluoreszenz
Maus monoklonaler Antikörper anti-NcSAG1	Andrew Hemphill, Schweiz	1:2000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Maus anti-NcMAG1-Antiserum	Andrew Hemphill, Schweiz	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Kaninchen anti-NcMAG1-Antiserum	Andrew Hemphill, Schweiz	1:3000 Western Blot
Kaninchen anti-NcSAG1-Antiserum	Andrew Hemphill, Schweiz	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Kaninchen anti-TgBAG1-Antiserum	Andrew Hemphill, Schweiz	1:250 Immunfluoreszenz
Kaninchen anti-NcMIC1-Antiserum	Andrew Hemphill, Schweiz	1:1000 Western Blot, Immunfluoreszenz
Maus monoklonaler Antikörper anti-NcMIC2	Gereon Schares, Deutschland	1:100 Westernm Blot, Immunfluoreszenz
Kaninchenanti-NcMIC3-Antiserum	Andrew Hemphill, Schweiz	1:1000 Western Blot,

Maus anti-HA-Antikörper	Invitrogen, Carlsbad, USA	Immunfluoreszenz 1:1000 Western Blot,
Kaninchen anti-HA-Antikörper	Invitrogen, Carlsbad, USA	Immunfluoreszenz 1:1000 Western Blot,

2.5.2. Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Quelle	Verwendung
Ziege anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:5000 Western Blot
Ziege anti-Maus Peroxidase-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:5000 Western Blot
Ziege anti-Rind Alkalische Phosphatase-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:5000 Western Blot
Ziege anti-Kaninchen Cy2-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:1000 Immunfluoreszenz
Ziege anti-Kaninchen Cy3-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:1000 Immunfluoreszenz
Ziege anti-Maus Cy2-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:1000 Immunfluoreszenz
Ziege anti-Maus Cy3-gekoppelt	dianova, West Grove, USA	1:1000 Immunfluoreszenz

2.6. Enzyme

Bezeichnung	Quelle
DNase	Roche, Mannheim, Deutschland
High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Lambda Protein Phosphatase, 4000000 U/ml	Roche, Mannheim, Deutschland
Neuroaminidase, 50000 U/ml	New England Biolabs, Ipswich, USA
O-Glycosidase, 40000000 U/ml	New England Biolabs, Ipswich, USA
PNGase F, 500000 U/ml	New England Biolabs, Ipswich, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase A	Roche, Mannheim, Deutschland
T4 Ligase	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.6.1. Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Quelle
<i>AvrII</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>BamHI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>BglII</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>HindIII</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>HindIII</i>	Fermentas, Ipswich, USA
<i>NcoI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>NdeI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>NdeI</i>	Fermentas, Ipswich, USA
<i>NotI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>SmaI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>SpeI</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.7. Größenstandards

1 Kb DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use	Fermentas, Ipswich, USA
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.8. Kits

Immunoprecipitation Kit (Protein G)	Roche, Mannheim, Deutschland
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning® Kit pCR®2.1-TOPO® Vector	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymoresearch, Irvine, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.9. Oligonukleotide

2.9.1. Oligonukleotide für PCR

Bezeichnung	Sequenz
BglII-Neo-for	5'-CACCACAGATCTATGATGTGAGGTCATTCAAG-3'
AvrII-Neo-rev	5'-ATAATACCTAGGTATTTCTCCGTTATGGTTTCGA-3'
NcGRA9Ndelfor	5'-CACCACCATATGATGATGAGGTCATTCAAG-3'
NcGRA9HindIIIre	5'-ATAATAAAGCTTTATTTCTCCGTTATGGTTTCGAGAA-3'
NGRA9gS1-1697for	5'-CACCACATGATGAGGTCATTCAAG-3'
NGRA9gS1-1697rev	5'-CACCACCTTATATTTCTCCGTTATGGTT-3'
NGRA9gS271-1290fo	5'-CACCACGTTTCAGGAGATGATGCGG-3'
NGRA9gS31-1230re	5'-CACCACGACTCTCCCCGTGCT-3'
pDHFRSpelNotIfo	5'-CACCACACTAGTAAGCTTCGCGAGGCTGTAAATCCCGTG-3'
pDHFRSpelNotIre	5'-ATAATAGCGGCCGCCCATGGCCTAGGCTTCCCGGAT-3'
pGRA9SpelNotIfo	5'-CACCACACTAGTGGCCAGGCGACAGGAACCTTCTGG-3'
pGRA9SpelNotIre	5'-ATAATAGCGGCCGCCCATGGCCTAGGCTTCCCGGGT-3'
GRA9HAAvrNcofo	5'-CACCACCCTAGGATGATGAGGTCATTCAAGTCC-3'
GRA9HAAvrNcorev	5'-ATAATACCATGGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTATATTTCTCCGTT-3'
3'GRA9NcoINotIf	5'-CACCACCCATGGGCGCCACGTGTA-3'
3'GRA9NcoINotIr	5'-ATAATAGCGGCCGCTTCGGAACACACTACG-3'
GRA9HAAvrNcofor	5'-CACCACCCTAGGATGATGAGGTCATTCAAGTCC-3'
NcGRA9d280revHA	5'-ATAATACCATGGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTACTCTGTAGGAGT-3'
NcGRA9d237revHA	5'-ATAATACCATGGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTAGGGAGAAGGGAA-3'
NcGRA9d201revHA	5'-ATAATACCATGGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTAGCACTCAGGGTC-3'
NcGRA9d81revHAn	5'-ATAATACCATGGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTAGCTTGGGAATTC-3'
cDNAdNcGRA9for	5'-ATGATGAGGTCATTCAAGTCCATTCTTGTA-3'
cDNAdNcGRA9rev	5'-AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA-3'
SondeNcGRA9for	5'-CGTGCGCGTGGTGTTCACCTT-3'
SondeNcGRA9rev	5'-TATTTCTCCGTTATGGTTTCGAGAAACG-3'

2.9.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz
pET22b-for	5'-CACCACCGGCCACGATGCGTC-3'
pET22b-rev	5'-CACCACGGATATAGTTCCTCC-3'
NcGRA9NdeI/HindIIIfor	5'-CACCACCGGCCACGATGCGTC-3'
NcGRA9NdeI/HindIIIrev	5'-CACCACGGTGGCAGCAGCCAA-3'
NcGRA9MitteNde/Hindfor	5'-TGCATTATGACCCGCGAGGTT-3'
DHFR-TSc3_Promoter	5'-CACACAGGAAACAGCTAT-3'
DHFR-TSc3_Schnittstellen	5'-GGACTGTTGCTGGTCTGC-3'
pDHFRüberSpelfor	5'-GGATGAATTCCTGCAGCC-3'
pDHFRüberNotIrev	5'-CTATAGGGCGAATTGGAG-3'
NcGRA9HAüberAvrIIfor	5'-GCAGGGAGGGTGAAGTTT-3'
NcGRA9HAüberNcoIrev	5'-ACGACGGCCAGTGAATTG-3'
3'GRA9überNcoIfor	5'-GAGTCGAGAGAGCAGTCC-3'
3'GRA9überNotIrev	5'-TCGCCCTGATAGACGGTT-3'
dNcGRA9HAüberNcoIrev	5'-CCACCCCGTTCCCTCAGT-3'

2.9.3. Oligonukleotide und Sonde für qPCR

Bezeichnung	Sequenz
Nc5forqPCR	5' - CGAGAGTTCAGTGTTCTGTGTTGA - 3'
Nc5revqPCR	5' - TCGTCCGCTTGCTCCCTAT - 3'
Nc5_Sonde	FAM - CAACACCGGCGGCACTGATGA - BHQ1

2.10. Plasmide

Bezeichnung	Bezugsquelle
pET-22b(+)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
pET-22b(+)_NcGRA9	in dieser Arbeit hergestellt
pTUB-HA	Boris Striepen, Athens, USA
pTUB-HA_NcGRA9	in dieser Arbeit hergestellt
pDHFR-TSc3	Markus Meissner, Glasgow, England
pDHFR-TSc3_NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
pDHFR-TSc3_Δ280NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
pDHFR-TSc3_Δ237NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
pDHFR-TSc3_Δ201NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
pDHFR-TSc3_Δ81NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
pCR [®] 2.1-TOPO [®] Vector	Invitrogen, Carlsbad, USA
pCR [®] 2.1_Sonde/NcGRA9	in dieser Arbeit hergestellt

2.11. Zelllinien

Bezeichnung	Bezugsquelle
humane Vorhautfibroblasten (HFF)	ATCC, Wesel, Deutschland

2.12. Bakterienstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> Stamm DH5α	ATCC, Wesel, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> Stamm B21	ATCC, Wesel, Deutschland

2.13. Parasitenstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Neospora caninum</i> Isolat NC-1	Gereon Schares, Wusterhausen, Deutschland
NC-1 + Vollängen NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
NC-1 + Δ 280 NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
NC-1 + Δ 237 NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
NC-1 + Δ 201 NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
NC-1 + Δ 81 NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm RH	ATCC, Wesel, Deutschland
RH + Vollängen NcGRA9-HA	in dieser Arbeit hergestellt

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Bakterien

3.1.1.1. Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Mit kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) aus einem Glycerinstock wurde eine 2 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl der Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium überimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD von 0,4 bis 0,6 bei 600 nm inkubiert. Für die nachfolgenden Schritte wurden alle Pipetten und Gefäße bei -20 °C vorgekühlt. Die Bakterien wurden in 50 ml Röhrchen überführt und für 10 bis 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien bei 1200 UpM 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Das bakterienhaltige Pellet wurde durch leichtes Schütteln in 20 ml RF1-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden danach für 2 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben erneut bei 1200 UpM und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 4 ml RF2-Puffer mit einer Plastikpipette resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 200 µl „Aliquots“ bei -80 °C eingefroren.

3.1.1.2. Transformation von *Escherichia coli*

Um Plasmide in *E. coli* zu transformieren, wurden kompetente Bakterien, die bei -80 °C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut. Dann wurde die Bakteriensuspension zu dem Ligationsansatz beziehungsweise dem Plasmid gegeben und der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Die Plasmide wurden mittels Hitzeschock in die Bakterien transformiert, dazu wurden die Bakterien für 90 sec bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt und mit 800 µl LB-Medium versetzt. Die Bakterien wurden für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend in zwei Verdünnungen (1/10, 9/10) auf LB Platten mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.2. Zellkulturmethoden

3.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen und Parasiten dauerhaft aufzubewahren, wurden die Zellen beziehungsweise Parasiten durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Die Proben wurden zügig bei -80°C eingefroren. 24 Stunden später wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt, wo diese für längere Zeit aufbewahrt werden können.

Um Zellen beziehungsweise Parasiten aufzutauen und in Kultur zu nehmen, wurden die Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen. Die Proben wurden angetaut und zügig mit vorgewärmtem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen beziehungsweise Parasiten durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet wurde in Kulturmedium aufgenommen.

3.2.2. Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden in IMDM-Medium mit 10 % FCS bei 37°C und 10 % CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden in 165 cm^2 Zellkulturflaschen angezüchtet. Um die Zellen zu expandieren, wurden die Zellen, die einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, mit einem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflaschen gelöst, im Medium resuspendiert und in dem Verhältnis 1:3 auf neue Flaschen verteilt.

3.2.3. Kultivierung von Parasiten

Neospora caninum-Tachyzoiten (Isolat NC-1) und *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten (Stamm RH) wurden in HFF in IMDM-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden 1×10^6 Parasiten auf eine neue mit HFF bewachsene Kulturflasche überführt.

Tachyzoiten stellen das Parasitenstadium dar, welches während einer akuten Infektion zu finden ist. Für die meisten Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden Tachyzoiten verwendet. Es wurden allerdings auch *in vitro* Bradyzoiten hergestellt, um die Lokalisation von NcGRA9 in diesem Parasitenstadium mittels Immunfluoreszenzanalyse zu untersuchen. Diese Stadienkonversion wurde durch die Zugabe von $70\ \mu\text{M}$ (Endkonzentration) Natriumnitroprussid (SNP) in die Parasitenkultur ausgelöst, wodurch die Stickstoffkonzentration im Kulturmedium erhöht wurde. *N. caninum* wurde für vier beziehungsweise acht Tage in Anwesenheit von SNP kultiviert. Jeden Tag erfolgte eine erneute SNP-Gabe ins Medium und alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Nach vier beziehungsweise acht Tagen wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.3.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus *Neospora caninum*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *N. caninum* wurden die Parasiten, die frisch aus ihren Wirtszellen ausgestiegen waren, geerntet. Der Überstand der Kultur wurde bei 600 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert, dann abgesaugt und das parasitenhaltige Pellet in 170 µl Laird's Tail Buffer resuspendiert. Die Probe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg) versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 55 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Probe mit 200 µl Roti Phenol/Chloroform-Lösung versetzt und für 5 min bei 14000 UpM und 4 °C zentrifugiert. 180 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl absoluter Ethanol wurde zugegeben. Die Probe wurde durch vortexen gemischt, um die DNA zu fällen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde komplett entfernt und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Die Probe wurde erneut gevortext und zentrifugiert (5 min, 14000 UpM, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 100 – 200 µl H₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration am NanoDrop bestimmt.

3.3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wurde mittels High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) aus *Escherichia coli* isoliert. Dafür wurden 5 ml Übernachtskulturen angeimpft, aus denen am nächsten Tag die Plasmid-DNA laut Herstellerangaben aufgereinigt wurde.

Um größere Mengen an Plasmid-DNA für die Transfektion von *N. caninum* aufzureinigen zu können, wurden 500 ml Übernachtskulturen mit den entsprechenden Bakterien beimpft und am nächsten Tag mittels Plasmid or Cosmid DNA Purification Using Plasmid Midi and Maxi Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) den Angaben des Herstellers entsprechend aufgereinigt. Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde am NanoDrop bestimmt.

3.3.1.3. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, um diese für weitere Analysen einsetzen zu können, wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, USA) verwendet. Die Banden, die das gewünschte DNA-Fragment enthielten, wur-

den unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in das dreifache Volumen des Gewichts des Gelfragmentes ADB Puffer aufgenommen. Damit sich die Agarose löst, wurde die Probe bei 55 °C für 10 min inkubiert. Sobald die Agarose aufgelöst war, wurde die Probe auf einen Filtereinsatz für Reaktionsgefäße gegeben und für 1 min bei 13000 UpM zentrifugiert, sodass die DNA im Filter hängen blieb. Die aufgereinigte DNA wurde zweimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Um die DNA aus dem Filter zu eluieren, wurde 10 µl Wasser zu gegeben und die Probe wurde erneut zentrifugiert. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mittels NanoDrop bestimmt oder 1 µl wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um die DNA-Konzentration abschätzen zu können.

3.3.1.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Neospora caninum*

Um Gesamt-RNA aus *N. caninum* zu isolieren, wurden extrazelluläre Parasiten geerntet, indem die Kulturüberstände von durchlysierten HFF-Kulturen aus einer 165 cm²-Kulturflasche abgenommen und bei 600 UpM für 10 min zentrifugiert wurden. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in PBS aufgenommen und erneut bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde in 1 ml Tri Reagent resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe wurde durch Schütteln gemischt. Es folgte eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur und danach wurde die Probe 15 min bei 13000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Probe wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und das Reaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert. Es folgten eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei 56 °C wurde die RNA gelöst. Anschließend wurde die RNA-Konzentration am Photometer bestimmt.

3.3.1.5. cDNA-Synthese

Um komplementäre DNA synthetisieren zu können, wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Die Probe wurde mit 0,5 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer versetzt und für 2 min bei 72 °C inkubiert, damit sich die Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer an die Poly-A-Schwänze der RNA anlagern. Danach wurde der Ansatz direkt auf Eis gestellt. Für die anschließende cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz hergestellt:

4 µl 5x First Strand Puffer
10 mM je dNTP
20 U RNase OUT Ribonuclease Inhibitor
200 U M-MLV Reverse Transkriptase

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C gefolgt von 4 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 80 µl DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und bei –80 °C gelagert.

3.3.1.6. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von DNA wurde am NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt.

Um die Konzentration von RNA zu bestimmen, wurde das Photometer GeneQuant II (Pharmacia Biotech) verwendet, die RNA wurde 1:250 in Quarzküvetten verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

3.3.1.7. Sequenzierungen von DNA

Aufgereinigte Plasmide und PCR-Fragmente wurden für die Sequenzierung zu GATC (Konstanz, Deutschland) geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Lasergene beziehungsweise CloneManager analysiert.

3.3.2. Southern Blot-Analyse

Für die Southern Blot-Analyse wurden je 40 ng genomische *N. caninum*-DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut und auf ein Agarosegel (0,8 %) aufgetragen. An das Gel wurde eine Spannung von 35 V angelegt und das Gel über Nacht laufen gelassen. Ein Lineal wurde für die spätere Auswertung des Southern Blots angelegt und das Gel anschließend fotografiert. Das Gel wurde für 15 min in 0,25 N HCl inkubiert. Anschließend wurde es für 30 min in 0,4 M NaOH inkubiert und ein alkalischer Blot wurde aufgebaut, sodass die DNA dauerhaft auf die Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham, GE healthcare, Buckinghamshire, UK) transferiert wurde. Danach wurde die Membran für 15 min in 2x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Membran wurde für 30 min bei 80 °C inkubiert und konnte bei 4°C aufbewahrt werden. Für die weitere Verwendung wurde die Membran in 2x SSC angefeuchtet und für 1 h bei 60 °C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde 25 ng Sonde eingesetzt, mit 2 µl random primer (LaddermanTM Labeling Kit, Takara, Shiga, Japan) versetzt und auf ein Endvolumen von 16,5 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden 2,5 µl 10x Puffer, 0,2 mM je dNTP, 1 MBq P³² dCTP und 2 U Bca DNA Polymerase zugegeben und die Probe wurde für 30 min bei 55 °C inkubiert. Um ungebundenes P³² dCTP von der Sonde zu trennen, wurde der Ansatz auf eine microSpin S-200 Säule pipettiert und für 3 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 95 °C inkubiert und nach dem Abkühlen auf Eis wurde der Ansatz zu der Membran in der Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 60 °C inkubiert und

anschließend mit Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,05 % SDS) bei Raumtemperatur für 15 min gewaschen. Es folgten drei Waschschrirte mit Waschpuffer 2 (0,1x SSC, 0,1 % SDS) bei 50 °C. Im Anschluss wurde ein Röntgenfilm bis zur Entwicklung, die nach 1 bis 5 Tagen erfolgte, bei -80 °C exponiert.

3.3.3. Enzymatische Methoden

3.3.3.1. DNA-Restriktion mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Fragmente, wie Plasmide oder zu inserierende Fragmente, wurden mit Restriktionsendonukleasen verdaut, um spezifische Überhänge zu erhalten. Die Ansätze wurden laut Herstellerangaben (Fermentas beziehungsweise New England Biolabs) hergestellt und die entsprechenden Inkubationszeiten wurden eingehalten.

3.3.3.2. DNA-Ligation

Um mit Restriktionsendonukleasen verdaute DNA-Fragmente zusammenzubringen, wurde eine Ligation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die T4 DNA-Ligase mit dem entsprechenden Puffer laut Herstellerangaben verwendet.

3.3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde durchgeführt, um spezifische Bereiche der DNA oder cDNA zu vervielfältigen. Diese Reaktion erfolgt unter Zugabe von Oligonukleotiden (Primer), die spezifisch an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragments binden. Außerdem wurden dNTPs (Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und eine Polymerase in den Ansatz gegeben.

Ein typischer Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

100 ng genomische DNA beziehungsweise cDNA
 50 pmol je(von jedem!) Primer
 10 mM je dNTP
 10 µl 5x High Fidelity Puffer
 2,5 U High Fidelity Polymerase
 ad 50 µl mit H₂O

Das in dieser Arbeit eingesetzte Routineprogramm, bei dem die DNA-Fragmente amplifiziert wurden, lief folgendermaßen ab:

Zyklus 1:	94°C	3 min
Zyklus 2: 30 x	94°C	30 sec
	variable Annealingtemp.	30 sec
	72°C	je nach Länge des Amplifikats

Zyklus 3:	72 °C	7 min
	4 °C	∞

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben mit Ladebuffer versetzt und auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Die PCR-Amplifikate wurden dann ihrer Größe nach aufgetrennt.

3.3.3.4. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob wildtypische und transfizierte *Neospora caninum* ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen. Dafür wurden 1×10^4 HFF in Flachboden-Mikrotiter-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1×10^5 Parasiten zu den Zellen gegeben und die Experimente wurden nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C ausgewertet. Die Versuche erfolgten in Triplikaten.

Um die Anzahl der Parasiten pro Ansatz bestimmen zu können, wurde ein Standard eingesetzt, der eine definierte Anzahl an Parasiten enthält. Um die DNA zu isolieren, wurden die Platten bei -20 °C eingefroren, sodass die Wirtszellen und Parasiten lysiert wurden. Die Proben wurden resuspendiert und die Überstände der Triplikate wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Die Vertiefungen wurden mit PBS gespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben bei 13000 UpM für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet wurde in 25 µl PBS resuspendiert. Zu dieser Probe wurden 50 µl Proteinase K-Aufarbeitungspuffer gegeben und der Ansatz anschließend bei 56 °C für 60 min verdaut. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 96 °C für 30 min. 5 µl der 1:100 in TE-Puffer verdünnten Proben wurden für die folgende qPCR eingesetzt.

Der Ansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

12,5 µl 2x qPCR[®] Mastermix –No ROX (Eurogentec, Seraing, Belgien)
 7,5 pmol je Primer
 5 pmol Sonde
 5 µl DNA (1:100 vorverdünnt)
 ad 25 µl mit H₂O

Die Amplifikation der Fragmente wurde bei folgendem Programm durchgeführt:

Zyklus 1:	Schritt 1	50 °C	2 min
	Schritt 2	95 °C	10 min
Zyklus 2:	45 x Schritt 1	95 °C	15 s
	Schritt 2	60 °C	1 min
Zyklus 3:	Schritt 1	4 °C	∞

Die Ergebnisse der PCR wurden mit dem Programm iQ5 analysiert. Um die Anzahl der Parasiten zu bestimmen, wurden Standardproben mit DNA von 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Parasiten eingesetzt. In dieser qPCR wurde ein Bereich des Nc5-Bereichs von *N. caninum* amplifiziert.

fiziert, wie es bereits in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben wurde (zum Beispiel Vonlaufen *et al.*, 2002).

3.3.3.5. Dephosphorylierung von Proteinen

Für den Nachweis, dass NcGRA9 ein phosphoryliertes Protein ist, wurde Lysat von extrazellulären *N. caninum* und von *N. caninum* infizierten Wirtszellen mit Lambda Proteinphosphatase behandelt.

Der Ansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

50 µg Protein aus den Lysaten
1,5 µl Lambda Protein Phosphatase
1x NEBuffer for Protein MetalloPhosphatases (10x)
1 mM MnCl₂

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym. Die Proben wurden für 90 min bei 30 °C inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert.

3.3.3.6. Deglykosylierung von Proteinen

Proteine können O-Glykosylierungen als posttranslationale Modifikationen tragen. Für den Nachweis einer solchen Modifizierung wurden Lysate von extrazellulären *N. caninum* und von *N. caninum* infizierten Wirtszellen mit O-Glykosidase und Neuroamidase inkubiert, um O-Glykosylierungen zu entfernen.

Der Ansatz, um O-Glykosylierungen zu entfernen, war:

20 µg Protein aus den Lysaten
1 µl Glykoprotein Denaturierungspuffer (10x)
ad 10 µl mit Wasser

Es folgte die Denaturierung des Glykoproteins für 10 min bei 100 °C.

Danach wurden folgende Komponenten zugegeben:

2 µl G7 Reaktionspuffer (10x)
2 µl 10% NP40
100 U Neuroaminidase
80000 U O-Glycosidase
ad 20 µl mit Wasser

Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 4 bis 72 h.

3.4. Gelelektrophoretische Methoden

3.4.1. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

PCR-Produkte und Plasmide wurden nach Restriktion in Agarosegelen entsprechend ihrer Größen elektrophoretisch aufgetrennt. Agarose wurde in TAE-Puffer in der Mikrowelle auf-

gekocht und nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid (1 % Lösung) versetzt. Die Lösung wurde in Gelschlitten gegossen. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde es in der Gelkammer, die mit TAE-Puffer gefüllt wurde, mit den Proben beladen. Es wurde eine Spannung von 70 V angelegt. Das Gel wurde mit dem GelDok XR+ System aufgenommen und ausgewertet.

3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auswertung der denaturierenden Proteinaufreinigung wurden SDS-Polyacrylamidgele gegossen.

Sammelgel :

6,5 ml destilliertes, entgastes Wasser
1 ml Rotiphorese Gel 30
2,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
100 µl 10 % SDS
150 µl 10 % APS
15 µl TEMED

Trenngel (9,5 %):

8,5 ml destilliertes, entgastes Wasser
6,3 ml Rotiphorese Gel 30
5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
200 µl 10 % SDS
200 µl 10 % APS
25 µl TEMED

Als Laufpuffer wurde Tris-Glycin-Puffer verwendet und zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 40 V über Nacht angelegt.

Für die Analyse von Proteinen mittels Western Blot wurden NuPage BisTris Gele von der Firma life eingesetzt. Der Laufpuffer war 1x MOPS-Puffer. Für die Auftrennung der Proteine in diesen Gelen wurde eine Spannung von 160 V angelegt.

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. *In vitro*-Induktion von exkretierten/sekretierten Antigenen

Die exkretierten/sekretierten Antigene (ESA) von *Neospora caninum* beinhalten Proteine, die als immunogen beschrieben sind und zu denen die dichte Granula-Proteine gehören.

Um diese Proteine zu präparieren, wurden mit *N. caninum* infizierte HFF geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zelllayer mit 4 °C PBS gespült. Die Flüssigkeit wurde komplett entfernt und es wurde ein kleines Volumen kaltes PBS auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit dem Zellschaber geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und das Volumen auf 1 ml eingestellt. Um die Parasiten aus den parasitophoren Vakuolen zu befreien, wurden die Proben dreimal durch eine 25 G-Kanüle gezogen. Die Proben wurden während des gesamten Experiments kalt gehalten. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 600 UpM und 4 °C zentrifugiert, um die Zellreste abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Anzahl der Parasiten wurde bestimmt. Die Proben wurden bei 3000 UpM und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um die Parasiten zu pelletieren. Das Pellet wurde in kaltes Medium aufgenommen und dabei wurde die Parasitenzahl auf 1×10^8

N. caninum-Tachyzoiten pro ml eingestellt. Die Proben wurden für die verschiedenen Zeitpunkte (1 min, 30 min, 360 min) bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt in der gekühlten Zentrifuge bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, durch einen Filter (0,2 µm) gegeben und bis zur Auswertung mittels Western Blot Analyse bei -20 °C gelagert.

3.5.2. Herstellung von *Neospora caninum*- und *Toxoplasma gondii*-Lysatantigen

Um Lysat-Antigen von extrazellulären Parasiten zu gewinnen, wurden die freigesetzten Parasiten in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 600 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert, um die Parasiten zu pelletieren. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend wurden die Parasiten in destilliertem Wasser versetzt mit Proteaseinhibitor-Cocktail aufgenommen. Um die Parasiten zu lysieren, wurden diese siebenmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Um noch intakte Parasiten und Zellwandreste zu entfernen, wurden die Proben bei 3400 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Um zu analysieren, wie sich die Proteine nach der Infektion der Wirtszellen verhalten, wurde Lysat von Parasiten präpariert, die sich noch innerhalb der parasitophoren Vakuole (PV) befanden. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde komplett abgesaugt und danach wurde ein kleines Volumen Wasser versetzt mit Proteaseinhibitor-Cocktail draufgegeben. Der Zellschaber wurde mit einem Zellschaber abgekratzt und die Proben ein Reaktionsgefäß überführt. Um die intravakuolären Parasiten zu liberieren, wurden die Zellen dreimal durch eine 25 G-Kanüle gezogen. Anschließend wurden die Proben bei 600 UpM für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die darin vorhandenen Parasiten zu lysieren, wurden die Proben siebenmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Um die noch intakten Parasiten und Zellwandreste zu entfernen, wurden die Proben bei 3400 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

3.5.3. Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen einer Probe wurde diese mit Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 10 % versetzt. Die Probe wurde für die Fällung der Proteine für 30 min bei -80 °C inkubiert und anschließend kurz angetaut. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min

bei 14000 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das proteinhaltige Pellet wurde mit Ethanol (70 %, -20 °C) gewaschen. Der Überstand wurde wieder entfernt, das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in einem Volumen von 10 – 50 µl PBS aufgenommen. Bis zur Analyse konnten die gefällten Proteine bei -20 °C gelagert werden.

3.5.4. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein-Assay

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels BCA™ Protein Assay Kit von Thermo Scientific bestimmt. Die Messung wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard diente BSA in einer Konzentration von 2 mg/ml bis 0 mg/ml.

3.5.5. Zellfraktionierung von *Neospora caninum* durch Ultrazentrifugation

Für die Zellfraktionierung durch Ultrazentrifugation wurden entweder 8×10^8 extrazelluläre *N. caninum* eingesetzt oder es wurden HFF mit 1×10^8 *N. caninum* infiziert und nach 24 h geerntet, um den Inhalt der PV zu analysieren. Die extrazellulären Parasiten wurden geerntet, gezählt und einmal mit PBS versetzt mit Proteaseinhibitor-Cocktail und 1 mM EGTA gewaschen. Anschließend wurde das Parasitenpellet in 1,5 ml PBS, versetzt mit Proteaseinhibitor-Cocktail und 1 mM EGTA, aufgenommen. *N. caninum* wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert und es folgte eine Zentrifugation bei 3400 UpM für 10 min. Das resultierende Pellet wurde als „low speed“ Pellet (LSP) bezeichnet und beinhaltete intakte Parasiten und Parasitenbruchstücke. Der Überstand („low speed“ Überstand, LSÜ) enthielt lösliche Komponenten aus den Parasiten, Proteinaggregate und membranöse Strukturen. Dieser LSÜ wurde bei 45000 UpM für 2 h und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Daraus resultierte ein „high speed“ Pellet (HSP) und ein „high speed“ Überstand (HSÜ). Das HSP enthielt membranöse Strukturen und Proteinaggregate, im HSÜ waren lösliche Proteine zu finden.

Von den *N. caninum* infizierten Wirtszellen wurde nach 24 h das Medium gut abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS + Proteaseinhibitor-Cocktail + 1 mM EGTA gespült. Der Überstand wurde wieder vollständig abgesaugt und die Zellen wurden in möglichst wenig PBS + Proteaseinhibitor-Cocktail + 1 mM EGTA (Endvolumen 1,5 ml) mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt. Die geernteten Zellen wurden anschließend dreimal durch eine 25 G-Kanüle gezogen, damit die Parasiten aus den PV freigesetzt wurden. Diese Proben wurden dann für 10 min bei 3400 UpM zentrifugiert, sodass im LSP die intakten Parasiten und die Wirtszellbruchstücke zu finden waren. Der LSÜ enthielt die PV-Inhalte, also membranöse Strukturen, Proteinaggregate und lösliche Proteine. Der LSÜ wurde auch einer Ultrazentrifugation (45000 UpM, 2 h, 4 °C) unterzogen. Das HSP enthielt Proteinaggregate und Membranbestandteile aus der PV und im HSÜ waren die in der PV löslichen Proteine.

Die vier Fraktionen (LSP, LSÜ, HSP und HSÜ) wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dafür wurde jeweils 1/20 der Pellets und der TCA-gefällten Überstände eingesetzt. Falls ein zu untersuchendes Protein im HSP vorhanden war, wurde untersucht welche Art von Interaktion mit den Membranen vorlag. Dazu wurde das HSP mit verschiedenen destabilisierenden Agenzien für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert, gefolgt von einer erneuten Ultrazentrifugation. Die HSP wurden mit 50 mM Tris/HCl, pH 8; 0,5 M KCl; 0,1 M NaHCO₃, pH 11; 4 M Urea; 6 M Urea; 1 % Igepal oder 1,5 % Triton X-114 behandelt. Anschließend wurden das behandelte HSP und der entsprechende HSÜ mittels Western Blot-Analyse ausgewertet. Es wurde jeweils 1/20 der Ausgangsprobe aufgetragen.

3.5.6. Triton X-114-Partitionierung

Für diese Analyse wurden $1,5 \times 10^8$ extrazelluläre *N. caninum* verwendet. Die Parasiten wurden bei 3000 UpM und 4 °C für 15 min zentrifugiert und das Pellet in PBS mit 2x Proteaseinhibitor-Cocktail und 10 mM EGTA aufgenommen. Hinzu wurden 200 µl 10% Triton X-114 in PBS gegeben und der Ansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 UpM und 4 °C für 10 min. Das resultierende Pellet wurde zweimal in PBS gewaschen und der Überstand wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand für 10 min bei 13000 UpM und RT zentrifugiert, sodass eine Detergensphase (unten) und eine wässrige Phase (oben) entstand. Die beiden Phasen wurden getrennt voneinander weiter behandelt. Die Detergensphase wurde dreimal mit PBS extrahiert, gefolgt von jeweils einer Zentrifugation für 10 min bei 14000 UpM und RT. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 10 % Triton X-114 ebenfalls durch Zentrifugation extrahiert. Nach den Waschschrritten wurden die Proteine beider Phasen in 2 Volumen eiskaltem Aceton über Nacht bei – 20 °C gefällt.

Die Analyse erfolgt mittels Western Blot. Das Pellet beinhaltet die unlösliche Fraktion, die Detergenzphase die hydrophoben Proteine und die wässrige Phase die tritonunlöslichen, hydrophilen Proteine.

3.5.7. Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner von NcGRA9 zu identifizieren. Diese Analyse wurde mit Hilfe des Immunoprecipitation Kit (Protein G) von Roche durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden laut Herstellerangaben zusammengesetzt. In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Interaktionspartner von NcGRA9 identifiziert werden. Dazu wurden Tachyzoiten, die mit NcGRA9-HA transfiziert waren, und als Negativkontrolle Wildtyp-Tachyzoiten verwendet. So konnten die Proben mit

anti-HA-Antikörpern inkubiert werden und unspezifische Bindungen an den Antikörper detektiert werden.

Für die Analyse wurden entweder Parasiten, die bereits aus den Wirtszellen ausgestiegen waren und extrazellulär vorlagen, oder mit *N. caninum* infizierte Wirtszellen geerntet. Um die extrazellulären Parasiten zu erhalten, wurde der Kulturüberstand in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 600 UpM für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Probe wurde bei 3000 UpM für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, die Anzahl der Parasiten wurde bestimmt (5×10^8) und die Probe wurde erneut bei 3000 UpM zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Lysis Buffer aufgenommen und die Parasiten wurden durch dreimaliges Einfrieren im flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37 °C Wasserbad aufgeschlossen. Durch eine Zentrifugation bei 9700 UpM für 10 min wurden noch intakte Parasiten und Zellwandreste von der zu analysierenden Probe getrennt.

Für die Analyse der parasitären Proteine nach Infektion der Wirtszelle wurden HFF mit $1,5 \times 10^8$ *N. caninum* infiziert und nach 24 – 30 h wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gespült und das PBS abgesaugt. Anschließend wurde eine geringe Menge Lysis Buffer auf die Zellen gegeben und diese wurden mit Hilfe eines Zellschabers von dem Boden der Kulturflasche gelöst. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und dreimal durch eine 25 G-Kanüle gezogen, um die Wirtszellen und die parasitophoren Vakuolen zu zerstören, sodass der Inhalt der PV freigesetzt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 600 UpM zentrifugiert, um Zelldebris zu pelletieren und aus den Proben zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltenen Parasiten durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37 °C Wasserbad lysiert. Um noch intakte *N. caninum* zu entfernen, wurde die Probe bei 9700 UpM für 10 min zentrifugiert.

Die Überstände beider Ansätze wurden mit 50 µl Protein G-gekoppelter Agarose versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Dadurch wurde der Hintergrund reduziert, da unspezifisch an die Protein G-Agarose bindende Proteine aus der Probe entfernt wurden. Die Probe wurde für 1 min bei 13400 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben wurde der Antikörper gegen das HA-Tag gegeben und es folgte eine Inkubation für eine Stunde auf einem Drehrad bei 4 °C. Anschließend wurde zu den Proben 50 µl Protein G-Agarose zugegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden durch Zentrifugation bei 13400 UpM für 1 min pelletiert und die Pellets in 1 ml Wasch Puffer 1 aufgenommen und für 20 min bei 4 °C auf einem Drehrad gewaschen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, es folgten zwei Waschschrift mit Wasch Puffer 2 ebenfalls für 20 min. Zum Schluss

wurde das Agarosepellet mit Wasch Puffer 3 inkubiert und nach der Zentrifugation wurde der komplette Überstand mit eine Hamilton-Spritze entfernt.

Für die Analyse der präzipitierten Proteine wurde entweder eine Western Blot-Analyse durchgeführt oder die Proben wurden zur Massenspektrometrieanalyse geschickt. In beiden Fällen wurde das Agarosepellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 100 °C aufgeköcht, sodass die Proteine von der Agarose gelöst wurden und denaturiert im Überstand vorlagen.

3.5.8. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Das SDS-Gel wurde nach dem Lauf in Coomassie-Färbelösung gelegt und für 1 Stunde gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, das Gel einmal mit Wasser gespült und mit Entfärbelösung behandelt. Die Lösung wurde mehrmals gewechselt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Die Entfärbereaktion wurde abgestoppt, indem das Gel mehrmals mit Wasser gespült wurde. Aus dem Gel konnten entweder die entsprechenden Banden ausgeschnitten werden oder das Gel im Geltdrockner direkt getrocknet werden.

3.5.9. Western Blot-Analyse

Western Blot Analysen werden durchgeführt, um Proteine von den SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen. Dazu wurden die zu analysierenden Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Dazu wurden sechs Chromatographiepapiere in Größe des Gels, die in NuPAGE® Transfer Puffer getränkt wurden, in eine Semi dry Blotting Kammer gelegt. Darauf folgte die Nitrocellulosemembran und darüber wurde das Gel gelegt. Auf das Gel wurden drei weitere Chromatographiepapiere gelegt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit Hilfe eines Zentrifugenröhrchens entfernt und die Blottingkammer wurde geschlossen. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche und einer Dauer von 2 h auf die Membran transferiert.

3.5.10. Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine können durch spezifische Antikörper detektiert werden. Um unspezifische Antikörperbindestellen auf der Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran in 5 % Milchpulver für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper in 0,5 % Milchpulver für mindestens 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit 0,2 % Tween 20 in PBS gewaschen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem HRP- (horseradish Peroxidase-) gekoppelten Sekundärantikörper und erneut wurde die

Membran gewaschen. Um die Chemilumineszenz-Signale, die durch die HRP entstehen, detektieren zu können, wurden die Membranen 1 min im Substrat ECL inkubiert und danach wurden, um die Lichtemission detektieren zu können, Röntgenfilme aufgelegt (10 sec – 30 min). Die Filme wurden in der Entwicklermaschine entwickelt und anschließend im Vergleich mit dem Größenstandard ausgewertet.

Alternativ wurden Sekundärantikörper verwendet, die an Alkalische Phosphatase gekoppelt waren. Nach dem Waschen wurden die Membranen in Alkalische Phosphatase-Puffer gelegt und dieser wurde mit NBT und BCIP-T versetzt. Dadurch kam es zu einem Farbumschlag, der die, vom Primärantikörper detektierten Proteine sichtbar machte.

3.5.11. Immunfluoreszenzanalyse

Um die Lokalisierung von Proteinen in den Wirtszellen darzustellen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Dafür wurden Deckgläschen in Platten mit 24 Vertiefungen verteilt und HFF ausgesät. Wenn die Zellen Monolayer gebildet hatten, wurden die Wirtszellen mit Tachyzoiten für unterschiedliche Zeiträume infiziert. Zu Beginn der Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA in PBS für 20 min bei RT auf dem Taumler fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Um die Wirtszellen und Parasiten für die Färbung zu permeabilisieren, wurden die Proben für 20 min bei -20 °C mit eiskaltem Methanol/Aceton inkubiert. Die Proben wurden wieder dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und dann wurden unspezifische Bindestellen mit 3 % BSA in PBS für 2 h bei RT blockiert. Die Primärantikörper wurden in 0,3 % BSA in PBS verdünnt und die Proben wurden für 1 h bei RT mit den Primärantikörpern inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder gewaschen (dreimal für 5 min mit PBS) und die Fluoreszenzmarkergekoppelten Sekundärantikörper für 45 min bei RT auf die Proben gegeben (in 0,3 % BSA in PBS). Die Proben wurden dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und zum Schluss für 2 min mit DAPI (Endkonzentration 0,5 µg/ml) inkubiert, kurz in PBS gewaschen, die Deckgläschen aus den Vertiefungen geholt, auf Papier abgetropft und mit Hilfe von Fluoromount-G auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden bei 4 °C und im Dunkeln gelagert.

Für die Analyse von *Neospora caninum* nach der Stadienkonversion in Bradyzoiten wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 20 min permeabilisiert. Die anderen Schritte dieser Färbung entsprachen den oben beschriebenen.

Die Präparate wurden mit dem Konfokalmikroskop LSM 780 von Zeiss analysiert und fotografiert. Die Bilder wurden mit der Software Zen 2009 ausgewertet und bearbeitet.

3.5.11. Denaturierende Proteinaufreinigung aus *Escherichia coli*

Von dem *E.coli*-Stamm, der mit pET-22b(+)_NcGRA9 transformiert war, wurde eine Vorkultur (5 ml LB-Medium) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium mit der Vorkultur beimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 inkubiert. Dann wurde eine Probe für das Coomassie Gel abgenommen und die Expression des rekombinanten Proteins durch die Zugabe von 2 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Die Bakterienkultur wurde für 4 weitere Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Wieder wurde eine Probe für den Gellauf abgenommen und die Bakterienkultur bei 8000 UpM für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 15 ml Puffer A resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde einmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Für das Coomassie-Gel wurde 1 ml abgenommen, für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert und das Lysat als eine Gellaufprobe in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer A resuspendiert und diente als weitere Gellaufprobe. Das restliche Lysat wurde bei 13000 UpM für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder bei –20 °C aufbewahrt oder weiterbehandelt.

Für die nachfolgende Proteinaufreinigung wurde Ni-NTA-Agarose mit 1 ml Puffer A äquilibriert, dafür wurden 600 µl Ni-NTA-Agarose mit 1 ml Puffer A durch 1 min schwenken gemischt, die Probe wurde für 1 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut in 1 ml Puffer A resuspendiert, nochmal zentrifugiert und der Überstand wurde wieder verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wurde mit dem Lysat gemischt und dieser Ansatz für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert, sodass das His-Tag an die Ni-NTA-Agarose binden kann. Anschließend wurde das Lysat auf eine Polypropylen-Säule gegeben und für 5 min stehen gelassen, damit sich die Agarose absetzen konnte. Die Säule wurde geöffnet und der Durchlauf aufgefangen, später wurde dieser auch auf dem Coomassie-Gel auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins analysiert. Danach wurde die Säule mit jeweils 10 ml Puffer A, Puffer B und Puffer C gewaschen, die Puffer für die spätere Coomassie-Gel-Analyse aufgefangen. Um das an die Ni-NTA-Agarose gebundene rekombinante Protein zu eluieren, wurde imidazolhaltiger Puffer E auf die geschlossene Säule gegeben, nach 5 min das Eluat in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und dieser Elutionsschritt noch neunmal wiederholt.

Zur Analyse, ob rekombinantes Protein in den Proben vorhanden ist, wurden 50 µl der Proben mit TCA aufkonzentriert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, um die vorhandenen Proteine nachzuweisen.

3.5.12. Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Dr. Katja Kuhlmann (Abteilung Medizinische Proteomik/Bioanalytik, Medizinisches Proteom-Center am Zentrum für Klinische Forschung, Bochum) durchgeführt. Die Proben wurden dazu im Gel mit Trypsin verdaut, die Peptide wurden aus dem Gel extrahiert und mittels LC-MS/MS analysiert (HPLC: RSLCnano, Dionex; Massenspektrometer: Orbitrap Elite, Thermo Scientific; 2h Top20 Methode). Die Daten wurden mit MaxQuant (Version 1.3.0.5) ausgewertet. Für den Vergleich der Proteinmengen in dem Präzipitat und der Kontrolle wurde der „LFQ intensity“ Parameter, eine normalisierte Intensität der MS-Messung, verwendet. Dieser Wert wurde für die Berechnung des Verteilungsverhältnisses von Proteinen verwendet.

3.6. Herstellung von *Neospora caninum*- und *Toxoplasma gondii*-Mutanten

3.6.1. Transfektion und Selektion von *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii*

N. caninum wurde mit dem Plasmid pDHFR-TSc3 transfiziert, welches die cDNA-Sequenz des zu exprimierenden Proteins enthielt. Extrazelluläre *N. caninum* wurden mittels Zentrifugation isoliert und einmal in PBS gewaschen. Für die Elektroporation wurden 1×10^7 Parasiten eingesetzt und in Cytomix resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 3 mM ATP und 3 mM Glutathion versetzt. Nach 5 min wurde 100 µg Plasmid-DNA zugegeben und die Parasiten durch Elektroporation transfiziert (Geräteeinstellungen: 50 Ω, 2 kV). Die transfizierten *N. caninum* wurden auf HFF überführt und unter Pyrimethamin-Selektion (Stocklösung 10 mM, Endkonzentration 1 µM) kultiviert. Nach zwei Wochen unter Selektionsdruck wurde zur Überprüfung der Expression des HA-getaggten Proteins eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die transfizierten Parasiten wurden mit dieser Methode stabil transfiziert.

T. gondii wurde mit dem Plasmid pTUB-HA unter denselben Bedingungen wie *N. caninum* transfiziert. *T. gondii* wurde nach der Transfektion unter Chloramphenicol-Selektion (Endkonzentration 20 µM) kultiviert und wurde auch stabil transfiziert.

3.6.2. Klonierung von stabilen Klonlinien

Wenn mittels Immunfluoreszenz bestätigt wurde, dass die transfizierten Parasiten das HA-getaggte Protein exprimierten, wurden stabile Klonlinien etabliert. Dazu wurden extrazelluläre Parasiten der gemischten Kultur isoliert und auf Flachboden-Mikrotiter-Platten, in denen konfluente Monolayer HFF gewachsen waren, ausgesät. Um eine Kultur ausgehend von einem einzelnen Parasiten heranzuziehen, wurden 0,3 Parasiten pro Vertiefung ausgesät. Zur Kontrolle wurden auch Vertiefungen mit 30, 12 und 1 Parasiten angesetzt. Nach zwei Wo-

chen Inkubation bei 37 °C wurden die Platten mikroskopisch auf Parasiten untersucht. Wenn in einer Vertiefung mit 0,3 Parasiten ein Plaque zu erkennen war, wurde der Überstand in Platten mit 6 Vertiefungen und einem HFF-Monolayer überführt. Die Parasiten wurden immer unter Selektionsdruck gehalten. Die stabilen Klonlinien wurden mittels Immunfluoreszenzanalyse auf Expression des HA-getaggtten Proteins untersucht.

3.7. Computerprogramme

Für Sequenzanalysen wurden die Software Lasergene (DNASTAR, Madison, USA) und CloneManager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software, Cary, USA) verwendet. Für weitere Analysen wurden auch Programme, die im Internet frei verfügbar sind, eingesetzt. Diese sind im Ergebnisteil an den entsprechenden Stellen erwähnt.

Für die Auswertung der Konfokalmikroskopaufnahmen wurde das Programm Zen 2009 von Zeiss verwendet.

Des Weiteren wurden für die Erstellung von Abbildungen Adobe Photoshop CS und Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von NcGRA9

Vor einigen Jahren wurde das dichte Granula Protein GRA9 in *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) beschrieben. Dieser Parasit gehört zu dem Stamm der Apicomplexa und ist phylogenetisch sehr nah mit *Neospora caninum* (*N. caninum*) verwandt. Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit lautet, ob in *N. caninum* ein homologes GRA9 existiert und in wie fern sich die Proteine der beiden Parasiten unterscheiden. Dazu wurden zuerst *in silico*-Analysen durchgeführt, die das mutmaßliche homologe NcGRA9 in *N. caninum* auf genomischer Ebene und im Bezug auf die Proteinstruktur identifizieren sollten.

4.1.1. Analyse von *Ncgra9* auf genomischer Ebene

ToxoDB ist eine Datenbank, die das komplette *N. caninum*-Genom, sowie bereits beschriebene und hypothetische Proteine beinhaltet. In dieser Datenbank ist ein putatives NcGRA9 als DNA- beziehungsweise RNA-Sequenz hinterlegt. Es zeigte sich, dass die *Ncgra9*-kodierende Sequenz auf Chromosom XII von *N. caninum* im Bereich von 5079007 bis 5080703 liegt und ein Intron enthält, was durch einen Abgleich der genomischen DNA-Sequenz gegen die cDNA-Sequenz deutlich wurde (Abbildung 4.1).

Die genomische *Ncgra9*-Sequenz wird von 1697 Basenpaaren kodiert und das Intron erstreckt sich von Base 411 bis Base 1150. Die Basen 411 und 412 bilden den Spleißdonor GT und Basen 1149 und 1150 sind ein typischer Spleißakzeptor mit der Sequenz AG.

Um das Intron, das in der Sequenz laut *in silico*-Analyse enthalten ist, experimentell zu verifizieren, wurde eine Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) mit zwei verschiedenen Oligonukleotidpaaren und mit genomischer DNA sowie cDNA durchgeführt. Das eine Oligonukleotidpaar wurde so gewählt, dass die gesamte genomische Sequenz von *Ncgra9* abgedeckt wurde und das zweite Oligonukleotidpaar war für die Amplifikation des Bereichs zuständig, der das Intron direkt flankiert (Abbildung 4.2). Für die genomische DNA wurden 1697 beziehungsweise 1019 Basenpaare als theoretische Größen der zu amplifizierenden Fragmente berechnet. Die PCR auf cDNA-Basis sollte Amplifikate von 957 und 280 Basenpaaren hervorbringen. Die Analyse der PCR (Abbildung 4.3) bewies, dass die genomische *Ncgra9*-DNA das erwartete Intron enthält, da alle erhaltenen Produkte den theoretisch berechneten Basenanzahlen in etwa entsprachen.

gen. DNA NcGRA9	1	atgatgaggtcattcaagtccattcttgtacccctgtcggcggttgtcgcaacggccgaactcgggtttctacctaattc
cDNA NcGRA9	1	atgatgaggtcattcaagtccattcttgtacccctgtcggcggttgtcgcaacggccgaactcgggtttctacctaattc
gen. DNA NcGRA9	81	tcatgtttacgtcgtgggtgccgagacaaaacgacgtggcactcagtcctccggaagacgtgcaggagaacccggaggggac
cDNA NcGRA9	81	tcatgtttacgtcgtgggtgccgagacaaaacgacgtggcactcagtcctccggaagacgtgcaggagaacccggaggggac
gen. DNA NcGRA9	161	acagcgagagctcgcaagaagttgacgtcttcggggagggatggaacaagtttgagggtcgggggttcggagaattccca
cDNA NcGRA9	161	acagcgagagctcgcaagaagttgacgtcttcggggagggatggaacaagtttgagggtcgggggttcggagaattccca
gen. DNA NcGRA9	241	agcgttgacttccgacacctgtatgcacaagttcaggagatgatgcggcgcttttcgggtctaggcgtggagccttttgg
cDNA NcGRA9	241	agcgttgacttccgacacctgtatgcacaagttcaggagatgatgcggcgcttttcgggtctaggcgtggagccttttgg
gen. DNA NcGRA9	321	cgggccttttttcggggagtctcccgttctcccgccttccccggctgagaattgcaaaccccaaacctcgctcaagc
cDNA NcGRA9	321	cgggccttttttcggggagtctcccgttctcccgccttccccggctgagaattgcaaaccccaaacctcgctcaagc
gen. DNA NcGRA9	401	gagttggcgcgtaagaaacggagagacgagggcgtgaaaaaaaaatgtcgacactttcccatacacaggccttccatccg
cDNA NcGRA9	401	gagttggcgc-----
gen. DNA NcGRA9	481	tgtccactcagttaccgtgtcgtcttgggcagaaaaaccgagtacagattccgtaaagcacacaacaacgaaatggatg
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	561	ctctgttgaagagacaactgtggcacagtaccccccccaggggactcgtgggtagagaatgtcctttgtcgtgaaaca
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	641	gtcacogtttcgaacggatgggttacttttgccttctcacggcaagttccgtttctcgagacgctgcgcttccagtgcaa
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	721	gaaacggtagcaggaaccagtcagagccaggtgtggagatctgtttctaggcagtcgggcgcttcggagcctcctt
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	801	ctggtttccgctgtagtgtagctccacaaggcctcttctcacatggagaagacagcttccatgtggcacgaaaggcgt
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	881	cctcccaggctgaaaaacgtgtttccctctgagctaaaaaccatgtacggtcgcctgcttcaacgagaagtcaactgct
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	961	tgacagatacacgtgtttcctttctttgacgcgctgctgtgtcccgctgcgtctgaaacagtcaatttgcttttcggcg
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	1041	acggtcgggttgtgcacagttgttgcgtctgtgcaacgctcaggtcggctgtagtttaattccatttcttctttgggtg
cDNA NcGRA9		-----
gen. DNA NcGRA9	1121	tgttctggatgtgcgtgtccattacgtcaggtgcccgttacgtcatttctctggatgcaggcgtgacggcgaacaacgtgc
cDNA NcGRA9	411	-----gtgcccgttacgtcatttctctggatgcaggcgtgacggcgaacaacgtgc
gen. DNA NcGRA9	1201	gcgtgggtgtgcaacttgcagagtcgtcaggttgaggttcagtatcgcgcgcatgcactcggccatgatgagaagaccgagcac
cDNA NcGRA9	461	gcgtgggtgtgcaacttgcagagtcgtcaggttgaggttcagtatcgcgcgcatgcactcggccatgatgagaagaccgagcac
gen. DNA NcGRA9	1281	ggggagagtcacagcagtcgagagagcagtcctctcagtcctgtctgtggaccctcagtgcatatgaccgcgaggt
cDNA NcGRA9	541	ggggagagtcacagcagtcgagagagcagtcctctcagtcctgtctgtggaccctcagtgcatatgaccgcgaggt
gen. DNA NcGRA9	1361	tgtcgcacagaaaactagctgggtggcggaacaacggagagagtgtagccaggctctccgaaaaagctgctcattacat
cDNA NcGRA9	621	tgtcgcacagaaaactagctgggtggcggaacaacggagagagtgtagccaggctctccgaaaaagctgctcattacat
gen. DNA NcGRA9	1441	tcccttctcccgaacacatcaaccagctgatcaaggaaggcagcttccagagggggctctggaaaaagtcaagggggga
cDNA NcGRA9	701	tcccttctcccgaacacatcaaccagctgatcaaggaaggcagcttccagagggggctctggaaaaagtcaagggggga
gen. DNA NcGRA9	1521	gatttttcggatttcacaccgacacagatgtgtctgctttccggcagaactcctcagcagtggtgcgtggcggaggggcca
cDNA NcGRA9	781	gatttttcggatttcacaccgacacagatgtgtctgctttccggcagaactcctcagcagtggtgcgtggcggaggggcca
gen. DNA NcGRA9	1601	gcaagtcgagctcgaggaacgcctcttccctcgagcccagcactcccgatagtgtagccttccctcgtttctcgaacc
cDNA NcGRA9	861	gcaagtcgagctcgaggaacgcctcttccctcgagcccagcactcccgatagtgtagccttccctcgtttctcgaacc
gen. DNA NcGRA9	1681	ataacggagaaatataa
cDNA NcGRA9	941	ataacggagaaatataa

Abbildung 4.1 Abgleich der genomischen DNA-Sequenz gegen die cDNA-Sequenz von *Ncgra9*. Die genomische Sequenz besteht aus 1697 Basenpaaren und enthält ein Intron. Die cDNA-Sequenz besteht aus 957 Basenpaaren.

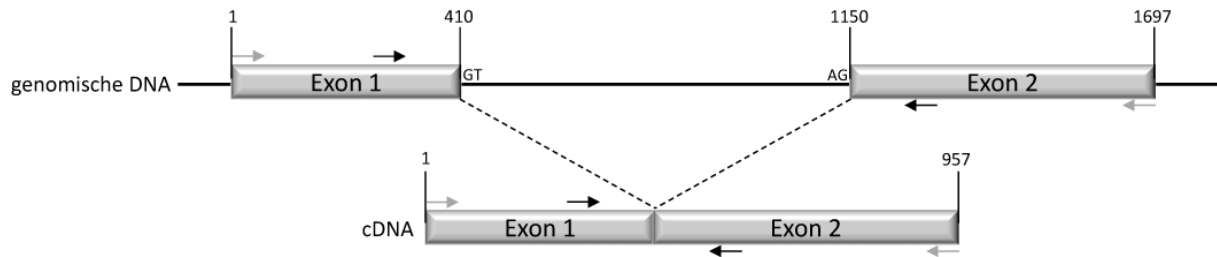


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der genomischen Sequenz und der cDNA-Sequenz von *Ncgra9*. Im oberen Bereich des Schemas ist die genomische DNA dargestellt mit Exon 1 und 2, die das Intron umspannen. Außerdem sind Spleißakzeptor (AG) und Spleißdonor (GT) eingezeichnet. Die Pfeile markieren die Stellen, an denen sich die Oligonukleotide während der PCR anlagern (hellgraue Pfeile: Primerpaar 1-1697: gesamte *Ncgra9*-Sequenz; schwarze Pfeile: Primerpaar 271-1290: Intron flankierender Bereich). Im unteren Bereich ist die cDNA-Struktur dargestellt, die aus den beiden Exons zusammengesetzt ist und es sind ebenfalls die Positionen mit Pfeilen markiert, an denen sich die Oligonukleotide während der PCR anlagern.

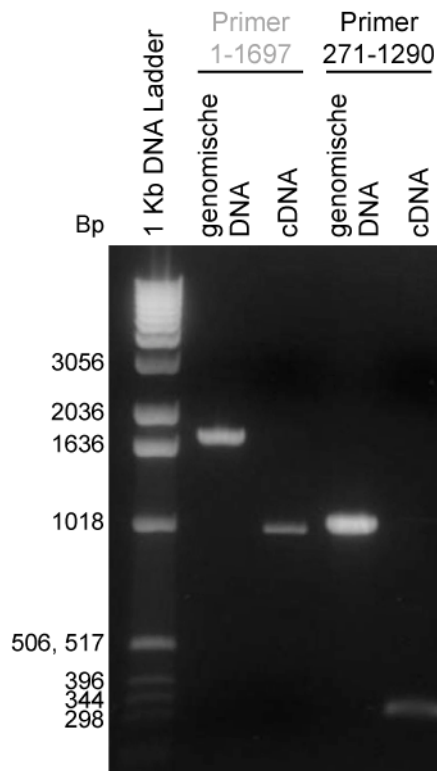


Abbildung 4.3 Analyse der Exon-Intron-Struktur von *Ncgra9* mittels Polymerasekettenreaktion. Um das Vorhandensein eines Introns in der genomischen DNA von *Ncgra9* zu bestätigen, wurde eine PCR mit zwei verschiedenen Oligonukleotidpaaren mit genomischer DNA und cDNA von *N. caninum* durchgeführt. Die Analyse der amplifizierten Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Größen aller erhaltenen Amplifikate entsprachen in etwa den theoretisch erwarteten Basenzahlen.

Im Folgenden wurde mittels Southern Blot-Analysen untersucht, ob *Ncgra9* mit einer oder mehreren Genkopien im haploiden Genom der *N. caninum*-Tachyzoiten vorliegt. Dazu wurde die genomische DNA aus *N. caninum* isoliert, mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut und die entstandenen DNA-Fragmente mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die *Ncgra9*-Sequenz wurde mit Hilfe einer spezifischen Sonde detektiert. Abbildung 4.4 zeigt ein Schema, welches die genomische DNA mit der Lage der Exons, der spezifischen Sonde und der Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen darstellt. Für die Konstruktion der Sonde wurde der Basenpaarbereich von 1274 bis 1676 gewählt. Mit 403 Basenpaaren ist die Sonde groß genug, um eine sehr hohe Spezifität aufzuweisen.

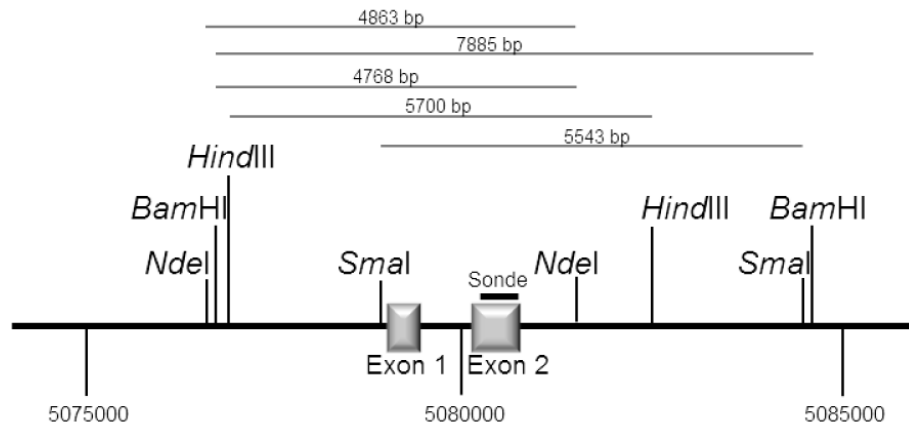


Abbildung 4.4 Schema der Position von *Ncgra9* auf Chromosom XII mit den flankierenden Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen. Das Schema zeigt die Lage von Exon 1, Exon 2 und den Bereich, den die spezifische Sonde erkennt. Außerdem sind die Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen aufgeführt, die für die Southern Blot-Analyse verwendet wurden. Im oberen Bereich sind die erwarteten Größen der Fragmente nach den verschiedenen Restriktionsendonukleasen-Verdauen aufgeführt.

Die Analyse des Southern Blots zeigte, dass nach jedem Restriktionsendonuklease-Verdau nur eine Bande mit der erwarteten Größe durch die spezifische Sonde detektiert wurde (Abbildung 4.5), was darauf schließen lässt, dass *Ncgra9* als singuläres Gen im haploiden *N. caninum* Tachyzoiten-Genom vorliegt.

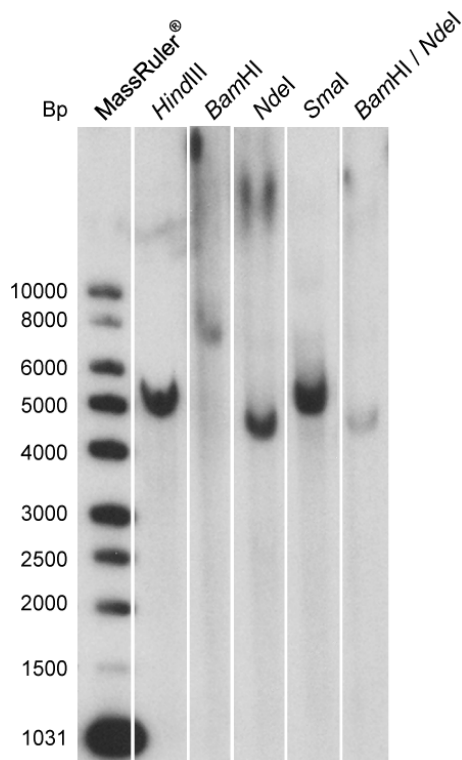


Abbildung 4.5 Southern Blot-Analyse des DNA-Verdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde MassRuler® als Standard eingesetzt und die Fragmentgrößen des Markers sind links neben dem Bild aufgeführt. Die verwendeten Enzyme sind im oberen Bereich genannt. In jeder Spur ist nur eine spezifische Bande zu erkennen, was darauf hindeutet, dass *Ncgra9* als singuläre Kopie im *N. caninum* Tachyzoiten-Genom vorliegt.

Zusammenfassend belegen die dargestellten Analysen des *Ncgra9*-Gens viele Gemeinsamkeiten mit dem bekannten *Tggra9*-Gen. So bestehen beide Gene aus zwei Exons und liegen als singuläres Gen im Parasitengenom vor (Nockemann et al., 1998).

4.1.2. Analyse der Proteinstruktur von NcGRA9

Laut *in silico* Analysen kodiert der offene Leserahmen des *Ncgra9*-Gens für ein Protein, das aus 318 Aminosäuren besteht. Die theoretische molekulare Masse des Proteins beträgt 34,9 kDa. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von NcGRA9 mit der Sequenz von TgGRA9 wurde deutlich, dass die beiden Proteine eine Sequenzidentität von 60 % aufweisen (Abbildung 4.6).

```

NcGRA9/1-318  1  MMRSFKSILVPLS- AVVATAELG- FLPNSHVYVVG- AETNDVALSLPED- VQENPEGHSESSQEV61
TgGRA9/1-318  1  -MRSLKSIIVVPLSAALVAAAEFLDLGEGSVYLFQKASESDVALKVPEDPVPEEP- -RREPEKHV62

NcGRA9/1-318  62  DVFGEGWKNKFEGPGFGEFPSVDFRHLYAQVQEMMRAFSGLGVEPFGRPFPGESPGSPAFPRRLIA126
TgGRA9/1-318  63  DLFGEDWKQFGGSGFGDFSKVEFENLFSQVHEMMRRLMGRGVDFGSPSLLGDSFG- FHFPRRLRAL126

NcGRA9/1-318  127  KPKTS LKRVGACRYV I SWMQGVTANNVRVVLH LQSRQVEVQYRAC TRHDEKTEHGESHSESREQS 191
TgGRA9/1-318  127  QPKTKLEKTGTCCQYVVTWAPEVTAENVRV I LHLQRRQVEVQYRAATRDEKTEGGESHSM SKEQS 191

NcGRA9/1-318  192  SQSVSVDPE C IMTREVVAQKLAGWADNGESVPPGSPKKLL I TFPSP EHI NQL I KEGHVPEGALEK256
TgGRA9/1-318  192  SQLMSVDPOC IMTREVVAQKLAGWTDNTH TATAGTPKKLL I SFSPDHI KEMVKEGYLPD NALER256

NcGRA9/1-318  257  VKGGDFSDFTPTQMCLLSGRTPHECALAEGQQVELEETPLPSSPSTPDSVDLPRFSNHNGEI 318
TgGRA9/1-318  257  VLAGDFEGFSRTQMCLVSGRNRTCAF AEGQVELEEKPLPSDSSPVTSELPRLSQEDRGL 318

```

Abbildung 4.6 Sequenzvergleich des Proteins NcGRA9 mit dem Protein TgGRA9. Die Aminosäuresequenz der beiden Proteine wurde gegeneinander gelegt und es zeigte sich, dass die Proteine eine Identität von 60 % aufweisen. Die grauen Boxen markieren die identischen Aminosäuren.

Die Proteinsequenz von NcGRA9 wurde *in silico* nach strukturellen und funktionellen Domänen abgesucht. Mit dem Sequenzanalyseprogramm Lasergene wurden potentielle alpha-helikale Bereiche nach Chou und Fasman bestimmt (Chou und Fasman, 1978). Außerdem zeigt die Analyse des hydrophilen und hydrophoben Profils nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982), dass NcGRA9 ein überwiegend hydrophiles Protein ist. In Abbildung 4.7 ist ein Schema mit den alpha-helikalen Bereichen und dem hydrophilen Profil dargestellt. Außerdem sind strukturelle und funktionelle Domänen gezeigt, die für die NcGRA9-Proteinsequenz vorhergesagt wurden. Im Einzelnen: Am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid (Aminosäuren 1 bis 21), das mittels Signal-P-Analyse bestimmt wurde und für das Targeting des Proteins zuständig ist. Im weiteren Verlauf bildet die Proteinsequenz eine amphipathische Alpha-helix von Aminosäure 82 bis 101 aus. Im hinteren Bereich der Sequenz können die Aminosäuren 202 bis 215 eine hydrophobe Alpha-helix ausprägen und am C-terminalen Ende (Aminosäuren 279 bis 310) ist eine PEST-Domäne lokalisiert (Programm PEST-find), die durch eine Anhäufung der sauren Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) charakterisiert ist.

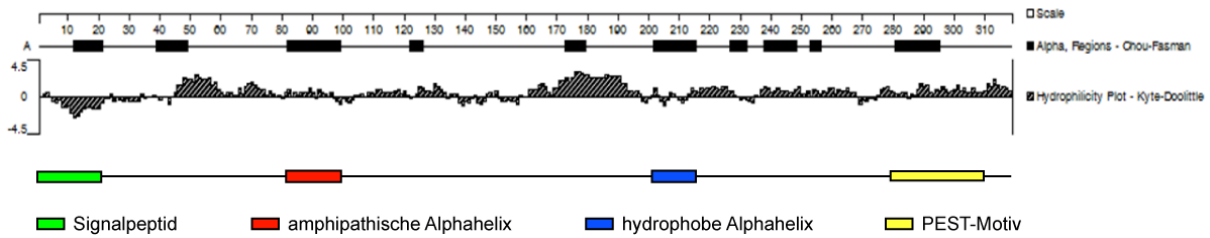


Abbildung 4.7 Schematische Darstellung der Alpha-Helices und des hydrophilen Profils von NcGRA9. Mit Hilfe des Lasergene-Sequenzanalyseprogramms wurden die potentiellen alpha-helikalen Bereiche von NcGRA9 nach der Methode von Chou und Fasman berechnet. Außerdem ist das hydrophile Profil des Proteins nach Kyte und Doolittle angegeben. Im unteren Bereich der Abbildung sind charakteristische strukturelle und funktionelle Domänen, die für die Proteinsequenz vorhergesagt wurden, zusammengefasst.

Mit dem Sequenzanalyseprogramm Lasergene wurde der Bereich von Aminosäure 82 bis 101 detaillierter analysiert und die mutmaßliche Alpha-Helix wurde als „Helical Wheel“ dargestellt (Abbildung 4.8). Es wurde deutlich, dass die eine Seite der Alpha-Helix hauptsächlich aus hydrophoben und die andere Hälfte vermehrt aus hydrophilen Aminosäuren besteht, wodurch der amphipathische Charakter der Alpha-Helix entsteht.

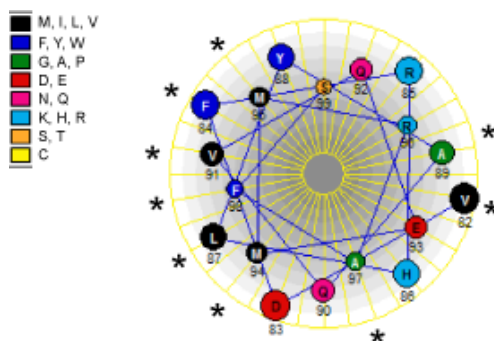


Abbildung 4.8 Darstellung der Alpha-Helix, die von den Aminosäuren 82 bis 101 gebildet wird, als „Helical Wheel“. Diese Darstellung hebt den amphipathischen Charakter dieser Alpha-Helix hervor. Die hydrophoben Aminosäuren sind durch Sterne markiert. Die Legende erklärt den Farbcodierungsschlüssel der Aminosäuren.

Wie in Abbildung 4.6 dargestellt ist, weisen die Proteinsequenzen von NcGRA9 und TgGRA9 eine Sequenzidentität von 60 % auf. Die zusätzlichen *in silico*-Analysen, basierend auf der Proteinsequenz von NcGRA9 zeigten, dass die beiden Proteine weitere Gemeinsamkeiten haben: Beide Proteine haben ein N-terminales Signalpeptid, das für ihre Sekretion verantwortlich ist. Des Weiteren zeigen beide Proteine einen überwiegend hydrophilen Charakter und es wurden ähnliche alpha-helikale Bereiche vorhergesagt. NcGRA9 sowie TgGRA9 enthalten in ihrer Proteinsequenz außerdem eine PEST-Domäne im Bereich des C-terminalen Endes.

4.2. Expression von rekombinantem NcGRA9 in *Escherichia coli* und Herstellung von polyklonalen Antiseren

Für die weitere Analyse von NcGRA9 ist es wichtig, einen spezifischen Antikörper gegen NcGRA9 zur Verfügung zu haben. Dafür wurde das Protein rekombinant hergestellt. In dieser Arbeit wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) als Expressionsorganismus gewählt, um das

NcGRA9-Protein biotechnologisch herzustellen. Die cDNA-Sequenz von NcGRA9 wurde in das Expressionsplasmid pET-22b(+) (Novagen) mit den Schnittstellen *Nde*I und *Hind*III kloniert und das Plasmid wurde in den *E. coli*-Laborstamm BL-21 transformiert. Die Überexpression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. IPTG fungiert als Induktor des *lac*-Operons, indem es an den Lac Repressor bindet. Diese Bindung führt dazu, dass der Lac Repressor nicht mehr mit den *lac* Operatoren interagieren kann. Das Gen des zu exprimierenden Proteins befindet sich auf dem Plasmid unter der Kontrolle eines Lac Repressor regulierten Promotors. So kann die Expression des rekombinanten Proteins gezielt induziert werden (Berg et al., 2003). Die Expression von NcGRA9 wurde durch IPTG-Zugabe induziert und nach 2 h wurde das rekombinante Protein unter denaturierenden Bedingungen und unter Zuhilfenahme des His-Tags aufgereinigt. Anschließend wurden die Eluate der Aufreinigung auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Coomassie-Färbung wurden die aufgereinigten Proteine sichtbar gemacht. In Abbildung 4.9 ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel gezeigt, auf dem ein Eluat der denaturierenden Aufreinigung aufgetrennt wurde. Eine starke Proteinbande ist auf der Höhe von etwa 45 kDa (Bande 1) zu erkennen. Darunter, bei etwa 43 kDa (Bande 2) ist eine weitere, deutlich schwächere Bande zu erkennen, die gegebenenfalls ein Abbauprodukt des Proteins in Bande 1 darstellen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden beide Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse geschickt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

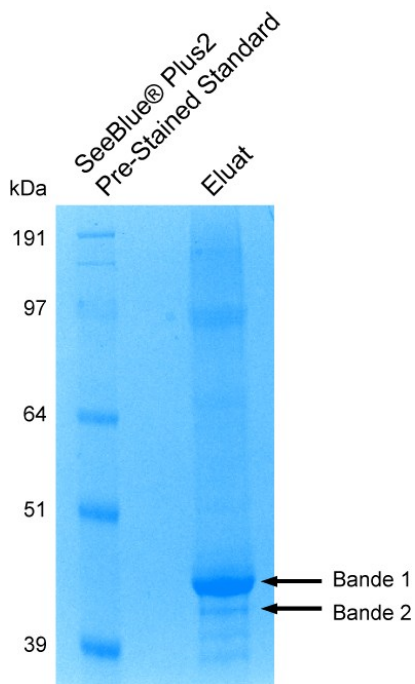


Abbildung 4.9 Coomassie-gefärbte SDS-PAGE, auf der ein Eluat der denaturierenden Proteinaufreinigung von NcGRA9 aufgetrennt wurde. In der linken Spur ist der SeeBlue® Plus2 Standard zu erkennen, durch welchen man auf die molekulare Masse der aufgetrennten Proteine schließen kann. In der rechten Spur wurde ein Eluat der denaturierenden Proteinaufreinigung von NcGRA9 aus *E. coli* aufgetrennt. Bande 1 ist eine starke Bande auf der Höhe von etwa 45 kDa, darunter mit etwa 43 kDa ist Bande 2 zu erkennen, die aber deutlich schwächer ist. Diese beiden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur massenspektroskopischen Analyse geschickt.

Durch die Massenspektrometrieanalyse wurde deutlich, dass in Bande 1 hauptsächlich NcGRA9 zu finden war (Tabelle 4.1). Außerdem konnten Bestandteile von vier weiteren Proteinen nachgewiesen werden, die jedoch von *E. coli* stammten.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektrometrieanalyse von Bande 1. In der Tabelle sind die durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine nach ihrer Abundanz aufgelistet. NcGRA9 mit der Accession-Nummer F0VR90 macht den größten Anteil in der untersuchten Bande 1 aus. Es wurden vier weitere Proteine identifiziert, die aus *E. coli* stammen, welches der Organismus ist, aus dem das rekombinante NcGRA9 aufgereinigt wurde.

Accession Nummer	Beschreibung
F0VR90	NCLIV_066630
EG11037	tufB EF-Tu, Elongation Factor-Translation, nicht stabil
EG10282	fbaA Fructose 1,6-bisphosphat Aldolase, Klasse II
EG10220	deoB Phosphopentomutase
EG12677	isc5 Cystein Desulfurase PLP-abhängig

In Bande 2 wurden Bestandteile von insgesamt 20 verschiedenen Proteinen identifiziert, die in Tabelle 4.2 aufgelistet sind. NcGRA9 war das Protein, das als zweithäufigstes gefunden wurde. Die anderen identifizierten Proteine stammten alle aus *E. coli*.

Tabelle 4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektrometrieanalyse von Bande 2. In der Tabelle sind die durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus Bande 2 nach ihrer Abundanz sortiert. NcGRA9 wurde als das zweithäufigste Protein in dieser Bande identifiziert. Am häufigsten war fbaA Fructose 1,6-Bisphosphat Aldolase aus dem Expressionorganismus *E. coli* nachweisbar. Außerdem wurden 18 weitere Proteine, die aus *E. coli* stammten, in dieser Probe identifiziert.

Accession Nummer	Beschreibung
EG10282	fbaA Fructose 1,6-Bisphosphat Aldolase, Klasse II
F0VR90	NCLIV_066630
EG11442	gcv T Aminomethyltransferase, Tetrahydrofolat-abhängig
EG12944	yhhX Putative Oxidoreductase, exprimiertes Protein
EG10367	gapA Glyceraldehyd 3-P Dehydrogenase A
EG10703	pgk Phosphoglycerat Kinase
EG14089	arnB UDP-4-Amino-4-Deoxy-L-Arabinose Synthase
EG10543	lpd Lipoamid Dehydrogenase, NADH-abhängig
EG10981	sucC Succinyl CoA Synthase beta-Untereinheit
EG11036	tuf A EF-Tu, Elongation Faktor-Translation, nicht stabil
EG10066	argD Acetylornithin Aminotransferase
EG10768	proB Glutamat 5-Kinase, Prolin Biosynthese
EG10870	rplI 50S ribosomale Untereinheit Protein L9
EG11663	slyD FKBP-Typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase
EG10893	rpoA RNA Polymerase, alpha-Untereinheit
EG10402	gltA Citrat Synthase
EG10445	hisB Imidazol Glycerolphosphat Dehydratase/Histidinol Phosphatase
EG12669	solA N-Methyltryptophan Oxidase, FAD-enthalten
EG10408	gly A Serin Hydroxymethyltransferase
EG13546	nemA N-Ethylmaleimid Reductase

Für die Antiserumherstellung wurde die entsprechende Bande 1 aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Für die Gewinnung des polyklonalen Antiserums gegen NcGRA9 wurden die Kaninchen viermal mit jeweils circa 100 µg NcGRA9 immunisiert. Die zweite Immunisierung erfolgte 2 Wochen, die dritte 4 Wochen und die letzte Immunisierung 8 Wochen nach der Erstimpfung. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Serumproben zur Analyse entnommen. Das Präimmunserum (S1 d0) zeigt den Antikörperstatus der Kaninchen vor der Immunisierung. Außerdem wurden Seren Tag 38 (S2 d38) und Tag 66 (S3 d66) nach der ersten Immunisierung entnommen. Nach 87 Tagen wurde final das Blut der Kaninchen entnommen und als S4 d87 versendet. Die vier verschiedenen Seren wurden mittels Western Blot-Analyse auf ihre Reaktivität gegen NcGRA9 in *Neospora*-Lysatantigen (NLA) getestet. Als Kontrolle wurde die Reaktivität gegen *Toxoplasma*-Lysatantigen (TLA) und Lysat von humanen Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) bestimmt. Das HFF-Lysat wurde als Kontrolle verwendet, da beide Parasiten als obligat intrazelluläre Erreger in HFF Zellen vermehrt wurden. Abbildung 4.10 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse. Die Proben von den beiden Kaninchen sind mit den Nummern 1189 beziehungsweise 1190 gekennzeichnet. Die Präimmunseren zeigten bei einer Verdünnung von 1:1000 eine geringe Reaktivität gegen Proteine in NLA und TLA, die jedoch nicht spezifisch gegen NcGRA9 gerichtet war. Das Serum 1189 zeigte 38 Tage nach der ersten Immunisierung Reaktivität gegen ein NLA-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 39 kDa. S2 1190 reagierte ebenfalls mit einem NLA-Protein mit einer molekularen Masse von etwa 39 kDa und zusätzlich mit einem TLA-Protein bei etwa 40 kDa. Gegen Proteine des HFF-Lysats wurde keine Reaktivität beobachtet. 66 Tage nach der ersten Immunisierung war mit beiden Antiseren (S3) sowohl in NLA als auch in TLA eine spezifische Reaktivität gegen Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 39 kDa zu detektieren. Im HFF-Lysat war erneut keine Reaktivität nachweisbar. Nach Abschluss der Immunisierung nach 87 Tagen zeigten beide Antiseren eine deutliche Reaktivität gegen ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 39 kDa. Auch im TLA war eine deutlich Kreuzreaktivität der Antiseren gegen ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa erkennbar.

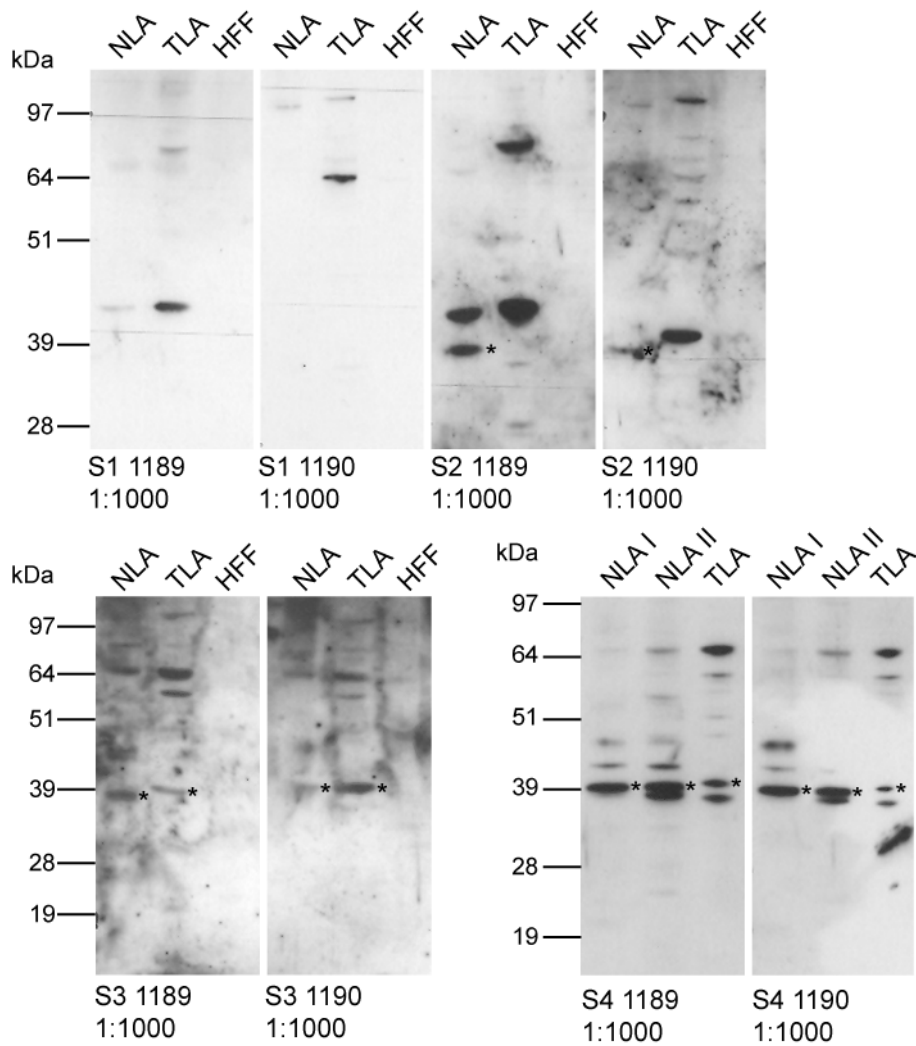


Abbildung 4.10 Austestung der Antiseren gegen das rekombinante NcGRA9 mittels Western Blot-Analyse. Es wurden die vier erhaltenen Seren in einer Verdünnung von 1:1000 auf ihre Reaktivität gegen NcGRA9 im Western Blot getestet. Neben *Neospora*-Lysatantigen (NLA) wurden *Toxoplasma*-Lysatantigen (TLA) und Lysat humaner Vorhautfibroblasten (HFF) untersucht. Die Seren beider Kaninchen zeigten ein ähnliches Bandenmuster. Beide Antiseren zeigten eine spezifische Reaktivität gegen Proteine von etwa 39/40 kDa. * markiert die erwarteten Banden.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den beiden detektierten Proteinen tatsächlich um NcGRA9 und TgGRA9 handelt, wurden zusätzliche Western Blot-Analysen mit rekombinanten GRA9 von *T. gondii* und *N. caninum* durchgeführt. Abbildung 4.11 belegt, dass die produzierten Antiseren tatsächlich mit NcGRA9 reagieren und dass beide Seren eine starke Kreuzreaktivität gegen TgGRA9 aufweisen.

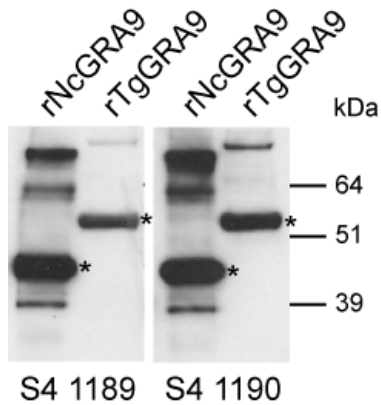


Abbildung 4.11 Die Antiseren gegen rekombinantes NcGRA9 erkennen die rekombinanten Proteine NcGRA9 und TgGRA9. Es konnte mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen werden, dass die beiden produzierten Antiseren gegen NcGRA9 spezifisch mit rekombinantes NcGRA9 und TgGRA9 reagieren. Dazu wurden etwa 5 μ g der rekombinanten Proteine aufgetrennt. Rekombinantes NcGRA9 hat ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa, rekombinantes TgGRA9 ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa (zusätzliches S•Tag). * markiert die erwarteten Banden.

Die gezeigten Daten belegen, dass nach Immunisierung mit rekombinantes NcGRA9 zwei polyklonale Kaninchenserum gewonnen wurden, die rekombinantes, aber auch natives NcGRA9 erkennen. Diese Seren wurden im Folgenden verwendet, um NcGRA9 in Immunfluoreszenz- und in Western Blot-Analysen zu detektieren.

4.3. Lokalisierung von NcGRA9 in *Neospora caninum*

Für die Beschreibung des Proteins NcGRA9 ist es wichtig zu analysieren, in welchem Kompartiment des Parasiten sich das Protein befindet. Dazu wurden Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Die Lokalisation von NcGRA9 wurde zunächst in Parasiten bestimmt, die extrazellulär vorlagen, das heißt die Wirtszelle verlassen hatten. Außerdem wurden *N. caninum* infizierte Wirtszellen analysiert, in welchen die Parasiten, von einer parasitophoren Vakuolen (PV) umschlossen, im Wirtszellzytoplasma vorliegen.

Bei der Untersuchung der extrazellulären *N. caninum*-Tachyzoiten wurde deutlich, dass NcGRA9 innerhalb der Zelle in einem punktierten Muster zu finden war (Abbildung 4.12). Dieses Muster war über den gesamten Parasiten verteilt. Dieses Verteilungsmuster lässt darauf schließen, dass sich NcGRA9 in den dichte Granula von *N. caninum* befindet. Die dichte Granula sind ein Typ der sekretorischen Organellen von *N. caninum* und beinhalten die dichte Granula-Proteine. Diese werden, nachdem der Parasit in die Wirtszelle eingedrungen ist, in die PV sekretiert.

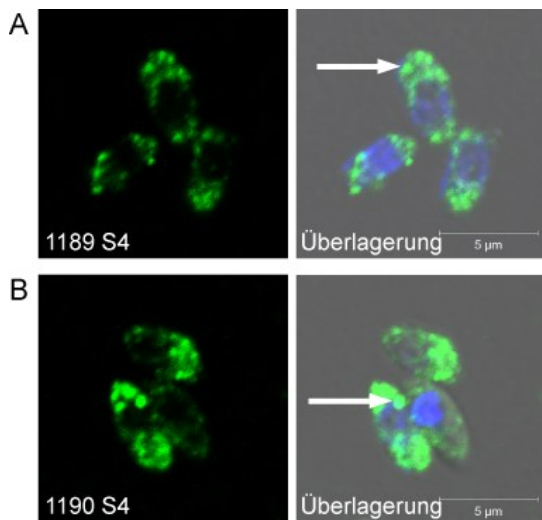


Abbildung 4.12 Lokalisationsstudie von NcGRA9 in extrazellulären *N. caninum* mittels Immunfluoreszenzanalyse. Extrazelluläre *N. caninum* wurden isoliert und nach Fixierung und Permeabilisierung mit den beiden polyklonalen Antisera (A: 1189; B: 1190) gegen NcGRA9 markiert. Die Detektion des Signals erfolgte über einen fluorochrommarkierten Sekundäranantikörper (grün) mittels Konfokalmikroskopie. NcGRA9 ist in einem punktförmigen Muster zu erkennen (Pfeile), das über den gesamten Parasiten verteilt ist. Diese Verteilung lässt darauf schließen, dass NcGRA9 in den dichten Granula lokalisiert ist. Der Maßstabsbalken steht für 5 µm. DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau).

Des Weiteren wurde die Lokalisation von NcGRA9 in *N. caninum* infizierten Wirtszellen untersucht. Dabei wurde deutlich, dass das Protein hauptsächlich außerhalb der Parasiten, und zwar innerhalb der parasitophoren Vakuole, zu detektieren war (Abbildung 4.13), was auf eine Sekretion von NcGRA9 durch den Parasiten schließen lässt. NcGRA9 war besonders deutlich in der Nähe der intrazellulären Parasiten und im Bereich der Membran der PV (PVM) nachweisbar.

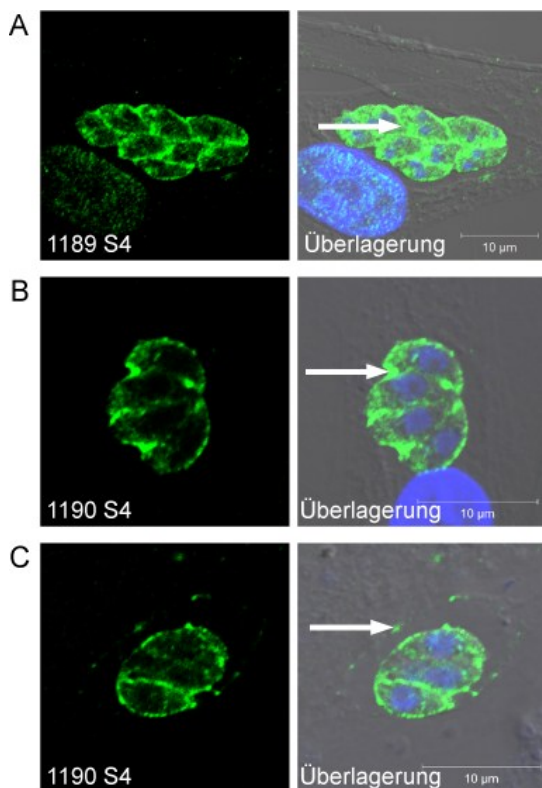


Abbildung 4.13 Analyse der Lokalisation von NcGRA9 nach Wirtszellinvasion des Parasiten mittels Immunfluoreszenztest. Beide Antisera gegen NcGRA9 (grün) detektieren ein Protein, das hauptsächlich außerhalb der Parasiten zu finden ist (A, B). Dabei lokalisiert NcGRA9 in der Nähe der Parasiten und im Bereich der PVM (C). DNA ist in blau (DAPI) dargestellt. Der Maßstabsbalken steht für 10 µm.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse darauf hin, dass NcGRA9 zu den dichten Granula-Proteinen von *N. caninum* gezählt werden kann. NcGRA9 ist,

wie für andere dichte Granula-Proteine beschrieben, in extrazellulären Tachyzoiten in einem punktförmigen Muster und nach Invasion in die Wirtszelle innerhalb der PV lokalisiert.

Im Folgenden wurde die Lokalisation von NcGRA9 im direkten Vergleich zu anderen, bereits beschriebenen *N. caninum*-Proteinen mittels Immunfluoreszenzanalyse in extrazellulären *N. caninum*-Tachyzoiten untersucht (Abbildung 4.14). Es zeigte sich, dass NcGRA9 und NcGRA7, welches ein bekanntes dichte Granula-Protein von *N. caninum* ist (Lally et al., 1997), in den dichten Granula teilweise kolokalisieren. NcMIC1, welches ein typisches Mikronemen-Protein ist (Keller et al., 2002), war ausschließlich im apikalen Bereich der Tachyzoiten zu detektieren, wo die Mikronemen üblicherweise zu finden sind. Es zeigte sich keine Kolokalisation von NcGRA9 mit NcMIC1. Ebenso zeigte das Oberflächenprotein NcSAG1 (Sonda et al., 1998) keine Kolokalisation mit NcGRA9, da es nur auf der Oberfläche der Tachyzoiten zu finden war.

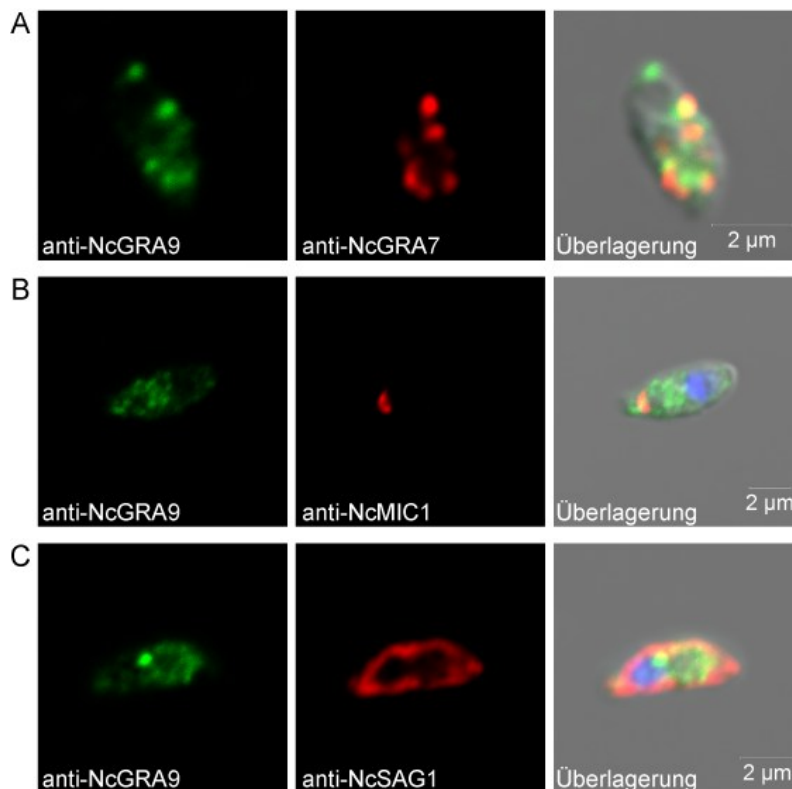


Abbildung 4.14 Immunfluoreszenzanalysen von NcGRA9 im Vergleich zu NcGRA7, NcMIC1 und NcSAG1 in extrazellulären *N. caninum*-Tachyzoiten. NcGRA9 (grün) wurde im Vergleich zu NcGRA7 (A, rot), NcMIC1 (B, rot) und NcSAG1 (C, rot) dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) anfärbt und die Maßstabsbalken stehen für 2 µm.

Außerdem wurde NcGRA9 im Vergleich zu den oben genannten Proteinen in *N. caninum* infizierten Wirtszellen untersucht (Abbildung 4.15). Bei der gleichzeitigen Detektion von NcGRA9 und NcGRA7 wurde deutlich, dass die Proteine teilweise kolokalisieren. NcGRA7 wird ebenfalls nach Wirtszellinvasion in die PV sekretiert und ist besonders in der Nähe der Parasiten und im Bereich der PVM lokalisiert. NcMIC1 wurde nach Wirtszellinvasion nur im

apikalen Bereich der Parasiten detektiert. Es wurde keine Kollokalisierung von NcGRA9 und NcMIC1 gefunden. NcSAG1 ist nur nach Wirtszellinvasion an der Oberfläche von *N. caninum* zu finden. Bei der Immunfluoreszenzanalyse erscheint es, als würde NcGRA9 teilweise mit NcSAG1 kollokalisieren, da NcGRA9 nach der Sekretion auch in der Nähe der Parasitenoberfläche detektiert wird. Eine Kollokalisierung in der Immunfluoreszenzanalyse deutet auf eine räumliche Nähe der Proteine hin, ist allerdings kein Beweis für eine direkte Interaktion der Proteine.

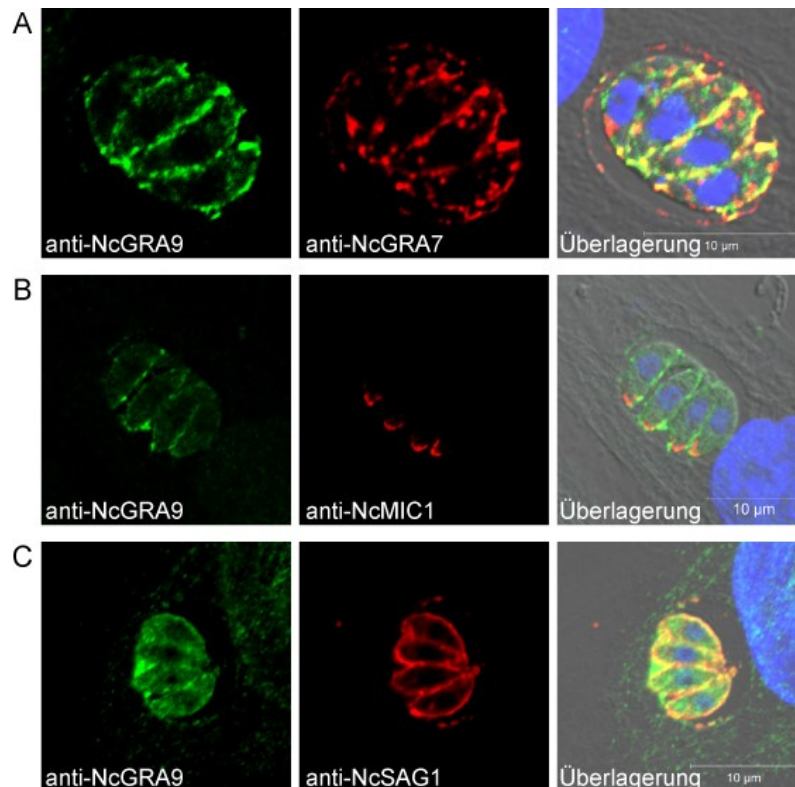


Abbildung 4.15 Immunfluoreszenzanalyse von NcGRA9 im Vergleich zu NcGRA7, NcMIC1 und NcSAG1. Für diese Analyse wurden mit *N. caninum* infizierte Wirtszellen eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern gegen NcGRA9 (grün) und NcGRA7 (A, rot), NcMIC1 (B, rot) und NcSAG1 (C, rot) inkubiert. Die Maßstabsbalken stehen für eine Einheit von 10 µm. Die DNA wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht.

Die Abbildungen 4.12, 4.13, 4.14 und 4.15 zeigen die Lokalisation von NcGRA9 in *N. caninum*-Tachyzoiten. Mit diesem Parasitenstadium, welches einfach *in vitro* kultiviert werden kann, wurden die meisten Analysen in dieser Arbeit durchgeführt. Wie in der Einleitung beschrieben, findet *in vivo* eine Stadienkonversion von schnell wachsenden Tachyzoiten zu langsam replizierenden Bradyzoiten statt. Diese Stadienkonversion kann man *in vitro* durch eine Behandlung mit Natriumnitroprussid (sodium nitroprusside, SNP) erzwingen. In Abbildung 4.16 ist die Detektion von NcGRA9 in SNP-induzierten Bradyzoiten mittels Immunfluoreszenzanalyse dargestellt. Als Bradyzoitenmarker wurde die BAG1-Expression analysiert. Dabei wurde ein anti-TgBAG1-Antiserum verwendet, da *T. gondii*-spezifische anti-BAG1-

Antikörper mit NcBAG1 kreuzreagieren. Abbildung 4.16 A zeigt, dass *N. caninum* nach SNP-Behandlung BAG1 exprimiert. Der Tachyzoitenmarker NcSAG1 hingegen ist in Bradyzoiten nur noch in reduzierter Menge nachweisbar. Als weitere Kontrolle wurde die Verteilung von NcGRA7 in Tachyzoiten und Bradyzoiten von *N. caninum* analysiert (Abbildung 4.16 B). Wie aus der Literatur bekannt, wurde auch in dieser Arbeit NcGRA7 nach SNP-Behandlung verstärkt im äußeren Bereich der Vakuole detektiert, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass die *in vitro*-Stadienkonversion erfolgreich war. Eine Analyse mit dem anti-NcGRA9 spezifischen Antiserum ergab, dass NcGRA9 nicht nur in Tachyzoiten sondern auch in Bradyzoiten exprimiert wird (Abbildung 4.16 C). Dabei weist NcGRA9 ein anderes Verteilungsmuster auf als NcGRA7, denn NcGRA9 ist nicht nur an der Zystenwand sondern auch im Innern der Parasitenzyste nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich zur Lokalisierung von NcGRA9 sagen, dass sich dieses Protein in Tachyzoiten und Bradyzoiten ähnlich verhält wie bereits bekannte dichte Granula-Proteine und sich deutlich von Mikronemen- und Oberflächenproteinen unterscheiden lässt.

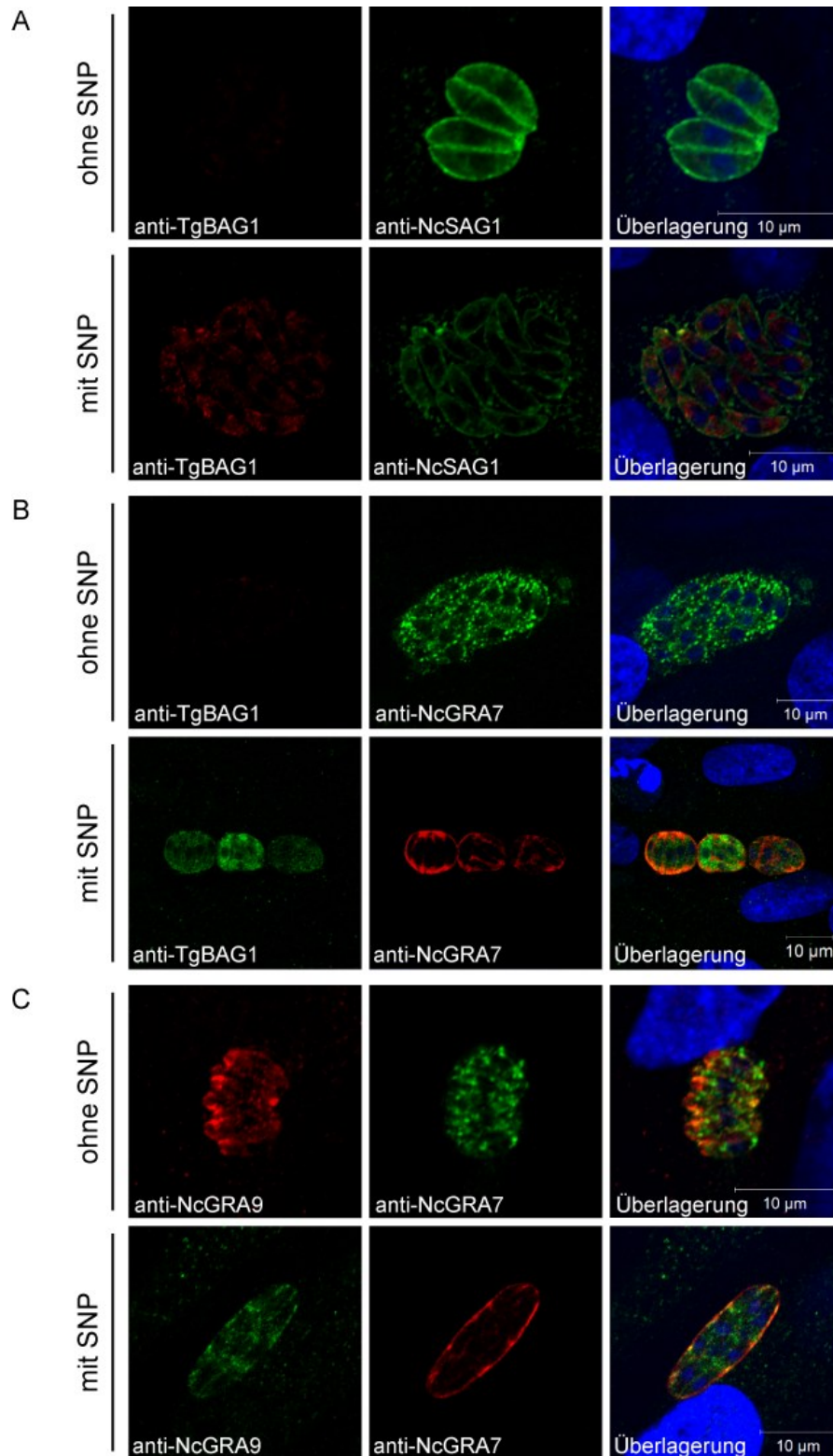


Abbildung 4.16 Auswertung der SNP-induzierten Stadienkonversion von Tachyzoiten in Bradyzoiten. Für die Stadienkonversion wurden *N. caninum* unter Zugabe von SNP für mehrere Tage kultiviert (mit SNP) und als Kontrolle wurde *N. caninum* parallel ohne SNP kultiviert. Es folgte eine Analyse der induzierten Bradyzoiten mittels Immunfluoreszenz. A belegt die erfolgreiche Stadienkonversion durch die Expression des bradyzoitenspezifischen Markers BAG1 (rot) im Vergleich zu SAG1 (grün). B zeigt die typische Verteilung von NcGRA7 in Tachyzoiten (grün) und Bradyzoiten (rot). C zeigt, dass NcGRA9 in Tachyzoiten (rot) und Bradyzoiten (grün) exprimiert wird und sich im Verteilungsmuster von NcGRA7 unterscheidet. In allen Analysen wurde DAPI (blau) zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Der Maßstabsbalken steht für 10 µm.

4.4. Immunologische Kreuzreaktivität von GRA9-spezifischen Antiseren

Bei der Analyse der Antiseren gegen rekombinantes NcGRA9 wurde deutlich, dass die beiden Antiseren nicht nur Reaktivität gegen rekombinantes und natives NcGRA9, sondern auch gegen ein Protein im TLA und rekombinantes TgGRA9 zeigten. Es wurde daher zusätzlich überprüft, ob das vorhandene, TgGRA9-spezifische Antiserum ebenfalls Kreuzreaktion mit NcGRA9 zeigt. Dies konnte mittels der in Abbildung 4.17 dargestellten Western Blot-Analyse bestätigt werden.

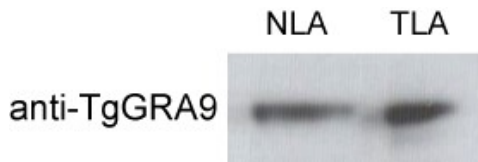


Abbildung 4.17 Bestätigung der Kreuzreaktivität des anti-TgGRA9-Antiserums gegen Lysatantigene von *T. gondii* und *N. caninum*. Lysat (20 µg Protein) von extrazellulären Tachyzoiten wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die homologen Proteine weisen beide ein Molekulargewicht von etwa 39/40 kDa auf.

Diese Kreuzreaktivität der Antiseren gegen NcGRA9 beziehungsweise TgGRA9 wurde auch bei Immunfluoreszenzanalysen gefunden (Abbildung 4.18). Anti-TgGRA9 konnte in *N. caninum* infizierten Wirtszellen ein Protein detektieren, welches wahrscheinlich das homologe NcGRA9 ist. Umgekehrt detektierte auch anti-NcGRA9 ein Protein in *T. gondii* infizierten Wirtszellen. Dabei könnte es sich um TgGRA9 handeln.

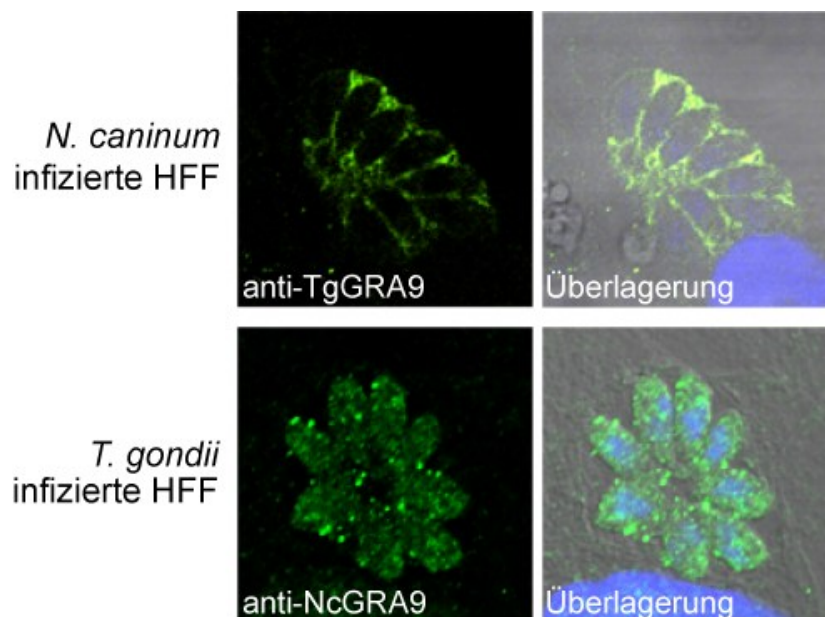


Abbildung 4.18 Darstellung der Kreuzreaktivität von anti-NcGRA9 beziehungsweise anti-TgGRA9 mittels Immunfluoreszenzanalyse. Das Antiserum gegen TgGRA9 war in der Lage, in *N. caninum* infizierten Wirtszellen ein Protein (grün) zu detektieren. Ebenso konnte das Antiserum gegen NcGRA9 ein Protein (grün) in *T. gondii* infizierten Wirtszellen erkennen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt.

In einem weiteren Schritt wurde analysiert, ob diese Kreuzreaktion zwischen den homologen Proteinen NcGRA9 und TgGRA9 auch bei der serologischen Diagnostik von Bedeutung sein könnte. TgGRA9 gilt als immundominantes Antigen und kann in ELISA-Systemen zur Diag-

nose einer Toxoplasmose verwendet werden. Um mögliche, auf GRA9 beruhende Kreuzreaktionen zu analysieren, wurden Seren von *N. caninum* infizierten Rindern in Western Blot-Analysen mit rekombinanten NcGRA9 beziehungsweise TgGRA9 als Antigen verwendet. Drei Beispiele sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Serum 1 zeigte keine Reaktion gegen rekombinantes NcGRA9 oder TgGRA9, wohingegen Serum 2 NcGRA9 detektierte. Mit Serum 3 konnte eine Reaktion gegen rekombinantes NcGRA9 und TgGRA9 gezeigt werden.

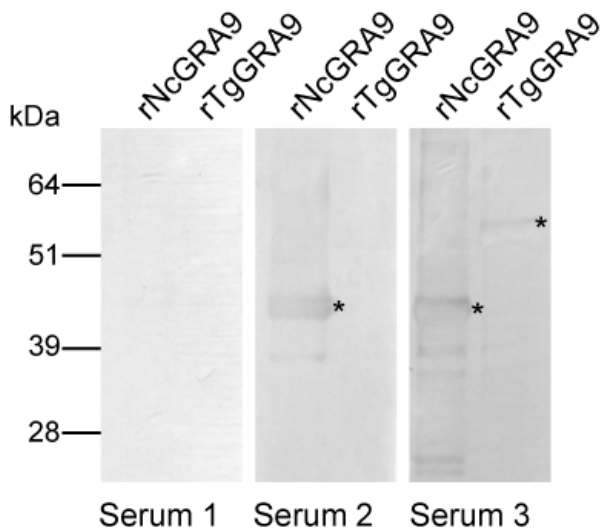


Abbildung 4.19 Seren von *N. caninum* infizierten Rindern wurden auf Reaktivität gegen rekombinantes NcGRA9 und TgGRA9 getestet. Es wurden etwa 5 µg der rekombinanten Proteine aufgetrennt. Serum 1 zeigte keine Reaktivität gegen die beiden rekombinanten Proteine, Serum 2 konnte NcGRA9 detektieren und Serum 3 wies zusätzlich eine Kreuzreaktivität gegen TgGRA9 auf. Rekombinantes NcGRA9 hat ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa, rekombinantes TgGRA9 hat wegen des zusätzlichen S-Tags eine molekulare Masse von etwa 55 kDa. * markiert die erwarteten Banden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden konnte, dass unser Antiserum gegen NcGRA9 eine Kreuzreaktivität mit TgGRA9 aufweist. Auch das nach Immunisierung mit rekombinanten TgGRA9 erhaltene Antiserum war gegen NcGRA9 kreuzreaktiv. Nach den vorliegenden Befunden ist daher GRA9 als Antigen nicht geeignet, um eine Toxoplasmose beziehungsweise Neosporose bei Rindern differentialdiagnostisch zu erfassen.

4.5. Posttranslationale Modifizierungen von NcGRA9

Für die weitere Beschreibung von NcGRA9 wurde die Proteinsequenz auf potentielle Phosphorylierungsstellen untersucht. Dazu wurde das Programm NetPhos 2.0 verwendet. Es zeigte sich, dass in der Aminosäureabfolge von NcGRA9 27 dieser potentiellen Stellen vorhanden sind (Abbildung 4.20). Es wurden 19 Serine, 6 Threonine und 2 Tyrosine als Kandidaten einer möglichen Phosphorylierung angegeben.

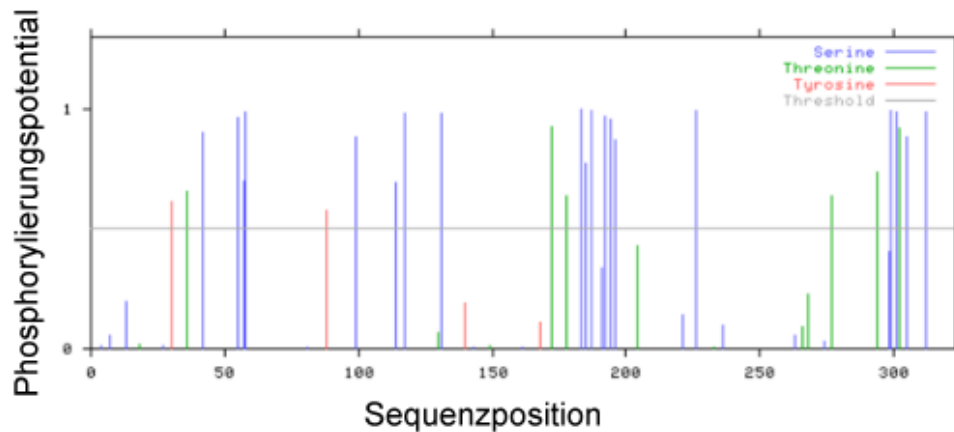
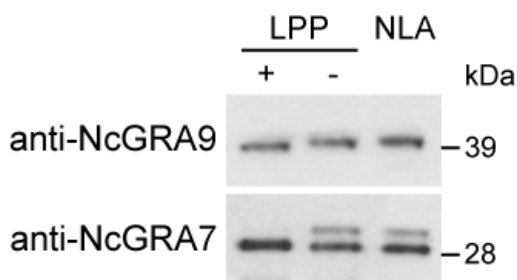


Abbildung 4.20 *In silico*-Analyse der potentiellen Phosphorylierungsstellen in der Proteinsequenz von NcGRA9. Die Analyse mit NetPhos 2.0 ergab 27 mögliche Phosphorylierungsstellen. In blau sind die 19 Serine markiert, die potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen. Außerdem wurden 6 Threonine (grün) und 2 Tyrosine (rot) als hypothetische Phosphorylierungsstellen identifiziert.

Um zu analysieren, ob NcGRA9 tatsächlich ein phosphoryliertes Protein ist, wurde Lysat von *N. caninum* infizierten Wirtszellen und Lysat von extrazellulären *N. caninum* mit Lambda Proteinphosphatase (LPP) behandelt. LPP entfernt vorhandene Phosphatgruppen, sodass mittels Western Blot-Analyse eine Änderung im Molekulargewicht im Vergleich zum nichtbehandelten Protein festzustellen wäre. Es zeigte sich, dass NcGRA9 in *N. caninum* infizierten Wirtszellen möglicherweise phosphoryliert ist, da das Protein nach LPP-Behandlung ein etwas geringeres Molekulargewicht aufwies als ohne Behandlung (Abbildung 4.21). Als Positivkontrolle wurde NcGRA7 verwendet, welches in *N. caninum* infizierten Wirtszellen phosphoryliert vorliegt. Im Lysat von extrazellulären *N. caninum* konnte weder für NcGRA9 noch für NcGRA7 eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NcGRA9 während oder nach der Sekretion in die PV phosphoryliert wird.

Lysat von *N. caninum*
infizierten Wirtszellen



Lysat von
extrazellulären *N. caninum*

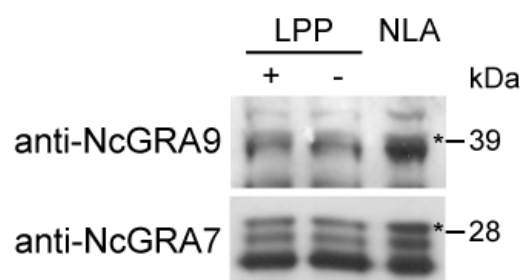


Abbildung 4.21 Behandlung von *N. caninum* Lysaten mit Lambda Proteinphosphatase zum Nachweis von Phosphorylierungen. Für den Nachweis von potentiellen Phosphorylierungen von NcGRA9 wurde Lysat (50 µg Protein) von *N. caninum* infizierten Wirtszellen und von extrazellulären *N. caninum* mit LPP behandelt. Im Lysat von *N. caninum* infizierten Wirtszellen zeigte sich nach LPP-Behandlung eine Reduktion des Molekulargewichts von NcGRA9, was auf eine Phosphorylierung hindeutet. Als Positivkontrolle wurde NcGRA7 analysiert. Für NcGRA9 und NcGRA7 von extrazellulären Parasiten wurde kein Effekt der LPP-Behandlung beobachtet. Als Kontrolle für die Reaktivität der Antikörper wurde 50 µg NLA verwendet. NLA = *Neospora*-Lysatantigen, * = erwartetes Molekulargewicht

Des Weiteren wurde die Proteinsequenz von NcGRA9 mit Hilfe von NetNGlyc auf potentielle *N*-Glykosylierungsstellen untersucht, dabei ergaben sich keine positiven Befunde.

Außerdem wurde NcGRA9 mittels NetOGlyc 3.1 auf mögliche *O*-Glykosylierungsstellen überprüft. Die *in silico*-Analyse zeigte drei mutmaßliche Aminosäuren, die glykosyliert sein könnten (Abbildung 4.22). Die drei Aminosäuren befinden sich am C-terminalen Ende von NcGRA9.

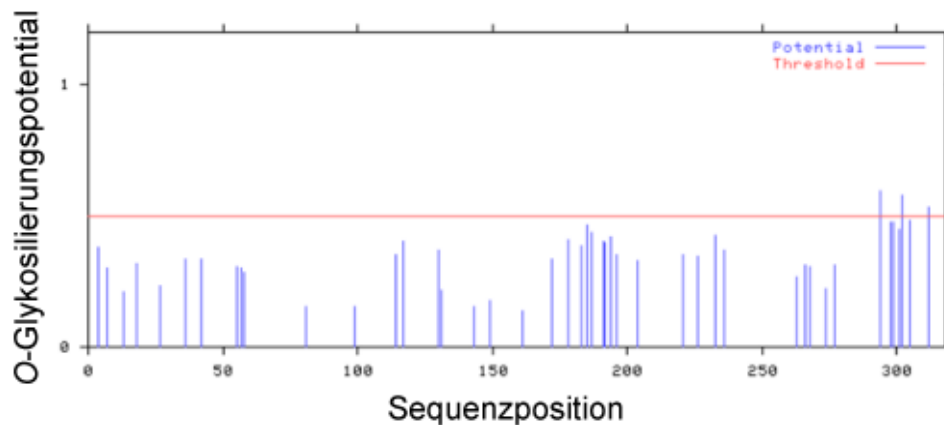


Abbildung 4.22 *In silico*-Analyse der mutmaßlichen *O*-Glykosylierungsstellen in der Proteinsequenz von NcGRA9. Mit dem Programm NetOGlyc 3.1 wurden drei Aminosäuren identifiziert, die potentielle Kandidaten für *O*-Glykosylierungen sind. Alle drei Aminosäuren befinden sich am C-terminalen Ende des Proteins.

Um eventuelle *O*-Glykosylierungen von NcGRA9 zu bestätigen, wurde Lysat von *N. caninum* infizierten Wirtszellen beziehungsweise von extrazellulären *N. caninum* mit *O*-Glykosidase behandelt. Diese Experimente ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine *O*-Glykosylierung.

In diesem Teil der Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass NcGRA9 nach meinen Ergebnissen während der Sekretion in die PV phosphoryliert wird. Die *in silico* vorhergesagten *O*-Glykosylierungen waren hingegen experimentell nicht nachweisbar.

4.6. Untersuchung der Targeting-Eigenschaften von NcGRA9

Um das dichte Granula-Protein NcGRA9 weiter zu beschreiben, wurden Eigenschaften im Bezug auf das Löslichkeits- und Sekretionsverhalten untersucht. Zusätzlich wurde analysiert, ob NcGRA9 mit Proteinaggregaten oder Membranen von *N. caninum* interagiert.

4.6.1. Untersuchung der exkretierten/sekretierten Antigene von *N. caninum*

Es ist beschrieben, dass *N. caninum* sowie *T. gondii* unter wirtszellfreien Bedingungen aktiv Proteine sekretieren, die als immunogen bekannt sind und als „excreted/secreted antigens“ (ESA) bezeichnet werden (Decoster et al., 1988). Um zu analysieren, ob auch NcGRA9 zu dieser Gruppe von Antigenen gezählt werden kann, wurde *N. caninum* isoliert

und für verschiedene Zeiträume in der Abwesenheit von Wirtszellen inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand auf das Vorhandensein von NcGRA9 mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 4.23). Es wurde deutlich, dass die Menge an NcGRA9 im Überstand über die Zeit zugenommen hatte. Dasselbe Ergebnis wurde für NcGRA7 als Positivkontrolle gefunden. NcGRA7 ist ein bekanntes dichte Granula-Protein und ein ESA von *N. caninum*. NcSAG1 hingegen ist ein Oberflächenprotein von *N. caninum* und wird von den Parasiten nicht sekretiert, weshalb die NcSAG1 Menge in den analysierten Überständen konstant bleibt (Negativkontrolle). Diese Kontrolle belegt ferner, dass NcGRA9 und NcGRA7 von *N. caninum* aktiv sekretiert wurden und nicht auf Grund von Zelllyse in den Überstand gelangt sind.

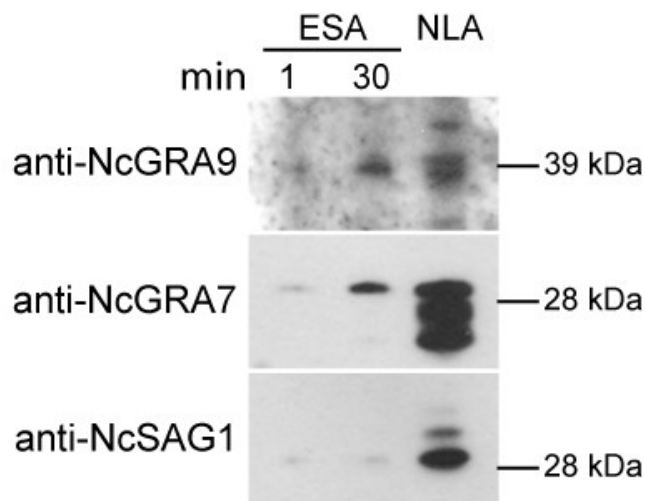


Abbildung 4.23 Analyse der exkretierten-sekretierten Antigene von *N. caninum*. Nachdem die Parasiten unter wirtszellfreien Bedingungen für verschiedene Zeitspannen inkubiert wurden, wurden die Überstände (Tachyzoitenkonzentration 1×10^8 / ml, 15 μ l aufgetragen) mittels Western Blot-Analyse ausgewertet. Die Menge an NcGRA9 sowie NcGRA7 nahm vom Zeitpunkt 1 min bis 30 min zu. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinmenge von NcSAG1 im Beobachtungszeitraum konstant. Als Vergleich wurde 20 μ g NLA (*N. caninum* Lysatantigen) aufgetragen.

4.6.2. Analyse des Verhaltens von NcGRA9 in den dichte Granula

Die bereits erwähnten *in silico*-Analysen hatten ergeben, dass NcGRA9 ein vorwiegend hydrophiles Protein ist. Um dies experimentell zu überprüfen, wurden die Parasiten mit dem Detergens Triton X-114 lysiert. Proteine können, nach Abtrennung des Parasitendebris durch Zentrifugation, im resultierenden Überstand aufgrund ihrer Affinität für hydrophile beziehungsweise hydrophobe Umgebungen, aufgetrennt werden. Für NcGRA9 wurde ersichtlich, dass das Protein sowohl in der wässrigen als auch in der Detergensphase zu finden war (Abbildung 4.24), dabei befand sich das Protein jedoch größtenteils in der wässrigen Phase. Als Beleg für eine erfolgreiche Partionierung wurde die Verteilung von NcGRA7, NcMIC3 und NcSAG1 ebenfalls analysiert. NcGRA7 war, wie beschrieben (Hemphill et al., 1998), sowohl in der wässrigen als auch in der Detergensphase zu finden, wohingegen NcMIC3 (Sonda et

al., 2000) und NcSAG1 (Hemphill et al., 1997; Howe et al., 1998; Sonda et al., 1998) wie erwartet jeweils hauptsächlich in der Detergensphase nachweisbar waren.

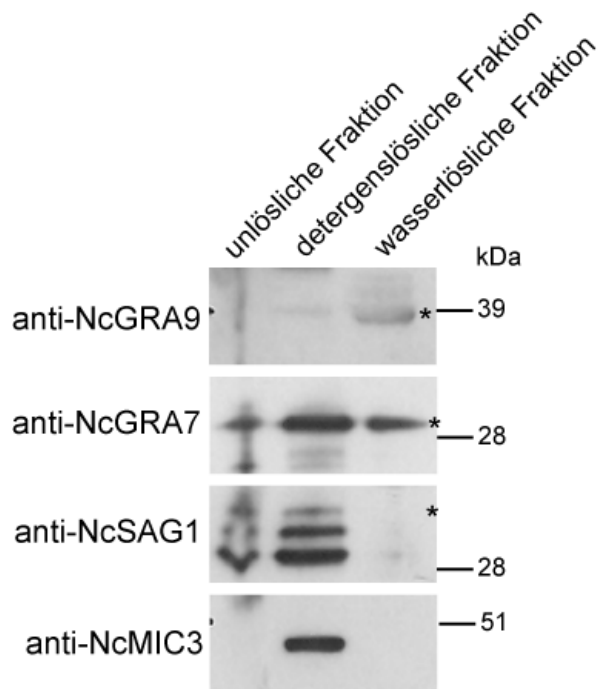


Abbildung 4.24 Partionierung von *N. caninum* durch Triton X-114-Behandlung. Die *N. caninum*-Proteine wurden aufgrund ihrer Affinität zu hydrophober beziehungsweise hydrophiler Umgebung aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper in einer Western Blot-Analyse nachgewiesen. Die unlösliche Fraktion enthält Parasitenbruchstücke und Proteine, die durch starke Protein-Protein-Interaktionen oder hydrophobe Interaktionen nach Zentrifugation des Lysats im Pellet zurückgehalten werden. Für die Analyse wurden $1,5 \times 10^8$ Tachyzoiten verwendet. * = erwartetes Molekulargewicht

4.6.3. Analyse der subzellulären Verteilung von NcGRA9

Im Folgenden wurde die subzelluläre Verteilung von NcGRA9 in extrazellulären *N. caninum* und in *N. caninum* infizierten Wirtszellen näher untersucht. Dazu wurden Zellfraktionierungen durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, Proteine, die an Membranen gebunden oder an Proteinaggregaten beteiligt sind, anhand ihres Sedimentationsverhaltens von löslichen Proteinen zu separieren. Bei der Analyse von extrazellulären *N. caninum* wurden lysierte Tachyzoiten einer differentiellen Zentrifugation zunächst bei 2500 g und danach bei 100000 g unterzogen. Das „low speed“ Pellet (LSP) enthält Parasitenbruchstücke und intakte Parasiten. Der „low speed“ Überstand (LSÜ) wird dann durch Ultrazentrifugation weiter aufgetrennt, dabei erhält man einen „high speed“ Überstand (HSÜ) erhalten, in dem sich lösliche Proteine befinden. Im „high speed“ Pellet (HSP) befinden sich Proteinaggregate und membranöse Strukturen. Die Analyse extrazellulärer Parasiten ergab für NcGRA9 eine Verteilung in allen vier Fraktionen (Abbildung 4.25). NcGRA9 assoziiert demnach an Proteinaggregaten (HSP), wie man sie besonders im Zentrum der dichten Granula findet, und liegt außerdem in einer löslichen Form innerhalb der Organellen vor (HSÜ). Eine ähnliche Verteilung wurde auch für NcGRA7 gefunden. NcSAG1 war wiederum nur in den Pelletfraktionen zu finden, was durch dessen starke Membranassoziation zu erklären ist.

In einem weiteren Ansatz wurden *N. caninum* infizierte Wirtszellen so aufbereitet, dass der Inhalt der PV mittels Ultrazentrifugation in eine membranhaltige und proteinaggregatbeinhal-

tende Fraktion sowie eine lösliche Fraktion getrennt wurde. Die resultierenden Fraktionen wurden mittels Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein von NcGRA9 ausgewertet.

Nach der Fraktionierung des PV-Inhaltes war NcGRA9 ebenfalls in allen vier untersuchten Fraktionen vorhanden (Abbildung 4.25). Das „low speed“ Pellet (LSP) enthält Wirtszellbruchstücke und intakte Parasiten. Nachdem der „low speed“ Überstand (LSÜ) durch Ultrazentrifugation getrennt wurde, zeigte sich, dass NcGRA9 im vakuolären Raum löslich vorliegt („high speed“ Überstand, HSÜ). Außerdem ist NcGRA9 entweder an Membranen gebunden oder an Proteinaggregaten assoziiert („high speed“ Pellet, HSP). NcGRA7 wurde nach Fraktionierung des LSÜ hauptsächlich in der Pelletfraktion gefunden, was darauf hindeutet, dass dieses Protein, wie erwartet, vorwiegend membrangebunden beziehungsweise in Proteinaggregaten gebunden vorliegt. NcSAG1 war als bekanntes, membrangebundenes Oberflächenprotein hauptsächlich in dem LSP zu finden.

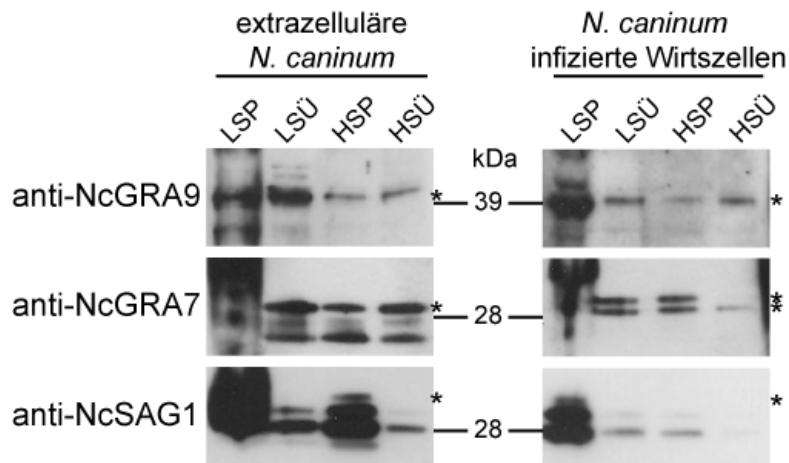


Abbildung 4.25 Zellfraktionierung von *N. caninum* mittels Ultrazentrifugation. Für diese Analyse wurden *N. caninum* infizierte Wirtszellen und extrazelluläre *N. caninum* verwendet und mit spezifischen Antikörpern mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Daten zeigen, dass NcGRA9 nicht nur in einer löslichen Form sondern auch membran- oder aggregatgebunden in *N. caninum* vorliegt. Für die Auswertung wurden 1/20 der Pellets beziehungsweise Überstände eingesetzt.

LSP: „low speed“ Pellet; LSÜ: „low speed“ Überstand; HSP: „high speed“ Pellet; HSÜ: „high speed“ Überstand

Nachdem gezeigt wurde, dass NcGRA9 zum Teil an Membranen gebunden oder an Proteinaggregate assoziiert ist, wurden weiterführende Analysen angeschlossen, die die Art der Interaktion aufklären sollten. Dafür wurde die Pelletfraktion, die aus der Ultrazentrifugation (HSP) resultiert, genauer untersucht, indem sie mit verschiedenen destabilisierenden Agenzien behandelt wurde. Es wurde wieder die Verteilung von NcGRA9 in *N. caninum* infizierten Wirtszellen und in extrazellulären *N. caninum* analysiert.

Von den *N. caninum* infizierten Wirtszellen wurde der Inhalt der PV, der sich im HSP befand, der Behandlung mit verschiedenen Agenzien unterzogen (Abbildung 4.26). Nach der Inkubation mit 50 mM Tris/HCl (pH 8) oder 0,5 M KCl konnte NcGRA9 nicht vom Pellet gelöst werden. Nach einer Behandlung mit 0,1 M NaHCO₃ (pH 11) und mit 4 M Urea wurde etwa die Hälfte des NcGRA9 vom Pellet entfernt. Durch 6 M Urea wurde das gesamte NcGRA9 aus

der Pelletfraktion herausgelöst. Nach Inkubation mit 1 % Igepal beziehungsweise 1,5 % Triton X-114 wurde nur ein geringer Teil des NcGRA9 in den Überstand abgegeben. Als Kontrolle wurde das Oberflächenprotein NcSAG1 verwendet, das sich nur durch Detergensbehandlung (1,5 % Triton X-114) von der Pelletfraktion lösen ließ, da es bekanntermaßen ein integrales Membranprotein ist.

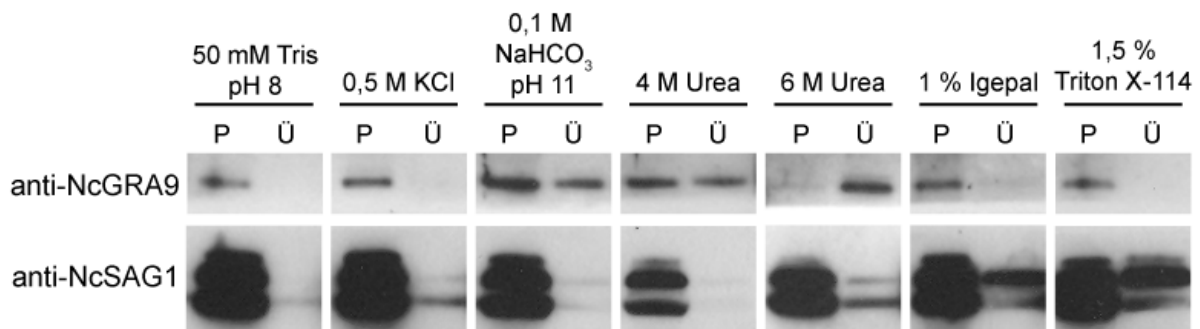


Abbildung 4.26 Analyse der Interaktionsart zwischen NcGRA9 und dem intravakuolären Netzwerk. Das HSP, das nach Ultrazentrifugation des LSÜ erhalten wurde, wurde mit verschiedenen destabilisierenden Agenzien behandelt, um die Art der Interaktionen von NcGRA9 mit anderen Proteinen oder Membranen zu bestimmen. Nach erneuter Ultrazentrifugation wurde in den resultierenden Pellet- (P) und Überstandsfractionen (Ü) NcGRA9 mittels Western Blot-Analysen detektiert. Das Oberflächenprotein NcSAG1 wurde als Kontrolle verwendet. Es wurde 1/20 des entsprechenden Pellets bzw. Überstands aufgetragen.

Zusätzlich wurde auch das Verhalten von NcGRA9 in extrazellulären *N. caninum* mit der identischen Methode analysiert (Abbildung 4.27). Auch hier konnte NcGRA9 teilweise durch 0,1 M NaHCO₃ (pH 11) und vollständig durch 6 M Urea aus der HSP-Fraktion gelöst werden.

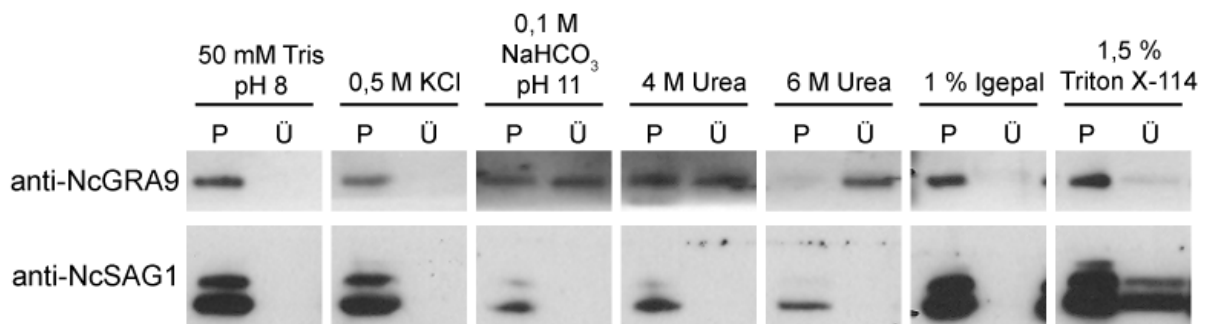


Abbildung 4.27 Analyse der Interaktionsart von NcGRA9 in extrazellulären *N. caninum*. Das HSP von gereinigten Tachyzoiten wurde mit verschiedenen destabilisierenden Agenzien behandelt und einer erneuten Ultrazentrifugation unterzogen und so in eine Pellet- (P) und eine Überstandsfraction (Ü) aufgetrennt. Es wurde mittels Western Blot analysiert, welche Agenzien in der Lage waren, NcGRA9 vom Pellet zu lösen und in den HSÜ zu überführen. Als Kontrollprotein wurde erneut NcSAG1 untersucht. Es wurde 1/20 des entsprechenden Pellets bzw. Überstands aufgetragen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass NcGRA9 zu den exkretierten/sekretierten Antigenen von *N. caninum* zählt und dass es in den dichte Granula von *N. caninum* lokalisiert ist. Durch Triton X-114-Partitionierungsexperimente konnte der, in *in silico*-Analysen vorhergesagte, eher hydrophile Charakter des Proteins bestätigt werden.

Außerdem wurde deutlich, dass NcGRA9 innerhalb von *N. caninum* aber auch innerhalb der parasitophoren Vakuole als lösliches und als membran- oder proteinaggregatassoziiertes Protein vorliegt.

4.7. Expression von rekombinantem NcGRA9 in *Neospora caninum*

Um das Lokalisationsverhalten von NcGRA9 noch detaillierter zu untersuchen, sollten *N. caninum*-Tachyzoiten erzeugt werden, die zusätzlich zum endogenen NcGRA9 noch ein rekombinantes NcGRA9, das zur Unterscheidung einen C-terminalen HA-Tag trägt, exprimieren. Da *N. caninum* sehr eng mit *T. gondii* verwandt ist, wurde zu diesem Zweck das zur Proteinexpression in *T. gondii* bekannte Transferplasmid pTUB-HA verwendet. Dazu wurde zunächst die cDNA-Sequenz des Volllängen-*Ncgra9* ohne das Stopcodon in pTUB-HA kloniert und *N. caninum* wurde mit diesem Konstrukt transfiziert. Die Parasiten wurden unter Chloramphenicol-Selektion kultiviert, es konnte jedoch keine Expression des HA-markierten NcGRA9 nachgewiesen werden. In diesem Transferplasmid wurde die *Ncgra9*-Sequenz unter Kontrolle des *T. gondii* β -Tubulin-Promoter transkribiert. In Diskussionen mit unseren Kooperationspartnern stellte sich heraus, dass der *T. gondii* β -Tubulin-Promoter in *N. caninum* nicht funktionsfähig ist. Aus diesem Grund wurde die *Ncgra9*-cDNA in das Plasmid pDHFR-TSc3 kloniert (Donald und Roos, 1993). Als Promoterregion wird in diesem Expressionsplasmid der DHFR-Promoter genutzt. Dieser Promotor wurde mittels PCR aus dem Plasmid heraus amplifiziert, wobei auch die Sequenzen der Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen *SpeI* und *NotI* am 5'- beziehungsweise 3'-Ende angefügt wurden. Außerdem wurden zwei zusätzliche Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen am 3'-Ende vor *NotI* eingefügt (*AvrII* und *NcoI*). Die erhaltene Sequenz wurde über die Schnittstellen *SpeI* und *NotI* in die Plasmidsequenz inseriert. Anschließend wurde die *Ncgra9*-cDNA-Sequenz inklusive C-terminalem HA-Tag gefolgt von einem Stopcodon eingefügt, dies wurde mit Hilfe der Schnittstellen *NcoI* und *NotI* durchgeführt. Schließlich wurden 300 Basenpaare der 3'-Region von *Ncgra9* mittels PCR auf genomischer *N. caninum*-DNA amplifiziert und über die Schnittstellen *AvrII* und *NcoI* in die Plasmidsequenz eingebracht. Dieser Bereich der 3'-Region ist für die Terminierung der Transkription wichtig. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde nach jedem Klonierungsschritt durch Sequenzierungen bestätigt. *N. caninum* wurde mit diesem Konstrukt transfiziert, unter Pyrimethamin-Selektion kultiviert und die erfolgreiche Expression des HA-markierten Proteins wurde durch Western Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 4.28). Es wurden vier stabile Klonlinien aus der gemischten Kultur isoliert. Nur die Klone 1, 2 und 4 zeigten eine Expression des HA-markierten Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa. Allerdings war die Stärke der Expression zwischen den Klonlinien unterschiedlich.

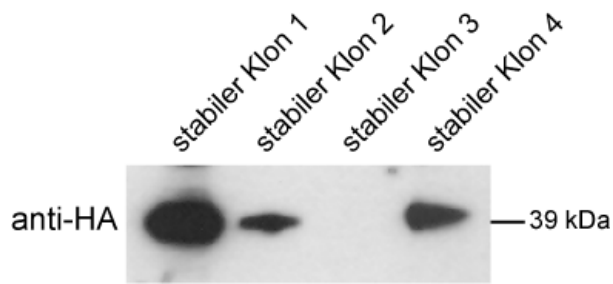


Abbildung 4.28 Expressionsnachweis von NcGRA9-HA in transfizierten *N. caninum* mittels Western Blot-Analyse. Nach der Transfektion von *N. caninum* wurden aus der gemischten Kultur heraus vier stabile Klonlinien isoliert. Die Expression von NcGRA9-HA wurde mittels Western Blot-Analyse mit anti-HA-Antikörpern nachgewiesen. Es wurden 20 μ g NLA aufgetragen.

Die Expression von NcGRA9-HA wurde auch auf Basis von Immunfluoreszenzanalysen bestätigt. Hierfür wurden extrazelluläre Wildtyp-*N. caninum* und transfizierte *N. caninum* analysiert. Wie schon gezeigt wurde, wird endogenes NcGRA9 in extrazellulären Parasiten innerhalb der dichte Granula detektiert. Mit Hilfe des anti-HA-Antikörpers konnte für das transfizierte NcGRA9-HA ebenfalls eine Lokalisierung innerhalb der dichte Granula gezeigt werden (Abbildung 4.29). Dies deutet darauf hin, dass transfiziertes NcGRA9-HA dasselbe Lokalisierungsverhalten wie endogenes NcGRA9 innerhalb der Parasiten aufweist.

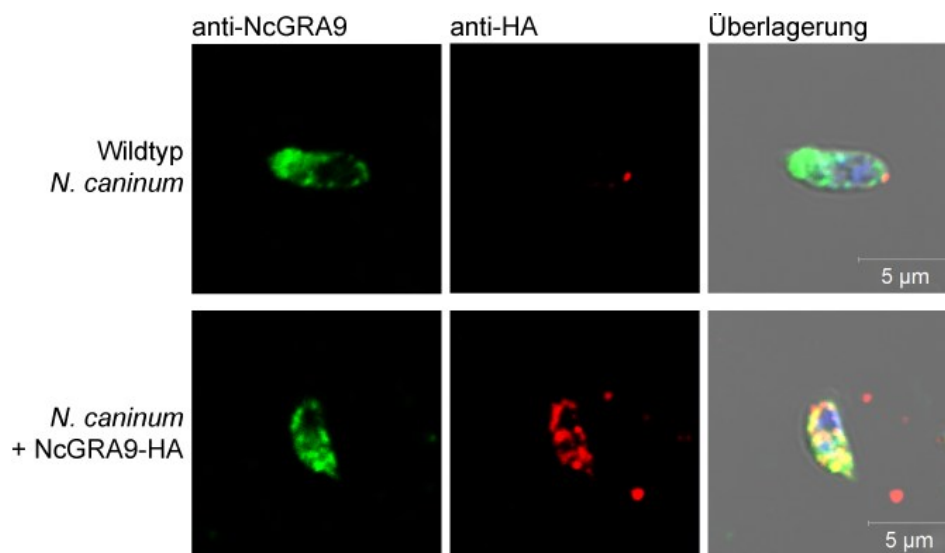


Abbildung 4.29 Lokalisierung des transfizierten NcGRA9-HA innerhalb von extrazellulären *N. caninum*-Tachyzoiten. Mittels Immunfluoreszenzanalyse wurde die Lokalisation von transfiziertem NcGRA9-HA (rot) im Vergleich zu endogenem NcGRA9 (grün) untersucht. Der Maßstabsbalken steht für 5 μ m. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI dargestellt.

Die Lokalisation des transfizierten NcGRA9-HA wurde auch nach Wirtszellinvasion der Tachyzoiten mittels Immunfluoreszenzanalyse bestimmt. Es wurde ebenfalls die Verteilung des transfizierten Proteins mit endogenem NcGRA9 verglichen (Abbildung 4.30). Es wurde deutlich, dass sowohl endogenes als auch transfiziertes, HA-markiertes NcGRA9 nach Wirtszellinvasion hauptsächlich innerhalb der PV zu finden sind. Dies deutet darauf hin, dass transfiziertes NcGRA9-HA, genau wie endogenes NcGRA9 von *N. caninum* in die PV sekretiert wird. Die Proteine weisen innerhalb des vakuolären Raums eine deutliche Kolokalisation auf.

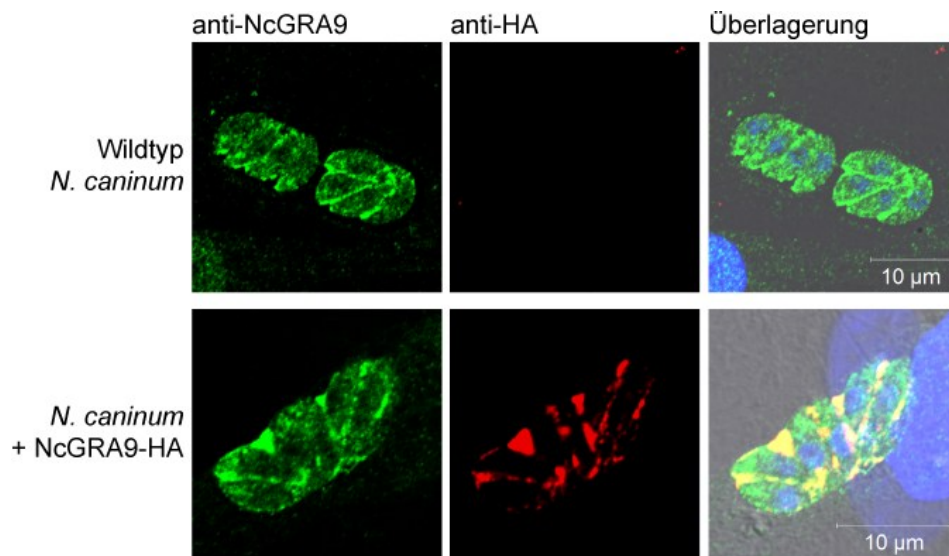


Abbildung 4.30 Analyse der Lokalisation des transfizierten NcGRA9-HA nach Wirtszellinvasion. Transfiziertes NcGRA9-HA (rot) wurde nach Wirtszellinfektion innerhalb der PV gefunden und zeigte eine Kolo-kalisation mit endogenem NcGRA9 (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Der Maßstabsbalken steht für 10 µm.

Nachdem die Lokalisierung des transfizierten NcGRA9-HA innerhalb des Tachyzoitenstadiums untersucht worden war, wurde eine Analyse von SNP-induzierten Bradyzoiten abgeschlossen. Dafür wurde *N. caninum* wie bereits beschrieben für vier beziehungsweise acht Tage in der Gegenwart von SNP kultiviert. Als Kontrolle wurden die Parasiten für denselben Zeitraum ohne SNP kultiviert. Nach SNP-Behandlung zeigten die Parasiten eine BAG1-Expression, welche auf eine Stadienkonversion hindeutet, da BAG1 ein Bradyzoiten-spezifisches Protein ist (Abbildung 4.31). Nach SNP-Behandlung war NcGRA9-HA hauptsächlich in den Randbereichen der Zysten zu finden. Damit ergibt sich innerhalb der PV und der parasitären Zysten ein ähnliches Verteilungsmuster von rekombinantem NcGRA9.

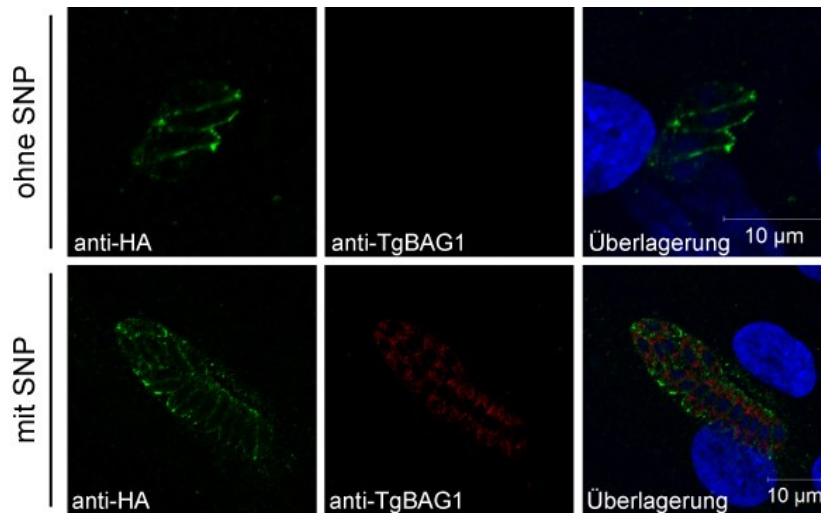


Abbildung 4.31 Expression von rekombinantem NcGRA9-HA in Tachyzoiten und Bradyzoiten. Das HA markierte NcGRA9 ist in grün, der Bradyzoitenmarker BAG1 in rot dargestellt. Der Zellkern wurde mit DAPI blau angefärbt. Der Maßstabsbalken steht für 10 µm.

Nachdem gezeigt wurde, dass transfiziertes NcGRA9-HA dieselbe Lokalisation wie endogenes NcGRA9 zeigt, wurde analysiert, ob NcGRA9-HA auch die gleiche subzelluläre Verteilung zeigt. Dazu wurden, wie oben beschrieben, Zellfraktionierungen mittels Ultrazentrifugation durchgeführt.

Die in Abbildung 4.32 gezeigten Daten belegen, dass auch NcGRA9-HA in Tachyzoiten und in der PV in einer löslichen Form vorkommt (Nachweis im HSÜ). Die Analyse des HSP bei der Ansätze ergab, dass auch transfiziertes NcGRA9-HA in der Lage ist, mit Membranen oder Proteinaggregaten zu interagieren und sich somit in allen überprüften Parametern genauso verhält, wie das endogene NcGRA9.

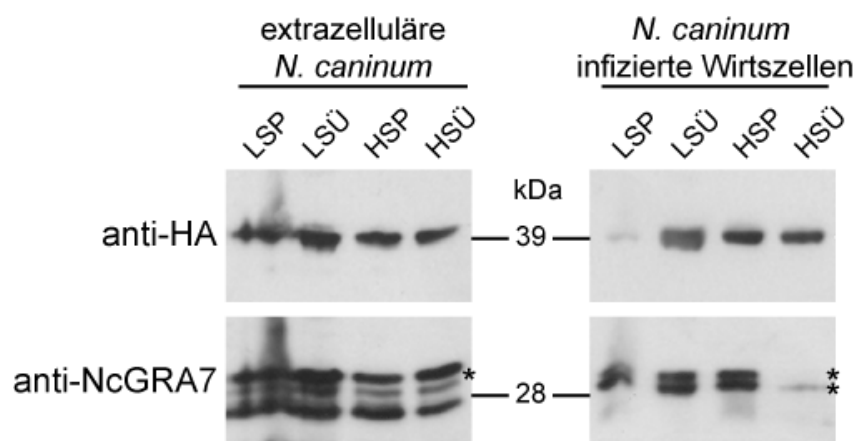


Abbildung 4.32 Analyse des Interaktionsverhaltens von NcGRA9-HA. Es wurden extrazelluläre *N. caninum* und *N. caninum* infizierte Wirtszellen lysiert und mittels Ultrazentrifugation fraktioniert. Das Vorhandensein von NcGRA9-HA wurde mit einem Tag-spezifischen Antikörper in Western Blot-Analysen überprüft. NcGRA7 diente als Kontrolle für die erfolgreiche Fraktionierung. Von den jeweiligen Pellets und Überständen wurde 1/20 aufgetragen. * = erwartetes Molekulargewicht

4.8. Heterologe Expression von NcGRA9 in *Toxoplasma gondii*

Da die Proteine NcGRA9 und TgGRA9 eine Sequenzidentität von 60 % aufweisen, war es im Rahmen dieser Arbeit von Interesse zu untersuchen, wie sich NcGRA9 in *T. gondii* verhalten würde. Deshalb wurde die cDNA-Sequenz von *Ncgra9* in das Plasmid pTUB-HA kloniert und anschließend zur Transfektion von *T. gondii* verwendet. Mit Hilfe des HA-Tags war es möglich, transfiziertes NcGRA9 von endogenem TgGRA9 zu unterscheiden. Allerdings wurde transfiziertes NcGRA9 auch von dem Antiserum gegen TgGRA9 erkannt, da es zwischen den Spezies *T. gondii* und *N. caninum* kreuzreagiert. Nach der Transfektion von *T. gondii* wurden sechs stabile Klonlinien etabliert, die alle das HA-markierte NcGRA9 exprimierten. Diese Expression wurde mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 4.33). Das heterologe NcGRA9-HA wurde bei einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa detektiert. Das endogene NcGRA9 hat in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 39 kDa, das Molekulargewicht des HA-Tags entspricht etwa 1 kDa.

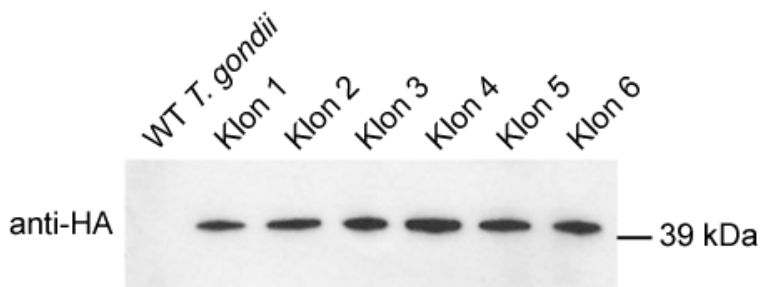


Abbildung 4.33 Nachweis des HA-markierten NcGRA9 in transfizierten *T. gondii*. Die Western Blot-Analyse konnte bestätigen, dass in den sechs stabilen Klonen das NcGRA9-HA exprimiert wurde. Als Negativkontrolle wurde Lysat von Wildtyp *T. gondii* verwendet. Es wurde 20 µg TLA aufgetragen.

Die Expression von NcGRA9-HA in *T. gondii* wurde auch mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht, um die Lokalisierung innerhalb von *T. gondii* zu detektieren. Nach Wirtszellinvasion war das transfizierte NcGRA9-HA hauptsächlich innerhalb der PV nachweisbar (Abbildung 4.34). Bei der Überlagerung von transfiziertem NcGRA9-HA und endogenem TgGRA9 wurde deutlich, dass die beiden Proteine dieselbe Lokalisierung innerhalb der PV zeigten und daher kolokalisierten. Das lässt darauf schließen, dass transfiziertes NcGRA9-HA in *T. gondii* dasselbe Lokalisationsverhalten zeigt, wie das endogene TgGRA9.

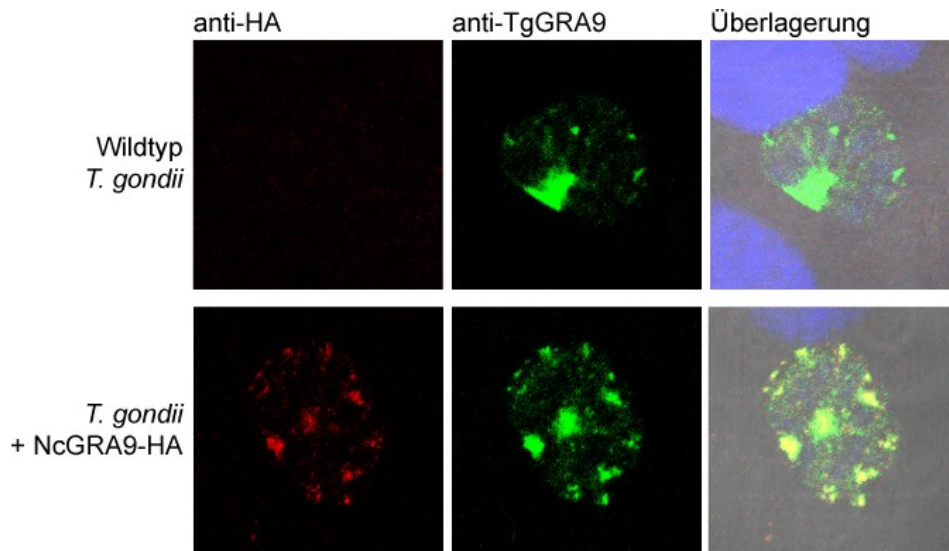


Abbildung 4.34 Analyse der Lokalisation von transfiziertem NcGRA9-HA in *T. gondii*. Um die Lokalisation von NcGRA9-HA in *T. gondii* darzustellen, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse mit Wirtszellen durchgeführt, die mit NcGRA9-HA transfizierten *T. gondii* infiziert wurden. Es zeigte sich eine deutliche Kolokalisation von TgGRA9 (detektiert in grün mit einem spezifischen Antiserum) und NcGRA9 (rot, detektiert mit anti-HA Antikörpern). Dies wird in der überlagerten Darstellung der Kanäle besonders deutlich. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI vorgenommen (blau).

4.9. Analyse funktioneller Domänen im NcGRA9 Protein

Das NcGRA9-Protein von *N. caninum* gehört zu den „exkreted/secreted antigens“ und ist wahrscheinlich am Aufbau der parasitophoren Vakuole beteiligt. Wie bei den meisten dichten Granula-Proteinen ist eine genaue Funktion nicht bekannt. Man nimmt aber allgemein an, dass die dichten Granula-Proteine am Nährstoffaustausch zwischen Parasit und Wirtszelle beteiligt sind. Die bisherigen Analysen zeigen, dass NcGRA9 ein definiertes Targeting-Verhalten im Parasiten, aber auch in der parasitophoren Vakuole aufweist. Es ist daher von Interesse, welche Molekülbereiche für das Targeting von NcGRA9 verantwortlich sind.

4.9.1. Expression von C-terminalen trunkeierten NcGRA9-Proteinen in *Neospora caninum*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich war mit pDHFR-TSc3 NcGRA9-HA in *N. caninum* zu exprimieren, wurden C-terminale Verkürzungen von NcGRA9 konstruiert und die modifizierten Sequenzen in pDHFR-TSc3 kloniert. Das Schema in 4.35 zeigt die vier C-terminalen Verkürzungen, die alle die Proteinsequenz vor einem alpha-helikalen Bereich trunkeieren. $\Delta 280$ NcGRA9-HA verkürzt das Protein in der Art, dass ein C-terminales PEST-Motif und eine darin enthaltene Alpha-helix entfernt werden. Die Verkürzung $\Delta 237$ ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine angrenzende Alpha-helix entfernt wird. In der Verkürzung $\Delta 201$ fehlt zusätzlich eine Alpha-helix mit hydrophobem Charakter und in der Verkürzung $\Delta 81$ wird außerdem die amphipathische Alpha-helix entfernt.

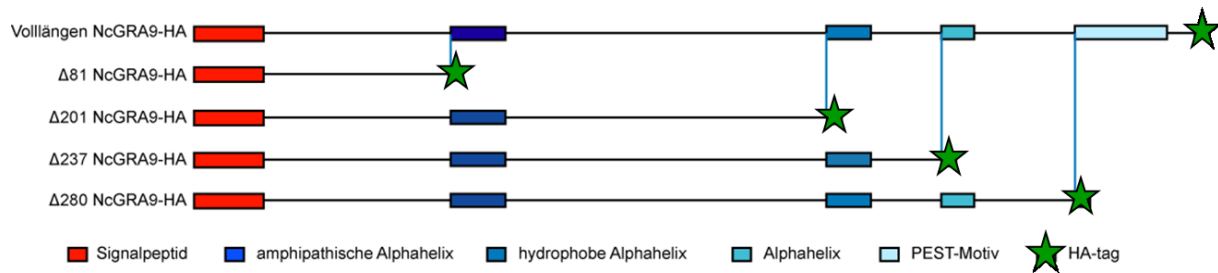


Abbildung 4.35 Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von NcGRA9. Das Schema stellt dar, welche Domänen jeweils durch die C-terminalen Trunkierungen entfernt werden. Außerdem ist das N-terminale Signalpeptid (rot) und das HA-Tag (grüner Stern) dargestellt. Die Bereiche, die durch die C-terminalen Verkürzungen entfernt werden, sind in verschiedenen Blautönen dargestellt.

Nach der Klonierung von stabilen Klonlinien mit den verschiedenen C-terminalen Verkürzungen des *Ncgra9* wurde analysiert, ob mRNA der HA-markierten Konstrukte in *N. caninum* nachzuweisen war. Dafür wurden Reverse Transkriptase-PCR-Analysen durchgeführt, mit Oligonukleotiden, die das N-terminale Ende von *Ncgra9* erkannten und andererseits an das HA-Tag anlagerten. So konnte nachgewiesen werden, welche der gemischten Parasitenkulturen beziehungsweise stabilen Klone die jeweilige *Ncgra9*-Variante in das Genom integriert hatte und diese auch transkribierten. Es konnte gezeigt werden, dass alle *Ncgra9*-HA-Varianten in zumindest einem Klon transkribiert wurden (Abbildung 4.36). Für das Volllänge *Ncgra9*-HA (VL) wurde ein Fragment aus 984 Basenpaaren erwartet und in drei der mit 1 gekennzeichneten stabilen Klone gefunden. Das Amplifikat von $\Delta 280$ *Ncgra9*-HA besteht aus 866 Basenpaaren und wurde in fünf stabilen Klonen exprimiert, die mit 2 gekennzeichnet sind. Für $\Delta 237$ *Ncgra9*-HA wurde ein 737 Basenpaar-Fragment erwartet, welches in Klon 3.2 gefunden wurde. Das $\Delta 201$ *Ncgra9*-HA Fragment sollte 629 Basenpaare enthalten und war in vier Klonen nachweisbar, die mit 4 gekennzeichnet sind. Das $\Delta 81$ *Ncgra9*-HA Fragment mit 269 Basenpaaren konnte in Klon 5.2 nachgewiesen werden. Die Abbildung 4.36 zeigt ferner, dass die mRNA der einzelnen *Ncgra9*-Varianten in den verschiedenen Klonen unterschiedlich stark transkribiert wurde.

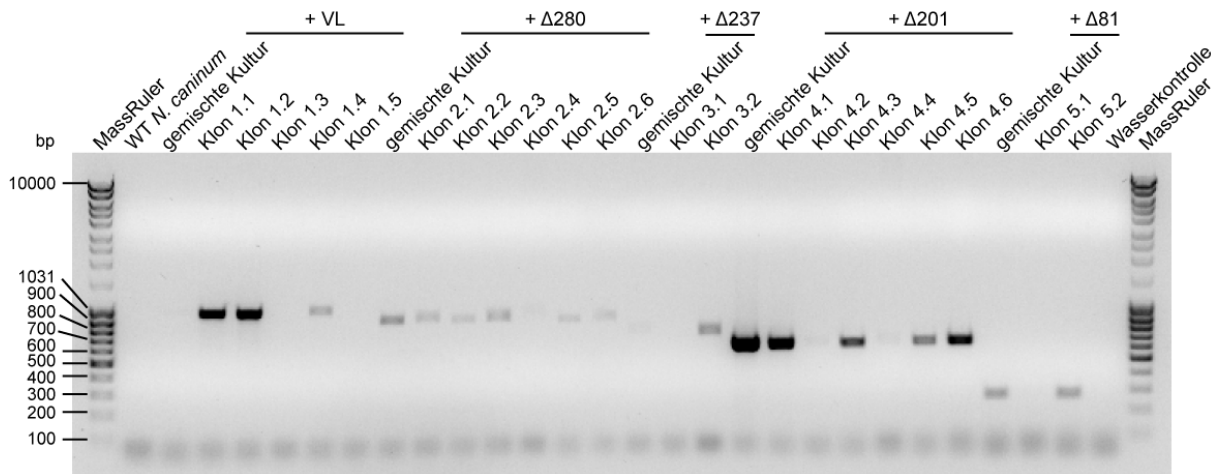


Abbildung 4.36 Reverse Transkriptase-PCR zum Nachweis, dass die *Ncgra9-HA*-Varianten in das *N. caninum* Genom integriert und auch transkribiert wurden. Für alle *Ncgra9-HA*-Varianten konnten PCR-Fragmente mit der erwarteten Anzahl an Basenpaaren amplifiziert werden. Nicht alle Klone zeigten einen Transkriptspiegel der untersuchten mRNA. Die Menge der transkribierten mRNA war nicht für alle Klone identisch, obwohl dieselben Mengen cDNA (100 ng) für jede RT-PCR-Reaktion eingesetzt wurde.

Zum Nachweis der Expression der verkürzten NcGRA9-HA Proteine in *N. caninum* wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Lysate von infizierten Wirtszellen hergestellt und nach Zentrifugation das Pellet und der Überstand der verschiedenen Klone auf die Expression der HA-markierten Proteine mit anti-HA-Antikörpern überprüft (Abbildung 4.37). $\Delta 81$ NcGRA9-HA konnte mittels Western Blot-Analyse in keinem der Klone nachgewiesen werden. Die anderen NcGRA9-HA-Varianten hingegen wurden exprimiert und konnten detektiert werden. Volllängen NcGRA9-HA wurde bei einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa nachgewiesen, wobei das theoretische Molekulargewicht bei 36 kDa liegt. Die Verkürzung $\Delta 280$ wurde bei etwa 35 kDa detektiert und das theoretische Molekulargewicht liegt bei 32 kDa. $\Delta 237$ zeigte sich mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa im Western Blot, wobei das theoretische Molekulargewicht bei 27,2 kDa liegt. Bei etwa 26 kDa wurde die Verkürzung $\Delta 201$ gefunden, deren theoretisches Molekulargewicht mit 23,4 kDa berechnet wurde. Die Western Blot-Analyse machte deutlich, dass nicht alle gestesteten Klone das transfizierte Protein exprimierten und dass die Menge des exprimierten Proteins in den einzelnen Klonen unterschiedlich war. Die verkürzten Proteine wurden zumeist im Überstand der Parasitenlysate gefunden, nur Volllängen NcGRA9-HA und $\Delta 280$ NcGRA9-HA waren auch teilweise im Pellet des Parasitenlysats zu finden.

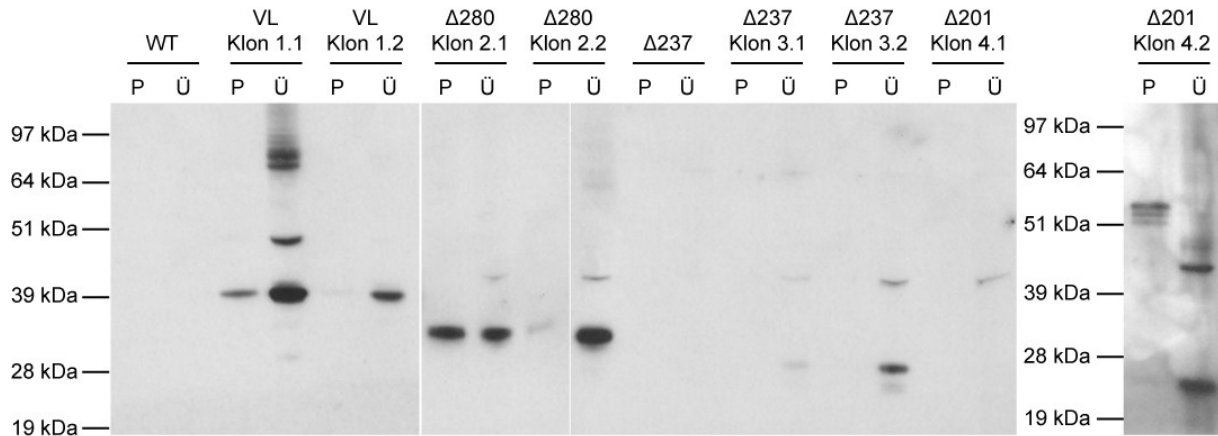


Abbildung 4.37 Nachweis der HA-markierten NcGRA9-Varianten mittels Western Blot-Analyse. Es wurde Lysat aus intrazellulären *N. caninum*-Tachyzoiten hergestellt und das Pellet (P) und der Überstand (Ü) wurden auf die Expression der HA-markierten Proteine untersucht. Von den Pellets wurde 1/20 aufgetragen, von den Überständen 20 µg Protein.

4.9.2. Lokalisierung von C-terminal trunkierten NcGRA9-Proteinen in *Neospora caninum*

Darüber hinaus wurde die Lokalisierung der transfizierten NcGRA9-HA-Varianten in der parasitophoren Vakuole mittels Immunfluoreszenzanalyse bestimmt (Abbildung 4.38). Als Kontrollprotein wurde NcGRA7 eingesetzt. Für Volllängen NcGRA9-HA wurde, wie schon in Abbildung 4.27 gezeigt, eine Sekretion in die PV festgestellt. Außerdem wurde das HA-markierte Volllängenprotein auch im Bereich der PVM detektiert. $\Delta 280$ NcGRA9-HA wurde sowohl innerhalb der Parasiten gefunden als auch sekretiert in der PV. In den Fällen, in denen das Protein innerhalb der Parasiten verblieb, war es hauptsächlich apikal der Zellkerne lokalisiert. Das sekretierte $\Delta 280$ NcGRA9-HA hingegen war bevorzugt im vakuolären Raum verteilt. $\Delta 201$ NcGRA9-HA war stets nur innerhalb der Parasiten zu detektieren. Dort war das Protein größtenteils im paranukleären Bereich verteilt. Die beiden anderen verkürzten Proteine $\Delta 237$ NcGRA9-HA und $\Delta 81$ NcGRA9-HA konnten mittels Immunfluoreszenzanalyse nicht nachgewiesen werden.

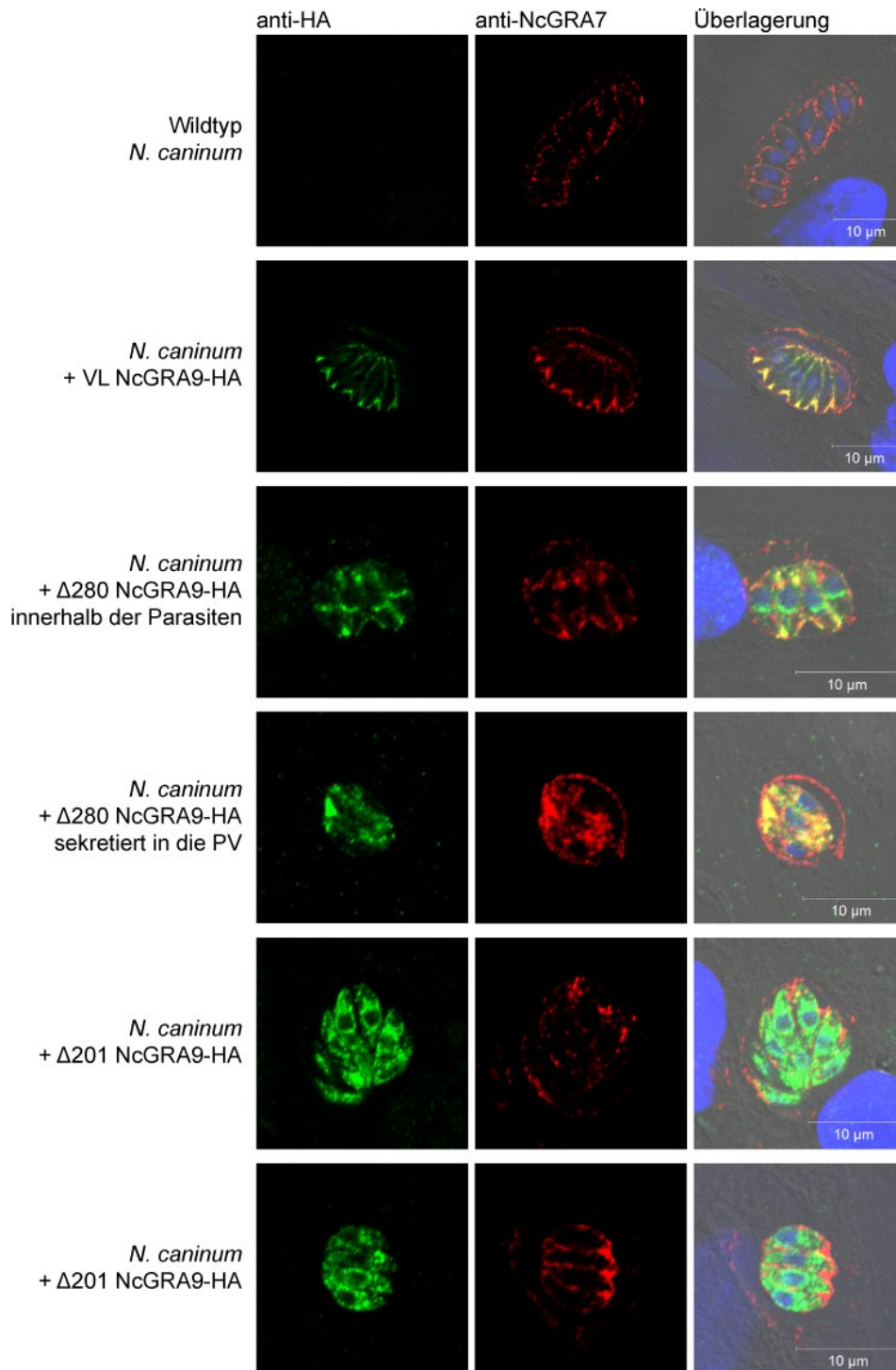


Abbildung 4.38 Lokalisationsanalyse der transfizierten NcGRA9-HA-Varianten in *N. caninum* infizierten Wirtszellen. Es wurde gezeigt, dass Vollängen NcGRA9-HA in die PV sekretiert wird und dort auch im Bereich der PVM lokalisiert ist. $\Delta 280$ NcGRA9-HA wurde entweder innerhalb der Parasiten detektiert, wo es apikal der Zellkerne akkumulierte, oder sekretiert in die PV. $\Delta 201$ NcGRA9-HA war ausschließlich innerhalb der Parasiten lokalisiert und dabei verstärkt im paranukleären Bereich. Der Maßstabsbalken steht für 10 μm . Anti-HA ist in grün und anti-NcGRA7 in rot dargestellt, die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt.

Da deutlich wurde, dass $\Delta 280$ NcGRA9-HA in *N. caninum* infizierten Wirtszellen sowohl sezerniert als auch parasitengebunden vorlag, wurde bestimmt, zu welchem Prozentsatz das Protein innerhalb der Parasiten verbleibt und zu welchem Anteil das Protein sekretiert wird.

Dafür wurden in drei unabhängigen Immunfluoreszenzanalysen jeweils 100 Vakuolen ausgezählt und das unterschiedliche Lokalisationsverhalten als Prozentsätze in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 4.39). Es wurde deutlich, dass 54,3 % der Vakuolen sekretiertes $\Delta 280$ NcGRA9-HA aufwiesen und in 45,6 % $\Delta 280$ NcGRA9-HA nur innerhalb der Parasiten zu finden war.

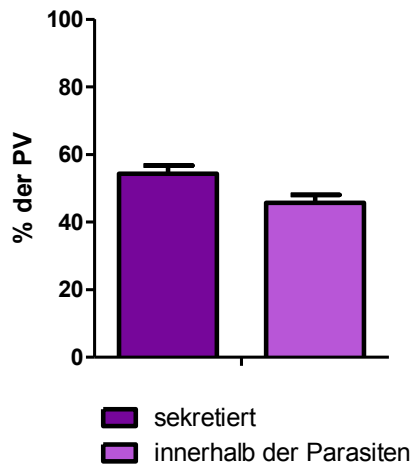


Abbildung 4.39 Lokalisationsverhalten von $\Delta 280$ NcGRA9-HA in der PV beziehungsweise den intrazellulären Parasiten. Es wurden je 100 PV aus drei unabhängigen Immunfluoreszenzanalysen ausgezählt.

4.9.3. Einfluss der Expression von verkürzten Varianten des NcGRA9-Proteins auf die Viabilität der Parasiten

Um zu überprüfen, ob die transfizierten NcGRA9-HA-Varianten einen Einfluss auf das Wachstum von *N. caninum* vermitteln, wurden Proliferationstests durchgeführt.

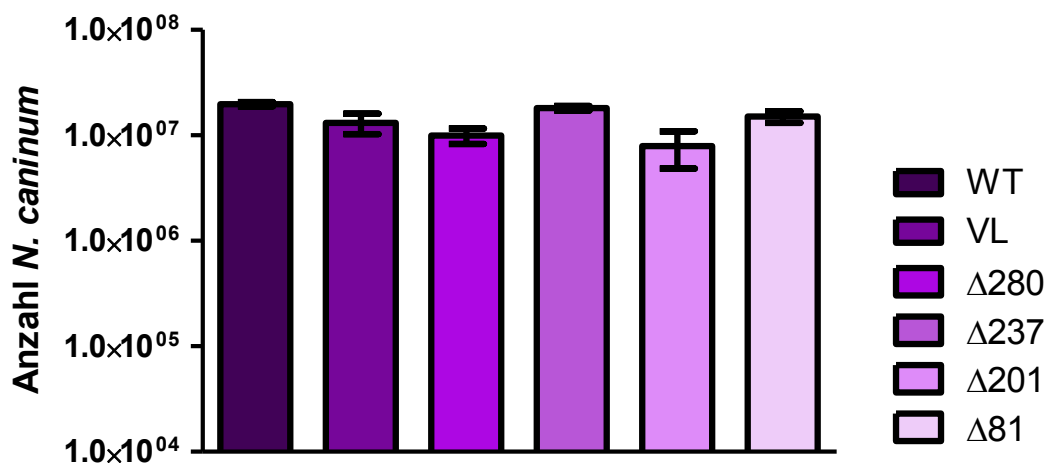


Abbildung 4.40 Wachstumsverhalten der transfizierten *N. caninum* im Vergleich zu Wildtyp-*N. caninum*. HFF wurden mit 1×10^5 *N. caninum*-Tachyzoiten der unterschiedlichen Klone infiziert. Nach drei Tagen wurde die Anzahl der Parasiten mittels qPCR bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen.

Dazu wurden HFF mit *N. caninum* infiziert und nach drei Tagen Kultur die Anzahl der transfizierten *N. caninum* pro Kultur mit der von Wildtyp-*N. caninum* mittels quantitativer Real Ti-

me-PCR verglichen (Abbildung 4.40). Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der verschiedenen *N. caninum*-Klone.

4.9.4. Analyse des Sekretionsverhaltens der C-terminal verkürzten NcGRA9-Proteine

In den folgenden Experimenten wurde analysiert, ob die C-terminalen Deletionen des NcGRA9-Proteins einen Einfluss auf das Sekretionsverhalten vermitteln. Um die Sekretion der NcGRA9-HA-Varianten über einen Zeitraum von 24 h zu verfolgen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Wirtszellinfektion Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Volllängen NcGRA9-HA war bereits nach 20 min innerhalb der PV zu detektieren (Abbildung 4.41). Nach der Sekretion akkumulierte das Protein lateral des Parasiten und 4 h nach Infektion war Volllängen NcGRA9-HA auch tiefer im vakuolären Raum zu finden. 8 h nach der Infektion war Volllängen NcGRA9-HA bereits im Bereich der PVM zu detektieren.

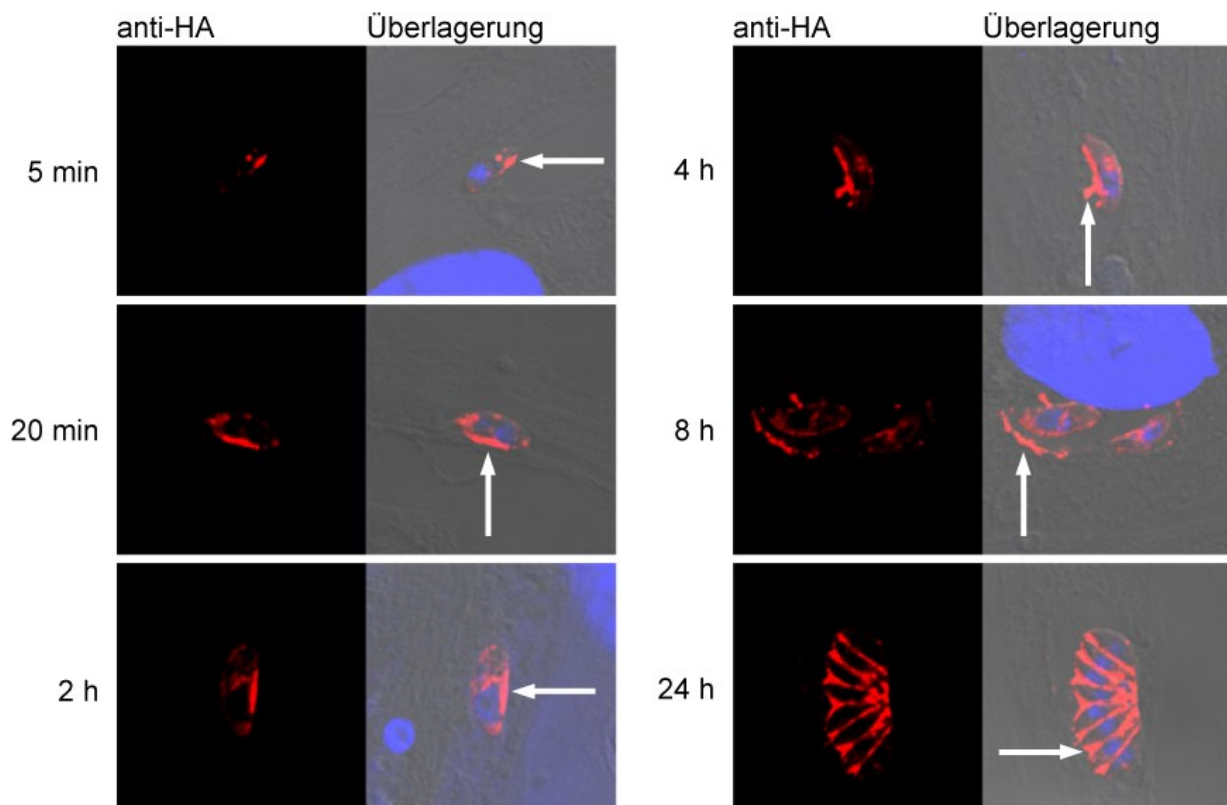


Abbildung 4.41 Kinetik der Sekretion von Volllängen NcGRA9-HA. Die Pfeile deuten auf die im Text beschriebene Lokalisierung von Volllängen NcGRA9-HA (rot) hin. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Das Sekretionsverhalten von $\Delta 280$ NcGRA9-HA wurde ebenfalls untersucht und das Ergebnis ist in Abbildung 4.42 dargestellt. Das HA-markierte Protein war bis zu einem Zeitpunkt von 2 h nach Infektion nur innerhalb der Parasiten zu detektieren. 4 h nach Infektion konnte $\Delta 280$ NcGRA9-HA in der PV lateral des Parasiten gefunden werden. Nach 8 h war eine Akkumulation des Proteins seitlich von *N. caninum* festzustellen. Erst 24 h nach Infektion war

$\Delta 280$ NcGRA9-HA in ca. 50 % der Klone im tieferen vakuolären Raum detektierbar.

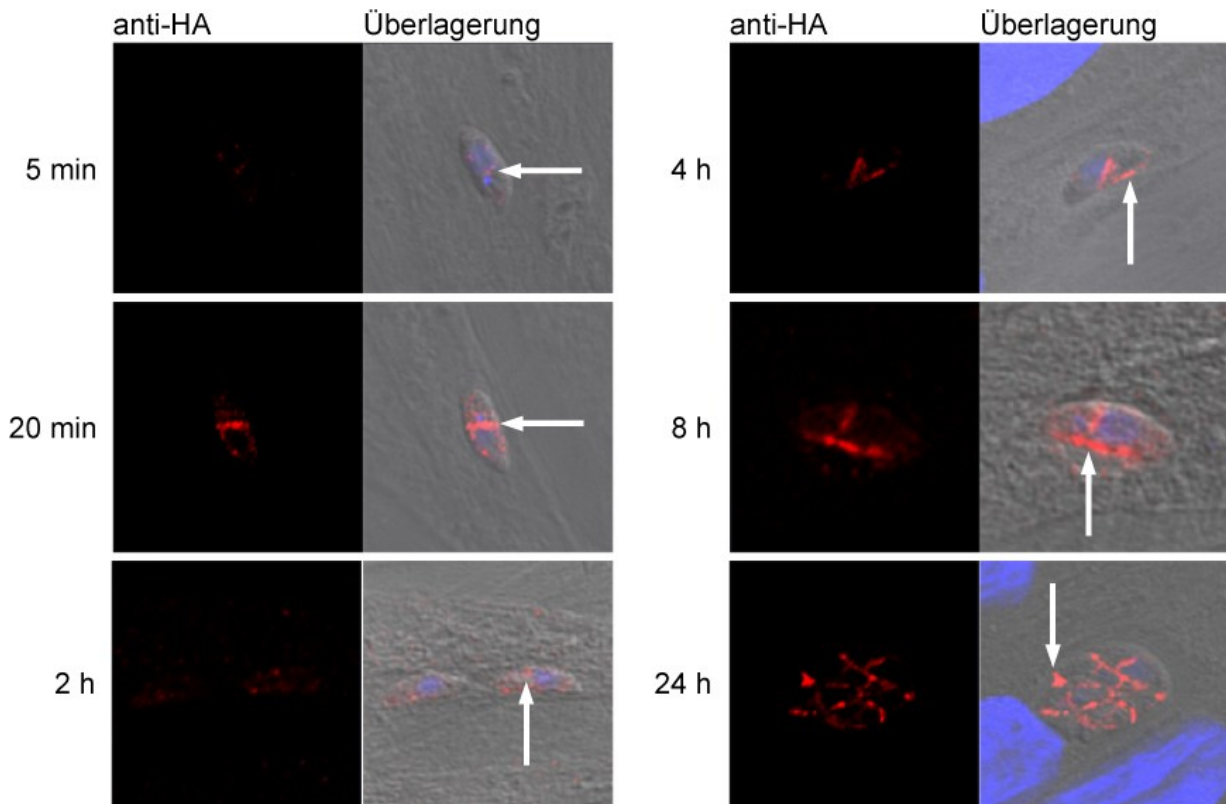


Abbildung 4.42 Sekretionsverhalten von $\Delta 280$ NcGRA9-HA zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Pfeile deuten auf die im Text beschriebene Lokalisierung von $\Delta 280$ NcGRA9-HA (rot) hin. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt.

Als dritte NcGRA9-HA-Variante wurde auch $\Delta 201$ NcGRA9-HA analysiert (Abbildung 4.43). Es zeigte sich, dass das Protein bis zu 24 h nach Infektion ausschließlich innerhalb der *N. caninum*-Tachyzoiten zu detektieren war.

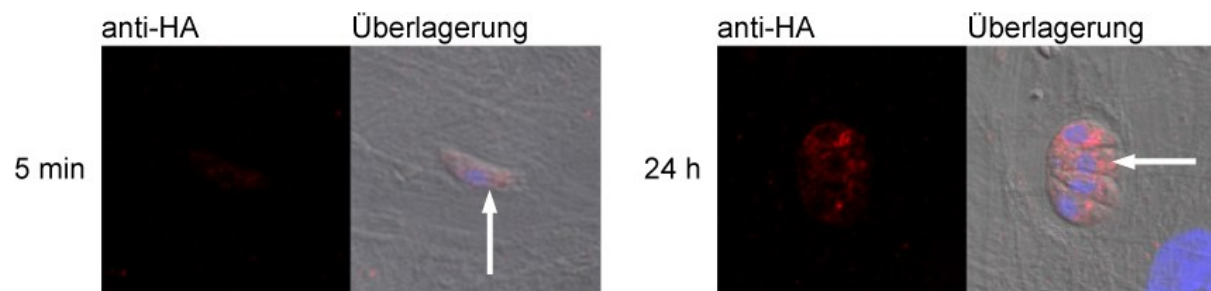


Abbildung 4.43 Analyse der Lokalisation von $\Delta 201$ NcGRA9-HA über einen Zeitraum von 24 h. 5 min nach Infektion war $\Delta 201$ NcGRA9-HA (rot) innerhalb von *N. caninum* zu finden. Auch zu den weiteren analysierten Zeitpunkten war das Protein nur innerhalb der Tachyzoiten zu detektieren, was am Beispiel der Analyse der infizierten Wirtszellen 24 h nach Infektion demonstriert wird. Die Pfeile deuten auf die im Text beschriebene Lokalisierung von $\Delta 201$ NcGRA9-HA hin. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Die hier gezeigten Daten legen nahe, dass die bei Aminosäure 280 und Aminosäure 201 verkürzten Proteine im Vergleich zu Vollängen NcGRA9-HA und endogenem NcGRA9 ein

verändertes Sekretionsverhalten zeigen. Dies wurde in einem zweiten funktionellen Ansatz überprüft. Dabei wurde die Sekretion der Proteine durch extrazelluläre Parasiten analysiert. Dazu wurden freie Tachyzoiten in serumreichem Medium für 1 min, 30 min und für 360 min inkubiert und die Kulturüberstände mittels Western Blot-Analysen auf exkretierte/sekretierte Antigene (ESA) untersucht (Abbildung 4.44). Für Vollängen NcGRA9-HA wurde deutlich, dass die Menge des rekombinanten Proteins im Überstand über die Zeit zunahm. Das C-terminal trunkeerte Protein $\Delta 280$ NcGRA9-HA war erst nach 6 Stunden in geringen Mengen im Überstand zu finden. $\Delta 201$ NcGRA9-HA konnte bei der ESA-Analyse nicht identifiziert werden.

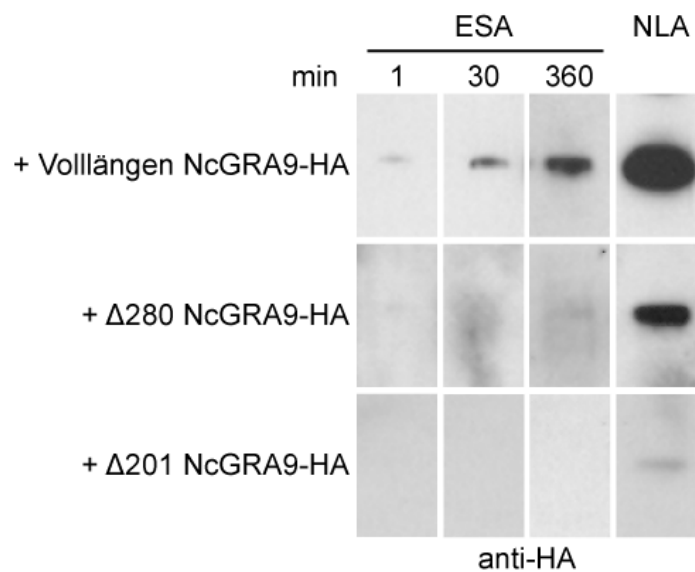


Abbildung 4.44 Analyse der ESA-Präparation von Parasiten, die verschiedene NcGRA9-HA-Varianten exprimieren. Vollängen NcGRA9-HA konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt im ESA-haltigen Überstand nachgewiesen werden und die Proteinmenge nahm über die Zeit zu. $\Delta 280$ NcGRA9-HA war nur in geringen Mengen nach 360 min im Überstand detektierbar. $\Delta 201$ NcGRA9-HA konnte zu keinem Zeitpunkt in den ESA-haltigen Überständen nachgewiesen werden. Als Vergleich wurde 20 μg NLA von Wirtszellen, die mit den entsprechend transfizierten *N. caninum* infiziert waren, aufgetragen. ESA wurde von 1×10^8 Tachyzoiten / ml präpariert und 15 μl wurden aufgetragen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die C-terminal verkürzten Proteine $\Delta 280$ NcGRA9-HA und $\Delta 201$ NcGRA9-HA sowohl während des Wachstums in der parasitophoren Vakuole als auch während der Produktion von ESA vermindert sekretiert werden. Dabei kann man ausschließen, dass dies auf einer toxischen Wirkung beruht, da die Produktion dieser beiden Proteine keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Parasiten zeigt.

4.10. Identifikation möglicher Interaktionspartner von NcGRA9

Um mögliche Interaktionspartner von NcGRA9 nach der Sekretion in die PV zu identifizieren, wurden Ko-Immünpräzipitationen durchgeführt. Dafür wurden Wirtszellen für 24 Stunden mit Vollängen NcGRA9-HA transfizierten *N. caninum* infiziert. Die Zellen wurden danach geern-

tet und lysiert. Das Lysat wurde mit anti-HA Antikörpern präzipitiert und über Protein G-gekoppelte Agarose aufgereinigt. Als Kontrolle wurde das Lysat von Wirtszellen, die mit Wildtyp-*N. caninum* infiziert waren, ebenfalls mit anti-HA-Antikörpern präzipitiert und aufgereinigt. Da nur eine begrenzte Anzahl von *N. caninum*-spezifischen Antikörpern in unserem Labor verfügbar war, wurden die aufgereinigten Proben zunächst massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden *N. caninum*-Proteine identifiziert, welche mögliche Interaktionspartner von NcGRA9 sein könnten. Es wurde ein Quotient aus der „label-free quantification“- (LFQ-) Intensität der unterschiedlichen Proteine des Präziptats im Verhältnis zur LFQ-Intensität in der Kontrolle berechnet. Ab einem Schwellenwert von 2,0 wurden die detektierten Proteine als potentielle Interaktionspartner von NcGRA9 betrachtet. Bei dieser Analyse wurde NcMAG1, welches ein bekanntes *N. caninum*-Protein ist, als mutmaßlicher Interaktionspartner von NcGRA9 identifiziert (Tabelle 4.3). Im Vergleich dazu erreichte NcGRA7 nicht den Schwellenwert von 2,0, was gegen eine Interaktion von NcGRA7 mit NcGRA9 spricht.

Tabelle 4.3 Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation, die mittels Massenspektrometrie ausgewertet wurde. Es wurde deutlich, dass NcMAG1 mit einem Verhältnis von 6,85 über dem Schwellenwert von 2,0 lag und somit als Interaktionspartner von NcGRA9 in Frage kommt. Der entsprechende Wert von NcGRA7 (1,26) lag unter dem Schwellenwert und daher ist es unwahrscheinlich, dass NcGRA7 mit NcGRA9 direkt interagiert.

Proteinname	Genname	LFQ-Intensität Kontrolle	LFQ-Intensität Komplex	Verhältnis Komplex/Kontrolle
GRA9 Protein	NCLIV_066630	10289000	702420000	68,27
GRA7 Protein	NCLIV_021640	22943000	28808000	1,26
MAG1 Protein	NCLIV_036410	78995000	540860000	6,85

In einem weiteren Schritt wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht, ob nach Invasion in die Wirtszelle eine Kolokalisation von NcGRA9 und NcMAG1 zu finden ist (Abbildung 4.45). Es zeigte sich, dass die beiden Proteine innerhalb der PV in der Nähe der Tachyzoiten kolokalisierten. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Immunfluoreszenzanalysen mit anti-NcGRA9 und anti-NcGRA7 erzielt (siehe Abbildung 4.15). Eine Kolokalisierung in der Immunfluoreszenz ist ein Hinweis auf eine mögliche Protein-Protein-Interaktion, kann jedoch auch auf einer räumlichen Nähe der Proteine ohne direkte Interaktion beruhen.

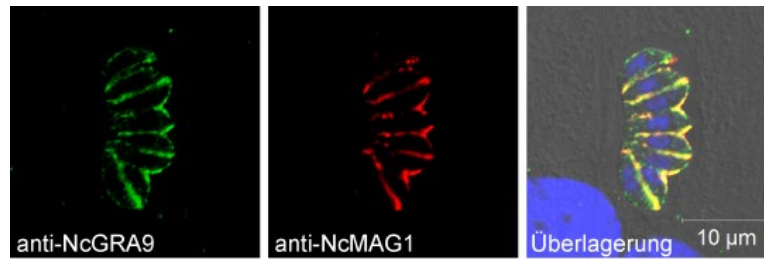


Abbildung 4.45 Analyse der Kolokalisation von NcGRA9 und NcMAG1 nach Wirtzellinvasion. Mittels Immunfluoreszenzanalyse wurde die Lokalisierung von NcGRA9 und NcMAG1 innerhalb der PV untersucht. NcGRA9 (grün) zeigt eine Kolokalisation mit NcMAG1 (rot) innerhalb der PV in der Nähe der Tachyzoiten. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt (blau). Der Maßstabsbalken steht für 10 µm.

Daher wurde in einem orientierenden Experiment das nach Inkubation mit anti-HA-Antikörper erhaltene Präzipitat im Western Blot analysiert. Dazu wurden die Proben mit Antikörpern gegen HA, NcMAG1 und NcGRA7 ausgewertet. Es wurde deutlich, dass in dem Präzipitat aus Vollängen NcGRA9-HA transfizierten Parasiten eine stärkere Detektion von NcMAG1 zu finden war als in dem Kontrollpräzipitat aus Wildtyp-Parasiten (Abbildung 4.46). NcGRA7 war in beiden Ansätzen nicht detektierbar.

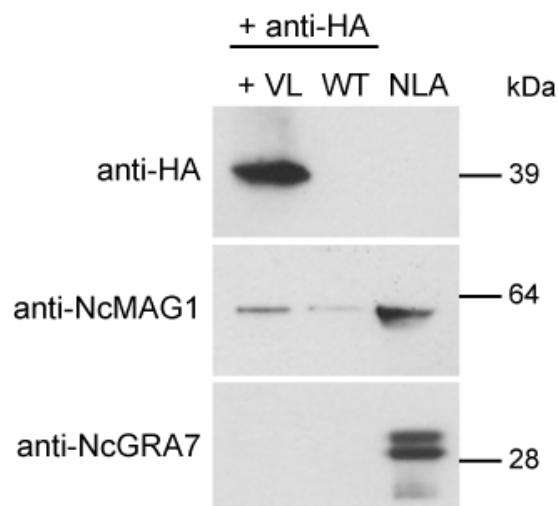


Abbildung 4.46 Auswertung der Ko-Immunpräzipitation mittels Western Blot-Analyse. Lysat von Vollängen NcGRA9-HA exprimierenden und Wildtyp-*N. caninum* wurde mit anti-HA-Antikörpern präzipitiert, um mögliche NcGRA9-HA-enthaltende Proteinkomplexe zu isolieren. Anschließend wurden die Ansätze mittels Western Blot mit anti-HA, anti-NcMAG1 und anti-NcGRA7 analysiert. 20µg NLA von Wildtyp-*N. caninum* wurde als Vergleich aufgetragen.

Dieses Ergebnis belegt, dass NcMAG1 ein möglicher Interaktionspartner von NcGRA9 ist. Allerdings muss diese mögliche Interaktion in weiteren Analysen bestätigt werden.

5. Diskussion

Neospora caninum ist phylogenetisch nah verwandt mit *Toxoplasma gondii* und beide Mikroorganismen gehören dem Stamm der Apicomplexa an, welcher ausschließlich obligat intrazelluläre Parasiten umfasst. *T. gondii* wird als Modellorganismus für diese Parasitengruppe angesehen. Viele komplexe Vorgänge wie Invasion, Fortbewegung, Stoffwechsel und Wirtszellmodifikationen sind in *T. gondii* detailliert untersucht worden. Aufgrund der phylogenetisch nahen Verwandtschaft zwischen *T. gondii* und *N. caninum* wird für einige funktionelle Vorgänge angenommen, dass diese in *N. caninum* ähnlich ablaufen. Dies gilt insbesondere für die Wirtszellinvasion und die Fortbewegung. Für viele der bei Wirtszellinvasion und Fortbewegung von *T. gondii* wichtigen Proteine konnten homologe Proteine in *N. caninum* identifiziert werden, wodurch die Hypothese bekräftigt wird, dass diese Prozesse vergleichbar ablaufen. Allerdings bestehen zwischen *T. gondii* und *N. caninum* gravierende Unterschiede im Bezug auf das Wirtsspektrum und den Endwirt. Zum Beispiel ist *T. gondii* ein wichtiges Humanpathogen, wohingegen es keinen überzeugenden Beweis für eine *N. caninum* Infektion beim Menschen gibt (Graham et al., 1999; Tranas et al., 1999). Worauf diese Unterschiede in den Wirtsspektren beruhen, ist bisher nicht abschließend geklärt. Dies deutet aber darauf hin, dass trotz der vielen bestehenden Homologien zwischen Proteinen der beiden phylogenetisch nah verwandten Parasiten nicht der Schluss gezogen werden kann, dass alles, was für *T. gondii* gilt, auch für *N. caninum* zutrifft (Hemphill et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde das dichte Granula-Protein NcGRA9 von *N. caninum* beschrieben. Es zeigte sich, dass dieses Protein homolog zu dem vor einigen Jahren beschriebenen TgGRA9 von *T. gondii* ist (Nockemann et al., 1998). Die hier durchgeführten Analysen legten dar, dass NcGRA9 zu den dichte Granula-Proteinen von *N. caninum* gezählt werden kann. Ein N-terminales Signalpeptid, die Lokalisation innerhalb der dichte Granula, das Sekretionsverhalten und das abweichende Molekulargewicht in der SDS-PAGE verglichen mit dem theoretisch berechneten sind die Charakteristika, welche NcGRA9 als dichte Granula-Protein definieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *N. caninum*-Isolat NC-1 für die Analysen verwendet. Dieses Isolat wurde 1988 aus dem Gehirn eines von Geburt an infizierten Hundes in den Vereinigten Staaten von Amerika isoliert (Dubey et al., 1998a). Von *N. caninum* wurden verschiedene Isolate beschrieben, die mittels Multilokus-Microsatellit-Analysen voneinander zu unterscheiden sind. Die Isolate besitzen eine unterschiedliche Pathogenität in Mäusen (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernandez et al., 2006; Pereira Garcia-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Rojo-Montejo et al., 2009). So ist bekannt, dass das Isolat NC-Liverpool *in vitro* und *in vivo* eine höhere Virulenz besitzt als das Isolat NC-1. Auch bei *T.*

gondii sind Isolate unterschiedlicher Virulenz bekannt, wobei Subtypen des Rhoprien-Proteins TgROP18 eine unterschiedliche Virulenz definieren. Bei hochvirulenten Stämmen ist TgROP18 in der Lage, die bei der Toxoplasmenabwehr wichtigen IRGs (immunity-related GTPases) durch Phosphorylierung zu inaktivieren, während TgROP18 von niedrigvirulenten Stämmen nicht zu einer IRG-Inaktivierung fähig ist (Fentress et al., 2010; Steinfeldt et al., 2010). Analysen des homologen Proteins NcROP18 in *N. caninum* haben ergeben, dass NcROP18 in *N. caninum* aufgrund von mehreren, die Sequenz unterbrechenden Stopcodons ein Pseudogen ist und daher IRGs nicht inaktivieren kann (Reid et al., 2012). Dies ließ sich experimentell bestätigen. Es ließ sich zeigen, dass Interferon- γ - (IFN- γ -) induzierte IRGs und auch Guanylat-bindende Proteine (GBPs) an der Abwehr gegen NC-Liverpool aber auch gegen NC-1 beteiligt sind (Spekker et al., 2012). Da Modifikationen einzelner Proteine so starke Einflüsse auf die Virulenz von Apicomplexa vermitteln können und neben TgROP18 auch TgROP16 (Saeij et al., 2006; Saeij et al., 2007), TgROP5 (Behnke et al., 2012), TgGRA3 (Craver und Knoll, 2007) und TgGRA15 (Rosowski et al., 2011) ebenfalls Virulenz-determinanten sein können, wurde überprüft, ob sich die NcGRA9-Proteinsequenzen von hoch- und niedrigvirulenten *N. caninum*-Isolaten unterscheiden. Hier konnten keine Sequenzunterschiede gefunden werden. NcGRA9 kann also nicht für die unterschiedliche Virulenz von NC-1 und NC-Liverpool verantwortlich gemacht werden.

5.1. Beschreibung der genomischen Organisation von *Ncgra9*

Die Sequenz des *Ncgra9*-Gens liegt auf Chromosom XII des *N. caninum*-Genoms. Die kodierende Sequenz besteht aus 1697 Basenpaaren und enthält ein Intron. Die genomische Sequenz eines mutmaßlichen NcGRA9-Proteins wurde in der Datenbank ToxoDB veröffentlicht, die das gesamte Genom des *N. caninum*-Isolats NC-Liverpool beinhaltet. In dieser Datenbank wurde auch das in dieser Arbeit bestätigte Intron vorhergesagt, das einen typischen Spleißdonor und einen typischen Spleißakzeptor aufweist (Berg et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Ncgra9* als Einzelkopie im *N. caninum*-Genom vorliegt. Verglichen mit der genomischen Sequenz von *Tggra9* aus *T. gondii* zeigten sich Gemeinsamkeiten. In *Tggra9* ist ebenfalls ein Intron vorhanden und es liegt zudem als eine Einzelkopie im *T. gondii*-Genom vor (Nockemann et al., 1998). Außerdem besteht der offene Leserahmen (open reading frame, ORF) von *Ncgra9* sowie von *Tggra9* aus 957 Nukleotiden. Diese Ergebnisse belegen, dass *Ncgra9* auf genomischer Ebene viele Gemeinsamkeiten mit dem bekannten *Tggra9* zeigt.

5.2. Charakterisierung funktioneller Domänen des Proteins NcGRA9

Der ORF von *Ncgra9* kodiert für 318 Aminosäuren und das theoretische Molekulargewicht des Proteins beträgt 34,9 kDa. Bei einem Sequenzvergleich mit TgGRA9 konnte eine Identität von 60 % zwischen den Aminosäuren festgestellt werden, wobei die identischen Bereiche ziemlich gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt sind. Somit sind die beiden homologen Proteine der beiden phylogenetisch nah verwandten Parasiten relativ ähnlich. Der Vergleich anderer homologer dichte Granula-Proteine von *N. caninum* und *T. gondii* zeigte niedrigere Sequenzidentitäten. Zum Beispiel weisen NcGRA1 und TgGRA1 53 % (Atkinson et al., 2001), NcGRA2 und TgGRA2 52 % (Ellis et al., 2000), NcGRA6 und TgGRA6 33,5 % (Liddell et al., 1998), NcGRA7 und TgGRA7 42 % (Howe und Sibley, 1999) und NcMAG1 und TgMAG1 54 % (Guionaud et al., 2010) Sequenzidentität auf.

In der NcGRA9-Proteinsequenz konnte mittels *in silico*-Analyse eine hydrophobe N-terminale Signalsequenz bestimmt werden, die aus 21 Aminosäuren besteht. Es ist bekannt, dass alle Proteine, die in den dichte Granula lokalisieren, ein N-terminales Signalpeptid besitzen (Mercier et al., 2005). Eine entsprechende Sequenz wurde auch in der Proteinsequenz von TgGRA9 gefunden (Nockemann et al., 1998). Das N-terminale Signalpeptid ist in *T. gondii* und anderen Apicomplexa für die Translokation des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) von Bedeutung. Dort wird das Signalpeptid entfernt und das reife Protein wird weiter über den Golgi-Komplex zu den Zielorganellen transportiert (Kaasch und Joiner, 2000). Die Sekundärstruktur von NcGRA9 weist auf Domänen hin, die einen Einfluss auf die Funktion und Lokalisation des Proteins haben könnten. Die Aminosäuren 82 – 101 bieten die Voraussetzungen, eine amphipathische Alpha-helix auszubilden. Für TgGRA9 wurde für den gleichen Sequenzbereich die Möglichkeit zur Ausprägung einer Alpha-helix mit amphipathischem Charakter vorhergesagt (Adjogble et al., 2004). Die Konservierung dieser Sekundärstruktur könnte auf eine Rolle der amphipathischen Alpha-helix bei der Funktion oder Lokalisierung von GRA9 beider Parasiten hinweisen. Es ist bekannt, dass amphipathische Alpha-helices zur Interaktion mit Membranen befähigt sind. Allerdings zeigt die amphipathische Alpha-helix von NcGRA9 keine Anhäufung an basischen Aminosäuren, die für die Interaktion mit negativ geladenen Membranen (Drin et al., 2007) optimal wäre. Daher bleibt die Funktion dieser Alpha-helix in NcGRA9 weiterhin unklar.

Amphipathische Alpha-helices sind in den dichte Granula-Proteinen von *N. caninum* und *T. gondii* selten beschrieben. Nur in der Sequenz von GRA2 beider Parasiten wurden mehrere amphipathische Alpha-helices beschrieben (Ellis et al., 2000; Mercier et al., 1993; Travier et al., 2008), jedoch bisher nur in *T. gondii* charakterisiert. Die Gruppe von Mercier (Mercier et al., 1998) konnte nachweisen, dass TgGRA2 von *T. gondii*, in welchem diese Alpha-helices deletiert wurden, nicht mehr in der Lage ist, an die Membranen des vakuolären Netzwerks in der PV zu binden.

Eine weitere auffällige Domäne in der Proteinsequenz des überwiegend hydrophilen NcGRA9 ist eine Alphahelix mit hydrophobem Charakter. Diese hydrophobe Alphahelix ist mit 14 Aminosäuren zu kurz, um eine Transmembrandomäne auszubilden. Um den 3 nm breiten Kohlenwasserstoffkern von Membranen zu überbrücken, müsste die Alphahelix aus mindestens 20 Aminosäuren bestehen (Berg et al., 2003). Die funktionelle Bedeutung der hydrophoben Alphahelix könnte daher in hydrophoben Wechselwirkungen mit anderen *N. caninum*-Proteinen liegen. Auffällig ist außerdem, dass die Aminosäuren 201 – 215 innerhalb dieser Domäne eine hundertprozentige Übereinstimmung beim Vergleich von NcGRA9 und TgGRA9 aufweisen. Dies könnte bedeuten, dass dieser Bereich für die Funktion von GRA9 in den beiden Parasiten unerlässlich und daher konserviert ist.

Am C-Terminus von NcGRA9 ist eine prolin- (P), glutaminsäure- (E), serin- (S) und threonin- (T) reiche Sequenz zu finden. Eine derartige PEST-Domäne, in welcher saure Aminosäuren vermehrt vorkommen, ist oft in Proteinen zu finden, die eine kurze Halbwertszeit in der Zelle haben (Rogers et al., 1986). Außerdem ist bekannt, dass prolinreiche Regionen eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen (Kay et al., 2000). In TgGRA9 ist ebenfalls im C-terminalen Bereich eine PEST-Sequenz zu finden. Allerdings ist die PEST-Domäne in NcGRA9 mit 22 Aminosäuren länger als die TgGRA9 PEST-Domäne mit 17 Aminosäuren. Interessant wäre es, die Halbwertszeit von einer trunkierten NcGRA9-Variante zu untersuchen, welcher die PEST-Domäne fehlt. Außerdem könnten durch das Fehlen der PEST-Region Interaktionen von NcGRA9 mit anderen Proteinen gestört sein. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit PEST-deletiertem TgGRA9 von *T. gondii* ergaben keine Unterschiede im Targetingverhalten im Vergleich zu Wildtyp-TgGRA9 (Spekker, 2008). Untersuchungen zu Proteininteraktionen beziehungsweise zur Halbwertszeit mit diesem Toxoplasma-Protein stehen jedoch ebenfalls noch aus.

5.3. Kreuzreaktion polyklonaler Antiseren gegen NcGRA9 und TgGRA9

Nach der *in silico*-Analyse von NcGRA9 sollte das Protein molekularbiologisch und im Hinblick auf funktionelle Eigenschaften charakterisiert werden. Dazu wurden spezifische Antikörper benötigt, um NcGRA9 in den verschiedenen Versuchsansätzen nachweisen zu können. In dieser Arbeit wurde ein polyklonales Antiserum gegen rekombinantes NcGRA9 hergestellt.

Die Vorteile von polyklonalen Antiseren gegen das gesamte Protein sind, dass die größtmögliche Anzahl an linearen Epitopen für die Generierung von Antikörpern bereitgestellt wird. Außerdem bestehen bei dieser Methode die besten Möglichkeiten, Antikörper zu erhalten, die für viele verschiedene experimentelle Methoden anwendbar sind. Allerdings besteht das Risiko, dass polyklonale Antiseren gegen das gesamte Protein neben der spezifischen Detektion auch häufiger mit anderen Proteinen kreuzreagieren als polyklonale Peptidantiseren.

Die Immunisierung mit rekombinantem NcGRA9 war erfolgreich, denn es wurden Antikörper produziert, die spezifisch gegen NcGRA9 gerichtet sind. Außerdem zeigten die beiden aus Kaninchen erhaltenen Antiseren Kreuzreaktivität gegen das homologe Protein TgGRA9 von *T. gondii*. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass eine sechzigprozentige Sequenzidentität zwischen NcGRA9 und TgGRA9 besteht.

Für *T. gondii* und auch für *N. caninum* wurden immundominante Proteine beschrieben, die von Tachyzoiten sekretiert werden und als exkretierte/sekretierte Antigene (ESA) bezeichnet werden. Die Proteine der dichte Granula werden auch zu den ESA gezählt (Cesbron-Delauw, 1994). Um ESA zu gewinnen, werden Tachyzoiten unter wirtszellfreien Bedingungen in serumhaltigem Medium inkubiert. Unter diesen Bedingungen setzen die Tachyzoiten auch NcGRA9 frei. Damit gehört NcGRA9 wie alle dichte Granula-Proteine zu den exkretierten/sekretierten Antigenen von *N. caninum*.

Zur Diagnose einer Neosporose in Rindern werden häufig Antikörper gegen rekombinante Antigene zum Beispiel NcSAG1, NcSRS2 und NcGRA2 (Dong et al., 2012) bestimmt. Da TgGRA9 als Zielantigen bei der Diagnose einer humanen Toxoplasmose geeignet erscheint, wurde analysiert, ob auch NcGRA9 von *N. caninum* zum Einsatz in diagnostischen Testkits geeignet wäre.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kreuzreaktivität der anti-NcGRA9-Kaninchenantiseren mit einem Protein von *T. gondii* beschrieben werden. Die Antikörper gegen NcGRA9 erkennen in Western Blot-Analysen ein *T. gondii*-Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kDa, das entspricht der Größe von TgGRA9. In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass die anti-NcGRA9-Antiseren auch rekombinantes TgGRA9 erkennen. Diese Kreuzreaktion von anti-NcGRA9-Antikörpern mit TgGRA9 war nicht nur in Western Blot-Analysen sondern auch mittels Immunfluoreszenzanalysen detektierbar.

Um zu untersuchen, ob diese Kreuzreaktivität eine Rolle in der Serodiagnostik einer bovinen Neosporose spielen könnte, wurden Seren von Rindern, die natürlich mit *N. caninum* infiziert waren (erhalten von G. Schares, Wusterhausen), in Western Blot-Analysen auf ihre Reaktivität sowohl gegen rekombinantes NcGRA9 als auch gegen rekombinantes TgGRA9 getestet. Dabei wurde deutlich, dass einige Seren mit beiden Antigenen reagierten, wobei andere nur rekombinantes NcGRA9 erkannten oder keines der beiden rekombinanten Proteine detektierten. Das bedeutet, dass auch *in vivo* in einem Teil der *N. caninum*-Infektionen anti-NcGRA9-Antikörper gebildet werden, die monospezifisch für NcGRA9 sind und zusätzlich Antikörper, die mit NcGRA9 und TgGRA9 reagieren. Andererseits bilden nicht alle infizierten Tiere anti-NcGRA9-Antikörper aus. Tatsächlich konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass ein Großteil der Patienten mit einer Toxoplasmose Antikörper gegen TgGRA9 bilden, während einige Patienten keine Antikörper gegen TgGRA9 entwickelten. Ähnliche Befunde wur-

den in unserer Arbeitsgruppe auch bei der Analyse von Seren experimentell infizierter Mäuse beziehungsweise Schweine erhoben.

Nach diesen Befunden ist NcGRA9 somit kein geeignetes Antigen in diagnostischen serologischen Tests auf eine bovine Neosporose. Bei positiven Befunden müsste eine eventuelle Toxoplasmose des betroffenen Tieres noch ausgeschlossen werden. Für die Diagnose einer Neosporose in Rindern wurden bereits Antigene beschrieben, die sich als geeignet erwiesen haben, beispielsweise die oben genannten Antigene NcSAG1, NcSRS2 und NcGRA2 (Dong et al., 2012).

5.4. Lokalisierungsverhalten von NcGRA9 in *Neospora caninum*-Tachyzoiten

Nachdem die polyklonalen Antiseren gegen rekombinantes NcGRA9 verfügbar waren, konnten weiterführende Analysen des endogenen Proteins angeschlossen werden. Zunächst wurde das Lokalisierungsverhalten von NcGRA9 innerhalb von extrazellulär vorliegenden *N. caninum*-Tachyzoiten analysiert. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Bei der konfokalen Mikroskopie wird zu jedem Zeitpunkt nur ein Bruchteil des Präparats beleuchtet und nicht wie bei der konventionellen Lichtmikroskopie das gesamte Präparat. Da nur eine einzige, vertikale Ebene des Präparats beleuchtet wird, sinkt die Beleuchtungsstärke ober- und unterhalb der Brennebene. Somit wird Streulicht aus anderen Brennebenen reduziert (Madigan et al., 2001). In den aus ihren Wirtszellen freigesetzten Tachyzoiten detektierten die beiden anti-NcGRA9-Antiseren ihr Zielantigen in einem punktförmigen Muster, welches über die gesamten Parasiten verteilt war. Dies deutet auf eine Lokalisierung von NcGRA9 innerhalb der dichte Granula hin, da für diese sekretorischen Organellen ein ähnliches, punktförmiges Verteilungsmuster im Parasiten bekannt ist (Speer et al., 1999). Dieselbe Lokalisierung konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits für TgGRA9 in extrazellulären *T. gondii*-Tachyzoiten gezeigt werden (Adjogble et al., 2004). Für NcGRA7 wurde ebenfalls eine Lokalisation innerhalb der dichte Granula beschrieben (Lally et al., 1997). Bei der gleichzeitigen Darstellung von NcGRA9 und NcGRA7 in extrazellulären Tachyzoiten konnte eine partielle Kolo-kalisation innerhalb der dichte Granula gezeigt werden. Bei dem Vergleich von NcGRA9 mit NcMIC1 beziehungsweise NcSAG1 wurde keine Kolo-kalisation detektiert. NcMIC1 ist in den Mikronemen im anterioren Bereich des Tachyzoiten lokalisiert (Keller et al., 2002) und NcSAG1 ist ein Oberflächenprotein von *N. caninum* (Hemphill et al., 1997).

Um das Lokalisationsverhalten von NcGRA9 auch innerhalb der parasitophoren Vakuole zu untersuchen, wurden HFF mit *N. caninum*-Tachyzoiten infiziert und nach 24 Stunden mittels Immunfluoreszenz analysiert. Es wurde deutlich, dass die beiden anti-NcGRA9-Antiseren ihr Zielantigen unter diesen Bedingungen hauptsächlich außerhalb der Tachyzoiten innerhalb der PV detektierten. Das zeigt, dass NcGRA9 wie auch die anderen bekannten dichte Gra-

nula-Proteine nach der Wirtszellinvasion in die PV sekretiert wird. NcGRA9 war in der Nähe der Tachyzoiten, im tieferen vakuolären Raum und teilweise im Bereich der PVM zu finden. Damit entspricht die Verteilung von NcGRA9 innerhalb der PV von *N. caninum* der bereits beschriebenen Verteilung von TgGRA9 in *T. gondii* (Nockemann et al., 1998).

Die Sekretion in die PV kann darauf hindeuten, dass NcGRA9 eine Bedeutung bei der Etablierung und Funktion der PV hat. Für einige dichte Granula-Proteine in *T. gondii* konnte gezeigt werden, dass diese beim Aufbau des intravakuolären Netzwerks in der PV beteiligt sind und für den Nährstofftransport von der Wirtszelle in die PV sorgen. Es wird zudem vermutet, dass dichte Granula-Proteine für die Ausübung ihrer Funktionen multimere Komplexe miteinander bilden (Labruyere et al., 1999; Mercier et al., 2005; Travier et al., 2008). So ist zum Beispiel in *T. gondii* ein Multiproteinkomplex bestehend aus TgGRA2, TgGRA4 und TgGRA6 beschrieben (Labruyere et al., 1999). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine Interaktion von TgGRA9 mit den *T. gondii*-Proteinen TgGRA1, TgGRA3 und TgGRA5 gezeigt (Spekker, 2008). Außerdem konnte TgGRA7 von unserer Arbeitsgruppe als weiterer Interaktionspartner von TgGRA9 identifiziert werden. Um einen ersten Eindruck für mögliche Interaktionspartner von NcGRA9 zu erhalten, wurde zunächst die Lokalisation von NcGRA9 im Vergleich zu bekannten *N. caninum*-Proteinen nach Wirtszellinvasion analysiert. Es zeigte sich, dass NcGRA9 teilweise mit dem dichte Granula-Protein NcGRA7 kolokalisierte, vor allem in den Bereichen um die Tachyzoiten herum. Diese Kolokalisation deutet lediglich eine räumliche Nähe der beiden Proteine zueinander an, ist allerdings kein Beweis für eine direkte Interaktion von NcGRA9 mit NcGRA7. NcGRA7 wurde in größeren Mengen im Bereich an der PVM detektiert als NcGRA9. Die bevorzugte Lokalisation von NcGRA7 im Bereich der PVM passt gut zu der Tatsache, dass NcGRA7 eine potentielle Transmembrandomäne (Lally et al., 1997) aufweist, die in NcGRA9 nicht identifiziert werden konnte. Für NcGRA7 wurde bereits beschrieben, dass es nach Wirtszellinvasion am tubulären Netzwerk und an der PVM lokalisiert ist (Hemphill et al., 1998; Schares et al., 1999). In *T. gondii* wurde gezeigt, dass TgGRA7 durch eine Interaktion mit TgROP2 und TgROP4 am Targeting von Wirtszellorganellen an die PVM beteiligt ist (Dunn et al., 2008). Ferner ist TgGRA7 nach Befunden der Arbeitsgruppe Coppens et al. (2006) wichtig bei der Aufnahme von Lipiden in die PV. Weitere Befunde dieser Arbeitsgruppe belegen, dass auch TgGRA9 an Liposomen bindet und somit vielleicht auch an der Cholesterolaufnahme beteiligt sein könnte (Coppens et al., 2006).

5.5. Lokalisierungsverhalten von NcGRA9 in *Neospora caninum*-Bradyzoiten

Tachyzoiten stellen das Parasitenstadium dar, welches in der akuten Phase einer Infektion zu finden ist. Nach einiger Zeit im Zwischenwirt vollziehen die Parasiten eine Stadienkonversion, wodurch diese zu Bradyzoiten differenzieren. Dieses Stadium ist typischerweise während der chronischen Phase einer Infektion zu finden. Die Bradyzoiten liegen in Gewebezys-

ten vor und können vom Immunsystem des Wirtes nur schwer eliminiert werden. Die in den Gewebezysten lokalisierten Bradyzoiten sind auch für antiparasitär wirksame Medikamente wie Pyrimethamin/Sulfadiazin nicht zugänglich. Somit verbleiben Bradyzoiten auch bei einer antiparasitären Therapie vital und können zu einem anderen Zeitpunkt erneut Ausgangspunkt einer Parasitenreaktivierung werden (Gormley et al., 1998). Ferner sind Bradyzoiten bei der Infektion von Endwirten von Bedeutung. So sind bei *T. gondii* nur die Bradyzoiten in der Lage Enterozyten des Wirts zu infizieren und so die geschlechtliche Vermehrungsphase einzuleiten (Peng et al., 2011).

In vitro kann eine Stadienkonversion von *N. caninum*-Tachyzoiten in Bradyzoiten induziert werden, indem Natriumnitroprussid (sodium nitroprusside, SNP) dem Kulturmedium zugesetzt wird (Vonlaufen et al., 2002). SNP setzt Stickstoffmonoxid (NO) frei, das zum Beispiel mit Eisen-Atomen im Hämoglobin, der Cytochrom-c-Oxidase und Eisen in den katalytischen Zentren vieler Enzyme der Atmungskette reagiert. Daraus resultieren eine Abnahme der ATP-Produktion und eine verminderte Bindung von Sauerstoff an die Cytochrom-c-Oxidase. Die Anpassung der Parasiten an eine erniedrigte Energieproduktion und an eine anaerobe Umgebung könnte diese Stadiendifferenzierung veranlassen (Cooper, 1999). Eine Stadienkonversion in Bradyzoiten hat den Vorteil, dass langsam replizierende Bradyzoiten einen niedrigeren Energiebedarf als Tachyzoiten haben. NO ist auch *in vivo* bei der Induktion der *T. gondii* Stadienkonversion beteiligt. Dabei wird NO durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zum Beispiel in murinen Makrophagen (Scharton-Kersten et al., 1997) oder in murinen mesenchymalen Stammzellen (Meisel et al., 2011) nach Stimulation mit IFN- γ und weiteren Zytokinen (IL-1 und TNF- α) produziert. Die iNOS ist auch ein wichtiger antiparasitärer Effektormechanismus gegen *N. caninum* in murinen Makrophagen (Tanaka et al., 2000). Ob die iNOS auch beim Menschen zur Abwehr gegen *N. caninum* beiträgt, ist unklar, da humane Zellen im Vergleich zu murinen Zellen nur wenig iNOS-Aktivität besitzen (Meisel et al., 2011).

Vonlaufen et al. (2002) beschreiben, dass die Induktion einer *in vitro*-Stadienkonversion am Erfolgreichsten mit Vero-Zellen und dem *N. caninum*-Isolat NC-Liverpool erzielt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings HFF als Wirtszellen und das *N. caninum*-Isolat NC-1 verwendet. Wie die Immunfluoreszenzanalysen belegen, konnte auch unter diesen Bedingungen eine eindeutige Stadienkonversion von Tachyzoiten in Bradyzoiten induziert werden. Nach etwa vier Tagen NO-Exposition *in vitro* stellen die Parasiten ihre Genexpression dem Bradyzoitenstadium entsprechend um und das bradyzoitenspezifische Protein BAG1 ist nachweisbar, während die Expression des tachyzoitenspezifischen Markers SAG1 reduziert wird (McAllister et al., 1996). Ein weiterer Hinweis für die erfolgreiche Stadienkonversion von Tachyzoiten in Bradyzoiten ist die Verteilung von NcGRA7. In Bradyzoiten kommt NcGRA7 verstärkt in der Zystenwand vor (Vonlaufen et al., 2004). Diese NcGRA7-

Anreicherung war auch in den, im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, *N. caninum*-Bradyzoiten nachweisbar. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die dichte Granula-Proteine NcGRA1 und NcGRA2 bevorzugt in der Nähe der Zystenwand lokalisiert sind (Vonlaufen et al., 2004). NcGRA9 hingegen ist zusätzlich auch im Inneren der Zyste deutlich nachweisbar. Eine *in vitro*-Stadienkonversion in Bradyzoiten wurde in dieser Arbeit auch mit *N. caninum*-Tachyzoiten, die rekombinantes Vollängen NcGRA9-HA exprimieren, durchgeführt. In Bradyzoiten war das rekombinante NcGRA9 ebenfalls nicht nur im Bereich der Zystenwand sondern auch im Inneren der Zyste nachweisbar.

5.6. Posttranslationale Modifikationen von NcGRA9

Das NcGRA9-Protein von *N. caninum* hat ein theoretisches Molekulargewicht von 34,9 kDa, ist jedoch in der SDS-PAGE als ein 39 kDa Protein detektierbar. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wären posttranslationale Modifikationen des Proteins. Über 100 verschiedene posttranslationale Proteinmodifikation sind bekannt, dabei sind reversible Phosphorylierungen die häufigsten posttranslationale Modifikationen, die alle wesentlichen zellulären Prozesse beeinflussen (Ciesla et al., 2011). Bei einer Phosphorylierungsreaktion, welche durch Proteinkinasen katalysiert wird, wird die endständige (γ -)Phosphorylgruppe von ATP auf spezifische Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste übertragen. Proteinphosphatasen hingegen können Phosphorylgruppen hydrolytisch von Proteinen entfernen. Durch den Mechanismus der Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird die Aktivität des Zielproteins aufgrund struktureller, thermodynamischer, kinetischer und regulatorischer Gründe gesteuert (Berg et al., 2003).

Die Aminosäuresequenz von NcGRA9 weist mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen auf, die nach den Befunden dieser Arbeit auch *in vivo* genutzt werden. Dies ergibt sich aus der Tatsache das NcGRA9 von intrazellulären *N. caninum*-Tachyzoiten nach Entfernung von Phosphorylierungen mittels Lambda Proteinphosphatase (LPP) ein erniedrigtes Molekulargewicht aufweist. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass NcGRA9 erst während oder nach der Sekretion in die PV phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von NcGRA9 könnte für dessen Funktion oder Interaktion mit anderen Proteinen von Bedeutung sein. Zur endgültigen Bestätigung dieser Phosphorylierung wären jedoch weitere Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen Phosphorylierungen sinnvoll. Die Untersuchungen mit LPP ergaben außerdem, dass NcGRA9, das in den dichte Granula gespeichert ist, nicht phosphoryliert ist. In den dichte Granula wird NcGRA9 vermutlich nur gespeichert und übt seine Funktion sehr wahrscheinlich erst nach Phosphorylierung während oder nach der Sekretion innerhalb der PV aus.

Für TgGRA7 aus *T. gondii* wurde beschrieben, dass das Protein erst nach Invasion in die Wirtszelle phosphoryliert wird (Dunn et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft,

ob sich NcGRA7 von *N. caninum* genau wie das homologe TgGRA7 im Bezug auf Phosphorylierungen verhält. Wie in Abbildung 4.21 gezeigt, wird NcGRA7 von *N. caninum* während oder nach der Sekretion phosphoryliert und konnte daher als Positivkontrolle für die beschriebenen Phosphorylierungsuntersuchungen von NcGRA9 verwendet werden. Das Phosphoproteom von *T. gondii* wurde vor kurzem analysiert und es konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass sich eine beträchtliche Anzahl phosphorylierter *T. gondii*-Proteine außerhalb des Parasiten, aber in der PV befanden (Treeck et al., 2011). Für diese Proteine wird vermutet, dass sie erst während oder kurz nach der Sekretion phosphoryliert werden. Für die phosphorylierten Parasitenproteine, die im Lumen der PV zu finden sind, wird angenommen, dass diese durch parasiteneigene Kinasen phosphoryliert werden. Die Rhoptrien enthalten unter anderem Proteine mit Kinasefunktion und diese könnten für die Phosphorylierungen innerhalb der PV zuständig sein. In der Arbeit von Treeck et al. (2011) gibt es auch Hinweise auf eine Phosphorylierung von TgGRA7, phosphoryliertes TgGRA9 konnte von dieser Arbeitsgruppe in *T. gondii* jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Daten zum Phosphoproteom wurden mit Lysaten von *T. gondii* erhoben, entsprechende Arbeiten mit *N. caninum* stehen jedoch noch aus. Aus dem Vergleich der *T. gondii*- und *N. caninum*-Daten zur Phosphorylierung von GRA9 ergeben sich jedoch parasitenspezifische Unterschiede, deren funktionelle Bedeutung noch unklar ist.

Da aber die bestehende Differenz zwischen dem theoretischen und dem tatsächlichen Molekulargewicht nicht allein mit Phosphorylierungen zu erklären ist, wurde in dieser Arbeit auch eine mögliche Glykosylierung von NcGRA9 überprüft. Es konnten jedoch keine O-Glykosylierungen nachgewiesen werden und *in silico*-Analysen haben die Abwesenheit von potentiellen N-Glykosylierungsstellen gezeigt. Die Differenz zwischen dem theoretischen und dem tatsächlichen Molekulargewicht von NcGRA9 könnte jedoch auch durch den Prolinreichtum (8,2 %) erklärt werden. Eine Häufung von Prolinen in der Primärsequenz kann für eine verminderte elektrophoretische Mobilität verantwortlich sein, da Proline Knicke und eine strukturelle Starrheit der Proteine verursachen (Hames, 1998). So ist zum Beispiel auch TgGRA8 ein prolinreiches dichte Granula-Protein und dieser Prolinreichtum wurde für die Differenz zwischen dem theoretischen (28 kDa) und tatsächlichen (38 kDa) Molekulargewicht verantwortlich gemacht (Carey et al., 2000).

5.7. Analyse des Löslichkeitsverhaltens von NcGRA9 in den dichte Granula

NcGRA9 von *N. caninum* ist in extrazellulären Tachyzoiten hauptsächlich innerhalb der dichte Granula nachweisbar. In infizierten Wirtszellen ist NcGRA9 größtenteils im Inneren der PV detektierbar. Bisher war unklar, ob NcGRA9 in den dichte Granula oder innerhalb der PV mit dort vorhandenen membranösen Strukturen interagiert, ob es in Multiproteinkomplexen gebunden ist oder ob es frei löslich vorliegt. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde in

dieser Arbeit das Lösungsverhalten des NcGRA9 in Parasitenlysaten nach Triton X-114-Partitionierung beziehungsweise nach differentieller Zentrifugation analysiert.

Das überwiegend hydrophile Protein NcGRA9 liegt in extrazellulären Tachyzoiten in den dichte Granula vor. Zur Klärung des Löslichkeitsverhaltens von NcGRA9 wurde zunächst eine Triton X-114-Partitionierung vorgenommen. Bei dieser Methode werden die Proteine entsprechend ihrer Affinität zur hydrophoben beziehungsweise hydrophilen Umgebung getrennt (Bordier, 1981). Der größte Anteil von NcGRA9 war in der wässrigen Phase zu finden, was dem für NcGRA9 vorhergesagten Lösungsverhalten entspricht. Eine geringe Menge NcGRA9 lag jedoch auch in der hydrophoben Phase vor, was darauf hindeutet, dass NcGRA9 auch an Proteinaggregaten assoziiert beziehungsweise an membranösen Strukturen gebunden vorliegt. Proteinaggregate werden nach Befunden aus *T. gondii* insbesondere im Kern der dichte Granula erwartet (Labruyere et al., 1999).

Die hier durchgeführte Triton X-114 Partitionierung wurde bereits mehrfach zur Analyse von *N. caninum*-Proteinen verwendet. So findet sich NcGRA7 besonders in der Detergensphase (Hemphill et al., 1998), ebenso NcMIC3 (Sonda et al., 2000). NcSAG1 findet sich teilweise in der hydrophoben Fraktion aber auch in großen Mengen in dem nach Detergenslyse entstehenden Sediment (Hemphill et al., 1997; Howe et al., 1998; Sonda et al., 1998), wobei NcGRA7 und NcGRA9 nur in geringen Mengen im Sediment vorhanden sind. Dieses Sediment besteht zum großen Teil aus unlöslichen Parasitenbruchstücken, was die deutliche Präsenz des Oberflächenproteins NcSAG1 in diesem Sediment erklärt. Da das Verhalten dieser drei verschiedenen Proteine nach Detergenslyse bekannt war, wurden diese Proteine als Kontrolle für die Qualität der hier durchgeführten Triton X-114-Partitionierung verwendet.

Die subzelluläre Verteilung von NcGRA9 innerhalb der extrazellulären Tachyzoiten und somit innerhalb der dichte Granula wurde außerdem untersucht, indem Fraktionierungsexperimente mittels Ultrazentrifugation durchgeführt wurden. Dabei wird das durch mehrmaliges Einfrieren/Auftauen gewonnene Lysat in vier Fraktionen aufgetrennt. NcGRA9 ist zu einem relativ hohen Anteil im „low speed“ Pellet (LSP) nachweisbar, in dem sich größere Parasitenbruchstücke befinden. Das deutet darauf hin, dass das eigentlich hydrophile NcGRA9 eine starke Assoziation mit parasitären Strukturen/Organeln eingeht, die das Protein in der unlöslichen Debrisfraktion zurückhalten. Eine vergleichbare Menge von NcGRA9 verblieb im „low speed“ Überstand (LSÜ) und konnte durch Ultrazentrifugation weiter aufgetrennt werden. Danach fand sich NcGRA9, entsprechend seiner hydrophilen Eigenschaften, zum Teil im „high speed“ Überstand (HSÜ). Der anderer Teil des NcGRA9 fand sich im „high speed“ Pellet (HSP), in dem besonders Proteinaggregate und membranöse Strukturen angereichert sind. Als Kontrollproteine wurden NcGRA7 und NcSAG1 eingesetzt. NcGRA7 wurde als Kontrollprotein gewählt, weil von TgGRA7 von *T. gondii* bekannt ist, dass es in extrazellulären Parasiten hauptsächlich membrangebunden vorkommt (Neudeck et al., 2002), Daten zu

NcGRA7 sind bisher nicht bekannt. In den in dieser Arbeit vorgestellten Analysen war NcGRA7 sowohl als lösliches als auch als membrangebundenes Protein nachweisbar. Dies ist ein Hinweis dafür, dass sich NcGRA7 und TgGRA7 in den dichte Granula extrazellulärer Parasiten unterschiedlich verhalten. Für andere dichte Granula-Proteine von *T. gondii* wie TgGRA4, TgGRA6 (Labruyere et al., 1999) und TgGRA9 (Adjogble et al., 2004) ist bekannt, dass diese in den dichte Granula sowohl löslich als auch aggregiert vorkommen und sich somit ähnlich wie das hier analysierte NcGRA9 verhalten. Als weiteres Kontrollprotein wurde das Oberflächenprotein NcSAG1 verwendet, das in den hier durchgeführten Analysen hauptsächlich in allen membranhaltigen Fraktionen (LSP, LSÜ und HSP) zu finden war. Dies entspricht exakt den Befunden, die von Labruyere et al. (1999) für TgSAG1 von *T. gondii* publiziert wurden. Zusammenfassend belegen die Daten der Triton X-114-Partitionierung als auch die der Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation, dass NcGRA9 in den dichte Granula von Tachyzoiten sowohl löslich als auch membran-/proteinaggregatgebunden vorkommt.

Um die Art der Interaktion von NcGRA9 in den dichte Granula mit Membranen oder Proteinaggregaten zu klären, wurde das HSP mit verschiedenen destabilisierenden Agenzien behandelt. Da nur eine Behandlung mit 6 M Urea zu einer vollständige Freisetzung von NcGRA9 aus dem Sediment führt, kann gefolgert werden, dass NcGRA9 in den dichte Granula hauptsächlich in Proteinaggregaten gebunden vorliegt. Unspezifische Bindungen beziehungsweise direkte Membraninteraktionen sind weitestgehend auszuschließen, da Kaliumchlorid, Igepal und Triton X-114 NcGRA9 nicht nennenswert aus dem Sediment herauslösen konnten.

5.8. Analyse des Löslichkeitsverhaltens von NcGRA9 innerhalb der parasitophoren Vakuole

Da dichte Granula-Proteine ihre präsumtive Funktion innerhalb der PV ausüben und in den dichte Granula wahrscheinlich nur gespeichert werden, ist die Interaktion von NcGRA9 mit Strukturen innerhalb der PV von besonderer Bedeutung. Eine Lyse der Parasiten mittels Triton X-114 ist für diese Analysen nicht hilfreich, jedoch kann auch hier eine Fraktionierung durch Ultrazentrifugation zur Analyse des Löslichkeitsverhaltens beitragen.

Für diese Untersuchungen wurden die infizierten Wirtszellen mechanisch ohne Trypsinbehandlung geerntet und durch mehrfache Passagen durch eine 25 G-Kanüle lysiert. Dadurch werden sowohl die Wirtszellen als auch die PV zerstört, die Parasiten selbst bleiben jedoch intakt und können durch Zentrifugation eliminiert werden. Durch den Verzicht auf Trypsin in der Aufarbeitung kann ausgeschlossen werden, dass diese exogene Protease die dichte Granula-Proteine degradiert. Das so gewonnene Lysat besteht aus Zytoplasma und Organellen der Wirtszelle und aus dem parasitenfreien Inhalt der PV und kann mittels Ultrazentrifugation weiter aufgetrennt werden. Nach den hier erhaltenen Befunden liegt NcGRA9 sowohl

in einer löslichen Form im vakuolären Raum vor als auch membranengebunden beziehungsweise assoziiert an Proteinaggregate. Als Kontrollproteine bei dieser Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation dienten wieder NcGRA7, welches sich in der parasitophoren Vakuole wie TgGRA7 verhält (Neudeck et al., 2002), und NcSAG1, welches sich TgSAG1-entsprechend verhält (Travier et al., 2008).

Auch in diesem Ansatz wurde die Natur der Interaktion von NcGRA9 mit Strukturen im „high speed“ Pellet (HSP) mittels Löslichkeitsanalysen untersucht. Auffallend ist dabei, dass auch hier nur eine Behandlung mit 6 M Urea eine vollständige Lösung von NcGRA9 aus dem HSP erlaubt. Damit scheint NcGRA9 insbesondere über Protein-Protein-Interaktionen im Sediment gebunden zu sein. Eine genauere Analyse ergab jedoch auch, dass NcGRA9 zumindest teilweise durch Natriumhydrogenkarbonat (pH 11) aus dem Pellet gelöst werden kann. Dies deutet darauf hin, dass NcGRA9 möglicherweise mit peripheren Membranproteinen interagiert. Ein ähnlicher, wenn auch schwächer ausgeprägter Effekt war auch bei der Analyse des Sediments von extrazellulären Parasiten zu beobachten.

Bisher sind keine dichte Granula-Proteine von *N. caninum* als periphere Membranproteine beschrieben, jedoch weisen NcGRA3 (Henriquez et al., 2005), NcGRA6 (Liddell et al., 1998) und NcGRA7 (Lally et al., 1997) potentielle Transmembrandomänen auf. Da NcGRA9 nach den, in dieser Arbeit erhaltenen, Befunden eher mit peripheren Membranproteinen interagiert, ist eine direkte Interaktion von NcGRA9 mit NcGRA3, NcGRA6, NcGRA7 eher unwahrscheinlich. Detaillierte Untersuchungen in *T. gondii* ergaben, dass TgGRA1 (Nam, 2009), TgGRA2 (Mercier et al., 1993) und TgGRA9 (Nockemann et al., 1998) keine Transmembrandomänen besitzen. TgGRA2 (Mercier et al., 1993) und TgGRA9 (Adjogble et al., 2004) können nach den bisher bekannten Daten mit Membranen in der PV interagieren, während es sich bei TgGRA1 um ein in der PV überwiegend lösliches Protein handelt (Sibley et al., 1995). Detaillierte Untersuchungen zu einer NcGRA2/NcGRA9 Interaktion waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da keine NcGRA2-spezifischen Antikörper vorlagen und der anti-TgGRA2-Antikörper nicht mit NcGRA2 kreuzreagiert.

5.9. Identifikation möglicher Interaktionspartner von NcGRA9

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NcGRA9 von *N. caninum* nach Wirtszellinvasion in die PV sekretiert wird. Es wird angenommen, dass die dichte Granula-Proteine Funktionen bei der Aufrechterhaltung der PV, der Proliferation der Parasiten und dem Nährstofftransport von der Wirtszelle in die PV haben könnten. Deshalb wird vermutet, dass NcGRA9 seine Funktion erst nach Sekretion ausübt. Mittels Fraktionierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass NcGRA9 innerhalb der PV mit anderen Proteinen interagiert, da es sich nur durch Behandlung mit 6 M Urea aus der membran- und proteinaggregathaltigen Fraktion lösen lässt. Um eine mögliche Funktion von NcGRA9 herausfinden zu können, ist

es interessant, mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Dazu wurden orientierende Ko-Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt.

In diesen Analysen wurden extra- und intrazelluläre *N. caninum*-Tachyzoiten verwendet, die mit Vollängen NcGRA9-HA transfiziert waren. So konnte eine Kontrolle mit Wildtyp-Tachyzoiten benutzt werden, um unspezifische Präzipitationen durch den anti-HA-Antikörper auszuschließen. Die erhaltenen Präzipitate wurden zunächst mittels Massenspektrometrie (MS) untersucht. Dabei wurde als Positivkontrolle die Anwesenheit von NcGRA9 detektiert. Als bekanntes *N. caninum*-Protein wurde NcMAG1 in dem Präzipitat von intrazellulären Parasiten angereichert und damit als potentieller Interaktionspartner von NcGRA9 identifiziert.

NcMAG1 wird auch zu den dichte Granula-Proteinen gezählt und hat wahrscheinlich im Bradyzoitenstadium eine Funktion beim Aufbau der Zystenwand, worauf auch der andere Name, unter dem dieses Protein bekannt ist, „cyst matrix protein“, hindeutet (Guionaud et al., 2010). Bei der Charakterisierung von NcMAG1 wurde herausgefunden, dass das Protein in den verschiedenen Parasitenstadien exprimiert wird. NcGRA9 und NcMAG1 werden beide in *N. caninum*-Bradyzoiten exprimiert, dabei ist NcMAG1 nach Western Blot-Analysen von Parasitenlysaten in Bradyzoiten sogar stärker exprimiert als in Tachyzoiten. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe von Marugán-Hernández et al. (2010) eine verstärkte Expression von NcGRA9 in Bradyzoiten finden. Dieser Befund ergab sich aus differentieller Gelelektrophorese (differential gel electrophoresis, DIGE) gekoppelt mit Massenspektrometrie.

Analysen mittels Immunfluoreszenz ergaben, dass NcMAG1 in Tachyzoiten innerhalb der dichte Granula und in intrazellulären Parasiten auch im Lumen der PV nachweisbar ist. Innerhalb der PV ist NcMAG1 zumeist in der direkten Parasitennähe zu finden, geringere Mengen finden sich aber auch in der Peripherie der PV (Guionaud et al., 2010). Eine genaue Lokalisation im Bezug auf die PVM wurde jedoch nicht beschrieben. Zusätzliche immunogoldelektronenmikroskopische Analysen lassen jedoch vermuten, dass NcMAG1 auch mit Strukturen im Bereich des intravakuolären Netzwerks interagiert (Guionaud et al., 2010). Diese Verteilung von NcMAG1 ist damit der Verteilung von NcGRA9 sehr ähnlich. Eine potentielle Kolo-kalisation von NcGRA9 und NcMAG1 wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Ko-Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen. Die in Abbildung 4.45 dargestellten Daten zeigen eine räumliche Nähe der beiden Proteine innerhalb der PV. Eine Interaktion kann mittels Ko-Immunpräzipitationen identifiziert werden. Daher haben wir zur Bestätigung der durch MS-Analyse erhaltenen Ergebnisse zusätzlich Western Blot-Analysen mit den Immunpräzipitaten angeschlossen.

Dabei ergab sich, dass in dem Präzipitat, das mit anti-HA-Antikörpern erhalten wurde, NcMAG1 nachweisbar war. Das in der Immunfluoreszenzanalyse ebenfalls mit NcGRA9 zumindest teilweise kolo-kalisierte NcGRA7 war weder mittels MS- noch mittels Western Blot-

Analyse im Immunpräzipitat nach Inkubation mit anti-HA-Antikörpern nachweisbar. Damit ist NcGRA7 im Gegensatz zu NcMAG1 kein wahrscheinlicher Interaktionspartner von NcGRA9. Analysen mit *T. gondii* aus unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass in diesem Parasiten TgGRA7 ein Interaktionspartner von TgGRA9 ist. TgGRA7 in *T. gondii* ist als integrales Membranprotein in der PVM beschrieben. Die Untersuchungen zur Löslichkeit von membrangebundenem TgGRA9 haben ergeben, dass dieses wahrscheinlich mit einem integralen Membranprotein interagiert, denn es wurde durch Igepal aus der Membranfraktion herausgelöst. In *N. caninum* ist NcGRA9 dagegen nicht mit einem integralen Membranprotein assoziiert, denn es kann nicht mit Igepal aus der Membranfraktion isoliert werden. Dies kann als ein weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass NcGRA9 im Gegensatz zu TgGRA9 nicht mit GRA7 interagiert.

5.10. Heterologe Expression von NcGRA9 in *Toxoplasma gondii*

Aufgrund der phylogenetisch nahen Verwandtschaft von *N. caninum* mit *T. gondii* und der Tatsache, dass in *N. caninum* ein homologes NcGRA9 zu dem bekannten TgGRA9 gefunden wurde, wurde untersucht, wie sich transfiziertes NcGRA9-HA in *T. gondii* verhält. Dazu wurde die cDNA des Volllängen NcGRA9 in das Plasmidsystem pTUB ligiert. Es konnte schon in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass dieses System in *T. gondii* funktionell ist (Spekker, 2008). Da eine Kreuzreaktivität des anti-TgGRA9-Antiserums gegen NcGRA9 besteht, diente ein HA-Tag als Marker zum Nachweis des transfizierten Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs stabile *T. gondii*-Klonlinien etabliert, die transfiziertes NcGRA9-HA exprimierten. Immunfluoreszenzanalysen mit diesen Klonen ergaben eine identische Lokalisation von transfizierten NcGRA9-HA und endogenem TgGRA9 in extrazellulären Tachyzoiten. Nach Wirtszellinvasion wurde NcGRA9-HA hauptsächlich innerhalb der PV von *T. gondii* detektiert, auch dies entspricht exakt der Lokalisation des endogenen TgGRA9. Die Daten belegen, dass *N. caninum*-Proteine heterolog in *T. gondii* exprimiert werden können und dass in diesem Fall das heterologe NcGRA9 in die dichte Granula transportiert, dort richtig prozessiert und anschließend sekretiert wurde. Demnach ist nicht nur *N. caninum* ein geeigneter Organismus, um *T. gondii*-Proteine zu exprimieren und zu untersuchen (Beckers et al., 1997; Howe et al., 1997; Howe und Sibley, 1997), sondern auch *T. gondii* kann für die Analyse von *N. caninum*-Proteinen herangezogen werden. Besonders interessant ist es hier, in Zukunft zu analysieren, ob NcGRA9, das in *T. gondii* exprimiert wird, mit TgGRA7 von *T. gondii* interagiert und ob NcGRA9 in *T. gondii*, im Gegensatz zur Situation bei *N. caninum*, mit einem integralen Membranprotein assoziiert ist.

5.11. Analyse funktioneller Domänen von NcGRA9 mittels C-terminal trunkierter Proteine

Wie beschrieben ist es leicht durchführbar, mittels des pTUB-Plasmids *N. caninum*-Proteine in *T. gondii* zu exprimieren. In eigenen Vorarbeiten hat sich jedoch herausgestellt, dass der im pTUB-Plasmid enthaltene β -Tubulin-Promotor von *T. gondii* in *N. caninum* nicht funktionell ist. Erst nach Verwendung des modifizierten DHFR-TSc3-Plasmids war eine erfolgreiche Expression von rekombinanten Proteinen in *N. caninum* möglich. Da aus Vorbefunden anderer Arbeitsgruppen bekannt war, dass der DHFR-Promotor aus *T. gondii* in *N. caninum* funktionell ist, wurde das *Ncgra9-HA*-Gen unter Kontrolle dieses Promotors in das Plasmid eingebracht.

Erste Analysen mit NcGRA9-HA in *N. caninum* ergaben, dass sich dieses rekombinante Protein ähnlich verhält wie das native NcGRA9. In Immunfluoreszenzanalysen zeigte sich eine eindeutige Kolokalisation beider Proteine. Beide Proteine sind in den dichten Granula von extrazellulären Parasiten nachweisbar. Ebenso werden beide Proteine in die PV sekretiert und sind dort sowohl im vakuolären Raum als auch im Bereich der PVM lokalisiert. Fraktionierungsanalysen ergaben darüber hinaus, dass NcGRA9-HA ebenso wie natives NcGRA9 löslich in der PV vorkommt und zum Teil auch membrangebunden vorliegt.

Die Proteinsequenz von NcGRA9 bildet in der Sekundärstruktur Domänen aus, welche einen Einfluss auf das Verhalten des Proteins im Bezug auf Funktion, Lokalisierung und Interaktionen haben könnten. Aus Studien mit TgGRA9 ist bekannt, dass die Deletion einzelner, α -helicaler beziehungsweise hydrophober Regionen keinen Einfluss auf das Targetingverhalten des Proteins ausübt (Spekker, 2008). In dieser Arbeit wurde daher eine andere Strategie gewählt. Es wurden vier C-terminal trunkierte NcGRA9-Varianten in das DHFR-TSc3-Plasmidsystem ligiert und *N. caninum* wurde mit diesem Konstrukt transfiziert. Einem dieser Proteine, $\Delta 280$ NcGRA9-HA, fehlt die C-terminale PEST-Domäne mit der darin enthaltenen α -Helix. Das Protein $\Delta 237$ NcGRA9-HA wurde um einen weiteren α -helikalen Bereich verkürzt. Das Protein $\Delta 201$ NcGRA9-HA wurde zusätzlich um die hydrophobe α -Helix gekürzt und $\Delta 81$ NcGRA9-HA fehlt außerdem die amphipathische α -Helix.

Nach Transfektion wurden alle vier Gene von selektionierten Klonen transkribiert, aber nur drei der modifizierten Proteine waren in Western Blot-Analysen nachweisbar. $\Delta 81$ NcGRA9-HA war in Western Blot-Analysen nicht detektierbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die mRNA nicht suffizient translatiert wird oder dass das produzierte Protein schnell abgebaut wird. Auffällig war außerdem, dass die produzierten mRNA- und Proteinmengen der transfizierten Gene in unterschiedlichen Klonen verschieden waren, obwohl identische cDNA- beziehungsweise Proteinmengen für die Analysen eingesetzt wurden. Unterschiede des Expressionslevels in identisch hergestellten Klonen wurden bereits von Beckers et al. (1997) beschrieben, nachdem *N. caninum* mit DHFR-TSc3 transfiziert wurde. Allerdings konnten die Gründe für diese Unterschiede nicht abschließend geklärt werden. Sie könnten

auf eine zellzyklusspezifische Expression oder auf eine unterschiedlich häufige Transgeninsertion in das *N. caninum*-Genom zurückzuführen sein.

Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurde zunächst untersucht, ob die Transfektion von *N. caninum* mit den NcGRA9-HA-Varianten das Parasitenwachstum beeinflusst. Dafür wurde die Proliferation von Wildtyp-*N. caninum* mit der der stabilen Klonlinien mittels quantitativer Real-Time PCR verglichen. Die mit den verschiedenen NcGRA9-HA Varianten transfizierten Parasiten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten im Vergleich zu Wildtyp-*N. caninum*. Somit kann ein toxischer Effekt oder ein Vorteil durch zusätzliches Volllängen oder trunkiertes NcGRA9 für *N. caninum* ausgeschlossen werden.

Erste Analysen zum Targetingverhalten der verschiedenen Proteinvarianten wurden mittels Lysaten von *N. caninum* infizierten Wirtszellen, die mittels „low speed“-Zentrifugation aufgetrennt wurden, durchgeführt. Volllängen NcGRA9-HA konnte sowohl im Pellet als auch im Überstand detektiert werden, was bedeutet, dass das Protein teilweise löslich vorliegt aber auch, wahrscheinlich durch starke Protein-Protein-Interaktionen, im Parasitendebris zurückgehalten wird (Labruyere et al., 1999). Eine ähnliche Verteilung konnte auch für $\Delta 280$ NcGRA9-HA gezeigt werden. $\Delta 237$ NcGRA9-HA konnte jedoch nur im Überstand nachgewiesen werden genau wie $\Delta 201$ NcGRA9-HA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Bereich zwischen Aminosäure 201 und 280 für die Vermittlung der starken Protein-Protein-Interaktionen, die NcGRA9 ausbildet, zuständig ist. Unter anderem ist in diesem Bereich des Proteins die hydrophobe Alpha-helix lokalisiert, die zu Protein-Protein-Interaktionen beitragen könnte.

Das Lokalisierungsverhalten der C-terminal verkürzten NcGRA9-HA-Varianten nach Wirtszellinvasion wurde außerdem mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Dabei zeigte das Volllängen NcGRA9-HA dieselbe Verteilung wie das endogene NcGRA9 und zwar hauptsächlich innerhalb der PV in der Nähe der Parasiten und auch im Bereich der PVM. Im Vergleich dazu zeigte $\Delta 280$ NcGRA9-HA eine andere Verteilung. In etwa der Hälfte der analysierten PV wurde dieses C-terminal trunkierte Protein innerhalb der PV im vakuolären Raum detektiert, in den anderen Fällen war $\Delta 280$ NcGRA9-HA nur innerhalb der Parasiten, verstärkt anterior des Nukleus, zu finden. Diese Anreicherung anterior des Nukleus könnte bedeuten, dass $\Delta 280$ NcGRA9-HA im Golgi-Komplex zurückgehalten wird, der bei *N. caninum* anterior des Nukleus lokalisiert ist (Striepen et al., 2001). Das C-terminal trunkierte $\Delta 201$ NcGRA9-HA wurde ausschließlich innerhalb der Parasiten detektiert. Dabei war das Protein hauptsächlich rund um den Nukleus und somit im Bereich des Endoplasmatischen Retikulum (ER), zu finden. Diese paranukleäre Lokalisation deutet darauf hin, dass $\Delta 201$ NcGRA9-HA möglicherweise im ER zurückgehalten wird (Striepen et al., 2001). Dass Proteine im ER oder Golgi-Komplex zurückgehalten werden, kann auf ungenauen Proteinfaltungen beruhen. Diese fehlerhaft gefalteten Proteine werden von Chaperonkomplexen, welche eine

wichtige Funktion in der Qualitätskontrolle von neu synthetisierten Proteinen haben, zurückgehalten (Ellgaard et al., 1999) und später wahrscheinlich proteasomal abgebaut.

In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich die C-terminal verkürzten Proteine $\Delta 237$ NcGRA9-HA und $\Delta 81$ NcGRA9-HA mittels Immunfluoreszenzanalyse in intrazellulären Tachyzoiten nachzuweisen. Da $\Delta 81$ NcGRA9-HA schon in Western Blot-Analysen nicht detektierbar war, ist es nicht verwunderlich, dass in den Immunfluoreszenzanalysen, die weniger sensitiv sind, kein Signal erhalten wurde. Der fehlende Nachweis von $\Delta 237$ NcGRA9-HA mittels Immunfluoreszenzanalyse könnte quantitative Gründe haben, vielleicht wird dieses Protein weniger stark transkribiert oder das Genprodukt wird beschleunigt abgebaut.

5.12. Untersuchung des Sekretionsverhaltens der C-terminal trunkierten NcGRA9-Proteine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die transfizierten NcGRA9-HA-Varianten ein verändertes Sekretionsverhalten zeigen, wurde in einem zweiten Ansatz die Sekretionskinetik der verschiedenen trunkierten Proteine über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert.

Volllängen NcGRA9-HA war bereits nach 20 min im vakuolären Raum lateral des Tachyzoiten zu finden. Nach 4 Stunden war das Protein tiefer in den vakuolären Raum diffundiert und nach 8 Stunden konnte das Volllängen NcGRA9-HA zusätzlich im Bereich der PVM detektiert werden. Damit verläuft die Kinetik der Nc-GRA9-HA Freisetzung ähnlich wie die von TgGRA9 (Adjogble et al., 2004).

Im Vergleich dazu wurde das C-terminal verkürzte Protein $\Delta 280$ NcGRA9-HA verzögert in den vakuolären Raum sekretiert. Erst 4 Stunden nach der Invasion wurde dieses Protein im vakuolären Raum lateral der Tachyzoiten detektiert. Auch nach 24 Stunden konnte $\Delta 280$ NcGRA9-HA nicht im Bereich der PVM vorgefunden werden. Dies deutet auf ein verändertes Lokalisationsverhalten von $\Delta 280$ NcGRA9-HA im Vergleich zum Volllängen NcGRA9-HA hin. In weiterführenden Fraktionierungsanalysen müsste abgeklärt werden, ob $\Delta 280$ NcGRA9-HA in Proteinaggregaten assoziiert ist beziehungsweise an Membranen gebunden vorliegt.

Im gesamten analysierten Zeitraum konnte $\Delta 201$ NcGRA9-HA ausschließlich innerhalb der Tachyzoiten detektiert werden. In allen Fällen war eine paranukleäre Verteilung zu beobachten, was auf die bereits beschriebene Lokalisation des Proteins im ER hindeutet. Damit ist es unwahrscheinlich, dass das Protein überhaupt in die dichte Granula transportiert und nach der Wirtszellinvasion sekretiert werden kann.

In einer weiteren Experimentalserie wurde die Sekretion der NcGRA9-HA-Varianten durch wirtszellfrei kultivierte Tachyzoiten untersucht. Dazu wurden die exkretierten/sekretierten Antigene (ESA) von transfizierten *N. caninum* zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert. Dabei zeigte sich eindeutig, dass die Konzentration des Volllängen NcGRA9-HA im ESA-haltigen Überstand über die Zeit zunahm. Die ESA-Präparation aus Tachyzoiten, die mit

$\Delta 280$ NcGRA9-HA transfiziert wurden, zeigte eine deutlich langsamere Freisetzung dieses Proteins in den Überstand. $\Delta 201$ NcGRA9-HA konnte hingegen zu keinem Zeitpunkt in den ESA Präparationen detektiert werden.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der zwei C-terminal verkürzten NcGRA9-HA-Varianten $\Delta 201$ und $\Delta 280$ gezeigt werden, dass das Fehlen des C-Terminus das Sekretionsverhalten des Proteins beeinflusst. Das könnte im Einzelnen damit erklärt werden, dass das Protein $\Delta 201$ NcGRA9-HA im ER zurückgehalten wird, da es aufgrund der C-terminalen Deletion falsch gefaltet wurde. Somit gelangt $\Delta 201$ NcGRA9-HA nicht in die dichte Granula und kann demnach nicht von den Tachyzoiten sekretiert werden. Ferner ist es möglich, dass die nach Deletion falsch gefalteten Proteine ins Zytoplasma gelangen und im Proteasom verstärkt degradiert werden. Beide Effekte würden auch das Fehlen des Proteins im Vergleich zum Volllänge NcGRA9-HA in den ESA-Präparationen erklären. $\Delta 280$ NcGRA9-HA wird dagegen teilweise nach Wirtszellinvasion in die PV sekretiert und zum Teil im Bereich des Golgi-Komplexes zurückgehalten. Ein derartiger „Golgi-Arrest“ wurde bereits für TgMIC2 von *T. gondii* gezeigt. Dieses Protein wird in Abwesenheit von TgM2AP (MIC2-associated protein) größtenteils nicht in die Mikronemen transportiert sondern im Golgi-Komplex zurückgehalten (Huynh et al., 2003). Es wurde außerdem für die Mikronemen-Proteine TgMIC6 und TgMIC8 gezeigt, dass diese als „Escortproteine“ für andere Mikronemen-Proteine dienen, damit diese ebenfalls in die Mikronemen transportiert werden (Meissner et al., 2002; Reiss et al., 2001). Wenn solche Escorter fehlen, werden die Mikronemen-Proteine falsch beziehungsweise in geringerem Ausmaß transportiert. Dies könnte bedeuten, dass auch NcGRA9 für den Transport vom Golgi-Komplex in seine Zielorganelle einen bisher unbekannt Interaktionspartner benötigt, der an das trankierte $\Delta 280$ NcGRA9-HA allerdings nicht korrekt binden kann. Durch diese gestörte Interaktion könnte der Transport von NcGRA9 in die dichte Granula und die daraus folgende Sekretion in die PV reduziert sein. So könnte die beobachtete verzögerte und verminderte Sekretion und die verstärkte Lokalisation im Golgi-Komplex zu erklären sein. Für die Bestätigung der Lokalisation von $\Delta 201$ NcGRA9-HA im Endoplasmatischen Retikulum beziehungsweise $\Delta 280$ NcGRA9-HA im Golgi-Komplex sind jedoch noch immunogold-elektronenmikroskopische Analysen notwendig.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass NcGRA9 in der PV sowohl löslich als auch in Proteinaggregaten assoziiert vorliegt. Somit könnte NcGRA9, das wahrscheinlich nicht direkt mit Membranen interagiert, über ein anderes, membranlokalisierendes Protein an das intravakuoläre Netzwerk gebunden sein. Da NcGRA9 auch teilweise durch alkalische Natriumhydrogenkarbonat-Behandlung aus Membranpräparationen gelöst werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass NcGRA9 mit einem peripheren Membranprotein interagiert. Ein möglicher Kandidat wäre NcMAG1, welches in Ko-Immunpräzipitationsanalysen als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden konnte.

Allerdings ist die genaue Art der Interaktion von NcMAG1 mit dem intravakuolären Netzwerk und mit NcGRA9 noch nicht abschließend geklärt. Damit ist NcGRA9 von *N. caninum* dem homologen Protein in *T. gondii* in vielen Eigenschaften, wie genomische Organisation, funktionellen Domänen und der Aminosäuresequenz (60 % Sequenzidentität) ähnlich, es gibt aber auch deutliche Unterschiede. So ist zum Beispiel TgGRA9 von *T. gondii* wahrscheinlich mit einem Transmembranprotein assoziiert, während NcGRA9, wie oben erwähnt, wahrscheinlich mit einem peripheren Membranprotein interagiert. Ferner ist TgGRA7 ein wichtiger Interaktionspartner von TgGRA9 während NcGRA9 von *N. caninum* nicht an NcGRA7 bindet. Diese Daten belegen, dass homologe Proteine in *N. caninum* und *T. gondii* verschiedene Eigenschaften haben. Auch diese kleinen Differenzen können dazu beitragen, dass die beiden Erreger ein unterschiedliches Wirtsspektrum besitzen und sich evolutionär anders entwickelt haben.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte das dichte Granula-Protein NcGRA9 des obligat intrazellulären Parasiten *Neospora caninum* (*N. caninum*) beschrieben werden. *N. caninum* ist phylogenetisch sehr nah verwandt mit dem bekannten Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), in dem ein homologes TgGRA9 existiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl auf genomischer Ebene als auch auf Proteinebene Gemeinsamkeiten zwischen beiden Proteinen bestehen. Die Aminosäuresequenzen von NcGRA9 und TgGRA9 zeigen eine Identität von 60 %. Antikörper gegen rekombinantes NcGRA9 reagieren auch mit TgGRA9. Aufgrund dieser Kreuzreaktivität ist NcGRA9 als Antigen für die serologische Diagnose einer Neosporose in Rindern ungeeignet.

NcGRA9 wurde auch im Bezug auf seine Lokalisation untersucht. In extrazellulären Tachyzoiten ist das Protein innerhalb der dichte Granula zu finden und nach Wirtszellinvasion wird es in die parasitophore Vakuole (PV) sekretiert. Diese Lokalisation ist typisch für dichte Granula-Proteine. Außerdem gehört NcGRA9 zur Gruppe der exkretierten/sekretierten Antigene von *N. caninum*. Des Weiteren wurde die Interaktion von NcGRA9 mit membranösen Strukturen innerhalb der PV analysiert. Nach der Sekretion liegt NcGRA9 sowohl löslich als auch membrangebunden vor. Weiterführende Analysen legten dar, dass NcGRA9 wahrscheinlich über periphere Membranproteine mit dem membranösen intravakuolären Netzwerk assoziiert sein könnte. Ferner ist NcGRA9 an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt, dabei wurde NcMAG1 als möglicher Interaktionspartner identifiziert. Die Analyse von C-terminal trunkierten NcGRA9-Proteinen ergab, dass es im C-terminalen Bereich des Moleküls Regionen gibt, die für das Targeting- und Sekretionsverhalten von NcGRA9 entscheidend sind.

Zusammenfassend weist das NcGRA9-Protein viele Ähnlichkeiten zu seinem homologen Protein in *T. gondii* auf. Jedoch gibt es im Detail Unterschiede im Bezug auf die Membranbindung und das Interaktionsverhalten mit anderen Proteinen in der PV. Diese Abweichungen könnten zur unterschiedlichen Wirtsspezifität, Virulenz und Wachstumskinetik von *T. gondii* und *N. caninum* beitragen.

7. Summary

In the present thesis the dense granule protein NcGRA9 of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* (*N. caninum*) is described. *N. caninum* is phylogenetically closely related to the known parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) where a homologous TgGRA9 protein exists. Similarities between both proteins have been shown on genomic and on protein basis. Comparison of the amino acid sequences of NcGRA9 and TgGRA9 reveal a sequence identity of about 60 %. Antibodies directed against recombinant NcGRA9 also recognise TgGRA9. Depending on this cross-reactivity NcGRA9 is not suitable for usage as an antigen in serological diagnostic for Neosporosis in cattle.

NcGRA9 was also analysed regarding its localisation. In extracellular tachyzoites the protein is detected inside the dense granules and after invasion of the host cell it is secreted into the parasitophorous vacuole (PV). This distribution is typical for dense granule proteins. In addition, NcGRA9 belongs to the group of excreted/secreted antigens of *N. caninum*. Furthermore, interaction of NcGRA9 with membranous structures inside the PV was analysed. Following secretion NcGRA9 is soluble as well as membrane-bound. Additional analyses demonstrated that NcGRA9 is likely associated to the membranous intravacuolar network via peripheral membrane proteins. Moreover, NcGRA9 participates in protein-protein-interactions and NcMAG1 was identified as a putative interaction partner of NcGRA9. C-terminally truncated NcGRA9 proteins were analysed and it became obvious that the C-terminal region of the protein contains areas that could be crucial for targeting and secretion of NcGRA9.

In summary, NcGRA9 exhibits many similarities to its homologue in *T. gondii*. However, there are differences regarding membrane binding capacity and the interaction with other proteins inside the PV. These aberrations could contribute to the different host specificity, virulence and growth kinetic of *T. gondii* and *N. caninum*.

8. Literaturverzeichnis

- Adjogble, K.D., Mercier, C., Dubremetz, J.F., Hucke, C., Mackenzie, C.R., Cesbron-Delauw, M.F., und Daubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *International journal for parasitology* **34**, 1255-1264.
- Aguado-Martinez, A., Alvarez-Garcia, G., Fernandez-Garcia, A., Risco-Castillo, V., Arnaiz-Seco, I., Rebordosa-Trigueros, X., Navarro-Lozano, V., und Ortega-Mora, L.M. (2008). Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Veterinary parasitology* **157**, 182-195.
- Al-Qassab, S., Reichel, M.P., und Ellis, J. (2010). A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. *Molecular and cellular probes* **24**, 20-26.
- Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Ivens, A., und Ellis, J.T. (2009). Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Molecular and cellular probes* **23**, 132-139.
- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., und Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS pathogens* **1**, e17.
- Alves Neto, A.F., Bandini, L.A., Nishi, S.M., Soares, R.M., Driemeier, D., Antoniassi, N.A., Schares, G., und Gennari, S.M. (2011). Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. *The Journal of parasitology* **97**, 135-139.
- Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., Packham, A.E., Barr, B.C., und Conrad, P.A. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **210**, 1169-1172.
- Asai, T., Howe, D.K., Nakajima, K., Nozaki, T., Takeuchi, T., und Sibley, L.D. (1998). *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Experimental parasitology* **90**, 277-285.
- Atkinson, R., Harper, P.A., Ryce, C., Morrison, D.A., und Ellis, J.T. (1999). Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* **118** (Pt 4), 363-370.
- Atkinson, R.A., Ryce, C., Miller, C.M., Balu, S., Harper, P.A., und Ellis, J.T. (2001). Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection. *International journal for parasitology* **31**, 67-71.
- Basso, W., Schares, S., Barwald, A., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., und Schares, G. (2009). Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary parasitology* **160**, 43-50.
- Basso, W., Schares, S., Minke, L., Barwald, A., Maksimov, A., Peters, M., Schulze, C., Muller, M., Conraths, F.J., und Schares, G. (2010). Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary parasitology* **173**, 24-31.
- Baszler, T.V., Shkap, V., Mwangi, W., Davies, C.J., Mathison, B.A., Mazuz, M., Resnikov, D., Fish, L., Leibovitch, B., Staska, L.M., *et al.* (2008). Bovine immune response to inoculation with *Neospora caninum* surface antigen SRS2 lipopeptides mimics immune response to infection with live parasites. *Clinical and vaccine immunology* : *CVI* **15**, 659-667.
- Beck, H.P., Blake, D., Darde, M.L., Felger, I., Pedraza-Diaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., *et al.* (2009). Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International journal for parasitology* **39**, 175-189.
- Beckers, C.J., Wakefield, T., und Joiner, K.A. (1997). The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptyry protein. *Molecular and biochemical parasitology* **89**, 209-223.
- Behnke, M.S., Fentress, S.J., Mashayekhi, M., Li, L.X., Taylor, G.A., und Sibley, L.D. (2012). The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18. *PLoS pathogens* **8**, e1002992.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Häcker, B., Held, A., Lange, C., Mahlke, K., Maxam, G., Seidler, L., und Zellerhoff, N. (2003). *Stryer Biochemie* (Spektrum Akademischer Verlag).

- Bjerkas, I., Mohn, S.F., und Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 70, 271-274.
- Blackman, M.J., und Bannister, L.H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Molecular and biochemical parasitology* 117, 11-25.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The Journal of biological chemistry* 256, 1604-1607.
- Boulton, J.G., Gill, P.A., Cook, R.W., Fraser, G.C., Harper, P.A., und Dubey, J.P. (1995). Bovine Neospora abortion in north-eastern New South Wales. *Australian veterinary journal* 72, 119-120.
- Bradley, P.J., und Sibley, L.D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current opinion in microbiology* 10, 582-587.
- Buguliskis, J.S., Brossier, F., Shuman, J., und Sibley, L.D. (2010). Rhomboid 4 (ROM4) affects the processing of surface adhesins and facilitates host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 6, e1000858.
- Butcher, B.A., Fox, B.A., Rommereim, L.M., Kim, S.G., Maurer, K.J., Yarovinsky, F., Herbert, D.R., Bzik, D.J., und Denkers, E.Y. (2011). *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS pathogens* 7, e1002236.
- Buxton, D., McAllister, M.M., und Dubey, J.P. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in parasitology* 18, 546-552.
- Carey, K.L., Donahue, C.G., und Ward, G.E. (2000). Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 105, 25-37.
- Carruthers, V., und Boothroyd, J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology* 10, 83-89.
- Carruthers, V.B., und Sibley, L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European journal of cell biology* 73, 114-123.
- Carruthers, V.B., und Tomley, F.M. (2008). Microneme proteins in apicomplexans. *Sub-cellular biochemistry* 47, 33-45.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* 57, 953-994.
- Cesbron-Delauw, M.F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 10, 293-296.
- Chou, P.Y., und Fasman, G.D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 47, 45-148.
- Ciesla, J., Fraczyk, T., und Rode, W. (2011). Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta biochimica Polonica* 58, 137-148.
- Collantes-Fernandez, E., Lopez-Perez, I., Alvarez-Garcia, G., und Ortega-Mora, L.M. (2006). Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infection and immunity* 74, 2491-2494.
- Cooper, C.E. (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1411, 290-309.
- Coppens, I., Andries, M., Liu, J.L., und Cesbron-Delauw, M.F. (1999). Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. *European journal of cell biology* 78, 463-472.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., und Joiner, K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125, 261-274.
- Cowper, B., Matthews, S., und Tomley, F. (2012). The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. *Molecular and biochemical parasitology* 186, 1-10.
- Craver, M.P., und Knoll, L.J. (2007). Increased efficiency of homologous recombination in *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 demonstrates that GRA3 is not necessary in cell culture but does contribute to virulence. *Molecular and biochemical parasitology* 153, 149-157.

- Crookshanks, J.L., Taylor, S.M., Haines, D.M., und Shelton, G.D. (2007). Treatment of canine pediatric *Neospora caninum* myositis following immunohistochemical identification of tachyzoites in muscle biopsies. *The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne* 48, 506-508.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., und Gasbarre, L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International journal for parasitology* 29, 1647-1657.
- Debache, K., Alaeddine, F., Guionaud, C., Monney, T., Muller, J., Strohbusch, M., Leib, S.L., Grandgirard, D., und Hemphill, A. (2009). Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *International journal for parasitology* 39, 1373-1384.
- Debache, K., Guionaud, C., Alaeddine, F., Mevissen, M., und Hemphill, A. (2008). Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *International journal for parasitology* 38, 1455-1463.
- Decoster, A., Darcy, F., und Capron, A. (1988). Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clinical and experimental immunology* 73, 376-382.
- Di Cristina, M., Spaccapelo, R., Soldati, D., Bistoni, F., und Crisanti, A. (2000). Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and cellular biology* 20, 7332-7341.
- Donald, R.G., und Roos, D.S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11703-11707.
- Dong, J., Otsuki, T., Kato, T., und Park, E.Y. (2012). Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins. *BMC biotechnology* 12, 19.
- Drin, G., Casella, J.F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T.U., und Antony, B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nature structural & molecular biology* 14, 138-146.
- Dubey, J.P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology* 41, 1-16.
- Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkas, I., Bjorkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., *et al.* (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International journal for parasitology* 32, 929-946.
- Dubey, J.P., Buxton, D., und Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology* 134, 267-289.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., und Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192, 1269-1285.
- Dubey, J.P., Dorough, K.R., Jenkins, M.C., Liddell, S., Speer, C.A., Kwok, O.C., und Shen, S.K. (1998a). Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International journal for parasitology* 28, 1293-1304.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., und Topper, M.J. (1988b). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193, 1259-1263.
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C., und Choudhary, S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 181, 382-387.
- Dubey, J.P., und Lindsay, D.S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary parasitology* 67, 1-59.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., und Speer, C.A. (1998b). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews* 11, 267-299.
- Dubey, J.P., und Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary parasitology* 140, 1-34.

- Dubey, J.P., und Schares, G. (2011). Neosporosis in animals--the last five years. *Veterinary parasitology* 180, 90-108.
- Dubey, J.P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K.B., Vianna, M.C., Kwok, O.C., Hill, D.E., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., und Greene, C.E. (2004). Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International journal for parasitology* 34, 1157-1167.
- Dubey, J.P., Vianna, M.C., Kwok, O.C., Hill, D.E., Miska, K.B., Tuo, W., Velmurugan, G.V., Conors, M., und Jenkins, M.C. (2007). Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 149, 158-166.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., und Fourmaux, M.N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International journal for parasitology* 28, 1007-1013.
- Dunn, J.D., Ravindran, S., Kim, S.K., und Boothroyd, J.C. (2008). The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhopty proteins ROP2 and ROP4. *Infection and immunity* 76, 5853-5861.
- Eastick, F.A., und Elsheikha, H.M. (2010). Stress-driven stage transformation of *Neospora caninum*. *Parasitology research* 106, 1009-1014.
- Ellgaard, L., Molinari, M., und Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.
- Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., und Johnson, A.M. (1994). The phylogeny of *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 64, 303-311.
- Ellis, J.T., Ryce, C., Atkinson, R., Balu, S., Jones, P., und Harper, P.A. (2000). Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology* 120 (Pt 4), 383-390.
- Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., *et al.* (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell host & microbe* 8, 484-495.
- Ferreira da Silva Mda, F., Barbosa, H.S., Gross, U., und Luder, C.G. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular bioSystems* 4, 824-834.
- Friedrich, N., Santos, J.M., Liu, Y., Palma, A.S., Leon, E., Sauros, S., Kiso, M., Blackman, M.J., Matthews, S., Feizi, T., *et al.* (2010). Members of a novel protein family containing microneme adhesive repeat domains act as sialic acid-binding lectins during host cell invasion by apicomplexan parasites. *The Journal of biological chemistry* 285, 2064-2076.
- Fry, D.R., McSporran, K.D., Ellis, J.T., und Harvey, C. (2009). Protozoal hepatitis associated with immunosuppressive therapy in a dog. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 23, 366-368.
- Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., und Hemphill, A. (1998). Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *The Journal of parasitology* 84, 753-758.
- Galgut, B.I., Janardhan, K.S., Grondin, T.M., Harkin, K.R., und Wight-Carter, M.T. (2010). Detection of *Neospora caninum* tachyzoites in cerebrospinal fluid of a dog following prednisone and cyclosporine therapy. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 39, 386-390.
- Garosi, L., Dawson, A., Couturier, J., Matiasek, L., de Stefani, A., Davies, E., Jeffery, N., und Smith, P. (2010). Necrotizing cerebellitis and cerebellar atrophy caused by *Neospora caninum* infection: magnetic resonance imaging and clinicopathologic findings in seven dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 24, 571-578.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Anderson-Sprecher, R.C., Bjorkman, C., Lock, T.F., Firkins, L.D., Gao, L., und Fischer, W.R. (2004a). Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *The Journal of parasitology* 90, 1394-1400.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., und Zemlicka, D.E. (2004b). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 34, 159-161.
- Gormley, P.D., Pavesio, C.E., Minnasian, D., und Lightman, S. (1998). Effects of drug therapy on *Toxoplasma* cysts in an animal model of acute and chronic disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 39, 1171-1175.

- Graham, D.A., Calvert, V., Whyte, M., und Marks, J. (1999). Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *The Veterinary record* 144, 672-673.
- Guerardel, Y., Leleu, D., Coppin, A., Lienard, L., Slomianny, C., Strecker, G., Ball, S., und Tomavo, S. (2005). Amylopectin biogenesis and characterization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the intracellular development of which is restricted in the HepG2 cell line. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 41-48.
- Guionaud, C., Hemphill, A., Mevissen, M., und Alaeddine, F. (2010). Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. *Parasitology* 137, 1605-1619.
- Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Bjorkman, C., Smith, R.F., und Trees, A.J. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary record* 149, 443-449.
- Hager, K.M., Striepen, B., Tilney, L.G., und Roos, D.S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* 112 (Pt 16), 2631-2638.
- Hakansson, S., Charron, A.J., und Sibley, L.D. (2001). *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO journal* 20, 3132-3144.
- Hames, B.D. (1998). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* (Oxford University Press).
- Harper, J.M., Hoff, E.F., und Carruthers, V.B. (2004a). Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. *Molecular and biochemical parasitology* 134, 201-212.
- Harper, J.M., Zhou, X.W., Pszeny, V., Kafsack, B.F., und Carruthers, V.B. (2004b). The novel coccidian micronemal protein MIC11 undergoes proteolytic maturation by sequential cleavage to remove an internal propeptide. *International journal for parasitology* 34, 1047-1058.
- Hemphill, A. (1999). The host-parasite relationship in neosporosis. *Advances in parasitology* 43, 47-104.
- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., und Hentrich, B. (1997). Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 115 (Pt 4), 371-380.
- Hemphill, A., Gajendran, N., Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., Hentrich, B., und Jenkins, M. (1998). Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *International journal for parasitology* 28, 429-438.
- Hemphill, A., und Gottstein, B. (2000). A European perspective on *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 30, 877-924.
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., und Naguleswaran, A. (2006). Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133, 261-278.
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Keller, N., Riesen, M., Guetg, N., Srinivasan, S., und Alaeddine, F. (2004). Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 10, 602-620.
- Henriquez, F.L., Nickdel, M.B., McLeod, R., Lyons, R.E., Lyons, K., Dubremetz, J.F., Grigg, M.E., Samuel, B.U., und Roberts, C.W. (2005). *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitology* 131, 169-179.
- Hoff, E.F., Cook, S.H., Sherman, G.D., Harper, J.M., Ferguson, D.J., Dubremetz, J.F., und Carruthers, V.B. (2001). *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. *Experimental parasitology* 97, 77-88.
- Holmberg, T.A., Vernau, W., Melli, A.C., und Conrad, P.A. (2006). *Neospora caninum* associated with septic peritonitis in an adult dog. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 35, 235-238.
- Hoppe, H.C., Ngo, H.M., Yang, M., und Joiner, K.A. (2000). Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nature cell biology* 2, 449-456.

- Howe, D.K., Crawford, A.C., Lindsay, D., und Sibley, L.D. (1998). The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity* **66**, 5322-5328.
- Howe, D.K., Mercier, C., Messina, M., und Sibley, L.D. (1997). Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* **86**, 29-36.
- Howe, D.K., und Sibley, L.D. (1997). Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods* **13**, 123-133.
- Howe, D.K., und Sibley, L.D. (1999). Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* **29**, 1489-1496.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D.S., und Murray, J.M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* **2**, e13.
- Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C.J., Roos, D.S., und Murray, J.M. (2002). Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular biology of the cell* **13**, 593-606.
- Huynh, M.H., Rabenau, K.E., Harper, J.M., Beatty, W.L., Sibley, L.D., und Carruthers, V.B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *The EMBO journal* **22**, 2082-2090.
- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Bjorkman, C., Williams, D.J., und Conrad, P.A. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in parasitology* **18**, 497-504.
- Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S.W., Wright, S.E., und Buxton, D. (2007). Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* **25**, 5495-5503.
- Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macalodowie, C., Esteban-Redondo, I., und Buxton, D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary immunology and immunopathology* **108**, 29-36.
- Jewett, T.J., und Sibley, L.D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular cell* **11**, 885-894.
- Joiner, K.A., und Roos, D.S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *The Journal of cell biology* **157**, 557-563.
- Kaasch, A.J., und Joiner, K.A. (2000). Protein-targeting determinants in the secretory pathway of apicomplexan parasites. *Current opinion in microbiology* **3**, 422-428.
- Kafsack, B.F., Pena, J.D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J.C., und Carruthers, V.B. (2009). Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* **323**, 530-533.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C.J., Reddy, A., Dubremetz, J.F., Webster, P., und Joiner, K.A. (1998). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *The Journal of cell biology* **141**, 1323-1333.
- Kay, B.K., Williamson, M.P., und Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**, 231-241.
- Keeley, A., und Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in cell biology* **14**, 528-532.
- Keller, N., Naguleswaran, A., Cannas, A., Vonlaufen, N., Bienz, M., Bjorkman, C., Bohne, W., und Hemphill, A. (2002). Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infection and immunity* **70**, 3187-3198.
- Keller, N., Riesen, M., Naguleswaran, A., Vonlaufen, N., Stettler, R., Leepin, A., Wastling, J.M., und Hemphill, A. (2004). Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. *Infection and immunity* **72**, 4791-4800.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., und Windsor, P.A. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* **40**, 945-950.

- Kyte, J., und Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157, 105-132.
- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., und Sibley, L.D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 102, 311-324.
- Lally, N., Jenkins, M., Liddell, S., und Dubey, J.P. (1997). A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 87, 239-243.
- Liddell, S., Lally, N.C., Jenkins, M.C., und Dubey, J.P. (1998). Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 93, 153-158.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., und Toivio-Kinnucan, M. (1991). Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *The Journal of parasitology* 77, 126-132.
- Lovett, J.L., Howe, D.K., und Sibley, L.D. (2000). Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 107, 33-43.
- Lyons, R.E., McLeod, R., und Roberts, C.W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends in parasitology* 18, 198-201.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Brock, T.D., und Thomm, M. (2001). Brock Mikrobiologie (Pearson Education).
- Marechal, E., und Cesbron-Delauw, M.F. (2001). The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends in plant science* 6, 200-205.
- Marugan-Hernandez, V., Alvarez-Garcia, G., Risco-Castillo, V., Regidor-Cerrillo, J., und Ortega-Mora, L.M. (2010). Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. *Proteomics* 10, 1740-1750.
- Marugan-Hernandez, V., Alvarez-Garcia, G., Tomley, F., Hemphill, A., Regidor-Cerrillo, J., und Ortega-Mora, L.M. (2011). Identification of novel rhoptry proteins in *Neospora caninum* by LC/MS-MS analysis of subcellular fractions. *Journal of proteomics* 74, 629-642.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., und McGuire, A.M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 28, 1473-1478.
- McAllister, M.M., Parmley, S.F., Weiss, L.M., Welch, V.J., und McGuire, A.M. (1996). An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *The Journal of parasitology* 82, 354-355.
- Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bulle, H., Woite, C., Stuhlsatz, S., Schwippert, W., Jager, M., Sorg, R., *et al.* (2011). Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 25, 648-654.
- Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V.B., Toursel, C., Tomavo, S., Ajioka, J.W., und Soldati, D. (2002). A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *Journal of cell science* 115, 563-574.
- Mercier, C., Adjogble, K.D., Daubener, W., und Delauw, M.F. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International journal for parasitology* 35, 829-849.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F., und Sibley, L.D. (1998). The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *Journal of cell science* 111 (Pt 15), 2171-2180.
- Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslee, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A., und Cesbron-Delauw, M.F. (1993). Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 58, 71-82.
- Mondragon, R., und Frixione, E. (1996). Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *The Journal of eukaryotic microbiology* 43, 120-127.
- Moore, D.P., Echaide, I., Verna, A.E., Leunda, M.R., Cano, A., Pereyra, S., Zamorano, P.I., Odeon, A.C., und Campero, C.M. (2011). Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Veterinary parasitology* 175, 245-251.

- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M., und Sibley, L.D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *The Journal of experimental medicine* 190, 1783-1792.
- Mordue, D.G., und Sibley, L.D. (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol* 159, 4452-4459.
- Morris, M.T., Cheng, W.C., Zhou, X.W., Brydges, S.D., und Carruthers, V.B. (2004). *Neospora caninum* expresses an unusual single-domain Kazal protease inhibitor that is discharged into the parasitophorous vacuole. *International journal for parasitology* 34, 693-701.
- Morrisette, N.S., und Sibley, L.D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66, 21-38; table of contents.
- Nagamune, K., Hicks, L.M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E.N., und Sibley, L.D. (2008). Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 451, 207-210.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Bjorkman, C., und Hemphill, A. (2002). Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 32, 695-704.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Schares, G., Conraths, F.J., Bjorkman, C., und Hemphill, A. (2001). *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. *Infection and immunity* 69, 6483-6494.
- Naguleswaran, A., Muller, N., und Hemphill, A. (2003). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Experimental parasitology* 104, 149-158.
- Nam, H.W. (2009). GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *The Korean journal of parasitology* 47 Suppl, S29-37.
- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G., und Fischer, H.G. (2002). Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 581-590.
- Nichols, B.A., und Chiappino, M.L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of protozoology* 34, 217-226.
- Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A., und Daubener, W. (1998). Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 97, 109-121.
- Opitz, C., Di Cristina, M., Reiss, M., Ruppert, T., Crisanti, A., und Soldati, D. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The EMBO journal* 21, 1577-1585.
- Peng, H.J., Chen, X.G., und Lindsay, D.S. (2011). A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *The Journal of parasitology* 97, 620-628.
- Pereira Garcia-Melo, D., Regidor-Cerrillo, J., Collantes-Fernandez, E., Aguado-Martinez, A., Del Pozo, I., Minguijon, E., Gomez-Bautista, M., Aduriz, G., und Ortega-Mora, L.M. (2010). Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. *Parasitology* 137, 1057-1068.
- Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A.R., und Schares, G. (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International journal for parasitology* 31, 1144-1148.
- Piergili Fioretti, D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., und Rosignoli, L. (2003). *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health* 50, 399-404.
- Quinn, H.E., Ellis, J.T., und Smith, N.C. (2002). *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends in parasitology* 18, 391-394.
- Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Del Pozo, I., Jimenez-Ruiz, E., Aduriz, G., und Ortega-Mora, L.M. (2010). Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Veterinary research* 41, 52.

- Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Alvarez-Garcia, G., Del Pozo, I., und Ortega-Mora, L.M. (2011). In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Veterinary research* 42, 41.
- Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Diaz, S., Gomez-Bautista, M., und Ortega-Mora, L.M. (2006). Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 92, 517-524.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Konen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., *et al.* (2012). Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS pathogens* 8, e1002567.
- Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M.N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J.F., und Soldati, D. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology* 152, 563-578.
- Rogers, S., Wells, R., und Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Regidor-Cerrillo, J., Alvarez-Garcia, G., Marugan-Hernandez, V., Pedraza-Diaz, S., Blanco-Murcia, J., Prenafeta, A., und Ortega-Mora, L.M. (2009). Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Veterinary parasitology* 159, 7-16.
- Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D., und Saeij, J.P. (2011). Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *The Journal of experimental medicine* 208, 195-212.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., und Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780-1783.
- Saeij, J.P., Collier, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., und Boothroyd, J.C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324-327.
- Schaes, G., Dubremetz, J.F., Dubey, J.P., Barwald, A., Loyens, A., und Conraths, F.J. (1999). *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Experimental parasitology* 92, 109-119.
- Schaes, G., Zinecker, C.F., Schmidt, J., Azzouz, N., Conraths, F.J., Gerold, P., und Schwarz, R.T. (2000). Structural analysis of free and protein-bound glycosyl-phosphatidylinositols of *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 105, 155-161.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., und Sher, A. (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *The Journal of experimental medicine* 185, 1261-1273.
- Schwan, T.G., und Hinnebusch, B.J. (1998). Bloodstream- versus tick-associated variants of a relapsing fever bacterium. *Science* 280, 1938-1940.
- Sheffield, H.G., und Melton, M.L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology* 54, 209-226.
- Sheiner, L., Santos, J.M., Klages, N., Parussini, F., Jemmely, N., Friedrich, N., Ward, G.E., und Soldati-Favre, D. (2010). *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Molecular microbiology*.
- Sibley, L.D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304, 248-253.
- Sibley, L.D., und Howe, D.K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Current topics in microbiology and immunology* 219, 3-15.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Parmley, S.F., und Cesbron-Delauw, M.F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* 108 (Pt 4), 1669-1677.
- Sinai, A.P., und Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of cell biology* 154, 95-108.

- Sohn, C.S., Cheng, T.T., Drummond, M.L., Peng, E.D., Vermont, S.J., Xia, D., Cheng, S.J., Wastling, J.M., und Bradley, P.J. (2011). Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. *PLoS one* 6, e18383.
- Sonda, S., Fuchs, N., Connolly, B., Fernandez, P., Gottstein, B., und Hemphill, A. (1998). The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. *Molecular and biochemical parasitology* 97, 97-108.
- Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., und Hemphill, A. (2000). Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 108, 39-51.
- Speer, C.A., Dubey, J.P., McAllister, M.M., und Blixt, J.A. (1999). Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 29, 1509-1519.
- Spekker, K. (2008). Interaktions- und Sekretionsverhalten des "Dichte Granula" Proteins Gra 9 von *Toxoplasma gondii*. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
- Spekker, K., Czesla, M., Ince, V., Heseler, K., Schmidt, S.K., Schares, G., und Daubener, W. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infection and immunity* 77, 4496-4501.
- Spekker, K., Leineweber, M., Degrandi, D., Ince, V., Brunder, S., Schmidt, S.K., Stuhlsatz, S., Howard, J.C., Schares, G., Degistirici, O., *et al.* (2012). Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). *Medical microbiology and immunology*.
- Starnes, G.L., Coincon, M., Sygusch, J., und Sibley, L.D. (2009). Aldolase is essential for energy production and bridging adhesin-actin cytoskeletal interactions during parasite invasion of host cells. *Cell host & microbe* 5, 353-364.
- Steinfeldt, T., Konen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., und Howard, J.C. (2010). Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS biology* 8, e1000576.
- Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S., und Bradley, P.J. (2009). Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cellular microbiology* 11, 590-603.
- Striepen, B., Crawford, M.J., Shaw, M.K., Tilney, L.G., Seeber, F., und Roos, D.S. (2000). The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *The Journal of cell biology* 151, 1423-1434.
- Striepen, B., He, C.Y., Matrajt, M., Soldati, D., und Roos, D.S. (1998). Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 92, 325-338.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J.F., und Roos, D.S. (2001). Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* 113, 45-53.
- Sundermann, C.A., und Estridge, B.H. (1999). Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *International journal for parasitology* 29, 1725-1732.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., und Ward, G.E. (1996). *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8413-8418.
- Tanaka, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., und Mikami, T. (2000). Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. *Parasitology research* 86, 768-771.
- Tilney, L.G., und Tilney, M.S. (1996). The cytoskeleton of protozoan parasites. *Current opinion in cell biology* 8, 43-48.
- Tranas, J., Heinzen, R.A., Weiss, L.M., und McAllister, M.M. (1999). Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 6, 765-767.
- Travier, L., Mondragon, R., Dubremetz, J.F., Musset, K., Mondragon, M., Gonzalez, S., Cesbron-Delauw, M.F., und Mercier, C. (2008). Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *International journal for parasitology* 38, 757-773.

- Trecek, M., Sanders, J.L., Elias, J.E., und Boothroyd, J.C. (2011). The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell host & microbe* 10, 410-419.
- Trees, A.J., Davison, H.C., Innes, E.A., und Wastling, J.M. (1999). Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International journal for parasitology* 29, 1195-1200.
- Trees, A.J., McAllister, M.M., Guy, C.S., McGarry, J.W., Smith, R.F., und Williams, D.J. (2002). *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary parasitology* 109, 147-154.
- Uzeda, R.S., Costa Kde, S., Santos, S.L., Pinheiro, A.M., De Almeida, M.A., McAllister, M.M., und Gondim, L.F. (2007). Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *The Korean journal of parasitology* 45, 295-299.
- Vonlaufen, N., Guetg, N., Naguleswaran, A., Muller, N., Bjorkman, C., Schares, G., von Blumroeder, D., Ellis, J., und Hemphill, A. (2004). In vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infection and immunity* 72, 576-583.
- Vonlaufen, N., Muller, N., Keller, N., Naguleswaran, A., Bohne, W., McAllister, M.M., Bjorkman, C., Muller, E., Caldelari, R., und Hemphill, A. (2002). Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. *International journal for parasitology* 32, 1253-1265.
- Walker, M.E., Hjort, E.E., Smith, S.S., Tripathi, A., Hornick, J.E., Hinchcliffe, E.H., Archer, W., und Hager, K.M. (2008). *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10, 1440-1449.
- Weiss, L.M., Ma, Y.F., Halonen, S., McAllister, M.M., und Zhang, Y.W. (1999). The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *International journal for parasitology* 29, 1713-1723.
- Wolters, J. (1991). The troublesome parasites--molecular and morphological evidence that Apicomplexa belong to the dinoflagellate-ciliate clade. *Bio Systems* 25, 75-83.
- Wouda, W., Moen, A.R., und Schukken, Y.H. (1998). Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311-1316.
- Zhang, G., Huang, X., Boldbaatar, D., Battur, B., Battsetseg, B., Zhang, H., Yu, L., Li, Y., Luo, Y., Cao, S., *et al.* (2010). Construction of *Neospora caninum* stably expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine* 28, 7243-7247.
- Zhang, H., Compaore, M.K., Lee, E.G., Liao, M., Zhang, G., Sugimoto, C., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., und Xuan, X. (2007). Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. *Molecular and biochemical parasitology* 151, 205-212.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Walter Däubener möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die konstante Unterstützung danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst für die bereitwillige Übernahme des Koreferats und der Betreuung meiner Arbeit im Hinblick auf das MOI-Graduiertenschulprogramm.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit, in seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen und für die Initiierung der MOI-Graduiertenschule.

Bei der Jürgen Manchot-Stiftung möchte ich mich für die Finanzierung der MOI-Graduiertenschule bedanken und besonders Frau Dr. Inge Krümpelbeck für ihr Organisationstalent.

Der größte Dank von ganzem Herzen gilt der AG Däubener für die stetige Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlicher Hinsicht und bezüglich des Mittagssessen. Ganz besonders für die Unterstützung jeglicher Art in den letzten Monaten.

Außerdem danke ich den Mitgliedern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die gute Atmosphäre, den ganzen Spaß und das Verputzen meiner Backkünste.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner gesamten Familie für die Unterstützung und das Verständnis bedanken, die mir immer, nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit, zur Seite gestanden haben.