

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Die parasitophore Vakuolenmembran der Mikrosporidienspezies *Encephalitozoon cuniculi* enthält keine endophagosomalen Membranproteine**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Verena Faßhauer

aus

Göttingen

GÖTTINGEN 2009

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. U. Groß

**II. Berichterstatter/in:**

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

IV

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VI

**1 EINLEITUNG**

Seite

<b>1.1</b>	<b>Mikrosporidien – biologische Einordnung</b>	1
1.1.1	Aufbau und Natur der Spore	1
1.1.2	Germination und Lebenszyklus	3
<b>1.2</b>	<b>Humanpathogene Mikrosporidienspezies</b>	4
1.2.1	Mikrosporidien und der Mensch	4
1.2.2	Mikrosporidiosen	5
1.2.2.1	Immunsystem	5
1.2.2.2	Klinische Manifestationen	6
1.2.2.3	Epidemiologie, Diagnostik und Therapieansätze	7
<b>1.3</b>	<b><i>Encephalitozoon cuniculi</i> und die parasitophore Vakuole</b>	10
1.3.1	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> - Speziesbesonderheiten	10
1.3.2	Parasitophore Vakuole – Forschungsstand	11
<b>1.4</b>	<b>Phagozytose - Überblick (Ablauf und beteiligte Zellkompartimente)</b>	12
1.4.1	Endozytose-Pinozytose	12
1.4.2	Endozytose-Phagozytose	13
1.4.3	Phagosomenreifung	14
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung und Ziel dieser Arbeit</b>	15

**2 MATERIAL UND METHODEN**

<b>2.1</b>	<b>Material</b>	17
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial	17
2.1.2	Antikörper	18
2.1.3	Zelllinien	19
2.1.3.1	HFF – Human Foreskin Fibroblasts	19
2.1.3.2	L929 – Mäusefibroblasten	19
2.1.3.3	RAW-MΦ – Mäusemakrophagen	20
2.1.3.4	BMM-MΦ – Murine Knochenmarksmakrophagen	20
2.1.3.5	Hybridomazellen	20
2.1.3.6	<i>Encephalitozoon-cuniculi</i> – Sporen	20
2.1.4	Zellkulturmedien	20

<b>2.1.5</b>	<b>IFT-Lösungen</b>	22
<b>2.1.6</b>	<b>Geräte</b>	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	24
<b>2.2.1</b>	<b>Zellmodell</b>	24
<b>2.2.2</b>	<b>Zellkultur</b>	24
2.2.2.1	Standardzellkultur für HFF und L929	24
2.2.2.2	Produktion von L929-Überstand	25
2.2.2.3	Isolierung und Kultur der BMM-MΦ	25
2.2.2.4	Gewinnung Hybridomaüberstand	26
<b>2.2.3</b>	<b>Infektionsmodus und Sporengewinnung</b>	27
<b>2.2.4</b>	<b>Kontrollphagozytose mit Zymosan und abgetöten <i>E.cuniculi</i>-Sporen</b>	28
<b>2.2.5</b>	<b>Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung</b>	29
2.2.5.1	Reguläre Immunfluoreszenzfärbung	29
2.2.5.2	Differenzielle Immunfluoreszenzfärbung	29
<b>2.2.6</b>	<b>Acridine-Orange-Färbung</b>	30
<b>2.2.7</b>	<b>Mikroskopische Auswertung</b>	30
<b>2.2.8</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	31

### 3 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

<b>3.1</b>	<b>Mikrosporidienphagozytose versus Invasion</b>	32
<b>3.1.1</b>	<b>Etablierung der differenziellen Verwendung stadienspezifischer Antikörper</b>	32
<b>3.1.2</b>	<b>Sporenphagozytose</b>	35
3.1.2.1	Phagozytose vitaler Sporen in primären Zelllinien	35
3.1.2.2	Einfluss von Hitzeinaktivierung auf die Sporenphagozytose	36
3.1.2.3	Zymosan / Dextrane und endophagosomale Markerproteine	39
3.1.2.4	Phagozytierte Sporen und lysosomale Wirtszellkompartimente	40
3.1.2.5	Phagozytierte Sporen und Zymosan	45
<b>3.1.3</b>	<b>Infektionsverhalten</b>	45
3.1.3.1	<i>E.cuniculi</i> infiziert HFF und BMMΦ - Auswertung der Unterschiede	45
3.1.3.2	Morphologische Unterschiede der parasitophoren Vakuole in HFF und BMMΦ	47
<b>3.1.4</b>	<b>Verhältnis der Vitalphagozytose zu erfolgreicher Infektion in professionellen und nichtprofessionellen Phagozyten</b>	48

---

<b>3.2</b>	<b>Die parasitophore Vakuole von <i>E.cuniculi</i> entwickelt sich unabhängig von endophagosomalen Wirtszellkompartimenten</b>	<b>50</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Zymosan-markierte Lysosomen und die parasitophore Vakuole von <i>E.cuniculi</i></b>	<b>50</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Kinetische Studien der parasitophoren Vakuolenmembran mit endosomalen, lysosomalen und ER-Markerproteinen</b>	<b>51</b>
<b>3.2.3</b>	<b>PH-Wert-Bestimmung innerhalb der parasitophoren Vakuole</b>	<b>57</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Einfluss wirksamer Antiinfektiva auf die antifusionäre Autonomie der parasitophoren Vakuole</b>	<b>58</b>
3.2.4.1	Vorinkubation der Wirtszellen mit Albendazol und Fumagillin	59
3.2.4.2	Antiinfektivazugabe nach mehrstündiger Infektionsdauer	60
<b>3.3</b>	<b>Das Zytoskelett der infizierten Wirtszelle und die parasitophore Vakuole</b>	<b>61</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Aktinstrukturen infizierter Wirtszellen</b>	<b>61</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Tubulinanordnung und die parasitophore Vakuole</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	
<b>4.1</b>	<b><i>E.cuniculi</i>-Sporen und Phagozytose</b>	<b>63</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Sporenphagozytose in primären Zelllinien</b>	<b>63</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Bedeutung der Sporenphagozytose für die Zellinfektion</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Etablierung der Infektion unter Bildung der parasitophoren Vakuole</b>	<b>65</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Die parasitophore Vakuole von <i>E.cuniculi</i> und endophagosomale Kompartimente</b>	<b>65</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Herkunft der parasitophoren Vakuolenmembran</b>	<b>66</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Zytoskelett der Wirtszelle</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b><i>E.cuniculi</i> im Vergleich mit anderen Pathogenen</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>GLOSSAR</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>

<b>Abbildungen</b>		Seite
Abb. 1	Schematischer Aufbau einer Spore von <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2
Abb. 2	Vereinfachtes Phagozytoschema	16
Abb. 3	Verwendung stadienspezifischer Antikörper	34
Abb. 4	Stadienspezifische Antikörper in frühen Infektionen	34
Abb. 5	Differenzielle Immunfluoreszenzfärbung	35
Abb. 6	Vitalphagozytose	36
Abb. 7	Phagozytierte <i>E.cuniculi</i> -Sporen	37
Abb. 8	Phagozytose hitzeinaktivierter Sporen	38
Abb. 9	Zymosan in professionellen Phagozyten	40
Abb. 10	Zymosan in Fibroblasten	41
Abb. 11	Phagozytierte <i>E.cuniculi</i> -Sporen und LAMP1 in professionellen Phagozyten	43
Abb. 12	Phagozytierte vitale Sporen und LAMP1 in Fibroblasten	44
Abb. 13	Infektionsrate	46
Abb. 14	Infektion in professionellen Phagozyten	47
Abb. 15	Diagramm Phagozytose-/Infektionsverhältnis	49
Abb. 16	Infektion: Parasitophore Vakuole und Zymosan	51
Abb. 17	Transferrinrezeptor und Kinetik der parasitophoren Vakuole	53
Abb. 18	Early Endosome Antigen1 und Kinetik der parasitophoren Vakuole	54
Abb. 19	Lysosomal assoziiertes Membranprotein1 und Kinetik der parasitophoren Vakuole	56
Abb. 20	Infektion in professionellen Phagozyten: LAMP1 und die parasitophore Vakuole	56
Abb. 21	Calnexin und Kinetik der parasitophoren Vakuole	57
Abb. 22	PH-Wertbestimmung der parasitophoren Vakuole	58
Abb. 23	Antiinfektiva und die parasitophore Vakuole	60
Abb. 24	Zytoskelett infizierter Wirtszellen	62
<b>Tabellen</b>		
Tab. 1	Chemikalie, Verbrauchsmaterial	17
Tab. 2	Antikörper	18
Tab. 3	HFF-Grundmedium	20
Tab. 4	L929-Grundmedium	21
Tab. 5	L929-Medium für ZK-Überstand	21
Tab. 6	RAW-MΦ-Grundmedium	21

---

Tab. 7	BMM $\Phi$ -Isolierungsmedium	21
Tab. 8	BMM $\Phi$ -Differenzierungsmedium	22
Tab. 9	Hybridoma-Grundmedium	22
Tab. 10	PBS10-Stammlösung	22
Tab. 11	PFA 4% in PBS1	23
Tab. 12	Triton X-100 in PBS1	23
Tab. 13	IFT-Grundlösung	23
Tab. 14	Mowiol-Präparation	23
Tab. 15	Geräte	24
Tab. 16	Anteil intrazellulärer Meronten und extrazellulären Sporoplasmas bei differenzieller 6G2-Markierung	33
Tab. 17	Schemadarstellung verwendeter Antikörper	42
Tab. 18	Phagozytose vitaler <i>E.cuniculi</i> -Sporen in professionellen Phagozyten und der Lysosomenmarker LAMP1	43
Tab. 19	Kolokalisationen der parasitophoren Vakuole in HFF mit TfR, EEA1 und LAMP1	54
Tab. 20	Kolokalisationen der parasitophoren Vakuole in BMM $\Phi$ mit LAMP1	55

---

AK	Antikörper
BMM-MΦ	Bone Marrow Macrophages (vgl. 2.1.3.4)
BSA	Bovines Serumalbumin = Rinderserumalbumin
CFLS	Konfokale Laserscanmikroskopie
ConA	Concanavalin A
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
EEA1	Early Endosome Antigen1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal-Calf-Serum = Foetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
6G2-AK	Sporoplasmaspezifischer monoklonaler Antikörper (vgl. 2.2.2.4)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HFF	Human Foreskin Fibroblasts (vgl. 2.1.3.1)
<i>HIV</i>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
Kolok	Kolokalisation(en)
L929	Mäusefibroblasten (vgl. 2.1.3.2)
LAMP1	Lysosomal assoziiertes Membranprotein1
MetAP	Methioninaminopeptidase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p.i.	post infectionem (nach Infektion)
PV	Parasitophore Vakuole (von <i>Encephalitozoon cuniculi</i> )
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RAW-MΦ	Murine Makrophagen (vgl. 2.1.3.3)
RT	Raumtemperatur
SWP1	Spore Wall Protein1 (Bohne et al. 2000)
TfR	Transferrinrezeptor
TR	Texas Red
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
ZK	Zellkultur



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Mikrosporidien – biologische Einordnung

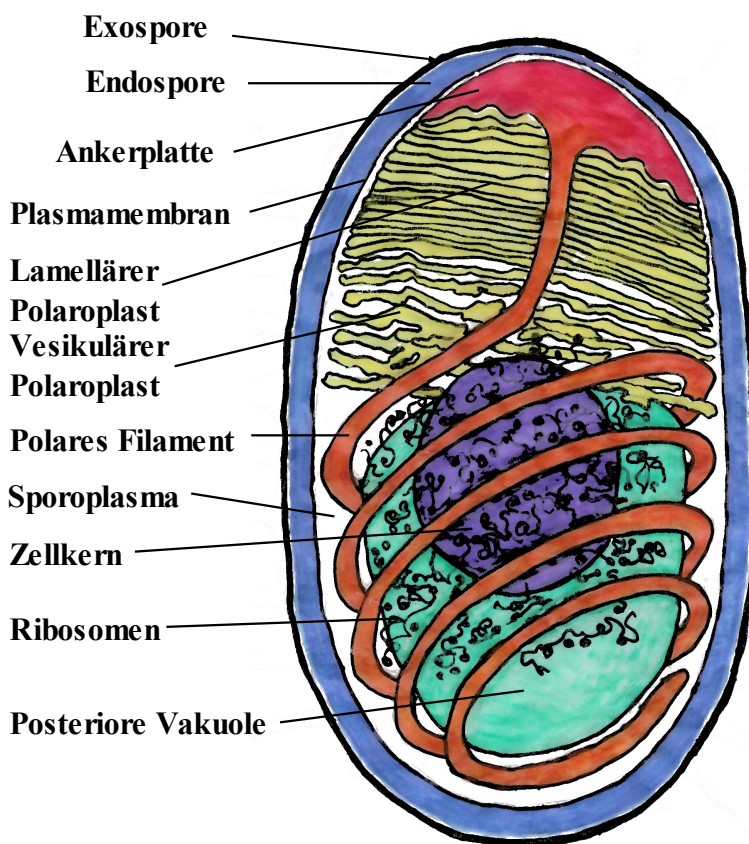
Namentlich nicht zu verwechseln mit Mikrosporen oder Kryptosporidien, stellen Mikrosporidien eine eigenständige eukaryontische Lebensform dar. Man kennt inzwischen über 140 Mikrosporidien-Gattungen und mehr als 1200 Arten (Didier und Weiss 2006). Ihre phylogenetische Einordnung wechselte seit ihrer Entdeckung als Einzeller mehrfach zwischen den biologischen Reichen (Wittner 1999). Ultrastrukturelle Untersuchungen aus der Mitte des letzten Jahrhunderts sprachen für eine Zuordnung in das Reich der Protozoen (Vávra 1976). Moderne molekulargenetische Analysen favorisieren derzeit verwandtschaftliche Beziehungen zu Pilzen (Didier und Weiss 2006, Katinka et al. 2001, Edlind et al. 1996).

Mikrosporidien sind obligat intrazellulär proliferierende Erreger. Außerhalb von Wirtsorganismen kommen sie in Sporenform vor (Cali und Takvorian 1999). Einer erstaunlichen Diversität bezüglich Struktur, Größe, Vermehrungszyklen (Vávra und Larsson 1999) und tierischen Wirten (Canning 1993, Canning und Lom 1986) stehen charakteristische und in der Natur bislang singuläre (Keeling 2001) Gemeinsamkeiten gegenüber. Dieses gilt v.a. für das Infektionsprinzip und damit für den Aufbau der infektiösen, extrazellulären Spore (Vávra und Larsson 1999) – vgl. Abb. 1.

#### 1.1.1 Aufbau und Natur der Spore

Die am häufigsten beobachteten Formen sind oval oder birnengleich, im Längenmaß variierend von 1 µm (*Enterocytozoon bieneusi*) bis 40 µm (einige Mikrosporidienspezies aquatischer Wirte). Eine dicke Umwandung schützt das Sporeninnere vor Umwelteinflüssen. Die äußere Exospore wird als elektronendicht beschrieben und besteht aus gegeneinanderlaufenden, regelmäßig angeordneten Proteinschichten. Darunter folgt die Endospore, deren Hauptbestandteil Chitin für diagnostische Färbemethoden (fluoreszenzmikroskopisch mit optischen Aufhellern) genutzt werden kann (Weber et al. 2000). Untersuchungen über die genaue Zusammensetzung und die Produktion sporenwandspezifischer Proteine führten bereits zu mehreren wichtigen Identifizierungen, darunter ein glycin- und serinreiches Sporenwandprotein (Bohne et al. 2000) und die Regulierung mehrerer Chitinasen-Gene in Abhängigkeit vom intrazellulären Entwicklungsstadium (Rönnebaumer et al. 2006). Von der Endospore wird angenommen, dass sie die reife Spore „versiegelt“ und daher relativ spät im Reifungsprozess vollendet wird (Vávra und Larsson 1999). Als dritte und letzte Schicht folgt eine Zellmembran mit als Transportproteinen interpretierten intramembranösen Partikeln (Bigliardi et al. 1996). Vorläufige Kenntnisse über Lipidkomponenten finden sich bei Méténier und

Vivarès (2001). Das Sporoplasma im Sporennieren wird dominiert von den drei Hauptbestandteilen des Expulsionsapparates. Am vorderen Pol mündet das polare Filament unter einer verdünnten Stelle in der Endospore in seine Verankerungsplatte. Von dort aus orientiert es sich in spiralförmigen Windungen exzentrisch um die Längsachse. Anzahl und Lagen der Windungen, der Winkel ihrer Verlaufebenen sowie die Entwicklung des filamentären Querschnitts sind spezieverschieden. Die Bezeichnung Filament ist im Grunde irreführend, handelt es sich dabei doch um eine komplexe tubuläre Struktur (Keohane und Weiss 1999). Des Weiteren gehören zum Infektionsapparat der Anteriore Polaroplast, der wiederum aus einem Stapel paralleler Membranlamellen besteht, und die Posteriore Vakuole (Vávra und Larsson 1999).



**Abb.1 Schematischer Aufbau einer Spore von *Encephalitozoon cuniculi*.** Farbgebung korrespondierend mit möglicher Darstellbarkeit in unterschiedlichen diagnostischen Verfahren (verändert nach Cali und Owen 1988, sowie Vávra und Larsson 1999, S. 16-17).

Im verbleibenden Raum liegen der eukaryonte Zellkern (je nach Mikrosporidienart einfach oder doppelt) und das Endoplasmatische Retikulum mit zahlreichen im Sedimentationsverhalten (70S) prokaryontenähnlichen, gensequenzanalytisch jedoch reduzierten eukaryontischen Ribosomen (Weiss und Vossbrink 1999, Peyretailade et al. 1998). In Sporonten (Sporenvorläuferstadien vgl. Glossar) lassen sich atypische Golgivesikel beobachten, denen eine Hauptrolle in der Entwicklung sporenspezifischer Organe zugeschrieben wird (Takvorian and Cali 1994). Mikrosporidien galten lange Zeit als primitive Organismen nicht zuletzt wegen vermeintlich fehlender Mitochondrien (Vávra 1976). Die

Entdeckung mitochondrientypischer Gene (Katinka et al. 2001, Hirt et al. 1997) in einem erstaunlich kleinen Gesamtgenom von 2,3 Mbp bis 19,5 Mbp (Weiss und Vossbrink 1999) spricht aber für einen sekundären Verlust im Zuge der evolutionären Spezialisierung und Kompaktierung (Keeling und Fast 2002).

Über die Umweltbeständigkeit der Sporen lässt sich berichten, dass die Resistenz gegen Kälte ausgeprägt ist (Erhalt der Infektiosität nach monatelangem Einfrieren bei  $-70\text{ °C}$ , vgl. Bryan und Schwartz 1999), die Empfindlichkeit gegenüber Hitze (Koudela et al. 1999), UV-Strahlung (Bohne 2004) und pH-Werte  $<4$  (Weidner und Sibley 1985) jedoch hoch ist.

### 1.1.2 Germination und Lebenszyklus

Für die meisten Mikrosporidien sporen gilt, dass sie mit den Absonderungen ihrer Wirtsorganismen ausgeschieden werden, um später durch Ingestion, seltener Inhalation von einem neuen Wirt aufgenommen zu werden (Canning 1993, Weber et al. 2000). Dabei scheint zur Etablierung symptomatischer Infektionen wegen mäßiger Infektiosität der Erreger im sonst gesunden Wirtsorganismus eine größere Anzahl von Sporen notwendig (Canning und Lom 1986).

Das klassische Infektionsmodell geht also davon aus, dass die Initiation der Spore zur Germination im Darmmilieu stattfindet. Zahlreiche Studien belegen den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und pH-Wertverschiebungen als externe Stimuli auf die Verstärkung eines durch osmotische Gradienten angetriebenen hydrostatischen Drucks im Sporennieren (Undeen und Frixione 1990, Undeen und Van der Meer 1994). Über die Rolle intramembranöser Aquaporine (Frixione et al. 1997) oder Trehalaseaktivität (Undeen und Van der Meer 1999) in der trehalosereichen Posterioren Vakuole kann bislang nur spekuliert werden. Interaktionen mit Glykoproteinen möglicher Wirtszellen wurden ebenfalls beschrieben, bedürfen aber noch eingehender Forschungsarbeit (Leitch et al. 2005).

Durch den aufgebauten hohen Druck reißt die Sporenwand an der schwächsten Stelle über der Verankerungsplatte des Polaren Filaments ein. Das Polare Filament krepelt sich wie eine Socke von innen nach außen um und erstreckt sich maximal in mehrfacher Sporenlänge. Bei diesem explosionsartigen Ausschlagen durchschlägt seine Spitze die Plasmamembran der Wirtszelle (Frixione et al. 1992). Intrasporal nimmt die Posteriore Vakuole an Volumen zu und drückt zusätzlich zu dem immer noch herrschenden Überdruck das Sporoplasma mit Kern und Polaroplast durch den präformierten Schlauch hinaus. Am Ende des Polaren Filaments erscheint tröpfchenförmig das nun als Meront bezeichnete Sporoplasma - die Wirtszelle ist infiziert. Die alte Sporenmembran verbleibt in der leeren Sporenhülle, während wahrscheinlich aus den Membranen des mitinjizierten Polaroplasten eine neue Merontenmembran entsteht (Weidner et al. 1984). Der gesamte Prozess von Initiation bis erfolgreicher, vollendeter Infektion dauert kaum zwei Sekunden (Frixione et al. 1992). Als Zweck dieses komplizierten Mechanismus wird das Vermeiden einer phagosomalen Erkennung durch die Wirtszelle angesehen (Cali und Takvorian 1999). Schließlich

durchbohrt das Polare Filament die Wirtszellmembran und setzt das Sporoplasma erst hinter dieser Barriere ab (vgl. 1.4. Phagozytose im Überblick).

Die intrazelluläre Weiterentwicklung wird unterteilt in proliferative Phase (Merogonie) und Sporogonie (Cali und Takvorian 1999). Bereits die proliferierenden Stadien (Meronten, vgl. Glossar) verfolgen abhängig von ihrer Mikrosporidiengattung multiple Strategien des intrazellulären Parasitismus. So lassen sich binäre Zellteilungen von multinukleärer Plasmotomie, freies Vorliegen im Wirtszellzytoplasma von der Entwicklung in speziellen Vesikeln unterscheiden (näheres Eingehen hierauf folgt in 1.3.2 „Parasitophore Vakuole - Forschungsstand“). Weitere Gattungsvariablen findet man bezüglich der Anordnung in Nähe von bestimmten Wirtszellorganellen (Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus oder Mitochondrien – Vávra und Larsson 1999) und der Anzahl möglicher Sporenzyklen, sowie selten sexueller Vermehrung (Cali und Takvorian 1999).

Gegen Ende der intrazellulären Lebensphase nehmen die neugebildeten Sporen einen Großteil des Wirtszellvolumens ein, die Zelle platzt und reife infektiöse Sporen werden in die Umgebung (zumeist Darmlumen) freigesetzt. Während ein Teil nun benachbarte Zellen infiziert, gelangt der Rest auf natürlichem Weg in die Umwelt. Der Lebenszyklus beginnt ab hier erneut.

## **1.2 Humanpathogene Mikrosporidienspezies**

### **1.2.1 Mikrosporidien und der Mensch**

Lange Zeit kannte man Mikrosporidien nur als Parasiten in kulturell genutzten Tierbeständen. Erste kommerzielle Bedeutung erlangten sie durch Befall der anthropogen aufwendig in Südeuropa angesiedelten Seidenraupen (*Nosema bombycis* 1857). Mikrosporidien fand man bereits in nahezu allen Wirbellosen, sogar in einzelligen Ziliaten, und Vertebraten. Ökonomisch hervorzuheben sind sie v.a. als Parasiten von Insekten (Honigbiene) und Fischen in Süß- wie in Salzwasser (Wittner 1999, Canning und Lom 1986)<sup>1</sup>. Da Mikrosporidien in Säugetieren bevorzugt unter engen Lebensbedingungen und Überbevölkerung übertragen werden (Canning 1993), wundert es kaum, dass es wiederholt zu Epidemien in Zoos, bei Labortieren und bei felltragenden Tieren kommt, z.B. bei Blaufüchsen, die zur Pelzgewinnung gehalten werden.

Ihre weite Verbreitung im gesamten Tierreich ist es auch, die bei menschlichen Infektionen mit Mikrosporidien ein zoonotisches Potenzial vermuten lässt (Mathis et al. 2005). Für den Zeitraum vor der AIDS-Pandemie existieren jedoch nur weniger als zehn Fallberichte menschlicher

---

<sup>1</sup> Humanmedizinische Relevanz könnten auch diese Mikrosporidien erlangen, etwa zur Vektorkontrolle der Malaria mit moskitobefallenden *Amblyospora* – bislang durchgeführte Versuche blieben erfolglos. Andere Mikrosporidien werden bereits in der Landwirtschaft eingesetzt, so z.B. in den USA gegen Heuschrecken (Canning 1993).

Erkrankungen an Mikrosporidien (Mathis et al. 2005). Nach Isolierung des *HIV1*-Virus 1983 (Barré-Sinoussi et al.) und 1984 (Gallo et al.) wurden mehrere damit assoziierte Krankheitsbilder beschrieben, darunter das „wasting syndrom“ als chronische Diarrhöe mit ausgeprägtem Gewichtsverlust. 1985 wurde in einem Teil dieser Patienten *Enterocytozoon bieneusi* als bis dahin unbekannte Mikrosporidienart entdeckt (Desportes et al.). Es folgten die Identifikation von *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*<sup>2</sup> ebenfalls aus dem Darm (Cali et al. 1993) sowie *Encephalitozoon hellem* bei *HIV*-begleitenden Keratokonjunktivitiden (Didier et al. 1991). Länger bekannt als Erreger systemischer Mikrosporidiosen in Säugetieren (v.a. enzephalitisch-nephritischer Ausprägung bei Hund und Kaninchen, sehr vereinzelt im Menschen – Canning und Lom 1986) wurde nun auch vermehrt *Encephalitozoon cuniculi* (Levaditi et al. 1923) in Untersuchungsmaterialien AIDS-Kranker gefunden und als opportunistischer Krankheitsverursacher benannt (Groß et al. 1996, Weber et al. 2000, Franzen und Müller 2001). Diese Entwicklung führte dazu, dass die bisher für die Humanmedizin als eher irrelevant betrachtete Mikrosporidiose diagnostisch stärker berücksichtigt und biologisch erforscht wurde. Und so kam es in den vergangenen zwanzig Jahren zu fundamentalen Neuerkenntnissen über die Einzigartigkeit der Mikrosporidien.

## 1.2.2 Mikrosporidiosen

### 1.2.2.1 Immunsystem

Die Mehrzahl der schweren oder fatal verlaufenden humanen Mikrosporidiosen befällt Menschen mit angeborenem oder erworbenem Immundefizit (Weber et al. 2000). Die befallenen Organe zeigen vornehmlich lymphozytäre Infiltrationen und multiple kleinere Läsionen (Canning und Lom 1986, Weber et al. 1999). Immunologische Studien hierzu wurden zumeist an gesunden, athymischen und SCID (severe combined immunodeficient)-Mäusen durchgeführt (Didier und Bessinger 1999). Als kritisch für das Überleben bei intraperitonealer Applikation von *Encephalitozoon cuniculi* haben sich wiederholt CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erwiesen (Braunfuchsová et al. 2002, Khan et al. 1999). Interessanterweise waren CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten für den zeitlichen Ablauf der Infektion bedeutend, spielten aber für den Ausgang keine nachweisbare Rolle (Braunfuchsová et al. 2001, Moretto et al. 2000). Anders verhielt es sich bei peroralen Infektionen mit *Encephalitozoon intestinale* und *Encephalitozoon cuniculi*, bei denen den CD4<sup>+</sup>-Zellen gleichwertig neben den CD8<sup>+</sup>-Zellen ein höherer Stellenwert zugemessen werden muss (Salát et al.

---

<sup>2</sup> Sprachwissenschaftlich korrekt ist *Encephalitozoon intestinale* (n.). Im Folgenden wird diese Schreibweise der in der Literatur üblichen vorgezogen. Die Endung -is ist als Relikt der früheren Einordnung als *Septata* (f.) anzusehen.

2002, Braunfuchsová et al. 2002).

Grundsätzlich lässt sich in allen infizierten Organismen eine starke Antikörperantwort gegen Mikrosporidienantigene nachweisen, ohne dass diese jedoch den Ausgang günstig beeinflussen könnte (Didier und Bessinger 1999). Bei infizierten Carnivoren wurden hyperergere Reaktionen beobachtet, bei denen es im Verlauf durch Immunkomplexbildung zu Nierenversagen kam. Zwar vermindert Antikörperopsonierung die Infektivität der Sporen im Mausmodell, grundsätzlich verhindern sie eine Infektion aber nicht (Didier et al. 2000). Wichtiger in diesem Zusammenhang sollen hingegen Interleukin-12, Interferon- $\gamma$  (vermutlich nicht über Makrophagenaktivierung sondern durch verstärkte Expression der MHC-I- und -II-Moleküle (Khan und Moretto 1999, Franzen et al. 2005a)), NK-Zellen und Komplementsystem sein (Didier und Bessinger 1999). Inwiefern sich diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen, kann anhand dieser Versuche nicht bestimmt werden.

### 1.2.2.2 Klinische Manifestationen

In *HIV*-positiven Individuen rechnet man ab einer CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenzahl <100 /  $\mu$ l mit Mikrosporidienerkrankungen (Hoen und May 2006; Weber et al. 2000). Am häufigsten sind die beiden oben bereits erwähnten Arten *Enterocytozoon bieneusi* und *Encephalitozoon intestinale*, die zusammen in 30% aller chronischen Durchfälle nachgewiesen werden können (Fishman 2002). Andere humanpathogene Mikrosporidien sind, neben *Encephalitozoon cuniculi* und *Encephalitozoon hellem*, die selteneren Arten *Brachiola vesicularum*, *Brachiola algerae*, *Microsporidium africanum*, *Microsporidium ceylonensis*, *Nosema (Anncaliia) connori*, *Nosema ocularum*, *Pleistophora sp.*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Trachipleistophora hominis* und *Vittaforma corneae* (Didier und Bessinger 1999, Weber et al. 2000). Sie finden sich bevorzugt extraintestinal im Auge (Keratokonjunktivitis), im oberen und unteren Respirationstrakt (Sinusitis, Bronchiolitis und Pneumonie – häufig im Rahmen einer Dissemination), Urogenitaltrakt (interstitielle Nephritis), in Leber und Gallenwegen (granulomatöse Hepatitis, akalkuläre Cholecystitis, Cholangitis und Pankreatitis), im Zentralen Nervensystem, im Muskelgewebe (Herz und Myositis der Skelettmuskulatur) sowie weitere Lokalisationen als Einzelfälle (Weber et al. 2000). Insgesamt ist die Inzidenz von Mikrosporidienerkrankungen bei *HIV*-Patienten, die uneingeschränkten Zugang zu antiretroviraler Medikation haben<sup>3</sup>, v.a. seit Einführung der Protease-Inhibitoren stark rückläufig (Hoen und May 2006). Die Restauration eines funktionsfähigen Immunsystems besitzt, auch angesichts unbefriedigender antibiotischer Therapiemöglichkeiten des

---

<sup>3</sup> Somit wird deutlich, warum Mikrosporidien bei *HIV*-Positiven in Ländern des Südens unveränderte Bedeutung haben. Vgl. Tumwine et al. 2005, Chacin-Bonilla et al. 2006, Sarfati et al. 2006.

häufigsten Erregers *Enterocytozoon bieneusi*, oberste Priorität (Groß 2003, Carr et al. 1998, Conteas et al. 1998).

Mit wachsenden Bevölkerungsanteilen, die therapeutisch immunsupprimiert werden, entweder wegen autoimmunologischer Erkrankungen oder nach Transplantationen, steigt auch die Häufigkeit dokumentierter Infektionen mit Mikrosporidien bei diesen Patienten. Noch liegen zu geringe Fallzahlen vor, um daraus konkrete Schlüsse zu ziehen, doch hat es den Anschein, dass in diesem Zusammenhang der Erreger *Encephalitozoon cuniculi* in seiner Relation zu *Enterocytozoon bieneusi* häufiger auftritt als bei *HIV*-Patienten (Rabodonirina et al. 2003, Teachey et al. 2004, Orenstein et al. 2005).

Sensibilisiert durch die Aufmerksamkeit, die Mikrosporidien bei *HIV* zuteil wurde, wird in den letzten Jahren auch in immunkompetenten Menschen verstärkt nach diesen Parasiten gefahndet. Dabei stellte sich heraus, dass v.a. *Enterocytozoon bieneusi* durchaus als Ursache selbstlimitierender, wässrig-unblutiger Diarrhöe bei Tropenreisenden in Betracht kommt (Lopez-Velez et al. 1999, Weber et al. 2000, Wichro et al. 2005).

Neben ungewohnter Exposition beeinflussen auch konstitutionelle Faktoren eines Wirtsorganismus die Etablierung von Infektionen. Bezogen auf Mikrosporidien führt die besondere immunologische Situation im vorderen Augenbereich zu gehäuften Ulzerationen der Kornea und zu Keratokonjunktivitis durch *Nosema*- und *Encephalitozoon*-Arten im sonst Immunkompetenten (Weber et al. 2000, Chan et al. 2003). Als immunologisch privilegiertes Gewebe ist dieser Teil des Körpers der zytolytischen Abwehr (Komplement, NK-Zellen und T-Lymphozyten) nur eingeschränkt zugänglich (Niederhorn 2006, Janeway et al. 2005). Da aber genau diese zur Beseitigung von mikrosporidienbefallenen Zellen notwendig ist, kommt es gelegentlich zu lokalem Befall.<sup>4</sup>

### 1.2.2.3 Epidemiologie, Diagnostik und Therapieansätze

Die Seroprävalenz der Mikrosporidien in der Bevölkerung ist unklar. Das hängt damit zusammen, dass Seren hohe Kreuzreaktivitäten für unterschiedliche Mikrosporidienspezies zeigen und dass eine genaue Spezieszuordnung nicht allein morphologisch, sondern nur mittels PCR erfolgen kann (Mathis et al. 2005, Didier und Bessinger 1999, Groß et al. 1996). Zwar weisen einzelne Untersuchungen eine Seroprävalenz von 5-8% für *Encephalitozoon-intestinale*-spezifische Antikörper auf (Bryan und Schwartz 1999, Del Aguila et al. 2001), doch wurden diese in kleinen, selektierten Gruppen erhoben, und es ist nicht klar, in welchem Umfang eine transiente Besiedlung bei Immunkompetenten vorkommt (Groß 2006). Insofern bleibt abzuwarten, ob Mikrosporidiosen bei Schwächung des Immunsystems in vorher asymptomatischen Trägern reaktiviert werden

---

<sup>4</sup> Kontaktlinsenträger sind hiervon besonders betroffen (Theng et al. 2001, Didier et al. 2005a).

könnten.

Die geographische Verteilung nachgewiesener Mikrosporidieninfektionen im Menschen erstreckt sich über alle Kontinente (Bryan und Schwartz 1999). Als mögliches Erregerreservoir kommen v.a. für *Encephalitozoon cuniculi* und *Encephalitozoon intestinale* Wild- (Wilson 1979) und Haustiere in Betracht (Canning und Lom 1986, Mathis et al. 2005), auch *Enterocytozoon bieneusi* wurde 2005 erstmals im Kot städtischer Tauben nachgewiesen (Haro et al.). Für *Encephalitozoon hellem* scheint eine Übertragung durch Papageienvögel denkbar (Weber et al. 2000). Erst kürzlich wurde *Brachiola algerae* in Anopheles-Moskitos gefunden (Visvesvara et al. 2005). Ausführliche Fallkontrollstudien bei erkrankten *HIV*-Patienten und Transplantatempfängern konnten Tierhaltung nicht als Risikofaktor für die Entwicklung einer Mikrosporidiose feststellen. Vielmehr trat hierbei der Kontakt mit belastetem Trinkwasser und Schwimmbädern in den Vordergrund (Rabodonirina et al. 2003, Hutin et al. 1998).

Wegen nachgewiesener hoher Ausscheidungsraten in Stuhl und Urin sowie Transmission in Lebensgemeinschaften werden Autoinokulation beispielsweise bei okulärem Befall und sexuelle oder nichtsexuelle Mensch-zu-Menschkontamination angenommen (Weber et al. 2000).

Um Mikrosporidien erfolgreich nachweisen zu können, ist es in erster Linie wichtig, an sie zu denken. Es ist wegen ihrer kleinen Größe (1  $\mu\text{m}$  -3  $\mu\text{m}$  bei humanpathogenen Arten) unwahrscheinlich, Mikrosporidien in der Routinediagnostik mikroskopisch zu bemerken (Weber et al. 1999). Als Untersuchungsmaterial dienen je nach Symptomlokalisierung Stuhlproben, andere Körperflüssigkeiten (Urin, Liquor, Sputum, BAL, Duodenal-/Gallensaft), Abstriche, Biopsien und Kornealabschabsel. Außer in Gewebeproben werden in der Regel die Sporen nachgewiesen, z.B. mit spezieller Trichrom-Färbung nach Weber, Gram, Giemsa und fluoreszierenden optischen Aufhellern. Die Gewebestadien lassen sich zusätzlich mit HE, PAS und Giemsa anfärben.<sup>5</sup> Da die sichere Speziesidentifizierung mit all diesen Methoden nicht möglich ist, diese Information aber die therapeutische Entscheidung essenziell beeinflusst, müssen molekulargenetische (PCR) oder elektronenmikroskopische Untersuchungen folgen (Groß 2006, Weber et al. 2000). Außerhalb von Stuhlkulturen (starke Hintergrundfärbung zu erwarten) kann bei Verfügbarkeit entsprechender Antisera auch eine immunologische Sichtbarmachung durchgeführt werden. Die in-vitro-Anzucht der obligat intrazellulären Mikrosporidien muss in Zellkulturen erfolgen. Für die humanmedizinische Forschung kommt erschwerend hinzu, dass der am häufigsten identifizierte Erreger *Enterocytozoon bieneusi* bis heute nicht langfristig in Kultur gehalten werden kann (Didier und Weiss 2006). Gelegentlich wird *Vittaforma corneae* in Versuchen als *Enterocytozoon*-Ersatz

---

<sup>5</sup> Nähere Beschreibung der Färbemethoden siehe Heitz et al. (2001) sowie Miksits und Böttger (2001).



benutzt, da molekulare Ähnlichkeiten, verbunden mit augenscheinlich gleicher intrazellulärer Strategie und Antibiotikaresistenz, dieses nahelegen (Didier et al. 2005b).

Wie bereits oben angedeutet, sind die Möglichkeiten der antibiotischen Therapie bislang begrenzt und abhängig von der zugrundeliegenden Mikrosporidienspezies. Alle *Encephalitozoon*-Spezies sprechen gut auf eine Behandlung mit Albendazol per os an (400 mg x 2 / d über zwei, vier bis acht Wochen) (Groß 2003, Weber et al. 2000, Delfraissy 2004). Mit dem Verschwinden klinischer Symptome versiegt in der Regel auch die Sporenausscheidung aus dem Darm und im Urin. Vereinzelt wurde aber über intestinale Erregerpersistenz trotz klinischer Restitution unter Albendazol geschrieben (Wichro et al. 2005). Die sonst bei verschiedenen Wurmerkrankungen eingesetzte Substanz inhibiert die Tubulinpolymerisation durch Bindung an  $\beta$ -tubulin und beeinflusst damit die Kernteilung in der Merogonie und Sporogonie (Didier 1997).

Während mit Albendazol ein relativ gut verträgliches Medikament vorliegt<sup>6</sup>, gilt für das einzige sicher gegen *Enterocytozoon bieneusi* wirksame Antibiotikum Fumagillin bei systemischer Gabe das Gegenteil. Bei der lokalen Anwendung von Fumagillin im Auge, z.B. bei *E.hellem*-Infektion, ist seine Toxizität glücklicherweise jedoch unbedeutend (Weber et al. 2000). Fumagillin, ein Angiogeneseinhibitor produziert von *Aspergillus fumigatus*, wirkt in einer p.o.-Dosierung von 60 mg pro Tag über zwei Wochen gut im Sinne klinischer Verbesserung und Verschwinden des Pilzes aus untersuchten Stuhlproben (Molina et al. 2002). Eine wichtige unerwünschte Arzneimittelwirkung ist die teilweise transfusionspflichtige Knochenmarkstoxizität. Mit der Entwicklung des semisynthetischen Fumagillinanalogons TNP-470 erhoffte man sich diesbezüglich eine Verbesserung (Didier 1997), bislang überzeugt die Substanz in ihrer Wirksamkeit gegenüber Fumagillin nur begrenzt (Didier et al. 2006). Interessant für Weiterentwicklungen bleibt jedoch der vermutete selektive Ansatzpunkt: die Methioninaminopeptidase 2 (MetAP2). Im Genom von *Encephalitozoon cuniculi* wird die Methioninaminopeptidase von einem Gen kodiert (Katinka et al. 2001), wohingegen die meisten Eukaryonten zwei Isoformen (Methioninaminopeptidase 1 und 2) besitzen. Die Aktivität der MetAP1 wird von Fumagillin quasi nicht beeinflusst und reicht in humanen Zellen zum Überleben aus (Didier et al. 2006).<sup>7</sup>

---

<sup>6</sup> Zu beachten ist das teratogene Potenzial der Substanz, die in Schwangerschaft und Stillzeit dringend gemieden werden sollte. Längerfristige Anwendung sollte nur unter Blutbild- und Transaminasenkontrolle erfolgen.

<sup>7</sup> Im übrigen wird von den bekannten Antibiotika der Einsatz von Fluorchinolonen diskutiert (Didier et al. 2005b). In vitro vermochte die Substanz Resveratrol über mehrere hypothetische Mechanismen, Infektionen mit *Encephalitozoon cuniculi* günstig zu beeinflussen (Leiro et al. 2004). Die bei HIV-Patienten mit therapieresistenten gastrointestinalen Beschwerden und Mukositis als ultima ratio angewandte Substanz Thalidomid (TNF- $\alpha$ -Inhibitor) führt zwar zur klinischen Besserung, ändert aber nichts an der Pilzlast (Weber et al. 2000). Diskutiert wird dazu ein direkt antiparasitärer Effekt der HIV-Protease-Inhibitoren, der über die Wiederherstellung der Immunfunktionen hinausgehen soll (Pozio und Morales 2005)

### 1.3 *Encephalitozoon cuniculi* und die parasitophore Vakuole

#### 1.3.1 *Encephalitozoon cuniculi* - Speziesbesonderheiten

Als Levaditi et al. 1923 die erste mikrosporidiale Spezies in Gehirn und Nieren schwerkranker Kaninchen entdeckten, meinte man fälschlich den Erreger der Tollwut identifiziert zu haben (Canning und Lom 1986). Gestützt wurde diese Vermutung durch spätere Erregerfunde in Speicheldrüsen bei Hunden. Tatsächlich bezeugen diese Untersuchungen den ersten mikroskopischen Fund einer Säugetierinfektion mit Mikrosporidien. Es stellte sich heraus, dass *Encephalitozoon cuniculi* (*E.cuniculi*) ein ungewöhnlich breites Wirtsspektrum innerhalb der Mammalia befällt, darunter Kaninchen, Mäuse, Ratten, Hunde, Füchse, Katzenartige, div. Nutztiere wie Pferd und Schwein, Primaten inkl. des Menschen (Canning und Lom 1986). Molekulargenetisch konnten drei Unterarten I („rabbit strain“), II („mouse strain“) und III („dog strain“) bestimmt werden (Didier et al. 1995), von denen I und III mehrfach für menschliche Erkrankungen verantwortlich gemacht wurden (Mathis et al. 2005). Die Ausbildung der Krankheitsbilder variiert stark. Am vital bedrohlichsten prägt sich diese Mikrosporidiose in Carnivoren aus, wenn eine transplazentare Übertragung (Modus noch Gegenstand der Diskussion – Canning 1993) stattgefunden hat.

Die weite Verbreitung von *Encephalitozoon cuniculi* und die vergleichbar unkomplizierte Kultivierung (Visvesvara 2002, Shaddock 1969) führten dazu, dass *E.cuniculi* die weitaus am besten studierte Mikrosporidienart ist (Canning und Lom 1986). An *E.cuniculi* gewonnene Erkenntnisse ungeprüft auf andere Arten zu übertragen birgt jedoch die Gefahr, die besondere Stellung dieser Spezies außer acht zu lassen. Zahlreiche Elemente des Lebenszyklus unterscheiden sie offenbar grundsätzlich von anderen Arten und auch von *Enterocytozoon bieneusi*.

Nach Vávra und Larsson (1999) besitzt die infektiöse Form von *E.cuniculi* ein isofilares polares Filament, das sich in ca. sechs Windungen in der uninukleären Spore anordnet. Die Zellteilung im Merontenstadium erfolgt binär, die Sporonten teilen sich in genau zwei Sporoblasten und sind somit disporös. Es wird ein einfacher Generationszyklus mit isomorphen Sporen 1,5 µm x 2,5 µm beschrieben. Intrazellulär liegt *E.cuniculi* in einer membranösen parasitophoren Vakuole vor (Petri 1969, Barker 1975, Weidner 1975), auf die noch detailliert eingegangen werden soll (1.3.2). Im Gegensatz dazu liegt *Enterocytozoon bieneusi* frei im Zytoplasma, wieder andere Mikrosporidien umgeben sich in der Sporogonie mit Material, das sporophore Vesikel formt (Vávra und Larsson 1999). Das 2,9 Mbp kleine Genom von *E.cuniculi* wurde 2001 von Katinka et al. vollständig entschlüsselt und veröffentlicht.

Die Ausbreitung im Körper infizierter Organismen erfolgt disseminierend, *E.cuniculi* wurde

ubiquitär nachgewiesen. Anders als die meisten Mikrosporidien befällt *E.cuniculi* wahrscheinlich nicht die Zellen der Darmmukosa (Cox et al. 1979). Vielmehr findet man *E.cuniculi* in vaskulären Endothelien, Nierentubuluszellen, Makrophagen und Fibroblasten unterschiedlichster Gewebe. Diese Beobachtungen führten zu der Theorie, dass infizierte Makrophagen *E.cuniculi* vom Gastrointestinaltrakt ausgehend zu fernen Infektionsorten wie dem Gehirn transportieren könnten. Seine Distribution mag aber auch direkt als Spore über das venöse Blut und die Leber passieren (Canning und Hollister 1991, Canning und Lom 1986).

### 1.3.2 Parasitophore Vakuole - Forschungsstand

Schon im Merontenstadium umgibt die proliferierenden *E.cuniculi*-Erreger eine einfache Membran, die mit Volumenzunahme des von ihr umschlossenen Inhalts mitwächst. Die Meronten scheinen mit ihrer Plasmamembran der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) anzuhaften. Je größer die Zahl der intravakuolären Meronten wird, umso häufiger beobachtet man Ablösungen von der PVM und die Entstehung eines epiparasitären Raums. Zusätzlich bilden sich an der PVM kleine vesikuläre Ein- und Ausstülpungen („Blebs“), die bislang als Internalisierung von Wirtszellzytoplasma in die parasitophore Vakuole interpretiert wurden (Weidner 1975, Vávra und Larsson 1999). Weidner und andere Mikrosporidienforscher vertraten die Ansicht, dass die parasitophore Vakuolenmembran von der Wirtszelle stammt (1975). Magaud et al. (1997) postulierten für andere Encephalitozoonspezies (*E. intestinale*) einen phagosomalen Ursprung.

Mit zunehmender Differenzierung in reifere Stadien sammeln sich diese (Sporonten und Sporoblasten) im Lumen der parasitophoren Vakuole (PV). Entlang der parasitophoren Vakuolenmembran verharren die Zellen jedoch bis zur Ruptur der PV im Merontenstadium und es resultiert eine asynchrone Entwicklung (Bohne et al. 2000, Weidner 1975). Ob die Meronten dort aktiv am Nährstoffaustausch oder an der Erhaltung der Membranbarriere mitwirken, ist ungewiss.

Auffällig ist die Affinität der wachsenden parasitophoren Vakuole zu Mitochondrien (Canning und Hollister 1991). Da *E.cuniculi* vermutlich in der Lage ist, ATP über spezifische Transportproteine von außen einzuschleusen (Katinka et al. 2001), mehren sich Hinweise auf Strategien, die denen von *Toxoplasma gondii* ähneln (Sinai et al 1997). Einmal mit der parasitophoren Vakuolenmembran assoziiert, verbleiben Mitochondrien dort stabil lokalisiert. Jedenfalls besteht nach Scanlon et al. (2004) keine Abhängigkeit von tubulingebundenen Zytoskelettarrangements.

Insgesamt scheint die Natur der PVM nicht primär nur eine abgrenzende Funktion zu erfüllen, sondern scheint durchlässig für zahlreiche Nutritiva und kleinere Moleküle zu sein. Ionenkonzentrationen dies- und jenseits der Membran werden als quasi isotonisch beschrieben

(Leitch et al. 1995). Calcium- und H<sup>+</sup>-Ionenkonzentrationen der fortgeschrittenen PV von *Encephalitozoon hellem* wurden relativ bestimmt und unterschieden sich dabei nicht von zytoplasmatischen Konzentrationen der infizierten oder uninfizierten Wirtszellen. Minimale Ionenkonzentrationsschwankungen der Umgebung übertrugen sich direkt auf das Innere der parasitophoren Vakuole. Hier besteht eine weitere Gemeinsamkeit mit den parasitären Vakuolen von *Toxoplasma gondii* und Plasmodien (Leitch et al. 1995, Desai et al. 1993).

In längere Zeit zurückliegenden Versuchen demonstrierte Weidner 1975, dass die ältere parasitophore Vakuole nicht mit ferritinmarkierten Lysosomen fusioniert. Damit schien die PV-Entwicklung außerhalb des klassischen endophagosomalen Weges stattzufinden. Weil sich inzwischen gezeigt hat, dass seitens diverser intrazellulärer Erreger hierbei Zwischenwege beschränkt werden (Haas 2007), lohnt es sich, dieser Frage erneut und genauer nachzugehen.

Zusammenschauend beschränken sich bisherige Analysen der parasitophoren Vakuole von *E.cuniculi* aus Gründen mangelnder Differenzierbarkeit zwischen junger Infektion (frühe Merontenstadien) und phagozytierten Sporen auf die Analyse letzterer oder weit fortgeschrittener Entwicklungsstadien (Couzinet et al. 2000, Weidner und Sibley 1985). Da für den Erfolg der intrazellulären Überlebensstrategie jedoch der Modus der frühen Etablierung der Meronten und die Auseinandersetzung mit den Abwehrmechanismen des Wirtes entscheidend sind, wurde die hier vorliegende Arbeit auf eben diese frühen Infektionen fokussiert

## **1.4 Phagozytose - Überblick (Ablauf und beteiligte Zellkompartimente)**

Einerseits wird für den Invasionsmechanismus der Mikrosporidien argumentiert, er diene dazu, der Wirtszellphagozytose zu entgehen, andererseits soll nach bisherigen Erkenntnissen speziell die parasitophore Vakuolenmembran von *E.cuniculi* von der Wirtszelle stammen (Weidner 1975 – bisher nicht widerlegt) und könnte somit u.a. phagosomal erworben sein. Um diesen hypothetischen Ursprung abzuklären, bedarf es der Auseinandersetzung mit gültigen Phagozytose- und Phagosomenreifungsmodellen. Ein umfassender Reviewartikel zu diesem Thema wurde in diesem Jahr (2007) von Haas verfasst.

### **1.4.1 Endozytose – Pinozytose**

Phagozytose gilt als eine Sonderform der Endozytose. Alle eukaryontischen Zellen nehmen kontinuierlich durch Endozytose kleine gelöste Stoffe aus ihrer Umgebung auf. Dabei stülpt sich die Zellmembran über häufig clathrinbeschichteten Vertiefungen ein und umschließt extrazelluläres

Material durch einwärts gerichtete Abschnürung. Innerhalb von Sekunden wird daraus durch Abwerfen der Clathrinhülle ein Endosom, in dem sich das weitere Schicksal des membranumschlossenen Inhalts entscheidet (Alberts et al. 2004). In der Zelle existieren unterschiedliche ein- und auswärts gerichtete Transportströme, die sich in definierten Knotenpunkten treffen. Charakteristische Membranproteine führten u.a. zu der Identifikation dreier solcher Stationen: Frühe Endosomen, Späte Endosomen und Lysosomen (vgl. Abb. 2). Aufgenommenes Material gelangt nun entweder als Recycling-Endosom zurück an die Zelloberfläche, wo es wieder ausgeschieden wird, kann aber auch der zellulären Verdauung zugeführt werden. Dazu verschmilzt es als frühes Endosom effektorprotein- und mikrotubulivermittelt mit Späten Endosomen (Der genaue Ablauf ist noch unklar – Alberts et al. 2004)<sup>8</sup>. Diese stammen aus dem Golgi-Apparat und führen eine Vielzahl von Verdauungsenzymen (Hydrolasen) mit sich. Zusätzlich bewirkt eine membranständige Protonenpumpe (H<sup>+</sup>-ATPase) die Ansäuerung des Lumens und damit die Schaffung eines optimalen Milieus für die Enzymaktivität. Weitere Fusionsprozesse des Späten Endosoms münden in der Entwicklung zum Lysosomen. In diesem setzt sich der Abbau des endozytierten Materials fort.

#### 1.4.2 Endozytose - Phagozytose

Während die beschriebenen Abläufe in erster Linie für kleine Partikel < 0,4 µm gelten (Pinozytose), werden größere Strukturen wie abgestorbene Zellen und schädliche Agenzien (darunter mikrobiologische Krankheitserreger) v.a. von spezialisierten phagozytierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophilen Granulozyten) aufgenommen (Rabinovitch 1995). Anders als die Pinozytose läuft diese Form der Endozytose, Phagozytose, nicht kontinuierlich sondern rezeptorvermittelt oder nach alternativer Initiierung ab. Viele Bakterien, die sich obligat oder fakultativ intrazellulär vermehren, nutzen Phagozytose als Mittel zum Betreten der Wirtszelle (Haas 2007, Tjelle et al. 2000, Alberts et al. 2004). Wie für *Toxoplasma gondii* gezeigt wurde, spielt der Eintrittsmechanismus in die Zelle eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Fortentwicklung (Sibley et al. 1985, Sinai et al. 1997).

Phagozyten tragen Rezeptoren für Komplementfaktoren oder Fc-Teile von Immunglobulinen und internalisieren gebundene, opsonierte Bakterien über Pseudopodienbildung, die abhängig ist von Aktinpolymerisation. Daneben existieren zahlreiche andere Membranproteine der Wirtszelle, die z.B. als Oligosaccharid-Rezeptoren von Erregern erkannt werden. Nach Adhäsion der Erreger werden sie von den rezeptortragenden Zellen phagozytiert, ohne dass eine Opsonierung

---

<sup>8</sup> Multivesikuläre Körperchen könnten eine essenzielle Mittlerrolle spielen.

vorangegangen wäre (Tjelle et al. 2000). Zunehmendes Interesse gewinnt auch für die Phagozytose die Gruppe der Toll-Like-Rezeptoren, deren endgültige Funktion in dieser Hinsicht noch unklar ist (Haas 2007). Bei nicht-professionellen Phagozyten täuschen Bakterien die designierte Wirtszelle indem sie sich an Zelladhäsionsmoleküle anheften und die Zelle bei dem Versuch Zellkontakte herzustellen, den Erreger umschließt (Alberts et al. 2004, Rabinovitch 1995). Solche rezeptorvermittelten Phagozytoseprozesse werden als Zipper-Mechanismen (Reißverschluss-Mechanismen) bezeichnet. Als Trigger-Mechanismus bekannt ist die Induktion der Makropinozytose durch bakterielle Signalsubstanzen. Dabei nutzt der freie Erreger den Flüssigkeitseinschluss, um mit ihm in die Zelle zu gelangen (Haas 2007). Das Kompartiment, das die auf unterschiedlichem Wege phagozytierten Strukturen umschließt, wird Phagosom genannt. Bakterien verhalten sich beim derartigen Eindringen in ihre Wirtszellen also selbst eher passiv, die energiereichen Prozesse der Aktinpolymerisation etc. werden von ihnen zwar angestoßen, jedoch von der Wirtszelle ausgeführt. Anders läuft es bei manchen Eukaryonten, die eher aktive Invasionsstrategien bevorzugen. So wurde nachgewiesen, dass *Toxoplasma gondii* das eigene Zytoskelett benötigt, um über eine kragenartige Struktur (Conoid) in die Wirtszelle eindringen zu können (Sibley und Andrews 2000).

### 1.4.3 Phagosomenreifung

Die natürliche Entwicklung eines Phagosoms mündet in Fusionen mit dem endosomalen System und in der Zersetzung und Tötung seines Inhalts. Dabei werden analog zu den oben für Endozytose geschilderten Schritten mehrere Stationen durchlaufen. Erfolgt eine vollständige Fusion mit Endosomen und Lysosomen, kann man deren Markerproteine auch auf den resultierenden Endophagosomen- bzw. Phagolysosomenmembranen finden<sup>9</sup>. Der zeitliche Ablauf folgt dabei einer für unterschiedlichste Substanzen reproduzierbaren Kinetik. Ungefähr 20 Minuten nach Phagosomenbildung ereignen sich heterotype Fusionen zwischen späten Endosomen und Phagosomen. Nach ca. zwei Stunden kommt es dann in relevanter Anzahl zu Fusionen mit Lysosomen (Tjelle et al. 2000).

Neben komplett vollzogener Fusion existiert noch eine Kontaktform zwischen den Kompartimenten, die „kiss-and-run“-Interaktion benannt wird. Hierbei kommt es zu einem teilweisen Austausch der Inhaltsstoffe, ohne dass die Membranen miteinander dauerhaft verschmelzen.

---

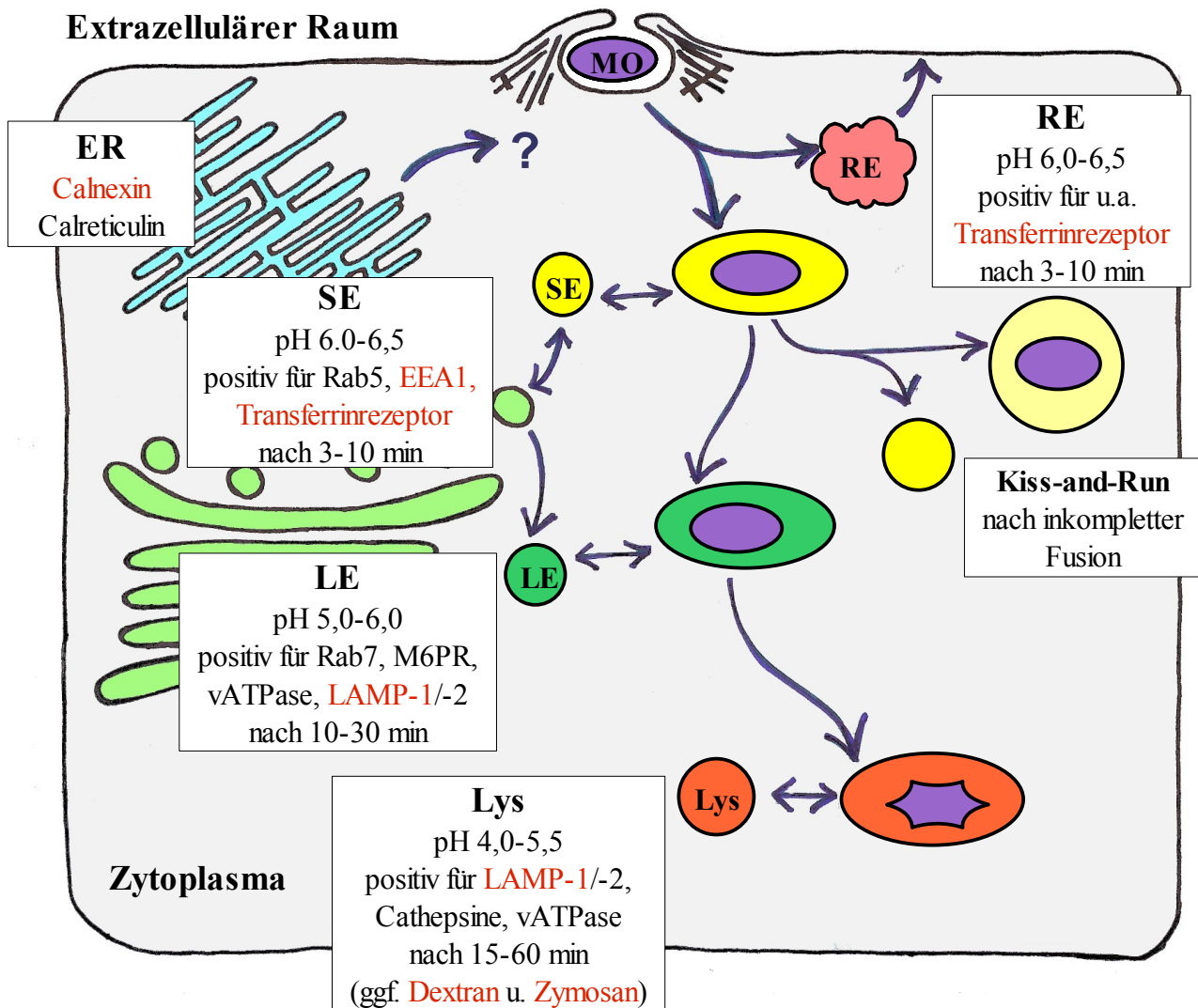
<sup>9</sup> Außerdem werden ausgehend vom Späten Endophagosom Proteinefragmente gebunden an MHCII-Moleküle zur Antigenerkennung für das Immunsystem an die Zelloberfläche geschleust. Die Darbietung auf MHCI-Molekülen bedarf noch unklarer Umwege über das Endoplasmatische Retikulum (Haas 2007, Tjelle et al. 2000).

In jüngeren Studien zur Biogenese des Phagosoms erörtern die Autoren die zuvor vernachlässigte Bedeutung des Endoplasmatischen Retikulums, seiner Proteine und Membranen (vgl. Literaturverzeichnis Haas 2007). Bislang wird deutlich, dass ER-Chaperonproteine maßgeblich an der Bildung der phagosomalen Einstülpung beteiligt sind (Müller-Taubenberger et al. 2001).

Auch wenn man nicht sicher weiß, inwiefern die phagosomale Reifung für intrazelluläre Erreger den Tod oder den Verlust der Regenerationsfähigkeit bedeuten würde, haben Pathogene zahlreiche Mechanismen entwickelt, um den gewöhnlichen Pfad zu verlassen. Zum Einen entfliehen manche Erreger dem phagosomalen Kompartiment, andere beeinflussen den Ablauf der phagosomalen Reifung und dirigieren Organellassoziationen. Insgesamt wurden hierfür vier Hauptkategorien geschaffen (Haas 2007 u.a.), auf die in der Diskussion detailliert eingegangen werden soll.

### **1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit**

Die intrazelluläre Entwicklung von *Encephalitozoon cuniculi* erfolgt innerhalb einer parasitophoren Vakuole, deren Biogenese und Interaktionen mit Wirtszellkomponenten unklar sind. Die vorliegende Arbeit will versuchen, die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) von *E.cuniculi* auf Fusionen oder Assoziationen mit den wichtigsten endophagosomalen Kompartimenten der Wirtszelle zu analysieren, um hierdurch die Stellung der PV innerhalb des Vesikeltransportsystems der Wirtszelle zu ermitteln. Eine mögliche Assoziierung des Erregers mit Wirtszellkomponenten soll durch mikroskopische Kolo-kalisationsexperimente nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung erfolgen. Zur Darstellung von *E.cuniculi* sollen monoklonale Antikörper verwendet werden, die zwischen unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *E.cuniculi* differenzieren können. Als Markerproteine für Endosomen, Lysosomen und das Endoplasmatische Retikulum der Wirtszelle sollen der Transferrin-Rezeptor (TfR), das Early Endosome Antigen1 (EEA1), das Lysosomal assoziierte Membranprotein1 (LAMP1) und Calnexin dienen (Vgl. Abb. 2 und Glossar), die ebenfalls mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die Untersuchungen sollen an unterschiedlichen Wirtszelltypen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Etablierung der Infektion durchgeführt werden. Zur Verwendung kommen humane und murine Fibroblasten (HFF und L929) als nichtprofessionell-phagozytierende Zelltypen sowie murine Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) als Vertreter professioneller Phagozyten.



**Abb. 2 Vereinfachtes Phagozytoseschema** nach Haas (2007, S. 3), Alberts et al. (2004; S. 862,873,1690) und Tjelle et al. (2000, S. 256 und 261). Nach aktinvermittelter Phagozytose eines Mikroorganismus (MO) erfolgt die phagosomale Reifung entlang der Pfeile. Dabei kommt es zu Fusionen mit endozytotischen Organellen der jeweils nächsten Reifungsstufe. Exozytose geschieht über Recycling- Endosomen (RE). Abtötung und Verdauung des phagozytierten Partikels passiert vornehmlich in Späten Endosomen und Lysosomen. Eine inkomplette Fusion mit Organellen führt zu einem Austausch der Inhaltsstoffe ohne dauerhafte Verschmelzung der Membranen (Kiss-and-Run). Die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums für den Phagozytoseprozess ist unklar. Charakteristische Eigenschaften und Kinetik der jeweiligen Kompartimente sind den zugeordneten Kästchen zu entnehmen – in dieser Arbeit untersuchte Marker sind durch rote Schrift hervorgehoben. SE – Sortierendes (Frühes) Endosom, LE – Late (spätes) Endosom, Lys – Lysosom, ER – Endoplasmatisches Retikulum, M6PR – Mannose-6-phosphat-Rezeptor, Rab5 u. 7 – spezifische GTPasen, vATPase – vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase, EEA1 – Early Endosome Antigen 1, LAMP-1/-2 – Lysosomal assoziierte Membranproteine 1 u. 2.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial

In Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien (inkl. der runden Deckgläschen) wurden zuvor bei 121 °C unter gesättigtem Wasserdampf  $2,02 \cdot 10^5$  Pa für 15 Min. autoklaviert. Im Folgenden nicht gelistete Verbrauchskemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma und Biochrom geordert.

<b>Tab. 1</b>	
<i>Chemikalie, Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Mowiol® (Polyvinylalkohol)	Calbiochem, # 475904, Bad Soden
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Na <sup>+</sup> -Pyruvat	Biochrom, Berlin
NEAA	Biochrom, Berlin
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer	Biochrom, Berlin
Glucose	Biochrom, Berlin
Interleukin-6	Boehringer, Mannheim, Charge 14899200
Trypsin / EDTA	Gibco, Karlsruhe
EDTA	Biochrom, Berlin
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Steinheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
24-Lochplatten	Falcon, Multiwell
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Falcon
Zellkulturflaschen 80 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Nunc, Roskilde
PP-Reagenzgläser mit Drehverschluss	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
PBS	Merck, Darmstadt
Nagellack, Resist and Shine, soft rose	L'Oréal
Wattestäbchen	Lilibe
Objektträger	Knittel, Braunschweig
Deckgläser, rund, 12 mm-Durchmesser	Menzel, Braunschweig

Neubauer-Zählkammer, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
Kanülen, 26 Gauge	Braun, Melsungen
Spritzen, Luer Lock	Terumo, Leuven
Zellschaber	Falcon
Eppendorf-Cups 1,5 u. 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde
BSA	Biochrom, Berlin
FCS Charge 180X, 546U und 360X	Biochrom, Berlin
Sterilfilter 0,20 µm	Corning, NY
Bottle-Top-Filter	Corning, NY
Na <sup>+</sup> -acid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Acridine Orange	Molecular Probes, A-1301
DAPI	Roche, Mannheim
Dextrane, TR-konjugiert, MW 3.000-40.000	Molecular Probes, D-3329, D-1828, D-1829
Zymosan A, Texas Red-konjugiert	Molecular Probes, Z-2843
Phalloidin, FITC-gekoppelt	Sigma-Aldrich, P-5282, Deisenhofen
Aqua bidestillata, destilliertes städtisches Leitungswasser	Stadtwerke Göttingen
Glycerin	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Antikörper

Aufbewahrung (je nach Herstellerempfehlung) versetzt mit Glycerin und Ampuwa 1:1 bei -20 °C.

<b>Tab. 2</b>		
<i>Antikörper</i>	<i>Quelle</i>	<i>Verwendete Konzentration</i>
Maus- $\alpha$ -human/maus- $\alpha$ tubulin-IgG	Sigma, T-5168	1:500
Maus- $\alpha$ -human-TfR (CD 71)-IgG	Zytomed, Berlin, H68.4	1:1000
Maus- $\alpha$ -human-EEA1-IgG	BD Biosciences, clone 14	1:2000
Maus- $\alpha$ -human-LAMP1 (CD 107a)-IgG	RDI Research Diagnostics, H4A3	1:500
Ziege- $\alpha$ -human/maus-Calnexin-IgG	Santa Cruz, K0703	1:500
Ziege- $\alpha$ -human/maus-EEA1-IgG	Santa Cruz, J2803	1:500

Ziege- $\alpha$ -human/maus-TfR-IgG	Santa Cruz, sc 7087	1:50
Ziege- $\alpha$ -human/maus-LAMP1, polykl.	Santa Cruz, D0704	1:50
Ratte- $\alpha$ -maus-LAMP1-IgG	RDF, 1D4B	1:500
Kaninchen- $\alpha$ -maus-TfR polyklonal	Santa Cruz, K2403 u. B202	1:50
Kaninchenserum- $\alpha$ - <i>E.cuniculi</i> , klonal (23)	poly- Spende von LM Weiss, NY	1:3000
Mäuseserum- $\alpha$ - <i>E.cuniculi</i> , (M98)	polyklonal Entwicklung der Arbeitsgruppe	1:1000
Mäusehybridomaüberstand ontenspezifisch-IgG	6G2, mer- Entwicklung in der Arbeitsgruppe	1:25
Mäusehybridomaüberstand SWP1-IgG	11A1, $\alpha$ - Entwicklung in der Arbeitsgruppe (2000)	1:25 / 10
Kaninchenserum- $\alpha$ -SWP1	Entwicklung der Arbeitsgruppe	1:500
FITC-konj. Esel- $\alpha$ -Maus IgG	Dianova, Hamburg, Lot # 60337	1:500
Cy2-konj. Esel- $\alpha$ -Maus IgG	Dianova, Hamburg, Lot # 50510	1:250
Cy3-konj. Esel- $\alpha$ -Maus IgG	Dianova, Hamburg, Lot # 44274	1:500
Cy2-konj. Esel- $\alpha$ -Ratte IgG	Dianova, Hamburg, Lot # 47115	1:500
Cy3-konj. Esel- $\alpha$ -Ziege polyklonal	Dianova, Hamburg, 705-166-147	1:1000
Cy2-konj. Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg, Lot # 57832	1:250
Cy3-konj. Esel- $\alpha$ -Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg, Lot # 59451	1:500

### 2.1.3 Zelllinien

#### 2.1.3.1 HFF – Human Foreskin Fibroblasts

Natürliche Wirtszellen von *Encephalitozoon*-Spezies sind neben Lungen-, Choroidalplexus- und Nierentubuluszellen Fibroblasten (Canning und Lom 1986, Visvesvara 2002), entsprechend bot sich ihre Verwendung als Hauptinfektionsmodell an. Es handelt sich um menschliche primäre Zellen, die von 5. bis 15. Passage verwendet wurden.

#### 2.1.3.2 L929 – Mäusefibroblasten

Permanente Fibroblasten einer anderen Wirtsspezies (Canning und Lom 1986) dienten als Kontrollmodell. Aus humanmedizinischer Sicht lag die Untersuchung muriner Zellen auf der Hand, da sich in vivo ähnliche Krankheitsbilder in Maus und Mensch beobachten lassen (Didier und Bessinger 1999).

### 2.1.3.3 RAW-M $\Phi$ – Mäusemakrophagen

Diese permanente Zelllinie zeichnet sich durch unkomplizierte Kultur und Passagierung aus (Falke 2001). Wegen beschriebener Nachteile bezüglich des höheren Risikos artefizieller Ergebnisse erfolgte ihre Verwendung lediglich als Vergleichsmodell und zur Ansatzoptimierung der Phagozytoseversuche.

### 2.1.3.4 BMM-M $\Phi$ – Murine Knochenmarksmakrophagen

Als Hauptmodell für professionelle Phagozyten wurden frisch gewonnene Knochenmarksmakrophagen von BALB/c-Mäusen verwendet. Versuche an dieser primären Zelllinie (Bienz 2001) gelten als besonders aussagekräftig, da keine gravierenden Veränderungen oder Verlust von Eigenschaften durch wiederholte Passagezeiten in Kultur zu erwarten sind. Murine Peritonealmakrophagen als Wirtszellen von *E.cuniculi* sind in der Literatur vielfach beschrieben (Barker 1975, Weidner 1975).

### 2.1.3.5 Hybridomazellen

Kulturüberstand dieser murinen Zellen wurde zwecks Gewinnung merontenspezifischer Antikörper produziert. Diese Zelllinien stammen aus früheren Projekten der Arbeitsgruppe (Bohne et al. 2000).

### 2.1.3.6 *Encephalitozoon-cuniculi*-Sporen

Ursprünglich eine Spende von Peter Deplazes, Zürich, Schweiz. Mittlerweile in der Arbeitsgruppe etabliert und fortgeführt.

## 2.1.4 Zellkulturmedien

DMEM und RPMI wurden institutsintern zentral angesetzt. Zusätze zu den ZK-Medien wurden generell steril filtriert. FCS wurde vor Einsatz bei 56 °C im Wasserbad für 45 Min. inaktiviert. Alle Medien wurden, außer wenn gesondert erwähnt, vor Zellkontakt im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

<b>Tab. 3</b>	
<b><u>HFF-Grundmedium</u></b>	
<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
DMEM (Dulbecco's MEMedium)	
FCS, Charge 180X	10% in Kultur, 1% in Infektionsansätzen
Penicillin / Streptomycin	1%

Tab. 4

**L929 -Grundmedium**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
DMEM	
FCS, Charge 360X	1%
Penicillin / Streptomycin	1%
Na <sup>+</sup> -Pyruvat	1%
NEAA	1%

Tab. 5

**L929 – Medium für ZK-Überstand**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
RPMI 1640 (incl. stab. L-Glutamat)	
FCS, Charge 546U	10%
Penicillin / Streptomycin	1%

Tab. 6

**RAW-MΦ -Grundmedium**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
RPMI 1640 (incl. stab. L-Glutamat)	
FCS, Charge 546U	10%
Penicillin / Streptomycin	1%
Na <sup>+</sup> -Pyruvat	1%
HEPES-Puffer	1%
Glucose	0,25%

Tab. 7

**BMMΦ -Isolierungsmedium**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
RPMI 1640 (incl. stab. L-Glutamat)	
FCS, Charge 546U	10%
Penicillin / Streptomycin	1%

Tab. 8

**BMMΦ -Differenzierungsmedium**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
RPMI 1640 (incl. stab. L-Glutamat)	
FCS, Charge 546U	10%
Penicillin / Streptomycin	1%
L929-ZK-Überstand (enthält GM-CSF)	20%

Tab. 9

**Hybridoma -Grundmedium**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
RPMI #1640	ad 500ml
FCS, Charge 360X	10%
NEAA	1%
Na <sup>+</sup> -Pyruvat	1%
Penicillin / Streptomycin	1%
(Glutamin	1% - im institutsangesetzten RPMI enthalten)
β-Mercaptoethanol	1,2 ml
HECS	5%
HAT	10 ml

**2.1.5 IFT-Lösungen**

Tab. 10

**PBS10 - Stammlösung**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
Aqua bidestillata	ad 1000 ml
PBS – Fertigzusammensetzung (s.u.)	1Pck, als Gebrauchslösung 1:10 verdünnt
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	29,25 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,9 gr
NaCl	160 gr)

Tab. 11

**PFA 4% in PBS1**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
PBS1	ad 1000 ml
Paraformaldehyd	40 gr

Erwärmen des verschlossenen Behältnisses bei 50 °C im Wasserbad über mehrere Stunden, bis makroskopisch alles gelöst ist.

Tab. 12

**Triton X-100 in PBS1**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
PBS1	
Triton X-100	0,25% in regulären IFTs, 0,1% in differenzieller Färbetechnik

Längeres Rühren im Magnetrührer zwecks ausreichender Durchmischung notwendig.

Tab. 13

**IFT-Grundlösung**

<i>bestehend aus</i>	<i>Konzentration, Stoffmenge</i>
ad PBS1 45ml	43,41 ml
Na-acid 10%	0,02% entspr. 90 µl
BSA 30%	1% entspr. 1,5 ml

Tab. 14

**Mowiol-Präparation**

- 2,4 gr Mowiol 4 mit 6 g Glycerin mischen

- 6 ml *aqua bidest.* hinzufügen und mehrere Stunden (min. zwei) bei RT rühren

- 12 ml 0,2 M *Tris-Puffer* (pH 8,5) dazugeben und bei 50 °C für 10 Min. unter gelegentlichem Umrühren erhitzen; danach evtl. um *DABCO* (50 mg / ml) erweitern

- nach Auflösung bei 5.000 g für 15 Min. klar zentrifugieren.

- Verwendung des Überstandes: Aliquotierung und Aufbewahrung bei -20 °C.

## 2.1.6 Geräte

<b>Tab. 15</b>	
<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank	Heraeus, HERACell 240, Hanau
Zellbank	BDK, S 1800, Sonnenbühl-Genkingen
Zentrifugen	Heraeus, Megafuge 2.0 und Megafuge 2.0 RS
Zentrifuge mit Heizfunktion	Heraeus, Multifuge 3 S-R
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Pipetten	Eppendorf, Reference, Sarstedt
IF-Mikroskop	Leica, Modell DM R, Heidelberg
Digitalkamera-Ausrüstung und Software	Zeiss, AxioCam
Phasenkontrastmikroskop	Leica DMIL, Heidelberg
Konfokales Laserscanmikroskop	Leica, Modell TCS SP2
Bildbearbeitungsprogramm	GIMPshop für Windows-Anwendung
Schüttler	Heidolph, Reax top
Dreh-Schüttelapparat	Gebr. Rettberg, Göttingen
Ultraschallsonde	Branson, Sonifier 250
TK -20 °C	Liebherr, Comfort
TK -80 °C	GFL, Burgwedel
Kühlschränke	Kirsch und Liebherr
Thermocycler	Biometra, T3, Göttingen
Waagen	Sartorius, BP 221S und LP 6200S, Göttingen
Magnetrührer	IKA Labortechnik, RCT basic, Staufen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellmodell

Die untersuchten Zellreihen wuchsen für die geplanten Versuche in 24-Lochplatten auf runden Glasobjektträgern. Bei Konfluenz zwischen 60 und 90 Prozent erfolgte hierauf die Infektion.

### 2.2.2 Zellkultur

#### 2.2.2.1 Standard-ZK für HFF und L929

Zellkulturarbeiten fanden in keimarmer Umgebung unter einer Sicherheitswerkbank statt. Für die



Haltung der Zelllinien wurden die Zellen mit jeweiligem Grundmedium in Zellkulturflaschen bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub>-angereicherter Umgebungsluft und 95% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Zur Kontaminationsprophylaxe waren allen Grundmedien Antibiotika (Penicillin / Streptomycin) beigesetzt. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Mycoplasmenkontrolle mit Hoechst-Färbung (DAPI) oder kommerziellem Mycoplasmen-PCR-Kit (Qiagen). Besonderheiten der BMM-MΦ werden gesondert beschrieben (2.2.2.2)

Vor Splitten der Kultur wurde am Phasenkontrastmikroskop Zustand und Konfluenz der Zellen überprüft. Dann folgte Absaugen des Mediums, einmaliges kurzes Spülen mit Trypsin / EDTA und erneute Trypsin / EDTA-Benetzung für maximal drei Minuten. Dabei wurde die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Bei beginnender Ablösung wurde die Restflüssigkeit vorsichtig abgesaugt, danach wurde der Falcon-Behälter kräftig geklopft, ggf. auf die Tischunterlage geschlagen und die Zellen aufgeschüttelt. Zu den so freien Zellen wurde vorbereitetes Zellkulturmedium hinzugegeben und geschwenkt. Letztlich wurden unterschiedliche Verdünnungen, i.d.R. 1:10, in die Bedarfsgefäße abgefüllt - für die Immunfluoreszenz-Infektionsversuche also in vorbereiteten 24-Lochplatten mit Glasobjektträger und mit 1% FCS-haltigem Grundmedium. Zur Gewinnung neuer *E.cuniculi*-stocks wurden HFF in ZK-Flaschen (25 cm<sup>2</sup>) angelegt, für die Weiterführung der Zellreihe auf 175 cm<sup>2</sup>. Inkubation erfolgte immer im Brutschrank bei 37 °C unter üblichen Bedingungen.

#### **2.2.2.2 Produktion von L929-Überstand**

L929-Zellen wuchsen in 3-4 großen Flaschen heran, bis diese dicht bewachsen waren. Hierbei wurde noch das reguläre L929-Grundmedium verwendet. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst, durch Barbotage voneinander getrennt und ausgezählt. Jeweils  $6 \times 10^6$  Zellen wurden mit 60 ml Spezialmedium (vgl. Tab. 5) in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen gegeben und im Brutschrank inkubiert. Im Verlauf von ungefähr einer Woche begannen die Zellen sich abzurunden und vom Untergrund zu lösen. Dann wurde der Überstand gesammelt und für 5 Min. bei 1360 upm zentrifugiert. Zwecks Aufreinigung wurde der so erhaltene Überstand im Bottle-Top-Filter (0,22 µm) steril filtriert und dann portioniert à 45 ml bei -20 °C eingefroren.

#### **2.2.2.3 Isolierung und Kultur der BMM-MΦ**

Knochenmarkszellen wurden aus dem Oberschenkelmarkraum zweier maximal zweijähriger BALB/c-Mäuse gewonnen. Die Mäuse wurden in einem kohlenstoffdioxidhaltigen Behälter narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Die Präparation der Oberschenkelknochen geschah mit sterilen Instrumenten und reichlicher Desinfektion mit 70%-igem Ethanol.

Unter sterilen Bedingungen einer Sicherheitswerkbank wurden die Markräume eröffnet und mit einer kurzen 26 Gauge-Kanüle und Isolierungsmedium (ca. 10 ml pro Knochen) innen ausgespült. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde in ein Falcon-Tube überführt und 5 Min. stehengelassen, damit sich mögliche Knochensplitter absetzen konnten. Der Überstand wurde entfernt und enthaltene Zellen abzentrifugiert (1300 upm für 5 Min.). Das Pellet wurde mit Isolierungsmedium resuspendiert, dadurch gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Wiederaufnahme des Pellets erfolgte in 1 ml Differenzierungsmedium. Davon wurde ein Aliquot in 1:10 Verdünnung mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die restlichen Zellen wurden in Differenzierungsmedium in 1 ml Aliquots mit einer Konzentration von  $10^5$  / ml in 24-Lochplatten mit Glasobjektträger ausplattiert. Nach drei Tagen wurde ein 50%-iger Medienwechsel mit frischem Differenzierungsmedium vollzogen. Nach insgesamt sechs Tagen wurde das Medium ganz gegen Isolierungsmedium ausgetauscht und am siebten Tag erfolgte bei mikroskopisch guter Konfluenz (>60%) die Infektion.

#### **2.2.2.4 Gewinnung Hybridomaüberstand**

*Auftauen der Hybridomzellen* Gefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut und in ein vorbereitetes Falcontube überführt. Unter Schütteln wurde tröpfchenweise aber schnell ZK-Medium hinzugegeben, um in den gefrorenen Zellen enthaltenes toxisches DMSO schnell zu entfernen. Nach Zugabe von insgesamt 20 ml Medium wurde bei 1300 upm für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde schwenkend mit wenigen Tropfen resuspendiert.

*Kultur und Weiterführung* Die erhaltene Suspension wurde mit Hybridoma-Grundmedium und Interleukin 6 (100 U / ml) auf eine 6-Lochplatte (5 ml / Loch) in unterschiedlicher Verdünnung überführt und täglich mikroskopisch kontrolliert. Nach Ablauf von zwei Tagen wurden die Zellen vorsichtig mit der Pipette aufgenommen und im Verhältnis 1:2 zunächst in Medium ohne Interleukinzugabe in ZK-Flaschen gesplittet. Weitere zwei Tage später konnten die Zellen erneut in größere Behältnisse umgesetzt werden. Dem Grundmedium wurde Interleukin-6 in einer Konzentration von 30 U / ml zugegeben. Diese Prozedur wurde wiederholt bis eine suffiziente Quantität an Überstandsvolumen erreicht war.

*Hybridomaernte* Drei Tage vor geplanter Überstandsernte erfolgte kein Mediumwechsel mehr, um die produzierten und freigesetzten 6G2-Antikörper nicht zu verlieren. Dann wurde der gepoolte Überstand bei 1400 upm über 10 Min. zentrifugiert und steril filtriert. Abgefüllt in mehrere Aliquots à 10 ml konnte das Produkt im KS und in TK bei -20 °C aufbewahrt werden. In

Verdünnungsreihen wurde die zu verwendende Konzentration bestimmt.

### 2.2.3 Infektionsmodus und Sporengewinnung

Unterschieden wurden Infektionen zur Gewinnung neuer *E.cuniculi*-Sporen und zur Versuchsvorbereitung der Kinetiken und Immunfluoreszenzassays. Bei ersteren wurde je nach Produktivität des alten Sporenvorrats 1 ml davon in 100%-konfluente HFF-Kulturen in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gegeben und nach sanftem Schwenken mehrere Tage inkubiert.

*Encephalitozoon-cuniculi-Ernte* Die so infizierten Zellrasen wurden regelmäßig unter dem Phasen-contrastmikroskop angeschaut und die Entwicklung der parasitophoren Vakuolen beurteilt. Nach ca. sieben Tagen war die PV auf fast halbe Größe der Wirtszelle angewachsen und stand kurz vor der Spontanruptur. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Wirtszellrasen mit einem Zellschaber vom Flaschengrund abgelöst. Die Suspension wurde in eine Spritze gegeben und unter manuellem Druck durch eine 26 G-Kanüle gepresst. Dabei kam es zum Platzen der Vakuolen und zur Freisetzung der reifen Sporen. Durch Zentrifugation bei 400 upm für 2 Min. sollten Zelltrümmer abgetrennt werden. Der *E.cuniculi*-sporenhaltige Überstand wurde erneut zentrifugiert. Das bei 2500 upm nach 20 Min erhaltene Sediment enthielt nun v.a. infektiöse Sporenformen. Es wurde mit steril filtriertem PBS1 resuspendiert und im Kühlschrank als frischer Sporenvorrat aufbewahrt (vgl. Canning und Lom 1986). Vor Einsatz wurde dieser mit der Pipette aufgewirbelt und bei Bedarf die Sporenzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Infektiosität der Sporen blieb unverändert über vier Monate erhalten, danach nahm sie langsam ab. Aber auch nach sechs und acht Monaten waren die Sporen in der Lage, Zellen zu infizieren.

*E.cuniculi intrazellulär einfrieren* Konfluente HFF wurden in 80 cm<sup>2</sup>-ZK-Flaschen hoch mit *E.cuniculi* infiziert. Nach Verstreichen von 24 h bis 48 h wurden die Zellen (vgl. Zellkultur) trypsinisiert und abgelöst. Auf Eis erfolgte eine Resuspension mit DMEM mit 40% FCS und diese wurde für 5 Min. gekühlt. Nun folgte die Zugabe von 5 ml vorbereitetem kaltem Freeze-Mix (20% DMSO, 20% FCS in DMEM). Diese Mischung wurde auf 10 vorgekühlten Kryoröhrchen aliquotiert und sofort bei -80 °C eingefroren, später in einen Kühltank mit flüssigem Stickstoff weitergeleitet.

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens schnell im Wärmebad aufgetaut und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit HFF-Grundmedium (FCS 10%) gegeben. Die HFF wuchsen an und intrazellulär entwickelten sich parasitophore Vakuolen. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium

gewechselt, dann wurden die Zellen regulär weitergeführt und *E.cuniculi* konnte geerntet werden.

*Infektion auf 24-Lochplatten* Vor Zugabe der infektiösen Sporen auf vorbereitete HFF wurden diese mit Zellkulturmedium verdünnt, um eine bessere Verteilung zu erreichen. Dazu wurden für Ansätze längerer Infektionszeiten ( $\geq 8$  h) 10  $\mu\text{l}$  mit 90  $\mu\text{l}$  Medium vermischt. Für Ansätze im kleinen Stundenbereich waren 30  $\mu\text{l}$  pro Well auf 100  $\mu\text{l}$  vorgesehen und für die Versuche ganz früher Zeitpunkte (1 Min. bis 20 Min.) wurden 50  $\mu\text{l}$  der suspendierten *E.cuniculi*-Sporen pro Lochvertiefung benötigt.

Bei Zugabe in ein Loch wurde zweimal vorsichtig auf- und abpipettiert, damit sich die Sporen gleichmäßig verteilen konnten. Dann wurden die Lochplatten bei 2000 upm für 5 Min. zentrifugiert. Im Fall der frühen Kinetiken mußte die Zentrifugationsdauer (entspr. 3.2.2) verkürzt werden. Außerdem erfolgte die Zentrifugation in auf 35 °C vorgewärmten Zentrifugen.

#### 2.2.4 Kontrollphagozytose mit Zymosan und abgetöten *E.cuniculi*-Sporen

*TR-Zymosan in Lösung* Zymosan bezeichnet eine Partikelpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae* und eignet sich gut zur Untersuchung natürlicher Phagozytoseprozesse (Roos et al. 1981). Das hier verwendete Produkt war kovalent mit dem fluoreszierenden Farbstoff Texas Red gekoppelt, der sich durch eine hohe pH-Unabhängigkeit auszeichnet und somit auch nach Aufnahme in saure Zellkompartimente keine Aktivitätseinbuße erleidet.

Die Zubereitung der Zymosanlösung geschah entsprechend den Herstellerempfehlungen. Für die Stammlösung wurde Zymosan in steril filtriertem PBS1 mit 0,02%igem Na<sup>+</sup>-acid gelöst. Diese Suspension wurde mittels Ultraschall dreimal hintereinander über 30 Sek. auf hoher Stufe (3/30) homogenisiert. Um eine übermäßige Erwärmung zu vermeiden, lag das Eppendorfröhrchen während der Energieeinwirkung auf Eis. Die finale Konzentration in Zellkulturmedium betrug 0,02 mg / ml und wurde so 500  $\mu\text{l}$  / Loch mit 1600 upm über 30 Min. auf die Zellen zentrifugiert.

*TR-Dextrane in Lösung* Dextrane wurden in unterschiedlichen Molekulargewichten von 3.000, 10.000 und 40.000 Da eingesetzt. Auch sie waren Texas-Red-gekoppelt und wurden letztendlich analog zu Zymosan präpariert. Die verwendeten Konzentrationen betragen 0,1 mg / ml und 1 mg / ml. Insgesamt neigten die Dextranansätze zu Präzipitationen und konnten auch durch Drehraddurchmischung, Zentrifugation und ausgiebiges Waschen schwierig optimiert werden. Auch die herstellerseits empfohlene 1:1-Mischung mit Glycerin führte nur bedingt zum gewünschten Ergebnis. Eine Nutzung war dennoch möglich, wenngleich die Versuche teilweise

mehrfach wiederholt werden mussten. Die Phagozytosevermittlung erfolgte wie bei Zymosan durch Zentrifugation.

*Hitzeinaktivierung und AK-Opsonierung der E.cuniculi-Sporen* *E. cuniculi* in PBS1 (infektiöser Sporenvorrat) wurde für 20 Min. auf 70 °C im Wasserbad erhitzt und dadurch infektionstechnisch inaktiviert (Koudela et al. 1999). Nach Abkühlung wurden die Sporen zur Opsonierung auf unterschiedliche Eppendorf-Reagenzgläser aufgeteilt. In PBS1 wurden sie mit Maus- $\alpha$ -SWP1-AK (aus Zellüberstand 11A1) in Verdünnung 1:2 und mit polyklonalem Maus- $\alpha$ -*E.cuniculi*-Serum in 1:1000-facher Verdünnung über zwei Stunden auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden sie mikroskopisch auf Agglutination kontrolliert und bei 3500 upm für 10 Min. zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die markierten Sporen für Phagozytoseversuche bereit standen.

## **2.2.5 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung**

### **2.2.5.1 Reguläre Immunfluoreszenzfärbung**

Nach Entfernen des Zellkulturmediums und einmaligem Waschen mit PBS1 wurden die Zellen auf den Glasobjektträgern für 10 Min. bei Raumtemperatur mit 4%igem PFA fixiert. Daraufhin folgte zweimaliges Waschen und Permeabilisierung für 10 Min. mit 0,25%igem Triton und mit anschließendem Waschen. Eine Blockierung möglich störender Proteinladungen erfolgte für 30 Min. mit 1% BSA in PBS1. Die Zugabe des Erstantikörpers in bestimmter Konzentrierung in IFT-Grundlösung wurde gefolgt von einstündiger Inkubation bei RT. Diese Ansätze wurden dreimal gründlich mit PBS1 gewaschen, bevor der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zweitantikörper nach gleicher Methode aufgetragen wurde. Die Inkubation des Farbschritts erfolgte für eine Stunde im Dunkeln. Eine Parallelfärbung mit DAPI (0,1  $\mu$ g / ml) ermöglichte die Darstellung der Wirtszellkerne sowie der Meronten-DNA. Danach folgte wiederum 3 x Waschen mit PBS1. Schließlich wurde der Glasobjektträger herausgehoben, vorsichtig mit Aqua destillata gespült und kopfüber auf einem Unterträger mit einem Tropfen Mowiol konserviert. Nach Aushärtung im Kühlschrank konnte der Ansatz mikroskopiert werden.

### **2.2.5.2 Differenzielle Immunfluoreszenzfärbung**

Die Vorgehensweise entsprach grundsätzlich der regulären Färbung. Der Permeabilisierungsschritt wurde jedoch erst nach Zugabe des ersten Antikörpers durchgeführt, dadurch sollte verhindert

werden, dass intrazelluläre Bestandteile durch diesen erkannt würden. Das Vorgehen orientierte sich an den Arbeiten von Couzinet et al. (2000) und Heesemann und Laufs (1985). Um die Aktivität des Antikörpers und seine Interaktion mit der erkannten Struktur nicht zu stören, wurde Triton nur in 0.1%iger Konzentration verwendet. Nach zehnminütiger Permeabilisierung folgte der erste Farbmarkierungsschritt der extrazellulären Erregerformen für eine Stunde wie oben beschrieben im Dunkeln bei RT. Im Anschluss an gründliches Waschen sollten nun auch intrazelluläre Strukturen unter Verwendung des Antikörpers aus dem ersten Markierungsschritt dargestellt werden, wobei die Inkubation ebenso und weiterhin im Dunkeln ablief. Als vierter Antikörper und im zweiten farbgebenden Schritt gelangte ein im Emissionsspektrum vom ersten fluoreszenzmarkierten AK verschiedener Farbstoff zum Einsatz. Letztlich führte der Gesamt Ablauf dieser zwischen intrazellulär und extrazellulär (IZ/EZ) differenzierenden Immunfluoreszenzfärbung zu einfacher Fluoreszenz intrazellulärer Erreger und zweifacher Ausstrahlung extrazellulärer Formen, die dadurch sicher voneinander unterschieden werden konnten.

### **2.2.6 Acridine-Orange-Färbung**

Der Herstellerempfehlung folgend wurde Acridine Orange als Stammlösung 5 mg / ml in Methanol gelöst. Das weitere Vorgehen orientierte sich an Literaturvorgaben (Yoshimori et al. 1991, Hiruma et al. 2007). Zellkulturmedium und Stammlösung wurden auf eine Acridine-Orange-Konzentration von 5 µg / ml vermischt. Davon wurden je 500 µl pro Napf auf vitale HFF in unterschiedlichen Infektionsstadien gegeben. Nach zehnminütiger Einwirkung im Inkubator wurden die Zellen fünfmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Zur Vorbereitung der mikroskopischen Auswertung wurden die Glasobjektträger mit den HFF umgekehrt mit einem Tropfen Zellkulturmedium auf normale Objektträger gelegt. Ringsherum wurde der Rand mit Nagellack versiegelt und die Glasplättchen ohne Druckausübung mit Wattestäbchen und aqua destillata gereinigt. Die Auswertung erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation.

### **2.2.7 Mikroskopische Auswertung**

*Immunfluoreszenzmikroskop* Das zur mikroskopischen Auswertung verwendete reguläre Immunfluoreszenzmikroskop verfügte über je einen FITC-, TRITC-, Kombinations- und DAPI-Filter. Zusätzlich bestand die Möglichkeit zur Phasenkontrastmikroskopie. Die Präparate wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen betrachtet (100-fach bis 1000-fach). Digital mit aufgesetzter Kamera dokumentiert wurden die Immunfluoreszenztests, außer wenn anders vermerkt, in 1000-

facher Vergrößerung.

Relevant im Sinne der Fragestellung waren räumliche Beziehungen zwischen parasitophorer Vakuole, bzw. phagozytierten Partikeln, und den diversen Zellkompartimenten. Besonders der Kombinationsfilter eignete sich gut, um Kollokationen zweier markierter Strukturen festzustellen. Diese Kollokationen stellten sich als grün-rot-additives Gelbsignal dar. Die erstellten Bilder wurden zuerst in Einzelkanälen aufgezeichnet und später am Computer mit den Programmen AxioCam und GIMPshop übereinandergelagert.

Neben beschriebenen Kollokationen wurden auch ringförmige Signalanordnungen um Partikel als Positivbefund gewertet.

*Konfokale Laserscanmikroskopie (CFLS)* Die konfokale Laserscanmikroskopie kam v.a. bei frühen Infektionszeitpunkten und bei schwierig zu interpretierenden Immunfluoreszenztests zum Einsatz. Ihre Anwendung sollte durch gezielte Auswahl der Schnitthöhen und -ebenen mögliche Überlagerungsartefakte durch durchscheinende Signale unterschiedlicher Höhen vermeiden. Limitierende Faktoren der Auflösung waren begründet in sehr kleinen Zielstrukturen (Merontendurchmesser ca. 1  $\mu\text{m}$ ) und den natürlichen Wellenlängen der Lichtstrahlen. Untersuchte Emissionsspektren lagen im FITC- und TRITC-Bereich (528 nm und 582 nm).

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Berechnung erfolgte mit OpenOffice.Calc. Signifikanzen wurden einmal mit dem t-Test für k-verbundene Stichproben bestimmt. Als statistisch signifikant galten p-Werte kleiner oder gleich 0,05. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm der Firma SPSS Science, Chicago, USA.

### 3 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

#### 3.1 Mikrosporidienphagozytose versus Invasion

##### 3.1.1 Etablierung der differentiellen Verwendung stadienspezifischer Antikörper

In der Arbeitsgruppe wurden monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Entwicklungsstadien von *E.cuniculi* hergestellt (Bohne et al. 2000). Zum einen kann mit dem murinen  $\alpha$ -SWP1-Antikörper ein Sporenwandprotein nachgewiesen werden, das in Sporen, Sporoblasten und Sporonten vorkommt (vgl. Glossar). Merontenstadien werden nicht erkannt (Abb. 3). Zum anderen bindet der murine 6G2-Antikörper an bislang nicht näher bestimmte Bestandteile des Sporoplasmas. Da die dichte Sporenwand in oben genannten reiferen Entwicklungsformen eine Diffusion des Antikörpers in das Sporennere verhindert, kommt es in diesen Stadien nicht zur Markierung mit 6G2. In Meronten und jungen Sporonten, die noch gar keine oder nur eine unvollständige Sporenwand gebildet haben, kann der 6G2-Antikörper mit Sporoplasmaproteinen interagieren und diese markieren. Das führt zu einem Nachweis ausgetretenem Sporoplasmas und junger Entwicklungsstadien innerhalb der parasitophoren Vakuole.

Die dadurch ermöglichte Unterscheidung zwischen Spore ( $\alpha$ -SWP1-positiv) und Meront (6G2-positiv) dient als Grundlage der Differenzierung phagozytierter *E.cuniculi*-Sporen und früher Infektionsvakuolen in den Versuchen dieser Arbeit (Abb. 4).

Da nicht jede Expulsion des Sporoplasmas durch das polare Filament in die erfolgreiche Etablierung einer Infektion mündet, wurde mittels einer differentiellen Immunfluoreszenzfärbung (Methoden 2.2.5.2) ermittelt, wie groß der tatsächliche Infektionsanteil ist.

Hierzu wurden Deckgläser in Lochplatten mit einem konfluenten Zellrasen von HFF-Zellen nach beschriebener Methode (Methoden 2.2.3) mit 50 bis 10  $\mu$ l Sporensuspension infiziert. Es wurden unterschiedliche Infektionszeitpunkte von 5 Minuten bis 8 Stunden untersucht. Da die Zahl der etablierten Infektionen / Infektionstriggerung in der Spore proportional zur Dauer der Einwirkung und der Menge der aufgetragenen Sporensuspension ist, wurde für die Auswertung kürzerer Infektionszeiten mehr Sporenmateriale pro Deckglas verwendet als für längere Infektionszeiten. Somit konnten auch für fünf Minuten post infectionem bei Einsatz von 50  $\mu$ l Suspension signifikante Infektionsraten erzielt werden.

Die folgende differenzielle Anfärbung diente der Ermittlung der Zahl intrazellulärer Meronten (6G2-positiv) gegenüber der Zahl extrazellulär liegenden Sporoplasmas. Nach erfolgter Markierung des extrazellulären Sporoplasmas mit dem Erstantikörper und anschließend Cy3-Färbung wurde durch Permeabilisierung auch die Markierung intrazellulärer Formen ermöglicht, so dass die



wiederholte Verwendung des Erstantikörpers nun alle Sporoplasmastrukturen erfassen konnte. Die daraufhin durchgeführte Cy2-Färbung führte somit zu einer reinen Cy2-Markierung intrazellulärer Meronten, während extrazelluläres Sporoplasma Cy2 und Cy3 markiert war (Abb. 5).

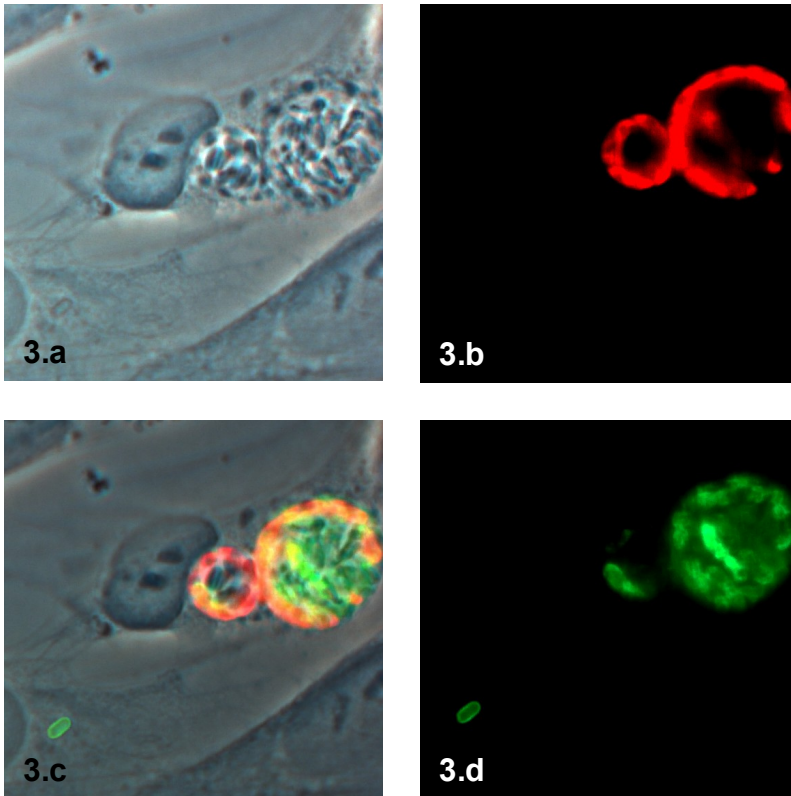
Die Auszählung erfolgte bezogen auf alle HFF-Zellen eines Objektträgers bei 100-facher mikroskopischer Vergrößerung (Methoden 2.2.7). Alle Versuche an HFF-Zellen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Der gleiche Versuchsaufbau wurde für eine Infektionsdauer von 1 h auch an L929-Zellen angewendet.

Bei der quantitativen Auswertung stellte sich heraus, dass bereits fünf Minuten nach Infektion in HFF mehr als zwei Drittel der 6G2-positiven Erreger im Inneren der Wirtszelle vorlagen (repräsentatives Experiment in Tab. 16). Mit fortschreitender Infektionsdauer nahm ihr Anteil mit einer Gesamtzunahme der Infektionsrate (vgl. 3.1.3) noch zu, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der 6G2-Antikörper tatsächlich auch in regulärer Anwendung geeignet ist, um speziell frühe Infektionsstadien von *E.cuniculi* nachzuweisen.

6G2 in HFF	5 min p.i.	30 min p.i.	1 h p.i.	2 h p.i.	8 h p.i.
Intrazellulär	37 (69,8%)	82 (77,4%)	107 (79,3%)	99 (81,1%)	114 (84,4%)
Extrazellulär	16 (30,2%)	24 (22,6%)	28 (20,7%)	23 (18,9%)	21 (15,6%)
Summe Exp 1	53	106	135	122	135
Mittelwert Intrazellulär	nicht bestimmt	76,25%	80,71%	82,55%	nicht bestimmt
Standardabweichung	nicht bestimmt	1,07	1,58	1,46	nicht bestimmt

**Tab. 16 Anzahl intrazellulärer Meronten und extrazellulären Sporoplasmas bei differenzieller 6G2-Markierung.** Mittels differenzieller Verwendung des sporoplasmaspezifischen Antikörpers wurde repräsentativ die Zahl einfach markierter 6G2-positiver intrazellulärer Infektionen gegenüber doppelt markierten extrazellulären Erregerformen bestimmt. Die Mittelwerte beziehen sich auf die relative Häufigkeit intrazellulärer Meronten gegenüber der extrazellulären Formen in drei parallelen Ansätzen unterschiedlicher Objektträger mit der jeweils angegebenen Infektionsdauer. Die Standardabweichung für Stichproben wurde mittels OpenOffice.calc ermittelt. Darüber hinaus folgte eine Analyse der Signifikanz der Unterschiede zwischen dem Mittelwert für 30 min und 2 h unter Anwendung des t-Tests für k-verbundene Stichproben. Hier zeigte sich mit  $t=1,604$  (für  $p_{0,05}$  wäre der kritische Wert 4,30) unter Annahme der Nullhypothese ein nicht signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Infektionszeitpunkten.

Analoge Ansätze in HFF unter differenzieller Anwendung des  $\alpha$ -SWP1-Antikörpers zeigten eine klare Unterscheidbarkeit phagozytierter (intrazellulärer) Sporen von extrazellulär aufliegenden Sporen (Abb. 3 und 4).

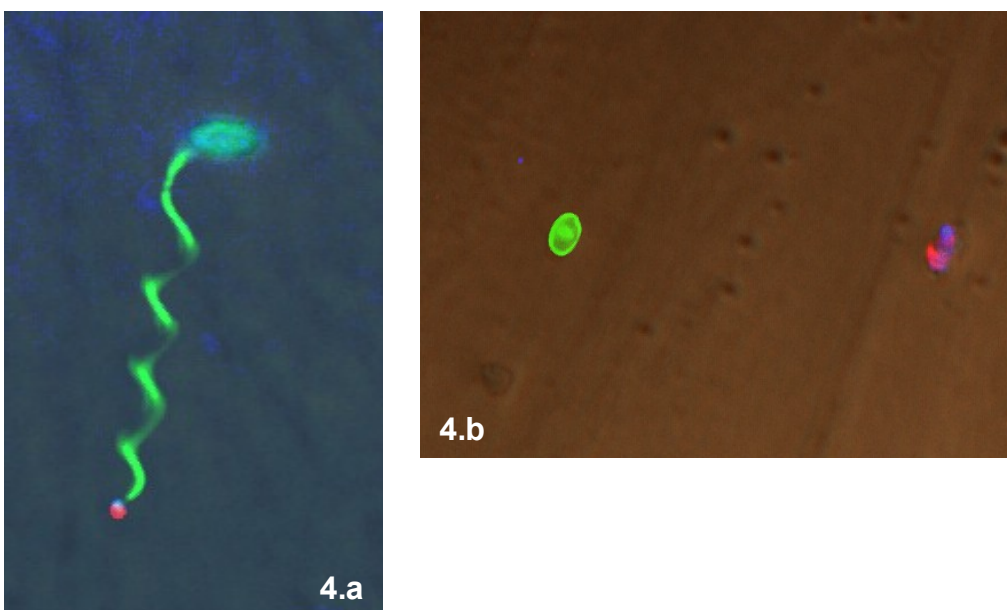


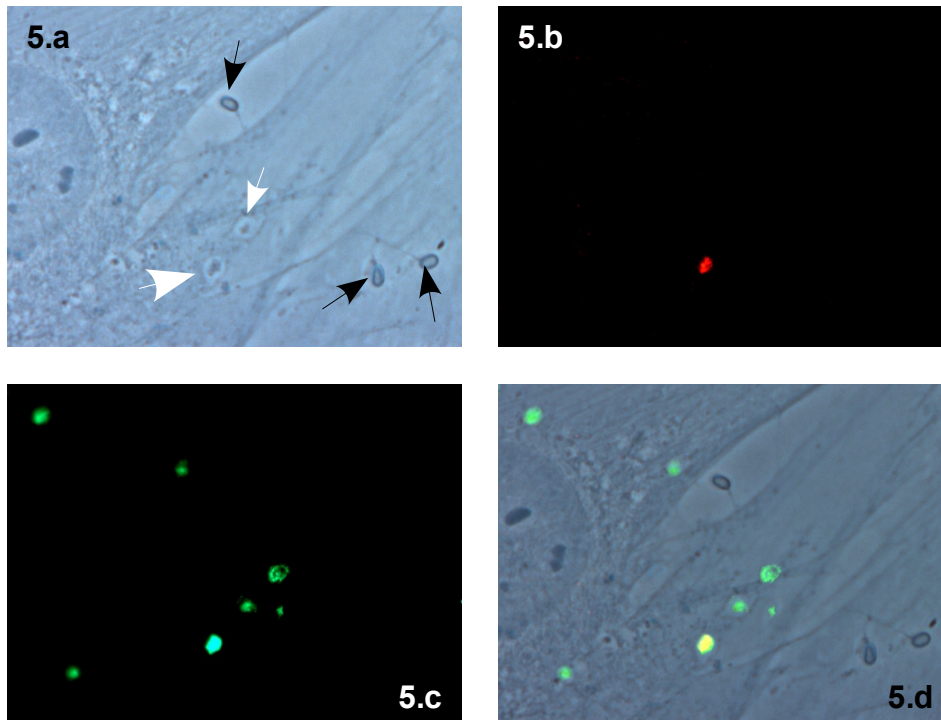
**Abb. 3 Verwendung stadienspezifischer Antikörper** – 3.a-d zeigen zwei nebeneinanderliegende parasitophore Vakuolen in HFF nach 48 h Infektion mit *E.cuniculi*. 3.a: Phasenkontrastaufnahme; 3.b: 6G2-AK (sporoplasmaspezifisch) markiert randständige Merontenstadien, Zweitantikörper Cy3 konjugiert (rot); 3.c: SWP1-AK markiert Sporonten, Sporoblasten und Sporen, Zweitantikörper Cy2 konjugiert (grün); 3.d: Zusammenschau der Einzelaufnahmen, gelbe Kollokalisierung in Übergangsstadien – erste Sporenwandproteine sind vorhanden, aber die entstehende

Sporenwand ist noch durchlässig, so dass auch das Sporoplasma im Sporonteninneren angefärbt werden kann und optisch ein Überlagerungseffekt entsteht.

**Abb. 4 Stadienspezifische Antikörper in frühen Infektionen** - 4.a zeigt *E.cuniculi* 20 min post infectionem: Polyklonales Serum markiert die Spore und das polare Filament – Markierung mit Cy2-konjugiertem Zweitantikörper (grün). Der 6G2-AK führt zur spezifischen Darstellung des austretenden Sporoplasmas, hier mit Cy3-konjugiertem Zweitantikörper markiert (rot); Verifikation des DNA-Gehalts erfolgt durch DAPI-Färbung (blau).

In 4.b gelang die Darstellung einer halbstündigen Infektion (Merontenstadium) und verbleibender Sporenhülle mittels Cy3-markiertem Anti-6G2-AK (rot) sowie Chromatinfärbung (blau) und Cy2-markiertem Anti-SWP1-AK (grün).





**Abb. 5** Differenzielle Immunfluoreszenzfärbung an zweistündiger *E.cuniculi*-Infektion in HFF. (5.a) Die Phasenkontrastaufnahme zeigt die Morphologie der Wirtszellen und lichtdichte Sporen (schwarzer Pfeil) und damit verbundene polare Filamente sowie Sporoplasmaumrisse (weißer Pfeil); 5.b: Vor Permeabilisierung mit 6G2-AK markiertes, also extrazellulär liegendes Sporoplasma, Zweitantikörper Cy3-konjugiert (rot); 5.c: Nach Permeabilisierung mit 6G2-AK markierte Formen, Zweitantikörper Cy2-konjugiert (grün) – sowohl extrazelluläres als auch intrazelluläres Vorliegen. In der digitalen Überlagerung in 5.d erkennt man die einfach gefärbten Meronten (reines Cy2-Signal - grün) als intrazelluläre Formen und das doppelt gefärbte extrazelluläre Sporoplasma durch den gelben Additionseffekt. Aufgrund der Stadienspezifität des 6 G2-AKs für Meronten werden die Sporenformen von *E.cuniculi* nicht dargestellt

### 3.1.2 Sporenphagozytose

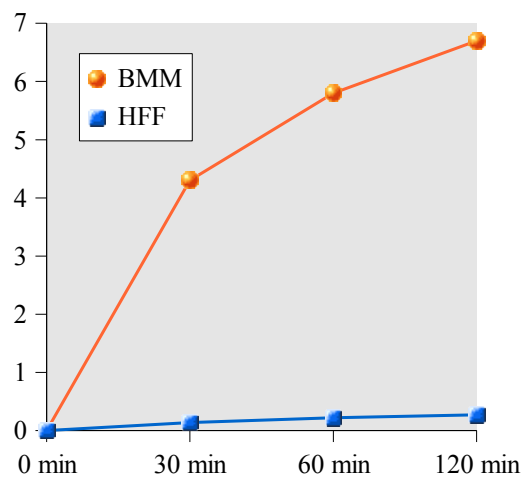
#### 3.1.2.1 Phagozytose vitaler Sporen in primären Zelllinien

Es konnte gezeigt werden, dass einige nichtprofessionelle Phagozytenzelllinien in der Lage sind, Sporen von Mikrosporidien durch Phagozytose zu internalisieren (Couzinet et al. 2000). Im Folgenden wurde untersucht, wie sich zwei primäre Zelllinien hinsichtlich ihrer Phagozytoseaktivität von *E.cuniculi*-Sporen verhalten.

Um extrazelluläre Sporen von intrazellulären (phagozytierten) Sporen zu unterscheiden, wurde eine differenzielle Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (Methoden 2.2.5). Dabei wurde zum Nachweis von Sporen der monoklonale Antikörper  $\alpha$ -SWP1 verwendet. Als primäre Zelllinien wurden sowohl professionell phagozytierende murine BMM $\Phi$  als auch nichtprofessionell

phagozytierende humane Fibroblasten (HFF) eingesetzt. Vitale *E.cuniculi*-Sporen wurden auf beide Zelllinien zentrifugiert (vgl. Infektionsmodus in 2.2.3) und über 30 min, 60 min und 120 min inkubiert.

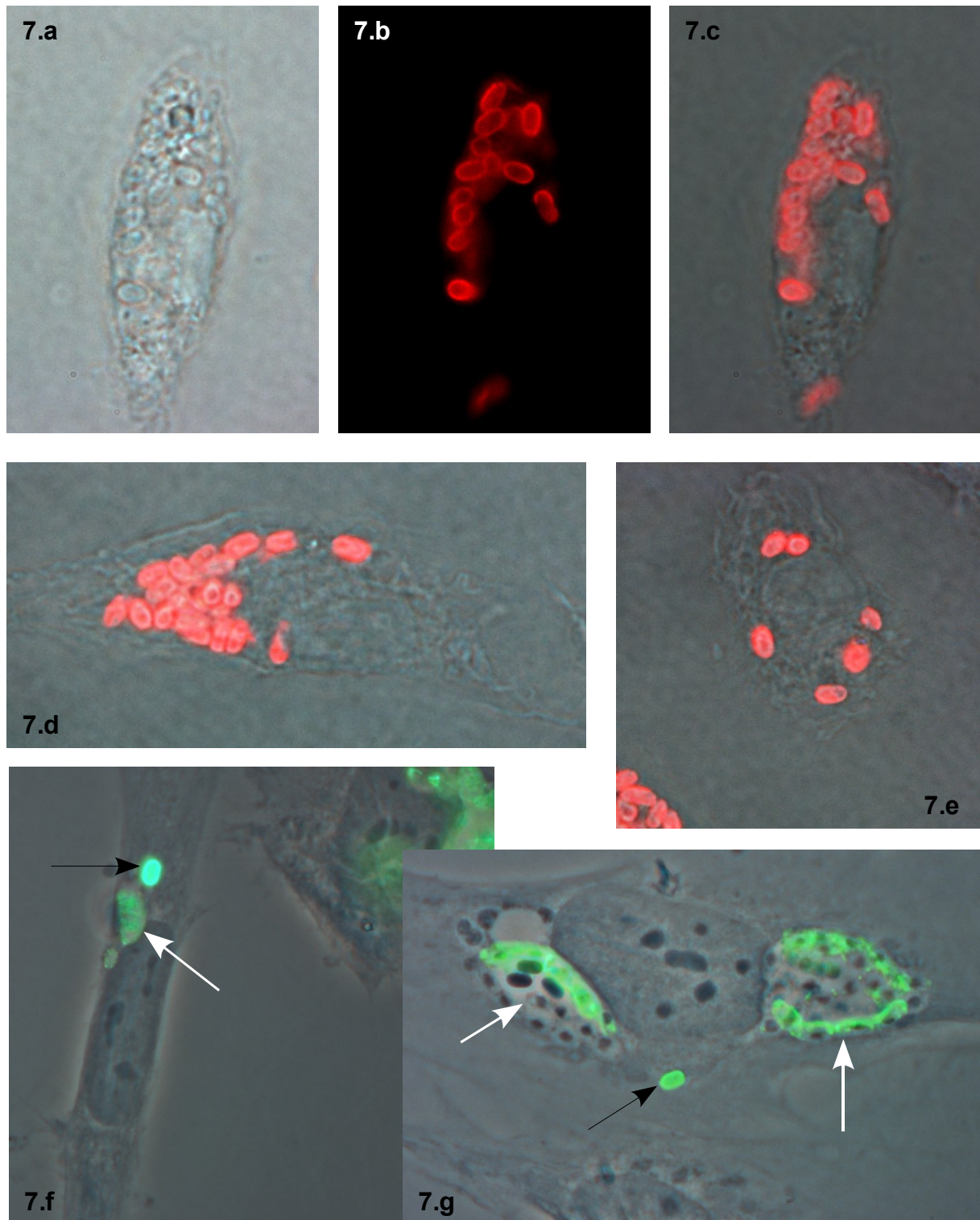
Grundsätzlich fand eine Phagozytose der Sporen bereits nach 30 Minuten in beiden untersuchten Zelllinien statt (Abb. 6 und 7). Erwartungsgemäß geschah dieses in deutlich größerem Umfang in den professionellen Phagozyten (Abb. 6). In den HFF fand sich nach einer halben Stunde Inkubationszeit nur in jeder zehnten Zelle eine phagozytierte Spore. Die Phagozytoserate, definiert als gezählte intrazelluläre Sporen pro Wirtszelle, steigerte sich noch nach 60 min und erreichte nach 120 min allmählich ein Plateau.



**Abb. 6 Vitalphagozytose.** Auszählung phagozytierter vitaler Sporen pro Wirtszelle (BMM $\Phi$  und HFF) unter Infektionsbedingungen (Ermittlung mittels differenzieller Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung des  $\alpha$ -SWP1-Antikörpers). Für je zweimal fünf ausgewertete Gesichtsfelder eines repräsentativen Experiments betrug die Mittelwerte und Standardabweichungen für BMM $\Phi$  4,36 und 0,08 (30 min); 5,65 und 0,20 (60 min); 6,88 und 0,25 (120 min). Respektive für HFF 0,12 und 0,02 (30 min); 0,21 und 0,01 (60 min); 0,26 und 0,01 (130 min).

### 3.1.2.2 Einfluss von Hitzeinaktivierung auf die Sporenphagozytose

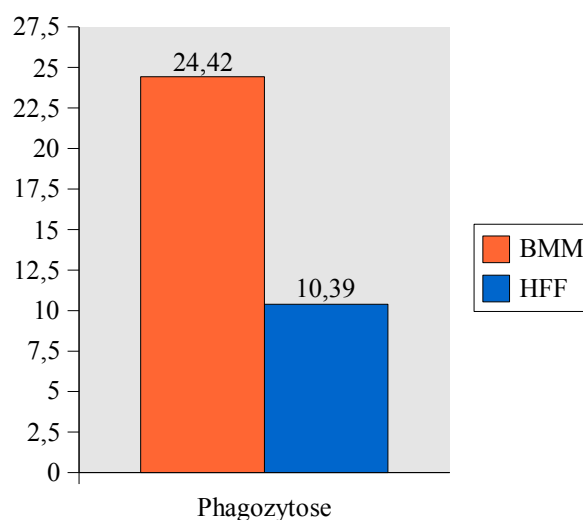
Vorangegangene Experimente mit formalinfixierten *E.cuniculi*-Sporen zeigten keine Unterschiede in der Phagozytose vitaler Sporen und abgetöteter Sporen (Couzinet et al. 2000). Ziel dieses Versuchs war es, die Phagozytose hitzeinaktivierter Sporen in primären Zelllinien zu untersuchen. Hitzeinaktivierung geht mit einem Verlust der Germinationsfähigkeit einher (Koudela et al. 1999). Hitzeinaktivierte Sporen wurden zum einen unmarkiert und zum anderen mit Antikörpern opsoniert verwendet (Methoden 2.2.4). Durch die Opsonierung sollte die Phagozytose in professionellen Phagozyten erleichtert werden.



**Abb. 7 Phagozytierte *E.cuniculi*-Sporen.** In 7.a-c, f und g erfolgte die Inkubation mit vitalen Sporen. Phagozytierte Sporen in BMMΦ eine Stunde p.i. in a bis c., differenzielle Färbung mit sporenspezifischem SWP1-Antikörper (a – Phasenkontrast, b – SWP1-Färbung, c - Overlay). In 7.d und e Inkubation mit hitzeinaktivierten (d und e) und mit murinem Sporenanikörper opsonierten (nur e) Sporen 30 min nach Sporenzugabe in BMMΦ. Auch primäre Fibroblasten (HFF) phagozytieren vitale Sporen (f und g). Die Verwendung polyklonalen Serums, das alle Entwicklungsformen von *E.cuniculi* markiert, in differenzieller Technik ermöglicht die parallele Betrachtung von Infektionsvakuolen (Pfeil weiß) neben phagozytierten Sporen (Pfeil schwarz) in derselben Wirtszelle – 24 h nach Infektion (f) und 48 h nach der Infektion (g).

Analog zu 3.1.2.1. erfolgten die Phagozytoseansätze mit BMM $\Phi$  und HFF. Bei den separat verwendeten Antikörpern zur Opsonierung handelte es sich um den murinen monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -SWP1 und ein polyklonales anti-*E.cuniculi*-Serum murinen Ursprungs. Zwecks schneller Vermittlung des Zellkontakts wurden auch diese Sporen wie die nichtopsonierten Sporen auf die Wirtszellen zentrifugiert. Nach Zentrifugation bei 1600 UpM über 30 min erfolgte eine weitere Inkubation von 90 min im Brutschrank. Daraufhin wurden die Ansätze dreimal gründlich mit Zellkulturmedium gewaschen und für 30 min, 60 min und 120 min im Inkubator weitergeführt (Methoden 2.2.4). Nach Fixierung folgte zwecks Unterscheidung intrazellulär und extrazellulär liegender Sporen eine differenzielle Immunfluoreszenzfärbung mit Kaninchenserum, das  $\alpha$ -SWP1 markierte. Dieses wurde verwendet, um im zweiten Schritt der indirekten Färbung nicht falsch positive Signale der extrazellulär liegenden, mit murinen Antikörpern opsonierten Sporen zu erhalten.

Sowohl BMM $\Phi$  als auch HFF phagozytierten hitzeinaktivierte Sporen (Abb.7). Nach zwei Stunden war fast das gesamte Zytoplasma der BMM $\Phi$  angefüllt mit phagozytierten Sporen. Auch in HFF fanden sich bis zu zehn Sporen pro Zelle, wobei die Phagozytoserate bei BMM $\Phi$  im Vergleich zu HFF um den Faktor 2 bis 3 erhöht war (Abb. 8). Die vorangegangene Opsonierung der hitzeinaktivierten Sporen führte unabhängig von den verwendeten Antikörpern zu einer Verdopplung der Phagozytoserate in BMM $\Phi$  gegenüber nichtopsonierten hitzeinaktivierten Sporen (ohne Abb.). Dieses Experiment wurde insgesamt zweimal durchgeführt.



**Abb. 8 Phagozytose hitzeinaktivierter Sporen.** Phagozytierte hitzeinaktivierte Sporen pro Wirtszelle nach zweistündiger Inkubation mit Fibroblasten (HFF) und Knochenmarksmakrophagen (BMM). Darstellung eines repräsentativen Experiments. Die Auswertung erfolgte mittels differenzieller Färbung und SWP1-Markierung. Die Auszählung von jeweils dreimal ca. 40 Wirtszellen pro zwei Gesichtsfeldern ergab für BMM einen Mittelwert von 23,3 mit einer Standardabweichung von 1,54; für HFF einen Mittelwert von 7,83 und eine Standardabweichung von 2,28.

### 3.1.2.3 Zymosan / Dextrane und endophagosomale Markerproteine

Zymosan und Dextrane dienten als etablierte Kontrollsubstanzen des Phagozytosenachweises (Roos et al. 1981, Underhill 2003, Swanson J 1989). In dieser Arbeit kamen Texas-Red-konjugiertes Zymosan A und Texas-Red-konjugierte Dextrane unterschiedlichen Molekulargewichts (3.000 bis 40.000) zum Einsatz. Nach beschriebener Methode (2.2.4) wurden aufbereitete Suspensionen beider Substanzen in jeweils getrennten Ansätzen auf zwei Zelltypen professioneller Phagozyten (RAW-M $\Phi$  und BMM $\Phi$ ) und zwei Fibroblastenlinien (HFF und L929) zentrifugiert. Der dadurch geschaffene enge Kontakt mit der Zellmembran ermöglicht die Phagozytoseinduktion ohne zusätzliche Opsonierung (Roos et al.1981).

Parallel wurden Ansätze auf allen Zelllinien ohne Medienwechsel für 20 h inkubiert und andere nach 2 h gründlich gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium für 30 min und 120 min weitergeführt. Es folgten indirekte Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen TfR, EEA1 und LAMP1, um die phagolysosomalen Kompartimente der Zellen darzustellen. Im Fall der murinen Zelllinien wurde nur mit Anti-LAMP1 markiert. Für humane Fibroblasten wurden murine monoklonale Immunglobuline G gegen TfR, EEA1 und LAMP1 verwendet (Material 2.1.2), für die unterschiedlichen Zelllinien aus der Maus ein monoklonales IgG gegen LAMP1 aus der Ratte. Sowohl in humanen als auch in murinen Zellen war der jeweilige Zweitantikörper Cy2-gekoppelt, da die phagozytierten Partikel von Zymosan und Dextran bereits Texas-Red-konjugiert waren.

Bei erfolgter Phagozytose der verwendeten Partikel in die Zellen ist eine räumliche Übereinstimmung von markiertem Partikel mit markierten phagolysosomalen Kompartimenten zu erwarten. Im Mikroskop galten ringförmige Anordnung um phagozytierte Partikel und Farbüberlagerung (Kokalisation) als positiver Nachweis stattgefundener Phagozytose und intrazellulärer Fusion (vgl. 2.2.7 und Abb. 9 und 10). Diese Versuchsanordnung wurde mindestens dreimal wiederholt.

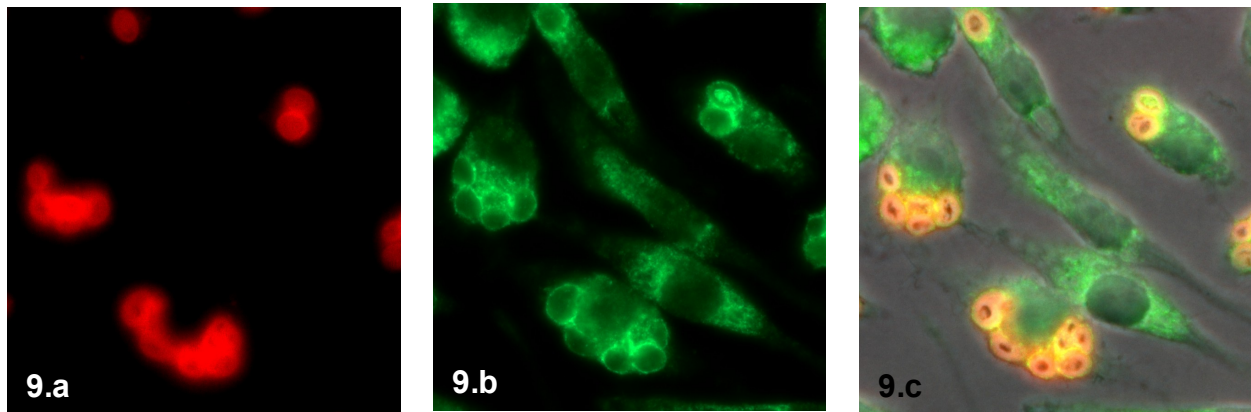
Im Gegensatz zu Dextranen konnten die zymosanhaltigen Lysosomen deutlich auch im Phasenkontrast als runde Formen in Makrophagen und Fibroblasten erkannt werden.

Sowohl in RAW-M $\Phi$  als auch in BMM $\Phi$  zeigten sich zu allen untersuchten Inkubationszeiten LAMP1-Kokalisationen der phagozytierten Partikel (Abb. 9). Die Kokalisationsquote lag dabei nach 120 min bei 90%, nach 30 min bei 60%. Die schon nach 30 min deutliche Ringbildung um die Partikel nahm an Intensität nach 120 min Inkubation noch zu und blieb so bis 20 h erhalten.

Für die HFF- und L929-Ansätze konnten ebenfalls Kokalisationen von phagozytierten Zymosanpartikeln mit Phagolysosomenmarkern ausgewertet werden (Abb. 10). Ihr Anteil lag jedoch deutlich niedriger und ihre Signalintensität blieb geringer. So fanden sich in beiden

Zelllinien nach 120 min LAMP1-Kolokalisationsraten von 45%, nach 30 min 30%.

In HFF erreichte der EEA1-Antikörper mit den Zymosanpartikeln nach 30 min knapp 20% Kolokalisationen. Für den TfR-Antikörper konnten lediglich vereinzelte Kolokalisationsphänomene zu diesen Zeitpunkten angegeben werden.



**Abb. 9 Zymosan in professionellen Phagozyten.** Texas-Red-gekoppelte Zymosanpartikel (rot) kolokalisieren in professionellen Phagozyten (RAW-MΦ) nach 45 min Inkubation mit LAMP1 (Cy2 markiert – grün). 9.a: Zymosanpartikel; 9.b: LAMP1-Markierung; 9.c: Overlay mit Phasenkontrast.

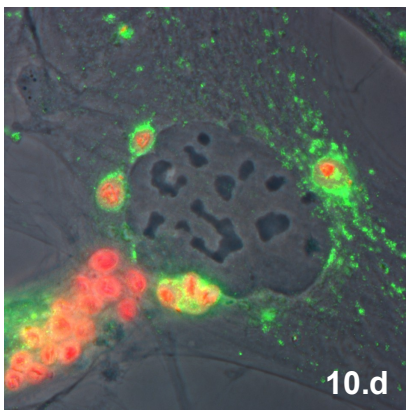
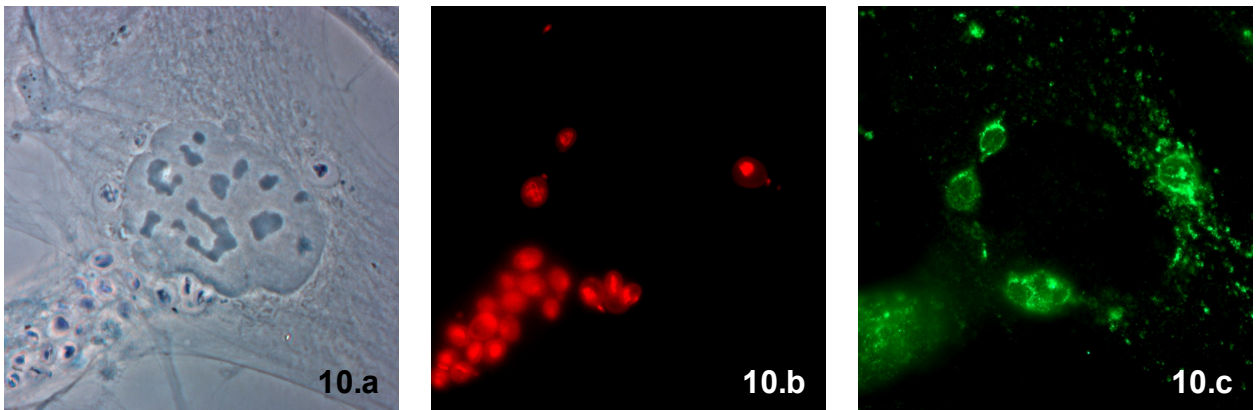
### 3.1.2.4 Phagozytierte Sporen und lysosomale Wirtszellkompartimente

In den vorangegangenen Versuchen wurde demonstriert, dass vitale *E.cuniculi*-Sporen prinzipiell ebenso wie hitzeinaktivierte Sporen von den Wirtszellen phagozytiert werden können. Außerdem zeigte sich in weiteren Untersuchungen, dass diese Sporen intrazellulär in Kompartimenten auftauchen, die andere phagozytierte Partikel hier z.B. Zymosan enthielten (3.1.2.3). Zur weiteren Charakterisierung dieser Kompartimente wurden daher Kolokalisationsanalysen mit Endophagosomenmarkern durchgeführt. Sollten die sporenhaltigen PVM mit dem lysosomalen Marker LAMP1 kolokalisieren, spräche dies für einen regulären Phagozytoseprozess der *E.cuniculi*-Sporen.

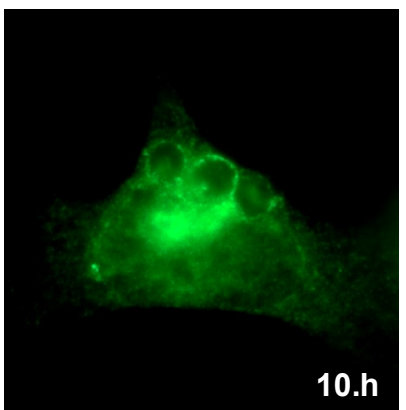
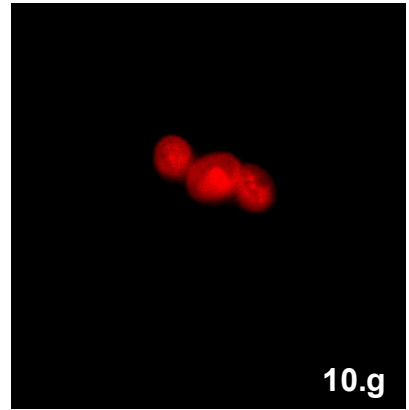
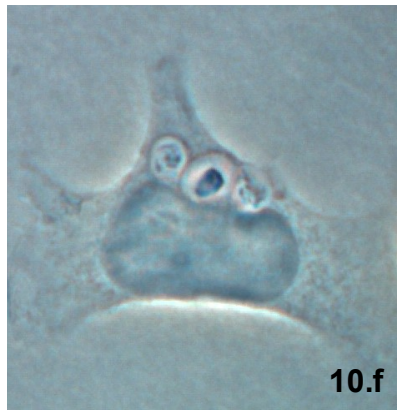
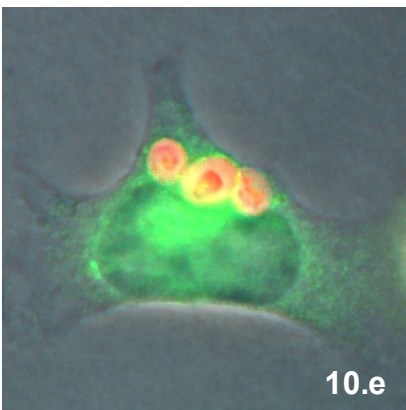
Die Zentrifugation der vitalen Sporen (20 µl Infektionsvorrat) sowie der hitzeinaktivierten Sporen erfolgte auf HFF, L929 und BMMΦ. Um möglichst viele phagozytierte vitale Sporen in Fibroblasten (HFF und L929) auszählen zu können, wurde diese Ansätze über 24 h und 48 h inkubiert. In den stärker phagozytierenden Makrophagen wurden neben diesen langen Inkubationszeiten auch kürzere Ansätze vitaler Sporen nach 30 min, 60 min und 120 min untersucht. Die Phagozytoseansätze mit hitzeinaktivierten Sporen wurden in allen drei Zellen nach Vorinkubation und Waschen noch 30 min und 120 min weiterinkubiert.

Die Sporen wurden in allen beschriebenen Ansätzen mittels differenzieller Immunfluoreszenz-





**Abb. 10 Zymosan in Fibroblasten.** Phagozytierte Zymosanpartikel (Texas-Red-gekoppelt - rot) kolokalisieren nach 24 h Inkubationszeit mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP1 (Cy2-konj. Zweitantikörper - grün) in Fibroblasten (HFF – 10.a-d , L929 – 10.e-h). Phasenkontrastdarstellung in a und f, Immunfärbung LAMP1 in c und h, Zymosan in b und g, Overlay in d und e.



technik unter Verwendung des Kaninchenserums  $\alpha$ -SWP1 markiert (intrazellulärer Nachweisantikörper in HFF als humanen Zellen Cy2-konjugiert, in L929 und BMM $\Phi$  als murinen Zellen Cy3-konjugiert) (Methoden 2.2.5). Lysosomale Wirtszellkompartimente wurden mit den  $\alpha$ -LAMP1-Antikörpern nachgewiesen. Für humane Wirtszellen kam ein murines  $\alpha$ -human-LAMP1-IgG zum Einsatz und für Wirtszellen aus der Maus wurde ein  $\alpha$ -Maus-LAMP1-IgG aus der Ratte verwendet (Material 2.1.2). Der indirekte IF-Nachweis erfolgte in humanen Zellen mit Cy3-konjugiertem Esel  $\alpha$ -MausFc-IgG, für murine Zellen wurde ein Cy2-gekoppeltes Esel  $\alpha$ -RatteFc-IgG eingesetzt (vgl. Tab.17). Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

	Murine Wirtszellen		Humane Wirtszellen	
<b>Zielstruktur</b>	<i>E.cuniculi</i> -Sporen	LAMP1	<i>E.cuniculi</i> -Sporen	LAMP1
<b>1. Antikörper</b>	Kaninchenserum- $\alpha$ -SWP1	Ratte- $\alpha$ -Maus-LAMP1-IgG	Kaninchenserum- $\alpha$ -SWP1	Muriner $\alpha$ -human-LAMP1-IgG
<b>2. Antikörper</b>	Cy3-konj. Esel- $\alpha$ -Kaninchen-IgG	Cy2-konj. Esel- $\alpha$ -Ratte-IgG	Cy2-konj. Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG	Cy3-konj. Esel- $\alpha$ -Maus-IgG
<b>Effektive Farbgebung</b>	rot	grün	grün	rot

**Tab. 17 Schemadarstellung verwendeter Antikörper** in indirekter Immunfluoreszenztechnik bei Untersuchung phagozytierter Sporen und deren Beziehung zu lysosomalen Kompartimenten.

Ergänzend dazu wurden parallel einige Ansätze mit vitalen Sporen in HFF angelegt, die mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen *E.cuniculi* und dem murinen  $\alpha$ -human-LAMP1-IgG gefärbt wurden.

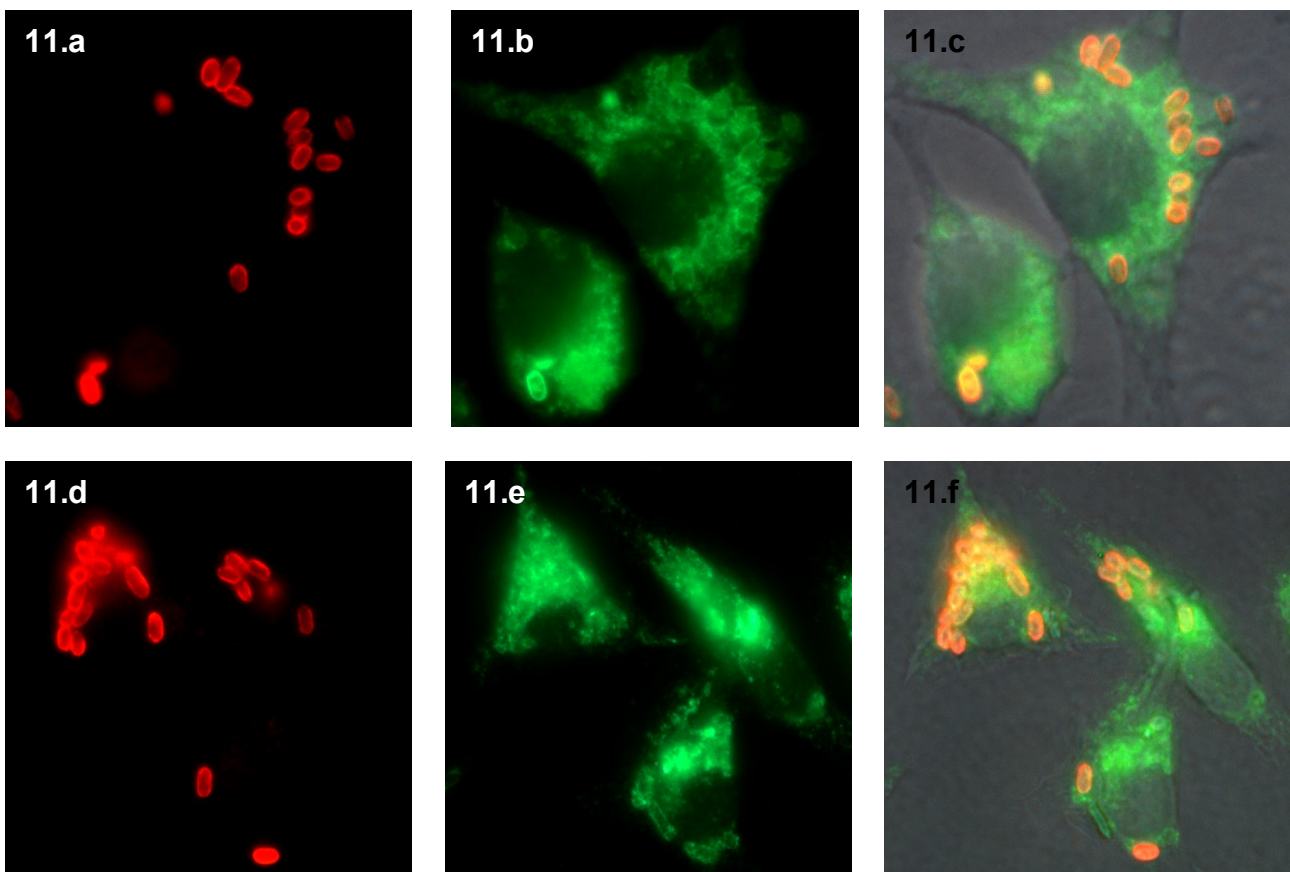
Die Versuchsansätze wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet (Abb. 11 und 12). Nach Phagozytose durch die BMM $\Phi$  kolokalisierte die überwiegende Zahl vitaler und hitzeinaktivierter sporenhaltiger PVM mit LAMP1-positiven Strukturen (62-96% - vgl. repräsentative Darstellung in Tab. 18). Die Kolokalisationsrate erhöhte sich im zeitlichen Verlauf und blieb nach zwei Stunden bis zu 24 Stunden auf einem hohen Niveau stabil. Die ausgezählten Kolokalisationsraten waren vergleichbar mit denen der Kontrollansätze (3.1.2.3).

Hierbei fanden sich keine Unterschiede bezüglich des Kolokalisationsanteils zwischen vitalen oder hitzeinaktivierten Sporen. So kann davon ausgegangen werden, dass vitale und hitzeinaktivierte Sporen über bekannte Phagozytosemechanismen von den Makrophagen aufgenommen werden und entlang des phagolysosomalen Weges degradiert werden.

Auch in den beiden Fibroblastenzellarten HFF und L929 gelangten die aufgenommenen Sporen in

Vitalphagozytose in BMMΦ	30 min p.i.	60 min p.i.	120 min p.i.	24 h p.i.
SWP1-positiv	245	192	207	184
LAMP1-positiv	152	178	169	167
Anteil LAMP1-positiv von SWP1-positiv	62 %	93 %	82 %	91 %
Mittelwert von drei Experimenten	63,19 %	94,61 %	87,04 %	nicht bestimmt
Standardabweichung	3,17	2,01	4,87	nicht bestimmt

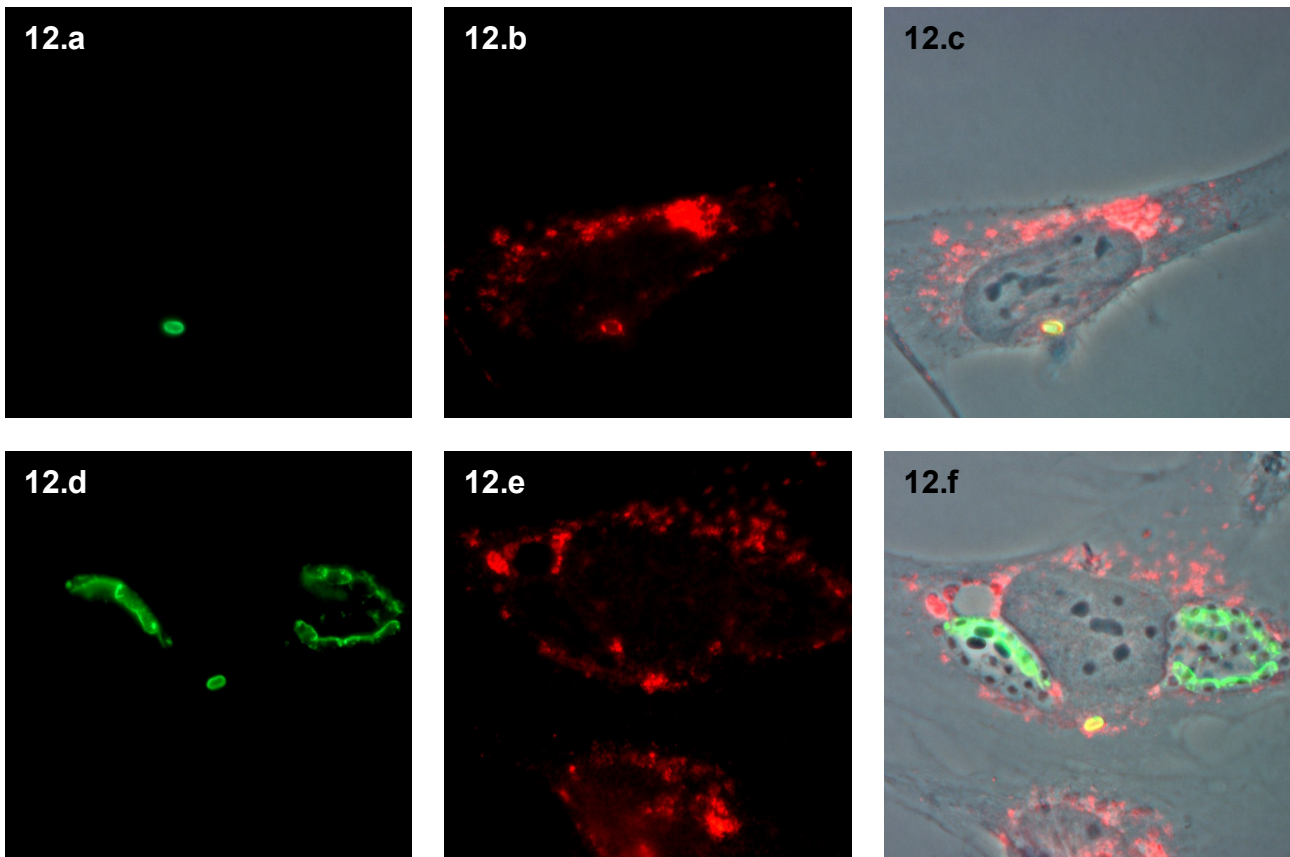
**Tab. 18 Phagozytose vitaler *E.cuniculi*-Sporen in professionellen Phagozyten und der Lysosomenmarker LAMP1.** Kolokalisationsrate intrazellulärer phagozytierter Sporen (SWP1-positiv) mit dem Lysosomenmarker LAMP1 nach Infektion von Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) mit *E.cuniculi*. Repräsentatives Experiment zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion (dunkelorange hinterlegt), Das Experiment wurde für die Zeitpunkte 30 min, 60 min und 120 min zweimal wiederholt – Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichung des Anteils der kolokalisierenden Sporen mit LAMP1 im unteren Tabellenteil (hellorange).



**Abb. 11 Phagozytierte *E.cuniculi*-Sporen und LAMP1 in professionellen Phagozyten.** Phagozytierte Sporen finden sich intrazellulär in LAMP1-positiven Kompartimenten professioneller Phagozyten (11.a-c: RAW-MΦ nach 45 Min Inkubation mit Spore; 11.d-f: BMMΦ nach 30 min Inkubation mit Spore). 11.a und d: Sporenfärbung mit SWP1-AK und Cy3-Nachweis (rot), 11. b und e: LAMP1 ist Cy2-positiv (grün) markiert; 11.c und f zeigen ein Overlay mit Phasenkontrast.

LAMP1-positive Kompartimente. Die Kolokalisationsraten von phagozytierten vitalen Sporen mit LAMP1 betragen hier nach 24 h und 48 h gleichermaßen 50 Prozent. Der Zustand der Sporen in Hinsicht auf Vitalität war auch hierbei irrelevant für die Phagosomenentwicklung.

Durch differenzielle Immunfluoreszenztests mit polyklonalen Antikörpern konnte in Parallelversuchen nachgewiesen werden, dass innerhalb einer einzigen Wirtszelle nebeneinander LAMP1-positive phagozytierte Sporen und LAMP1-negative Meronten vorliegen (Bsp. Abb. 12).



**Abb. 12 Phagozytierte vitale Sporen und LAMP1 in Fibroblasten.** 12.a-c zeigt eine phagozytierte vitale Spore in nichtprofessionellen Phagozyten (HFF) nach 24 h Inkubationszeit post infectionem. 12.a: Intrazelluläre Spore ist mit SWP1-AK und Cy2 markiert (grün); 12.b und e: LAMP1 wird durch Cy3 indirekt gefärbt (rot), 12.c und f: Overlay mit Phasenkontrast. Die intrazelluläre Spore kolokalisiert mit LAMP1 und leuchtet in der Überlagerung gelb.

In 12.d wurde zur Darstellung von *E.cuniculi* ein polyklonales Serum verwendet und dieses mit Cy2-AK nachgewiesen (grün). Das polyklonale Serum stellt alle Entwicklungsstadien von *E.cuniculi* dar. Nach 48 h Infektion (d-f) in HFF sieht man im Overlay f nebeneinander ein LAMP1-positives Sporenphagosom (LAMP1 immungefärbt mit Cy3-Konjugat – rot; in additiver Überlagerung mit Cy2 hier gelb) und LAMP1-negative parasitophore Vakuolen.

### 3.1.2.5 Phagozytierte Sporen und Zymosan

In den Vorversuchen stellte sich heraus, dass phagozytierte Sporen in LAMP1-markierte Kompartimente gelangen. Dieses gilt ebenso für Zymosan, für das diese Kompartimente bereits als Phagolysosomen klassifiziert wurden (Lührmann et al. 2001, Roos et al. 1981). Da es im Rahmen der phagosomalen Reifung kontinuierlich zu Fusionen der Phagolysosomen mit anderen Lysosomen kommt, würde man erwarten, dass sporenhaltige Kompartimente, sollten sie klassische Phagolysosomen darstellen, mit zymosanhaltigen Organellen fusionieren können.

Zum Nachweis solcher Fusionen verwendeten wir hitzeinaktivierte Sporen, die in getrennten Ansätzen unmarkiert und opsoniert mit Maus- $\alpha$ -SWP1-AK sowie mit polyklonalem Maus- $\alpha$ -*E.cuniculi*-Serum eingesetzt wurden. Gleichzeitig wurden Zymosan- und Dextranpräparationen auf HFF, L929 und BMM $\Phi$  inkubiert (Methoden 2.2.4). Nach Vorinkubation über 2 h und mit anschließenden Waschschritten betrug die weitere Inkubationszeit noch einmal 30 min und 120 min. Es folgte eine differenzielle IF-Färbung (Methoden 2.2.5) unter Verwendung des sporenspezifischen Kaninchenserums- $\alpha$ -SWP1 zur Unterscheidung intrazellulärer und extrazellulärer Sporen. Die indirekte Markierung nach Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte mit einem Cy2-konjugierten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG. Daraus resultierte eine reine Cy2-Markierung der intrazellulären Sporen, die unter dem Mikroskop auf Assoziationen mit den Texas-Red-gekoppelten Zymosan-/ Dextranpartikeln ausgewertet wurden. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Am deutlichsten wurden Kollokalisierungen phagozytierter Sporen mit Zymosan in BMM $\Phi$  nach einem Zweistundenzeitraum (ohne Abb.) nachgewiesen.

Auch in den Fibroblastenlinien kam es nach zwei Stunden zu gemeinsamen Endophagosomen von Sporen und Zymosan. Bereits die 30-minütigen Ansätze ergaben Fusionen, jedoch nur als vereinzelte Beispiele, die daher nicht ausgezählt wurden. Dextran zeigte für alle untersuchten Zeiträume ebenfalls nur sehr vereinzelt Fusionen.

Aus den Beobachtungen sowohl professionell phagozytierender Zellen als auch nichtprofessionell phagozytierender Zelllinien folgt, dass phagozytierte Sporen im Lysosomen enden. Eine exakte quantifizierende Analyse wurde nicht erhoben.

### 3.1.3 Infektionsverhalten

#### 3.1.3.1 *E.cuniculi* infiziert HFF und BMM $\Phi$ - Auswertung der Unterschiede

Mikrosporidien können sich in vielen verschiedenen Wirtszelltypen vermehren (vgl. 1.3.1 und 2.1.3). In diesem Versuch sollte die Infektionsrate von zwei primären Zellarten, murinen BMM $\Phi$

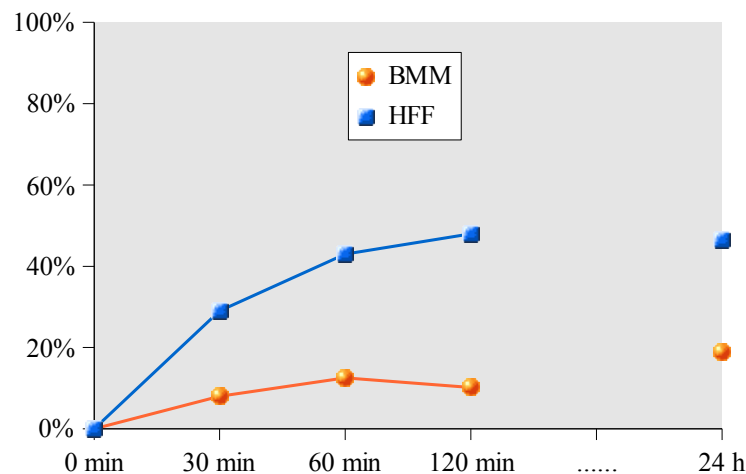
und humanen Fibroblasten (HFF), verglichen werden.

Da *E.cuniculi* auch als Spore phagozytiert werden kann und dadurch die Verwendung polyklonaler Seren keine Differenzierung zwischen erfolgter Invasion in Form der parasitophoren Vakuole und Sporenphagosom zuläßt, wurde der monoklonale Antikörper 6G2 zur stadienspezifischen Anfärbung der Meronten verwendet.

Die Zellkulturen in 24-Lochplatten wurden parallel mit *E.cuniculi* nach beschriebenem Infektionsmodus infiziert (Methoden 2.2.3). Die beobachteten Zeitspannen betragen 30 min, 60 min, 120 min, 24 h, 48 h und 72 h nach Inkubation im Zellbrutschrank.

Nach Durchführung der indirekten Färbung erfolgte die Auswertung am Immunfluoreszenzmikroskop (Abb. 5). Die angegebenen Infektionsraten beziehen sich auf merontenhaltige parasitophore Vakuolen pro mindestens 550 ausgewertete Wirtszellen (Abb. 13). Dabei war die Zahl der Wirtszellen pro Gesichtsfeld in beiden Zelllinien vergleichbar, hingegen betrug die Konfluenz bei den HFF ca. 90%, bei den BMMΦ ca. 60%. Diese Versuche wurden dreimal durchgeführt.

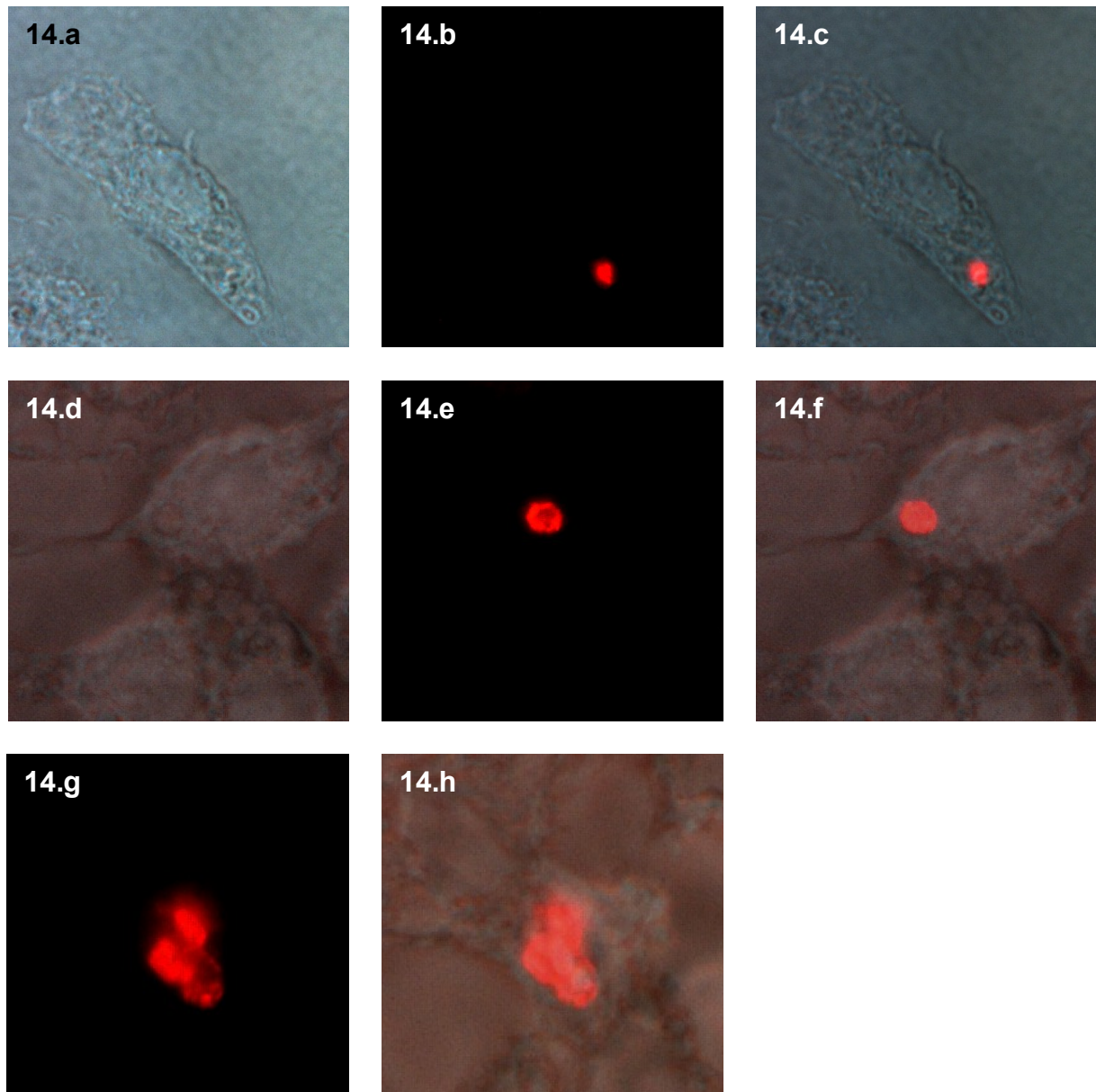
Bei sonst gleichen Bedingungen ergaben sich höhere Infektionsraten (drei- bis vierfach) für die HFF. In beiden Wirtszellen stieg die Zahl der nachweisbaren intrazellulären Erreger im Zeitverlauf an, um nach ca. einer Stunde eine stabile Rate zu erreichen.



**Abb. 13 Infektionsrate.** Prozentuale Infektionsraten (Merontenstadium) der Wirtszellen nach Zugabe und Zentrifugation von *E.cuniculi* auf Knochenmarksmakrophagen (BMM) und Humane Vorhautfibroblasten (HFF). Repräsentatives Experiment. Die Versuche 30 min p.i., 60 min p.i. und 120 min p.i. wurden dreimal durchgeführt und ergaben für HFF folgende Mittelwerte und Standardabweichungen: 30,07% und 1,21 (30 min); 41,3% und 2,73 (60 min); 56,36% und 9,74 (120 min). Für BMM: 6,58% und 1,88 (30 min); 12,35% und 0,27 (60 min); 14,12% und 4,15 (120 min).

**3.1.3.2 Morphologische Unterschiede der parasitophoren Vakuole in HFF und BMMΦ**

Ein morphologischer Vergleich der Mikrosporidien 24 h p.i., 48 h p.i. und 72 h p.i. zeigte sowohl in HFF als auch in BMMΦ eine Vergrößerung der parasitophoren Vakuole sowie Zellteilung der Meronten und Differenzierung in Sporonten und Sporoblasten (vgl. Glossar). Jedoch verlief dieser Wachstumsprozess in den Makrophagen langsamer (Abb. 14).



**Abb. 14 Infektion in professionellen Phagozyten.** Infektion mit *E.cuniculi* in zwei professionellen Phagozytenlinien. Phasenkontrastdarstellung der Zellkonturen und Darstellung der Merontenstadien mit dem sporoplasmaspezifischen 6G2-Antikörper (Cy3-Immundefärbung - rot). 14.a-c zeigt eine halbstündige Infektion von primären Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ). In 14.d-f sieht man ein einzelliges Vakuolenstadium 24 h nach Infektion von RAW-MΦ. Erst 48 h nach erfolgter Infektion kommt es zu mehrzelligen Infektionsvakuolen – ebenfalls in RAW-MΦ (14.g-h). a und d sind Phasenkontrastaufnahmen; b,e und g Reaktionen mit 6G2; c,f und h die zugehörigen Overlays.

### **3.1.4 Verhältnis der Vitalphagozytose zu erfolgreicher Infektion in professionellen und nichtprofessionellen Phagozyten**

In Zusammenschau der Experimente aus 3.1.2 und 3.1.3 stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Sporenphagozytose und Infektion in den Wirtszelllinien besteht. In parallel durchgeführten Versuchen sollte dieses Verhältnis daher quantitativ erfasst werden.

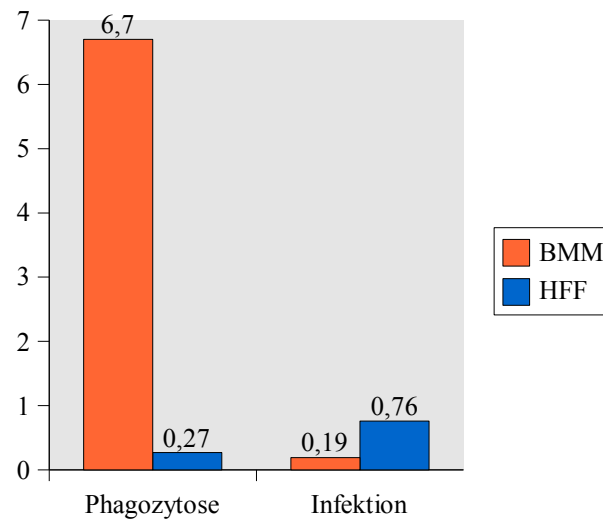
Infiziert wurden konfluent auf Deckgläsern in Lochplatten gezüchtete HFF und BMM $\Phi$  mit je 20  $\mu$ l Suspension vitaler Sporen (nach 2.2.3). Die Ansätze wurden 30 min, 60 min und 120 min nach der Infektion gestoppt und fixiert. Zur Darstellung der vital phagozytierten Sporen wurde eine differenzielle Immunfluoreszenzfärbung mit Maus- $\alpha$ -SWP1-Antikörper, für die Merontenstadien in der jungen parasitophoren Vakuole mit Maus- $\alpha$ -6G2-Hybridomaüberstand durchgeführt. Ausgezählt wurden intrazelluläre Sporen und parasitophore Vakuolen in über 500 Wirtszellen. Insgesamt wurde der Versuch zweimal erfolgreich wiederholt.

Die in den HFF enthaltenen Mikrosporidien waren größtenteils über einen aktiven Infektionsprozess und nicht durch Phagozytose in die Zellen gelangt (Abb. 15).

Im Gegensatz dazu war die Infektionsrate in den BMM $\Phi$  analog zu 3.1.3 geringer als die Sporenphagozytoseaktivität. Befanden sich einerseits durchschnittlich sieben phagozytierte Sporen in einem Makrophagen, war im gleichen Ansatz nur in jeder fünften Zelle auch eine Infektion (Merontenstadium) nachweisbar.

Da sich Phagozytoserate (intrazelluläre Sporen) und Infektionsrate (intrazelluläre Meronten) in den verschiedenen Zelllinien nicht gleichsinnig verhielten (Abb. 15), müssen HFF und BMM $\Phi$  voneinander getrennt bewertet werden. Während die Sporenphagozytose in nichtprofessionellen Phagozyten (HFF) offenbar keine Relevanz für eine erfolgreiche Infektion besitzt, bleibt die Bedeutung des Phagozytoseprozesses für die Infektion von professionellen Phagozyten (BMM $\Phi$ ) an dieser Stelle offen.





**Abb. 15 Phagozytose-/Infektionsverhältnis.** Auswertung des Phagozytose-/Infektionsverhältnisses zwei Stunden nach Infektion mit *E.cuniculi* in Knochenmarksmakrophagen der Maus (BMM) und Humanen Vorhautfibroblasten (HFF). Die Werte der y-Achse beziehen sich auf nach Auszählung von je mindestens 150 Wirtszellen gemittelte positive intrazelluläre Befunde, d.h. Infektionen oder phagozytierte Sporen pro Wirtszelle. Sporenphagozytose entsprach SWP1-positivem Färbeverhalten in differenzieller Technik. Als Infektion galten 6G2-positive intrazelluläre Meronten. Im Mittel enthielten ein Makrophage 6,7 phagozytierte Sporen gegenüber 0,19 parasitophoren Infektionsvakuolen (Meronten). Umkehrung des Verhältnisses bei HFF: hier enthielt ein nur jeder vierte Fibroblast eine phagozytierte Spore (0,27 pro Wirtszelle) aber war häufiger infiziert (0,76 Meronten pro Wirtszelle).

Es folgte in diesem Fall keine Analyse der Mittelwerte und Standardabweichungen, da die erhobenen absoluten Zahlen in den Experimenten aufgrund unterschiedlicher Infektiosität bei Sporensuspensionen unterschiedlichen Alters stark differierten. Jedoch verhielten sich diese Zahlen zueinander konstant, vgl. auch Versuche 3.1.3 und 3.1.2.

## **3.2 Die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* entwickelt sich unabhängig von endophagosomalen Wirtszellkompartimenten**

### **3.2.1 Zymosan-markierte Lysosomen und die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi***

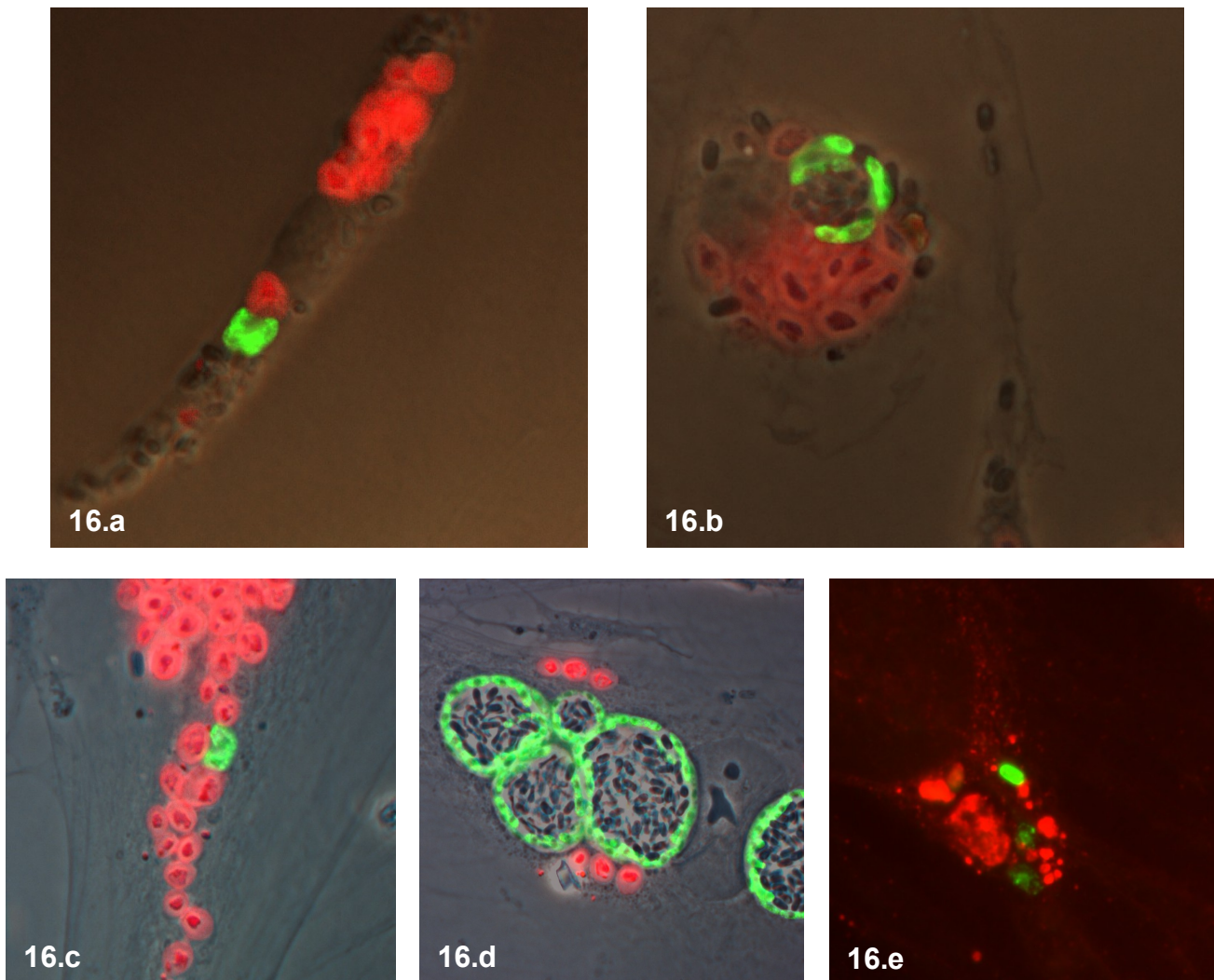
Wie bereits erwähnt, haben Zymosan und Dextrane als phagozytierte Partikel vielfach Verwendung in der Phagozytoseforschung gefunden (vgl. 3.1.2). Beide Substanzen werden nach intrazellulärer Aufnahme in Endophagosomen zu Lysosomen weitergeleitet. Lysosomen verschmelzen kontinuierlich miteinander (Haas 2007). Eine hypothetische Fusion der parasitophoren Vakuole (PV) mit dem phagosomalen Netzwerk sollte so theoretisch in ein örtliches Aufeinandertreffen von zymosanhaltigen Lysosomen und der PV münden.

In der Gewissheit, dass nach zweistündiger Zymosaninkubation dieses phagosomal aufgenommen und in lysosomale Kompartimente weitergeleitet sein würde (3.1.2.3), wurde dieser Zeitrahmen vor Inkubation der verschiedenen Zelllinien (HFF, L929 und BMMΦ) mit *E.cuniculi* gewählt (vgl. Methoden 2.2.3 und 2.2.4). Dann erfolgte die Zugabe der Mikrosporidien für 30 min, 2 h, 24 h und 48 h.

In HFF wurde zusätzlich eine längere Inkubation mit Mikrosporidien durchgeführt. Hierfür wurden den Zellen in einem Teil der Ansätze 24 h vor Zymosan-Zentrifugation *E.cuniculi* zugegeben und in dem anderen Teil 24 h nach Zymosan-Zentrifugation. Nach gründlichem Waschen wurden alle Ansätze mit Zellkulturmedium für weitere 15 h inkubiert.

Zymosanpartikel wie Dextrane waren mit rot emittierenden Fluoreszenzfarbstoffen (Texas Red) markiert. Die Anfärbung der frühen parasitophoren Vakuole von *E.cuniculi* gelang mit dem merontenspezifischen murinen 6G2-Antikörper und indirektem Nachweis durch Cy2-konjugiertes Esel- $\alpha$ -MausFc-IgG. Dadurch wurde eine Verwechslung mit phagozytierten Sporen ausgeschlossen. In älteren parasitophoren Vakuolen war die Zuordnung anhand charakteristischer Morphologie (Größe und Mehrzellstadium) mittels polyklonalen Kaninchenserums und Cy2-Markierung möglich und wurde in den älteren HFF-Ansätzen auch so durchgeführt. Diese Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt.

Mikroskopisch erhielten alle Zelllinien sowohl zahlreiche Mikrosporidien als auch Zymosanpartikel (Abb. 16). Eine Phagozytose von Dextran war hingegen nur vereinzelt erfolgreich. Weder in den Fibroblasten (HFF und L929) noch in den Makrophagen (BMMΦ) liessen sich Kolokalisationen von phagozytiertem Zymosan mit den unterschiedlichen Reifungsgraden der parasitophoren Vakuole finden.



**Abb. 16 Infektion: Parasitophore Vakuole und Zymosan.** Zymosanpartikel sind Texas-Red-markiert (rot), Merontenstadien werden durch den 6G2-AK und Cy2 (grün) nachgewiesen. In BMMΦ entwickelt sich die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* nach 24 h Infektionsdauer (16.a) und nach 48 h (16.b) unabhängig von zymosanhaltigen Phagosomen. Auch in HFF kommt es nicht zu Fusionen der Infektionsvakuolen mit den lysosomalen Phagosomen – 16.c ist eine 24-stündige Infektion, 16.d zeigt eine Infektionszeit von 48 h.

Bild 16.e zeigt Texas-Red-konjugiertes Dextran in HFF nach 14 h Infektionsdauer. Zur Darstellung von *E.cuniculi* wurde ein polyklonales Serum und Cy2-Markierung (grün) verwendet. Die Meronten entwickeln sich auch hier außerhalb der Dextranphagosomen. 16.a bis e: Overlays mit Phasenkontrast.

### 3.2.2 Kinetische Studien der parasitophoren Vakuolenmembran mit endosomalen, lysosomalen und ER-Markerproteinen

Wie in der Einleitung besprochen, sind am Phagozytosegeschehen im Zeitverlauf mehrere Zellkompartimente beteiligt, die sich durch das Vorhandensein spezifischer Oberflächenproteine

und anderer antigener Strukturen charakterisieren lassen. Um eine mögliche Assoziation der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) von *E.cuniculi* mit diesen Kompartimenten zu untersuchen, bietet sich die Verwendung von Antikörpern an, die gegen eben diese Strukturen gerichtet sind. Wir untersuchten repräsentativ für die Plasmamembran und frühe Endosomen den Transferrinrezeptor (TfR), für frühe Endosomen das Early Endosome Antigen 1 (EEA1), für späte Endosomen und Lysosomen das Lysosomal-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP1) und als Bestandteil der Membran des Endoplasmatischen Retikulums das Protein Calnexin.

Die verwendeten Antikörper richteten sich nach der Herkunft der Zelllinien. Dabei wurden in allen Zelllinien IgG aus der Ziege gegen TfR, EEA1 und Calnexin eingesetzt. In HFF wurden polyklonale Ziegenantikörper gegen LAMP1 verwendet. Der Nachweis der Ziegenantikörper geschah mit Cy3-konjugierten polyklonalen  $\alpha$ -Ziege-Antikörpern. Entsprechend wurde die parasitophore Vakuole in diesen Ansätzen mit dem murinen 6G2-Antikörper und Cy2-konjugierten  $\alpha$ -MausFc-IgG dargestellt (Abb. 17, 18, 19 und 21)

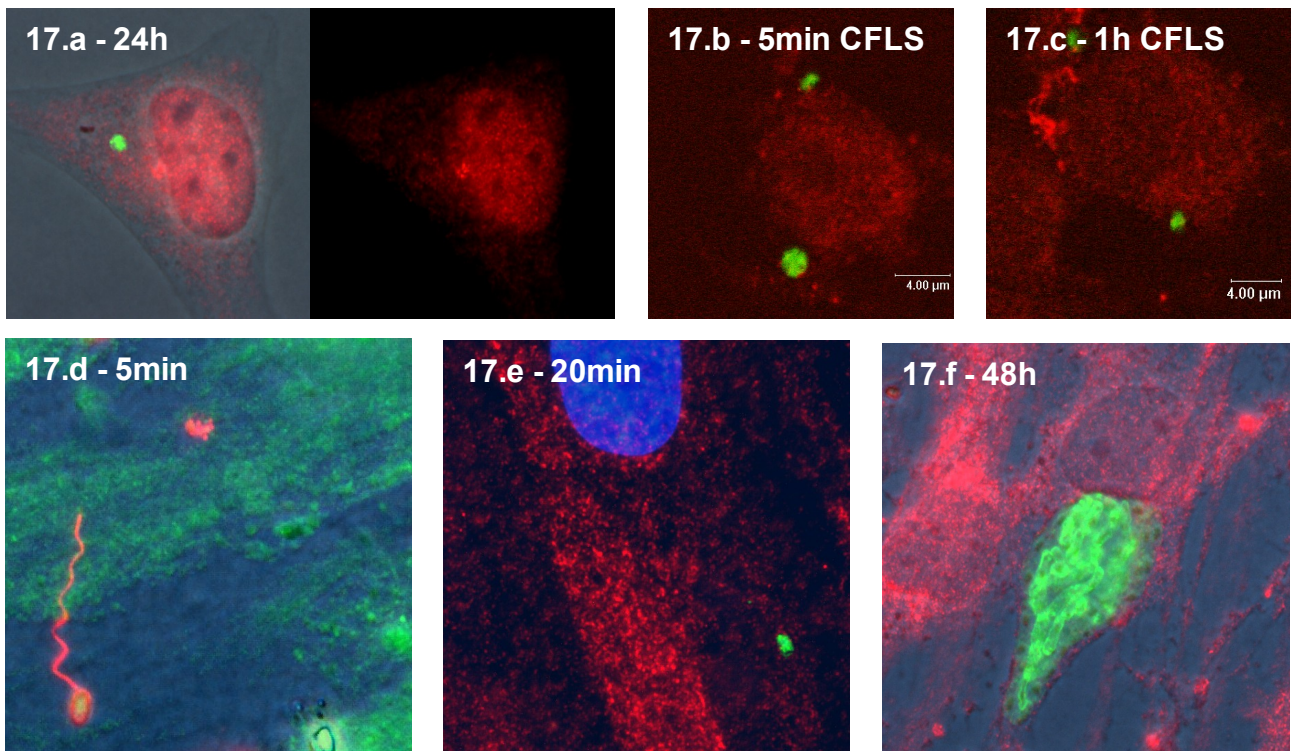
In den L929-Zellen und den beiden murinen Makrophagenarten wurde LAMP1 mit einem aus der Ratte stammenden IgG markiert, dieser wiederum wurde dann mit Cy2-konjugiertem  $\alpha$ -RatteFc-IgG gefärbt. Zum Nachweis der parasitophoren Vakuole mit murinem 6G2-Antikörper wurde als Zweitantikörper ein Cy3-konjugiertes  $\alpha$ -MausFc-IgG verwendet (Abb. 20).

In HFF wurden alle Zeitfenster in zusätzlichen Ansätzen mit polyklonalem Kaninchenserum gegen *E.cuniculi* markiert und mit Cy3-konjugiertem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG nachgewiesen. Für die Darstellung von TfR, EEA1 und LAMP1 kamen murine  $\alpha$ -humanTfR-, -EEA1- sowie -LAMP1-IgG zum Einsatz. Diese wurden dann mittels Cy2-konjugierter  $\alpha$ -MausFc-IgG gefärbt (Abb. 17 und 18).

Farbliche Markierung der parasitophoren Vakuole einerseits und der genannten Zellorganellen andererseits ergäbe bei Verschmelzen der Membranen eine örtliche Doppelfärbung (Kokalisation). Da im Zuge der ungeklärten Bildung der PVM während der Invasion die frühen Infektionszeitpunkte von ganz besonderem Interesse sind, lag hier ein Schwerpunkt der Beobachtungen.

Als Wirtszellen der Infektion wurden Fibroblastenlinien (HFF und L929) und Makrophagen (BMM $\Phi$  und initial auch RAW-M $\Phi$ ) verwendet. Die untersuchten Infektionszeiträume betragen 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 3 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Dabei wurde die Infektionsdosis bei den kurzen Zeiträumen im Minutenbereich erhöht, um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen (50  $\mu$ l Mikrosporidiensuspension statt 10  $\mu$ l). Außerdem wurde die Zentrifugationsdauer für 1 min und 3 min entsprechend verkürzt. Im übrigen verlief die Infektion nach den geschilderten Zentrifugationsverfahren (vgl Methoden 2.2.3). In HFF und Makrophagen

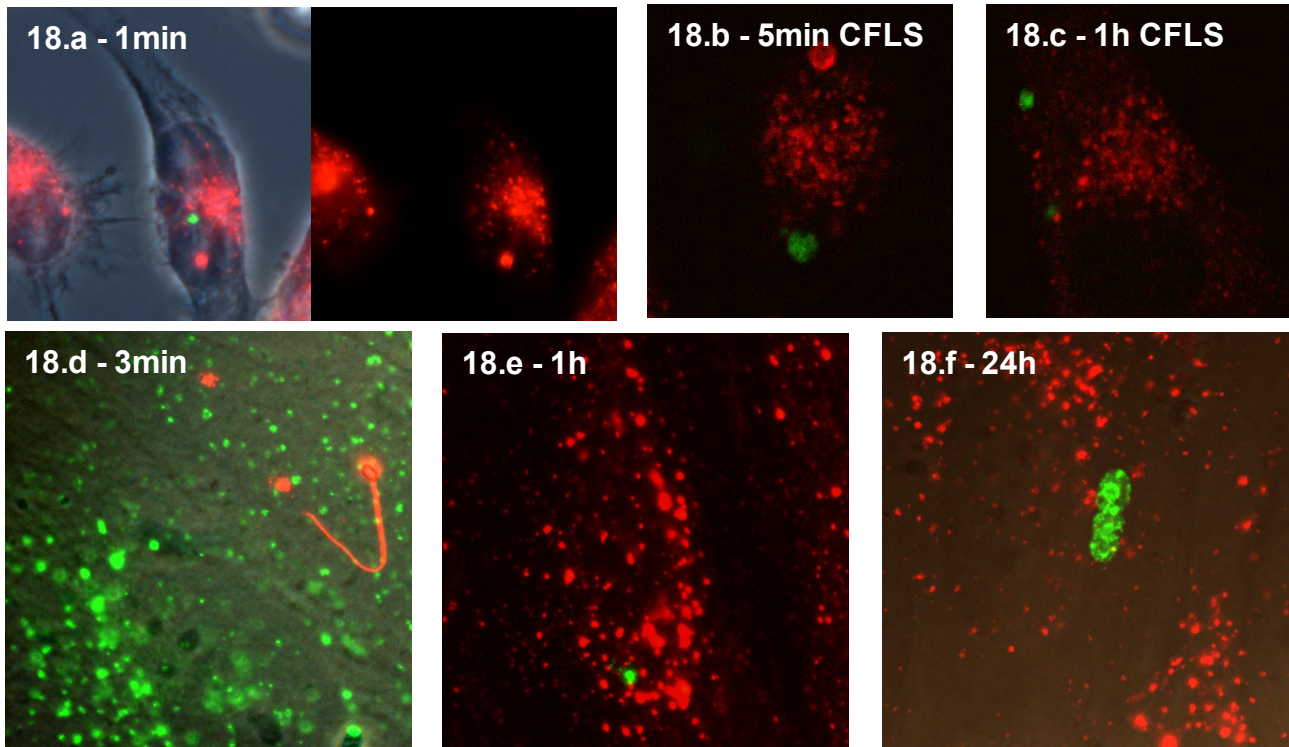
wurden die Versuche dreimal unabhängig voneinander, in L929 wurde das Experiment zweimal durchgeführt.



**Abb. 17 Transferrinrezeptor und Kinetik der parasitophoren Vakuole** von *E.cuniculi* in Fibroblasten (L929 und HFF). 17.a: L929-Fibroblasten in regulärer IF-Mikroskopie 24 h nach Infektion . Darstellung der PV mittels 6G2-AK und Cy2-Markierung (grün), TfR dargestellt mit Cy3-Färbung (rot). 17.b und c: 5 min und 1 h nach Infektion mit konfokaler Mikroskopie (CFLS) dokumentiert. Bilder d-f zeigen Infektionen in HFF und reguläre IFT-Mikroskopie. In d wurde polyklonales Serum gegen *E.cuniculi* verwendet und mit Cy3 markiert (rot), während der TfR mit Cy2 markiert wurde (grün). In e und f ist der TfR Cy3-markiert (rot) und die merontenhaltige PV mit dem 6G2-AK und Cy2-Nachweis grün markiert. Hoechstfarbstoff führt zur Blaufärbung der DNA-haltigen Zellkerne. Kolokalisationen zwischen PV und TfR wurden nicht beobachtet. 17.a, d, e, und f als Overlays mit Phasenkontrast.

Ausgewertet wurden die Immunfluoreszenzobjektträger am Zeiss-Mikroskop und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (CFLS). Eine ringförmige Anordnung um die parasitophore Vakuole zählte ebenso wie eine farbliche Überlagerung als Kolokalisation (vgl.2.2.7, S.30 f.). Solch eine Kolokalisation galt als Indikator einer erfolgten Fusion der parasitophoren Vakuolenmembran mit den jeweils angefärbten Wirtszellkompartimenten. Zur Quantifizierung wurden pro Zellart und Infektionszeitpunkt je mindestens 50 parasitophore Vakuolen ausgezählt. Exemplarisch wurden mit integrierter Digitalkamera des Mikroskops und CFLS-Aufnahme unterschiedlichste Infektionszeitpunkte dokumentiert (Abb. 17 - 21). Hierbei wurden Einzelkanalaufnahmen (Cy2 und Cy3) und Phasenkontrastbilder digital übereinander gelagert, so dass es im Kolokalisationsfall zu Gelbadditionseffekten kommen würde (Methoden 2.2.7, S. 30 f.).

Im Ergebnis zeigte sich die parasitophore Vakuole in beiden Fibroblastenlinien (HFF und L929) nicht fusiogen. Keiner der untersuchten Marker kolokalisierte zu irgendeinem Infektionszeitpunkt in signifikantem Ausmaß mit der parasitophoren Vakuole (Tab. 19).



**Abb. 18 Early Endosome Antigen1 (EEA1) und Kinetik der parasitophoren Vakuole** von *E.cuniculi* in Fibroblasten (L929 und HFF). 18.a: L929-Fibroblasten in regulärer IF-Mikroskopie 1 min nach Infektion . Darstellung der PV mittels 6G2-AK und Cy2-Markierung (grün), EEA1 dargestellt mit Cy3-Färbung (rot). 18.b und c: 5 min und 1 h nach Infektion mit konfokaler Mikroskopie (CFLS) dokumentiert. Bilder d-f zeigen Infektionen in HFF und reguläre Immunfluoreszenzmikroskopie. In d wurde polyklonales Serum gegen *E.cuniculi* verwendet und mit Cy3 markiert (rot), während EEA1 Cy2-markiert (grün) zur Darstellung kommt. In den dann folgenden Bildern ist EEA1 rot und die merontenhaltige PV mit dem 6G2-AK und Cy2-Nachweis grün markiert. Kolokalisationen zwischen PV und EEA1 wurden nicht beobachtet. 18.a und d sind Overlays mit Phasenkontrast.

**Tab. 19 Kolokalisationen der parasitophoren Vakuole in HFF für Tfr, EEA1 und LAMP1.**

Tfr	1 min	3 min	5 min	10 min	20 min	40 min	1 h	3 h	8 h	24 h	48 h	72 h
PV	48	52	65	61	84	75	71	115	83	73	89	67
Kolok	0	2	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0
Rel %	0	0,04	0	0,03	0,07	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert%	0	0,02	0,01	0,03	0,05	0,01	0	0	0	0	0	0
Stabw	0	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0	0	0	0	0	0

<b>EEA1</b>	1 min	3 min	5 min	10 min	20 min	40 min	1 h	3 h	8 h	24 h	48 h	72 h
<b>PV</b>	51	64	57	63	65	80	75	88	94	77	118	61
<b>Kolok</b>	0	1	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<b>Rel %</b>	0	0,02	0,05	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0
<b>Mittelwert%</b>	0	0,01	0,04	0,02	0,01	0	0,01	0,01	0	0	0	0
<b>Stabw</b>	0	0,01	0,02	0,02	0,01	0	0,01	0,01	0	0	0	0

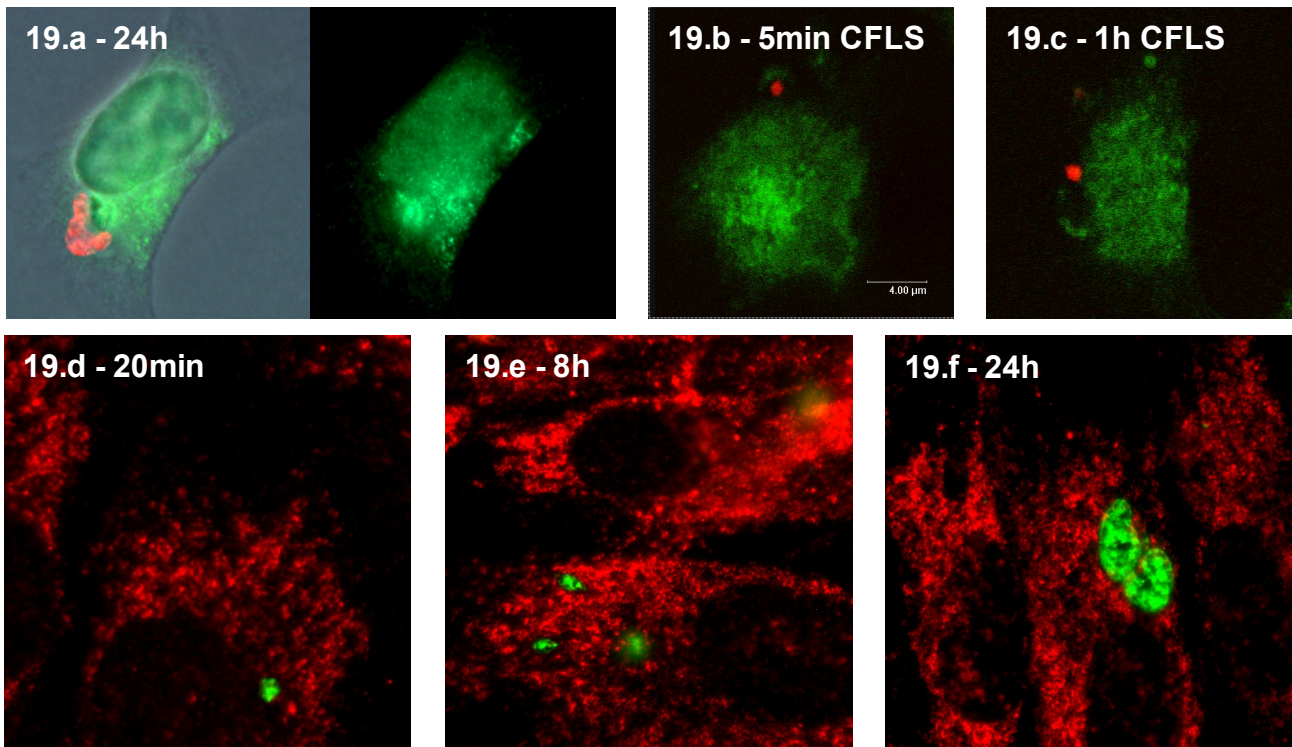
<b>LAMP</b>	1 min	3 min	5 min	10 min	20 min	40 min	1 h	3 h	8 h	24 h	48 h	72 h
<b>PV</b>	49	56	42	67	71	66	80	103	90	82	68	55
<b>Kolok</b>	0	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0
<b>Rel %</b>	0	0	0	0	0,03	0	0,05	0	0	0	0	0
<b>Mittelwert%</b>	0	0	0	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01	0	0	0	0
<b>Stabw</b>	0	0	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0	0	0	0

Auszählung der Kolokalisationen (Kolok) der parasitophoren Vakuole (PV) zu unterschiedlichsten Infektionszeitpunkten in HFF mit TfR, EEA1 und LAMP 1 im Kombinationsfilter des Immunfluoreszenzmikroskops. Darstellung eines exemplarischen Experiments mit Angabe des prozentualen Anteils der Kolokalisationen (Rel %) an Infektionen pro Zeitpunkt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Mittelwerte beziehen sich auf die Kolokalisationsanteile in Prozent bei je drei Experimenten, ebenso die Standardabweichung (Stabw)

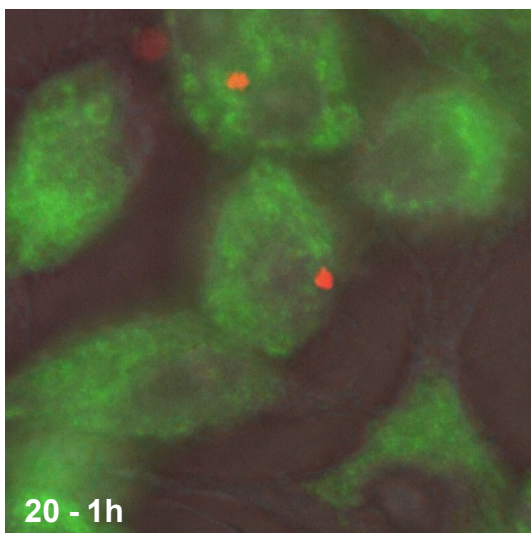
Auch in professionellen Phagozyten (BMMΦ) fusioniert die parasitophore Vakuole prinzipiell nicht mit dem endophagosomalen System (Abb. 20). Man sah aber vor allem mit dem lysosomalen Marker LAMP1 eine geringfügig höhere Zahl an Kolokalisationen als in Fibroblasten. Diese Assoziationen betrafen jedoch nur einen geringen Anteil der Infektionsvakuolen (Tab. 20). Die überwiegende Mehrzahl der parasitophoren Vakuolen in allen Zellarten kolokalisierte nicht mit den endophagosomalen Markern oder dem Marker für das Endoplasmatische Retikulum.

**Tab. 20 Kolokalisationen (Kolok) der parasitophoren Vakuole in BMMΦ mit LAMP1.** Legende vgl. Tab. 19. Die Versuche für spätere Infektionszeitpunkte (24 h, 48 h, 72 h) wurden nur einmal durchgeführt.

<b>LAMP1</b>	30 min p.i.	1 h p.i.	2 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.
<b>PV</b>	60	62	57	79	65	47
<b>Kolok</b>	8	6	8	4	0	0
<b>Rel %</b>	13,3	9,67	14,04	5,06	0	0
<b>Mittelwert%</b>	12,3	12,86	12,25	nicht bestimmt		
<b>Stabw</b>	1,27	3,03	1,93			

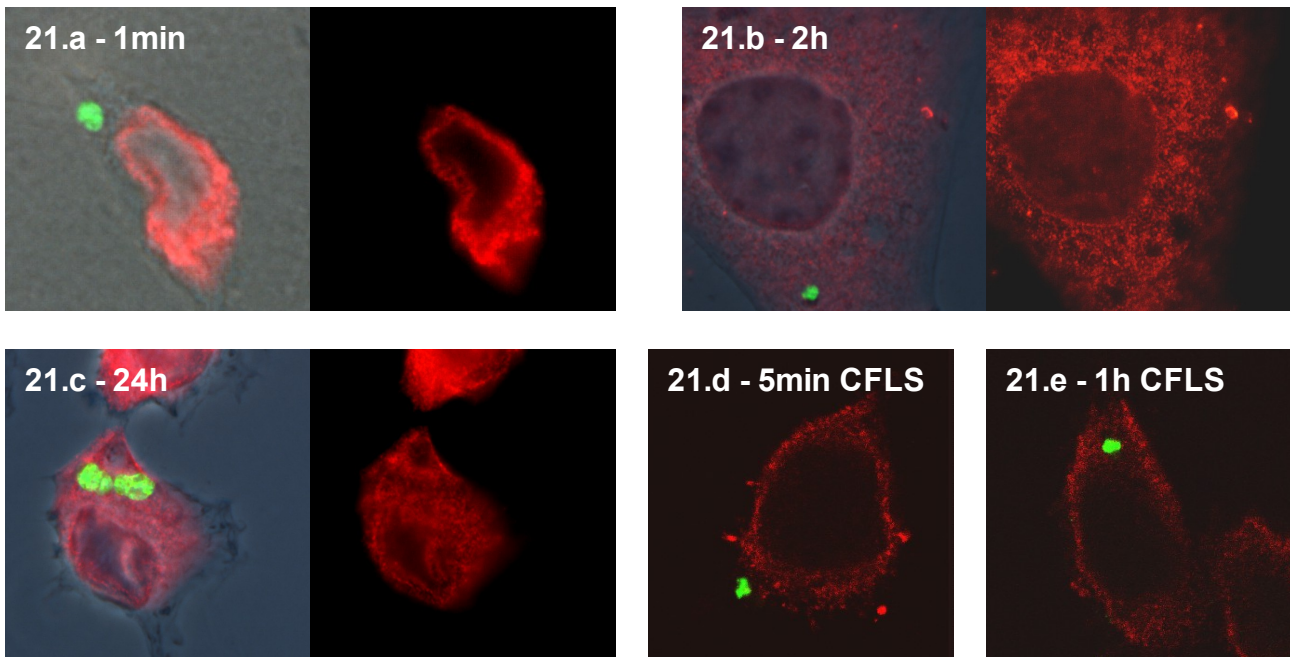


**Abb. 19** Lysosomal-assoziiertes Membranprotein1 (LAMP1) und Kinetik der parasitophoren Vakuole von *E.cuniculi* in Fibroblasten (L929 und HFF). 19.a: L929-Fibroblasten in regulärer IF-Mikroskopie 24 h nach Infektion . Darstellung der PV mittels 6G2-AK und Cy3-Markierung (rot), LAMP1 dargestellt mit Cy2-Färbung (grün). Overlay mit Phasenkontrast. 19.b und c: 5 min und 1 h nach Infektion mit konfokaler Mikroskopie (CFLS) dokumentiert. Bilder d-f zeigen Infektionen in HFF und reguläre Immunfluoreszenzmikroskopie. Hier ist LAMP1 Cy3-markiert (rot) und die merontenhaltige PV mit dem 6G2-AK und Cy2-Nachweis grün markiert. Kolokalisationen zwischen PV und LAMP1 wurden nicht beobachtet.



**Abb. 20** Infektion in professionellen Phagozyten: LAMP1 und die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* nach einstündiger Infektion in professionellen Phagozyten (RAW-MΦ). Cy2-Markierung von LAMP1 (grün) sowie Anwendung des sporoplasmaspezifischen 6G2-Antikörpers mit Cy3-Zweitantikörper (rot). Overlay mit Phasenkontrast. Es kommt nicht zu Kolokalisationen und damit nicht zu Fusionen der Lysosomen mit der parasitophoren Vakuole.





**Abb. 21 Calnexin und Kinetik der parasitophoren Vakuole** von *E.cuniculi* in Fibroblasten (L929). 21.a-c: L929-Fibroblasten in regulärer Immunfluoreszenzmikroskopie 1 min, 2 h und 24 h nach Infektion. Darstellung der PV mittels 6G2-Antikörper und Cy2-Markierung (grün), Calnexin dargestellt mit Cy3-Färbung (rot). Abb. a bis c als Overlay mit Phasenkontrast.

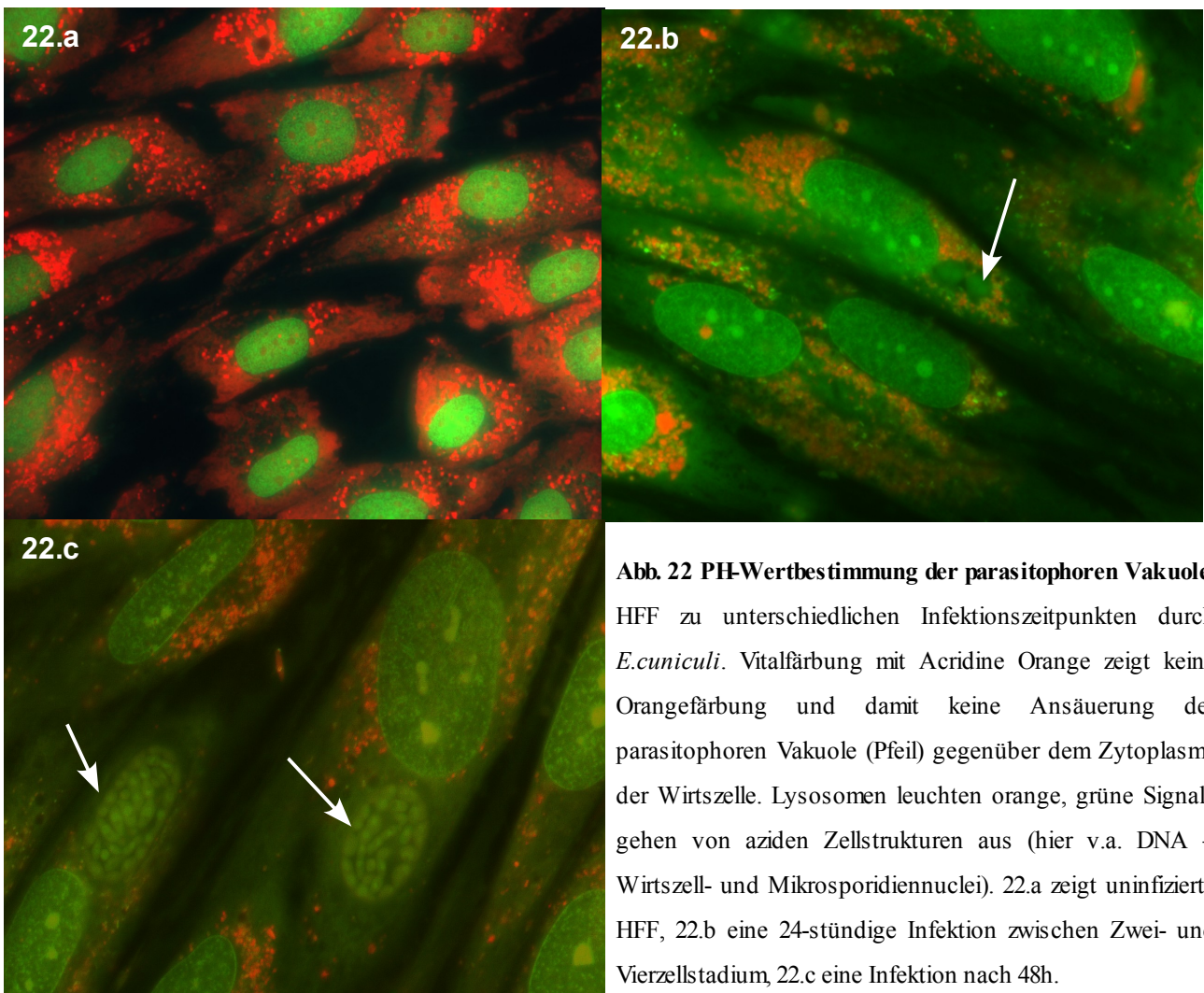
21.d und e: 5 min und 1 h nach Infektion mit konfokaler Mikroskopie (CFLS) dokumentiert. Kolokalisationen zwischen PV und Calnexin wurden nicht beobachtet.

### 3.2.3 PH-Wert-Bestimmung innerhalb der parasitophoren Vakuole

Bei der phagosomalen Reifung findet in der Regel auch eine Verringerung des pH-Wertes statt. Acridine Orange als schwach basischer Fluoreszenzfarbstoff akkumuliert in sauren intrazellulären Regionen und reichert sich abhängig von der Aktivität vesikulärer H<sup>+</sup>-ATPasen in sauren Zellkompartimenten an (Hiruma et al. 2007, Yoshinori et al. 1982). Günstige Diffusionseigenschaften und konzentrationsabhängige Dimerisierung und damit Verschiebung des Emissionsspektrums machen Acridine Orange zu einem geeigneten Farbstoff, um intrazelluläre pH-Wertschwankungen an Membranen vitaler Zellen sichtbar zu machen (Hiroshi et al. 2007, Wang et al. 2006, Millot et al. 1997).

Um die parasitophore Vakuole mit Acridine Orange auf eine mögliche Ansäuerung hin zu untersuchen, waren daher Vitalfärbungen notwendig. Da unter diesen Bedingungen der 6G2-Antikörper nicht eingesetzt werden konnte, wurden vor allem größere, fortgeschrittene Infektionsvakuolen untersucht. Der Versuch wurde an HFF und BMMΦ durchgeführt. Die analysierten parasitophoren Vakuolen reiften jeweils über 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Im Anschluss

wurden die Zellkulturen mit Acridine Orange inkubiert und fixiert (Methoden 2.2.6, S. 30). Nukleinsäuren von Wirtszelle und *E.cuniculi* (innerhalb der parasitophoren Vakuole) sowie azide Proteinstrukturen zeigten eine grünliche Emission, während Lysosomen Acridine Orange anreicherten. Dieses führte zu einer Dimerisierung und starker Orange-Rot-Fluoreszenz. Weder in HFF noch in BMMΦ kam es zu einer Acridine-Orange-Akkumulation innerhalb der parasitophoren Vakuole, so dass für die angegebene Infektionsdauer eine Ansäuerung der parasitophoren Vakuole ausgeschlossen werden kann (Abb. 22).



**Abb. 22** pH-Wertbestimmung der parasitophoren Vakuole. HFF zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten durch *E.cuniculi*. Vitalfärbung mit Acridine Orange zeigt keine Orangefärbung und damit keine Ansäuerung der parasitophoren Vakuole (Pfeil) gegenüber dem Zytoplasma der Wirtszelle. Lysosomen leuchten orange, grüne Signale gehen von aziden Zellstrukturen aus (hier v.a. DNA – Wirtszell- und Mikrosporidiennuclei). 22.a zeigt uninfizierte HFF, 22.b eine 24-stündige Infektion zwischen Zwei- und Vierzellstadium, 22.c eine Infektion nach 48h.

### 3.2.4 Einfluss wirksamer Antiinfektiva auf die antifusionäre Autonomie der parasitophoren Vakuole

Albendazol und Fumagillin zeigen *in vitro* und *in vivo* eine antibiotische Aktivität gegen *Encephalitozoon*-Spezies (vgl. 1.2.2.3, S. 8f.). Dabei führt die *in-vitro*-Applikation vor und nach Etablierung einer Infektion zu Wachstums- und Zellteilungsstörungen der Meronten in der

parasitophoren Vakuole (Didier 1997). Diese Effekte sind nach Austausch des antibiotikahaltigen Zellkulturmediums partiell reversibel. Hier sollte untersucht werden, inwiefern die Wirkweise beider Substanzen mit einer Beeinflussung des oben festgestellten antifusionären Charakters der parasitophoren Vakuole einhergehen könnte.

Im Fall einer Beeinflussung würde interessieren, ob die nichtfusiogenen Eigenschaften stabil beim Eintritt von *E.cuniculi* in die Wirtszelle erworben werden oder ob zu ihrem Erhalt aktive Prozesse während des gesamten intrazellulären Zyklus notwendig wären. Daher wurden zwei unterschiedliche Versuche konzipiert: Einige Infektionen sollten unter permanenter Anwesenheit der Antiinfektiva betrachtet werden, andere Infektionen wurden erst nach Etablierung der parasitophoren Vakuole mit den Antiinfektiva behandelt.

#### **3.2.4.1 Vorinkubation der Wirtszellen mit Albendazol und Fumagillin**

In diesem Versuch sollte die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* bereits von Anfang an in Kontakt mit wirksamen intrazellulären Konzentrationen der Antiinfektiva kommen.

Die Versuche erfolgten in den Fibroblastenlinien HFF und L929. Zellkulturmedium auf HFF- und L929-Zellen wurde in einer Konzentration von 10 ng / ml mit Albendazol oder Fumagillin versetzt (vgl. Didier 1997). Nach 24 h Einwirkung erfolgten die Infektionen mit *E.cuniculi* (2.2.3), die dann im 24 h-, 48 h- und 72 h-Stadium gestoppt wurden. In HFF wurde das Experiment zweimal wiederholt.

Für die Analyse der infizierten HFF wurden ein polyklonales Kaninchenserum gegen *E.cuniculi* und ein LAMP1-Antikörper aus der Maus eingesetzt. Bei den L929-Fibroblasten kamen der merontenspezifische 6G2-Antikörper und ein LAMP1-Antikörper aus der Ratte zum Einsatz. Mögliche Kolo-kalisationen wurden anschließend mikroskopisch bewertet (Abb. 23).

Die Infektionsraten in den antiinfektivahaltigen Ansätzen entsprachen denen der unbehandelten Kontrollansätze. Morphologisch zeigten die parasitophoren Vakuolen unter Albendazol und Fumagillin sowie ohne Antibiose deutliche Unterschiede. So befanden sich 80% der fumagillinbehandelten Infektionen nach 72 h noch im Einzellstadium, die restlichen 20% hatten maximal das Vierzellstadium erreicht. Das Wachstum in den albendazol-behandelten parasitophoren Vakuolen verlief schneller als unter Fumagillin und langsamer als in unbehandelten Infektionen. Dabei entstanden jedoch unvollständig getrennte, dysmorphe Riesenmeronten (geschätzter Durchmesser 5 µm, d.h. mehr als doppelte Sporontenlänge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Unterschiede zwischen den Wirtszellen konnten nicht festgestellt werden (Abb. 23).

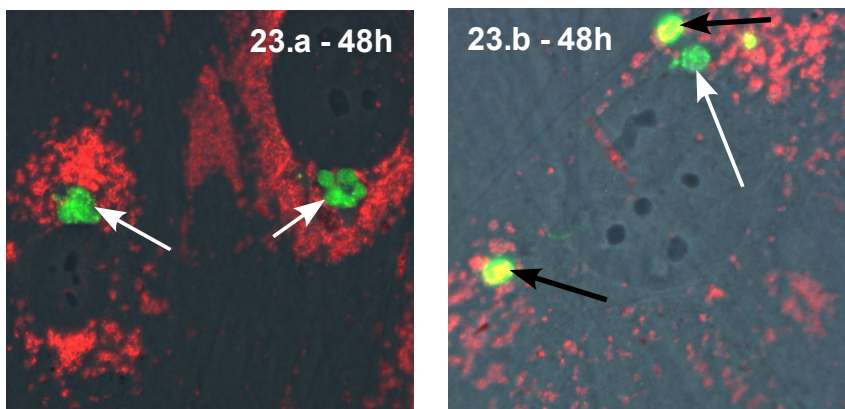
Zu keinem Zeitpunkt wurde eine signifikant vermehrte Kolokalisation von LAMP1 mit der PV festgestellt. Pro Zellreihe, einwirkendem Antiinfektivum und Infektionszeit wurden über 250 parasitophore Vakuolen ausgezählt. Die Anzahl der Kolokalisationen strebte in allen Versuchen gegen Null. Daraus folgt, dass die parasitophore Vakuole auch unter Behandlung mit Albendazol und Fumagillin nicht mit lysosomalen Kompartimenten fusioniert.

### 3.2.4.2 Antiinfektivazugabe nach mehrstündiger Infektionsdauer

In HFF sollte den Überlegungen aus 3.2.4 folgend der Einfluss von Albendazol und Fumagillin auf die parasitophore Vakuole nach mehrstündiger erfolgreicher Infektionsetablierung untersucht werden.

3 h, 8 h und 24 h nach stattgehabter Infektion wurde ein Medienwechsel der infizierten Fibroblasten durchgeführt. Dem frischen Zellkulturmedium wurde entweder Albendazol oder Fumagillin in wirksamer Konzentration (10 ng / ml) zugesetzt. Daraufhin wurden die Ansätze für weitere 24 h inkubiert. Schließlich folgte die Fixierung und indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit dem polyklonalem Kaninchenserum gegen *E.cuniculi* und einem murinen LAMP1-Antikörper.

Auch hierbei konnten keine Kolokalisationsphänomene ausgemacht werden.



**Abb. 23 Antiinfektiva und die parasitophore Vakuole.** Einwirkung von Albendazol (23.a) und Fumagillin (23.b) hat Einfluß auf das Wachstum der parasitophoren Vakuole (mit polyklonalem Serum und Cy2 (grün) markiert in HFF). LAMP1 leuchtet nach AK-Markierung und Cy3-Konjugat rot. Beide Bilder zeigen eine 48-stündige Infektion mit *E.cuniculi* und liegen als Overlay mit Phasenkontrast vor. Es kommt nicht zu LAMP1-Kolokalisationen der PV (Pfeil weiß) , aber der phagozytierten Sporen (Pfeil schwarz).

### 3.3 Das Zytoskelett der infizierten Wirtszelle und die parasitophore Vakuole

Bei der Phagozytose unterschiedlicher Erreger durch ihre Wirtszellen ist das Zytoskelett der phagozytierenden Zelle maßgeblich an der Bildung des Endophagosoms beteiligt (vgl. Einleitung). Auch die Phagozytose von *Encephalitozoon*-Sporen soll eine Aktinakkumulation hervorrufen (Foucault und Drancourt 2000). Bisher war jedoch eine derartige Analyse mangels merontenspezifischer Antikörper nicht möglich. Im folgenden sollten Aktin und Tubulin als Zytoskelettbestandteile grob orientierend in der Umgebung der parasitophoren Vakuole untersucht werden, um eine denkbare erregerinduzierte Beeinflussung dieser Zellorganisationselemente zu erkennen.

#### 3.3.1 Aktinstrukturen infizierter Wirtszellen

Dieses Experiment wurde an HFF nach Infektionsdauer von 24 h bzw. 48 h durchgeführt.

Zur Markierung der Aktinstrukturen stand FITC-gekoppeltes Phalloidin zur Verfügung, das als Zellgift auch in lebenden Zellen hochaffin an F-Aktin bindet und dieses dadurch stabilisiert, bzw. *in vivo* in seiner Funktion hemmt. Im Immunfluoreszenztest führt diese Eigenschaft zu einer selektiven Markierung der aktinhaltigen Zytoskelettbestandteile. Phalloidin wurde bei der Färbung analog zu den Antikörpern im letzten Färbeschritt verwendet (Methoden 2.2.5, S. 29).

In zwei parallelen Immunfluoreszenzfärbungen wurde einmal der murine monoklonale 6G2-Antikörper und FITC-konjugiertes Phalloidin, ein anderes Mal das polyklonale Anti-*E.cuniculi*-Kaninchenserum mit ebenfalls FITC-konjugiertem Phalloidin benutzt. Der Erreger wurde in jedem Fall mit Cy3-konjugierten Antikörpern gegen Maus bzw. Kaninchen dargestellt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung.

Die Anordnung der Aktinstrukturen in den infizierten Zellen unterschied sich nicht von der in uninfizierten Kontrollzellen. In der Nähe der parasitophoren Vakuole kam es nicht zu einer Kondensation oder Richtungsänderung der Aktinfasern (Abb. 24). Somit haben fortgeschrittene Infektionsstadien keinen Einfluss auf die aktinbeteiligte Zytoskelettorganisation ihrer Wirtszellen.

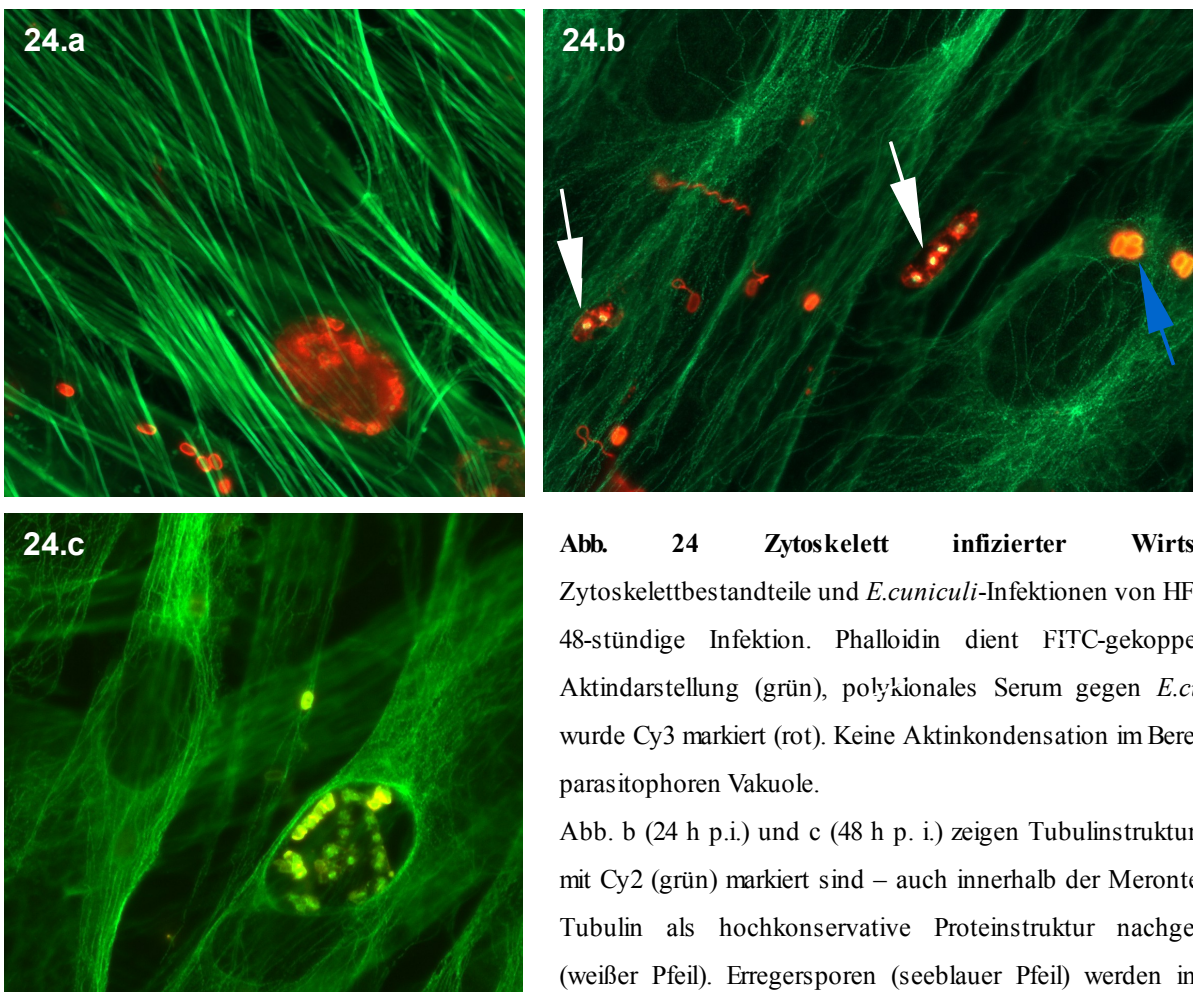
#### 3.3.2 Tubulinanordnung und die parasitophore Vakuole

Von Albendazol wird angenommen, dass es seinen antibiotischen Effekt über die Beeinflussung des  $\beta$ -Tubulins von *E.cuniculi* entfaltet. Somit könnte das erregereigene Tubulin eine wesentliche Rolle für die erfolgreiche intrazelluläre Vermehrung haben (vgl. 1.2.2.3, S. 9). Inwiefern sich *E.cuniculi*

darüberhinaus des Zytoskeletts der Wirtszelle bedient, um sich eine kommode Nische im Zytoplasma einzurichten, sollte hier geklärt werden.

Tubulinanalysen wurden an 24 h bzw. 48 h infizierten HFF und BMM $\Phi$  vorgenommen. *E.cuniculi*-Formen wurden mit dem polyklonalen Kaninchenserum und Cy3-konjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG gekennzeichnet. Das murine  $\alpha$ -Tubulin-IgG wurde mit Cy2-konjugiertem  $\alpha$ -MausFc-IgG als Zweitantikörper dargestellt. Das fortgeschrittene Entwicklungsstadium der parasitophoren Vakuole ließ eine unproblematische Abgrenzung der Infektion gegenüber phagozytierten Sporen zu.

Die mikroskopische Auswertung der angefertigten Präparate durch zwei unabhängige Betrachter führte zu keiner eindeutigen Aussage bezüglich des Tubulin-Kondensationsverhaltens um die parasitophore Vakuole, so dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine definitive Aussage hinsichtlich der Infektionsrelevanz von Tubulin getroffen werden konnte.



**Abb. 24 Zytoskelett infizierter Wirtszellen.**

Zytoskelettbestandteile und *E.cuniculi*-Infektionen von HFF. 24.a: 48-stündige Infektion. Phalloidin dient FITC-gekoppelt der Aktindarstellung (grün), polyklonales Serum gegen *E.cuniculi* wurde Cy3 markiert (rot). Keine Aktinkondensation im Bereich der parasitophoren Vakuole.

Abb. b (24 h p.i.) und c (48 h p. i.) zeigen Tubulinstrukturen, die mit Cy2 (grün) markiert sind – auch innerhalb der Meronten wird Tubulin als hochkonservative Proteinstruktur nachgewiesen (weißer Pfeil). Erregersporen (seeblauer Pfeil) werden in ihrem Inneren nicht angefärbt. Wie oben wird der Erreger mit polyklonalem Serum und Cy3 (rot) dargestellt. Eine Tubulinkondensation um die parasitophore Vakuole ist nicht sicher feststellbar.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 *E.cuniculi*-Sporen und Phagozytose

#### 4.1.1 Sporenphagozytose in primären Zelllinien

Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass primäre Zellen *E.cuniculi*-Sporen phagozytotisch aufnehmen können. Sowohl professionelle Phagozyten (BMMΦ) als auch nichtprofessionell phagozytierende Fibroblasten (HFF) internalisieren Sporen in quantitativ fassbarem Ausmaß. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf permanente Zellkulturen und murine Peritonealmakrophagen (Couzinet et al. 2000, Foucault und Drancourt 2000, Weidner und Sibley 1985, Weidner 1975).

Die Verfügbarkeit stadienspezifischer Antikörper (Bohne et al. 2000) ließ darüberhinaus die zweifelsfreie molekulare Zuordnung phagozytierter Sporen einerseits und injizierten Sporoplasmas (Meront) andererseits zu. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen orientierten sich frühere lichtmikroskopische Studien nur an vagen morphologischen Kriterien (Weidner und Sibley 1985) unter Verwendung polyklonaler Seren (Couzinet et al. 2000, Foucault und Drancourt 2000).

Der Vergleich der Phagozytoseraten ergab nun in Knochenmarksmakrophagen zwanzig- bis vierzigfach höhere Sporenphagozytosezahlen als in Fibroblasten. Dennoch enthielt auch jede vierte bis zehnte Fibroblastenzelle eine phagozytierte Spore<sup>1</sup>. Vergleichbare Zahlen fanden Leitch et al. in Enterozyten und Makrophagen, die mit *Encephalitozoon intestinale* infiziert wurden (2005).

In den von uns verwendeten Zelllinien waren sporenhaltige Phagosomen einerseits durch das Vorhandensein endosomal-lysosomaler Marker (LAMP1) charakterisiert und andererseits verschmolzen sie mit zymosanhaltigen Lysosomen. Diese Beobachtung deckt sich mit den elektronenmikroskopischen Ferritinversuchen von Weidner 1975 und Couzinets Phagozytosestudien an permanenten Lungenfibroblasten (Couzinet et al. 2000). Letzterer verwendete jedoch zur Darstellung der Mikrosporidien ein polyklonales Serum, das keine Unterscheidung phagozytierter Sporen von Infektionen (Meronten) ermöglichte. Somit konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass *E.cuniculi* als Spore in verschiedensten Zelllinien phagozytiert wird und diese Sporen dem klassischen Phagozytoseweg folgen, wobei sie letztendlich biologisch abgebaut werden (Didier 1995, Franzen et al. 2005c).

---

<sup>1</sup> Schwankungen dieser Zahlen innerhalb einer Zelllinie erklären sich durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten (3.1, S. 36)

#### 4.1.2 Bedeutung der Sporenphagozytose für die Zellinfektion

Neben dem bekannten aktiven Invasionsmodell, bei dem das polare Filament die Zellmembran der Wirtszelle durchbohrt und das Sporoplasma direkt in das Zytoplasma injiziert wird, werden zunehmend Vermutungen über alternative Infektionsmechanismen geäußert. Gestützt auf die Beobachtung phagozytierter Sporen favorisieren Franzen (2004) und Couzin et al. (2000) eine phagozytoseinduzierte Germination der Spore. Dabei könnte theoretisch eine Ansäuerung im phagosomalen Kompartiment als Auslöser für die Aktivierung des Expulsionsapparates wirken (Undeen 1990, Pleshinger und Weidner 1985). Das Sporoplasma könnte so über das polare Filament dem Phagosom entfliehen und sich als Meront im Zytoplasma etablieren. Die leere Spore verbliebe im Phagosom.

Unsere Untersuchungen können diesen bislang hypothetischen Mechanismus zwar nicht ausschließen, der Vergleich von Phagozytoseraten zu Infektionsraten legt aber nahe, dass die Relevanz dieser Infektionstheorie für professionelle Phagozyten und nichtprofessionelle Phagozyten differiert (Rabinovitch 1995). Da aus jeder Spore nur ein Sporoplasma freigesetzt werden kann und somit nur eine Infektionsvakuole gebildet wird, müsste nach erwähnter Theorie ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Zahl phagozytierter Sporen und der Anzahl der Infektionsmeronten bestehen. In HFF konnten wir jedoch zeigen, dass das Verhältnis zwischen etablierten Infektionen und phagozytierten Sporen drei bis vier zu eins ist. Selbst wenn aus jeder phagozytierten Spore eine Infektion resultieren sollte, wäre dieser Mechanismus nur für einen geringen Anteil der gesamten Infektionen in nichtprofessionellen Phagozyten verantwortlich.

Diese Erklärung würde auch mit den Erkenntnissen von Leitch et al. (2005) übereinstimmen. Danach steht Sporenphagozytose in differenzierten Enterozyten nicht in signifikantem Zusammenhang mit erfolgreicher *in-vitro*-Infektion durch *Encephalitozoon intestinale*.

Anders verhält es sich möglicherweise bei den Knochenmarksmakrophagen: Hier steht einer geringen Infektionsrate eine mehrfach höhere Phagozytoserate gegenüber. Im Vergleich mit Fibroblasten lassen sich Makrophagen schlechter infizieren. Diese höhere Infektionsresistenz könnte durch alternative Infektionswege seitens des Erregers überwunden werden. Verbunden mit der höheren Phagozytoseaktivität könnte dies bedeuten, dass durch sie die Spore in die Wirtszelle gelangt, wo die ausgelöste Germination dann ein Entweichen des Sporoplasmas aus dem Phagosom ermöglicht. Couzin et al. (2000) postulierten diesen Weg auch als wesentlich für die Infektion permanenter nichtprofessionell phagozytischer Zelllinien. Jedoch beruhten ihre Infektionsraten auf Auswertungen mittels polyklonaler Seren, bei deren Verwendung die Differenzierbarkeit zwischen phagozytierter Spore und junger Infektionsvakuole schwierig ist.



Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sporenphagozytose für die Etablierung einer Infektion bei Fibroblasten nachrangig zu sein scheint, während bei professionellen Phagozyten die Sporenphagozytose eine Rolle für die Infektionsetablierung spielen könnte (Franzen et al. 2005b). Unabhängig von der Phagozytosediskussion wurde ein Zusammenhang zwischen Infektion und Adhäsion der Sporen an der Wirtzellmembran nichtprofessioneller Phagozyten erkannt. Sowohl für *Encephalitozoon intestinale* als auch für *Encephalitozoon cuniculi* konnte gezeigt werden, dass kationenverstärkte Interaktionen der Spore mit Glykosaminoglykanen der Wirtszelle zu höheren Infektionsraten führten (Southern et al. 2006). Eine Hemmung der Adhäsion bewirkte eine verminderte Infektiosität (Hayman et al. 2005). Welche Sporenwandproteine seitens der *Encephalitozoon*-Spezies hierfür entscheidend sind, konnte bislang noch nicht geklärt werden. In Frage käme hierfür beispielsweise das SWP1-Protein, für das entsprechende Domänen beschrieben wurden (Bohne et al. 2000, Méténier und Vivarès 2001).

## **4.2. Etablierung der Infektion unter Bildung der parasitophoren Vakuole**

### **4.2.1 Die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* und endophagosomale Kompartimente**

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* weder zu frühen noch zu späteren Infektionszeitpunkten Teil des endosomalen oder lysosomalen Vesikelnetzwerks ist, da zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Kolokalisation der parasitophoren Vakuole mit endophagosomalen Markerproteinen (TfR, EEA1, LAMP1) oder Calnexin nachweisbar war. Diese Beobachtung war unabhängig vom Wirtszelltyp (primäre und permanente nichtprofessionelle und professionelle Phagozyten). Auch bestand kein Bezug der parasitophoren Vakuole zum Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Netzwerk.

Zusätzliche Kolokalisationsstudien der parasitophoren Vakuole mit Zymosanpartikeln blieben ebenfalls negativ. Damit bestätigt sich, dass die parasitophore Vakuole nicht mit endozytotischen Vesikeln fusioniert oder im Sinne einer Kiss-and-Run-Interaktion Inhaltsstoffe austauscht. Zu analogen Ergebnissen kam Weidner 1975 bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung Ferritin-markierter Vesikel in mit *E.cuniculi* infizierten Makrophagen. Bezüglich des Fusionsverhaltens ähnelt die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* stark der parasitophoren Vakuole von *Toxoplasma gondii*, die auch weder mit Lysosomen fusioniert (Jones und Hirsch 1972), noch endophagosomale Transmembranproteine aufweist (Mordue und Sibley 1997).

Ergänzend wurde mittels Acridine-Orange-Vitalfärbungen dargestellt, dass in der parasitophoren Vakuole keine Ansäuerung stattfindet. Die dazu notwendige Akquirierung der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase ginge in normalen Phagosomen mit endosomalen und lysosomalen Fusionen einher. Diese

Ergebnisse decken sich mit denen von Leitch et al. (1995), die die Wasserstoffionenkonzentration in der parasitophoren Vakuole von *Encephalitozoon hellem* analysierten und zu dem Schluss kamen, dass diese sich nicht von der des umgebenden Wirtszellzytoplasmas unterscheidet.

Somit scheint bei aktiver Infektion von *E.cuniculi* sowohl eine Phagosomenbildung als auch eine intraphagosomale Ansäuerung auszubleiben und das intrazelluläre Überleben der Mikrosporidien zu gewährleisten.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Einwirkung wirksame Antiinfektiva keinen Einfluss auf das Fusionsverhalten der parasitophoren Vakuole in nichtprofessionellen Phagozyten hatten. Es kam weder unter wirksamen Konzentrationen von Albendazol noch von Fumagillin (Didier 1997) zu Kollokationen der parasitophoren Vakuole von *E.cuniculi* mit lysosomalen Markerproteinen. Dabei waren jeddoch die Größe der parasitophoren Vakuole und die Zahl der in ihr enthaltenen Meronten deutlich geringer als in unbehandelten Kontrollansätzen. Somit scheint die Hemmung der Replikation von *E.cuniculi* keinen Einfluss auf die Fusionsinkompetenz dieser Mikrosporidienart zu haben.

Das Fusionsverhalten der parasitophoren Vakuolenmembran könnte unmittelbar bei Eintritt in die Wirtszelle erworben sein, analog zu beschriebenen Assoziationen mit Wirtszellorganellen (Canning und Hollister 1991). Untersuchungen der Mitochondrienassoziation mit der parasitophoren Vakuolenmembran ergaben eine stabile Anordnung direkt nach Etablierung der Infektion (Scanlon et al. 2004). Sobald die Mitochondrien mit der parasitophoren Vakuole in Kontakt getreten waren, war der Erhalt dieser Assoziation nicht abhängig von funktionsfähigen mikrotubulären Zytoskelettelementen. Hier zeigen sich weitere Parallelitäten zu *Toxoplasma gondii* (Sinai und Joiner 2001, Sinai et al. 1997).

#### 4.2.2 Herkunft der parasitophoren Vakuolenmembran

Für die verbreitete Annahme, die parasitophore Vakuolenmembran stamme von der Wirtszelle, existieren bisher keine direkten Beweise (Vávra und Larsson 1999). Die meisten Autoren (Bigliardi und Sacchi 2001, Cali und Takvorian 1999) verweisen hier auf elektronenmikroskopische Untersuchungen, die von Weidner 1972 und 1975 u.a. mit *E.cuniculi* an murinen Makrophagen durchgeführt wurden. Weidner markierte zelluläre Membranen mit eisenpartikelgekoppeltem Concanavalin A (ConA)<sup>2</sup>. In den infizierten Peritonealmakrophagen konnte ConA an der

---

<sup>2</sup> Concanavalin A ist ein Lektin mit Bindungsspezifitäten für mannose- und glucosehaltige Glykoproteine (Becker et al. 1971, Virtanen und Wartiovaara 1976, Mandal und Brewer 1993). Rezeptoren für ConA finden sich auf der Zytoplasmamembran und je nach Zelltyp auf unterschiedlichen Endomembranen, darunter Kernmembranen und rauhes Endoplasmatisches Retikulum (Virtanen und Wartiovaara 1976).

parasitophoren Vakuolenmembran fortgeschrittener Infektionen, an intravakuolären Vesikeln und an der Oberfläche der Wirtsplasmamembran nachgewiesen werden. Andere intrazelluläre Membranen oder intravakuoläre Meronten oder Sporonten wurden durch ConA nicht markiert. Weidner schloss daraus, dass die Membran der parasitophoren Vakuole von der Wirtszelle stammen müsse und durch Vesikelfusion wachse.

In vorangegangenen Versuchen mit *Ameson michaelis* (früher *Nosema*) beobachtete er auf polaren Filamenten ebenfalls ConA-Markierungen, die sich in die Ankerplatte der Spore fortsetzten (Weidner 1972). Außerdem dokumentierte er in anderen Ansätzen bei der Inokulation des Sporoplasmas in leukämische EL4-Zellen eine Einstülpung der Zytoplasmamembran um das ins Zellinnere gerichtete polare Filament. Doch ließ sich dieser Versuch mit *E.cuniculi* damals nicht wiederholen und schien wohl wegen sonst sehr verschiedener intrazellulärer Entwicklungsstrategien der beiden Mikrosporidienarten für die Beurteilung der parasitophoren Vakuolenmembran von *E.cuniculi* unbedeutend.

Da Glykoproteine jedoch grundsätzlich auch im Bereich des anterioren Sporenpols von *E.cuniculi* vorhanden sind (Vávra und Larsson 1999) und zumindest an der Ausbildung der Sporoplasamembran die Membranenstapel des benachbarten Polaroplasten beteiligt sind (Weidner et al. 1984), reicht die relativ unspezifische Markierung mit ConA eigentlich nicht aus, um die postulierte Wirtszellherkunft der parasitophoren Vakuolenmembran zu belegen.

Basierend auf elektronenmikroskopischen Beobachtungen wurde für die Wirtszellinvasion durch *Encephalitozoon intestinale* ein alternatives Modell vorgestellt. Demnach würde das Sporoplasma nicht direkt injiziert, sondern durch einen phagozytotischen Prozess nach extrazellulärer Germination internalisiert (Magaud et al. 1997, Foucault und Drancourt 2000).

Neuere Analysen des polaren Filaments und seines Hauptbestandteils, des Polar Tube Proteins PTP1 (Keohane et al. 1998), sprechen für eine posttranslationale Glykosylierung dieses in allen Mikrosporidien vorhandenen Proteins. Wie in Weidners Concanavalin-A-Versuchen (1972) an *Ameson michaelis* erstmals beobachtet, bindet ConA an diese mannosylierten Filamentproteine unterschiedlichster Mikrosporidienspezies, einschließlich *E.cuniculi* (Xu et al. 2004). Außerdem erhält das polare Filament durch die Glykosylierung die Fähigkeit über bislang unbekannte mannosebindende Wirtszellmoleküle an die Wirtszellmembran anzuheften. Für *Encephalitozoon hellem* bedeutete eine Hemmung oder Verstärkung dieser Interaktion eine gleichsinnig veränderte Infektionsrate (Xu et al. 2003). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine induzierte Phagozytose des distalen polaren Filamentteils und Austritt des Sporoplasmas in die so präformierte Einbuchtung. Damit könnte die parasitophore Vakuolenmembran tatsächlich von der Oberfläche der Wirtszelle stammen. Sollte sich dieser Aufnahmemechanismus bewahrheiten, müssten die

typischen phagosomalen Markerproteine jedoch sehr schnell von der sich entwickelnden parasitophoren Vakuolenmembran entfernt werden. Denn bereits nach einer Infektionsdauer von nur einer Minute waren weder Transferrinrezeptor noch EEA1 auf den in dieser Arbeit untersuchten parasitophoren Vakuolen nachweisbar.

Für *Encephalitozoon intestinalis* zeigten Foucault und Drancourt (2000) eine Aktinabhängigkeit der erfolgreichen Etablierung einer Infektion. Diese Studie wurde von einigen Autoren als Beleg dafür gewertet, dass Sporenphagozytose ein relevanter Infektionsmechanismus wäre (Franzen 2004). Leitch et al. widerlegten diese Theorie jedoch für nichtprofessionelle Phagozyten (2005). Auch unsere eigenen Daten deuten nicht auf eine signifikante Rolle der Sporenphagozytose von *E. cuniculi* in primären Fibroblasten hin.

Schottelius et al. (2000) beobachteten mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen an der Spitze des polaren Filaments eine conoide Struktur. Schon Weidner verwies auf unterschiedliches Markierungsverhalten der *Encephalitozoon*-Filamentspitze durch Latexpartikel gegenüber dem restlichen Filament (1982).

Eine Neuinterpretation der Aktinanalysen von Foucault und Drancourt (2000) bietet zwei andere Erklärungen. Zum einen könnte wie oben geschildert aktinvermittelte Phagozytose für die Aufnahme des Sporoplasmas wichtig sein. Zum anderen könnte die bei Foucault und Drancourt geschilderte Infektionsreduktion durch zytoskeletthemmende Substanzen auch auf eine Hemmung aktiver Invasionsanstrengungen des jungen Meronten beim Austritt des Sporoplasmas aus dem polaren Filament beruhen. Leitch et al. konnten für *Encephalitozoon hellem* in Germinationsstudien bereits 1993 eine Inhibition der Expulsion des polaren Filaments durch zytoskelettbeeinflussende Substanzen nachweisen (Leitch et al. 1993 a und b). In der Tat wurde in allen Entwicklungsstadien von *Encephalitozoon cuniculi* und *Encephalitozoon hellem* Aktin als Organisationsstruktur nachgewiesen (Bigliardi et al. 1999).

Der Ursprung der parasitophoren Vakuolenmembran bleibt weiter unklar. Wenngleich auch einiges für eine Wirtszellherkunft spricht, konnte diese bisher nicht bewiesen werden. Die zweite Möglichkeit, dass die Membran bereits in der infektiösen Spore produziert und dann mit dem Sporoplasma injiziert wird, sollte in der Gesamtbetrachtung nicht vernachlässigt werden.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt neben der primären Ausbildung der parasitophoren Vakuolenmembran in der jungen Infektion ist auch ihr Erhalt und die Vergrößerung mit fortschreitender Volumenzunahme der parasitophoren Vakuole. Woher stammt das Membranmaterial, um das die PVM erweitert wird? Sollte dieses von der Wirtszelle stammen, kämen dafür z.B. membranhaltige Organellen in Frage. Wie von uns gezeigt werden konnte, sind in der parasitophoren Vakuolenmembran keine Proteine nachweisbar, die für eine Verbindung mit

dem endophagosomalen System oder dem Endoplasmatischen Retikulum sprächen.

Die parasitophore Vakuole von *E.cuniculi* ist umgeben von stabil assoziierten Mitochondrien. Für die parasitophore Vakuole von *Toxoplasma gondii* wurde ein Membranzufluss von angelagerten Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum beschrieben (Charron und Sibley 2004). Auch *Chlamydophila psittaci* akquiriert Lipide über eine Assoziation mit Mitochondrien (Matsumoto et al. 1991). Inwiefern dieses Modell auf *E.cuniculi* anzuwenden wäre, bedarf noch eingehender Analysen.

Infektionen mit *E.cuniculi* führen zu ausgeprägten Beeinflussungen des Zellzyklus der betroffenen Wirtszelle (Scanlon et al. 2000) und der Apoptoseregulierung (del Aguila et al. 2006). Wirtszellmitochondrien dienen den sich entwickelnden Mikrosporidien innerhalb der parasitophoren Vakuole wahrscheinlich als ATP-Lieferanten (Méténier und Vivarès 2001, Katinka et al. 2001, Weiss und Vossbrink 1999). Insofern wäre die zusätzliche Nutzung mitochondrialer Bestandteile für den Einbau in die parasitophore Vakuolenmembran durchaus nachvollziehbar.

Das Endoplasmatische Retikulum scheidet als Membranlieferant für *E.cuniculi* nahezu aus. Weder befand sich in unseren Kolokalisationsexperimenten Calnexin in der Nähe der parasitophoren Vakuolenmembran, noch wurde in ultrastrukturellen Studien ein Bezug zwischen ER und PVM gesehen (Cali und Takvorian 1999).

Weidner (1975) und Bohne et al. (2000) verwiesen in elektronenmikroskopischen Studien auf vesikulotubuläre Strukturen im Inneren der parasitophoren Vakuole. Auch diese könnten in der Biogenese der parasitophoren Vakuolenmembran eine Rolle spielen. Ob es sich bei ihnen um internalisierte Vesikel aus dem Wirtszellzytoplasma oder um von Meronten und Sporonten gebildete Strukturen handelt, ist ungewiss.

Auffällig bleibt die Anordnung der Merontenstadien an der parasitophoren Vakuolenmembran, während im Zentrum der parasitophoren Vakuole eine Weiterentwicklung in Sporonten und Sporoblasten stattfindet.

#### 4.2.3 Zytoskelett der Wirtszelle

Der Einsatz einfacher Immunfluoreszenzfärbungen zur Untersuchung des Zytoskeletts der Wirtszelle stellte sich in den Versuchen dieser Arbeit als unzureichend heraus. Einerseits würde man bei einem phagosomalen Ursprung der parasitophoren Vakuole zwar eine Aktinbeteiligung erwarten (Alberts et al. 2004), andererseits erschwert das Vorhandensein eukaryonter Zytoskelettbestandteile innerhalb des Erregers (Edlind et al. 1996, Bigliardi et al. 1999) und auf der Sporoplasmamembran (Weidner 2000) die Auswertung von Kolokalisationsexperimenten.

In dieser Arbeit konnte hinsichtlich der Infektionsrelevanz von Tubulin keine Aussage getroffen werden.

Leitch et al. (1999) spekulierten über eine Mikrotubulirestrukturierung um die ältere parasitophore Vakuole, die im Zusammenhang mit Mitochondrienassoziation stehen sollte. Jedoch konnten Scanlon et al. (2004) beweisen, dass für die Aufrechterhaltung der etablierten Organellenanheftung keine aktiven mikrotubulivermittelten Prozesse notwendig sind.

Im Gegensatz zu der unklaren Bedeutung von Tubulin zeigte sich in der Umgebung der parasitophoren Vakuolen weder eine Aktinkondensation noch eine Änderung der Aktinorganisation, so dass eine Beeinflussung der Aktinfilamente der Wirtszelle durch die Infektion mit *E.cuniculi* nicht anzunehmen ist. Zu gleichen Ergebnissen kamen Leitch et al. (1999) für alle humanpathogenen *Encephalitozoon spp.* bei Infektionen in nichtprofessionell phagozytierenden Zellen.

#### 4.3 *E.cuniculi* im Vergleich mit anderen Pathogenen

Intrazelluläre Erreger haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um in die Wirtszelle zu gelangen. Große (5-10 µm) eukaryontische Erreger bedienen sich hierbei ungewöhnlich komplexer Mechanismen (Sibley und Andrews 2000). Intrazellulär wird das Überleben oft dadurch gesichert, dass die Erreger sich in Vakuolen vermehren, die oft als parasitophore Vakuolen bezeichnet werden. Die Natur dieser parasitophoren Vakuolen ist dabei ausgesprochen heterogen (Hackstadt 2000, Méresse et al. 1999, Haas 2007).

Wie für Mikrosporidien bereits in der Einleitung erläutert, können intrazelluläre Strategien sogar innerhalb einer Gattung deutlich variieren. Sowohl *Encephalitozoon intestinale* als auch *Encephalitozoon cuniculi* vermehren sich in einer parasitophoren Vakuolen, doch nur *E.intestinale* umgibt sich zusätzlich mit sporophorem Vesikelmateriale. Und *Encephalitozoon hellem* befindet sich intrazellulär in enger Beziehung zu Nucleus und Endoplasmatischem Retikulum der Wirtszelle, während die parasitophore Vakuolenmembran von *E.cuniculi* mit Mitochondrien assoziiert ist (Cali und Takvorian 1999, Vavrà und Larsson 1999).

Um die Stellung von *E.cuniculi* inmitten diverser intrazellulärer Pathogene zu bestimmen, sollen zunächst die verschiedenen intrazellulären Überlebensstrategien einiger Erreger vergleichend betrachtet werden.

Viele bakterielle Erreger lassen sich phagozytotisch von der Wirtszelle aufnehmen, um anschließend dem phagosomalen Abbau zu entgehen. *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*,

*Francisella tularensis* und *Rickettsia spp.* verlassen das gebildete Phagosom und liegen frei im Zytoplasma vor, wo sie direkt zytoplasmatische Nährstoffe vorfinden (Clemens et al. 2004, Haas 2007). *Trypanosoma cruzi* beeinflusst als Eukaryont exozytotische Lysosomen, um in einer Vakuole lysosomalen Ursprungs in die Zelle zu gelangen.<sup>3</sup> Nach Ablauf einer halben Stunde führen sezernierte säureabhängige Hämolytine des Erregers zu einer Ruptur der Vakuole und zur Evasion in das Zytoplasma. Das herrschende saure Milieu löst vorher in *Trypanosoma* die Differenzierung in amastigote Stadien aus und ist damit essenziell für die intrazelluläre Weiterentwicklung (Sibley und Andrews 2000, Andrade und Andrews 2004). Ähnlich stellt man sich die Germinationsaktivierung phagozytierter Sporen in mit *E.cuniculi* infizierten professionellen Phagozyten vor (Franzen 2004).

Einige *Mykobacterium spp.* und *Rhodococcus equi* unterbrechen den phagosomalen Reifungsprozess direkt nach ihrer Aufnahme und leben in Kompartimenten, die alle Charakteristika früher Endosomen besitzen, die aber nicht mit späten Endosomen oder Lysosomen fusionieren (Bourhaial 2007, Toyooka et al. 2005). Der Pilz *Histoplasma capsulatum* lebt in Phagosomen, verhindert aber deren Ansäuerung (Eissenberg et al. 1993). Andere intrazelluläre Pathogene verlangsamen die Reifung ihres Phagosoms (*Leishmania donovani*) oder fusionieren zusätzlich mit Bestandteilen des sekretorischen Systems: *Chlamydiaceae* präferieren Golgi-Vesikel (Hackstadt 2000, Al-Younes et al. 1999), *Brucella abortus* und *Legionella pneumophila* entwickeln sich in Vakuolen mit Merkmalen des Endoplasmatischen Retikulums (Pizarro-Cerdá et al. 1998, Swanson MS und Isberg 1995). Der fehlende Nachweis entsprechender Markerproteine auf der parasitophoren Vakuolenmembran von *E.cuniculi* schließt hier eine Analogie aus.

*Afipia felis* infiziert die Wirtszelle durch induzierte Makropinozytose (Schneider et al. 2007) und bildet Vakuolen, die frei von entsprechenden Markerproteinen sind (Lührmann et al. 2001). *Bartonella henselae* entscheidet sich je nach Befall nichtprofessioneller Phagozyten oder professioneller Phagozyten für wechselnde intrazelluläre Strategien. In Endothelzellen zeigen die parasitophoren Vakuolen kein Fusionsverhalten, in Makrophagen hingegen werden sie als spätendosomal charakterisiert (Kyme et al. 2005).

Die Wahl der Wirtszelle spielt auch für die aktinvermittelte Phagozytose von *Aspergillus-fumigatus*-Conidien eine wichtige Rolle. Während Makrophagen diese abtöten, gelingt es dem Pilz in Lungenepithelzellen in lysosomalen Kompartimenten zu überleben und auszusprossen

---

<sup>3</sup> Woolsey et al. (2003) beschrieben einen alternativen Eintrittsmechanismus, der letztendlich unter Umgehung der frühen Endosomen auch zu einer Fusion mit Lysosomen führt.

(Wasylnka und Moore 2003, Ibrahim-Granet et al. 2003, Wasylnka und Moore 2002).

Die Vermeidung endophagosomaler Kompartimente ist also nicht zwangsläufig eine Bedingung für intrazelluläres Überleben. *Cryptococcus neoformans*, *Leishmania mexicana*, *Coxiella burnetii* und *Salmonella spp.* sind Beispiele der erfolgreichen Anpassung an die phagosomale Umgebung (Levitz et al. 1999, Garcia-del Portillo und Finlay 1995). In Mikroinjektionsstudien zeigte sich *Salmonella* sogar unfähig, sich frei im Zytoplasma von Makrophagen zu vermehren und bedurfte des phagosomalen Schutzes vor zytoplasmatischen antibakteriellen Peptiden (Haas 2007).

Die größte Gemeinsamkeit der intrazellulären Lebensweise von *E.cuniculi* findet sich mit *Toxoplasma gondii*, der ebenso wie *E.cuniculi* ein opportunistischer Erreger abwehrgeschwächter Individuen ist (Groß 2006). Obwohl der Invasionsmechanismus von *T.gondii* völlig anders verläuft als in *E.cuniculi*, sind die Eigenschaften der entstehenden parasitophoren Vakuole erstaunlich ähnlich. In den Membranen beider Vakuolen lassen sich einige Minuten nach ihrer Entstehung keine Wirtszellproteine nachweisen (Mordue et al. 1999a und b, Charron und Sibley 2004). Für *T.gondii* konnte die Sekretion zahlreicher parasitärer Proteine festgestellt werden, die seine parasitophore Vakuolenmembran erheblich modifizieren (Sibley et al. 1986, Sinai und Joiner 2001). Intrazellulär assoziiert sich die parasitophore Vakuole in beiden Pathogenen stabil mit Mitochondrien (Sinai et al. 1997, Sinai und Joiner 2001), fusioniert nicht mit endosomalen oder lysosomalen Vesikeln, und es findet keine Ansäuerung statt (Jones und Hirsch 1972, Sibley et al. 1985).

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Herkunft und die infektiobiologische Bedeutung der parasitophoren Vakuolenmembran zu verstehen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die intrazelluläre Entwicklung der Mikrosporidienspezies *Encephalitozoon cuniculi* erfolgt innerhalb einer parasitophoren Vakuole unklaren Ursprungs. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Membran der parasitophoren Vakuole keine Assoziation zu endophagosomalen Kompartimenten der Wirtszellen aufweist. Bereits wenige Minuten nach Infektion primärer Fibroblasten und primärer professioneller Phagozyten zeigte sich weder ein Bezug der parasitophoren Vakuole zu Plasmamembran oder frühen endosomalen Markern (Transferrinrezeptor und Early Endosome Antigen1), zu lysosomalen Markern (Lysosomal Assoziiertes Membranprotein1 und Zymosan), noch zu einem Marker des Endoplasmatischen Retikulums (Calnexin). Eine Ansäuerung der parasitophoren Vakuole konnte mit Vitalfärbungen durch Acridine Orange ausgeschlossen werden.

Die Fusionsinkompetenz der parasitophoren Vakuole von *E.cuniculi* bleibt auch unter Einfluss der wirksamen Antiinfektiva Albendazol und Fumagillin erhalten.

Somit haben Mikrosporidien eine effektive Strategie entwickelt, um intrazellulären Abwehrmechanismen zu entgehen und sich intrazellulär differenzieren zu können. Im Gegensatz zum aktiven Invasionsmechanismus findet eine Sporenphagozytose in primären nichtprofessionellen Phagozyten zwar statt, scheint jedoch kein quantitativ bedeutender Infektionsmechanismus zu sein.

## 6 GLOSSAR

Die vorgestellten Definitionen der Entwicklungsstadien gelten in dieser Adaptation ausschließlich für das Mikrosporidium *Encephalitozoon cuniculi* (nach Cali und Takvorian 1999).

*Meront* Primäre intrazelluläre Form der proliferativen Phase (Merogonie). Meronten sind gekennzeichnet durch einen großen runden Nucleus und einen schmalen lichtdurchlässigen Zytoplasmasaum. Wegen gegenüber der Karyokinese verzögerter Zytokinese entsteht u.U. ein Bild kettenförmiger Anordnung. Nach Eintritt in die Phase der Sporogonie verharren die Zellen in unmittelbarer Nähe zu der parasitophoren Vakuolenmembran im Merontenstadium, während im Lumen der parasitophoren Vakuole in vitro nach frühestens 24 Stunden eine Umwandlung in Sporonten stattfindet (Bohne et al. 2000).

*Sporont* Zellform, mit der die Metamorphose zur Spore beginnt. Abgrenzbarkeit gegen Meronten durch Zunahme der Lichtdichte im Zytoplasma (Anhäufung von Zellorganellen) sowie durch initial punktförmige Akkumulation elektronendichten Materials auf der Oberfläche und damit Verdickung des Plasmalemmas. Auftreten spezifischer Sporenwandproteine (SWP1 u.a.). Sporonten sind noch teilungsfähig, teilen sich jedoch nur noch einmal in zwei resultierende Sporoblasten.

*Sporoblast* Prämatüre Zelle. Reift unter Schrumpfung und Kondensierung des Zytoplasmainshalts direkt zur Spore. Im Sporoblasten bildet sich der Komplex um des Polare Filament – der Infektionsapparat. Die Form wird zunehmend oval und die äußeren Schichten werden undurchlässiger.

*Spore* Infektiöse Form des Erregers, die nach Ruptur der Wirtszelle frei wird und in der Umwelt bis zur erneuten Inokulation in einen Wirtsorganismus den äußeren widrigen Einflüssen trotzt. Dieses gelingt ihr durch eine dicke Schutzwand (Exospore und Endospore), die sich mikroskopisch stark refraktär verhält.

*Transferrinrezeptor* Äußeres Zellmembranprotein, das das Serumtransportprotein Transferrin bindet und die Eisenaufnahme der Zelle reguliert. Wird endozytotisch internalisiert und zirkuliert zwischen Sortierendem Endosom, Recycling-Endosom und Zellmembran (Alberts et al. 2004).

*Early Endosome Antigen 1* Findet sich auf Membranen Sortierender Endosomen (Früher

Endosomen). Vermittelt als Rab5 GTPasen-Effektorprotein die Fusion Früher Endosomen mit Phagosomen. Kolokalisiert entsprechend mit Rab5 und Transferrinrezeptor (Christoforidis et al. 1999, Amer und Swanson 2002).

*Lysosomal assoziiertes Membranprotein 1* Membranständiges Glykoprotein Später Endosomen und v.a. Lysosomen. Wahrscheinlich relevante Funktion für Fusion der Phagosomen mit Lysosomen. Bei weiter intrazellulärer Verbreitung noch eher unklare Bedeutung für Prozesse der Zelladhäsion u.a. (Huynh et al. 2007, Tjelle et al. 2000)

*Calnexin* Integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums. Wirkt mit vornehmlich luminaler Ausrichtung als Chaperon für sekretorische Glykoproteine und MHC1-Moleküle (Williams 2006, Bergeron et al. 1994).

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P:** Molecular Biology of the Cell. 4. Auflage; dt. Übers. hrsg. v. Jaenicke L: Molekularbiologie der Zelle; Wiley-VCH, Weinheim 2004
- Al-Younes HM, Rudel T, Meyer TF (1999):** Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell Microbiol* 1(3), 237-247
- Amer AO, Swanson MS (2002):** A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* 5, 56-61
- Andrade LO, Andrews NW (2004):** Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* 200(9), 1135-1143
- Barker RJ (1975):** Ultrastructural observations on *Encephalitozoon cuniculi* from mouse peritoneal macrophages. *Folia Parasitol (Prag)* 22, 1-9
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauquet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983):** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599), 868-871
- Becker JW, Reeke GN, Edelman GM (1971):** Location of the saccharide binding site of Concanavalin A. *J Biol Chem* 246(19), 6123-6125
- Bergeron JJM, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB (1994):** Calnexin, a membrane bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 19, 124-128
- Bienz KA:** Virusisolierung durch Anzüchten; in: Medizinische Mikrobiologie; hrsg. v. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, 10. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York 2001, S.424
- Bigliardi E, Sacchi L (2001):** Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect* 3, 373-379
- Bigliardi E, Selmi MG, Lupetti P, Corona S, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L (1996):** Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J Eukaryot Microbiol* 43, 181-186
- Bigliardi E, Riparbelli MG, Selmi MG, Bini L, Liberatori S, Pallini V, Bernuzzi A, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L (1999):** Evidence of actin in the cytoskeleton of microsporidia. *J Eukaryot Microbiol* 46, 410-415
- Bohne W, Göttingen (2004):** direkte Kommunikation nicht veröffentlichter Daten
- Bohne W, Ferguson DJ, Kohler K, Gross U (2000):** Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun* 68, 2268 – 2275

- Braunfuchsová P, Salát J, Kopecký J** (2001): CD8+-T-lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int J Parasitol* 31, 681-686
- Braunfuchsová P, Salát J, Kopecký J** (2002): Comparison of the significance of CD4+- and CD8+-T-lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Parasitol* 88(4), 797-799
- Bryan RT, Schwartz DA**: Epidemiology of microsporidiosis; in: *The Microsporidia and Microsporidiosis*; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.502-516
- Cali A, Owen R**: Microsporidiosis; in: *The laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice*; hrsg. v. Balows A; Springer Verlag, New York 1988, S. 929-950
- Cali A, Takvorian PM**: Developmental morphology and life cycles of the microsporidia; in: *The Microsporidia and Microsporidiosis*; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.85-128
- Cali A, Kotler DP, Orenstein JM** (1993): *Septata intestinalis* N.G., N.Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 40, 101-112
- Canning EU**: Microsporidia; in: *Parasitic protozoa, Volume 6*; hrsg. v. Kreier JP, 2. Auflage; Academic Press, New York 1993, 299 ff
- Canning EU, Lom J**: *The microsporidia of vertebrates*; Academic Press, New York 1986
- Canning EU, Hollister WS** (1991): In vitro and in vivo investigations of human microsporidia. *J Protozool* 38(6), 631-635
- Carr A, Marriott D, Field A, Vasak E, Cooper DA** (1998): Treatment of *HIV-1*-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet* 351, 256-261
- Chacin-Bonilla L, Panunzio A, Monsalve-Castillo FM, Parra-Cepeda IE, Martinez R** (2006): Microsporidiosis in Venezuela: Prevalence of intestinal microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of *Human Immunodeficiency Virus*-infected patients from Zulia State. *Am J Trop Med Hyg* 74(3), 482-486
- Chan CM, Theng JT, Li L, Tan DT** (2003): Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series. *Ophthalmology* 110, 1420-1425
- Charron AJ, Sibley LD** (2004): Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 5, 855-867
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M** (1999): The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397(6720), 621-625
- Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA** (2004): Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the

cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* 72(6), 3204-3217

- Conteas CN, George O, Berlin W, Speck CE, Pandhumas SS, Lariviere MJ, Fu C** (1998): Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in acquired immunodeficiency syndrome patients by immune status and anti-*human immunodeficiency virus* therapy. *Am J Trop Med Hyg* 58(5), 555-558
- Couzinet S, Cejas E, Schittny J, Deplazes P, Weber R, Zimmerli S** (2000): Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 68(12), 6939-6945
- Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD** (1979): An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J Protozool* 26, 260-265
- Del Aguila C, Rueda C, De La Camara C, Fenoy S** (2001): Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol, Suppl*: 75S-78S
- Del Aguila C, Izquierdo F, Granja AG, Hurtado C, Fenoy S, Fresno M, Revilla Y** (2006): *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int J Parasitol* 36, 869-876
- Delfraissy J-F** (Hrsg.): Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH, Recommandations du groupe d'experts – Rapport 2004; Éditions Flammarion, Paris 2004
- Desai SA, Krogstad DL, McCleskey DJ** (1993): A nutrient permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* 362(6421), 643-646
- Desportes I, LeCharpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priolett B, Laverne A, Ravisse P, Modigliani R** (1985): Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* 32, 250-254
- Didier ES** (1995): Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol* 17, 405-412
- Didier ES** (1997): Effects of Albendazole, Fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 41(7), 1541-1546
- Didier ES, Bessinger GT**: Host-parasite relationships in microsporidiosis: Animal models and immunology; in: *The Microsporidia and Microsporidiosis*; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.225-257
- Didier ES, Weiss LM** (2006): Microsporidiosis: current status – Review. *Curr Opin Infect Dis* 19, 485-492
- Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Yee RW, Tio FO, Davis RM, Vossbrinck C, Millichamp N et al.** (1991): Isolation and characterization of a new human microsporidian. *Encephalitozoon hellem* (n.sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J Infect Dis* 163, 617-621

- Didier ES, Vossbrink CR, Baker MD, Rogers LB, Bertucci DC, Shadduck JA** (1995): Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111, 411-421
- Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA** (2000): Microsporidiosis in mammals. *Microb Infect* 2, 709-720
- Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ** (2005a): Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3(3), 419-434
- Didier ES, Bowers L, Stovall ME, Kuebler D, Mittleider D, Brindley PJ, Didier PJ** (2005b): Antimicrosporidial activity of (fluoro)quinolones *in vitro* and *in vivo*. *Folia Parasitol* 52, 173-181
- Didier PJ, Phillips JN, Kuebler DJ, Nasr M, Brindley PJ, Stovall ME, Bowers LC, Didier ES** (2006): Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(6), 2146-2155
- Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, Katiyar SK** (1996): Phylogenetic analysis of  $\beta$ -tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol* 5, 359-367
- Eissenberg LG, Goldman WE, Schlesinger PH** (1993): *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med* 177(6), 1605-1611
- Falke D**: Labormethoden der Virologie; in: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; hrsg. v. Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, 4. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 2001, S.519 f.
- Fishman JA**: Pneumocystis carinii and Parasitic Infections in the Immunocompromised Host; in: Clinical Approach to Infection in the Compromised Host; hrsg. v. Rubin RH, Young LS, 4. Auflage; Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York 2002, S. 306-309
- Foucault C, Drancourt M** (2000): Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-e. *Microb Pathog* 28, 51 – 58
- Franzen C** (2004): Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol* 20(6), 275-279
- Franzen C, Müller A** (2001): Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microb Infect* 3, 389-400
- Franzen C, Hartmann P, Salzberger B** (2005a): Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Exp Parasitol* 109(1), 1-6
- Franzen C, Hosl M, Salzberger B, Hartmann P** (2005b): Uptake of *Encephalitozoon spp.* and *Vittaforma* by different cells. *J Parasitol* 91(4), 745-749
- Franzen C, Müller A, Hartmann P, Salzberger B** (2005c): Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology* 130, 285-292

- Frixione E, Ruiz L, Santillán M, de Vargas LV, Tejero JM, Undeen AH** (1992): Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil Cytoskel* 22, 38-50
- Frixione E, Ruiz L, Cerbon J, Undeen AH** (1997): Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: Conditional inhibition by D2O, ethanol and Hg<sup>2+</sup> suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J Eukaryot Microbiol* 44, 109-116
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al.** (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224(4648), 500-503
- Garcia-del Portillo F, Finlay BB** (1995): Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 129(1), 81-97
- Germot A, Philippe H, Le Guyader H** (1997): Evidence for loss of mitochondria from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol* 87, 159-168
- Ghosh K, Weiss LM** (2006): Microsporidia 2006: IWOP-9. *J Eukaryot Microbiol* 53(S1), S52-S54
- Groß U** (2003): Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol Res* 90, 14-18
- Groß U**: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie – Kurzlehrbuch; 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- Groß U, Weig M, Petry F** (1996): Opportunistische parasitologische Infektionen bei immunsupprimierten Patienten. *Med Welt* 48, 158-168
- Haas A** (2007): The phagosome: compartment with a license to kill - review. *Traffic* 8(4), 311- 330
- Hackstadt T** (2000): Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites – review. *Traffic* 1, 93-99
- Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andrés I, Alonso F, Fenoy S, del Águila C** (2005): First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl Environ Microbiol* 71(6), 3153-3157
- Hayman JR, Southern TR, Nash TE** (2005): Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect Immun* 73, 841-848
- Heesemann J, Laufs R** (1985): Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol* 22, 168-175
- Heitz PU, Komminoth P, Zimmermann D, Schüler G, Böcker W, Denk H**: Untersuchungsmethoden der Pathologie; in: Pathologie; hrsg. v. Böcker W, Denk H, Heitz PU, 2. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München Jena 2001, S. 9-27



- Hiroshi Y, Kobayashi S, Kimura K** (2007): Self-assembly of acridine orange dye at a mica/solution interface: Formation of nanostripe supramolecular architectures. *J Colloid Interface Sci* 307, 272-279
- Hirt RP, Healy D, Vossbrink CR, Canning EU, Embley TM** (1997): Identification of a mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol* 7, 995-998
- Hiruma H, Katakura T, Takenami T, Igawa S, Kanoh M, Fujumura T, Kawakami T** (2007): Vesicle disruption, plasma membrane bleb formation, and acute cell death caused by illumination with blue light in acridine orange-loaded malignant melanoma cells. *J Photochem Photobiol B* 86, 1-8
- Hoën B, May T** (Hrsg.): *E. Pilly – Maladies Infectieuses et Tropicales*; 20. Auflage; Vivactis Plus, Paris 2006, S. 189, 490 f. u. 562
- Höfler H, Müller KM, Noll S, Schaub-Kuhnen S**: *Praxis der Immunhistochemie*; 1. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München Jena 2000
- Horwitz MA** (1984): Phagocytosis of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36(1), 27-33
- Hutin YJ, Sombardier MN, Liguory O** (1998): Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J Infect Dis* 178, 904-907
- Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S** (2007): Lamp proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 26(2), 313-324
- Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latgé JP** (2003): Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* 71(2), 891-903
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ**: *Autoimmunity and transplantation*; in: *Immunobiology – the immune system in health and disease*; 6. Auflage; Garland Science Publishing, New York 2005
- Jones TC, Hirsch JG** (1972): The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 136(5), 1173-1194
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P et al.** (2001): Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450-453
- Keeling PJ** (2001): Parasites go the full monty. *Nature* 414, 401-402
- Keeling PJ, Fast NM** (2002): Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56, 93-116

- Keohane EM, Weiss LM:** The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube; in: *The Microsporidia and Microsporidiosis*; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.196-224
- Keohane EM, Orr GA, Zhang HS, Takvorian PM, Cali A, Tanowitz HB, Wittner M, Weiss LM (1998):** The molecular characterization of the major polar tube gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Mol Biochem Parasitol* 94, 227-236
- Khan IA, Moretto M (1999):** Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67(4), 1887-1893
- Khan IA, Schwartzmann JD, Kasper LH, Moretto M (1999):** CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 162, 6086-6091
- Kodjikian L, Garweg JG, Nguyen M, Schaffner T, Deplazes P, Zimmerli S (2005):** Intraocular microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. *Int J Med Microbiol* 294(8), 529-533
- Koudela B, Kučerová Š, Hudcovic T (1999):** Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol* 46, 171-174
- Kyme PA, Haas A, Schaller M, Peschel A, Iredell J, Kempf VA (2005):** Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae*-containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. *Cell Microbiol* 7, 1019-1034
- Leiro J, Cano E, Ubeira FM, Orallo F, Sanmartín ML (2004):** In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(7), 2497-2501
- Leitch GJ, Visvesvara GS, He Q (1993a):** Inhibition of microsporidian spore germination. *Parasitol Today* 9, 422-424
- Leitch GJ, He Q, Wallace S, Visvesvara GS (1993b):** Inhibition of the spore polar filament extrusion of the microsporidium, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient. *J Eukaryot Microbiol* 40(6), 711-717
- Leitch GJ, Scanlon M, Visvesvara GS, Wallace S (1995):** Calcium and hydrogen ion concentrations in the parasitophorous vacuoles of epithelial cells infected with the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *J Eukaryot Microbiol* 42(5), 445-451
- Leitch GJ, Scanlon M, Shaw A, Visvesvara GS (1999):** Modifications of the cytoskeleton in *Encephalitozoon*-infected cells. *J Eukaryot Microbiol* 46(5), 36S-37S
- Leitch GJ, Ward TL, Shaw AP, Newman G (2005):** Apical spore phagocytosis is not a significant route of infection of differentiated enterocytes by *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect Immun* 73(11), 7697-7704

- Levaditi C, Nicolau S, Schoen R** (1923): L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). C R Soc Biol Paris 89, 984-986
- Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER** (1999): *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. Infect Immun 67(2), 885-890
- Lewis NL, Francis IC, Hawkins GS, Corunen MT** (2003): Bilateral microsporidial keratoconjunctivitis in an immunocompetent non-contact lens wearer. Cornea 22, 374-376
- Lopez-Velez R, Turrientes MC, Garron C, Montilla P, Navajas R, Feney S, del Aguila C** (1999): Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. J Travel Med 6, 223-227
- Lührmann A, Streker K, Schüttfort A, Daniels JJD, Haas A** (2001): *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a nonendocytic compartment. Proc Natl Acad Sc 98(13), 7271-7276
- Magaud A, Achbarou A, Desportes-Livage I** (1997): Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. J Eukaryot Microbiol 44, 81S
- Mandal DK, Brewer CF** (1993): Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. Biochemistry 32(19), 5116-5120
- Mathis A** (2000): Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms – Review. Int J Parasitol 30, 795-804
- Mathis A, Weber R, Deplazes P** (2005): Zoonotic potential of the microsporidia. Clin Microbiol Rev 18(3), 423-445
- Matsumoto A, Bessho H, Uehira K, Suda T** (1991): Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions. J Electron Microsc 40, 356-363
- Méresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel J-P** (1999): Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death – review. Nat Cell Biol 1(Nov), E183-188
- Méténier G, Vivarès CP** (2001): Molecular characteristics and physiology of microsporidia – review. Microb Infect 3, 407-415
- Miksits K, Böttger EC**: Prinzipien der mikrobiologischen Labordiagnose; in: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; hrsg. v. Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, 4. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 2001, S.890-912
- Millot C, Millot J-M, Morjani H, Desplaces A, Manfait M** (1997): Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry. J Histochem Cytochem 45(9), 1255-1264

- Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, Chevret S, De Gouvello A, Gobert JG, Balkan S, Derouin F** (2002): Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *N Engl J Med* 346(25), 1963-1969
- Mordue DG, Sibley LD** (1997): Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol* 159, 4452-4459
- Mordue DG, Hakanson S, Niesman I, Sibley LD** (1999a): *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 92(2), 87-99
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD** (1999b): Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 190(12), 1783-1792
- Moretto M, Casciotti L, Durell B, Khan IA** (2000): Lack of CD4+ T-cells does not affect induction of CD8+ T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 68(11), 6223-6232
- Moretto M, Weiss LM, Khan IA** (2004): Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 172, 4402-4409
- Müller-Taubenberger A, Lupas AN, Li H, Ecke M, Simmeth E, Gerisch G** (2001): Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J* 20, 6772-6782
- Niederhorn JY** (2006): Review – See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 7(4), 354-359
- Orenstein JM, Russo P, Didier ES, Bowers C, Bunin N, Teachey DT** (2005): Fatal pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Ultrastruc Pathol* 29, 269-276
- Petri M** (1969): Studies on *Nosema cuniculi* found in transplantable ascites tumours with a survey of microsporidiosis in mammals. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 204, 1-91
- Peyretailade E, Biderre C, Peyret P, Duffieux F, Méténier G, Gouy M, Michot B, Vivarès CP** (1998): Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res* 26, 3513-3520
- Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, Moreno E, Gorvel JP** (1998): *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66(12), 5711-5724
- Pleshinger J, Weidner D** (1985): The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *J Cell Biol* 100, 1834-1838

- Pozio E, Morales MAG** (2005): The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol* 21(2), 58-63
- Rabinovitch MR** (1995): Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5, 85-87
- Rabodonirina M, Cotte L, Radenne S, Besada E, Trepo C** (2003): Microsporidiosis and transplantation: a retrospective case study of 23 cases. *J Eukaryot Microbiol* 50, Suppl: 583
- Rönnebaumer K, Wagener J, Gross U, Bohne W** (2006): Identification of novel developmentally regulated genes in *Encephalitozoon cuniculi*: An endochitinase, a chitin-synthase, and two subtilisin-like proteases are induced during meront-to-sporont differentiation. *J Eukaryot Microbiol* 53, S74-76
- Roos D, Bot AAM, van Schaik MLJ, De Boer M, Daha MR** (1981): Interaction between human neutrophils and zymosan particles: the role of opsonins and divalent cations. *J Immunol* 126(2), 433-440
- Salát JA, Braunfuchsová P, Kopecký J, Ditrich O** (2002): Role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon intestinalis* infection. *Parasitol Res* 88, 603-608
- Sarfati C, Bourgeois A, Menotti J, Liegeois F, Moyou-Somo R, Delaporte E, Derouin F, Mpoudi Ngole E, Molina JM** (2006): Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in *Human Immunodeficiency Virus*-infected adults in Cameroon: A cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg* 74(1), 162-164
- Scanlon M, Shaw AP, Zhou CJ, Visvesvara GS, Leitch GJ** (2000): Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* 47, 525-531
- Scanlon M, Leitch GJ, Visvesvara GS, Shaw AP** (2004): Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon* microsporidia. *J Eukaryot Microbiol* 51(1), 81-87
- Schneider B, Gross R, Haas A** (2000): Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 68(12), 7039-7048
- Schneider B, Schueller C, Utermohlen O, Haas A** (2007): Lipid microdomain-dependent macropinocytosis determines compartmentation of *Afpia felis*. *Traffic* 8(3), 226-240
- Schottelius J, Schmetz C, Kock NP, Schuler T, Sobottka I, Fleischer B** (2000): Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes Infect* 2, 1401-1406
- Shadduck JA** (1969): *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science* 166, 516-517
- Shadduck JA** (1980): Effect of fumagillin on *in vitro* multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool* 27(2), 202-208

- Sibley LD, Andrews NW** (2000): Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1, 100-106
- Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL** (1985): Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315, 416-419
- Sibley LD, Krahenbuhl JL, Adams GMW, Weidner E** (1986): *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol* 103, 867-874
- Sinai AP, Joiner KA** (2001): The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 154, 95-108
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA** (1997): Association of host cell mitochondria and endoplasmic reticulum with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane – a high affinity interaction. *J Cell Sci* 110, 2117-2128
- Southern TR, Jolly CE, Hayman JR** (2006): Augmentation of microsporidia adherence and host cell infection by divalent cations. *FEMS Microbiol Lett* 260, 143-149
- Swanson J** (1989): Fluorescent labelling of endocytic compartments. *Methods Cell Biol* 29, 137-151
- Swanson MS, Isberg RR** (1995): Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* 63(9), 3609-3620
- Takvorian PM, Cali A** (1994): Enzyme histochemical identification of the golgi apparatus in the microsporidian *Glugea stephani*. *J Eukaryot Microbiol* 41, 63S-64S
- Teachey DT, Russo P, Orenstein JM, Didier ES, Bowers C, Bunin N** (2004): Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation – Fallbericht. *Bone Marrow Transplant* 33(3), 299-302
- Theng J, Chan C, Ling ML, Tan D** (2001): Microsporidial keratokonjunctivitis in a healthy contact lens wearer without *human immunodeficiency virus* infection. *Ophthalmology* 108(5), 976-978
- Thomarat F, Vivarès CP, Gouy M** (2004): Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol* 59, 780-781
- Tjelle TE, Lóvdal T, Berg T** (2000): Phagosome dynamics and function – review. *BioEssays* 22, 255-263
- Toyooka K, Takai S, Kirikae T** (2005): *Rhodococcus equi* can survive in a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. *J Med Microbiol* 54, 1007-1015
- Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, Akiyoshi DE, Tzipori S** (2005): Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the *Human*

*Immunodeficiency Virus*. Am J Trop Med Hyg 73(5), 921-925

- Undeen AH** (1990): A proposed mechanism for the germination of microsporidian (protozoa: microspora) spores. J Theor Biol 142, 223-235
- Undeen AH, Frixione E** (1990): The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. J Protozool 37, 561-567
- Undeen AH, Van der Meer RK** (1994): Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (protista: microspora) spores: a quantitative study. J Eukaryot Microbiol 41, 120-132
- Undeen AH, Van der Meer RK** (1999): Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. J Invertebr Pathol 73(3), 294-302
- Underhill DM** (2003): Macrophage recognition of zymosan particles. J Endotoxin Res 9(3), 176-80
- Van der Meer JWM, Kullberg BJ**: Defects in host defense mechanisms; in: Clinical approach to infection in the compromised host; hrsg. v. Rubin RH, Young LS, 4. Auflage; Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York 2002, S. 5-47
- Vávra J**: Structure of the microsporidia; in: Comparative Pathobiology – Vol.1; hrsg. v. Bulla LA, Cheng TC; Plenum Press, New York 1976, S.1-86
- Vávra J, Larsson JIR**: Structure of the microsporidia; in: The Microsporidia and Microsporidiosis; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.7-84
- Virtanen I, Wartiovaara J** (1976): Lectin receptor sites on rat liver cell nuclear membranes. J Cell Sci 22, 335-344
- Visvesvara GS** (2002): In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. Clin Microb Rev 15(3), 401-413
- Visvesvara GS, Moura H, Leitch GJ, Schwartz DA, Xiao LX** (2005): Public health importance of *Brachiola algerae* (Microsporidia) – an emerging pathogen of humans. Folia Parasitol 52(1-2), 83-94
- Wang F, Yang J, Wu X, Wang X, Feng L, Jia Z, Guo C** (2006): Study on formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange-sodium dodecyl benzene sulfonate-protein system. J Colloid Interface Sci 298, 757-764
- Wasylnka JA, Moore MM** (2002): Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. Infect Immun 70(6), 3156-3163
- Wasylnka JA, Moore MM** (2003): *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. J Cell Sci 116(Pt 8), 1579-87

- Weber R, Schwartz DA, Deplazes P:** Laboratory diagnosis of microsporidiosis; in: The Microsporidia and Microsporidiosis; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S. 315-362
- Weber R, Schwartz DA, Bryan RT:** Microsporidia; in: Principles and practice of infectious diseases; 5. Auflage; hrsg. v. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R; Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia 2000, S. 2920-2933 u.a.
- Weidner E (1972):** Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z Parasitenkd* 40(3), 227-242
- Weidner E (1975):** Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages – parasitophorous vacuole growth and the absence of lysosomal fusion. *Z Parasitenkd* 47, 1-7
- Weidner E (1982):** The microsporidian spore invasion tube. III. tube extrusion and assembly. *J Cell Biol* 93, 976-979
- Weidner E (2000):** Cytoplasmic proteins on the surface of discharged microsporidian sporoplasms. *Biol Bull* 199, 208-209
- Weidner E, Sibley LD (1985):** Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. *J Protozool* 32(2), 311-317
- Weidner E, Byrd W, Scarborough A, Pleshinger J, Sibley D (1984):** Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *J Protozool* 31(2), 195-198
- Weiss LM, Vossbrink CR:** Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia; in: The Microsporidia and Microsporidiosis; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.129-171
- Wichro E, Hölzl D, Krause R, Bertha G, Reinthaler F, Wenisch C (2005):** Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *Am J Trop Med Hyg* 73(2), 285-287
- Williams DB (2006):** Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119(4), 615-623
- Wilson JM (1979):** *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res Vet Sci* 26, 114
- Wittner M:** Historic perspective on the microsporidia: Expanding horizons; in: The Microsporidia and Microsporidiosis; hrsg. v. Wittner M, Weiss LM; American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999, S.1-6
- Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA (2003):** Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of *trypanosome* invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* 116, 3611-3622



- Yoova SL, Subrungruang I, Rangsing R, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Worapong J, Naaglor T, Mungthin M** (2005): Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype A in a Thai orphanage. *Am J Trop Med Hyg* 73(1), 104-107
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y** (1991): Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* 266, 17707-17712
- Yoshinori M, Takano T, Ohkuma S** (1982): Acridine Orange as a fluorescent probe for lysosomal proton pump. *J Biochem* 92, 1333-1336
- Xu Y, Takvorian P, Cali A, Weiss LM** (2003): Lectin binding of the major polar tube protein (PTP1) and its role in invasion. *J Eukaryot Microbiol* 50(Suppl), 600-601
- Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G, Weiss LM** (2004): Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infect Immun* 72(11), 6341-6350

Aus dieser Dissertation ist folgende Publikation hervorgegangen: Faßhauer V, Groß U, Bohne W (2005): The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryot Cell* 4, 221-224.

Die Laborarbeiten zur Erstellung dieser Dissertation wurden in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. U. Groß) vom Mai 2003 bis zum August 2004 durchgeführt. In der Arbeitsgruppe „Mikrosporidien“ erfolgte die Betreuung durch Dr. rer. nat. W. Bohne.

Weiterhin wurde diese Arbeit durch finanzielle Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (GR 906/11-1).

Frau Dr. rer. nat. Wiedemann (Abt. Med. Statistik und Biometrie der TU Dresden) half bei der statistischen Analyse der Untersuchungsergebnisse.

### **Mein persönlicher Dank gilt:**

Prof. Dr. Uwe Groß für die interessante Themenstellung, für die Möglichkeit, unter seiner Leitung in einem außergewöhnlich sympathischen und professionellen Team arbeiten zu können und für seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion aller auftretenden Probleme. Für seine konstruktiven Verbesserungsvorschläge am Manuskript bin ich ihm sehr dankbar.

Dr. Wolfgang Bohne für die exzellente Betreuung, seine Geduld bei meiner Einarbeitung in die experimentelle Arbeit und seinen feinen Sinn für Humor. Ohne sein Verständnis für meine freie Einteilung der Labortätigkeit hätte ich diese Arbeit nicht beenden können. Bei der Erstellung der schriftlichen Abfassung dieser Dissertation war sein Rat von großem Wert.

Dr. Carsten Lüder für die Erklärung und hilfreiche Unterstützung der Analysen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

Tobias Fleige, Nicole Müller, Maja Rupnik, Christine Lang, Michaela Algner, Ahmad Saleh und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Bohne, Lugert und Lüder für das Erläutern neuer Techniken und Hilfe bei der Gewinnung der Knochenmarksmakrophagen. Aber vor allem danke ich Euch für die nette Atmosphäre, die gemeinsame Freude an der Arbeit, viele gute Gespräche und Pizzaparties.

Prof. Dominique Peyramond und seinen Mitarbeitern für die Gelegenheit, mein infektiologisches Wissen im Rahmen des Praktischen Jahres unter optimaler Anleitung in ihrer Abteilung praktisch zu vertiefen. Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner infektiologischen Mentorin Dr. Mirta Peralta bedanken. Ihre menschlich offene und fachlich kompetente Art möchte ich als Vorbild für meine ärztliche Tätigkeit nehmen.

Mahan und Patty Tabari danke ich für die Empfehlung geeigneter Software (OpenOffice und GIMPshop). Meinem Bruder Martin für das Zurverfügungstellen seines Scanners und das am Laufenhalten meines Computers. Meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung meiner Promotionszeiten und des Studiums. Meinem Großvater, Dr. Fritz Baunack, für seine naturwissenschaftliche Begeisterungsfähigkeit. Ihm und meiner Großmutter Ingeborg für wiederholte Geldzuwendungen während meines Studiums und meiner Promotion.

## LEBENS LAUF

Ich kam am 02. September 1977 als Verena Stephanie Faßhauer in Göttingen zur Welt. Meine Kindheit verbrachte ich mit zwei jüngeren Geschwistern, Annette Cornelia und Martin Alexander, und unseren Eltern, Kurt und Christine Faßhauer, im nordhessischen Dohrenbach (Werra-Meißner-Kreis).

Im August 1983 wurde ich in die Gelstertalschule Hundelshausen eingeschult und besuchte ab 1987 die kooperative Gesamtschule Witzenhausen. Nach der achten Klasse wechselte ich im Jahr 1991 auf das humanistische Max-Planck-Gymnasium in Göttingen. Von 1993 bis 1994 verbrachte ich ein zehnmonatiges Auslandsschuljahr in Michigan, USA. Zurückgekehrt nach Deutschland an meine Göttinger Schule erwarb ich die Allgemeine Hochschulreife im Juni 1997.

Im Oktober 1997 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität Göttingen im Fach Humanmedizin. Während dieser ersten Jahre des Medizinstudiums arbeitete ich u.a. als studentische Sitzwache und in der Tierheilpraxis. Ich zog im Sommer 2000 nach München und unterbrach mein Medizinstudium für anderthalb Jahre. Nach verschiedenen Erfahrungen in anderen Betätigungsfeldern entschloss ich mich, mein Studium in Göttingen wiederaufzunehmen und legte im Frühjahr 2002 meine medizinische Vorprüfung ab.

Im März 2003 folgte der Erste Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Mai desselben Jahres begann ich die Arbeit an dieser Promotion in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie unter Prof. Dr. Uwe Groß. Neben diversen Famulaturen nahm ich 2003 an der zweiwöchigen Sommerakademie zur Tropenmedizin und Öffentlichen Gesundheit am missionsärztlichen Institut in Würzburg teil. Nach bestandenem Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung im September 2005 konnte ich im Oktober 2005 das erste Tertial meines Praktischen Jahres in der Anästhesie und Intensivmedizin am Krankenhaus Links Der Weser in Bremen antreten. Zum zweiten Tertial wechselte ich in die Unfall- und Allgemein Chirurgie am Diakoniekrankenhaus in Rotenburg/Wümme und das dritte und letzte Tertial belegte ich in der Infektiologischen Abteilung der Inneren Medizin am Hôpital Croix-Rousse in Lyon, Frankreich (Leiter: Prof. Dr. D. Peyramond). Am 21. Dezember 2006 bestand ich den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und damit das medizinische Staatsexamen an der Universität Göttingen.

Nach Erhalt der Approbation als Ärztin im Januar 2007 arbeite ich seit dem 01. Juli 2007 als Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen Klinik 1, Abteilung Pneumologie, des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden.