

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene
des Fachbereichs für Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Proteinbiochemische Charakterisierung von Antigenen pathogener
Prototheken-Spezies**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
PhD of Biomedical Sciences
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alexandra Irrgang, geb. Franke
Biologin
aus Karl-Marx-Stadt

Berlin 2016
Journal-Nr.: 3869

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Dritter Gutachter: PD Dr. Karsten Nöckler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Prototheca, protothecosis, MALDI-TOF, western blot, antigens, virulence factors

Tag der Promotion: 15.06.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-731-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Charakterisierung von <i>Prototheca spp.</i>	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Morphologie, Lebenszyklus und Genomorganisation	3
1.1.3	Stoffwechsel und Differenzierung	4
1.1.4	Vorkommen und Ökologie	7
1.2	Protothekosen	8
1.2.1	Humane Protothekosen	10
1.2.2	Bovine Protothekosen	12
1.2.3	Canine Protothekosen	13
1.3	Ziele der Arbeit.....	16
2	Veröffentlichungen	17
2.1	Publikation 1	17
2.2	Publikation 2	22
3	Ergänzung nicht publizierter Ergebnisse.....	33
3.1	Kreuzreaktivität des ersten anti- <i>P. zopfii</i> GT2-Serums	33
3.2	Bestimmung der antigenen Proteine von <i>P. zopfii</i> GT1 und <i>P. blaschkeae</i>	34
3.3	Spezifische Antigene einer induzierten Protothekose des Kaninchens	41
3.3.1	<i>P. zopfii</i> Genotyp 2-spezifische Antigene	41
3.3.2	Gemeinsame Antigene der untersuchten Prototheken	41
3.3.3	Individuelle Antigene von <i>P. zopfii</i> GT2 bei induzierter Protothekose von Kaninchen	42
4	Diskussion.....	43
4.1	Vergleich der beiden Studien - leporine vs. canine Protothekose	43
4.2	Detektierte Proteine und deren Einfluss auf das Pathogenitätspotential	45
4.2.1	Intrazelluläre Proteine.....	45
4.2.2	Oberflächenassoziierte und sekretorische Proteine	46

4.3	Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden	48
4.4	Impulse der Arbeit im Hinblick auf weiterführende Forschungsansätze	50
4.4.1	Immunsystem vermittelte Toleranz als Schutz vor toxischer Schädigung?.....	51
4.4.2	Virus-assoziierte Virulenzfaktoren	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Summary.....	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Publikationsverzeichnis.....	77
9	Danksagung	78
10	Selbständigkeitserklärung.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufnahmen von <i>P. zopfii</i> GT2	3
Abbildung 2: Venn-Diagramm zur Kreuzreaktivität des ersten anti- <i>P. zopfii</i> GT2-Serum.	34
Abbildung 3: 2D-SDS-PAGE von SAG 2063 ^T (<i>P. zopfii</i> GT1) und SAG 2064 ^T (<i>P. blaschkeae</i>)	35
Abbildung 4: Position von Malatdehydrogenase auf Membranen von SAG 2021 ^T (<i>P. zopfii</i> GT2) und SAG 2063 ^T (<i>P. zopfii</i> GT1).....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phänotypische Merkmale zur Differenzierung der fünf anerkannten <i>Prototheca</i> Spezies.	5
Tabelle 2: Differenzierung von <i>P. blaschkeae</i> und den Genotypen von <i>P. zopfii</i>	6
Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Formen von Protothekosen bei verschiedenen Wirten und das jeweilige pathogene Agens	10
Tabelle 4: Ergebnisse der MALDI-TOF MS Analyse der kreuzreaktiven Proteine von SAG 2063 ^T (<i>P. zopfii</i> GT1) und SAG 2064 ^T (<i>P. blaschkeae</i>).	36
Tabelle 5: Allgemeine Antigene von <i>P. zopfii</i> GT2 einer induzierten Protothekose.	41
Tabelle 6: Ergebnisse der MALDI TOF MS Analyse der individuellen Antigene von <i>P. zopfii</i> GT2 (zweites anti- <i>P. zopfii</i> GT2-Serum).	42

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	engl. für: <i>amplified fragment-length polymorphism</i>
AMP	antimikrobielles Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
C	Elementsymbol im Periodensystems für Kohlenstoff
C.	<i>Chlorella</i>
DNA	engl. für <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EF-1 α	Elongationsfaktor-1 alpha
ELISA	engl. für <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	et allis (lat. für: und weitere)
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMS	Gömöri-Methenamin-Silberfärbung
GT	Genotyp
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hsp	Hitzeschockprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF MS	engl. für <i>matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i>
MLST	engl. für <i>multilocus sequence typing</i>
MOWSE-Score	engl. für <i>molecular weight search score</i>
N	Elementsymbol im Periodensystem für Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
P.	<i>Prototheca</i>
PAS	engl. für <i>periodic acid Schiff</i>
PCR	engl. für <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEM	engl. für <i>Prototheca enrichment medium</i>
PIM	engl. für <i>Prototheca isolation medium</i>
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SDS-PAGE	engl. für <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
SSCP	engl. für <i>single strand conformation polymorphism</i>
TPI	Triosephosphatisomerase
UE	Untereinheit
ZNS	Zentralnervensystem

Einheiten

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
S	Svedberg

1 Einleitung

1.1 Charakterisierung von *Prototheca* spp.

1.1.1 Taxonomie

Die erste Beschreibung von Prototheken (*Prototheca zopfii* und *Prototheca moriformis*) fand im Jahr 1894 durch Wilhelm Krüger statt [1]. Er isolierte sie aus dem Saftfluss von Laubbäumen. Aufgrund der Abwesenheit von Chlorophyll, dem Nachweis von Cellulose in der Zellwand und ihrer metabolischen Eigenschaften ordnete er sie den Pilzen zu, erkannte aber auch ihre Nähe zu den Algen, die er ebenfalls aus dem Saftfluss von Laubbäumen gewonnen hatte. Diese beschrieb er dementsprechend als *Chlorella protothecoides*. Da Prototheken sowohl Eigenschaften aufweisen, die sie mit Pilzen teilen, als auch typische Charakteristika von Algen aufweisen, wurde ihre Einordnung im zwanzigsten Jahrhundert kontrovers diskutiert. CHODAT (1913) und PRINTZ (1927) ordneten sie aufgrund ihrer Fortpflanzung durch Endosporenbildung ohne Vorhandensein typischer fungaler Strukturen den Algen zu [2,3]. Ihre Nähe zu den Chlorellen wird durch ihre obligat heterotrophe Lebensweise mit Thiamin als essentielle Aminosäure und der fehlenden Nitratassimilation jedoch immer wieder in Frage gestellt [4]. Häufig werden sie dabei als hefeähnliche farblose Algen bezeichnet und als eine Art Bindeglied zwischen Pilzen und Algen betrachtet [5]. Auch in Aufbau und Zusammensetzung der Zellwand gibt es große Diskrepanzen zwischen Chlorellen und Prototheken, weshalb ihre tatsächliche Zuordnung bis Anfang der 1970er schwer fiel [6,7]. Mit dem Nachweis von stärkehaltigen Leukoplasten und Plastiden als degenerierte Chloroplasten wurden sie endgültig den Algen zugeschrieben [8,9]. Mit der Möglichkeit molekularbiologischer Analysen wurde die Zuordnung gefestigt [10]. Systematisch werden Prototheken derzeit (Stand 2012) folgendermaßen eingeordnet [11]:

Eukaryota
 Diaphoretickes
 Archaeplastida
 Chloroplastida
 Chlorophyta
 Trebouxiophyceae
 Chlorellales
 Chlorellaceae
 Prototheca

Über die Abstammung von Prototheken gibt es bis heute anhaltende Diskussionen. Häufig wurde die Ansicht vertreten, dass Prototheken direkt von Chlorellen evolvierten und durch Mutationen ihre Fähigkeit zur Fotosynthese verloren haben [5,12–14]. Dies ist sowohl auf morphologische und reproduktive Eigenschaften zurückzuführen, als auch darauf, dass es mit *C. protothecoides* ein Bindeglied zu geben schien [15]. Diese bildet bei guter Nährstoffversorgung kaum Chlorophyll und assimiliert ebenfalls heterotroph. Zusätzlich benötigt *C. protothecoides* in Übereinstimmung mit *Prototheca* sp. Thiamin zum Wachstum und zeichnet sich ebenfalls durch fehlende Nitratassimilation aus. Andererseits unterscheiden sich Prototheken und Chlorellen im Bereich der N- und C-Assimilation und in der Ultrastruktur ihrer Zellwände stark voneinander, sodass eine enge Verwandtschaft der beiden Gattungen auch kritisch gesehen wurde [16]. Phylogenetische Untersuchungen der 18S rDNA zeigten, dass *C. protothecoides* näher mit *Prototheca wickerhamii* verwandt ist, als mit den anderen *Chlorella* Spezies [10]. Prototheken selbst sind schon auf DNA-Ebene eine sehr heterogene Gattung mit GC-Gehalten zwischen 62 % und 78 % und wenig Homologien untereinander [17,18]. Entsprechend den historischen Problemen in der Zuordnung der Prototheken, existieren in der Literatur eine Reihe von *Prototheca* Spezies, die aktuell nicht mehr anerkannt werden. Der Gattung *Prototheca* werden aktuell die fünf Spezies ***P. stagnora***, ***P. ulmea***, ***P. wickerhamii***, ***P. zopfii*** und ***P. blaschkeae*** zugeordnet. Diese Einteilung befindet sich noch immer im Fluss. Als möglicherweise sechste Art wird ***P. cutis*** geführt [19]. Bisher gibt es jedoch keine weitere Beschreibung dieser Spezies und die phylogenetischen Untersuchungen lassen auf eine sehr nahe Verwandtschaft mit *P. wickerhamii* schließen, sodass abzuwarten ist, ob es sich tatsächlich um eine eigenständige Art handelt. Die Existenz der in der Literatur noch häufig erwähnten Spezies *P. moriformis* wurde schon länger bezweifelt und seit 2003 wird diese endgültig *P. zopfii* zugeordnet [14,20]. Einer ständigen Veränderung unterlag *P. zopfii*. BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1983) unterteilte *P. zopfii* aufgrund von Kohlenstoffassimilationsmustern und mikromorphologischen Merkmalen erstmals in drei verschiedene Varianten [21]. Anhand der klaren biochemischen und serologischen Unterschiede wurde eine Umbenennung in drei Biotypen vorgeschlagen [22]. Aufgrund von Untersuchungen der zelleigenen Fettsäurezusammensetzung und Analysen der 18S rDNA-Sequenzen wird *P. zopfii* seit 2006 in zwei Genotypen (GT) unterteilt. Der ursprünglich dritte Biotyp wurde als neue Art mit der Bezeichnung *P. blaschkeae* sp. nov. etabliert [23]. Phylogenetische Studien zeigen zudem, dass *P. wickerhamii* näher mit *Chlorella protothecoides* als mit den restlichen Prototheken verwandt ist [20,24]. Unabhängig davon, ob die Gene der großen oder kleinen Untereinheit der Ribosomen als Berechnungsgrundlage herangezogen wurden, erwies sich das Genus *Prototheca* als paraphyletisch. Somit ist mit fortschreitenden Änderungen in der Systematik von Prototheken zu rechnen.

1.1.2 Morphologie, Lebenszyklus und Genomorganisation

Prototheken sind einzellige, farblose Algen (Mikroalgen). Abhängig von Spezies und Entwicklungsstand variiert ihre Form von sphärisch bis ellipsoid mit Durchmessern von 3-30 µm (Abschnitt 1.1.3) [25]. Prototheken besitzen eine feste sporopolleninhaltige Zellwand [26,27]. Je nach Spezies und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Zellen kann diese einschichtig (junge Zellen) bis zwei- oder dreischichtig sein [28]. In einigen Fällen ist der Zellwand eine zusätzliche Kapsel aufgelagert (siehe Tabelle 1). Sporopollenin ist ein extrem festes Biopolymer, das den Zellen eine enorme Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem und physischem Stress verleiht. Prototheken vermehren sich asexuell durch die Bildung von endogenen Sporen (Sporangiosporen) [29]. Je nach Stamm und Umweltbedingung entwickeln sich im Inneren der Sporenmutterzelle (Sporangium) 2-50 Tochterzellen. Durch Aufreißen des Sporangiums werden die Endosporen entlassen und der Lebenszyklus beginnt von neuem. Eine sexuelle Vermehrung wurde bisher noch nicht beobachtet. Bei ungünstigen Umweltbedingungen können Prototheken Dauerzellen ausbilden, die sich durch eine sehr dicke fettreiche Zellwand auszeichnen. In diesem Zustand findet keine Endosporenbildung statt [1]. Protothekenzellen sind außerdem nicht-motil.

In Kultur wachsen Prototheken auf festen Nährmedien (z.B. Sabouraud-Dextrose-Agar) als weiße hefeähnliche Zellen mit dem für Hefen typischen Geruch. Makroskopisch sind sie daher leicht mit Hefen der Gattung *Candida* zu verwechseln. Mittels Laktophenol-Baumwollblau-Färbung ist eine mikroskopische Unterscheidung dieser beiden Gattungen durch die bei Prototheken fehlende Sprossung und die enthaltenen Endosporen gut möglich (Abbildung 1 B). Die Größe und Form der Zellen ist sowohl abhängig von dem verwendeten Nährmedium als auch von Spezies und Entwicklungsstand der Zellen [1]. Die in dieser Arbeit verwendeten Isolate der Spezies *P. zopfii* GT2 entwickeln auf festem Nährboden große Einzelkolonien, mit kleinen Furchen und trockner Oberfläche (Abbildung 1 A).

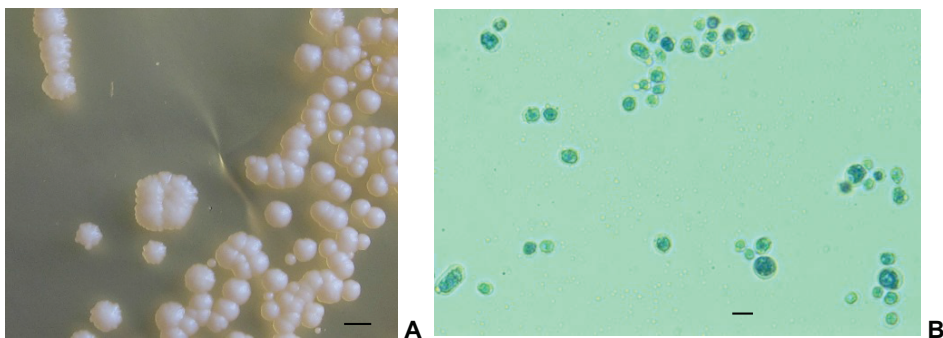


Abbildung 1: Aufnahmen von *P. zopfii* GT2

(A) Kolonien von SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2), kultiviert auf Sabouraud-Dextrose-Agar
Balken = 1 mm (B) Mikroskopische Aufnahmen von SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2),
gefärbt mit Laktophenol-Baumwollblau **Balken = 20 µm**

Über die Genomorganisation von Prototheken ist nur wenig bekannt. Einzig über das reduzierte Plastidengenom sind die Sequenzdaten zum größten Teil verfügbar [30]. Im Vergleich zu *Chlorella vulgaris* weist dieses ein um fast 100 000 kb verkleinertes Genom auf. Von sechs Untereinheiten der ATP-Synthase abgesehen, verfügen die Plastiden nicht mehr über die ursprünglichen Fotosynthesegene.

1.1.3 Stoffwechsel und Differenzierung

Prototheken sind heterotrophe, saprophytische, aerobe Mikroorganismen. Als Kohlenstoffquelle steht ihnen ein großes Spektrum an Verbindungen zur Verfügung. Das Assimilationsmuster von Kohlenhydraten kann sich dabei stamm- und speziesspezifisch unterscheiden (Tabelle 1), alle Prototheken können jedoch Glucose und Xylose metabolisieren. Neben einer Reihe von Kohlenhydraten stehen Prototheken auch teilweise aliphatische Kohlenwasserstoffe wie *n*-Alkane und *n*-Alkene als Kohlenstoffquelle zur Verfügung [31–33]. Sogar der Abbau von Erdöl konnte nachgewiesen werden [34,35]. Als Stickstoffquelle kommen Ammoniumsalze und organische Stickstoffverbindungen, wie die Aminosäuren Glutamat und Glycin, in Frage [16]. Charakteristisch für die Gattung ist die fehlende Nitratassimilation und der fehlende Abbau von Stärke, sowie Thiamin als essentielle Aminosäure [5,36].

Die Kultivierung der Mikroalgen ist auf einer Reihe von Standardmedien, wie Sabouraud-Dextrose-Agar, Columbia Blood Agar oder Brain Heart Infusion Agar, möglich und erfolgt je nach Stamm und Spezies bei 28 °C bzw. 37 °C, wobei in Einzelfällen auch Temperaturen bis 40 °C toleriert werden [37]. Aufgrund des vergleichsweise langsamen Wachstums der Prototheken eignen sich die genannten Medien nicht zur selektiven Anreicherung aus kontaminierten Proben, da Bakterien und Pilze die Algen überwachsen würden. Als selektive Minimalmedien eignen sich die von PORE (1973 und 1987) entwickelten Medien PIM (*Prototheca Isolation Medium*) oder PEM (*Prototheca Enrichment Medium*) [38,39]. Diese hemmen Bakterien durch den Zusatz von Kaliumhydrogenphthalat sowie Hefen und Schimmelpilze durch das enthaltene 5-Fluorocytosin. Der histologische Nachweis von Prototheken gelingt mittels PAS-Reaktion (*periodic acid Schiff*) oder GMS-Färbung (Gömöri-Methenamin-Silberfärbung).

Makro- und mikroskopische Beobachtungen können jedoch nur für Verdachtsdiagnosen dienen. Eine weitere Differenzierung der Protothekenspezies muss anhand von biochemischen, serologischen oder molekularbiologischen Methoden erfolgen. Die älteste Möglichkeit zur Differenzierung von Prototheken erfolgt anhand auxanographischer und biochemischer Untersuchungen [40]. Anhand ihrer unterschiedlichen Assimilationsmuster,

sowie Größe, Form und Farbe der Kolonien lassen sich Prototheken, wie in Tabelle 1 dargestellt, differenzieren.

Tabelle 1: Phänotypische Merkmale zur Differenzierung der fünf anerkannten *Prototheca* Spezies.
(erstellt nach [21,22,40–43])

Eigenschaft	<i>P. zopfii</i>	<i>P. blaschkeae</i>	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. stagnora</i>	<i>P. ulmea</i>
Zellform	zylindrisch-sphärisch	sphärisch	sphärisch	sphärisch	zylindrisch-sphärisch
Oberfläche u. Form der Kolonien	rau, flach, zentraler Knopf	uneben, flach, zentraler Knopf	glatt, halbrund	glatt, flach	k. A.
Zellgröße in µm	7-30	12-22	4-10	7-14	7-10
Kapselbildung	(+)	-	-	+	+
Assimilation von: Galaktose	+/-	+	+	+	-
Sucrose	-	-	-	+	-
Fructose	+	+	+	+	-
Trehalose	-	-	+	-	-
n-Propanol	+	k. A.	-	-	-
Acetate	+	k. A.	-	(-)	-
Glycerol	+	-	+	+	-

+ wird assimiliert; - keine Assimilation; (-) schlechte Assimilation; +/- unterschiedlich; k. A. keine Angabe; (+) Kapselbildung möglich - Stämme, die ehemals *P. moriformis* zugeordnet wurden

Zur schnellen biochemischen Identifizierung der Gattung *Prototheca* stehen kommerzielle Systeme wie API 20C [44], RapID Yeast Plus (Thermo Scientific) [45] oder Vitek (BioMérieux) zur Verfügung. Die Systeme wurden für die Identifikation von Hefen entwickelt, lassen aber einen Nachweis von Prototheken zu. Allerdings ist eine Differenzierung der *Prototheca* Spezies bzw. Genotypen nur unzureichend möglich. So kann man mit dem System RapID Yeast Plus nur zwischen *P. zopfii* und *P. wickerhamii* diskriminieren, im API 20C ist derzeit nur *P. wickerhamii* als Referenz hinterlegt [46,47].

Die ursprüngliche Einteilung der Varianten von *P. zopfii* aufgrund ihrer biochemischen und mikroskopischen Eigenschaften ist bei der Differenzierung der Genotypen 1 und 2 sowie *P. blaschkeae* anwendbar (Tabelle 2) [22].

Tabelle 2: Differenzierung von *P. blaschkeae* und den Genotypen von *P. zopfii*. (erstellt nach [21,22,48])

Eigenschaft	<i>P. zopfii</i> GT1	<i>P. zopfii</i> GT2	<i>P. blaschkeae</i>
Zellform	sphärisch - zylindrisch	sphärisch - zylindrisch	sphärisch
Größe der Zellen	groß - sehr groß	mittelgroß	mittelgroß - groß
(Sporangien) Max. in µm	13 x 30 (zylindrisch)	7 x 15 (zylindrisch)	22
Größe der Sporen Ø in µm	7-9	5-7	7-9
Assimilation von:			
Galaktose	++	(+)	+
Glycerin	+++	+++	-
Wachstum bei 37 °C	+	+++	++
pH -Toleranz	2,4 - 9,5	2,1 - 12	3 - 12
NaCl-Toleranz	4%	9%	18%

+++; ++; +; - Assimilationsvermögen bzw. Temperaturtoleranz; (+) zweifelhaft; NaCl = Natriumchlorid

Die biochemische Identifikation kann sich generell aufgrund hoher intraspezifischer Variabilität schwierig gestalten. Eine Identifikation mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ist prinzipiell möglich [14]. Die aufwändige Präparation spezifischer Antikörperkonjugate, die benötigte Geräteausstattung sowie die unzureichende Differenzierung der Spezies durch serologische Kreuzreaktivitäten schränkt die Methode in der Routinediagnostik ein.

Eine Differenzierung der *Prototheca* Spezies kann mit Hilfe der Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) erfolgen. Die Unterscheidung der Genotypen erweist sich auch bei dieser Methode als unzureichend [49].

Zur Differenzierung der verschiedenen Spezies stehen eine Reihe molekularbiologischer Methoden zur Verfügung. Die Grundlage ist der PCR-Nachweis auf Basis der 18S rDNA [50]. Auch phylogenetische Sequenzanalysen der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit beruhen darauf [20,24,51]. Zur Genotypisierung von *P. zopfii* stehen zudem PCR- und RFLP-Nachweise (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) zur Verfügung [23,52]. Ein großer Vorteil PCR-basierter Nachweismethoden ist die Möglichkeit des direkten Nachweises aus infiziertem Material, ohne vorherige Isolierung der Organismen. Darüber

hinaus ist auch ein Nachweis in fixierten Gewebeschnitten möglich. Eine äußerst akkurate und schnelle Differenzierung zwischen allen Spezies und Genotypen stellt die zweistufige qualitative real-time PCR dar [53]. Ebenfalls zur Identifikation und Differenzierung geeignet sind PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) sowie die Größenunterschiede des ITS (internal transcribed spacer) der rDNA der kleinen ribosomalen Untereinheit [54,55].

Zur schnellen Typisierung von Isolaten oder der Bestätigung biochemischer Analysen eignen sich auch proteomische Nachweisverfahren mittels MALDI-TOF [56–59]. Hohe Anschaffungs- und Unterhaltskosten machen diese Methoden jedoch erst bei einem hohen Probendurchsatz attraktiv.

1.1.4 Vorkommen und Ökologie

Prototheken sind ubiquitär verbreitet. Dies ist sowohl im geographischen Sinn als auch habitatbezogen zu verstehen. Dabei bevorzugen die saprophytisch lebenden Algen eine warme, feuchte, organische Umgebung, wodurch ihr Nachweis in der Umwelt saisonalen Schwankungen unterliegt [60,61].

Prototheken können aus dem Saftfluss von Laubbäumen isoliert werden. Besonders reichhaltige Quellen stellen dabei Ulmen dar, aber auch der Saftfluss von Linden, Eichen und Maulbeeren erweist sich als geeignetes Habitat für die chlorophylllosen Algen [1,4,60,61]. Prototheken gelten dabei nicht als primäre Verursacher des Saftflusses. Auch in unmittelbarer Umgebung dieser Bäume konnten Prototheken im Erdreich nachgewiesen werden. Da Insekten den Saftfluss von Bäumen als Nahrungsquelle aufsuchen, stellten PORE et al. (1983) die These auf, dass eine Verbreitung der Prototheken durch Insekten stattfinden könnte [60].

Prototheken konnten ebenfalls aus aquatischem Milieu isoliert werden [60]. In ruhigen Gewässern sedimentierten Prototheken, wohingegen in turbulenten Fließgewässern eine höhere Anzahl der Organismen im Wasser selbst nachweisbar war. Es wird aber davon ausgegangen, dass Regenfälle die Algen in die Gewässer gespült haben und aquatische Systeme keine natürlichen Habitate darstellen. Eine Reihe von Untersuchungen wiesen Prototheken in kommunalen und landwirtschaftlichen Abwässern sowie Kläranlagen nach [13,62,63]. Ihre Vorkommen in ungeklärten Abwässern wird als primäre Eintragsquelle in aquatische Systeme betrachtet [60]. In Abwässern von Sanitäranlagen kommen sie nur in geringer Zahl vor. Die Vermehrung der Organismen findet im Kanalisationssystem statt, einem Habitat mit reichem organischem Nährstoffangebot.

Prototheken bevorzugen eine feuchtwarme, nährstoffreiche Umgebung. Daher lassen sie sich leicht im Umfeld von landwirtschaftlichen Nutztieren nachweisen [64]. PORE et al. (1988)

konnten zeigen, dass Ratten über die Aufnahme von kontaminiertem Futter durch Ausscheidungen zur Verbreitung im Stall beitragen können, ohne dass ihr Darm jedoch mit den Mikroalgen kolonisiert wird [65]. Auch bei Schweinen wurde eine solche passagäre Besiedelung durch kontaminiertes Futter nachgewiesen. Demzufolge können auch Tiere und Schlachtabfälle mit Prototheken kontaminiert sein. Dies setzt sich in der Kontamination von Lebensmitteln fort [60]. In einer Studie über die Ökologie von Prototheken auf den Philippinen wiesen PORE et al. (1983) Protothekenkontaminationen bei Schweinefleisch-Rindfleisch- und Wasserbüffelfleischprodukten nach [60]. Die primäre Kontaminationsquelle für Lebensmittel, v.a. von Salaten, schien jedoch mit Prototheken belastetes Grundwasser darzustellen. Da Prototheken Verursacher von Mastitiden beim Rind sein können, stellen infizierte Rinder eine mögliche Kontaminationsquelle von Milch und Milchprodukten dar. BUZZINI et al. (2004) beprobten in Italien Tiere und Milch betroffener Herden und erbrachten in 4,7% der Milchproben einen Protothekennachweis [66]. Die Mikroorganismen verfügen über eine hohe Temperaturtoleranz und werden durch Pasteurisation nicht sicher abgetötet [67,68]. Erst durch sogenannte Ultrahoherhitzung kann von sicher abgetöteten Prototheken in Milch ausgegangen werden. Da einige *Prototheca* Spezies Humanpathogene darstellen, bedarf der Aspekt der Lebensmittelkontamination besonderer Beachtung.

Aufgrund ihrer morphologischen Merkmale verfügen Prototheken über eine sehr hohe Tenazität. Sie besitzen eine hohe Toleranz gegenüber Salzgehalt und pH-Wert [48]. *P. blaschkeae* zeigt noch ein geringes Wachstum bei 18% Salzgehalt und *P. zopfii* wächst immerhin noch bei 9%. Sie überstehen dadurch selbst eine Chlorung von Wasser. Ihr pH-Optimum liegt im Bereich von 5-9, sie überstehen aber auch extremere pH-Werte [69]. Wie schon erwähnt, verfügen Prototheken zusätzlich über eine hohe Hitzeresistenz. Ihre extreme mechanische und physische Festigkeit sowie ihre relative Anspruchslosigkeit bezüglich assimilierbarer Substrate lassen die Algen auch in ungewöhnlichen Habitaten auftreten. Bemerkenswert ist ihr Vorkommen in ölhaltigen Industrieabwässern und Ölschlamm von Raffinerien [34,35]. Diese Beobachtungen wurden von UENO et al. (2008) genutzt, als er in Polyurethanschaum eingebettete Prototheken zur Reinigung ölverseuchter Gewässer einsetzte [70].

1.2 Protothekosen

Als Protothekosen werden Infektionen bezeichnet, die durch *Prototheca* sp. hervorgerufen werden. Neben dem Begriff der Protothekose existieren in der Literatur noch weitere Bezeichnungen, die jedoch weniger eindeutig sind. Begrifflichkeiten wie „pseudofungale Infektion“ [71] oder „hefeähnliche Infektion“ resultieren zum einen aus der früheren Zuordnung der Prototheken zu den Hefen als auch aus dem meist primären Verdacht einer

Candidose. Ein häufig verwendeter Begriff ist „Algemie“ [72]. Dem Namen nach bezeichnet „Algemie“ Infektionen, die auf Algen zurückzuführen sind. Bei den beschriebenen Fällen handelt es sich dabei um Infektionen, die durch Prototheken verursacht wurden [73–77]. Dieser Begriff würde auch für Infektionen mit Helicosporidien, einer mit Prototheken nahverwandten Gattung, zutreffen. Doch stellen diese lediglich Pathogene von Invertebraten (speziell der Insekten) dar und sind somit an dieser Stelle nicht von Bedeutung [78,79]. Die Bezeichnung „Chlorellose“ kann ebenfalls auf Erkrankungen mit Prototheken hinweisen [80,81]. Diese Bezeichnung ist jedoch verwirrend, da auch andere Krankheitsbilder darunter beschrieben werden. „Chlorellose“ bezeichnet v.a. in älterer Literatur Protothekosen, wird aber namensgebend auch für sehr selten auftretende Infektionen durch *Chlorella* sp. verwendet. Entgegen häufig zu lesender Meinung, Prototheken wären die einzigen Pflanzen, die Infektionen bei Mensch und Tier hervorrufen können, gibt es einige nachgewiesene Infektionen durch Chlorellen beim Mensch [82], Hund [83] sowie einige Fälle bei Huftieren (Schafe, Rinder, Dromedar, Gazelle) [84–89].

Auch wenn Protothekosen nicht die einzigen durch Algen hervorgerufenen Infektionen sind, so stellen sie doch den überwiegenden Teil der beschriebenen Vertebrateninfektionen mit Algen dar. Nicht alle *Prototheca* Spezies verursachen Protothekosen. *P. stagnora*, *P. ulmea* und *P. zopfii* GT1 gelten als nicht-pathogen. Die häufigsten Infektionen werden durch *P. wickerhamii* und *P. zopfii* GT2 hervorgerufen, wobei Infektionen mit *P. zopfii* GT2 häufig durch einen schweren Verlauf gekennzeichnet sind [90]. *P. blaschkeae* tritt vornehmlich als Erreger von subklinischer boviner Mastitis in Erscheinung [91]. In einem Fall kutaner Protothekose konnte *P. cutis* isoliert werden [19]. Die häufigsten Protothekeninfektionen sind bei Rindern bekannt, gefolgt von Menschen und Hunden. Diese Protothekosen werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben. Sporadisch auftretende Infektionen sind von Katzen [92–97], Fischen (Lachs und Karpfen) [28,98], Schafen und Ziegen [99,100] bekannt. Des Weiteren gibt es Einzelfallbeschreibungen von Protothekosen bei Kornnatter [101], Reh [102], Biber [103] und Flughund [104]. Protothekosen können lokal begrenzt sein oder auch einen disseminierten Verlauf nehmen. Die Lokalisation, Pathogenese und das pathogene Agens von Protothekosen ist dabei abhängig vom jeweiligen Wirt. Tabelle 3 zeigt einen Überblick der Protothekosen verschiedener Wirte.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Formen von Protothekosen bei verschiedenen Wirten und das jeweilige pathogene Agens

Wirt	Manifestation	Pathogene <i>Prototheca</i> Spezies
Mensch	<u>kutan / subkutan</u> , <i>Olecranon bursitis</i> disseminiert	<i>P. zopfii</i> GT2, <i>P. wickerhamii</i> , <i>P. cutis</i>
Rind	Mastitis	<u><i>P. zopfii</i> GT2</u> , <i>P. blaschkeae</i>
Katze	kutan	<i>P. wickerhamii</i> , <i>P. zopfii</i> GT2
Hund	<u>disseminiert</u> , kutan (sehr selten)	<i>P. zopfii</i> GT2, <i>P. wickerhamii</i>

Die am häufigsten beschriebene Variante ist jeweils unterstrichen.

Antibiotika haben auf Prototheken als eukaryotische Mikroorganismen kaum eine Wirkung. Nur für Amikacin und Tetracyclin ist eine Sensitivität beschrieben [105]. Eine Hemmung im Wachstum kann bei einigen antifungalen Wirkstoffen verzeichnet werden [106]. Vor allem Amphotericin B schränkt die Vermehrung der Algen in vielen Fällen ein. Die Wirkung beruht auf dem relativ hohen Ergosterolgehalt der Zellmembran von 4 %. Imidazole hemmen das Wachstum aufgrund der vielen freien Fettsäuren in der Zellmembran. Azole hingegen eignen sich weniger zur Hemmung von Prototheken [107,108]. Experimentell wurde die algizide Wirkung ätherischer Öle und von Laktoferrin nachgewiesen [109–111].

1.2.1 Humane Protothekosen

Humane Protothekosen sind seltene, aber ernstzunehmende Erkrankungen. Sie kommen weltweit vor, mit verstärktem Auftreten in tropischen und subtropischen Gebieten vor allem in Asien und Nordamerika [112,113]. Der erste bestätigte Fall wurde 1964 beschrieben. Ein Reisfarmer aus Sierra Leone litt mehr als fünf Jahre an einer sich ausbreitenden, kutanen Protothekose [114]. Bis zum Jahr 2000 wurden weltweit 108 Fälle dokumentiert, dies entspricht durchschnittlich 2-5 Fällen pro Jahr [25,80]. Die Zahlen scheinen sich in jüngerer Zeit auf etwa fünf Fallberichte pro Jahr einzupendeln. Im Jahr 2014 wurden fünf Fälle aus Asien, Europa und Nordamerika publiziert [115–119] und zwischen Januar und Juni 2015 erschienen drei Publikationen humaner Protothekosen aus China, Indien und Australien [120–122]. Humane Protothekosen besitzen ein vielseitiges Erscheinungsbild. Sie können lokal oder systemisch auftreten und sowohl akut als auch chronisch verlaufen, wobei letzteres die häufigere Verlaufsform darstellt [123]. Klinisch werden drei Hauptformen anhand ihrer Lokalisation unterschieden: i) kutane Läsionen ii) Faszien-, Schleimbeutel- und Sehnenscheidenentzündungen iii) systemische / disseminierte Infektionen [124].

Die Pathogenese der Erkrankungen ist noch weitgehend unbekannt. Vor allem bei kutanen Infektionen und Entzündungen des straffen Bindegewebes wird ein vorangegangenes Gewebetraumata mit anschließendem Kontakt zu einer Infektionsquelle - vermutlich kontaminiertes Wasser - angenommen [113,125]. Eine Übertragung mit Arthropoden als Vektoren kann ebenso wenig ausgeschlossen werden wie die Ansteckung über kontaminierte Lebensmittel [68,126]. In mehr als der Hälfte aller Fälle stellt eine Immunsuppression den prädisponierenden Faktor dar. Alle fünf in 2014 publizierten Fälle gehörten dieser Risikogruppe an. Zu den Risikofaktoren zählen demnach Defekte in der Funktion der neutrophilen Granulozyten, Alkohol- und Steroidmissbrauch, chronische Erkrankungen wie *Diabetes mellitus*, vorangegangene Organtransplantation, Krebs oder HIV [107,127–137]. Vor allem schwer verlaufende disseminierte Protothekosen gehen mit einem stark geschwächten Abwehrsystem einher. Die langen Inkubationszeiten von bis zu mehreren Wochen erschweren die Identifikation von Infektionsquellen und potentiellen Ansteckungswegen [127]. Außerdem sind Co-Infektionen mit *Staphylococcus aureus* [138], *Klebsiella pneumoniae* [135], *Enterococcus faecalis* [107], *Pseudomonas aeruginosa* [133] *Escherichia coli* [107], Herpes-simplex-Virus, *Cryptococcus* spp. oder *Candida glabrata* [133] möglich.

Bisher gibt es keine standardisierte Behandlungsmethode für Protothekosen. Eine spontane Ausheilung von Protothekosen stellt eher die Ausnahme dar. Die Behandlung erfolgt an Hand der Symptomatik. Beste Erfolge bei lokalen Infektionen zeigt die chirurgische Entfernung des Infektionsherdes [139]. Ergänzend kann eine topische Therapie mit antimykotischen Salben erfolgen [140,141]. Protothekosen wurden des Öfteren erfolgreich mit antifungalen Therapeutika (Amphotericin B, Imidazol, Intraconazol, Ketoconazol), zum Teil in Kombination mit antibiotischen Wirkstoffen, behandelt [130,142]. Da es zwischen Amphotericin B und Tetracyclin zu einem synergistischen Effekt kommt, ist eine kombinierte Gabe zu empfehlen [143]. Allerdings bleibt die Behandlung experimentell. Wirkstoffe, die in einigen Fällen erfolgreich angewendet wurden, zeigten in anderen Fällen kaum Erfolge [108,137]. Außerdem sind die angewandten Wirkstoffdosen und Kombinationen recht unterschiedlich. Nicht immer gelingt jedoch die Eindämmung der parasitierenden Algen. Die Mortalitätsrate humaner Protothekosen beträgt insgesamt 2,2 % [80], im Bereich schwerer generalisierter Infektionen liegt sie entsprechend höher [117,118,137].

1.2.2 Bovine Protothekosen

LERCHE beschrieb 1952 die erste bekannte Protothekose - eine Mastitiserkrankung eines Rindes [144]. Die bovine Protothekenmastitis äußert sich in chronischen Entzündungen der Milchdrüsen. Mit der Entzündung einher geht eine stetig abnehmende Milchleistung bei gleichzeitiger Zunahme der Zellzahl der Milch [145]. Diese weist in der Regel eine wässrig-flockige Konsistenz auf. In der Routinediagnostik können in 0,1% der Milchproben Prototheken nachgewiesen werden [146]. Die Intraherden-Prävalenz in betroffenen Betrieben liegt zwischen 5,1% [146,147] und 10,5 % [148]. Die Erreger können sowohl aus sekretorisch auffälligen, als auch aus scheinbar eutergesunden Tieren isoliert werden [148].

Haupterreger klinischer Mastitiden ist *P. zopffii* GT2, während der Genotyp 1 hier so gut wie nicht als pathogenes Agens in Erscheinung tritt [149,150]. Als Erreger vor allem subklinischer Protothekenmastitis tritt außerdem *P. blaschkeae* in jüngerer Zeit in Erscheinung [59,91,151]. Infektionen mit *Prototheca* spp. erfolgen hauptsächlich über den Strichkanal der Zitzen und breiten sich galaktogen-aszendierend aus. Bei Ausbildung einer pyogranulomatösen Mastitis kommt es im Verlauf zur irreversiblen Schädigung des Alveolarepithels und zur weiteren intra-alveolaren Ausbreitung unter Beteiligung der lokalen Lymphknoten [152]. Die Bildung von Abszessen zur Abkapselung des Erregers wird für die abnehmende Milchleistung verantwortlich gemacht [153]. Spontane Ausheilungen sind selten und selbst nach einer längeren Trockenstehperiode und einem klinisch unauffälligen Bild kann es zum Wiederausbruch der Erkrankung kommen [154].

Die bovine Protothekenmastitis ist multifaktoriell bedingt. Protothekeninfektionen können zu allen Lebenszeitpunkten ab Laktationsbeginn auftreten, doch steigt das Risiko mit zunehmender Laktationszahl [155]. Häufig gehen weitere bakteriell hervorgerufene Mastitiden in der gleichen Laktationsperiode voraus. Ein weiterer Risikofaktor stellt das Versiegeln der Zitzen während der Trockenstehperiode dar [146]. Unzureichende Melkhygiene und schlechte hygienische Bedingung im Stall kommen als Risikofaktoren hinzu [156,157]. Da Prototheken sensitiv gegenüber Desinfektionsmitteln, wie Natriumhypochlorid und jodhaltigen Antiseptika sind, stellt eine gute Melkhygiene einen wichtigen Baustein in der Protothekenprophylaxe dar [158]. COSTA et al. (1998) konnten für Brasilien einen saisonalen Anstieg der Fallzahlen in den feuchtwarmen Sommermonaten beobachten [159]. Ein Anstieg in den Sommermonaten ist auch für kontinentales Klima beschrieben [157].

Die generell feuchtwarme Stallumgebung mit viel organischem Material stellt einen idealen Nährboden für Prototheken dar. Somit verwundert es nicht, dass in betroffenen Herden die Isolation der Algen aus der Stallumgebung leicht gelingt und es zu einer endemischen Verbreitung der Protothekenmastitis innerhalb der Herde kommt [64,160,161]. Neben der

Verbesserung der Melkhygiene und der hygienischen Zustände im Stall, schließen Bestandssanierungsmaßnahmen die Entfernung betroffener Tiere aus der Herde ein [162]. Dies bedeutet häufig eine vorzeitige Schlachtung der Tiere, da die Ausscheidung (permanent oder intermittierend) von Prototheken durch betroffene Rinder eine hohe Ansteckungsgefahr für die gesunden Tiere darstellt [163]. Daraus ergibt sich eine große ökonomische Bedeutung der Protothekenmastitis in den betroffenen Betrieben.

Die Merzung von Tieren mit einem positiven Erregernachweis ist auch deshalb nötig, da es bisher keine Therapiemöglichkeiten für erkranktes Milchvieh gibt. BERGMANN (1987 und 1993) wies *in vitro* und *in vivo* die algizide Wirkung von Levamisolhydrochlorid und Tetramisolhydrochlorid nach [164,165]. Eine entsprechende therapeutische Anwendung der Wirkstoffe als intramammale Behandlung hat sich jedoch nicht durchgesetzt. Hoffnung auf selektive Therapeutika der Protothekenmastitis machen Versuche von TOMASINSIG et al. (2012) mit antimikrobiellen Peptiden (AMPs) [166]. AMPs stellen Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems dar. Die Peptide BMAP-28, Bac-5 und LAP erwiesen sich in Zellkulturversuchen als effektive Moleküle gegen Protothekenzellen ohne die Zellen der Zellkultur zu schädigen. Während BMAP-28 hochgradig lytisch wirkt, interagieren Bac-5 und LAP nur lose mit der Plasmamembran. Die nicht-lytische Wirkung dieser beiden Peptide könnte demzufolge Ansatzpunkt für die Identifikation von geeigneten Targets auf der Zelloberfläche und die Entwicklung selektiver Therapeutika sein.

1.2.3 Canine Protothekosen

Die erste Beschreibung einer Protothekeninfektion eines Hundes stammt von VAN KRUIJNINGEN aus dem Jahr 1969 [167]. Seitdem wurden weltweit über 60 Fälle von caninen Protothekosen dokumentiert. Eine große Anzahl an Beschreibungen, 25 Fälle, stammen aus den USA [168], weitere 17 Fälle sind aus Australien bekannt [169]. Außerdem sind 13 europäische Fälle in der Literatur beschrieben [170–179], darunter drei deutsche Fälle [180–182], zwei Fälle stammen aus Japan [183,184] und je ein Fall aus Kanada [185], Südamerika [186] und Afrika [187]. Die Mehrheit der bekannten Protothekosen wurde bei weiblichen Tieren diagnostiziert. Neben dem Geschlecht scheint es eine Prädisposition einiger Rassen für die Erkrankung zu geben. Unter den australischen Hunden befanden sich auffällig viele Boxer, während die Infektion in Europa und USA häufiger Collies und in Deutschland Riesenschnauzer betraf. Ein genetischer Defekt von Collis und Boxern als prädisponierender Faktor wird daher diskutiert [90,169].

Im Gegensatz zu Katzen sind nur wenige canine Infektionen mit *P. wickerhamii* dokumentiert [176,184,188–191] und nur drei Fälle kutaner Läsionen bekannt [169,176,178]. Im Allgemeinen stellen canine Protothekosen systemische Infektionen dar. Symptomatisch

beginnen diese meist mit intermittierendem hämorrhagischen Durchfall sowie Gewichtsverlust in Folge der Colitis und manifestieren sich bei generalisiertem Verlauf vor allem in gut vaskularisierten Organen. Akute Blindheit in Folge von Retinaablösungen durch okuläre Protothekenbesiedlung [170,192–199], Ataxien, Taubheit, Hyperästhesie, Kopfschiefhaltung, Paraparese, Meningoenzephalitis u.a. durch Befall des Zentralnervensystems [172–174,194,200–205] sowie akute Niereninsuffizienz oder Polyurie/Polydipsie [167,169] durch renale Protothekeninfiltration gehören zu den Folgen fortgeschrittener Infektionen. Anatomisch können die Erreger bei einer Obduktion in Dickdarm, Augen, Herz, Lunge, Lymphknoten, Milz, Schilddrüse, Pankreas, Leber, Niere, Cochlea, Gehirn, Rückenmark und Muskeln bis hin zum Zwerchfell nachgewiesen werden [187,194,206,207].

Der langanhaltende blutige Durchfall der meisten caninen Protothekosen (initiale Symptomatik oder einziges Symptom) legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine orale Aufnahme der Erreger handelt. Im Fall einer fünfjährigen Labradorhündin stellte das erste Anzeichen der Infektion jedoch eine Paraparese (beidseitige Lähmung) der hinteren Extremitäten dar [172]. Diese wurde hervorgerufen durch eine Kompression der Spinalnerven zwischen dem 4. und 7. Lendenwirbel aufgrund eines Infektionsherdes des Erregers und der darauffolgenden Entzündungsreaktion in diesem Bereich. Es folgte eine Ausbreitung entlang des ZNS bis hin zu einer bilateralen okularen Affektion. Für kutane Infektionen wird eine perkutane Inokulation [176] oder ein lokales Trauma [178] in Betracht gezogen.

Die Prognose bei caninen Protothekosen ist ausgesprochen schlecht. Von den 17 bei STENNER et al. (2007) aufgeführten australischen Fällen mussten 16 eingeschläfert werden oder verstarben [169]. Unter den weiter aufgelisteten 27 nicht australische Fällen, befinden sich zwei Hunde, deren kutane Läsionen erfolgreich behandelt werden konnten [176,178]. Die restlichen 25 systemischen Infektionen nahmen einen letalen Verlauf bzw. mussten die Hunde eingeschläfert werden. RIBEIRO et al. (2009) berichten von einem Mischlingshund, dessen systemische Protothekose durch die orale Gabe von Nystatin kuriert werden konnte [186]. Therapien anderer Fälle mit verschiedenen Azolen, Amphotericin B, Corticoiden und Antibiotika schlugen hingegen fehl, obwohl es in einigen Fällen zunächst zu einer Verbesserung der Symptomatik kam, bevor sich der Gesundheitszustand des jeweiligen Tieres wieder verschlechterte [172,175,181,182,202].

Als ein Grund für den fatalen Verlauf systemischer Erkrankungen sieht HOLLINGSWORTH (2000) die oftmals späte Diagnose. Häufig werden die erkrankten Tiere erst nach Monaten vorgestellt oder intensiveren diagnostischen Tests unterzogen, wenn das Allgemeinbefinden der Hunde deutlich schlechter wird. Die zu diesem Zeitpunkt disseminierte Manifestation in

verschiedenen Organen mit Granulombildung und die Resistenz der Organismen gegenüber konventionellen Medikamenten machen eine erfolgreiche Behandlung kaum mehr möglich.

Im Falle von kutanen Protothekosen sind die Prognosen deutlich besser. Hier besteht die Möglichkeit der chirurgischen Entfernung der Läsionen. Im Fall von GINEL et al. (1997) schlug eine Therapie mit oraler Gabe von Ketoconazol in Kombination mit topischer Anwendung von Clotrimazol, sowie unterstützender Immuntherapie an [176]. Die orale Gabe von Ketoconazol (2 x täglich 100 mg über vier Monate) erwies sich auch bei MACARTNEY et al. (1988) als erfolgreiche Therapie [178].

Die Diagnostik der Protothekose erfolgt häufig über eine Erregerisolation aus Kot, Urin oder biopsierten Läsionen durch Ausstrich auf geeignete Nährmedien (siehe Abschnitt 1.1.3). Auch aus Punktionen der Augen oder des Liquors ist eine Isolation möglich [175]. Positive kulturmorphologische Befunde werden durch nachfolgende mikroskopische Untersuchungen bestätigt. Außerdem steht neben dem klassischen Nachweis durch PCR oder histologischen Nachweismethoden seit kurzer Zeit auch ein indirekter ELISA als diagnostische Möglichkeit zur Verfügung [168].

Die mit der Entwicklung des ELISAs erfolgte Prävalenzstudie mit 361 enteritisch auffälligen Hunden zeigte, dass es keine nicht diagnostizierten Protothekosen in diesem Probenpool gab. Somit muss nicht von einer hohen Dunkelziffer unentdeckter caniner Protothekosen ausgegangen werden. Ebenso gelang ein kultureller Nachweis in nur 0,5% der Fälle [167]. Allerdings zeigt die Veröffentlichung von STENNER et al. (2007), dass es eine relativ hohe Anzahl nicht publizierter Fälle gibt. Von den vorgestellten 17 Fällen, waren nur 4 Fälle zuvor publiziert worden [169]. Die restlichen Fälle wurden erst durch einen Aufruf in Fachmagazinen bekannt. Ähnliche Erfahrungen wurden auch am Institut für Tier- und Umwelthygiene gemacht. Die in dieser Arbeit verwendeten Seren stammen alle von nicht publizierten Fällen caniner Protothekosen.

1.3 Ziele der Arbeit

Protothekosen stellen seltene, facettenreiche Infektionen von Menschen und Tieren dar, welche von einigen Vertretern der Gattung *Prototheca* hervorgerufen werden. Zwar gibt es eine Reihe von Publikationen bezüglich der Prävalenz von Protothekosen (vor allem in Rinderbeständen), Nachweissystemen und Typisierungen der Erreger, sowie diverse Fallstudien, doch die zugrunde liegenden Mechanismen der schwer verlaufenden Erkrankungen sind bisher kaum bekannt. Welche Wirts-Erreger-Interaktionen finden statt? Welche Virulenzfaktoren besitzen pathogene Prototheken? Wie erkennt das Immunsystem eine Infektion und wie reagiert es darauf? Was unterscheidet pathogene von nicht-pathogenen Vertretern? Diese und viele weitere Fragen sind noch weitgehend ungeklärt. Doch Antworten auf diese Fragen stellen die Grundlage dar, um dem Erreger im klinischen Sinne begegnen zu können. Denn noch gibt es keine effektiv wirksamen und verträglichen medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten oder präventive Ansätze (z.B. in Form von Immunisierung). Daher stellt die vorliegende Arbeit einen Einstieg in ein hochkomplexes neues Forschungsfeld dar.

Um sich den oben genannten Fragestellungen zu nähern, bestand die Zielsetzung der Arbeit darin, antigene Proteine von *Prototheca zopfii* GT2 zu detektieren, zu identifizieren und im Hinblick auf mögliche virulente Eigenschaften zu charakterisieren.

Die zu diesem Zweck eingesetzten Blutseren stammten aus den nachfolgend genannten *Prototheca*-Infektionen:

- i) Experimentell induzierte leporine Protothekosen
- ii) Natürlich auftretende canine Protothekosen

Des Weiteren sollte die Kreuzreaktivität der Antikörper mit Proteinen von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae* getestet werden.

2 Veröffentlichungen

2.1 Publikation 1

Identification of immunodominant proteins of the microalgae *Prototheca* by proteomic analysis

A. Irrgang, C. Weise, J. Murugaiyan and U. Roesler

Journal: "New Microbes and New Infections"

Januar 2015, Jahrgang 3, Seite 37-40

DOI: 10.1016/j.nmni.2014.10.004

[http://www.newmicrobesnewinfections.com/article/S2052-2975\(14\)00006-7/fulltext](http://www.newmicrobesnewinfections.com/article/S2052-2975(14)00006-7/fulltext)

Eingereicht: 17.07.2014

Akzeptiert: 16.10.2014

Online erschienen: 08.11.2014

Please read this part online.

2.2 Publikation 2

Well-known surface and extracellular antigens of pathogenic microorganisms among the immunodominant proteins of the infectious microalgae *Prototheca zopfii*

Alexandra Irrgang, Jayaseelan Murugaiyan*, Christoph Weise, Walid Azab and Uwe Roesler

Journal: "Frontiers in Cellular and Infection Microbiology"

September 2015, Jahrgang 5, Artikel 67

DOI: 10.3389/fcimb.2015.00067

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2015.00067/full>

Eingereicht: 24.04.2015

Akzeptiert: 11.09.2015

Online erschienen: 29.09.2015

This document is protected by copyright and was first published by *Frontiers*. All rights reserved. It is reproduced with permission.



Well-known surface and extracellular antigens of pathogenic microorganisms among the immunodominant proteins of the infectious microalgae *Prototheca zopfii*

Alexandra Irrgang¹, Jayaseelan Murugaiyan^{1*}, Christoph Weise², Walid Azab³ and Uwe Roesler¹

¹ Institute of Animal Hygiene and Environmental Health, Centre for Infection Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ² Institute for Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ³ Institute of Virology, Centre for Infection Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Jiri Stulik,
University of Defence, Czech Republic

Reviewed by:

Deborah Threadgill,
Texas A&M University, USA
Stephen Peter Kidd,
University of Adelaide, Australia

*Correspondence:

Jayaseelan Murugaiyan,
Institute of Animal Hygiene and
Environmental Health, Centre for
Infection Medicine, Freie Universität
Berlin, Robert-von-Ostertag Straße
7–13, 14163 Berlin, Germany
jayaseelan.murugaiyan@fu-berlin.de

Received: 24 April 2015

Accepted: 11 September 2015

Published: 29 September 2015

Citation:

Irrgang A, Murugaiyan J, Weise C,
Azab W and Roesler U (2015)
Well-known surface and extracellular
antigens of pathogenic
microorganisms among the
immunodominant proteins of the
infectious microalgae *Prototheca zopfii*
Front. Cell. Infect. Microbiol. 5:67.
doi: 10.3389/fcimb.2015.00067

Microalgae of the genus *Prototheca* (*P.*) are associated with rare but severe infections (protothecosis) and represent a potential zoonotic risk. Genotype (GT) 2 of *P. zopfii* has been established as pathogenic agent for humans, dogs, and cattle, whereas GT1 is considered to be non-pathogenic. Since pathogenesis is poorly understood, the aim of this study was to determine immunogenic proteins and potential virulence factors of *P. zopfii* GT2. Therefore, 2D western blot analyses with sera and isolates of two dogs naturally infected with *P. zopfii* GT2 have been performed. Cross-reactivity was determined by including the type strains of *P. zopfii* GT2, *P. zopfii* GT1, and *P. blaschkeae*, a close relative of *P. zopfii*, which is known to cause subclinical forms of bovine mastitis. The sera showed a high strain-, genotype-, and species-cross-reactivity. A total of 198 immunogenic proteins have been analyzed via MALDI–TOF MS. The majority of the 86 identified proteins are intracellularly located (e.g., malate dehydrogenase, oxidoreductase, 3-dehydroquinate synthase) but some antigens and potential virulence factors, known from other pathogens, have been found (e.g., phosphomannomutase, triosephosphate isomerase). One genotype-specific antigen could be identified as heat shock protein 70 (Hsp70), a well-known antigen of eukaryotic pathogens with immunological importance when located extracellularly. Both sera were reactive to glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase of all investigated strains. This house-keeping enzyme is found to be located on the surface of several pathogens as virulence factor. Flow-cytometric analysis revealed its presence on the surface of *P. blaschkeae*.

Keywords: *Prototheca*, canine protothecosis, immunodominant proteins, western blotting, proteomics, MALDI TOF MS

Introduction

Prototheca spp. are inconspicuous microorganisms that have remained poorly described despite their worldwide distribution. Nevertheless, these unicellular algae attracted our attention because of their ability to infect vertebrates with severe manifestations. Since its discovery in 1894 by Krüger, the taxonomic classification of *Prototheca* has been discussed controversially (Krüger, 1894). On the one hand, because of their yeast-like appearance when cultured on Sabouraud dextrose agar and their staining patterns, they were considered to be fungal-like organisms. On the other hand, formation of endospores and the presence of non-chitin rigid cell walls indicated that *Prototheca* sp. might belong to algae. Currently, based on molecular analysis, they are classified as colorless green algae, closely related to *Chlorella* sp. They lack genes for photosynthesis and therefore can use organic carbon sources in almost every environment, including fossil oils (Walker et al., 1975; Pore et al., 1983). The cell walls of these microalgae contain sporopollenin, a robust biopolymer, rendering them highly resistant to mechanical stress, physical, and chemical treatment and to enzymatic degradation (Lloyd and Turner, 1968; Ueno, 2009). Currently there are six generally accepted *Prototheca* species: *P. ulmea*, *P. stagnora*, *P. cutis*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, and *P. zopfii* (Roesler et al., 2006; Satoh et al., 2010). At present *P. zopfii* is subdivided in two genotypes (GT), GT1 and GT2. Although termed a “genus,” *Prototheca* seems to be paraphyletic. *P. wickerhamii* is more closely related to *Auxenachlorella* sp. than to the other *Prototheca* species (Ueno et al., 2003, 2005). *P. wickerhamii*, *P. cutis*, *P. zopfii*, and *P. blaschkeae* are reported to cause infections in vertebrates, primarily mammals like household pets (cats and dogs), livestock (pigs and cattle) and also humans (Pore and Shahan, 1988; Leimann et al., 2004; Camboim et al., 2011). Interestingly *P. zopfii* GT2 is associated with the most severe forms of protothecosis like bovine mastitis or encephalitis of dogs, while GT1 is considered to be non-pathogenic (Möller et al., 2007; Osumi et al., 2008; Kishimoto et al., 2010). *P. blaschkeae* (previously *P. zopfii* GT3), is found to be associated with subclinical bovine mastitis and it is isolated much less frequently than *P. zopfii* GT2 (Marques et al., 2008; Jagielski et al., 2011). Only one case of severe systemic infection due to *P. blaschkeae* has been reported so far (Thompson et al., 2009).

The disease condition is referred as protothecosis, which displays varying clinical patterns depending on the host species. In human, local cutaneous lesions, infections of the olecranon bursa and disseminated infection are observed (Lass-Florl and Mayr, 2007). In cattle, bovine mastitis represents the predominant manifestation of protothecosis. Acute infections result in granulomatous mastitis, whereas chronic progression cases are associated with decreasing milk yield and increasing cell numbers (Lerche, 1954). *Prototheca* also represent a potential zoonotic risk as they persist after pasteurization of milk due to their heat-resistant nature (Melville et al., 1999).

Dogs typically suffer from disseminated infections usually beginning with chronic bloody diarrhea followed by neurologic symptoms like ataxia, blindness, deafness, or seizure (Stenner et al., 2007; Ribeiro et al., 2009). The majority of cases occur in

female dogs, mostly in boxers, collies, and giant schnauzers. The outcome of an infection is usually fatal (Stenner et al., 2007). As in cattle, most frequently *P. zopfii* GT2 is isolated from canine protothecosis (Font et al., 2014).

Little is known about the pathogenesis in humans, however immunosuppression and drug abuse have been identified as possible risk factors (Chao et al., 2002). Therapy options are limited in general. While local infections can be removed by surgery, disseminated infections in humans are treated experimentally with diverse mixtures of antimycotics and antibiotics with varying success (Thiele and Bergmann, 2002; Zhao et al., 2004).

The course of protothecosis and the difference in pathogenicity between the different *Prototheca* species and genotypes are poorly understood. So far no virulence factors are known and the severe inflammatory reactions in bovine mammary glands are reminiscent of toxin activity. Earlier attempts to identify possible antigens using rabbits experimentally immunized with living *Prototheca* cells remain inconclusive due to the fact that natural *Prototheca* infection among rabbits has not been described yet (Irrgang et al., 2015). Therefore, the aim of this study was to identify immunogenic proteins using the antibodies present in the sera of dogs which were naturally infected with *P. zopfii* GT2. Additionally, cross-reactivity of the sera was determined by western blot analysis of *P. zopfii* GT1, *P. zopfii* GT2, and *P. blaschkeae*.

Materials and Methods

Dogs and Sera

Sera from three dogs naturally infected with *Prototheca* collected during the routine diagnosis at the Institute of Animal Health and Environmental Hygiene, Freie Universität Berlin, were utilized in this study.

Case 1 (serum P): A female giant schnauzer (age: 7 years) suffered from chronic therapy-resistant diarrhea for more than one and a half year followed by a severe systemic protothecosis with neurological symptoms. Serum samples were obtained during the course of infection and pooled before use.

Case 2 (serum L): The female crossbreed (age: 9 years) suffered from a severe systemic protothecosis.

Case 3 (serum B): A female giant schnauzer with systemic protothecosis showing severe neurological symptoms.

Despite intensive therapeutic measures all three dogs finally had to be euthanized. *Prototheca* was isolated from the first two cases (P and L) and identified as *P. zopfii* GT2 using recommended molecular analysis (Möller et al., 2007) and MALDI TOF MS (Murugaiyan et al., 2012). *Prototheca* was not isolated from the third case; however, in addition to signs and symptoms, histological analysis, and species-specific PCR revealed the infection. Hence, the third sample (serum B) was utilized for comparative studies.

Sera (C, R, A) from three healthy dogs with no history of symptoms were used as negative controls.

Strains

The following type strains of different species or genotypes from the culture collection of the Institute of Animal Health and Environmental Hygiene were used: *P. zopfii* GT1 (SAG 2063^T) (Roesler et al., 2003), *P. zopfii* GT2 (SAG 2021^T) (Roesler et al., 2001), and *P. blaschkeae* (SAG 2064^T) (Roesler et al., 2006). These strains were originally isolated by the investigators and then deposited at the public strain collection “Stammsammlung für Algenkulturen” of the University of Göttingen (SAG). Additionally, the strains isolated from the dogs, cases 1 and 2, were designated as PZ-L and PZ-P, respectively.

Culture Conditions and Protein Extraction

Strains were cultured on Sabouraud dextrose agar at 37°C (except SAG 2063^T, which was cultured at 28°C) for 48 h. The culture temperature was chosen to represent the original environmental conditions and from our previous experience (Murugaiyan et al., 2012). A loop of colony was transferred in Sabouraud dextrose liquid medium and overnight cultured by shaking at 135 rpm. Following which, 2 ml of this culture was inoculated in 200 ml of medium and cultured as above. The whole-cell protein extraction was carried out as described (Murugaiyan et al., 2013). In brief, cells were harvested from 15 ml of culture by centrifugation at 2000 g for 5 min at room temperature. The pellet was washed two times in 1.5 ml PBS and resuspended in 1 ml lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4; 1 mM EDTA with 1% protease inhibitor cocktail tablet, 1% Triton X and 10% glycerol). Cell lysis was assisted by an additional sonication step on ice. After subsequent centrifugation, supernatant was collected and protein concentration was determined with Quick Start Bradford 1x Reagent Dye (BioRad, Munich, Germany).

Gel Electrophoresis

For sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1DE) 150 µg whole cell protein of SAG 2021^T was separated using a 12% SDS gel with preparative comb (Laemmli, 1970). The separation was carried out with 10 mA per gel for 15 min followed by increasing the current to 15 mA per gel until the dye reached the bottom of the gel.

Two-dimensional electrophoresis (2DE) was performed with 250 µg (western blot analysis) and with 500 µg up to 1 mg (preparative gel for protein identification). All the reagents and accessories for isoelectric focussing (IEF) were purchased from GE Healthcare. After acetone precipitation of the proteins, the pellet was resuspended in DeStreak Rehydration Solution containing 0.5% IPG buffer, centrifuged for 20 min at 18500 g, supernatant was transferred to 7 cm immobilized

pH gradient (IPG) drystrips (pH 3–10) and covered with mineral oil for passive rehydration overnight. The manufacturer's recommendations on IEF was followed: 300 V for 2 h, 300–1000 V for 1 h, 1000–5000 V for 2 h, holding 5000 V for another 1 h 30 min, total of 14750 V/h with current of 50 µA per strip. Subsequently, strips were incubated for 15 min for reduction in 2% dithioerythritol in equilibration buffer (0.05 M trichloroethylene HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 4% SDS, and 0.002% bromophenol blue). Strips were then rinsed with distilled water and subjected to alkylation with 2.5% iodoacetamide in the equilibration buffer for 15 min. Strips were stored at -20°C until further use. The second dimension separation was carried out on 12% SDS polyacrylamide gel using same conditions described for 1DE.

Prestained protein ladder (PageRuler™ Plus, ThermoScientific, Rockford, USA) was used as marker for 1DE as well as for 2DE. If desired the gels were stained with Colloidal Coomassie Brilliant Blue (Candiano et al., 2004).

Western Blot

Following protein separation on 1DE or 2DE, proteins were transferred to nitrocellulose membrane (BioRad, Munich, Germany) in a semi-dry blotting chamber at 80 mA per gel for 90 min using standard Towbin Buffer (Towbin et al., 1979). Membranes were blocked by incubating them overnight in 1% skin milk in Tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7.5), followed by three washing steps in TBS for 10 min. Membranes were stored at -20°C until further use. To facilitate simultaneous incubation of nine different serum samples 1D blot membrane, incubation manifolds (PR150, Hoefer, Holliston, USA) was utilized. 1DE and 2DE membranes were incubated with serum (1:100 in TBS with 0.5% Tween 20 referred as TBST) for 90 min. The membrane was then washed twice each for 10 min with TBS and then incubated with Anti-dog IgG (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA), 1:1500 diluted, for 90 min. Following secondary antibody exposure the membrane was washed twice 10 min each with TBST and finally washed for 5 min with TBS. Visualization was carried out by using tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich, Germany) following the manufacturer's instructions. The two serum samples (L and P) were applied to all five strains used in this study (Table 1). After stripping one membrane for each strain that had previously been developed with one of the positive sera, the negative serum C was applied. Membrane stripping was carried out by 30 min incubation with stripping buffer (62.5 mM Tris pH 6.7, 2% SDS, and 100 mM 2-mercaptoethanol). Then the membranes were washed several times in purified water followed

TABLE 1 | Overview of performed western blots and sera used.

Cell lysate/WB	SAG 2063 ^T (<i>P. zopfii</i> GT1)	PZ-P (<i>P. zopfii</i> GT2)	SAG 2021 ^T (<i>P. zopfii</i> GT2)	PZ-L (<i>P. zopfii</i> GT2)	SAG 2064 ^T (<i>P. blaschkeae</i>)
Serum	L (+)	L (+)	L (+)	L (+)	L (+)
	P (+)	P (+)	P (+)	P (+)	P (+)
	C (-)	C (-)	C (-)	C (-)	C (-)

+, serum of infection with *P. zopfii*; P, serum of dog 1 infected with strain PZ-P; L, serum of dog 2 infected with strain PZ-L; -, negative control (= serum “C”); GT, genotype.

by blocking overnight and proceeding with second antibody treatment.

2DE western blots were analyzed and compared using Delta2D software version 4.5.0 (Decodon, Greifswald, Germany) and the corresponding gel spots were identified on the Coomassie-stained gel by overlaying the western blot image with the image of the 2D gel.

Trypsin Digestion and Protein Identification

Protein spots that matched with the corresponding signals of the western blot were excised. The spots were subjected to trypsin digestion as described (Wareth et al., 2015). Thereafter 5 μ l of organic solvent (OS) (33% of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid) was added to the samples. One microliter of the peptide solution was mixed well with 1 μ l of α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA; 15 μ g/ μ l in OS), spotted on a ground steel MTP 384 target plate, air-dried completely and then measurements were carried out using matrix-assisted laser desorption ionization with a time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (Ultraflex II TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) that covers the range between 700 and 3500 Da was used for calibration, MALDI TOF peptide mass finger print (PMF) spectra were acquired in positive reflection mode with the following setting, ion source 1: 25 kV, ion source 2: 21.60 kV, lens: 10.50 kV, reflector 1: 26.30 kV, reflector 2: 13.60 kV. Measurements were carried out in the m/z range of 1000–3500 and seven of the intensive peaks were picked for lift spectra. The MS/MS product ion spectra were recorded in the laser-induced dissociation mode with the following settings; ion source 1: 8 kV, ion source 2: 7.20 kV, lens: 3.60 kV, reflector 1: 29.50 kV, reflector 2: 13.90 kV, lift 1: 19.00 kV, lift 2: 3.00 kV. Subsequently, BioTools 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was utilized to compare MS/MS data using MASCOT, www.matrixscience.com) against all entries of NCBI nr (GenBank) with the following parameters: trypsin digestion- up to one missed cleavage; fixed modifications-carbamidomethyl (C); variable modifications - oxidation (M); peptide tol.: \pm 100 ppm; MS/MS tol.: \pm 0.8 Da and peptide charge:+1.

Furthermore, seven samples were additionally analyzed by Proteome Factory (Berlin, Germany) using nanoLC-ESI-MSMS and the database search was carried out as described above.

Flow Cytometry

Expression of GAPDH on the surface of SAG 2063, SAG 2021, and SAG 2064 cells was analyzed by flow cytometry. A total of 1×10^7 cells (overnight culture as described above) were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, followed by one washing step with phosphate buffered saline (PBS). Cells were incubated with 5–10 μ g/ml polyclonal anti-GAPDH (Rockland, Limerick, USA) for 1 h at 37°C. After two additional washing steps, cells were stained with Alexa-Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG (1/500 dilution) for 1 h. After final two washes, cells were analyzed in FACSCalibur™ flow cytometer (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium). The intensity of fluorescence was analyzed using Flowing software (University of Turku, Finland). The experiment was repeated three times independently.

Results

Visual Analysis of Western Blots

In 2D-PAGE, proteins from *Prototheca* whole-cell extracts were evenly distributed over the selected pI range and well-resolved, as shown in Supplementary Material (Figure S1). Comparing the infectious strains PZ-L and PZ-P show high similarities between them and also each of them with SAG 2021^T, supporting their assignment as *P. zopffii* GT2 also at the proteome level.

Following optimization of serum and secondary antibody concentrations, all positive and negative serum samples were compared on a 1DE western blot membrane of SAG 2021^T to obtain an overview (Figure 1). All samples differed substantially in the resulting signal pattern which highlights the immunological variations among individuals. These differences were also reflected in their respective 2DE patterns. These were compared by pairwise overlays using image analysis software (Delta2D). Comparing the 2DE western blot patterns obtained by one of the serum samples on different cell lysates resulted in a high strain-, genotype- and species-cross-reactivity of both sera (Figure 2A). This suggest that antigen epitopes do not vary much between the *Prototheca* species and genotypes even though small differences are visible.

Comparison of both sera on a single membrane enables the identification of distinct protein spots that originate from individual immune responses (Figure 2B). Altogether, a total of

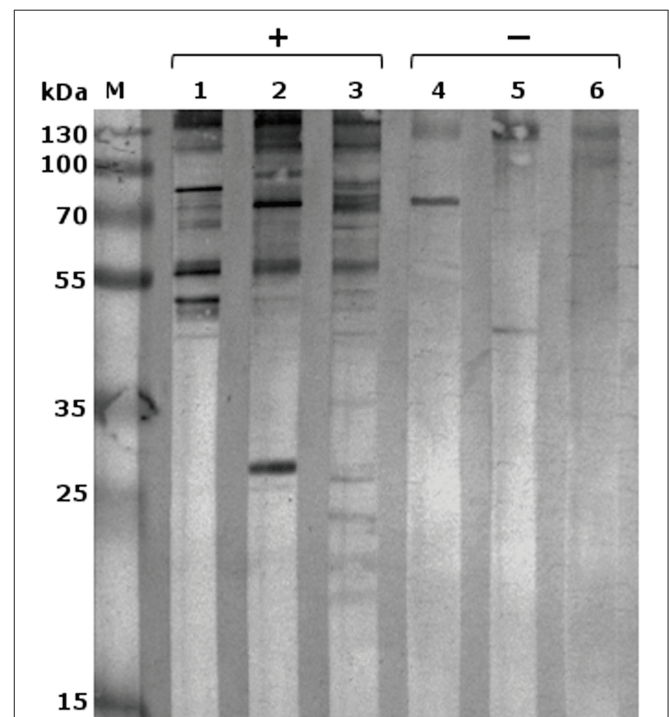
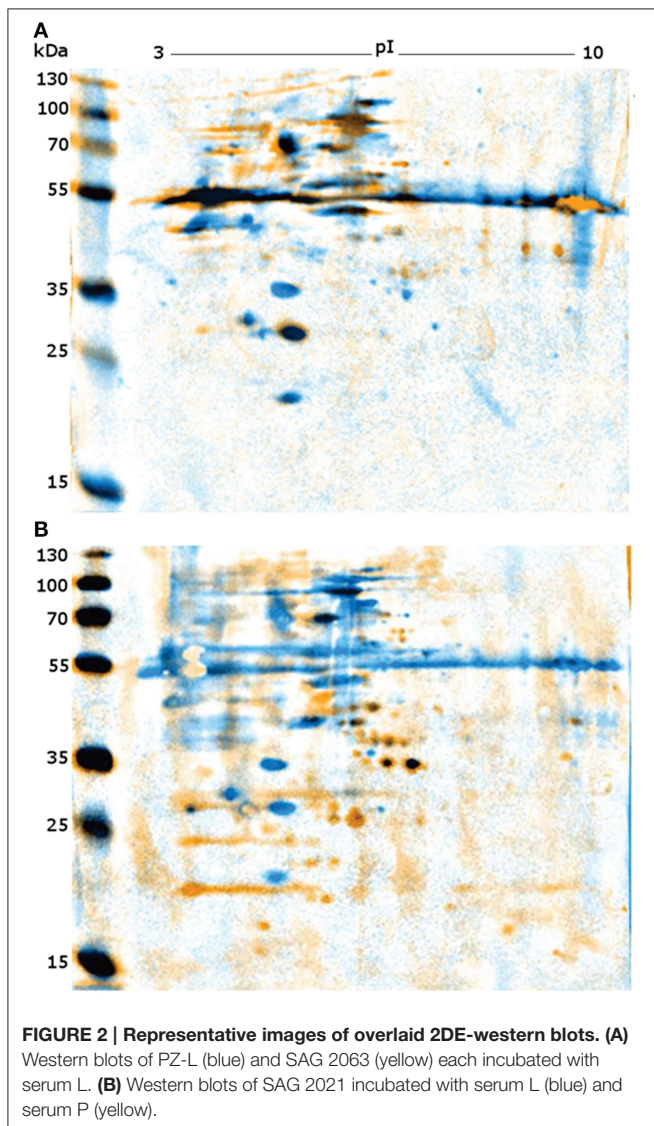


FIGURE 1 | 1DE-western blot of *P. zopffii* GT2 (SAG 2021) with different immune sera; M, marker; lanes 1–3 sera from infected dogs; and lanes 4–6 negative controls; 1, serum L; 2, serum P; 3, serum B; 4, serum R; 5, serum C; 6, serum A.



227 protein spots were detected from five membranes. For a better understanding of the large set of signal information across different membranes, the signals were classified in six categories based on visual comparison (Table 2).

Categories I–V consist of homologous signals which means that the signal can also be obtained on the associated western blot membrane (PZ-L and serum L; PZ-P and serum P). Figure 3 depicts the distribution of the signals in comparison to the sera used in this study. Serum L detects six and serum P nine proteins on western blot membranes of all five strains. Of note, the data of Figure 3 and Table 2 do not have to correspond. The Venn diagram only incorporates the events of antigen recognition so similar signals are not counted repeatedly, whereas data in Table 2 documents every labeled spot. According to Table 2, the major part of the western blot signals originated from non-specific antibody binding (category VI). Although proteins of special interest would fall into category II and ideally be detected by both immune sera, all proteins have been analyzed.

TABLE 2 | Categorization of the western blot signals based on visual comparison after overlaying the blots obtained from the strains and sera used in this study.

Category	Name	Characterization	No. of proteins (L/P)
I	Individual antigen	Signal of a serum on corresponding western blot membrane	11 (8/3)
II	genotype-specific antigen	Signals only detected on western blots of <i>P. zopfii</i> GT2	19 (6/13)
III	Common antigen	Signals detectable on all membranes of investigated strains	29 (17/12)
IV	Pathogenic-specific*	Signals for <i>P. zopfii</i> GT2 and <i>P. blaschkeae</i>	10 (8/2)
V	Species-specific antigen	Signals for <i>P. zopfii</i> (GT1+2)	12 (7/5)
VI	Unspecific antigen	Unspecific binding of antigens	146 (58/88)
			Σ 227 (104/123)

*This term is based on species included in the present study—the other known infectious species *P. wickerhamii* or *P. cutis* were not included; GT, genotype; P, serum of dog 1 infected with strain PZ-P; L, serum of dog 2 infected with strain PZ-L.

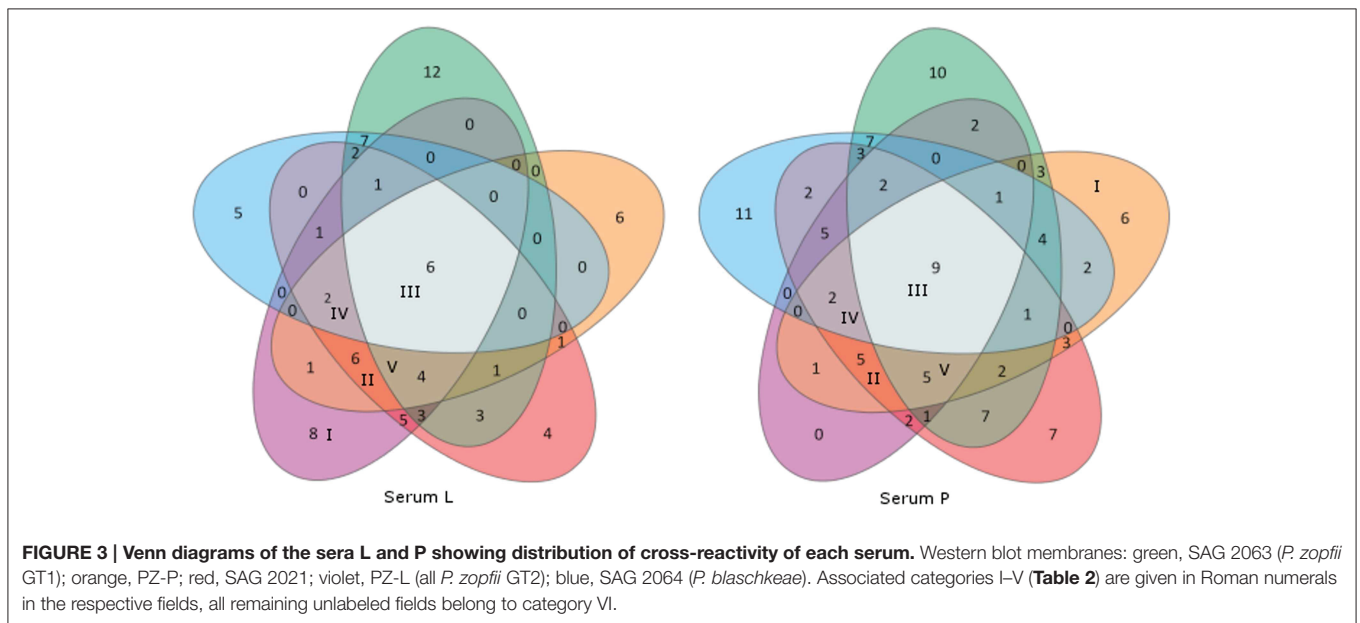
A preparative 2DE gel loaded with a higher amount of proteins (1 mg) was performed so as to enable efficient identification of proteins. In total, 198 proteins have been excised and analyzed via MALDI-TOF MS.

Immunoreactive Proteins

In summary 86 out of these 198 proteins could be identified. Most of the identified proteins appear to be involved in general cellular processes such as metabolism, cell cycle or, gene expression.

A structured overview is given in Table 3 where proteins are listed, which are either of special interest or represent typical results. Results obtained repeatedly are listed only once. The overall results, including spot numbers, hypothetical proteins, or implausible assignments are available in the Supplementary Material (Table S1).

One protein that was identified clearly and repeatedly is heat shock protein 70 (Hsp70). It was also identified from culture supernatant (unpublished data). Hsp70 was classified as genotype-specific antigen and traceable by both immune systems. Another example is glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), but in contrast to Hsp70 GAPDH is classified as a common antigen with stronger signals obtained using serum P. Interestingly serum P reacts more intensively on the membrane of PZ-L than on its homologous membrane of PZ-P. Triosephosphate isomerase could be detected by serum L on all membranes. Although identification via MALDI-TOF MS was not successful in this study, the protein identification was known from our earlier studies of difference gel electrophoresis (DIGE) and experimentally infected rabbits (Murugaiyan et al., 2013; Irrgang et al., 2015). Other recurrently detected proteins include malate dehydrogenase, elongation factor 1alpha (EF-1 α)



and ATPase. ATPase, phenylalanyl-tRNA synthetase, Hsp70, and malate dehydrogenase represent antigens specific for genotype 2 of *P. zopfii*.

Flow Cytometry Analysis

To examine whether GAPDH is expressed on the surface of *Prototheca*, a flow-cytometry analysis was performed (Figure 4). In this experiment, GAPDH was detected on the surface of *P. blaschkeae* (in 20% of the cell population) but not of *P. zopfii* (none of the genotypes).

Discussion

The microalgae *Prototheca* spp. are non-colored relatives of the well-known green algae, *Chlorella* sp. Their unique ability as a plant to cause severe and difficult-to-treat infections in vertebrates makes them fascinating for research. The mechanism of pathogenesis and their differences in pathogenicity are not understood yet, but valid knowledge hereof would be the key to develop tools for therapy (antimicrobial drugs) or for prevention by immunization. One aspect is the identification of immunoreactive proteins of *Prototheca* cells targeted by the present study. For that purpose sera from two dogs suffering from protothecosis caused by *P. zopfii* GT2 were used for western blot studies and MALDI-TOF MS-based identification of immunodominant proteins. The investigations involved strains of *P. zopfii* GT1 as non-pathogenic agent, *P. zopfii* GT2 as pathogenic representative with high prevalence and clinical manifestations and *P. blaschkeae* as pathogen with subclinical manifestations in cattle. Phylogenetic studies revealed a close relationship with distinct clusters of the species and genotypes (Ueno et al., 2003, 2005; Roesler et al., 2006). *P. wickerhamii*, another pathogenic *Prototheca* species is related much more closely to *Auxenachlorella* sp. than to the other *Prototheca* species and was therefore excluded from the present study.

The western blot signals were accordingly classified into six categories for the species included in this study. Genotype-specific antigens for *P. zopfii* GT 2 (category II), which were detected in both serum samples, were focused on since they might indicate virulence factors. With regard to bovine mastitis, caused by *P. zopfii* GT2 or *P. blaschkeae*, immunoreactive proteins assigned to category IV might be also of special interest. However, none of these proteins could be identified. The relatively low identification rate for *Prototheca* proteins is due to the fact that information on algal proteins is scarce since algae are strongly under-represented in the protein sequence databases. As a consequence of the absence of *Prototheca*-specific information in the public repositories only homologous proteins from other organisms can be retrieved and the identification scores generally tend to be lower. Regardless of this complication 86 proteins could be identified with significant scores. Due to the lack of *Prototheca* sequences in the database, most of the identified proteins are from other organisms. The fact that identifications are from very diverse species indicates that actually the proteins are from *Prototheca* rather than from one particular contaminating source, in which case more proteins should be identified from this contaminating species. Many of the identified proteins were metabolic and housekeeping proteins which might possess peptide sequences that are well conserved across species. We believe that in the case of “orphan species” such as *Prototheca* only those proteins are identified whose sequences are relatively well conserved across the species, while possibly more *Prototheca*-specific factors, where sequence divergence is larger, might be lost.

Hsp70 which was repeatedly identified in *P. zopfii* GT2 with both sera utilized, appears to be the major antigen of *Prototheca* infections. In our previous investigation using sera from experimentally infected rabbits Hsp70 was identified as immunoreactive, too (Irrgang et al., 2015). Hsp70 is a highly conserved protein family some members of which are

TABLE 3 | Representative list of identified proteins by MALDI TOF MS.

Protein	Organism	MOWSE Score	Category	Serum	Function	Identified from multiple gels
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Acidobacteria bacterium</i>	247*	III	L/P	Glycolysis	+
Heat shock protein 70	<i>Chlorella variabilis</i>	164	II	L/P	Intracellular: part of chaperon system; stress response Extracellular: proinflammatory immune response	+
Translation elongation factor- like protein (EF-1 α)	<i>Parachlorella kessleri</i>	159	III	L/P	Protein biosynthesis	+ ^a
ATPase alpha subunit	<i>Passiflora suberosa</i>	132	II	L	Energy metabolism	+ ^a
Triosephosphate isomerase	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	110	III	P	Glycolysis	a,b
Malate dehydrogenase	<i>Leishmania infantum</i>	115	II	L/P	diverse metabolic pathways	+a,b
PREDICTED: glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondrial	<i>Pelodiscus sinensis</i>	102	VI	P	Translation	-
Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	<i>Archaeoglobus sulfatcallidus</i>	101	II	L	Translation, ubiquitous	-
LysR family transcriptional regulator	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	99	III	L	Prokaryotic transcriptional regulator i.e., virulence	-
PREDICTED: protein BMH2 isoform 1	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	94**	III	P	Member of 14-3-3 protein family-> cell signaling	-
Radical SAM protein, TIGR01212	<i>Sorangium cellulosum</i>	93	V	L/P	Enzyme super family, catalytic metabolism	-
Putative phosphomannomutase	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. ivanovii	91	VI	L/P	Protein glycosylation, mannose synthesis	-
Protocatechuate 4,5-dioxygenase subunit alpha	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	90**	III	P	PCA -> break-down of lignin	-
3-dehydroquinate synthase	<i>Streptomyces rimosus</i>	89	I	P	Enzyme of shikimate-pathway	-

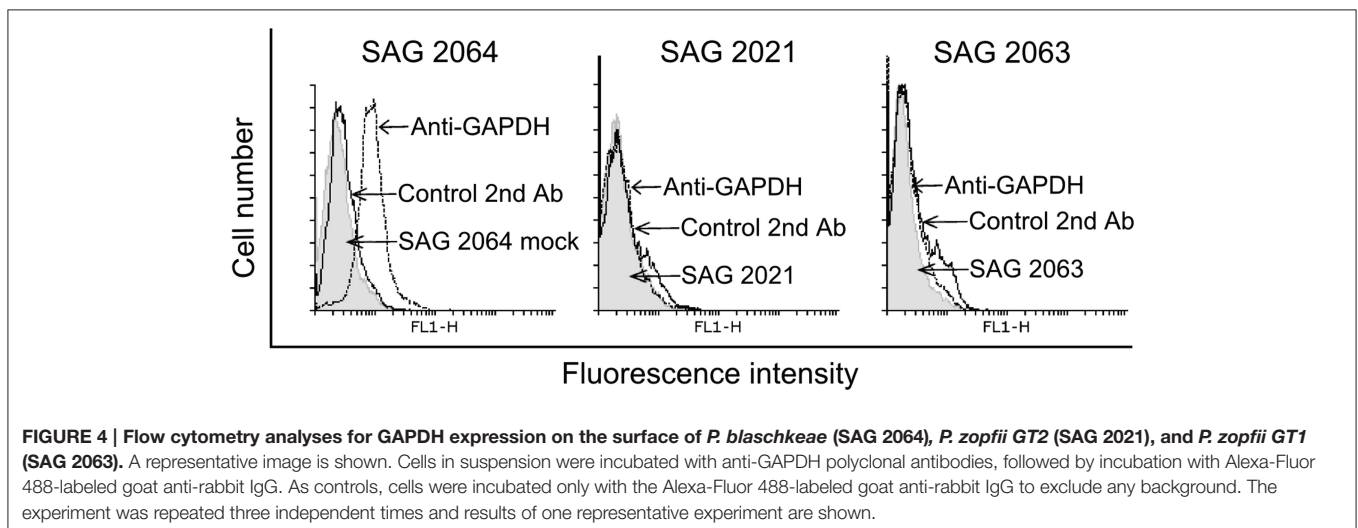
The MOWSE score (MOlecular WEight SEarch score) is calculated by $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. The identification is considered to be valid if the MOWSE score is greater than or equal to the significance threshold ($P < 0.05$). Category based on signals of different blots out of strains and sera used. P, serum of dog 1 infected with strain PZ-P; L, serum of dog 2 infected with strain PZ-L.

*Score from additional validation using nanoLC-ESI-MS/MS.

**Settings of MS/MS tolerance changed to 1.2 Da.

^aIdentification values from earlier study (Irrgang et al., 2015).

^bResults as reported in Murugaiyan et al. (2013).



stress-inducible proteins with chaperone functions while others are stress-independent proteins with house-keeping functions (Daugaard et al., 2007). Despite their mainly intracellular

functions, Hsp70 also may act as cytokine when located extracellularly (Asea et al., 2000). Hence, these proteins are known to be immunogenic in several eukaryotic infections.

Hsp70 represents the main target of immune response against *Cryptococcus neoformans* (Kakeya et al., 1997, 1999) and might be a target for immunization (Chaturvedi et al., 2013). Hsp70 of *Schistosoma mansoni* was found to be immunoreactive in humans (Ludolf et al., 2014) and Hsp70 of the nematode *Anisakis* was considered to be an allergenic protein (Arcos et al., 2014). Eliciting a strong pro-inflammatory response by Hsp70 of *Prototheca zopfii* GT2 might be an explanation for the observed inflammation especially of the udder of infected dairy cattle. This is consistent with the fact that the uptake rate of *P. zopfii* GT2 by macrophages is higher in comparison to GT1 going along with higher resistance to digestion (unpublished data). Furthermore, Hsp70 was also detected in culture supernatants of *Prototheca*. This supports the theory of an immunogenic role of Hsp70 during infection.

Like Hsp70, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was found to be an allergen of *Anisakis* and also an immunogenic protein of *Schistosoma* and *Cryptococcus* (Martins et al., 2013; Arcos et al., 2014; Ludolf et al., 2014). Additionally there are several studies which evince the presence of house-keeping enzymes such as GAPDH or triosephosphate isomerase at the surface of pathogens (Pancholi and Chhatwal, 2003). There, GAPDH acts as virulence factor due to adherence on host cells (Fu, 2013). Moreover, surface GAPDH of group A streptococci is an ADP-ribosylating enzyme, with ADP ribosylation being the mechanism of some bacterial toxins (Moss and Vaughan, 1988; Pancholi and Fischetti, 1993). Unfortunately, there is little known about surface proteins of *Prototheca* cells. In order to verify the presence of GAPDH on the *Prototheca* surface, the cells were subjected to a flow cytometry analysis, the results of which indicated the presence of GAPDH on the surface of *P. blaschkeae* but not of *P. zopfii*. This might be one of the reasons for varying mechanism in pathogenesis between those species. Besides GAPDH, the other identified enzymes such as triosephosphate isomerase and enolase have also been described to be present on the surface of pathogens. Hence, further research to confirm the presence of these enzymes on the surface of pathogenic *Prototheca* sp. is highly recommended.

Phosphomannomutase is another protein of immunological interest. This enzyme is supposed to be an indirect virulence factor for *Cryptococcus* sp. and was detected through immunoblotting using patient sera (Martins et al., 2013). It is needed for synthesizing mannose, a major component of the *Cryptococcus* capsule which represents the main virulence factor. The capsule protects the cells against immune system, either because of being an antiphagocytic factor or due to having immunosuppressive effects when extruded into surrounded tissue and liquids. Mannose is a component of lipopolysaccharide (LPS), which supports the earlier description of LPS-like molecules in the cell wall of *Prototheca* (Bedick et al., 2001). This aLPS was able to stimulate the insect immune system but was not recognized by murine macrophages. Potential immunosuppressive effects of intact *Prototheca wickerhamii* cells were also reported by Perez et al., which is in contrast to possible immune activation by Hsp70 (Pérez

et al., 1997). The sera showed no cross-reactivity, however, with Hsp70 of the non-pathogenic genotype 1 of *P. zopfii* or of *P. blaschkeae*, indicating a special form or genotype 2-specific epitopes of Hsp70. In contrast the sera were only reactive with phosphomannomutase of SAG 2063 (*P. zopfii* GT1) and therefore with the non-pathogenic form. In case *P. zopfii* GT1 might additionally lack a key virulence factor, this could be an explanation for their non-pathogenicity. Furthermore, Pérez et al. (1997) proposed that only dead *Prototheca* cells might induce an inflammatory response. This is supported by the results of the present study, where predominantly intracellularly located antigens were identified besides the discussed exceptions.

One of these intracellularly located antigens is malate dehydrogenase (MDH). This key enzyme of many metabolic pathways, including citric acid cycle, seems to play a specific role in antigen recognition of eukaryotic infections, especially fungal infections. The sera of patients with aspergillosis, infections of *Candida albicans*, or *Paracoccidioides brasiliensis* were also reported to possess antibodies against MDH (da Fonseca et al., 2001; Pitarch et al., 2004; Shi et al., 2012). The influence of MDH on inducing a host immune response or its role in pathogenicity is not clear. This enzyme appeared to be one of the antigens specific for genotype 2 of *P. zopfii*.

Taken together this study reveals among the immunodominant proteins of *Prototheca* a certain number of proteins that are also known as eukaryotic antigens. Protothecosis is a rare but severe infection with an increasing economic impact in dairy farming. Since there are no available therapies, options of immunization or immune therapy should be a focus of *Prototheca* research. Protein extracts might be used for inducing a protective immune response as a first approach. Once the genome of *Prototheca* is sequenced, *Prototheca*-specific pathways of infection could be clarified and a specific immunization based on recombinant proteins may become possible.

Acknowledgments

We thank Michael Kühl for technical support and Vanessa Palm and the colleagues from the Clinics of small animals of Freie Universität Berlin for collection the positive sera from the diseased dogs. For mass spectrometry (CW), we would like to acknowledge the assistance of the Core Facility BioSupraMol supported by the DFG.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2015.00067>

Figure S1 | 2D gel electrophoretic pattern of *Prototheca* strains. Spot ID with prefix L and P indicates that the western blot signals were observed with serum L and P, respectively. **(A)** SAG 2021 (*P. zopfii* GT2), **(B)** SAG 2063 (*P. zopfii* GT1), **(C)** SAG 2064 (*P. blaschkeae*), **(D)** PZ-L (*P. zopfii* GT2), and **(E)** PZ-P (*P. zopfii* GT2).

Table S1 | List of proteins identified by MALDI TOF MS. Spot ID is the spot excised based on the western blot signals where L and P represents the signals out of serum L and P, respectively and K represents the signals obtained from both of the sera with results from earlier study. Gel positions of spot numbers are shown in Supplementary Figure S1. Gel represents 2D gel from where spots were excised, *P. zopfii* GT1 (SAG 2063), *P. zopfii* GT2 (SAG SAG 2021, PZ-L, PZ-P), and *P. blaschkeae* (SAG 2064). NCBI Acc. No. is the accession number of the proteins identified by comparing the peptide sequence with NCBI databank, Uniprot Acc. No. is the accession number of the proteins with Uniprot. MW, molecular weight calculated from identified protein sequence, The MOWSE

score (MOlecular Weight SEarch score) is calculated by $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. The identification is considered to be valid if the MOWSE score is greater than or equal to the significance threshold ($P < 0.05$). This list includes only those proteins identified with a, pI, isoelectric point as calculated from the identified protein sequence, sequence coverage is the % of sequence of the matching peptides and category represents the grouping of western blotting signal (I-Individual antigen, II-genotype-specific antigen, III-common antigen, IV-Pathogenic specific for the species included in this study, V-species specific antigen, and VI-Unspecified antigen). (A) MS/MS product ion search result and (B) MS (PMF) ion search result.

References

- Arcos, S. C., Ciordia, S., Roberston, L., Zapico, I., Jiménez-Ruiz, Y., Gonzalez-Muñoz, M., et al. (2014). Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *Proteomics* 14, 1547–1568. doi: 10.1002/pmic.201300529
- Asea, A., Kraeft, S.-K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., et al. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6, 435–442. doi: 10.1038/74697
- Bedick, J. C., Shnyra, A., Stanley, D. W., and Pardy, R. (2001). Innate immune reactions stimulated by a lipopolysaccharide-like component of the alga *Prototheca* (strain 289). *Naturwissenschaften* 88, 482–485. doi: 10.1007/s00114-001-0269-8
- Camboim, E. K. A., Garino, F. J., Dantas, A. F. M., Simões, S. V. D., Melo, M. A., Azevedo, E. O., et al. (2011). Protothecosis by *Prototheca wickerhamii* in goats. *Mycoses* 54, e196. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01864.x
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., et al. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327–1333. doi: 10.1002/elps.200305844
- Chao, S.-C., Hsu, M.-L., and Lee, J.-Y. (2002). Cutaneous protothecosis: report of five cases. *Br. J. Dermatol.* 146, 688–693. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04609.x
- Chaturvedi, A. K., Weintraub, S. T., Lopez-Ribot, J. L., and Wormley, F. L. (2013). Identification and characterization of *Cryptococcus neoformans* protein fractions that induce protective immune responses. *Proteomics* 13, 3429–3441. doi: 10.1002/pmic.201300213
- Daugaard, M., Rohde, M., and Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581, 3702–3710. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.039
- da Fonseca, C. A., Jesuino, R. S., Felipe, M. S., Cunha, D. A., Brito, W. A., and Soares, C. M. (2001). Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 3, 535–542. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01409-5
- Font, C., Mascort, J., Márquez, M., Esteban, C., Sánchez, D., Durall, N., et al. (2014). Paraparesis as initial manifestation of a *Prototheca zopfii* infection in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 55, 283–286. doi: 10.1111/jsap.12188
- Fu, Q. (2013). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, an immunogenic *Streptococcus equi* ssp. *zoepidemicus* adhesion protein and protective antigen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 579–585. doi: 10.4014/jmb.1209.09037
- Irrgang, A., Weise, C., Murugaiyan, J., and Roesler, U. (2015). Identification of immunodominant proteins of the microalgae *Prototheca* by proteomic analysis. *New Microbes New Infect.* 3, 37–40. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.004
- Jagielski, T., Lassa, H., Ahrholdt, J., Malinowski, E., and Roesler, U. (2011). Genotyping of bovine *Prototheca mastitis* isolates from Poland. *Vet. Microbiol.* 149, 283–287. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.09.034
- Takeya, H., Udono, H., Ikuno, N., Yamamoto, Y., Mitsutake, K., Miyazaki, T., et al. (1997). A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. *Infect. Immun.* 65, 1653–1658.
- Takeya, H., Udono, H., Maesaki, S., Sasaki, E., Kawamura, S., Hossain, M. A., et al. (1999). Heat shock protein 70 (hsp70) as a major target of the antibody response in patients with pulmonary cryptococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 485–490. doi: 10.1046/j.1365-2249.1999.00821.x
- Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K., Ito, T., et al. (2010). 26S rDNA-based phylogenetic investigation of Japanese cattle-associated *Prototheca zopfii* isolates. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 123–126. doi: 10.1292/jvms.09-0115
- Krüger, W. (1894). Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Saftflusse der Laubbäume. *Hedwigia* 33, 241–266.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Lass-Florl, C., and Mayr, A. (2007). Human protothecosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 230–242. doi: 10.1128/CMR.00032-06
- Leimann, B. C. Q., Monteiro, P. C. F., Lazera, M., Candanoza, E. R. U., and Wanke, B. (2004). Protothecosis. *Med. Mycol.* 42, 95–106. doi: 10.1080/13695780310001653653
- Lerche, M. (1954). Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. *Berl. Muench. Tierärztl. Wochenschr.* 65, 64–69.
- Lloyd, D., and Turner, G. (1968). The cell wall of *Prototheca zopfii*. *J. Gen. Microbiol.* 50, 421–427. doi: 10.1099/00221287-50-3-421
- Ludolf, F., Patrocínio, P. R., Corrêa-Oliveira, R., Gazzinelli, A., Falcone, F. H., Teixeira-Ferreira, A., et al. (2014). Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2745. doi: 10.1371/journal.pntd.0002745
- Marques, S., Silva, E., Kraft, C., Carvalheira, J., Videira, A., Huss, V. A. R., et al. (2008). Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1941–1945. doi: 10.1128/JCM.00323-08
- Martins, L. M. S., de Andrade, H. M., Vainstein, M. H., Wanke, B., Schrank, A., Balaguez, C. B., et al. (2013). Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. *Future Microbiol.* 8, 549–563. doi: 10.2217/fmb.13.22
- Melville, P. A., Watanabe, E. T., Benites, N. R., Ribeiro, A. R., Silva, J. A., Garino, F. Jr., et al. (1999). Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia* 146, 79–82. doi: 10.1023/A:1007005729711
- Möller, A., Truyen, U., and Roesler, U. (2007). *Prototheca zopfii* genotype 2 - The causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet. Microbiol.* 120, 370–374. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.10.039
- Moss, J., and Vaughan, M. (1988). ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 61, 303–379. doi: 10.1002/9780470123072.ch6
- Murugaiyan, J., Ahrholdt, J., Kowbel, V., and Roesler, U. (2012). Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green microalgae of the genus *Prototheca*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 461–467. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03593.x
- Murugaiyan, J., Weise, C., von Bergen, M., and Roesler, U. (2013). Two-dimensional proteome reference map of *Prototheca zopfii* revealed reduced metabolism and enhanced signal transduction as adaptation to an infectious life style. *Proteomics* 13, 2664–2669. doi: 10.1002/pmic.201300037
- Osumi, T., Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K., et al. (2008). *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet. Microbiol.* 131, 419–423. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.012
- Pancholi, V., and Chhatwal, G. S. (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 391–401. doi: 10.1078/1438-4221-00283

- Pancholi, V., and Fischetti, V. A. (1993). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8154–8158. doi: 10.1073/pnas.90.17.8154
- Pérez, J., Ginel, P. J., Lucena, R., Hervás, J., and Mozos, E. (1997). Canine cutaneous protothecosis: an immunohistochemical analysis of the inflammatory cellular infiltrate. *J. Comp. Pathol.* 117, 83–89. doi: 10.1016/S0021-9975(97)80068-0
- Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2004). Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 4, 3084–3106. doi: 10.1002/pmic.200400903
- Pore, R. S., Barnett, E. A., Barnes, W. C., and Walker, J. D. (1983). *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* 81, 49–62. doi: 10.1007/BF00443909
- Pore, R. S., and Shahan, T. A. (1988). *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. *Mycopathologia* 101, 85–88. doi: 10.1007/BF00452891
- Ribeiro, M. G., Rodrigues de Farias, M., Roesler, U., Roth, K., Rodigheri, S. M., Ostrowsky, M. A., et al. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. *Res. Vet. Sci.* 87, 479–481. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.04.015
- Roesler, U., Möller, A., Hensel, A., Baumann, D., and Truyen, U. (2006). Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1419–1425. doi: 10.1099/ijs.0.63892-0
- Roesler, U., Scholz, H., and Hensel, A. (2001). Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J. Clin. Microbiol.* 39, 539–543. doi: 10.1128/JCM.39.2.539-543.2001
- Roesler, U., Scholz, H., and Hensel, A. (2003). Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1195–1199. doi: 10.1099/ijs.0.02556-0
- Satoh, K., Ooe, K., Nagayama, H., and Makimura, K. (2010). *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1236–1240. doi: 10.1099/ijs.0.016402-0
- Shi, L. N., Li, F. Q., Huang, M., Lu, J. F., Kong, X. X., Wang, S. Q., et al. (2012). Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GlIT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis. *BMC Microbiol.* 12:11. doi: 10.1186/1471-2180-12-11
- Stenner, V. J., MacKay, B., King, T., Barrs, V. R. D., Irwin, P., Abraham, L., et al. (2007). Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. *Med. Mycol.* 45, 249–266. doi: 10.1080/13693780601187158
- Thiele, D., and Bergmann, A. (2002). Protothecosis in human medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204, 297–302. doi: 10.1078/1438-4639-00105
- Thompson, G., Silva, E., Marques, S., Müller, A., and Carvalheira, J. (2009). Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. *Med. Mycol.* 47, 527–531. doi: 10.1080/13693780802566341
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350
- Ueno, R. (2009). Visualization of sporopollenin-containing pathogenic green micro-alga *Prototheca wickerhamii* by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Can. J. Microbiol.* 55, 465–472. doi: 10.1139/W08-155
- Ueno, R., Hanagata, N., Urano, N., and Suzuki, M. (2005). Molecular phylogeny and phenotypic variation in the heterotrophic green algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 41, 1268–1280. doi: 10.1111/j.1529-8817.2005.00142.x
- Ueno, R., Urano, N., and Suzuki, M. (2003). Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 275–280. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00394-X
- Walker, J. D., Colwell, R. R., Vaituzis, Z., and Meyer, S. A. (1975). Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii*. *Nature* 254, 423–424. doi: 10.1038/254423a0
- Wareth, G., Melzer, F., Weise, C., Neubauer, H., Roesler, U., and Murugaiyan, J. (2015). Proteomics-based identification of immunodominant proteins of *Brucellae* using sera from infected hosts points towards enhanced pathogen survival during the infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 202–206. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.059
- Zhao, J., Liu, W., Lv, G., Shen, Y., and Wu, S. (2004). Protothecosis successfully treated with amikacin combined with tetracyclines. *Mycoses* 47, 156–158. doi: 10.1046/j.1439-0507.2003.00955.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Irrgang, Murugaiyan, Weise, Azab and Roesler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3 Ergänzung nicht publizierter Ergebnisse

Die erste Publikation befasst sich mit der Identifikation immunreaktiver Proteine bei induzierter Protothekose von Kaninchen durch *P. zopfii* GT2. Die zweite Publikation handelt von Antigenen natürlicher caniner Protothekosen, hervorgerufen durch *P. zopfii* GT2, einschließlich der Kreuzreaktionen der verwendeten Seren mit weiteren Stämmen von *P. zopfii* GT1, *P. zopfii* GT2 und *P. blaschkeae*. Die nachfolgend aufgeführten ergänzenden Ergebnisse gehen auf die Kreuzreaktion des in der Publikation 1 verwendeten Kaninchenserums (polyvalentes Hyperimmunserum gegen SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2); kurz: erstes anti-*P. zopfii* GT2-Serum) mit Proteinen von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae* ein. Darüber hinaus werden vergleichende Ergebnisse mit einem weiteren Kaninchenserum (zweites anti-*P. zopfii* GT2-Serum) beschrieben. Verwendete Materialien und angewandte Methoden sind der Publikation 1 zu entnehmen.

3.1 Kreuzreaktivität des ersten anti-*P. zopfii* GT2-Serums

Die Proteinextrakte der Stämme SAG 2063^T (*P. zopfii* GT1), SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2) und SAG 2064^T (*P. blaschkeae*) wurden mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurden jeweils mit dem ersten anti-*P. zopfii* GT2-Serum als erstem Antikörper inkubiert, um die immunogenen Proteine zu detektieren. Die Bilder der Western Blot Membranen wurden mittels der Software Delta2D (Decodon, Greifswald) paarweise übereinandergelegt und die Signalverteilung verglichen. Generell gab es eine hohe Reaktivität des ersten anti-*P. zopfii* GT2-Serums auch auf Proteine von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae*. Abbildung 2 (folgende Seite) zeigt die Verteilung der Kreuzreaktivität des Serums. Daraus ist ersichtlich, dass eine fehlende Kreuzreaktivität nur bei fünf Proteinspots vorkam. Diese stellen demnach die genotypspezifischen Antigene (*P. zopfii* GT2) einer induzierten Protothekose bei Kaninchen dar. Es gab 18 Signale auf allen drei Western Blot Membranen, deren Proteine als allgemeine Prototheken-Antigene (analog Publikation 2) bezeichnet werden können. Die Bezeichnung „gattungsspezifisches Antigen“ wird an dieser Stelle vermieden, da nicht alle bekannten Arten der Gattung *Prototheca* in die Untersuchungen einbezogen werden konnten. Interessant ist der hohe Anteil nicht-homologer Signale, d.h. 32 Proteinspots führten auf den Membranen SAG 2063^T und / oder SAG 2064^T zu Signalen, nicht jedoch auf der Western Blot Membran von SAG 2021^T. Diese stellen unspezifische Kreuzreaktionen dar.

In 10 Fällen gab es eine Kreuzreaktion zwischen *P. zopfii* GT1 und *P. zopfii* GT2. Somit

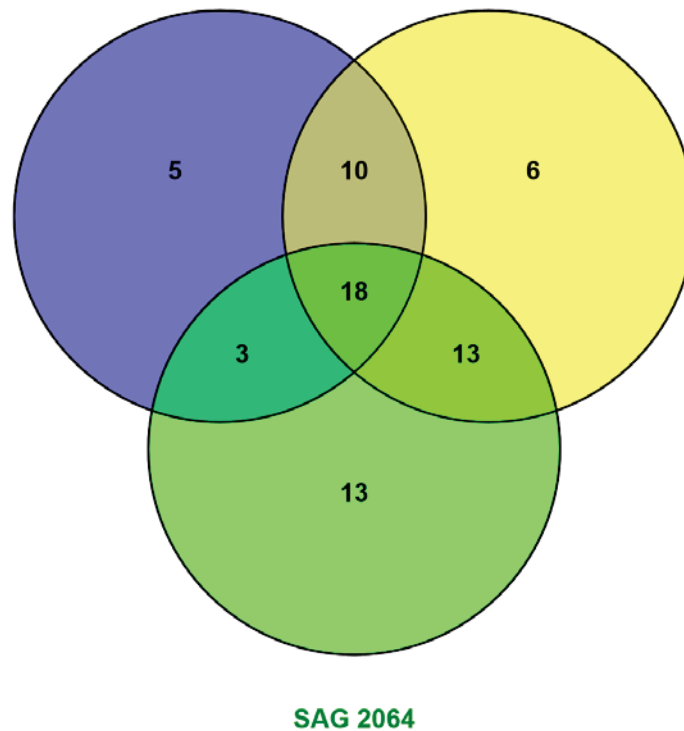


Abbildung 2: Venn-Diagramm zur Kreuzreaktivität des ersten anti-*P. zopfii* GT2-Serum.

Blau: Signale, die auf der Western Blot Membran von SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2) detektiert wurden.

Gelb: Signale, die auf der Western Blot Membran von SAG 2063^T (*P. zopfii* GT1) detektiert wurden.

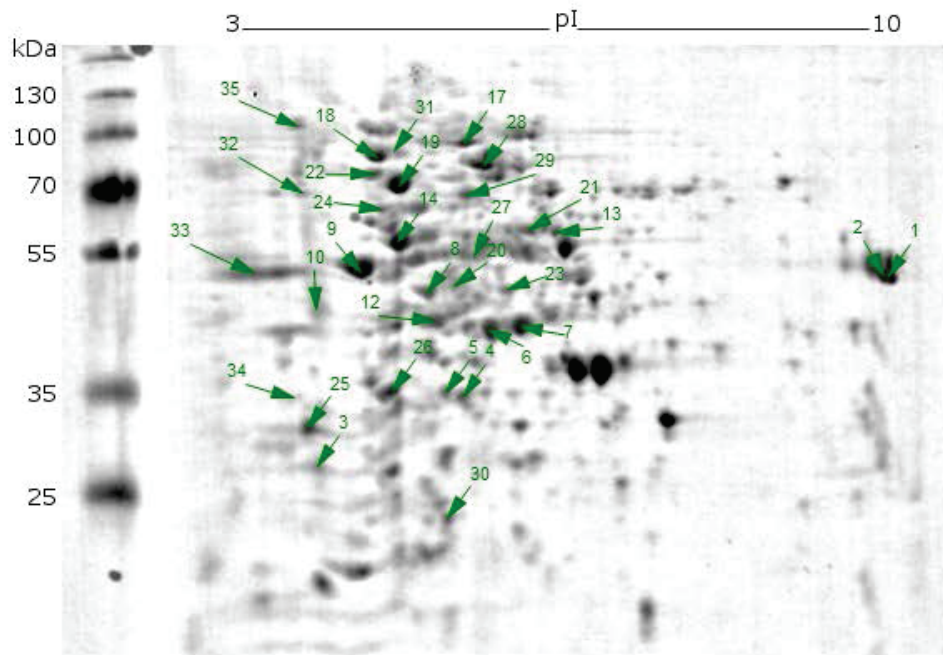
Grün: Signale, die auf der Western Blot Membran von SAG 2064^T (*P. blaschkeae*) detektiert wurden.

Proteinspots, welche auf mehreren Membranen Signale ergaben, befinden sich in den jeweiligen Schnittmengen. Die Abbildung wurde erstellt mittels: Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

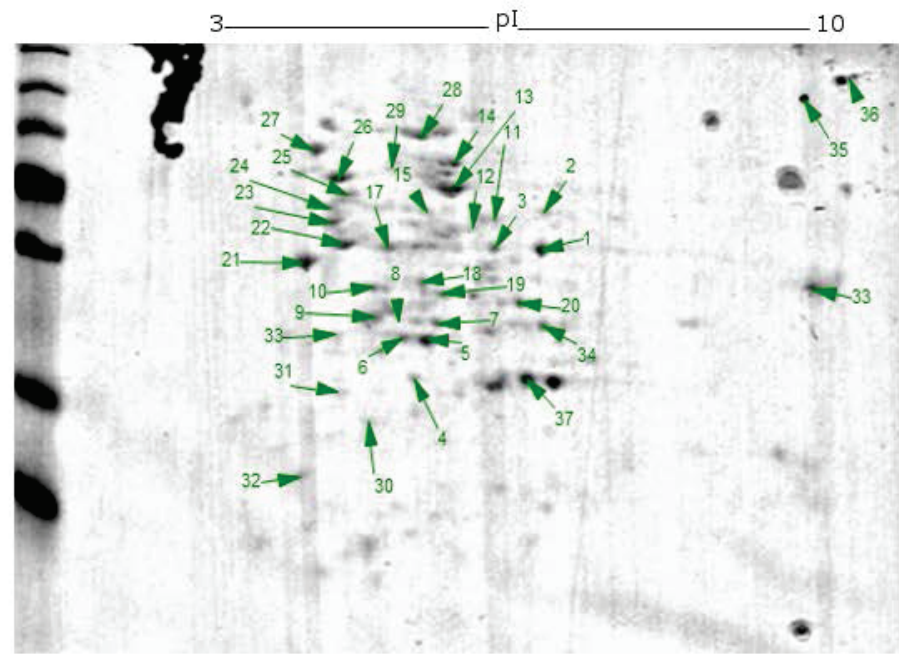
scheinen die dazugehörigen Antigene speziesspezifischer Natur zu sein. Drei Signale wurden jeweils bei den pathogenen Vertretern SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2) und SAG 2064^T (*P. blaschkeae*) detektiert. Die Bezeichnung „pathogenitätsassoziiertes Antigen“ kann allerdings nur im engeren Sinn der hier einbezogenen Spezies verwendet werden, da auch die in dieser Studie nicht untersuchten Arten *P. wickerhamii* und *P. cutis* als pathogen gelten.

3.2 Bestimmung der antigenen Proteine von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae*

Durch Überlagerung der Membranbilder mit den Bildern der 2D-SDS-PAGE wurden die reaktiven Proteine von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae* detektiert. Die entsprechenden Proteinspots (Abbildung 3) wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI TOF MS analysiert. Von den 61 analysierten Proteinen konnten 48 identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.



SAG 2063^T



SAG 2064^T

Abbildung 3: 2D-SDS-PAGE von SAG 2063^T (*P. zopfii* GT1, links) und SAG 2064^T (*P. blaschkeae*, rechts). Die mit dem ersten anti-*P. zopfii* GT2-Serum reaktiven Proteinspots wurden mittels Delta2D (Decodon) markiert und zur Analyse mittels MALDI TOF MS aus den Gelen ausgeschnitten und tryptisch verdaut.

Tabelle 4: Ergebnisse der MALDI-TOF MS Analyse der kreuzreaktiven Proteine von SAG 2063^T(*P. zopfii* GT1) und SAG 2064^T(*P. blaschkeae*).

MOWSE Score (**M**olecular **W**eight **S**earch Score): Wahrscheinlichkeitsbasierte Methode um Proteine anhand ihrer Masse zu bestimmen. Der Algorithmus wurde von PAPPIN et al. (1993) etabliert [208]. Ein Protein gilt als identifiziert, wenn der MOWSE Score größer/gleich der Signifikanz des Schwellenwertes ($p < 0,05$) ist und mehr als zwei Peptide erkannt wurden; pI: isoelektrischer Punkt des Proteins, errechnet aus der Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins. Die Namen der Proteine entsprechend den originalen Datenbankeinträgen und sind daher auf Englisch.

Spot Nr.	NCBI ID	Proteinname	Organismus	Molekular- gewicht in kDa	MOWSE Score	Anzahl Peptide	pI	% Sequenz- abdeckung	Funktion
SAG 2063^T (<i>P. zopfii</i> GT1)									
1	gi 148524171	elongation factor-1 alpha-like protein	<i>Tetraselmis tetrathele</i>	49499	115	8	8,86	19	Translation
2	gi 148524171	elongation factor-1 alpha-like protein	<i>Tetraselmis tetrathele</i>	49499	135	7	8,86	17	Translation
4	gi 259480305	TPA: malate dehydrogenase (Eurofung)	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	35778	145	7	8,8	33	Stoffwechsel u.a. Citratzyklus
5	gi 310798845	malate dehydrogenase	<i>Colletotrichum graminicola</i>	35244	129	6	8,63	16	Stoffwechsel u.a. Citratzyklus
6*	gi 489980589	MarR family transcriptional regulator	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	18678	96	11	10,1 3	75	Transkriptions- regulation, beteiligt an AB Resistenz
7*	gi 518127197	N-methylproline demethylase	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	74548	95	15	5,79	29	Oxidase
8	gi 3776021	RNA helicase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	50232	90	14	5,18	23	Replikation
9	gi 72386615	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	<i>Trypanosoma brucei</i>	55969	148	8	5,29	15	Energiegewinnung
12	gi 477381292	actin 7, partial	<i>Caragana korshinskii</i>	31822	103	4	5,58	22	Zellstruktur

Spot Nr.	NCBI ID	Proteinname	Organismus	Molekulargewicht in kDa	MOWSE Score	Anzahl Peptide	pI	% Sequenzabdeckung	Funktion
13	gi 11466576	ATP synthase F1 subunit alpha	<i>Rhodomonas salina</i>	55876	260	9	6,93	21	Energiegewinnung
14*	gi 517215625	hypothetical protein	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	131220	94	18	6,02	22	unbekannt
17_1*	gi 507081301	protein BolA	<i>Citrobacter</i>	12043	92	7	6,18	74	Stressantwort
17_2	gi 498333734	NAD-glutamate dehydrogenase	<i>Vibrio campbellii</i>	183932	86	17	5,32	16	Stickstoffmetabolismus
18	gi 32967469	90-kDa heat-shock protein, partial	<i>Nematostella vectensis</i>	66537	94	7	5,01	12	u.a. Stressantwort
19	gi 281333439	70 kDa heat shock protein	<i>Thitarodes pui</i>	71514	225	7	5,33	16	u.a. Stressantwort
20	gi 15076497	actin	<i>Nannochloris maculata</i>	26424	88	3	4,97	26	Strukturprotein, zellulärer Transport
21	gi 186920113	ATP synthase F0 subunit 1	<i>Hemiselmis andersenii</i>	53480	206	7	7,67	17	Energiegewinnung
22*	gi 586545242	PREDICTED: protein FAM47E	<i>Pteropus alecto</i>	58143	93	8	9,5	17	Transkription
24	gi 523460781	ATP synthase subunit beta	<i>Desulfovibrio alkalitolerans</i>	50301	162	7	4,99	24	Energiegewinnung
27	gi 2454484	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	19504	117	6	9,47	36	Proteinbiosynthese
28*	gi 75906255	DNA topoisomerase I	<i>Anabaena variabilis</i>	97257	101	20	8,24	22	Transkription / Replikation

Spot Nr.	NCBI ID	Proteinname	Organismus	Molekulargewicht in kDa	MOWSE Score	Anzahl Peptide	pI	% Sequenzabdeckung	Funktion
29*	gi 242032503	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g003510	<i>Sorghum bicolor</i>	51850	90	10	8,84	34	unbekannt
30*	gi 281212116	hypothetical protein PPL_00839	<i>Polysphondylium pallidum</i> PN500	70221	88	13	9,32	28	unbekannt
31*	gi 488361857	beta-D-glucoside glucohydrolase	<i>Escherichia coli</i>	82340	96	14	5,61	23	Zellwandabbau
32*	gi 255088499	predicted protein	<i>Micromonas sp.</i> RCC299	69121	91	16	9,91	30	unbekannt
33*	gi 525918327	glutamate synthase	<i>Listeria monocytogenes</i>	169169	88	18	5,8	14	Stickstoffmetabolismus
35	gi 475676482	hypothetical protein FOC4_g10000547, partial	<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4</i>	22993	88	9	6,47	61	unbekannt
SAG 2064 ^T (<i>P. blaschkeae</i>)									
1	gi 114411	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial		55595	216	16	6,51	33	Energiegewinnung
3	gi 164685576	atp1, partial (syn.: ATP Synthase subunit alpha)	<i>Borago officinalis</i>	44739	173	11	8,25	28	Energiegewinnung
4	gi 470103764	PREDICTED: malate dehydrogenase, glyoxysomal-like	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	38017	87	5	8,12	17	divers u.a. Citratzyklus
6*	gi 445937245	rhsA	<i>Escherichia coli</i>	158762	105	18	6,19	19	Selbstproteolyse

Spot Nr.	NCBI ID	Proteinname	Organismus	Molekulargewicht in kDa	MOWSE Score	Anzahl Peptide	pI	% Sequenzabdeckung	Funktion
7*	gi 498180835	DNA primase	<i>Paenibacillus elgii</i>	37734	89	11	9,51	32	Replikation
8	gi 15076497	actin	<i>Nannochloris maculata</i>	26424	91	2	4,97	19	Strukturprotein, zellulärer Transport
9*	gi 298715868	calmodulin-domain protein kinase	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	11832	94	8	9,95	69	Proteinphosphorylierung
10*	gi 495289164	DNA recombination protein RmuC	<i>Pseudomonas</i> sp.	55249	88	15	5,13	34	unbekannt, evtl. Schutz vor Nukleasen
13*	gi 491635818	Pantoate--beta-alanine ligase	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	31204	90	12	6,08	40	Aminosäurestoffwechsel
14*	gi 491635818	PREDICTED: dynein heavy chain 17, axonemal	<i>Anas platyrhynchos</i>	487085	88	39	5,57	10	intrazellulärer Transport
15*	gi 494656018	release factor H-coupled RctB family protein	<i>Pedospaera parvula</i>	41398	102	12	6,91	31	RNA-Prozessierung
19*	gi 446435854	dihydropyrimidine dehydrogenase subunit A	<i>Vibrio mimicus</i>	54031	93	10	5,95	21	DNA Synthese
21*	gi 565322612	Pericentriolar material 1 protein	<i>Ophiophagus hannah</i>	235109	92	35	4,97	18	Replikation
22	gi 399427	Enolase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	40483	135	8	5,02	31	u.a.Energiestoffwechsel (v.a. Glykolyse)
24*	gi 548300544	dNA ligase	<i>Clostridium</i> sp.	69897	91	21	6,01	37	Transkription / Replikation

Spot Nr.	NCBI ID	Proteinname	Organismus	Molekulargewicht in kDa	MOWSE Score	Anzahl Peptide	pI	% Sequenzabdeckung	Funktion
25*	gi 321259273	ubiquitin-protein ligase	<i>Cryptococcus gattii</i>	212506	89	36	6,39	19	Ubiquitinsynthese
26	gi 21427320	Hsp70 protein	<i>Mitsukurina owstoni</i>	50707	115	5	8,58	14	u.a. Stressantwort
	gi 552831072	heat shock protein 70B	<i>Chlorella variabilis</i>	72152	114	9	5,15	17	
27*	gi 552658122	putative 5'-3' exonuclease Bsu YpcP	<i>Mesoplasma florum</i>	36838	89	9	9,29	21	DNA-Bindung
28	gi 192288613	dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	48795	88	14	6,58	43	Energiestoffwechsel div.
33	gi 145353365	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	53203	159	8	8,49	14	Translation
34*	gi 497422999	NAD-dependent DNA ligase LigA	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i>	78643	114	20	7,15	27	Transkription / Replikation
37	gi 403224071	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku	36781	137	7	6,46	27	Energiegewinnung (Glykolyse)

*MS/MS-Toleranz von 0,8 auf 1,2 geändert

3.3 Spezifische Antigene einer induzierten Protothekose des Kaninchens

3.3.1 *P. zopfii* Genotyp 2-spezifische Antigene

Wie in Abbildung 2 dargestellt, fallen fünf der zur Analyse ausgewählten Proteinspots in die Kategorie „genotypspezifische Antigene“ für *P. zopfii* GT2. Dies beruht auf einer visuellen Auswertung der Western Blot Membranen. Bei Berücksichtigung der Ergebnisse der MALDI TOF Analyse reduziert sich diese Zahl auf vier, von denen zwei identifiziert werden konnten. Dabei handelt es sich um eine Serinrekombinase (Spot Nr. 2) und um ein Protein aus der Familie der 14-3-3 Proteine (Spot Nr. 22).

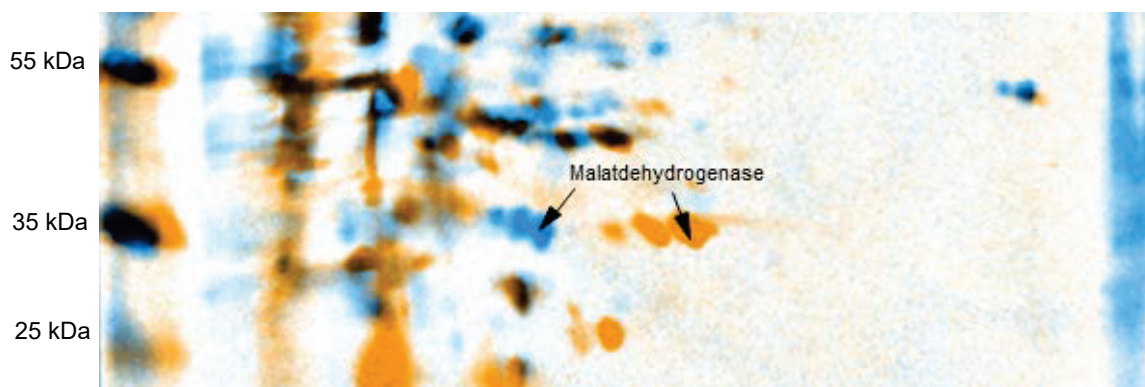
3.3.2 Gemeinsame Antigene der untersuchten Prototheken

Es gab 18 Signale, die auf Western Blot Membranen aller drei untersuchten Prototheken-Spezies bzw. Genotypen detektiert wurden. Es gelang in 4 Fällen das entsprechende Protein von allen drei Gelen (SAG 2021^T, SAG 2063^T und SAG 2064^T) zu identifizieren (Tabelle 5). Hierzu wird auch Malatdehydrogenase gezählt, welche bei *P. zopfii* GT2 jedoch einen anderen isoelektrischen Punkt aufweist und erst durch die Identifikation mittels MALDI TOF MS eine Übereinstimmung festgestellt werden konnte (Abbildung 4).

Tabelle 5: Allgemeine Antigene von *P. zopfii* GT2 einer induzierten Protothekose. Die Positionen der Spotnummern sind für SAG 2063^T (*P. zopfii* GT1) und SAG 2064^T (*P. blaschkeae*) der Abbildung 3 und für SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2) der ersten Veröffentlichung zu entnehmen. Die Namen der Proteine entsprechend den originalen Datenbankeinträgen und sind daher auf Englisch. UE = Untereinheiten

Spot Nummer			Name des Proteins
SAG 2021 ^T	SAG 2063 ^T	SAG 2064 ^T	
1	4 und 5	4	Malate dehydrogenase
15	19	26	Heat shock protein 70 (Hsp70)
20	1 und 2	33	Translation elongation factor 1-alpha
24	24	1	ATP synthase (ATPase) – versch. UE

Abbildung 4: Position von Malatdehydrogenase auf Membranen von SAG 2021^T (*P. zopfii* GT2; gelb) und SAG 2063^T (*P. zopfii* GT1; blau)



3.3.3 Individuelle Antigene von *P. zopfii* GT2 bei induzierter Protothekose von Kaninchen

In der Publikation 1 wurden durch den Vergleich mit dem Serum eines weiteren Versuchskaninchens (zweites anti-*P. zopfii* GT2-Serum) die Antigene bestimmt, welche eine generelle Aktivierung des Immunsystems der Tiere hervorrufen. Des Weiteren konnten somit je Serum vier Proteinspots ermittelt werden, welche individuell von den verschiedenen Immunsystemen erkannt wurden. Diese acht Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI TOF MS analysiert. Eine Proteinidentifikation war nur im Fall des zweiten anti-*P. zopfii* GT2-Serum („S2“) möglich (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnisse der MALDI TOF MS Analyse der individuellen Antigene von *P. zopfii* GT2 (zweites anti-*P. zopfii* GT2-Serum). MOWSE -Score (Molecular Weight Search Score): Wahrscheinlichkeitsbasierte Methode um Proteine anhand ihrer Masse zu bestimmen. Der Algorithmus wurde von PAPPIN et al. (1993) entwickelt [208]. Ein Protein gilt als identifiziert, wenn der MOWSE Score größer/gleich der Signifikanz des Schwellenwertes ($p < 0,05$) ist und mehr als zwei Peptide erkannt wurden. Die Namen der Proteine entsprechend den originalen Datenbankeinträgen und sind daher auf Englisch.

Spot Nr.	NCBI Identifikationsnummer	Name Protein	MOWSE Score	Funktion
1-S2	gi 385153416	ATPase alpha subunit	136	Energiestoffwechsel
2-S2	gi 11497478	H(+)-transporting ATPase, subunit 1	257	
3-S2	gi 402496445	dihydrolipoamide dehydrogenase E3 component	57 (Peptid)	div. metabolische Prozesse u.a. an Glykolyse und Citratzyklus beteiligt
4-S2	gi 154248595	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	92	Pyrimidinsynthese

Wie Tabelle 6 zu entnehmen, reagierte die ATPase Untereinheit alpha (Spot-Nr.1-S2) mit dem zweiten anti-*P. zopfii* GT2-Serum. Da dieses Serum auch mit der ATPase Untereinheit beta reagierte (Publikation 1), stellt demnach das Protein als Ganzes kein individuelles Antigen dar.

4 Diskussion

Im Fokus des Dissertationsvorhabens stand die Identifikation antigener Proteine von *P. zopfii* GT2 als Grundlage zum Verständnis des Infektionsgeschehens bei Protothekosen. Die Identifikation möglicher Virulenzfaktoren wurde dabei mit berücksichtigt.

4.1 Vergleich der beiden Studien - leporine vs. canine Protothekose

Die vorliegende Arbeit gliederte sich in zwei Studienteile. Im ersten Teil wurden anhand von Hyperimmunseren experimentell infizierter Kaninchen antigene Proteine von *P. zopfii* GT2 (SAG 2021^T) detektiert und teilweise identifiziert (Publikation 1) und die Kreuzreaktivität des ersten anti-*P. zopfii* GT2-Serum bestimmt (Abschnitt 3.1). Zur Identifikation antigener Proteine von *P. zopfii* GT2 wurden im zweiten Teil Isolate natürlicher caniner Protothekosen (PZ-L; PZ-P) und deren korrespondierende Patienten-Seren untersucht (Publikation 2).

Alle verwendeten Seren resultieren somit von Infektionen mit *P. zopfii* GT2. Die enthaltenen Antikörper erwiesen sich in den Untersuchungen jedoch als hochgradig kreuzreaktiv mit Proteinen von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae*. Dies unterstützt die Ergebnisse molekularer Untersuchungen bezüglich der nahen Verwandtschaft der Arten bzw. Genotypen [23,24]. In den genannten Studien zeigen phylogenetische Untersuchungen ein Cluster von *P. zopfii* (GT1 und 2) und *P. blaschkeae*. *P. wickerhamii* scheint außerdem näher mit *Chlorella variabilis* (Syn. *Auxenochlorella protothecoides*) verwandt zu sein als mit den anderen *Prototheca* Spezies. Da im Falle der caninen Protothekosen die zur Verfügung stehende Menge Serum pro Erkrankungsfall stark begrenzt war, wurde darauf verzichtet die Kreuzreaktivität auch mit *P. wickerhamii* zu testen, obwohl Infektionen bei Hunden auch mit dieser Spezies beschrieben sind [190].

Betrachtet man die identifizierten Proteine beider Studien im Ganzen, so stellte die Mehrheit der Antigene intrazellulär lokalisierte Proteine dar. Dabei handelte es sich vorrangig um Enzyme des Stoffwechsels sowie Proteine von Replikation, Regulation und Proteinexpression. Wobei anzumerken ist, dass tierartsspezifisch (Kaninchen vs. Hund) unterschiedliche Proteine detektiert worden sind. Lediglich acht Proteine (Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), Malatdehydrogenase, ATPase, Elongationsfaktor 1-alpha, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), 14-3-3 Protein, Triosephosphatisomerase (TPI), Serinrekombinase) wurden sowohl durch die caninen als auch die leporinen Seren detektiert. Die Spezifität der jeweiligen Antikörperbindung unterscheidet sich dabei oftmals zwischen den Untersuchungen experimentell gewonnener Kaninchenseren und den Seren natürlicher Hundinfektionen. Dafür sind zwei Erklärungen in Erwägung zu ziehen: i) Bisher wurde keine natürliche leporine Protothekose beschrieben. Dies könnte zu einem artifiziellen Charakter

der Ergebnisse führen. Erst die Beschreibung einer natürlichen Protothekose eines Kaninchens würde diesen Punkt widerlegen. ii) Die Unterschiede könnten aber ebenso in den verschiedenen Wirtsspezies als solche begründet liegen. Der Einfluss der Wirtsspezies auf die Pathogenese von Infektionen wird in Abschnitt 4.2.2 ausführlicher diskutiert.

Da im Falle der Kaninchen beide Tiere mit demselben Stamm (SAG 2021^T) von *P. zopfii* GT2 experimentell infiziert wurden, zeigt ein Vergleich der Seren auf derselben Western Blot Membran ebenso die individuellen Unterschiede in den Immunantworten der Wirtstiere. Auf Grund der Tatsache, dass die verwendeten Hundeseren aus natürlichen Infektionen stammen und die Tiere sich in großer geographischer Entfernung zueinander befanden (Bayern vs. Berlin), ist von einer Infektion mit verschiedenen nicht-klonalen Erregerstämmen auszugehen und könnte eine Erklärung für die in dieser Untersuchung individuell detektierten Signale (z.B. 3-dehydroquinate synthase) liefern. Da molekulare Methoden, wie z.B. Pulsfeldgelelektrophorese, AFLP (*amplified fragment-length polymorphism*) oder MLST (*multilocus sequence typing*), zur Erregercharakterisierung von Prototheken fehlen, kann diese Annahme jedoch nicht sicher bewiesen werden. Eine im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls geplante Etablierung der genannten Methoden schlug aufgrund einer vermutlich sehr speziellen Zell- und Genomorganisation von Prototheken bislang fehl (unveröffentlichte Daten des Autors).

Somit resultieren die heterogenen Signalmuster der beiden caninen Seren vermutlich nicht nur aus der Individualität des Immunsystems des jeweiligen Wirtstieres, sondern sie repräsentieren unter Umständen auch die individuellen Antigene der verschiedenen aus dem Krankheitsgeschehen isolierten Erregerstämmen.

Eine definitive Aussage, in wie weit sich die Ergebnisse aufgrund der verschiedenen Wirtsspezies unterscheiden, kann erst durch eine äquivalente Untersuchungen mit Infektionsseren einer dritten Wirtsspezies getroffen werden. Hierbei würden sich Untersuchungen mit Seren mastitiskranker Rinder anbieten, da hier die Fallzahlen vergleichsweise hoch liegen und entsprechende Isolate und Seren leichter verfügbar sind [148].

4.2 Detektierte Proteine und deren Einfluss auf das Pathogenitätspotential

4.2.1 Intrazelluläre Proteine

ATPase, EF-1 α , 14-3-3-Proteine und Malatdehydrogenase wurden mit Immunsereen der beiden Wirtsspezies Hund und Kaninchen als Antigene von Prototheken nachgewiesen. In Immunoblotanalysen von eukaryotischen Pathogenen bzw. Parasiten wie *Anisakis* spp. [203], *Schistosoma* sp.[209], oder *Cryptococcus* sp. [210] werden diese wiederkehrend als Antigene identifiziert. Außerdem gehören diese Proteine mit zu den am häufigsten differentiell exprimierten Proteinen überhaupt [211]. Obwohl sie häufig als Antigene oder Immunogene nachgewiesen werden, fehlt es an Erklärungen, welche Rolle den Proteinen im Infektionsgeschehen zukommt. Ihre Verwendung als Markerproteine für immunologische Nachweisverfahren wird jedoch häufig diskutiert. So kommen die 14-3-3-Proteine als diagnostischer Marker für *Clonorchis sinensis*, dem Chinesischen Leberegel in Betracht [212].

Einen anderen Aspekt beleuchtet das in den Western Blot Analysen der Hundesereen (L24 und P50) identifizierte *flagellar motor switch protein FliG*. Dieses Protein ist als Untereinheit des *flagellar motor switch complex* in der Cytoplasmamembran von Mikroorganismen verankert. Für Prototheken wurden entsprechende flagelläre Strukturen jedoch noch nie beobachtet. Daher ergab sich die vordergründige Annahme, dass es sich hierbei um ein Protein handelt, welches gewisse Homologien zu FliG aufweist, jedoch eine andere Funktion erfüllt. Genomanalysen von *Chlorella variabilis* zeigen, dass auch diese über eine ganze Reihe von Flagellenproteinen verfügen, obwohl auch Chlorellen als nicht-motil gelten [213]. Des Weiteren zeigte sich, dass Chlorellen alle nötigen Meiosegene besitzen. Bis dahin wurde ein rein asexueller Vermehrungszyklus, wie auch für Prototheken, angenommen. BLANC et al. (2010) schlussfolgern daraus, dass für Chlorellen durchaus eine sexuelle Reproduktion existiert und ein rudimentäres Flagellum zur Erkennung des Sexpartners dient. Auch für *Ostreococcus* sp. wurde der sexuelle Vermehrungszyklus lang übersehen [214] und bei *Chlamydomonas reinhardtii* kann er nur durch starkes Stressen der Zellen induziert werden [215]. An dieser Stelle wird deutlich, wie dringend Genomdaten zu Prototheken benötigt werden, wenn es dadurch möglich wird, lang bestehende Annahmen zu den grundlegendsten Charakteristika eines Organismus zu widerlegen. Erste Versuche der Ganzgenomsequenzierung von *P. zopfii* GT2 (SAG 2021^T) am Institut für Tier- und Umwelthygiene gestalten sich bisher leider als ausgesprochen schwierig (persönliche Kommunikation: Dr. Roschanski) [216].

4.2.2 Oberflächenassoziierte und sekretorische Proteine

Die Detektion und Identifikation der sogenannten *Housekeeping*-Enzyme GAPDH und TPI ist besonders spannend, da diese auch als oberflächenassoziierte Proteine eine gesonderte Stellung einnehmen. Bei einer Reihe von Pathogenen gelten bekannte glykolytische Enzyme, wie Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Triosephosphatisomerase oder Enolase, als Virulenzfaktoren, da sie für die Bindung an Zellen und Gewebe sowie direkt an der Induktion von Signalkaskaden der Wirtszellen beteiligt sind [217]. In der Wissenschaft hat sich für solche multifunktionalen Proteine der Ausdruck „moonlighting proteins“ herausgebildet [218].

Im Rahmen des hier vorgestellten Forschungsvorhabens wurden einführende Untersuchungen bezüglich oberflächenassoziierter Enzyme von Prototheken mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Der Fokus lag hierbei zunächst auf GAPDH, da es in den Western Blot Studien mehrfach und mit hoher Signifikanz detektiert und identifiziert wurde. Außerdem gehört GAPDH zu den bekanntesten und verbreitetsten oberflächenassozierten Stoffwechsellenzymen von Pathogenen [219–221] und es gab vergleichbare Untersuchungen zur schnellen Adaption der Methode an die Fragestellung [222]. GAPDH konnte dabei nur auf der Oberfläche von SAG 2064^T (*P. blaschkeae*) nachgewiesen werden. Dies deutet auf mögliche Unterschiede in der Pathogenese von Protothekose durch die verschiedenen Erreger hin. Allerdings wurden bisher noch keine Studien zum Bindungsverhalten von Prototheken-spezifischen GAPDH durchgeführt. Erst wenn klar ist, ob und an welches Wirtsprotein das Enzym bindet, kann man eine Aussage über dessen Beteiligung am Infektionsgeschehen treffen. Neben GAPDH existieren noch eine Reihe weiterer oberflächenassoziierter Stoffwechsellenzyme, die als Virulenzfaktoren in Frage kommen. Es ist nicht auszuschließen, dass *P. zopfii* GT2 über andere oberflächenassoziierte Enzyme als *P. blaschkeae* verfügt. Die von MURUGAIYAN et al. (2013) durchgeführte Differenz-Gelelektrophorese (DIGE) bezüglich der beiden Genotypen von *P. zopfii*, zeigte eine unterschiedliche Expression auch für Triosephosphatisomerase (TPI), Enolase, Phosphoglyceratkinase, und Alkoholdehydrogenase [223]. All diese Enzyme sind an der Bindung von Pathogenen wie Streptokokken, Staphylokokken, Mykobakterien, *Neisseria* oder *Candida* an Fibronectin oder Plasminogen beteiligt [217,224–226]. In den durchgeführten Western Blot Analysen dieser Arbeit konnten TPI, Enolase, sowie Succinyl-CoA Synthetase (oberflächenassoziiertes Enzym von *Trichomonas vaginalis* [227]) als immunreaktive Proteine identifiziert werden. Bei weiteren Untersuchungen sollte allerdings bei der Wahl des Fluorophors die Eigenfluoreszenz der Prototheken-Zellen aufgrund von Carotinoiden in ihrer Zellwand stärker berücksichtigt werden. Diese hatte zwar auf die Durchflusszytometrie keinen Einfluss, bei einer zusätzlichen Analyse mittels Immunfluoreszenzmikroskopie störten die Signale jedoch. Die Ergebnisse der

Durchflusszytometrie für GAPDH könnten jedoch auch auf unterschiedliche Beschaffenheit der Zelloberfläche zurückzuführen sein, so dass das Enzym für eine Bindung des Antikörpers nicht zur Verfügung steht. Für *Neisseria meningitidis* wurde gezeigt, dass GAPDH in Wildtypstämmen an der Oberfläche exprimiert wird, eine Antikörperbindung aufgrund der Kapsel jedoch nicht stattfinden konnte [228]. Es gibt nur wenige Studien über die Zellwand von Prototheken und keine, die direkte Vergleiche zwischen den verschiedenen Spezies bzw. Genotypen zieht.

Neben oberflächenassoziierten Molekülen zur direkten Erreger-Wirts-Interaktion könnten im Infektionsgeschehen auch sekretorische Effektormoleküle eine Rolle spielen. Dr. Murugaiyan vom Institut für Tier und Umwelthygiene (persönliche Kommunikation) hat in diesem Zusammenhang erste Analysen von Kulturüberständen der Spezies *P. zopfi* GT2 durchgeführt [229]. Dabei konnten mittels SDS-PAGE drei Proteine dargestellt werden. Eines davon wurde mittels MALDI TOF MS als Hsp70 identifiziert. Dieses Protein wurde ebenfalls in den im Rahmen dieses Dissertationsverfahrens durchgeführten Arbeiten als Antigen nachgewiesen – sowohl bei der experimentellen Ieporinen - als auch bei der natürlichen caninen Protothekose. Hsp70 stellt eine Familie an Hitzeschockproteinen dar, deren Molekülgröße ca. 70 kDa beträgt. Einige sind strikt stress-induziert, wohingegen andere *House-keeping*-Funktionen besitzen [230]. Hsp70 ist als immunogenes Protein von *Cryptococcus neoformans*, *Schistosoma mansoni* und als Allergen von *Anisakis spp.* bekannt [203,209,231,232]. Zusätzlich zeigen Studien, dass Hsp70 extrazellulär lokalisiert sein kann. Durch eine proinflammatorische Wirkung, ähnlich Cytokinen, werden Zellen des Immunsystems aktiviert [233,234]. Extrazellulär aktives Hsp70 könnte demnach eine Erklärung für die starken entzündlichen Reaktionen sein, wie sie vor allem beim Mastitisgeschehen des Rindes auftreten. Da es sich bei Hsp70 um eine Proteinfamilie handelt, ist in zukünftigen Untersuchungen zu zeigen, ob das im Rahmen dieser Arbeit detektierte Hsp70 mit dem von Dr. Murugaiyan identifizierten Protein aus den Überstandsanalysen übereinstimmt. Weitere Antigene, denen auch eine sekretorische Bedeutung zugeschrieben werden kann, konnten nicht identifiziert werden.

Da bisher noch keinerlei Daten über die Expressionsbedingungen Prototheken-assoziiierter Virulenzfaktoren existieren, sind die vorliegenden Ergebnisse allerdings mit Vorsicht zu interpretieren.

Sowohl in der angeführten Analyse des Überstandes, als auch in den Veröffentlichungen dieser Arbeit, wurden die Zellysate nach Kultivierung unter standardisierten Laborbedingungen gewonnen. Diese bieten den Zellen optimale Bedingungen in Bezug auf das verfügbare Nährstoffangebot und den vorherrschenden physikalischen Parametern (Temperatur, Sauerstoff etc.). Virulenzfaktoren stellen eine Spezialform von Fitnessfaktoren dar, welche es einem Organismus ermöglichen eine ökologische Nische zu besetzen. Daher

stellt sich die Frage, ob fakultative Pathogene unter idealen Bedingungen das volle Spektrum ihrer Virulenzfaktoren exprimieren, obwohl diese zum Überleben nicht zwingend erforderlich sind. Darüber hinaus gibt es beschriebene Fälle, bei denen die Induktion von Virulenzfaktoren von einem Erreger-Wirts-Kontakt abhängt: Beispielsweise kommt es bei *Neisseria meningitidis* in Folge eines Kontaktes mit epithelialen Zellen zu einem steigenden Expressionslevel von *gapA-1* (dem Gen für GAPDH) und anderer Virulenzfaktoren [235]. Zur Klärung des Pathomechanismus der Protothekose sind somit weiterführende Untersuchungen zur stressbedingte Induktion von Virulenzfaktoren und dem Einfluss von Zellkontakt mit Wirtsgewebe oder -zellen zwingend erforderlich. Letzteres scheint eine große Rolle bei der Pathogenese von Protothekosen zu spielen. Je nach Wirt variiert die Symptomatik und Lokalisation der Erkrankungen stark (vgl. Abschnitt 1.2) Die Art der Manifestation der Erkrankung scheint daher auch entscheidend von der Gewebeoberfläche der Wirtsspezies bestimmt, als nur durch den Erreger selbst. Das wohl bekannteste Beispiel für eine solche Abhängigkeit vom Wirt stellt das Grippevirus dar. Die verschiedenen Influenztypen haben einen unterschiedlichen Wirtstropismus, welcher auf Unterschiede im Glykosilierungsmuster der Wirte zurückzuführen ist [236]. Während Vogelgrippeviren bevorzugt an $\alpha(2,3)$ glykosidisch verknüpfte Sialylsäure im Darm der Tiere binden, erkennen humanpathogene Influenzaviren $\alpha(2,6)$ glykosilierte Sialylsäure im Respirationstrakt als Bindestelle. Nur im Schwein können beide Virustypen aufeinander treffen, da hier beide Rezeptoren für das Oberflächenprotein der Viren auf einem Gewebetyp vorkommen und neue Virusstämme ausbilden. Somit resultiert das zoonotische Potential der Grippeviren aus einer Co-Infektion der Schweine mit humanen und aviären Virusstämmen. Hinsichtlich der Rezeptoren verschiedener Wirtsspezies gibt es für Prototheken noch einen großen Forschungsbedarf.

4.3 Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden

Die vorliegende Arbeit zur Identifikation antigener Proteine von *Prototheca zopfii* GT2 stellt die erste umfangreiche Untersuchung dieser Art überhaupt dar. Als solche kann und möchte sie nicht den Anspruch auf Vollständigkeit erheben und unter diesem Aspekt müssen die Ergebnisse betrachtet werden.

Die Identifikationsrate der Proteine betrug zwischen 44 % und 63 %. Von diesen identifizierten Proteinen waren wiederum ca. $\frac{1}{5}$ „hypothetische Proteine“. Zur Identifikation der Proteine erfolgte ein Abgleich der mittels MALDI TOF MS erhaltenen Peptidspektren mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken. Da Daten von Algen hier deutlich unterrepräsentiert sind, musste ein solcher Abgleich auf weitere verfügbaren Datenbanken mit Einträgen von v. a. Bakterien, Pilzen oder anderer eukaryotischer Pathogene ausgeweitet werden. Die geringeren Homologien zwischen Peptiden der verschiedensten evolutionären

Bereiche führten zu einer deutlichen Reduktion der Signifikanz der Ergebnisse und spiegelten sich letztendlich auch in einer verminderten Identifikationsrate wieder. Bestand ein Proteinspot zudem aus mehreren verschiedenen Proteinen, erschwerte dies die Bestimmung zusätzlich.

Hinzu kommt, dass nicht alle Proteine einer Zelle durch Standardextraktionsmethoden in Lösung gehen oder sich unter den eingesetzten Bedingungen in der SDS-PAGE auftrennen lassen. Diese „Verluste“ sind bei der Interpretation der Western Blot Analyse im stets im Blick zu behalten.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass es sich bei SDS-PAGE und Western Blot um unterschiedlich sensitive Detektionsmethoden handelt. Im Western Blot führten die polyklonalen Antikörper in Kombination mit der mehrfachen Kopplung der Horse-Radish-Peroxidase an den zweiten Antikörper zu einer Vervielfachung des Signals. Somit kam es mehrfach vor, dass im Western Blot starke Signale detektiert wurden, obwohl im kolloidal-gefärbten SDS-Gel keine oder nur sehr schwache Proteinspots zu erkennen war (z. B. P6 oder L50). Da es in Folge dessen nicht möglich war, die entsprechenden Proteine aus dem Gel zu isolieren, war eine MALDI TOF MS Analysen in diesen Fällen nicht möglich. Zudem gab es keine Möglichkeit der Korrelation zwischen der Konzentration eines Proteins und dessen Bedeutung. Gerade Toxine sind schon in geringster Konzentration wirksam. Einige Toxine, wie z. B. das β -Bungarotoxin oder OS2, töten Nervenzellen schon im picomolaren Bereich ab [235]. Die Nachweisgrenze in kolloidal gefärbten SDS-Gelen beträgt 5 ng. Somit könnte ein Nachweis von Toxinen in Ganzzell-Proteinextrakten an einer zu geringen Konzentration der Moleküle scheitern. Die Möglichkeit eines Cytotoxins bei *Prototheca* sp. kann somit weder ausgeschlossen, noch bestätigt werden. Der Spot P109 (Tabelle S1 der zweiten Veröffentlichung) besitzt laut MASCOT Homologien zu Alveolysin, welches zur Gruppe der Zytotoxine gehört [236,237]. Der MOWSE Score ist jedoch nur knapp signifikant bei gleichzeitiger Erhöhung der MS Toleranz auf 1.2 kDa. Eine Bestätigung des Proteins durch eine alternative Analyseverfahren wie der Iontrap gelang wiederum nicht.

Die Western Blots wurden zunächst visuell *in silico* verglichen. Durch die paarweise Überlagerung der jeweiligen Membranen mittels der Software Delta2D (Decodon, Greifswald) wurde versucht, die Spezifität der Antigenbindung zu bestimmen. Das Beispiel von Malatdehydrogenase (Abbildung 3) zeigt dabei die Limitierung der Methode. Eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes oder eine Veränderung der Molekülgröße führen zu einer veränderten Position in der 2D SDS-PAGE. Die visuelle Auswertung zur Spezifität der Antigenerkennung wurde daher nur als Anhaltspunkt betrachtet und alle reaktiven Proteinspots wurden in die MALDI-TOF MS Analysen einbezogen. Um ein wirklich umfassendes Bild der antigenen Proteine von *P. zopffii* GT2 zu erhalten, müssten jedoch Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Infektionsseren erfolgen. Mit steigender

Anzahl untersuchter Seren, wäre ein Rückgang von Proteinspots zu erwarten, die durch alle Seren detektiert werden. Zu einem solchen Ergebnis kamen auch Untersuchungen mit Immuseren von Toxoplasmose-Patienten [238]. Diese zeigten eine starke Heterogenität der 2D Western Blot Signalmuster, vergleichbar mit denen der vorliegenden Arbeit.

4.4 Impulse der Arbeit im Hinblick auf weiterführende Forschungsansätze

Trotz der Vielzahl der zuvor aufgezeigten Limitationen und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse, ergeben sich insgesamt gesehen viele neue, spannende Forschungsansätze. Mit den angewandten Methoden war es möglich, erste Hinweise auf immunreaktive Proteine und ihre Bedeutung in der Pathogenese von Protothekosen zu erhalten. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich damit rein auf Proteine im Infektionsgeschehen. Andere Stoffklassen wie z.B. Glykolipide wurden in diesen Zusammenhang außer Acht gelassen. Glykolipide als Virulenzfaktoren treten bei verschiedenen Erregern auf. Für *Leishmania donovani* und *Mycobacterium leprae* wurde gezeigt, dass Glykolipide zytotoxische Sauerstoffradikale abfangen können, um so das Überleben der Krankheitserreger in Phagozyten zu sichern [237]. Genauso sind Toxine, die bekannteste Gruppe der Virulenzfaktoren, nicht zwingend Proteine. Vor allem Pflanzentoxine, wie Nicotin oder Morphin, stammen häufig aus der Gruppe der Alkaloide. Daher sollten zukünftige Untersuchungen zu Pathogenität-assoziierten Faktoren weitere Stoffklassen einschließen.

Die verwendeten Seren zeigen alle eine speziesübergreifende Kreuzreaktivität. Hinter dieser Beobachtung verbirgt sich die Möglichkeit, dass die Induktion einer schützenden Immunantwort nicht auf einen Stamm, Genotyp oder Art beschränkt ist. Gerade im Bereich der Milchviehhaltung mit zum Teil hohen Intraherdenprävalenzen wäre die Möglichkeit einer präventiven Immunisierung der Tiere wichtig. Bisher gibt es bei Prototheken noch keine Erkenntnisse, ob eine induzierte Immunantwort vor weiteren Infektionen schützt. Da die in dieser Arbeit durch Immuseren detektierten Proteine erst einmal nur Antigene darstellen, ist nicht bewiesen ob sie auch eine immunogene Wirkung besitzen. Daher sollten mögliche Immunisierungsversuche zunächst mit Ganzzellextrakten durchgeführt werden oder weitere Untersuchungen zur Immunogenität der identifizierten Antigene erfolgen. Prinzipiell ist eine Immunisierung mittels immunogener Proteine möglich [210,238]. Doch obwohl die Identifikation immunogener Proteine bei einigen Pathogenen vielversprechende Möglichkeiten für Immunisierungen darstellten, schlugen darauf aufbauende Vakzinierungen mit rekombinanten Proteinen fehl oder erzielten nicht den gewünschten Effekt [239,240]. Außerdem erhöhen kreuzreaktive Antikörper nicht zwingend den Schutz vor Infektionen mit anderen Stämmen. Im Falle des Dengue-Virus stellen kreuzreaktive polyklonale Antikörper einer ersten Infektion zum Beispiel das größte Risiko dar, dass es bei einer Folgeinfektion zu

einem schweren Verlauf mit lebensgefährlichen Komplikationen, wie dem Dengue-Schock-Syndrom, kommt [241]. Zudem ist nicht bekannt, welche Rolle dem zellulären Immunsystem bei der Kontrolle einer Protothekeninfektion zukommt und inwieweit dies immunprophylaktisch zu beachten wäre.

4.4.1 Immunsystem vermittelte Toleranz als Schutz vor toxischer Schädigung?

Das Hitzeschockprotein 70 ist nur eine von vielen Möglichkeiten, wie es im Verlauf einer Protothekose zu den teilweise schweren entzündlichen Reaktionen kommen kann. Bei einigen Pathogenen beruht der Mechanismus auf der Bildung von Toxinen. Als Exotoxine bezeichnet man dabei Toxine, die von Zellen synthetisiert und segregiert werden. Unter Endotoxinen versteht man Komponenten des Zellwandaufbaus gram-negativer Bakterien. Diese Lipopolysaccharide (LPS) enthalten im Inneren die eigentlich toxische Komponente Lipid A, welches erst bei Degradierung der Zellwand seine Wirkung entfaltet. ROYCE UND PARDY (1996) konnten nachweisen, dass LPS nicht auf das Reich der Bakterien beschränkt ist, sondern auch von Chlorellen gebildet wird [242]. Dieses aLPS („a“ für Algen) besitzt ebenfalls das Endotoxin Lipid A in aktiver Form. ROYCE UND PARDY (1996) vermuteten, dass aLPS für das Entkommen aus dem lysosomalen Verdau eine Rolle spielen könnte. Später wurde aLPS auch für *Prototheca* nachgewiesen [243]. Dabei wurde gezeigt, dass aLPS zwar vom Immunsystem von Insekten, aber nicht von Mäusen erkannt wird. Anstatt dies als Unvermögen des Immunsystems, die Zellen zu erkennen, anzusehen, könnte man darin auch eine Anpassung des Immunsystems sehen. Eine intakte Zellwand bedeutet, dass der Organismus vor Schädigungen durch das Toxin geschützt ist. Dies würde eine starke entzündliche Reaktion auf zerstörte Zellen erklären, wie sie auch von PEREZ et al. (1997) postuliert wurde [244]. Auch in dieser Arbeit waren die häufigsten detektierten Antigene intrazellulärer Natur. Trotz allem werden Protothekenzellen nur mit einer geringen Phagozytoserate von Makrophagen erkannt [245]. Die Suppression einer zellulären Immunantwort durch intakte Zellen wurde ebenfalls von PEREZ et al. (1997) postuliert [244]. Die Detektion von Phosphomannomutase bei Zelllysaten von *P. zopfii* GT1 könnte dabei eine Rolle spielen. Dieses Enzym gilt als indirekter Virulenzfaktor bei *Cryptococcus* sp., da es an der Bildung der Kapsel, dem größten Virulenzfaktor, beteiligt ist. Die Wirkung der Kapsel bei *Cryptococcus gattii* liegt entweder in einem immunsupprimierenden Effekt oder stellt einen antiphagozytotischen Faktor dar [246]. Allerdings ist die Kapselbildung bei Prototheken bisher vorwiegend für apathogene Prototheken beschrieben worden (siehe Tabelle 1, Abschnitt 1.1.3). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde Phosphomannomutase bei dem nicht-pathogenen Genotyp 1 von *P. zopfii* nachgewiesen, allerdings schließt diese Beobachtung allein aufgrund der methodologischen Unsicherheiten auch die Expression bei

pathogenen Prototheken nicht aus. Der genaue Zusammenhang muss in weiterführenden Analysen untersucht werden.

Bekannt ist aber, dass die Algenzellen nur zu einem geringen Teil phagozytiert werden. Kommt es dennoch zu einer Phagozytose von Protothekenzellen, so werden diese jedoch nicht im Phagolysosomen abgebaut [245]. Daher stellt sich die Frage, ob dies eine Anpassung des Erregers als Schutz vor Verdau (durch Carotinoide in der Zellwand, oder Superoxiddismutasen) darstellt oder ob es sich um eine Anpassung des Wirts als Schutz vor dem Endotoxin Lipid A handelt. Unklar ist außerdem, in wie weit phagozytierte Zellen weiterhin lebens- und teilungsfähig bleiben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen legen nahe, dass sie höchstens in einem Überdauerungszustand in den Makrophagen vorliegen [247]. Die geringe Anzahl an Infektionen lässt darauf schließen, dass es den Immunsystemen der verschiedenen Wirte in der Mehrzahl gelingt, eine Vermehrung und Ausbreitung der Prototheken im Körper zu verhindern. Eine mögliche Hypothese für das Überleben phagozytierter Prototheken in Makrophagen könnte ein nur seltener und nur unter Extrembedingungen exprimierter Virulenzfaktor sein. So könnten diese Zellen durch die Phagozyten in andere Bereiche des Körpers transportiert werden und die für Hunde typischen und auch beim Menschen selten vorkommenden disseminierten Protothekosen auslösen. Ein derartiges, einzeln auftretendes Ereignis würde sich z.B. durch erworbene Virulenz aber auch durch individuelle Immunsuppression erklären lassen.

4.4.2 Virus-assoziierte Virulenzfaktoren

Bei fakultativ pathogenen Keimen spielen häufig mobile genetische Elemente für die Virulenz eine große Rolle [248]. Eine Variante für mobile genetische Elemente stellen Infektionen von Bakterien mit Viren (Bakteriophagen, kurz Phagen) dar. Bakteriophagen, die in das Wirtsgenom integrieren und somit als Prophagen ständig weitervererbt werden, nennt man temperente oder auch lysogene Phagen. Prophagen können eine Vielzahl von Virulenz- bzw. Fitnessfaktoren beeinflussen [249]. Führt ein integrierter Phage zur Induktion eines veränderten Phänotypes, so spricht man von lysogener Konversion [250]. Eins der bekanntesten Beispiele ist die Expression phagenassoziiierter Toxine. So löst *Streptococcus pyogenes*, assoziiert mit Angina tonsillaris, nur dann Scharlach aus, wenn der Erreger einen toxincodierenden Prophagen trägt [251]. Ebenfalls bekannte Phagentoxine sind das Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae* [252], das Shiga-Toxin von *E. coli* [253] oder das Cholera toxin von *Vibrio cholerae* [254]. Neben Toxinen gibt es noch weitere phagenvermittelte Virulenzfaktoren. Diese können Proteine sein, die für Invasion, Adhäsion oder Antigenerkennung von Bedeutung sind und ebenso Enzyme, durch deren Aktivität intrazelluläres Überleben gesichert wird [255]. Ein Beispiel dafür sind zusätzlich eingebrachte Superoxiddismutasen. Durch das Abfangen freier Sauerstoffradikale können Pathogene der

Immunabwehr der Wirte entkommen. Ein solcher Mechanismus würde ein Überleben von Prototheken in Phagozyten plausibel erklären. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen bezüglich viraler Sequenzen in Protothekengenomen oder protothekenspezifischer Viren. Allerdings wurden von VAN ETTEN et al. (2012) Viren, sogenannte Chloroviren, beschrieben, welche in der Lage sind Chlorellen oder nahverwandte Arten zu infizieren [256]. Der meistuntersuchte Chlorellen-Virus ist PBCV-1. Er infiziert *Chlorella variabilis* (Syn. *Chlorella protothecoides*), den phylogenetisch nächsten Verwandten von *P. wickerhamii*. PBCV-1 weist einen lytischen Vermehrungszyklus auf und gehört mit einem Durchmesser von 160 nm zu den größten bekannten Viren [257]. Bei einer Genomgröße von 333 kb codiert das Virus nicht nur virale Proteine, sondern trägt ebenfalls Gene für Enzyme des Zuckerstoffwechsels sowie eine Cu/Zn-Superoxiddismutase [258]. Des Weiteren scheint die Synthese von Chitin bei Chlorellen erst durch den horizontalen Gentransfer aufgrund von Chloroviren ermöglicht worden zu sein [213]. Eigenschaften, die Prototheken nur aufgrund von Infektionen mit Viren erwerben, scheinen daher nicht unrealistisch und könnten einen Einfluss auf die Pathogenität der verschiedenen Spezies und Virulenz haben. Die Suche nach Prototheken-spezifischen Viren erscheint daher sinnvoll und sollte im Rahmen weiterführender Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

5 Zusammenfassung

Proteinbiochemische Charakterisierung von Antigenen pathogener Prototheken-Spezies

Prototheken sind einzellige, saprophytisch lebende Algen. Obwohl sie phylogenetisch der Gruppe der Grünalgen angehören, sind diese Mikroorganismen chlorophylllos und besitzen damit einen obligat heterotrophen Stoffwechsel. Kulturmorphologisch ähneln sie Hefen der Gattung *Candida*, können von diesen aber mikroskopisch leicht durch die fehlende Sprossung unterschieden werden. Prototheken weisen eine asexuelle Vermehrung durch die Bildung endogener Tochterzellen auf.

Medizinisch und veterinärmedizinisch sind die Mikroalgen von Bedeutung, da einige Arten Infektionen (sogenannt Protothekosen) beim Mensch und Tier hervorrufen. Dabei verfügen Prototheken über alle Voraussetzungen, die hochpathogene Erreger benötigen: eine stabile und strapazierfähige Zellwand, Widerstandsfähigkeit gegenüber physikalischem, chemischem oder mechanischem Stress, Ausbildung von Dauersporen und limitierte Behandlungsmöglichkeiten. Trotz allem sind Protothekosen sehr seltene Erkrankungen.

Der jeweilige Erreger sowie Verlauf und Lokalisation der Erkrankung variieren dabei zwischen den verschiedenen Wirtsspezies. Protothekosen können sowohl lokal begrenzt auftreten, häufig in Form kutaner oder subkutaner Manifestation, oder einen disseminierten Verlauf nehmen. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Pathogenese sind dabei noch weitgehend unbekannt. Um Grundlagen zum Verständnis des Infektionsverlaufes zu schaffen, sollten in dieser Arbeit immunreaktive Proteine von *Prototheca zopfii* GT2 durch Western Blot Analysen detektiert und mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden.

Im ersten Abschnitt wurden hierfür Seren experimentell infizierter Kaninchen verwendet. Mit den enthaltenen Antikörpern konnten im Western Blot 24 antigene Proteine von *P. zopfii* GT2 detektiert werden, welche auch für die weiterführende Analyse per MALDI-TOF MS genutzt wurden. Davon gelang im Folgenden die Identifikation von 15 Proteinen. Bei diesen handelte es sich vorrangig um regulatorische Proteine und Enzyme des Stoffwechsels. Einige dieser Proteine (Malatdehydrogenase (MDH), Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), Elongationsfaktor 1-alpha (EF-1 α), 14-3-3 Protein) sind als immunreaktive Proteine anderer eukaryotischer Pathogene bekannt. Weiter wurde auch die Kreuzreaktivität der leporinen anti-*P. zopfii* GT2 Seren mit Proteinen von *P. zopfii* GT1 und *P. blaschkeae* getestet. Diese erwies sich als sehr hoch. 48 der kreuzreaktiven Proteine konnten ebenfalls per MALDI-TOF MS bestimmt werden. ATPase, MDH, EF-1 α , Hsp70 wurden bei allen untersuchten Spezies bzw. Genotypen als antigene Proteine identifiziert.

Im zweiten Abschnitt wurden analoge Untersuchungen anhand natürlicher caniner Infektionsseren durchgeführt. Auch hier konnte eine sehr starke Kreuzreaktivität verzeichnet werden. Insgesamt wurden 198 Proteinspots mittels MALDI-TOF MS analysiert. Für 86 Proteine gelang eine Identifikation. Auch hier handelte es sich zum größten Teil um Proteine der Regulation, Replikation, Proteinexpression und um enzymatische Stoffwechselproteine. Auffällig ist, dass auch hier MDH, Hsp70, EF-1 α und ein 14-3-3 Protein als immunreaktive Proteine nachgewiesen wurden. Diese spielen auch eine Rolle bei Infektionen mit den eukaryotischen Erregern *Anisakis* sp. *Schistosoma* sp. und *Cryptococcus* sp. Außerdem wurden Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Triosephosphatisomerase, Enolase und Succinyl-CoA Synthetase als antigene Proteine bestimmt. Diesen sogenannten *Housekeeping*-Enzymen kommt bei einer Reihe von Pathogenen eine gesonderte Rolle als oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren zu. In ersten Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass GAPDH an der Zelloberfläche von *P. blaschkeae* exprimiert wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass GAPDH am Infektionsgeschehen von *P. blaschkeae* bei der bovinen Protothekenmastitis beteiligt ist und dass *P. zopfii* GT2 möglicherweise über andere oberflächenassoziierte Stoffwechsellzyme verfügt. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der Beteiligung von Enzymen am Infektionsgeschehen durch ihre Aktivität an der Zelloberfläche werden dringend benötigt.

6 Summary

Biochemical characterization of antigenic proteins from pathogenic *Prototheca* species

Prototheca spp. are unicellular, saprophytically living algae. Although these microorganisms belong to the phylogenetic group of the green algae, they are colorless due to the absence of chlorophyll. Therefore their metabolism is characterized as obligate heterotrophic. Macroscopically they bear a likeness to yeasts of the genus *Candida* but the algae can be differentiated from them easily under the microscope because they show no budding. *Prototheca* reproduce asexually by the formation of endogenous daughter cells.

They are of medical and veterinary interest as some of the *Prototheca* species are associated with infections in humans and animals, known as protothecosis. They fulfill all qualifications to be highly pathogenic: a strong and resilient cell wall, resistance against physical, chemical and mechanical stress, formation of a resting cell stage and limited treatment options. However, protothecosis is a relatively rare disease.

The pathogenic agent, the pathogenicity as well as the localization of the infection vary between the different host species. Protothecosis may occur as local infection for example as cutaneous manifestation but can run a disseminated course. There is little known about the underlying mechanisms of pathogenicity. To lay the basis of understanding the course of infection, the aim of this thesis was to determine immunoreactive proteins of *Prototheca zopfii* GT2 by western blot analysis and identify those using MALDI TOF MS.

In the first part of this work, western blot analysis was used to identify immunodominant protein spots using sera of experimentally infected rabbits. With these 24 immunoreactive proteins of *P. zopfii* GT2 were detected, from which 15 proteins could be identified by MALDI TOF MS. Most of these proteins were proteins of regulatory functions and enzymes of the metabolism. Some of them - malate dehydrogenase (MDH), heat shock proteins 70 (Hsp70), elongation factor 1- α (EF-1 α) and 14-3-3 protein – are known as immunoreactive proteins from other eukaryotic pathogens. Further crossreactivity of the sera with proteins from *P. zopfii* GT1 and *P. blaschkeae* was tested with a high success rate. 48 of these crossreactive proteins could be determined using MALDI TOF MS, too. ATPase, MDH, EF-1 α and Hsp70 were identified from western blot analysis of all tested strains.

In the second part of this PhD thesis, experiments with sera from naturally infected dogs were performed as above. The canine sera display a marked crossreactivity between different species and genotypes, too. Taken together 198 proteins spots were analyzed by MALDI TOF MS from which 86 were identified. Comparable with the leporine sera, the main

part of the immunoreactive proteins obtained with canine infection sera were proteins of regulation, replication, protein expression and metabolic enzymes. It is noticeable that MDH, Hsp70, EF-1 α and 14-3-3 protein were also found as immunoreactive proteins. These are involved in pathogenicity of the eukaryotic pathogens *Anisakis* sp., *Schistosoma* sp. and *Cryptococcus* sp. Further glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), triose-phosphate isomerase, enolase and succinyl-CoA synthetase could be determined as antigenic proteins. These so-called housekeeping enzymes are of special functions as surface-associated virulence factors in a number of pathogens. In this thesis, for the first time, the presence of GAPDH on the surface of *Prototheca* spp. was demonstrated using FACS analysis. It was shown that GAPDH is expressed on the surface of *P. blaschkeae*. This implies the assumption that GAPDH could be involved in the pathogenicity of *P. blaschkeae* causing bovine mastitis. It is also possible that *P. zopfii* GT2 disposes of other surface associated metabolic enzymes than GAPDH. It is strongly recommend that additional investigations be carried out to confirm the expression of these identified enzymes on the surface of *Prototheca* cells and ascertain their role in the infection process.

7 Literaturverzeichnis

1. Krüger W. Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Saffflusse der Laubbäume. *Hedwigia*. 1894;33:241–66.
2. Chodat R. Monographie d`algues en culture pur. *Crypt Suisse*. 1913;4:121.
3. Printz A. *Chlorophyceae*. In: Engler A, Prantl K, editors. Die natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig: Engelmann Verlag; 1927. p. 131–32.
4. Tubaki K, Soneda M. Cultural and taxonomical studies of on *Prototheca*. *Nagoa*. 1959;6:13–19.
5. Ciferri O. Thiamine-deficiency of *Prototheca*, a Yeast-like Achloric Alga. *Nature*. 1956;178:1475–76 DOI: 10.1038/1781475a0.
6. Lloyd D, Turner G. The Cell Wall of *Prototheca zopfii*. *J Gen Microbiol*. 1968;50:421–27 DOI: 10.1099/00221287-50-3-421.
7. Webster DA, Hackett DP, Park RB. The respiratory chain of colorless algae. III. Electron microscopy. *J Ultrastruct Res*. 1968;21:514–23.
8. Patni NJ, Aaronson S. Short Communications The Nutrition, Resistance to Antibiotics and Ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. *J Gen Microbiol*. 1974;83:179–82 DOI: 10.1099/00221287-83-1-179.
9. Nadakavukaren MJ, McCracken DA. *Prototheca*: an alga or a fungus? *J Phycol*. 1973;9:113–16 DOI: 10.1111/j.0022-3646.1973.00113.x.
10. Huss VA, Sogin ML. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol*. 1990;31:432–42.
11. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2012;59:429–93 DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
12. Anderson EH. Studies on the metabolism of the colorless alga *Prototheca zopfii*. *Gen Physiol*. 1945;28:297–327 DOI: 10.1085/jgp.28.4.297.
13. Cooke WB. Studies in the genus *Prototheca*. II. *J Elisha Mitchell Sci Soc Chapel Hill N C*. 1968;84:217–20.
14. Sudman MS, Kaplan W. Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. *Appl Microbiol*. 1973;25:981–90.
15. Conte MV, Pore RS. Taxonomic implications of *Prototheca* and *Chlorella* cell wall polysaccharide characterization. *Arch Microbiol*. 1973;92:227–33.

16. Kessler E. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Prototheca*: III. Utilization of Organic Carbon and Nitrogen Compounds. Arch Microbiol. 1982;132:103–06 DOI: 10.1007/BF00508713.
17. Kerfin W, Kessler E. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Prototheca*: II. Starch Hydrolysis and Base Composition of DNA. Arch Microbiol. 1978;116:105–07 DOI: 10.1007/BF00408740.
18. Huss VA. Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella* IV. *Chlorella protothecoides* and its relationship to the genus *Prototheca*. Arch Microbiol. 1988;150:509–11.
19. Satoh K, Ooe K, Nagayama H, Makimura K. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60:1236–40 DOI: 10.1099/ijs.0.016402-0.
20. Ueno R, Urano N, Suzuki M. Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. FEMS Microbiol Lett. 2003;223:275–80 DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00394-X.
21. Blaschke-Hellmessen R, Schuster H, Bergmann V. Differenzierung von Varianten bei *Prototheca zopfii* Krüger 1984. Arch Exp Veterinarmed. 1983;39:387–97.
22. Roesler U, Scholz S, Hensel A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:1195–99 DOI: 10.1099/ijs.0.02556-0.
23. Roesler U, Möller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1419–25 DOI: 10.1099/ijs.0.63892-0.
24. Ueno R, Hanagata N, Urano N, Suzuki M. Molecular phylogeny and phenotypic variation in the heterotrophic green algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). J Phycol. 2005;41:1268–80 DOI: 10.1111/j.1529-8817.2005.00142.x.
25. Leimann BCQ, Monteiro PCF, Lazera M, Candanoza ERU, Wanke B. Protothecosis. Med Mycol. 2004;42:95–106.
26. Atkinson AW, Gunning BE, John PC. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of (14)C-acetate, studied in synchronous cultures. Planta. 1972;107:1–32 DOI: 10.1007/BF00398011.
27. Ueno R. Visualization of sporopollenin-containing pathogenic green micro-alga *Prototheca wickerhamii* by fluorescent in situ hybridization (FISH). Can J Microbiol. 2009;55:465–72 DOI: 10.1139/W08-155.

28. Loupal G, Kutin ES, Kölbl O. Die Schwimmblasenentzündung der Karpfen (*Cyprinus carpio*) - ätiologisches Agens: eine Alge. Tierärztl Umschau. 1992;47:850–54.
29. El-Ani AS. Life Cycle and Variation of *Prototheca wickerhamii*. Science. 1967;156:1501–03 DOI: 10.1126/science.156.3781.1501.
30. Knauf U, Hachtel W. The genes encoding subunits of ATP synthase are conserved in the reduced plastid genome of the heterotrophic alga *Prototheca wickerhamii*. Mol Genet Genomics. 2002;267:492–97 DOI: 10.1007/s00438-002-0681-6.
31. Sakuradani E, Natsume Y, Takimura Y, Ogawa J, Shimizu S. Subterminal oxidation of n-alkanes in achlorophyllous alga *Prototheca* sp. J Biosci Bioeng. 2013;116:472–74 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.019.
32. Takimura Y, Sakuradani E, Natsume Y, Miyake T, Ogawa J, Shimizu S. Achlorophyllous alga *Prototheca zopfii* oxidizes n-alkanes with different carbon-chain lengths through a unique subterminal oxidation pathway. J Biosci Bioeng. 2014;117:275–77 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.004.
33. Koenig DW, Ward BH. *Prototheca zopfii* Krüger Strain UMK-13 Growth on Acetate or n-Alkanes. Appl Environ Microbiol. 1983;45:336.
34. Walker JD, Colwell RR, Vaituzis Z, Meyer SA. Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii*. Nature. 1975;254:423–24 DOI: 10.1038/254423a0.
35. Kocková-Kratochvílová A, Havelková M. *Prototheca hydrocarborea* n. sp. — Lebenszyklus, Metabolismus und Feinstruktur. Z Allg Mikrobiol. 1974;14:123–34 DOI: 10.1002/jobm.3630140207.
36. Pore RS. Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. Can J Microbiol. 1972;18:1175–77.
37. Ueno R, Urano N, Suzuki M, Kimura S. Isolation, characterization, and fermentative pattern of a novel thermotolerant *Prototheca zopfii* var. *hydrocarborea* strain producing ethanol and CO₂ from glucose at 40 degrees C. Arch Microbiol. 2002;177:244–50 DOI: 10.1007/s00203-001-0384-0.
38. Pore SR. Selective Medium for the Isolation of *Prototheca*. Appl Microbiol. 1973;26:648–49.
39. Pore RS, Shahan TA, Pore MD, Blauwiekel R. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. Vet Microbiol. 1987;15:315–23 DOI: 10.1016/0378-1135(87)90019-8.
40. Arnold P, Ahearn DG. The Systematics of the Genus *Prototheca* with a Description of a New Species *P. filamenta*. Mycologia. 1972;64:265–75. <http://www.jstor.org/stable/3757830>.
41. Pore RS. The association of *Prototheca* spp. with slime flux in *Ulmus amencana* and other trees. Mycopathologia. 1986;94:67–73 DOI: 10.1007/BF00437369.

42. Pore RS. *Prototheca* taxonomy. Mycopathologia. 1985;90:129–39 DOI: 10.1007/BF00436728.
43. Jánosi S, Ratz F, Szigeti G, Kulcsar M, Kerényi J, Laukó T, et al. Pathophysiology: Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. Vet Q. 2001;23:58–61 DOI: 10.1080/01652176.2001.9695082.
44. Padhye AA, Baker JG, D'Amato RF. Rapid identification of *Prototheca* species by the API 20C system. J Clin Microbiol. 1979;10:579–82.
45. Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J. Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. J Clin Microbiol. 1998;36:883–86.
46. BioMeriéux. Telefonat; 2015.
47. DiPersio JR. *Prototheca* and Protothecosis. Clin Microbiol Newsl. 2001;23:115–20.
48. Marques S, Silva E, Carneiro J, Thompson G. In vitro susceptibility of *Prototheca* to pH and salt concentration. Mycopathologia. 2010;169:297–302 DOI: 10.1007/s11046-009-9254-0.
49. Schmalreck AF, Tränkle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R. Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca* spp.) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. Mycoses. 1998;41:71–77 DOI: 10.1111/j.1439-0507.1998.tb00587.x.
50. Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene. 1988;71:491–99.
51. Huss, Volker A. R., Frank C, Hartmann EC, Hirmer M, Kloboucek A, Seidel BM, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). J Phycol. 1999;35:587–98 DOI: 10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x.
52. Möller A, Truyen U, Roesler U. *Prototheca zopfii* genotype 2 - The causative agent of bovine protothecal mastitis? Vet Microbiol. 2007;120:370–74 DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.10.039.
53. Ricchi M, Cammi G, Garbarino C, Buzzini P, Belletti G, Arrigoni N. A rapid real-time PCR/DNA resolution melting method to identify *Prototheca* species. J Appl Microbiol. 2011;110:27–34 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04861.x.
54. Cremonesi P, Pozzi F, Ricchi M, Castiglioni B, Luini M, Chessa S. Technical note: Identification of *Prototheca* species from bovine milk samples by PCR-single strand conformation polymorphism. J Dairy Sci. 2012;95:6963–68 DOI: 10.3168/jds.2012-5785.

55. Hirose N, Nishimura K, Inoue-Sakamoto M, Masuda M, Robinson DA. Ribosomal Internal Transcribed Spacer of *Prototheca wickerhamii* has Characteristic Structure Useful for Identification and Genotyping. PLoS ONE. 2013;8:e81223 DOI: 10.1371/journal.pone.0081223.
56. Bergen M von, Eidner A, Schmidt F, Murugaiyan J, Wirth H, Binder H, et al. Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. Prot Clin Appl. 2009;3:774–84 DOI: 10.1002/prca.200780138.
57. Wirth H, Bergen M von, Murugaiyan J, Rösler U, Stokowy T, Binder H. MALDI-typing of infectious algae of the genus *Prototheca* using SOM portraits. J Microbiol Methods. 2012;88:83–97 DOI: 10.1016/j.mimet.2011.10.013.
58. Murugaiyan J, Ahrholdt J, Kowbel V, Roesler U. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. Clin Microbiol Infect. 2012;18:461–67 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03593.x.
59. Ahrholdt J, Murugaiyan J, Straubinger RK, Jagielski T, Roesler U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. Med Mycol. 2012;50:234–43 DOI: 10.3109/13693786.2011.597445.
60. Pore RS, Barnett EA, Barnes WC, Walker JD. *Prototheca* ecology. Mycopathologia. 1983;81:49–62 DOI: 10.1007/BF00443909.
61. Phaff HJ, Yoneyama M, Carmo-Sousa LDO. A one year quantitative study of the yeast in a single slime flux of *Ulmus carpinifolia*. Gled Riv Patol Veg. 1964;4:p 485-497. <http://www.jstor.org/stable/42567347>.
62. Cooke WB. Fungi in the Lebanon sewage treatment plants and in Turtle Creek, Warren Co., Ohio. Mycopathol Mycol Appl. 1970;42:89–111.
63. Casal M, Solis F. First isolation of *Prototheca* species in Spain. Mycopathologia. 1981;74.
64. Anderson KL, Walker RL. Sources of *Prototheca spp* in a dairy herd environment. J Am Vet Med Assoc. 1988;193:553–56.
65. Pore RS, Shahan TA. *Prototheca zopfii*: Natural, transient, occurrence in pigs and rats. Mycopathologia. 1988;101:85–88 DOI: 10.1007/BF00452891.
66. Buzzini P, Turchetti B, Facelli R, Baudino R, Cavarero F, Mattalia L, et al. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. Mycopathologia. 2004;158:427–30 DOI: 10.1007/s11046-004-1819-3.
67. Marques S, Silva E, Carvalheira J, Thompson G. Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. J Dairy Sci. 2010;93:5110–13 DOI: 10.3168/jds.2010-3249.

68. Melville PA, Watanabe ET, Benités NR, Ribeiro AR, Silva JAB, Garino Jr. F, et al. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia*. 1999;146:79–82.
69. Kessler E. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Prototheca*: I Hydrogenae, Acid Tolerance, Salt Tolerance, Thermophily and Liquefaction of Gelatine. *Arch Microbiol*. 1977;113:139–41 DOI: 10.1007/BF00428593.
70. Ueno R, Wada S, Urano N. Repeated batch cultivation of the hydrocarbon-degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam. *Can J Microbiol*. 2008;54:66–70 DOI: 10.1139/w07-112.
71. Jagielski T, Lagneau P. Protothecosis. A pseudofungal infection. *J Mycol Med*. 2007;17:261–70 DOI: 10.1016/j.mycmed.2007.08.003.
72. Thompson G, Silva E, Marques S, Müller A, Carvalheira J. Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. *Med Mycol*. 2009;47:527–31 DOI: 10.1080/13693780802566341.
73. Lanotte P, Baty G, Senecal D, Dartigeas C, Bailly E, Duong TH, et al. Fatal algaemia in patient with chronic lymphocytic leukemia. *Emerging Infect. Dis*. 2009;15:1129–30 DOI: 10.3201/eid1507.090373.
74. Yeh C, Li M, Chuang Y, Hsu H, Lee M, Zhang C, et al. *Prototheca* algaemia: a rare but fatal opportunistic infection among immunocompromised individuals. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66:523–25.
75. Mohd Tap R, Sabaratnam P, Salleh, Mohd Azmi Mohd, Abd Razak, Mohd Fuat, Ahmad N. Characterization of *Prototheca wickerhamii* isolated from disseminated algaemia of kidney transplant patient from Malaysia. *Mycopathologia*. 2012;173:173–78 DOI: 10.1007/s11046-011-9469-8.
76. Mejia-Otero C, Singh S, Arias Urdaneta L, Sesin C, Chakrabarti A, Miller NM, et al. A rare case of *Prototheca* algaemia in a patient with systemic lupus erythematosus and recent belimumab infusion. *Case Reports Immunol*. 2012;2012:754901 DOI: 10.1155/2012/754901.
77. Kunová A, Kollár T, Spànik S, Krcméry V. First report of *Prototheca wickerhamii* algaemia in an adult leukemic patient. *J Chemother*. 1996;8:166–67 DOI: 10.1179/joc.1996.8.2.166.
78. Sun Y, Pombert J. Helicosporidia: a genomic snapshot of an early transition to parasitism. *Acta Soc Bot Pol*. 2014;83:377–85 DOI: 10.5586/asbp.2014.039.
79. Bläske-Lietze V, Boucias DG. Pathogenesis of *Helicosporidium* sp. (Chlorophyta: Trebouxiophyceae) in susceptible noctuid larvae. *J Invertebr Pathol*. 2005;90:161–68 DOI: 10.1016/j.jip.2005.09.002.

80. Krcméry V, Jr. Systemic chlorellosis, an emerging infection in humans caused by algae. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;15:235–37.
81. Ramírez-Romero R, Rodríguez-Tovar LE, Nevárez-Garza AM, López A. *Chlorella* infection in a sheep in Mexico and minireview of published reports from humans and domestic animals. *Mycopathologia*. 2010;169:461–66 DOI: 10.1007/s11046-010-9287-4.
82. Jones JW, McFadden HW, Chandler FW, Kaplan W, Conner DH. Green algal infection in a human. *Am. J. Clin. Pathol.* 1983;80:102–07.
83. Quigley RR, Knowles KE, Johnson GC. Disseminated chlorellosis in a dog. *Vet Pathol*. 2009;46:439–43 DOI: 10.1354/vp.08-VP-0142-Q-BC.
84. Cordy DR. Chlorellosis in a lamb. *Vet. Pathol.* 1973;10:171–76.
85. Zakia AM, Osheik AA, Halima MO. Ovine chlorellosis in the Sudan. *Vet Rec*. 1989;125:625–26.
86. Kaplan W, Chandler FW, Choudary C, Ramachandran PK. Disseminated unicellular green algal infection in two sheep in India. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32:405–11.
87. Philbey AW, Links IJ, Morrice GC. Algal infection in sheep grazing irrigated pasture. *Aust Vet J.* 2001;79:212–14.
88. Rogers RJ, Connole MD, Norton J, Thomas A, Ladds PW, Dickson J. Lymphadenitis of cattle due to infection with green algae. *J Comp Pathol.* 1980;90:1–9.
89. Le Net, J L, Ahmed MF, Saint-Martin G, Masson MT, Montois C, Longeart L. Granulomatous enteritis in a dromedary (*Camelus dromedarius*) due to green algal infection. *Vet Pathol.* 1993;30:370–73.
90. Hollingsworth SR. Canine protothecosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000;30:1091–101.
91. Ahrholdt J, Rösler U. Genotypische Differenzierung von *Prototheca*-Isolaten aus Milchproben mastitiskranker Rinder in Deutschland. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr.* 2011;124:108–13 DOI: 10.2376/0005-9366-124-108.
92. Coloe PJ, Allison JF. Protothecosis in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982;180:78–79.
93. Dillberger JE, Homer B, Daubert D, Altman NH. Protothecosis in two cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1988;192:1557–59.
94. Finnie JW, Coloe PJ. Cutaneous protothecosis in a cat. *Aust. Vet. J.* 1981;57:307–08.
95. Kaplan W, Chandler FW, Holzinger EA, Plue RE, Dickinson, R O 3rd. Protothecosis in a cat: first recorded case. *Sabouraudia.* 1976;14:281–86.
96. Endo S, Sekiguchi M, Kishimoto Y, Kano R, Aoki S, Sichinohe T, et al. The first case of feline *Prototheca wickerhamii* infection in Japan. *J Vet Med Sci.* 2010;72:1351–53.

97. Huth N, Wenkel RF, Roschanski N, Rösler U, Plagge L, Schöniger S. *Prototheca zopfii* Genotype 2-induced Nasal Dermatitis in a Cat. *J Comp Pathol.* 2015;152:287–90 DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.02.001.
98. Gentles JC, Bond PM. Protothecosis of Atlantic salmon. *Sabouraudia.* 1977;15:133–39.
99. Camboim EKA, Garino FJ, Dantas AFM, Simões SVD, Melo MA, Azevedo EO, et al. Protothecosis by *Prototheca wickerhamii* in goats. *Mycoses.* 2011;54:e196-e200 DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01864.x.
100. Macedo, J T S A, Riet-Correa F, Dantas, A F M, Simões, S V D. Cutaneous and nasal protothecosis in a goat. *Vet Pathol.* 2008;45:352–54 DOI: 10.1354/vp.45-3-352.
101. Crispens CG, Marion KR. Algal infection in a corn snake (*Elaphe guttata guttata*). *Lab Anim Sci.* 1975;25:788–89.
102. Frese K, Gedek B. Ein Fall von Protothekose beim Reh. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr.* 1968;81:174–78.
103. Sileo L, Palmer NC. Probable cutaneous protothecosis in a beaver. *J Wildl Dis.* 1973;9:320–22.
104. Mettler F. Generalisierte Protothecose bei einem Flughund (*Pteropus lylei*). *Vet Clin Pathol.* 1975;12:118–24.
105. Zhao J, Liu W, Lv G, Shen Y, Wu S. Protothecosis successfully treated with amikacin combined with tetracyclines. *Mycoses.* 2004;47:156–58 DOI: 10.1046/j.1439-0507.2003.00955.x.
106. Sud IJ, Feingold DS. Lipid composition and sensitivity of *Prototheca wickerhamii* to membrane-active antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16:486–90 DOI: 10.1128/AAC.16.4.486.
107. Torres HA, Bodey GP, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Protothecosis in patients with cancer: case series and literature review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003;9:786–92.
108. Lass-Flörl C, Fille M, Gunsilius E, Gastl G, Nachbaur D. Disseminated infection with *Prototheca zopfii* after unrelated stem cell transplantation for leukemia. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4907–08 DOI: 10.1128/JCM.42.10.4907-4908.2004.
109. Bouari C, Bolfa P, Borza G, Nadăș G, Cătoi C, Fiț N. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* and *Saturenja hortensis* in a murine model of cutaneous protothecosis. *J Mycol Med.* 2014;24:34–43 DOI: 10.1016/j.mycmed.2013.11.005.
110. Tanaka T, Nakamura I, Lee N, Kumura H, Shimazaki K. Expression of bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe by recombinant baculovirus and its antimicrobial activity against *Prototheca zopfii*. *Biochem Cell Biol.* 2003;81:349–54 DOI: 10.1139/o03-062.

111. Lee N, Kawai K, Nakamura I, Tanaka T, Kumura H, Shimazaki K. Susceptibilities against Bovine Lactoferrin with Microorganisms Isolated from Mastitic Milk. *J Vet Med Sci.* 2004;66:1267–69 DOI: 10.1292/jvms.66.1267.
112. Nelson AM, Neafie RC, Connor DH. Cutaneous protothecosis and chlorellosis, extraordinary “Aquatic-Borne” algal infections. *Clin Dermatol.* 1987;5:76–87 DOI: 10.1016/S0738-081X(87)80012-3.
113. Thiele D, Bergmann A. Protothecosis in human medicine. *Int J Hyg Environ Health.* 2002;204:297–302 DOI: 10.1078/1438-4639-00105.
114. Davies RR, Spencer H, Wakelin PO. A case of human protothecosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964;58:448–51.
115. Sykora T, Horakova J, Buzzasyova D, Sladekova M, Poczova M, Sufliarska S. Protothecal peritonitis in child after bone marrow transplantation: case report and literature review of paediatric cases. *New Microbes New Infect.* 2014;2:156–60 DOI: 10.1002/nmi2.61.
116. Chou D, Chung K, Lee C. *Prototheca wickerhamii* cutaneous and systemic infections. *Am J Trop Med. Hyg.* 2014;91:664–65 DOI: 10.4269/ajtmh.14-0082.
117. Takano M, Hoshi S, Nagai K, Ishidaira H, Onozaki M, Satoh K, et al. The first case of human protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in Japan. *J Infect Chemother.* 2014;20:647–49 DOI: 10.1016/j.jiac.2014.06.009.
118. Macesic N, Fleming S, Kidd S, Madigan V, Chean R, Ritchie D, et al. Protothecosis in hematopoietic stem cell transplantation: case report and review of previous cases. *Transpl Infect Dis.* 2014;16:490–95 DOI: 10.1111/tid.12223.
119. Figueroa CJ, Camp BJ, Varghese GI, Miranda E, Querfeld C, Hassoun H, et al. A case of protothecosis in a patient with multiple myeloma. *J Cutan Pathol.* 2014;41:409–13 DOI: 10.1111/cup.12338.
120. Zhang Q, Li L, Yuli K, Zhao Y, Zhu J, Zhu M. A case of cutaneous protothecosis mimics eczema. *Mycopathologia.* 2015;179:163–66 DOI: 10.1007/s11046-014-9812-y.
121. Gandham NR, Vyawahare CR, Chaudhary N, Shinde RA. Onychoprototthecosis: An uncommon presentation of protothecosis. *Indian J Med Microbiol.* 2015;33:435–37 DOI: 10.4103/0255-0857.158583.
122. Knox J, Coloe SV, Perera C, Waring LJ, Fuller A. *Prototheca wickerhamii* olecranon bursitis successfully treated with adjunctive systemic itraconazole. *Pathology.* 2015;47:388–91 DOI: 10.1097/PAT.000000000000266.
123. Lass-Flörl C, Mayr A. Human Protothecosis. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:230–42 DOI: 10.1128/CMR.00032-06.

124. Iacoviello VR, DeGirolami PC, Lucarini J, Sutker K, Williams ME, Wanke CA. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. *Clin Infect Dis*. 1992;15:959–67.
125. Blaschke-Hellmessen R, Schuster H, Schuster K. Chlorophyllose Algen der Gattung *Prototheca* (Krüger)--Saprophyten und Krankheitserreger bei Mensch und Tier. *Z Gesamte Hyg*. 1985;31:561–64.
126. Wirth FA, Passalacqua JA, Kao G. Disseminated cutaneous protothecosis in an immunocompromised host: a case report and literature review. *Cutis*. 1999;63:185–88.
127. Woolrich A, Koestenblatt E, Don P, Szaniawski W. Cutaneous protothecosis and AIDS. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31:920–24 DOI: 10.1016/S0190-9622(94)70260-8.
128. Boyd AS, Langley M, King LE. Cutaneous manifestations of *Prototheca* infections. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32:758–64 DOI: 10.1016/0190-9622(95)91456-0.
129. Venezia FR, Lavoo E, Williams JE, Zeiss CR, Caro WA, Mangkornkanok-Mark M, et al. Progressive cutaneous protothecosis. *Am J Clin Pathol*. 1982;77:485–93.
130. Chao S, Hsu M, Lee J. Cutaneous protothecosis: report of five cases. *Br J Dermatol*. 2002;146:688–93 DOI: 10.1046/j.1365-2133.2002.04609.x.
131. Heitzman HB, Brooks, T J Jr, Phillips BJ. Protothecosis. *South Med J*. 1984;77:1477–78.
132. Gibb AP, Aggarwal R, Swainson CP. Successful treatment of *Prototheca* peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Infect*. 1991;22:183–85.
133. Wolfe ID, Sacks HG, Samorodin CS, Robinson HM. Cutaneous protothecosis in a patient receiving immunosuppressive therapy. *Arch Dermatol*. 1976;112:829–32.
134. Kwok N, Schwartz SN. *Prototheca* sepsis in a lung transplant patient. *Clin Microbiol Newsl*. 1996;18:183–84 DOI: 10.1016/0196-4399(96)84101-8.
135. Khoury JA, Dubberke ER, Devine SM. Fatal case of protothecostosis in a hematopoietic stem cell transplant recipient after infliximab treatment for graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;104:3414–15 DOI: 10.1182/blood-2004-07-2720.
136. Carey WP, Kaykova Y, Bandres JC, Sidhu GS, Bräu N. Cutaneous Protothecosis in a Patient with AIDS and a Severe Functional Neutrophil Defect: Successful Therapy with Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1265–66 DOI: 10.1086/516974.
137. Kaminski ZC, Kapiia R, Sharer LR, Kloser P, Kaufman L. Meningitis Due to *Prototheca wickerhamii* in a Patient with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992;15:704–06 DOI: 10.1093/clind/15.4.704.
138. Thianprasit M, Youngchaiyud U, Suthipinittharm P. Protothecosis: a report of two cases. *Mykosen*. 1983;26:455–61.
139. Holcomb, H S 3rd, Behrens F, Winn, W C Jr, Hughes JM, McCue, F C 3rd. *Prototheca wickerhamii* - an alga infecting the hand. *J Hand Surg Am*. 1981;6:595–99.

140. Laeng RH, Egger C, Schaffner T, Borisch B, Pedrinis E. Protothecosis in an HIV-positive patient. *Am J Surg Pathol.* 1994;18:1261–64.
141. Matsuda T, Matsumoto T. Protothecosis: A report of two cases in Japan and a review of the literature. *Eur J Epidemiol.* 1992;8:397–406 DOI: 10.1007/BF00158575.
142. Okuyama Y, Hamaguchi T, Teramoto T, Takiuchi I. A Human Case of Protothecosis Successfully Treated with Itraconazole. *Jpn J Med Mycol.* 2001;42:143–47 DOI: 10.3314/jjmm.42.143.
143. Lee WS, Lagios MD, Leonards R. Wound infection by *Prototheca wickerhamii*, a saprophytic alga pathogenic for man. *J Clin Microbiol.* 1975;2:62–66.
144. Lerche M. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr.* 1954;65:64–69.
145. Wawron W, Bochniarz M, Piech T, Łopuszyński W, Wysocki J. Outbreak of protothecal mastitis in a herd of dairy cows in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2013;57 DOI: 10.2478/bvip-2013-0058.
146. Pieper L, Godkin A, Roesler U, Polleichtner A, Slavic D, Leslie K, et al. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *J Dairy Sci.* 2012;95:5635–44 DOI: 10.3168/jds.2011-5106.
147. Bueno VFF, de Mesquita, Albenones José, Neves, Rodrigo Balduino Soares, de Souza, Marcos Almeida, Ribeiro AR, Nicolau ES, et al. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia.* 2006;161:141–45 DOI: 10.1007/s11046-005-0145-8.
148. Baumgärtner B. Vorkommen und Bekämpfung der Protothekenmastitis des Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Potsdam. *Prakt Tierarzt.* 1997;78:406–14.
149. Jagielski T, Lassa H, Ahrholdt J, Malinowski E, Roesler U. Genotyping of bovine *Prototheca mastitis* isolates from Poland. *Vet Microbiol.* 2011;149:283–87 DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.09.034.
150. Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, et al. 26S rDNA-Based Phylogenetic Investigation of Japanese Cattle-Associated *Prototheca zopfii* Isolates. *J Vet Med Sci.* 2010;72:123–26.
151. Marques S, Silva E, Kraft C, Carvalheira J, Videira A, Huss VAR, et al. Bovine Mastitis Associated with *Prototheca blaschkeae*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1941–45 DOI: 10.1128/JCM.00323-08.
152. Jensen HE, Aalbaek B, Bloch B, Huda A. Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. *Med Mycol.* 1998;36:89–95 DOI: 10.1046/j.1365-280X.1998.00132.x.
153. Gedek B, Weber A. *Prototheca*-Mastitiden beim Rind als Bestandsproblem. *Tierarztl Prax.* 1978;6:441–50.

154. Dion WM. Bovine Mastitis due to *Prototheca zopfii* II. Can. Vet. J. 1982;23:272–75.
155. Tenhagen B-, Kalbe P, Klünder G, Heuwieser W, Baumgärtner B. Tierindividuelle Risikofaktoren für die Protothekenmastitis des Rindes. DTW. 1999;106:376–80.
156. Corbellini LG, Driemeier D, Cruz C, Dias MM, Ferreiro L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. Trop Anim Health Prod. 2001;33:463–70.
157. Jánosi S, Sziget G, Rátz F, Laukó T, Kerényi J, Tenk M, et al. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. Vet Q. 2001;23:80–83 DOI: 10.1080/01652176.2001.9695087.
158. Salerno T, Ribeiro MG, Langoni H, Siqueira AK, Costa EO, Melville PA, et al. In vitro algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. Res Vet Sci. 2010;88:211–13 DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.08.001.
159. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Melville PA. Infectious Bovine Mastitis Caused by Environmental Organisms. J Vet Med B. 1998;45:65–71 DOI: 10.1111/j.1439-0450.1998.tb00768.x.
160. Schuster H, Blaschke-Hellmessen R. Epizootologie der Protothekenmastitis des Rindes - Anzüchtung von Algen der Gattung *Prototheca* aus der Umgebung landwirtschaftlicher Nutztiere. Monatsh Veterinarmed. 1983;38:24–29.
161. Costa. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. Mycopathologia. 1997;137:33–36.
162. Schick W, Kutzer H. Zum Auftreten, zur Diagnostik und zur Bekämpfung der durch *Prototheca trispora* bedingten Mastitis des Rindes. Mh. Vet.-Med-. 1982;367:295–98.
163. Roesler U, Hensel A. Longitudinal Analysis of *Prototheca zopfii*-Specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows. J Clin Microbiol. 2003;41:1181–86 DOI: 10.1128/JCM.41.3.1181-1186.2003.
164. Bergmann A. Wirkung von Levamisol- und Tetramisolhydrochlorid in vitro gegen *Prototheca zopfii* und *Candida*. Monatsh Veterinarmed. 1987;42:599–602.
165. Bergmann A. Experimentelle Prototheken-Mastitis beim Rind und Therapie mit Tetramisolhydrochlorid. Berl Muench Tieraerztl Wochenschr. 1993;106:257–60.
166. Tomasinsig L, Skerlavaj B, Scarsini M, Guida F, Piccinini R, Tossi A, et al. Comparative activity and mechanism of action of three types of bovine antimicrobial peptides against pathogenic *Prototheca* spp. J Pept Sci. 2012;18:105–13 DOI: 10.1002/psc.1422.
167. Van Kruiningen, H J, Garner FM, Schiefer B. Protothecosis in a dog. Pathol Vet. 1969;6:348–54.

168. Palm V. Entwicklung eines indirekten ELISA-Testsystems zur Serodiagnostik der caninen Protothekeninfektion und nachfolgender Untersuchung der Prävalenz der caninen Protothekose. Inaugural-Dissertation. Berlin; 2014.
169. Stenner VJ, MacKay B, King T, Barrs VRD, Irwin P, Abraham L, et al. Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. *Med Mycol.* 2007;45:249–66 DOI: 10.1080/13693780601187158.
170. Beribè F, Miglio A, Cassarani MP, Magi G, Passamonti F, Laus F, et al. What is your diagnosis? Systemic lymphadenopathy and blindness in a dog from Italy. *Vet Clin Pathol.* 2014;43:605–06 DOI: 10.1111/vcp.12189.
171. Manino PM, Oliveira F, Ficken M, Swinford A, Burney D. Disseminated protothecosis associated with diskospondylitis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2014;50:429–35 DOI: 10.5326/JAAHA-MS-6083.
172. Font C, Mascort J, Márquez M, Esteban C, Sánchez D, Durall N, et al. Paraparesis as initial manifestation of a *Prototheca zopfii* infection in a dog. *J Small Anim Pract.* 2014;55:283–86 DOI: 10.1111/jsap.12188.
173. Márquez M, Ródenas S, Molin J, Rabanal RM, Fondevila D, Añor S, et al. Protothecal pyogranulomatous meningoencephalitis in a dog without evidence of disseminated infection. *Vet Rec.* 2012;171:100 DOI: 10.1136/vr.100661.
174. Salvadori C, Gandini G, Ballarini A, Cantile C. Protothecal granulomatous meningoencephalitis in a dog. *J Small Anim Pract.* 2008;49:531–35 DOI: 10.1111/j.1748-5827.2008.00579.x.
175. Rallis TS, Tontis D, Adamama-Moraitou KK, Mylonakis ME, Papazoglou LG. Protothecal colitis in a German shepherd dog. *Aust. Vet. J.* 2002;80:406–08.
176. Ginel PJ, Perez J, Molleda JM, Lucena R, Mozos E. Cutaneous protothecosis in a dog. *Vet Rec.* 1997;140:651–53 DOI: 10.1136/vr.140.25.651.
177. Fuchs A, Fidler G, Meissel H. Protothekose bei einem Hund. *Wien Tierarztl Monatsschr.* 1996;83:60–63.
178. Macartney L, Rycroft AN, Hammil J. Cutaneous protothecosis in the dog: first confirmed case in Britain. *Vet Rec.* 1988;123:494–96.
179. Povey RC, Austwick PK, Pearson H, Smith KC. A case of protothecosis in a dog. *Pathol Vet.* 1969;6:396–402.
180. Gorisson S. Protothekose bei einem Riesenschnauzer. *Kleintierprax (Kleintierpraxis).* 2011;56:16–20.
181. Birke L. Protothekose bei einem deutschen Schäferhund. *Prakt Tierarzt.* 2002;83:952–57.

182. Allgoewer I, Ehrlein J, Goebel T, Hermanns W, Leibold W, Schäffer E, et al. Disseminierte Protothekose bei einem Riesenschnauzer. Kleintierprax (Kleintierpraxis). 1998;43:375–91.
183. Hosaka S, Hosaka M. A case report of canine protothecosis. J Vet Med Sci. 2004;66:593–97.
184. Tsuji H, Kano R, Hirai A, Murakami M, Yanai T, Namihira Y, et al. An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. Vet Microbiol. 2006;118:305–11.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506003117> DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.08.003.
185. Vince AR, Pinard C, Ogilvie AT, Tan EO, Abrams-Ogg, Anthony C G. Protothecosis in a dog. Can Vet J. 2014;55:950–54.
186. Ribeiro MG, Rodrigues de Farias M, Roesler U, Roth K, Rodigheri SM, Ostrowsky MA, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. Res Vet Sci. 2009;87:479–81 DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.04.015.
187. Imes GD, Lloyd JC, Brightman MP. Disseminated prothothecosis in a dog. Onderstepoort J Vet Res. 1977;44:1–6.
188. Sudman MS, Majka JA, Kaplan W. Primary mucocutaneous protothecosis in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1973;163:1372–74.
189. Font RL, Hook SR. Metastatic protothecal retinitis in a dog. Electron microscopic observations. Vet Pathol. 1984;21:61–66.
190. Wilkinson GT, Leong G. Protothecosis in a dog. Aust Vet Pract. 1988;18:47–50.
191. Holscher MA, Shasteen WJ, Powell HS. Disseminated canine protothecosis: A case report. J Am Anim Hosp Assoc. 1976;12:49–52.
192. Carlton WW, Austin L. Ocular protothecosis in a dog. Vet. Pathol. 1973;10:274–80.
193. Buyukmihci N, Rubin LF, DePaoli A. Protothecosis with ocular involvement in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1975;167:158–61.
194. Cook JR, Tyler DE, Coulter DB, Chandler FW. Disseminated protothecosis causing acute blindness and deafness in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1984;184:1266–72.
195. Moore FM, Schmidt GM, Desai D, Chandler FW. Unsuccessful treatment of disseminated protothecosis in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1985;186:705–08.
196. Blogg JR, Sykes JE. Sudden blindness associated with protothecosis in a dog. Aust Vet J. 1995;72:147–49.
197. Rizzi TE, Cowell RL, Meinkoth JH, Gilmour MA. More than meets the eye: subretinal aspirate from an acutely blind dog. Vet Clin Pathol. 2006;35:111–13 DOI: 10.1111/j.1939-165X.2006.tb00099.x.

198. Schultze AE, Ring RD, Morgan RV, Patton CS. Clinical, cytologic and histopathologic manifestations of protothecosis in two dogs. *Vet Ophthalmol.* 1998;1:239–43.
199. Hariprasad SM, Prasad A, Smith M, Shah GK, Grand MG, Shepherd JB, et al. Bilateral choroiditis from *Prototheca wickerhamii* algaeaemia. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:1138–41 DOI: 10.1001/archophth.123.8.1138.
200. Tyler DE, Lorenz MD, Blue JL, Munnell JF, Chandler FW. Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1980;176:987–93.
201. Gaunt SD, McGrath RK, Cox HU. Disseminated protothecosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;185:906–07.
202. Young M, Bush W, Sanchez M, Gavin P, Williams M. Serial MRI and CSF analysis in a dog treated with intrathecal amphotericin B for protothecosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2012;48:125–31 DOI: 10.5326/JAAHA-MS-5701.
203. Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, Gonzalez-Muñoz M, et al. Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *Proteomics.* 2014;14:1547–68 DOI: 10.1002/pmic.201300529.
204. Lane LV, Meinkoth JH, Brunker J, Smith SK, Snider TA, Thomas J, et al. Disseminated protothecosis diagnosed by evaluation of CSF in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2012;41:147–52 DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00395.x.
205. Gupta A, Gumber S, Bauer RW, Royal AB. What is your diagnosis? Cerebrospinal fluid from a dog. Eosinophilic pleocytosis due to protothecosis. *Vet Clin Pathol.* 2011;40:105–06 DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00292.x.
206. Rakich PM, Latimer KS. Altered immune function in a dog with disseminated protothecosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;185:681–83.
207. Meredith RE, Gwin RM, Samuelson DA, BUERGELT CD, GELATT KN. Systemic protothecosis with ocular manifestations in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1984;20:153–56.
208. Pappin D, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology.* 1993;3:327–32 DOI: 10.1016/0960-9822(93)90195-T.
209. Ludolf F, Patrocínio PR, Corrêa-Oliveira R, Gazzinelli A, Falcone FH, Teixeira-Ferreira A, et al. Serological Screening of the *Schistosoma mansoni* Adult Worm Proteome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2745 DOI: 10.1371/journal.pntd.0002745.
210. Chaturvedi AK, Weintraub ST, Lopez-Ribot JL, Wormley FL. Identification and characterization of *Cryptococcus neoformans* protein fractions that induce protective immune responses. *Proteomics.* 2013;13:3429–41 DOI: 10.1002/pmic.201300213.

211. Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, et al. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*. 2008;8:1744–49 DOI: 10.1002/pmic.200700919.
212. Lee M, Kim Y, Kim D, Yoo WG, Cho S, Hwang KY, et al. The identification of antigenic proteins: 14-3-3 protein and propionyl-CoA carboxylase in *Clonorchis sinensis*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;182:1–6 DOI: 10.1016/j.molbiopara.2011.11.006.
213. Blanc G, Duncan G, Agarkova I, Borodovsky M, Gurnon J, Kuo A, et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell*. 2010;22:2943–55 DOI: 10.1105/tpc.110.076406.
214. Grimsley N, Péquin B, Bachy C, Moreau H, Piganeau G. Cryptic sex in the smallest eukaryotic marine green alga. *Mol Biol Evol*. 2010;27:47–54 DOI: 10.1093/molbev/msp203.
215. Goodenough U, Lin H, Lee J. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:350–61 DOI: 10.1016/j.semcdb.2007.02.006.
216. Roschanski N. Schwierigkeiten bei der Genomsequenzierung des Stammes SAG 2021 (*P. zopfii* GT2). mündlich. FU Berlin; 2015.
217. Pancholi V, Chhatwal GS. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2003;293:391–401 DOI: 10.1078/1438-4221-00283.
218. Henderson B, Martin A. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun*. 2011;79:3476–91 DOI: 10.1128/IAI.00179-11.
219. Alvarez RA, Blaylock MW, Baseman JB. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Mol Microbiol*. 2003;48:1417–25 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03518.x.
220. Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is a Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein. *Infect Immun*. 2004;72:2416–19 DOI: 10.1128/IAI.72.4.2416-2419.2004.
221. Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J, et al. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1190–203 DOI: 10.1016/j.biocel.2007.03.008.
222. Oliveira L, Madureira P, Andrade EB, Bouaboud A, Morello E, Ferreira P, et al. Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. *PLoS ONE*. 2012;7:e29963 DOI: 10.1371/journal.pone.0029963.

223. Murugaiyan J, Weise C, Bergen M von, Roesler U. Two-dimensional proteome reference map of *Prototheca zopfii* revealed reduced metabolism and enhanced signal transduction as adaptation to an infectious life style. *Proteomics*. 2013;13:2664–69 DOI: 10.1002/pmic.201300037.
224. Alloush HM, Lopez-Ribot JL, Masten BJ, Chaffin WL. 3-Phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology*. 1997;143:321–30 DOI: 10.1099/00221287-143-2-321.
225. Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol*. 2001;40:1273–87 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02448.x.
226. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 2002;46:1041–51 DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03207.x.
227. Engbring JA, O'Brien JL, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. *Adv Exp Med Biol*. 1996;408:207–23.
228. Tunio SA, Oldfield NJ, Ala'Aldeen, Dlawer A A, Wooldridge KG, Turner, David P J. The role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GapA-1) in *Neisseria meningitidis* adherence to human cells. *BMC Microbiol*. 2010;10:280 DOI: 10.1186/1471-2180-10-280.
229. Murugaiyan J. Analyse des Kulturüberstandes von *P. zopfii* GT2 durch 2D SDS-PAGE und MALDI TOF MS. mündlich, email. FU Berlin; 2013-2015.
230. Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*. 2007;581:3702–10 DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.
231. Kakeya H, Uono H, Ikuno N, Yamamoto Y, Mitsutake K, Miyazaki T, et al. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. *Infect Immun*. 1997;65:1653–58.
232. Kakeya H, Uono H, Maesaki, Sasaki E, Kawamura S, Hossain MA, et al. Heat shock protein 70 (hsp70) as a major target of the antibody response in patients with pulmonary cryptococcosis. *Clin Exp Immunol*. 1999;115:485–90 DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00821.x.
233. Demiroglu SY. Role of heat shock protein 70 and sulphatases 1 and 2 in apoptosis induced by cytotoxic cells of the immune system. Dissertation. Göttingen; 2009.

234. Asea A, Kraeft S, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 2000;6:435–42.
235. Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A, Draghi M, Frigimelica E, Berger J, et al. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol.* 2002;20:914–21 DOI: 10.1038/nbt728.
236. Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie*. 2nd ed. Spektrum-Lehrbuch. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.; 2003.
237. Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*;86:2453–57.
238. Romero-Saavedra F, Laverde D, Wobser D, Michaux C, Budin-Verneuil A, Bernay B, et al. Identification of peptidoglycan-associated proteins as vaccine candidates for enterococcal infections. *PLoS ONE.* 2014;9:e111880 DOI: 10.1371/journal.pone.0111880.
239. Hecker YP, Cóceres V, Wilkowsky SE, Jaramillo Ortiz, José M, Morrell EL, Verna AE, et al. A *Neospora caninum* vaccine using recombinant proteins fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;162:142–53 DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.11.001.
240. van den Berg, Sanne, Koedijk, Dennis G A M, Back JW, Neef J, Dreisbach A, van Dijl, Jan Maarten, et al. Active Immunization with an Octa-Valent *Staphylococcus aureus* Antigen Mixture in Models of *S. aureus* Bacteremia and Skin Infection in Mice. *PLoS ONE.* 2015;10:e0116847 DOI: 10.1371/journal.pone.0116847.
241. Ferguson N, Anderson R, Gupta S. The effect of antibody-dependent enhancement on the transmission dynamics and persistence of multiple-strain pathogens. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1999;96:790–94.
242. Royce CL, Pardy RL. Endotoxin-like properties of an extract from a symbiotic, eukaryotic *Chlorella*-like green alga. *Innate Immun.* 1996;3:437–44 DOI: 10.1177/096805199600300601.
243. Bedick JC, Shnyra A, Stanley DW, Pardy R. Innate immune reactions stimulated by a lipopolysaccharide-like component of the alga *Prototheca* (strain 289). *Naturwissenschaften.* 2001;88:482–85 DOI: 10.1007/s00114-001-0269-8.
244. Pérez J, Ginel PJ, Lucena R, Hervás J, Mozos E. Canine Cutaneous Protothecosis: an Immunohistochemical Analysis of the Inflammatory Cellular Infiltrate. *J Comp Path.* 1997;117:83–89.
245. Eidner A. Hämatogene Erreger-Wirt-Interaktionen bei Infektionen mit pathogenen Algen des Genus *Prototheca*. Diplomarbeit. Leipzig; 2006.

246. Martins LMS, Andrade HMd, Vainstein MH, Wanke B, Schrank A, Balaguez CB, et al. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: Novel candidate antigens for diagnosis. *Future Microbiol.* 2013;8:549–63 DOI: 10.2217/FMB.13.22.
247. Cheville NF, McDonald J, Richard J. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in Bovine Granulomatous Mastitis. *Vet. Pathol.* 1984;21:341–48.
248. Keen EC. Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:161 DOI: 10.3389/fcimb.2012.00161.
249. Brüssow H, Canchaya C, Hardt W. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:560-602, table of contents DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004.
250. Barksdale L, Arden SB. Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions. *Annu Rev Microbiol.* 1974;28:265–99 DOI: 10.1146/annurev.mi.28.100174.001405.
251. Weeks CR, Ferretti JJ. The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) is located in bacteriophage T12. *Infect. Immun.* 1984;46:531–36.
252. Freeman VJ. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol.* 1951;61:675–88.
253. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science.* 1984;226:694–96.
254. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996;272:1910–14.
255. Boyd E, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 2002;10:521–29 DOI: 10.1016/S0966-842X(02)02459-9.
256. Van Etten, James L, Dunigan DD. Chloroviruses: not your everyday plant virus. *Trends Plant Sci.* 2012;17:1–8 DOI: 10.1016/j.tplants.2011.10.005.
257. Van Etten, J L, Lane LC, Meints RH. Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. *Microbiol Rev.* 1991;55:586–620.
258. Kang M, Duncan GA, Kuszynski C, Oyler G, Zheng J, Becker DF, et al. Chlorovirus PBCV-1 encodes an active copper-zinc superoxide dismutase. *J Virol.* 2014;88:12541–50 DOI: 10.1128/JVI.02031-14.

8 Publikationsverzeichnis

Fachartikel:

Irrgang A, Weise C, Murugaiyan J, Roesler U. Identification of immunodominant proteins of the microalgae *Prototheca* by proteomic analysis. *New Microbes New Infect.* 2015;3:37–40
DOI: 10.1016/j.nmni.2014.10.004.

Irrgang A, Murugaiyan J, Weise C, Azab W, Roesler U. Well-known surface and extracellular antigens of pathogenic microorganisms among the immunodominant proteins of the infectious microalgae *Prototheca zopfii*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:67
DOI: 10.3389/fcimb.2015.00067.

Poster:

Irrgang, A.; Weise, C.; Murugaiyan, J.; Roesler, U.
Identification of antigenic proteins of infectious microalgae (*Prototheca* spp.) using proteomics approaches.
Tagung der DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie
München; 25.05. - 28.05.2014.

Irrgang, A.; Murugaiyan, J.; Weise, C.; Rösler, U.
Identification of infectious microalgae *Prototheca* spp. specific immunogenic proteins using proteomic analysis.
VAAM-Jahrestagung 2014, 66. Jahrestagung der DGHM
Dresden; 05.10. - 08.10.2014.

Irrgang, A.; Weise, C.; Murugaiyan, J.; Roesler, U.
Identification of microalgae *Prototheca* spp. specific immunogenic proteins using proteomics analysis.
The Münster Conference on Biomolecule Analysis
Münster; 05.12.2014.

Irrgang, A.; Murugaiyan, J.; Weise, C.; Azab, W.; Roesler, U.
Proteomics-based identification of immunodominant proteins of pathogenic microalgae of genus *Prototheca* spp. using sera naturally infected dogs.
19th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM 2015)
Melbourne; 04.05. - 08.05.2015.

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die zum Verfassen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Vielen Dank an Prof. Rösler, dass er es mir ermöglicht hat, am Institut für Tier- und Umwelthygiene zu promovieren sowie für die Unterstützung und kontinuierliche Betreuung meines begleitenden PhD-Studiums. Mein Dank gilt dabei auch meinen anderen beiden PhD-Betreuern, Prof. Alter und PD Dr. Nöckler, die sich regelmäßig die Zeit genommen haben, um sich über den Stand meiner Doktorarbeit zu informieren und in konstruktiven Gesprächen das Vorankommen der Arbeit mit fachlichen Anregungen zu unterstützen.

Mein besonderer Dank gilt Jay für dessen ambitionierte Betreuung. Er hat es ermöglicht, dass ich mit meinen eigentlich molekularbiologischen Erfahrungen letztendlich mit einem biochemischen Thema promoviere. Dabei blieb der Spaß nie auf der Strecke.

Für viel Saß und Witz im Labor hat auch Micha gesorgt. Die tolle Zusammenarbeit und lustigen Blödeleien fehlen mir sehr.

Ein großes Dankeschön gebührt Nicole Roschanski, die stets ein offenes Ohr für anfallende Probleme hatte, immer einen fachlichen Ratschlag für mich parat hatte und auch immer noch hat. Frust und Rückschläge ließ ich mit ihr sportlich hinter mir.

Ich möchte mich bei meinen „Mitdoktoranden“ Henriette, Karo, Nils, Michaela und Kathrin für die gegenseitige Unterstützung, den stetigen Austausch und gemeinsame Pausengestaltung danken. Ein spezieller Dank gilt dabei Nils, der über lange Zeit mehr an die Entstehung dieser Doktorarbeit geglaubt hat, als ich selbst. Ich bedanke mich bei allen anderen hier nicht namentlich genannten Kollegen für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke außerdem den Adleraugen von Silvia, Doris und meiner Mama, die mir bei der Korrektur der Arbeit so toll geholfen haben. Meinen beiden Eltern Danke ich für ihre Unterstützung und Vertrauen in mich.

Die mit Abstand beständigste Unterstützung verdanke ich meiner Familie - meinem Mann Stefan und meinen Kindern Maya und Jaz. Sie sind mein Rückgrat im Alltag. Ihnen fiel die schwierige Aufgabe zu, Stimmungsschwankungen zu ertragen, mich aufzumuntern, oder abzulenken. Ich freue mich, die täglichen Herausforderungen gemeinsam mit Ihnen zu meistern. Ohne Stefan und unsere flexible Arbeitsteilung wäre es nicht möglich gewesen diese Doktorarbeit anzufertigen. Daher widme ich diese Arbeit dem zukünftigen „Herrn Doktor Alexandra Irrgang“.

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 15.06.2016

Alexandra Irrgang