

Tierärztliche Hochschule Hannover

Institut für Parasitologie

Analyse des Gesamttranskriptoms, Sekretoms und Transmembranoms der
Roten Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae*

THESE

Zur Erlangung des Grades eines

DOCTOR OF PHILOSOPHY

(PhD)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von

Sabine Schicht
aus Erfurt

Hannover 2013

Supervisorin: Prof. Dr. Christina Strube, PhD

Betreuungsgruppe: Prof. Dr. Christina Strube, PhD

Prof. Dr. Ute Radespiel

Prof. Dr. Anja Joachim

1. Gutachten: Prof. Dr. Christina Strube, PhD

Institut für Parasitologie

Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Ute Radespiel

Institut für Zoologie

Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Anja Joachim

Institut für Parasitologie

Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich

2. Gutachten: Prof. Dr. Christoph G. Grevelding

Institut für Parasitologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2013

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt:

Schicht, S., Qi, W., Poveda, L., Strube, C. In silico analysis of *Dermanyssus gallinae* transmembrane and excretory/secretory proteins.

24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Perth, Australien, 25.-29.08.2013

Schicht, S., Qi, W., Poveda, L., Strube, C. In silico-Analyse von exkretorisch/sekretorischen und Transmembranproteinen der Roten Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae*.

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Gießen, 08.-10.07.2013

Schicht, S., Qi, W., Poveda, L., Schnieder, T., Strube, C. Transkriptomanalyse der Roten Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae* mittels 454-Pyrosequenzierung.

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Hannover, 02.-04.07.2012

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Nukleotidsequenzen wurden in folgenden Datenbanken hinterlegt:

Rohdaten (*reads*) der 454-Pyrosequenzierung sind unter der Experiment-Zugangsnummer SRX222259 im *Short Read Archive* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verfügbar

Assemblierte *reads* sind unter der Projekt-Zugangsnummer GAIF00000000 der *Transcriptome Shotgun Assembly* Sequenzdatenbank des NCBI verfügbar

In Liebe Diego, Manou und Andi gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Publikationen	4
Übergreifende Diskussion	5
Transkriptomanalyse der Roten Vogelmilbe	5
Erstellung und Untersuchung von <i>D. gallinae</i> -Gesamt-RNA	5
De novo-Sequenzierung des Transkriptoms	6
Identifizierung von Sequenzhomologen und funktionelle Annotierung	6
In silico-Analyse von putativen exkretorisch/sekretorischen (pES) und Transmembranproteinen (pTM)	9
Identifizierung von Sequenzhomologen und funktionelle Annotierung von pES und pTM Proteinen	10
Zusammenfassung	15
Summary	16
Literaturverzeichnis	17
Danksagung	27

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ALV	Aviärer Leukosevirus
bp	Basenpaare
CatD	Cathepsin D
CatL	Cathepsin L
Dg	<i>Dermanyssus gallinae</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>env</i>	<i>env</i> -Gen, Gen der Retroviren, was Proteine der Hülle codiert
EST	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	lateinisch: <i>et alii</i> = und andere
FGCZ	<i>Functional Genomic Centre Zurich</i>
<i>gag</i>	<i>gag</i> -Gen, Gruppenspezifisches Antigen der Retroviren
GO	Genontologie
HRF	<i>histamine release factor</i>
IgY	Immunglobulin Y
KEGG	englisch: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> = Kyoto Enzyklopädie von Genen und Genomen
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nr	englisch: <i>non-redundant</i> = nicht-redundant
<i>nrf-6</i>	<i>nose resistant to fluoxetine protein 6</i>
pES Proteine	putativ exkretorisch/sekretorische Proteine
PhD	<i>Doctor of Philosophy</i>
pTM Proteine	putative Transmembranproteine
p-Wert	Signifikanzwert; englisch: <i>p= probability</i> = Wahrscheinlichkeit
RNA	Ribonukleinsäuren
RRM	englisch: <i>RNA recognition motif</i> = RNA-Erkennungsmotiv
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäuren

Einleitung

Die Rote Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae* (DE GEER 1778) ist ein hämatophager Ektoparasit, welcher weltweit domestizierte und Wildvögel befällt. Dieser transiente Parasit befällt den Wirt bei Nacht, während er sich am Tag z.B. in Ritzen und Spalten des Stalls versteckt (CHAUVE 1998). In Abwesenheit ihres präferierten Wirtes befällt die Rote Vogelmilbe auch Haus- und Heimtiere wie Pferde, Hunde, Katzen, Nager und sogar den Menschen (SIKES u. CHAMBERLAIN 1954; BROCKIS 1980). Ist jedoch kein Wirt verfügbar, kann die Milbe über Monate hungern (AXTELL u. ARENDS 1990; NORDENFORS et al. 1999). Eine Infestation kann starken Juckreiz und Dermatitiden verursachen und erhöht die Gefahr von aggressivem Picken und Kannibalismus im Geflügelbestand (ABRAHAMSSON et al. 1998; CHAUVE 1998; KOENRAADT u. DICKE 2010). Zudem kann eine Infestation mit *D. gallinae* beim Wirtschaftsgeflügel nicht nur gravierende Leistungsminderungen, sondern mitunter den Tod durch Anämie für das befallene Tier zur Folge haben, woraus beträchtliche wirtschaftliche Einbußen resultieren können (KIRKWOOD 1967; SPARAGANO et al. 2009). Allein für Europa werden jährlich 130 Millionen Euro Verluste geschätzt, die auf Einbußen durch z.B. eine verminderte Eiproduktion und die Bekämpfung von *D. gallinae* zurück zu führen sind (VAN EMOUS 2005). Unter optimalen Bedingungen entwickelt sich die Rote Vogelmilbe innerhalb von einer Woche vom Ei zum Adulten, was zur raschen Entwicklung einer hohen Populationsdichte führen kann (WOOD 1917; MAURER u. BAUMGARTNER 1992). Die Bekämpfung von *D. gallinae* ist sehr schwierig, auch wenn ungefähr 35 unterschiedliche akarizide Substanzen als effektiv gegen diesen Ektoparasiten erachtet werden (CHAUVE 1998). Anwendungsfehler wie die Verwendung einer falschen Dosierung oder ein mehrfach wiederholter Einsatz können eine Akarizidresistenz zur Folge haben, was schon für einige Substanzen oder Wirkstoffgruppen wie z.B. Pyrethroide oder Organophosphate beschrieben wurde (ZEMAN 1987; CHAUVE 1998; NORDENFORS et al. 2001). In Deutschland stehen befallene Betriebe bezüglich der Bekämpfung vor großen Schwierigkeiten, da derzeit nur ein Akarizid zur Anwendung im belegten Stall zugelassen ist. Daher, sowie durch ihre Vektorfunktion wie z.B. für *Salmonella* spp. (VALIENTE MORO et al. 2007; HAMIDI et al. 2011) und ihrer zoonotischen Relevanz (BECK u. PFISTER, 2006), ist die Rote Vogelmilbe einer der bedeutendsten Parasiten in der modernen Geflügelhaltung. Deshalb wären neue Bekämpfungsmethoden durch z.B. die Identifizierung neuer Wirkstoffe oder die Entwicklung einer rekombinanten Vakzine für die Gesundheit des Geflügels bei gleichzeitiger Senkung möglicher Kosten wünschenswert.

Einleitung

Impfversuche gegen die Rote Vogelmilbe waren in den letzten Jahren schon häufiger Gegenstand der Forschung:

Ein Vakzineversuch, bei dem Legehennen mit somatischen *D. gallinae*-Antigenen immunisiert wurden, konnte mit Hilfe eines in vitro-Fütterungsversuchs einen Mortalitätsanstieg der Roten Vogelmilbe von 50,6 % ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle erzielen (HARRINGTON et al. 2009a). Eine Untersuchung der verschiedenen Proteinfractionen der somatischen Antigene ergab, dass es sich bei diesen geimpften Proteinen wahrscheinlich, um Tropomyosin, Myosin und Aktin sowie weitere, aber nicht identifizierte Proteine handelte. Mit dem Wissen über andere blutsaugende Arthropoden immunisierten HERRINGTON et al. (2009b) Geflügel mit dem rekombinant hergestellten Protein Subolesin der Mücke *Aedes albopictus*. Nach dem Saugakt wurde im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine um 35,1 % erhöhte *D. gallinae*-Mortalität ($p = 0,009$) festgestellt. In einem parallel durchgeführten Vakzineversuch, bei dem Geflügel mit rekombinant hergestellten Bm86 der Zecke *Rhipicephalus microplus* (ehemals *Boophilus microplus*) geimpft wurde, registrierten HERRINGTON et al. (2009b) eine um 23 % erhöhte *D. gallinae*-Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche sich jedoch nicht als signifikant erwies. Aus diesen Ergebnissen folgerten HERRINGTON et al. (2009b), dass Subolesin eine protektive Immunantwort gegen die Rote Vogelmilbe induziert. Im gleichen Jahr erstellten BARTLEY et al. (2009) ein rekombinantes *D. gallinae*-Protein bestehend aus 174 Aminosäuren, was sie mittels Sequenzvergleich mit anderen Organismen als *histamine release factor* (HRF) identifizierten. Durch immunohistochemische Färbung detektierten sie HRF als ubiquitäres Protein, was vor allem aber im Gewebe des Synganglions, Reproduktions- und Verdauungstrakts von *D. gallinae* vorkommt. Durch die Lokalisation von HRF stellten BARTLEY et al. (2009) die Hypothese auf, dass der Wirt während des Saugaktes nicht mit diesem Antigen in Kontakt kommt und es sich folglich um ein potentiell *concealed* Antigen handeln könnte. Sie mutmaßten, dass IgY-Antikörper von zuvor immunisierten Hühnern während des Saugaktes von der Milbe aufgenommen werden, in deren Darm mit HRF interagieren und so die Milbe schädigen. Um die protektive Wirkung von HRF zu testen, wurde heparinisiertes Hühnerblut mit IgY-Antikörpern versetzt, die aus Eiern von zuvor HRF-vakzinierten Hühnern gewonnen wurden. In einem in vitro-Fütterungsversuch wurde eine signifikante Zunahme der *D. gallinae*-Mortalität ($p = 0,004$) festgestellt, worauf hin die Autoren rekombinantes HRF-1 als Vakzinekandidat vorschlugen. In einem ähnlichen Versuch, bei dem BARTLEY et al. (2012) rekombinantes Cathepsin D und L als Vakzinekandidaten erachteten, erhielten Rote Vogelmilben in einem in vitro-Fütterungsversuch Hühnerblut, das mit anti-Dg-CatD-1 bzw.

Einleitung

mit anti-Dg-CatL-1 IgY-Antikörpern versetzt wurde. Milben, die mit anti-Dg-CatD-1 gefüttert wurden, zeigten eine 4,42-fach und anti-Dg-CatL-1 IgY gefütterte Milben eine 2,13-fach höhere Mortalität im Vergleich mit der Kontrolle.

Aufgrund dessen schlugen die Autoren eine Kombination aus beiden Cathepsinen als Multikomponenten-Vakzine vor. Auch wenn schon seit einigen Jahren an möglichen Vakzinekandidaten geforscht wird, ist bis heute noch kein Impfstoff gegen die Rote Vogelmilbe verfügbar.

Zu Beginn des PhD-Projekts (Oktober 2010) waren auf genetischer bzw. Transkriptebene nur sehr wenige Informationen über *D. gallinae* verfügbar. Insgesamt waren 649 partielle Nukleotidsequenzen von nur neun verschiedenen Genen in der GenBank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verfügbar. Deshalb war das Ziel des PhD-Projektes, eine de novo-Transkriptomanalyse durchzuführen, um mehr Sequenzdaten von der Roten Vogelmilbe als Forschungsgrundlage zu generieren. Dabei lag der Fokus auf der Determination von proteinkodierenden Sequenzen, die vielversprechende Angriffspunkte zur effektiven Bekämpfung darstellen könnten, wie z.B. Enzyme der Hämoglobinverdauung.

Um das gesamte Transkriptom des Parasiten zu erfassen, sollten alle Entwicklungsstadien sowie Geschlechter von hungrigen und frisch gesogenen Milben in die Analyse einbezogen werden. Die daraus resultierenden Transkriptsequenzen sollten *in silico* identifiziert und funktionell annotiert werden. Mit Hilfe von ESTScan, einem bioinformatischen Programm, das kodierende Sequenzen erkennt und die Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen translatiert, sollte ein Datensatz putativer *D. gallinae*-Proteine erstellt werden.

Da exkretorisch/sekretorische (ES) Proteine eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Parasiten mit dem Wirt spielen können und somit eine favorisierte Gruppe von Antigenen zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze darstellen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, putative ES (pES) Proteine sowie putative Transmembranproteine (pTM Proteine) der Roten Vogelmilbe *in silico* zu identifizieren. Eine anschließende funktionelle Charakterisierung dieser pES und pTM Proteine sollte mögliche Zielmoleküle für Akarizide (*drug targets*) oder Vakzinekandidaten identifizieren, um so die Grundlage für weitere Projekte bezüglich der Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien gegen die Rote Vogelmilbe zu bilden.

Publikationen

1) Gesamttranskriptomanalyse

Schicht, S., Qi, W., Poveda, L., Strube, C. (2013): Whole transcriptome analysis of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Parasitology*, *im Druck*, doi: 10.1017/S0031182013001467

Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen:

Konzept, Versuchsplanung: Christina Strube

Experimentelle Durchführung: Sabine Schicht, Lucy Poveda, Weihong Qi

Diskussion, Beratung: Sabine Schicht, Lucy Poveda, Weihong Qi, Christina Strube

Manuskript, Korrespondenz: Sabine Schicht, Lucy Poveda, Weihong Qi, Christina Strube

2) Sekretom- und Transmembranomanalyse

Schicht, S., Qi, W., Poveda, L., Strube, C. (2013): The predicted secretome and transmembranome of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Parasites & Vectors*, 6:259, doi:10.1186/1756-3305-6-259

Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen:

Konzept, Versuchsplanung: Christina Strube

Experimentelle Durchführung: Sabine Schicht, Weihong Qi

Diskussion, Beratung: Sabine Schicht, Lucy Poveda, Weihong Qi, Christina Strube

Manuskript, Korrespondenz: Sabine Schicht, Christina Strube

Übergreifende Diskussion

Transkriptomanalyse der Roten Vogelmilbe

Auch wenn *D. gallinae* einer der wichtigsten Parasiten in der modernen Geflügelhaltung darstellt und neue Interventionsmethoden zur Bekämpfung dieses hematophagen Ektoparasiten nötig sind, war bislang nur wenig auf genetischer bzw. Transkriptebene über die Rote Vogelmilbe bekannt. Um eine Forschungsgrundlage bezüglich der Identifikation von Zielmolekülen z.B. für neue Akarizide oder Vakzinekandidaten zu schaffen, wurde zunächst das Transkriptom der Roten Vogelmilbe de novo sequenziert und charakterisiert.

Erstellung und Untersuchung von D. gallinae-Gesamt-RNA

Um einen Datensatz an Gentranskripten zu erhalten, welcher das gesamte Transkriptom der Roten Vogelmilbe umfasst, wurde eine Probe gepoolter Gesamt-RNA verwendet, die alle Entwicklungsstadien sowie Geschlechter von hungernden und frisch gesogenen Milben beinhaltet. Die Analyse der RNA-Integrität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers ergab erstaunlicherweise, dass nur ein distinkter Peak bzw. Bande der 18S rRNA nachgewiesen werden konnte. Die 28S rRNA konnte nicht visualisiert werden. Dieses Phänomen war ebenso bei zwei weiteren arachniden Spezies, der Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus* sowie der Großen Zitterspinne *Pholcus phalangioides*, zu verzeichnen. Ein ähnliches Ergebnis erzielte KUHN (2005) beim Nachweis von Gesamt-RNA der Räudemilbe *Sarcoptes scabiei* auf einem Formaldehyd-Agarosegel. Einerseits könnte die Beobachtung darauf hinweisen, dass bei Milben und auch anderen Arachniden die 28S rRNA verglichen mit 18S rRNA nur in geringer Menge transkribiert wird und deshalb nicht visualisiert werden konnte. Andererseits ist von Insekten bekannt, dass die 28S rRNA aus zwei Fragmenten besteht, die über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Diese Wasserstoffbrückenbindungen können durch Hitze denaturiert werden, so dass die zwei Fragmente der 28S rRNA zusammen mit der 18S rRNA auf dem RNA-Chip des Agilent Bioanalyzers migrieren, wodurch sie als nur ein Peak bzw. eine Bande detektiert werden können (WINNEBECK et al. 2010). Im Falle der Insekten konnte dieses Phänomen nur nachgewiesen werden, wenn die Gesamt-RNA vor dem Beladen des RNA-Chips durch Hitze denaturiert wurde, so wie es das Protokoll des Agilent Bioanalyzers vorsieht. Eine Untersuchung der Insekten-Gesamt-RNA ohne vorheriges Denaturieren ergab zwei distinkte Banden bzw. Peaks entsprechend der Größe der 28S bzw. 18S rRNA. Verglichen mit der Roten Vogelmilbe ergab sich in jedem Fall, also unabhängig von einer vorherigen Hitzedenaturierung, nur eine Bande

bzw. ein Peak auf Höhe der 18S rRNA. Dies weist darauf hin, dass eine Denaturierung der 28S rRNA schon vorher stattgefunden haben könnte, z.B. während der Homogenisierung der Milben.

De novo-Sequenzierung des Transkriptoms

Nach der Assemblierung der Rohdaten umfasste das Gesamttranskriptom der Roten Vogelmilbe 232.097 Singletons und 42.130 Contigs, welche in 24.140 Isogruppen, bestehend aus 35.788 Isotigs, geclustert wurden. Mit den 42.130 resultierenden Contigs (Durchschnittslänge 621 bp) ist die Zahl der Transkriptsequenzen für *D. gallinae* im Vergleich mit Studien an anderen Milbenarten hoch. Für die Raubmilben *Phytoseiulus persimilis* und *Metaseiulus occidentalis* sind Transkriptome bestehend aus 12.556 Contigs [Durchschnittslänge 935 bp (CABRERA et al. 2010)] bzw. 30.691 Contigs [Durchschnittslänge 681 bp (HOY et al. 2013)] beschrieben wurden. Eine Erklärung für die unterschiedliche Anzahl an Contigs könnte daraus resultieren, dass CABRERA et al. (2010) ausschließlich mobile Entwicklungsstadien von *P. persimilis* untersuchten, weswegen sich eine geringe Anzahl an Contigs ergab. Für das Transkriptom von *M. occidentalis* und *D. gallinae* hingegen wurden alle Entwicklungsstadien vom Ei bis zum Adulten in die Studie inkludiert. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Milbenarten in unterschiedliche Familien [Dermanyssidae (*D. gallinae*) bzw. Phytoseiidae (*P. persimilis* und *M. occidentalis*)] klassifiziert sind, woraus die Unterschiede in den Transkriptomgrößen resultieren könnten.

Nach dem Abzug möglicher kontaminierender Sequenzen durch den Wirt „Huhn“ oder Endosymbionten der Milbe verblieben 267.464 *D. gallinae*-Sequenzen (231.657 Singletons, 56 Contigs und 35.751 Isotigs) für weitere Analysen.

Identifizierung von Sequenzhomologen und funktionelle Annotierung

Insgesamt wiesen 10,3 % (27.529 von 267.464 Sequenzen) *D. gallinae*-Sequenzen BLASTx-Hits (E-value: 1.0E-06) für Proteinsequenzen auf, die in der *non-redundant* (nr) *GenBank* verfügbar waren. Im Gegensatz zu diesem sehr geringen Anteil an *D. gallinae*-Sequenzen mit Übereinstimmungen in der *Genbank* konnten in Transkriptomstudien zu *P. persimilis* Milben für 38,7 % der Sequenzen (4.862 von 12.556 Sequenzen, CABRERA et al. 2010) BLASTx-Hits nachgewiesen werden. Für *M. occidentalis* konnten bei 34,9 % der Sequenzen (25.888 von 74.172 Sequenzen, HOY et al. 2013) BLASTx-Hits verzeichnet werden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass für genannte Raubmilben eine niedrigere Contiganzahl nach der Assemblierung vorlag. Bei den 89,7 % *D.gallinae*-Sequenzen, die keinen Hit aufwiesen, und

Übergreifende Diskussion

deshalb als „neu“ eingestuft wurden, könnte es sich großteils um Parasiten-spezifische und/oder Spezies-spezifische Sequenzen handeln. Dieser hohe Prozentsatz verdeutlicht, wie wichtig eine weitreichende Charakterisierung und funktionelle Determination von proteinkodierenden Genen im akariden Genus ist.

Bei der Spezieszuordnung der BLAST-Ergebnisse resultierte die Milbe *M. occidentalis* als Top-Hit (21.914 Hits), gefolgt von der Zecke *I. scapularis* (721 Hits). Da die genannte Milbenart sowie die Zecke nahe Verwandte von *D. gallinae* sind, war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Zudem sind das Genom sowie das Transkriptom beider Spezies sequenziert und über Datenbanken verfügbar. Insgesamt konnten 83,4 % der *D. gallinae*-Sequenzen, die über Homologe verfügten (22.960 Hits), Arten zugeordnet werden, die der Unterordnung Acari zugehörig sind. Es ergaben sich jedoch auch Sequenzhomologe, die nicht den Arthropoden zugeordnet werden konnten sondern beispielsweise wichtige prokaryotische und eukaryotische Schlüsselproteine von Zellfunktionen, wie z.B. der Transkription und Translation darstellten.

Mit Hilfe von verschiedenen bioinformatischen Servern konnten einem Teil der *D. gallinae*-Transkriptsequenzen funktionelle Eigenschaften *in silico* zugeordnet werden. Insgesamt wurden 15.482 Sequenzen (5,8 %) Genontologien (GO) zugeordnet. Diese Sequenzen unterteilten sich in 8.034 Singletons (von 231.657; 3,5 %), 18 Contigs (von 56; 32,1 %) und 7.430 Isotigs (von 35.751; 20,8 %), die einer Vielzahl unterschiedlicher GOs aus den Domänen „Zellulärer Bestandteil“, „Molekulare Funktion“ und „Biologischer Prozess“ zugeordnet wurden.

D. gallinae ist ein transienter Ektoparasit, der bevorzugt nachts nach einem Wirt sucht, während er tagsüber in seinem Versteck verweilt (WOOD 1917). Dabei sind Temperatur sowie Lichtsignale wichtige Faktoren, die die Aktivität der Milbe stark beeinflussen können (HARRISON 1963; KIRKWOOD 1968). Lichtsignale stellen eine Schlüsselrolle bei der circadianen Rhythmik dar, welche ein Teil der „Rhythmischen Prozesse“ ist, denen 0,2 % der *D. gallinae*-Sequenzen (94 Hits) innerhalb der Domäne „Biologischer Prozess“ zugeordnet wurden. Der GO-Kategorie „Lokomotion“ wurden 1,4 % der Sequenzen (571 Hits) zugeordnet und beinhaltet neben dem Bewegungsverhalten auch die Taxis z.B. die Thermotaxis. Unter optimalen Bedingungen entwickelt sich die Rote Vogelmilbe innerhalb einer Woche vom Ei zum adulten Stadium (WOOD 1917; MAURER u. BAUMGARTNER 1992). Eine derart schnelle Entwicklung wird auf genetischer Ebene möglicherweise durch die 6,3 % der Sequenzen (2.623 Hits), die „Entwicklungsprozessen“ und 1,2 % der Sequenzen (505 Hits), die dem „Wachstum“ innerhalb der Domäne „Biologischer Prozess“ zugeordnet sind,

Übergreifende Diskussion

erklärt. Denkt man an die Anzahl verschiedener Stadien, die in die Transkriptomanalyse einbezogen wurden und die daraus resultierende Menge unterschiedlicher Gentranskripte, ist es beachtlich, dass 1,9 % der Hits (801 Hits) der Kategorie „Reproduktion“ zugeordnet wurden, was die schnelle Reproduktionsrate der Milbe auf genetischem Level unterstreicht.

Die GO-Annotierung ergab jedoch nicht nur putative Genfunktionen, sondern unterstreicht auch die mögliche Vektorfunktion von *D. gallinae*, da interessanterweise 0,4 % der Sequenzen (171 Hits) innerhalb der Domäne „Biologischer Prozess“ der „Viralen Reproduktion“ zugeordnet wurden. Die „Virale Reproduktion“ beinhaltet die Infektion der Wirtszelle, Replikation des viralen Genoms sowie das Verpacken der neu synthetisierten Nukleinsäure in Viruspartikel. Von den 62 *D. gallinae*-Sequenzen, die letztlich der „Viralen Reproduktion“ zugeordnet wurden, wiesen jedoch 60 Sequenzen BLASTx-Hits eukaryotische Proteine auf. Ungefähr die Hälfte dieser Sequenzen war homolog mit Zeckenproteinen. Nur zwei der 62 Sequenzen waren möglicherweise viralen Ursprungs: ein Singleton (Sequenznummer: G9NSEKQ02I58T4) wies eine 77 %-ige Ähnlichkeit zum Gag-Env-Fusionsprotein, das aus *Gallus gallus* isoliert wurde auf (E-value: 1.22E-27). Ein zweites Singleton (Sequenznummer: G9NSEKQ02H1E7V) resultierte in einer 92 %-igen Ähnlichkeit zum Envelope-Protein des Aviären Leukosevirus (ALV) (E-value: 1.57E-23). Einerseits könnten diese Sequenzen von Virusmaterial stammen, was möglicherweise während der Blutmahlzeit aufgenommen und anschließend in die Transkriptomsequenzierung inkludiert wurde, andererseits könnte sich jedoch auch virales genetisches Material in das Milbengenom integriert haben, da *D. gallinae* bereits als Vektor für ALV beschrieben wurde (HILBRICH 1978; HOFFMANN 1987).

Für die biologische Interpretation möglicher Genfunktionen wurde das *D. gallinae*-Transkriptom KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)-Stoffwechselwegen zugeordnet, da diese einer Sequenz nicht nur eine mögliche Funktion, sondern auch einen biologischen Zusammenhang in Stoffwechselkreisläufen bietet. Insgesamt konnten 4.580 *D. gallinae*-Sequenzen 919 Enzymen zugeordnet werden, die in 127 KEGG-Stoffwechselwegen interagieren. Erstaunlicherweise waren der dritthäufigste (Stickstoffmetabolismus), der vierthäufigste (Methanmetabolismus), der neunthäufigste (Propionatmetabolismus) und der zehnthäufigste (Kohlenstofffixierung in Prokaryoten) Stoffwechselweg solche, die den Prokaryoten zugehörig sind. Auch BURGESS et al. (2011) fanden als fünfhäufigsten Stoffwechselweg den prokaryotischen Methanmetabolismus bei der Annotierung von *expressed sequence tags* (ESTs) von *Psoroptes ovis*-Milben. Enzyme von Milben, die generell in verschiedenen Stoffwechselwegen von Pro- und Eukaryoten

vorkommen, können nach einer Zuordnung fälschlicher Weise in prokaryotische Stoffwechselwege eingruppiert werden. So wurde zum Beispiel eine Peroxidase (ec:1.11.1.7), die von 66 *D. gallinae*-Sequenzen repräsentiert wurde, vom KEGG-Server überwiegend dem prokaryotischen Methanmetabolismus zugeschrieben.

Um kodierende Regionen der 267.464 *D. gallinae*-Sequenzen zu identifizieren, wurde eine Translation mittels ESTScan durchgeführt, welche in 55.129 (20,6 %) putative Proteinsequenzen resultierte. Diese wurden von 17.860 Isotigs, 24 Contigs und 37.245 Singletons repräsentiert. Warum insgesamt nur ein Fünftel (20,6 %) der *D. gallinae*-Sequenzen in Aminosäuresequenzen translatiert wurde, ist durch die beschränkte Anzahl an Sequenzen begründet, mit denen ESTScan kalibriert wurde – hierbei handelte es sich nämlich ausschließlich um die in den Datenbanken verfügbaren Sequenzen der Überordnung Parasitiformes.

Die putativen Proteinsequenzen von *D. gallinae* wurden anschließend mittels InterPro in Proteinfamilien und funktionelle Domänen klassifiziert. Insgesamt wurden 3.723 verschiedene funktionelle Domänen innerhalb der 55.129 putativen *D. gallinae*-Proteine identifiziert. Jeder funktionellen Domäne wurden ein bis 565 verschiedene Proteinsequenzen zugeordnet. Die am häufigsten vorkommenden Domänen waren Zinkfinger (LIM- und zf-C2H2-Domänen), die als kleine Proteinmotive mit fingerähnlicher Gestalt an DNA, RNA, Proteine und Lipidsubstrate binden und z.B. in Transkription, Proteinfaltung und Bildung des Zytoskeletts involviert sind. Eine weitere sehr häufige Domäne bestand aus RNA-Erkennungsmotiven (RRM) sowie Immunoglobulin-ähnlich gefalteten Motiven. Weitere Proteindomänen, die für *D. gallinae*-Proteinsequenzen häufig vorhergesagt wurden, waren in Zellorganisationsfunktionen wie Proteinexpression, Metabolismus und Entwicklung involviert. Diese sehr generellen Proteinfunktionen waren nicht unerwartet, da das Ziel der vorliegenden Arbeit darin lag, das Gesamttranskriptom der Roten Vogelmilbe zu erfassen.

In silico-Analyse von putativen exkretorisch/sekretorischen (pES) und Transmembranproteinen (pTM Proteine)

Da exkretorisch/sekretorische (ES) Proteine eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Parasiten mit dem Wirt einnehmen können und somit eine favorisierte Gruppe von Antigenen zur Entwicklung neuer Interventionsstrategien darstellen, war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, putative ES (pES) Proteine sowie putative Transmembranproteine (pTM Proteine) der Roten Vogelmilbe *in silico* zu identifizieren.

Das Sekretom eines Organismus ist ein Teil des Proteoms, welches sämtliche Proteine des Organismus umfasst. Es enthält somit beispielsweise Proteine, die von einer Zelle sezerniert werden wie auch Proteine der extrazellulären Matrix oder auch Vesikelproteine (ANTELMANN et al. 2001; CACCIA et al. 2013; Garg u. RANGANATHAN 2011; TJALSMA et al. 2000). Transmembranproteine sind eine Gruppe von Membranproteinen, die Untereinheiten besitzen, die auf beiden Seiten der Membran exponiert sind. Sie umfassen ca. 30 % eines typischen Genoms und sind in vielen wichtigen biologischen Prozessen wie die Zellsignaltransduktion, Zellerkennung und den Transport von membranimpermeablen Molekülen involviert (NUGENT u. JONES 2009). Da die Vorhersage des Sekretoms und Transmembranoms auf der Analyse des Gesamttranskriptoms von *D. gallinae* beruhte, also alle Stadien und Geschlechter von ungesogenen und gesogenen Milben enthielt, wurde ein breites Spektrum von pES und pTM Proteinen aus verschiedenen Stoffwechselwegen erwartet.

Ungefähr ein Fünftel (19 %) der putativen *D. gallinae*-Proteine wurden dem Sekretom bzw. dem Transmembranom zugeordnet. Davon waren 5,6 % (3.091 von 55.129 Proteinsequenzen) sezernierte Proteine und 13,4 % (7.361 von 55.129 Proteinsequenzen) Transmembranproteine.

Identifizierung von Sequenzhomologen und funktionelle Annotierung von pES und pTM Proteine

Ungefähr 35 % der putativen pES sowie pTM Proteine ergaben signifikante BLASTp-Matches mit bekannten Proteinsequenzen, wobei die Raubmilbe *M. occidentalis* auch hier wieder die am häufigste zugeordnete Spezies war: So ergaben sich für 89 % aller pES und 87 % aller pTM Proteine mit signifikanten BLASTp-Matches Homologe mit der genannten Raubmilbe. Die verbleibenden 65 % *D. gallinae* pES und pTM Proteine, die mittels BLAST unidentifiziert blieben, könnten wiederum Parasiten- und/oder Spezies-spezifische Proteine der Roten Vogelmilbe darstellen und unterstreichen somit erneut die Notwendigkeit weiterer Studien bezüglich der Proteincharakterisierung der Acari. Der größte Teil der pES Proteine wurde als Hydrolasen identifiziert, von denen wiederum der größere Teil Cysteinproteasen darstellte. Cysteinproteasen spielen bei verschiedenen biochemischen und physiologischen Prozessen in Arthropoden wie z.B. der Embryogenese eine wichtige Rolle (CHO et al. 1999; ESTRELA et al. 2007; FAGOTTO 1990a; FAGOTTO 1990b; SEIXAS et al. 2003; SOJKA et al. 2011; UCHIDA et al. 2001). Der Arthropodenembryo benötigt während seiner Entwicklung viele Nährstoffe (Aminosäuren, Kohlehydrate und Lipide), die in den Dottergranula gespeichert sind. Um diese Nährstoffe verfügbar zu machen, benötigt er eine Maschinerie verschiedener Enzyme (SEIXAS et al. 2003). Die Degradation des Dotterproteins Vitellin wird

durch eine Azidifikation der Dottergranula getriggert, was die Cysteinproteinasen Cathepsin L und B (FAGOTTO 1990a; FAGOTTO 1990b; MEDINA et al. 1988; SEIXAS et al. 2003) sowie die Aspartatprotease Cathepsin D (LOGULLO et al. 1998) aktiviert. Extrapoliert man von der sehr gut untersuchten Blutverdauung der nahe verwandten Zecken (ALIM et al. 2009; ANDERSON et al. 2008; FRANTA et al. 2010; HORN et al. 2009; RIBEIRO et al. 2012) und den anatomischen Ähnlichkeiten des intestinalen Traktes bei den Parasitiformes (HARRISON u. FOELIX 1999), könnten Cathepsin B, D und L neben der Embryogenese auch eine Schlüsselrolle in der proteolytischen Verdauung der Blutmahlzeit der Milbe spielen. Wie durch HORN et al. (2009) zusammengefasst, wird Hämoglobin beim Gemeinen Holzbock *I. ricinus* durch die katalytische Aktivität der Endopeptidasen Cathepsin D und L sowie Legumain gespalten. Dass diese Proteasen auch bei der Roten Vogelmilbe wichtige Funktionen inne zu haben scheinen, zeigt sich darin, dass diese drei Proteasen sechs der 30 BLASTp-Top-Hits des Milben-Sekretoms repräsentierten. Dies spiegelt sich auch in der InterPro-Analyse von Proteinfamilien und Domänen der *D. gallinae*-pES Proteine, bei der sich ebenfalls eine hohe Anzahl an Cysteinpeptidasen des C1A-Papain-Typs (IPR013128: 42 pES Sequenzen; IPR000668: 22 pES Sequenzen) bzw. C13-Legumain-Typs (IPR001096: 11 pES Sequenzen) ergab. SANTAMARIA et al. (2012) verglichen die Anzahl verschiedener Proteinfamilien der phytophagen Milbe *Tetranychus urticae* mit der weiterer unterschiedlicher Arthropodenspezies, wobei sie Genomdaten von zehn Insekten, einem Crustaceen und einer Zecke heran zogen. Die Autoren bemerkten, dass die C1A-Papain-ähnlichen Peptidasen sehr häufig in allen untersuchten Spezies vorkamen, wohingegen verglichen mit den anderen Spezies eine höhere Anzahl an C13-Legumain-ähnlichen Peptidasen bei *T. urticae* gefunden wurde (19 Gene *T. urticae* vs. null bis drei Gene bei den untersuchten Insekten und je ein Gen beim Crustaceen und der Zecke). Die 19 Gene, die bei *T. urticae*-Milben für C13-Legumain-ähnliche Peptidasen kodieren (SANTAMARIA et al. 2012) und die elf putativen C13-Legumain-ähnlichen Peptidasen von *D. gallinae* suggerieren, dass innerhalb der Milben eine doch recht hohe Anzahl von Legumain-codierenden Genen scheinbar nicht ungewöhnlich ist. Das KEGG-Mapping ordnete den größten Anteil pES Proteine dem Lysosom zu. Dies könnte aus der großen Anzahl an pES Proteinen resultieren, die als Proteasen z.B. verschiedene Cathepsine und Legumain identifiziert wurden und die als Endopeptidasen in Lysosomen lokalisiert sind (BOHLEY u. SEGLEN 1992; SANTAMARIA et al. 2012). So finden bei Milben als auch Zecken die digestiven Prozesse intrazellulär in den sauren endosomal/lysosomalen Vesikeln der Darmepithelzellen statt (NISBET u. BILLINGSLEY 2000; SONENSHINE 1991) während bei anderen blutsaugenden Arthropoden wie Insekten die

digestiven Prozesse extrazellulär im Lumen des Darmepithels ablaufen (SONENSHINE 1991). Infolge der Analyse verschiedener durch den Saugakt induzierter Moleküle konnte bei der Rinderzecke *Rhipicephalus microplus* (ehemals *Boophilus microplus*) ein Antigen identifiziert werden (WILLADSEN et al. 1989), das zur Entwicklung einer kommerziellen Vakzine (TickGARD plusTM/GavacTM) gegen diesen blutsaugenden Parasiten genutzt wurde. Dieses sogenannte Bm86-Antigen ist ein membran-assoziiertes Glykoprotein des intestinalen Traktes der Zecke (GOUGH u. KEMP 1993; WILLADSEN et al. 1989). Als darmständiges Protein ist Bm86 unter natürlichen Voraussetzungen nicht in die Interaktion zwischen dem Wirt und der Zecke eingebunden und stimuliert daher auch nicht das Immunsystems des Wirtes, da es diesem nicht exponiert ist. Jedoch führt eine Vakzinierung mit diesem sogenannten *concealed* oder *hidden* Antigen zu einer immunologischen Antwort des Rindes, die sich dann gegen das darmständige Bm86 der blutsaugende Zecke richten kann (WILLADSEN 2004; NUTTALL et al. 2006). Erachtet man die potentiell in die Blutverdauung involvierte pTM and pES Proteine von *D. gallinae* als *concealed antigens*, ergibt sich eine Vielzahl möglicher Vakzinekandidaten gegen die Rote Vogelmilbe, wie z.B. Legumain, Chymotrypsin oder verschiedene Cathepsine. Cathepsin D und L wurden sogar bereits als sogenannte Multikomponenten-Vakzine vorgeschlagen (BARTLEY et al. 2012), da diese in alleiniger Verwendung gute Ergebnisse bezüglich der Milbenmortalität bei in vitro-Fütterungsversuchen ergaben. Interessanterweise konnte jedoch mittels BLASTp-Analyse kein *D. gallinae*-Bm86-Homolog innerhalb der pTM Proteine gefunden werden. Dies suggeriert, dass dieses bei der der Roten Vogelmilbe oder generell bei Milben nicht vorkommt oder aber dass die Proteinähnlichkeit zwischen beiden Spezies recht gering ist, so dass sich Bm86 nicht unter den jeweils Top-20 BLAST-Hits je Protein befand. Diese Hypothese könnte durch eine Analyse von Darmtranskripten der Roten Vogelmilbe verifiziert oder falsifiziert werden. Bedauerlicherweise ist der Milbendarm im Vergleich zu den Zecken so klein und fragil, dass eine Dissektion unmöglich ist (NISBET u. BILLINGSLEY 2000), was auch durch eigene Versuche bestätigt wurde. Daher gestaltet sich die Identifizierung von Darm-assoziierten pTM Proteinen in *D. gallinae* als schwierig, da Proteine, die der Blutverdauung zugeschrieben werden, auch in anderen Stoffwechselfvorgängen eine Rolle spielen könnten. Neben den *concealed antigens* werden bei Zecken auch solche Antigene als Vakzinekandidaten diskutiert, die im direkten Kontakt mit dem Wirtsimmunsystem stehen und eine immunmodulierende Funktion haben, wie z.B. Speichelproteine (VALENZUELA 2002; NUTTALL et al. 2006; ALARCON-CHAIDEZ et al. 2007; SHAHEIN et al. 2013;). In Anbetracht dessen könnten Folgestudien an den 24 im Rahmen dieser Arbeit identifizierten

Übergreifende Diskussion

Speichelproteinen von *D. gallinae* die Entwicklung einer Vakzine gegen diesen hämatophagen Parasiten unterstützen.

Für die pTM Proteine ergaben die BLASTp-Analyse sowie der InterProScan Ninjurin als häufigsten Hit. Bei Säugetieren fungiert dieses Protein als Adhäsionsmolekül, das vermehrt bei einer Verletzung von Nervenzellen induziert wird und dabei das Axonwachstum stimuliert (ARAKI u. MILBRANDT 1996). Es wird jedoch auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert, vor allem jedoch in Epithelzellen. Eine Korrelation zwischen Verwundungsereignissen und einer Hochregulierung der Ninjurinexpression wurde auch bei adulten Fruchtfliegen der Spezies *Drosophila melanogaster* gezeigt (DE GREGORIO et al. 2001). Bei der Mücke *Anopheles gambiae* wird Ninjurin eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem und bei der Signal- und Zellkommunikation zugeschrieben (LOMBARDO et al. 2013). Ob die große Anzahl Ninjurin-ähnlicher pTM Proteine durch Präparationsschritte hervorgerufen wurde (immobilisierte Milben wurden mit einer Pinzette gesammelt, was möglicherweise eine Verletzung der Milben zur Folge hatte), dem Immunsystem zuzuschreiben wäre, aus bisher unbeschriebenen Funktionen oder auch einer Kombination sämtlicher genannter Faktoren resultiert, kann derzeit nicht gesagt werden.

Ein anderes unerwartetes Ergebnis war, dass das dritthäufigste pTM Protein als *nose resistant to fluoxetine protein 6- (nrf-6)* ähnlich bestimmt wurde. Dieses Membranprotein, das zuerst als Darmprotein von *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurde und dem ein Zusammenhang mit einer Resistenz gegen das Antidepressivum Fluoxetin (Prozac[®]) zugeschrieben wurde, wird ebenfalls als Transporter von Wirkstoffen oder auch Dotterproteinen durch Zellmembranen diskutiert (CHOY u. THOMAS 1999; CHOY et al. 2006). Das *D. melanogaster beltless* Gen ist dem *C. elegans nrf-6* Gen sehr ähnlich und ist während der Oogenese sowie der Embryogenese von Notwendigkeit. Es wird ebenfalls bei adulten *D. melanogaster* im Nervensystem exprimiert und man nimmt an, dass es dort wichtige neuronale Funktionen erfüllt (DZITOYEVA et al. 2003). Die Funktion und Lokalisation von Genen, die in neuronale Prozesse bei Milben involviert sind, ist größtenteils unbekannt. Dies erfordert weitere Arbeiten mit dem Ziel der Charakterisierung von *D. gallinae*-pTM Proteinen, da diese vielversprechende Angriffspunkte neuer Arzneistoffe darstellen könnten.

Übergreifende Diskussion

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit der Transkriptomanalyse von *D. gallinae* und den weiterführenden in silico-Analysen ein großer Datensatz von Transkript- und Proteinsequenzen verfügbar gemacht wurde. Dieser hilft dabei, die Biologie der Roten Vogelmilbe auf molekularer Ebene besser zu verstehen und bildet gleichzeitig ein Fundament für weitere Forschungsarbeiten an diesem Geflügelparasiten. Ferner wurde ein Repertoire an potentiellen Zielmolekülen für neue akarizide Substanzen bzw. die Vakzineentwicklung bereitgestellt. Insbesondere die identifizierten pES und pTM Proteine, die voraussichtlich in Stoffwechselfvorgänge wie die Hämoglobinverdauung oder in neuronale Funktionen involviert sind, stellen eine vielversprechende Grundlage für neue Interventionsstrategien dar.

Zusammenfassung

Sabine Schicht (2013)

„Analyse des Gesamttranskriptoms, Sekretoms und Transmembranoms der Roten Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae*“

Die Rote Vogelmilbe *Dermanyssus gallinae* stellt ein schwerwiegendes Problem in der modernen Geflügelhaltung dar, da ein Befall mit diesem Ektoparasiten gravierende Leistungsminderungen oder sogar den Tod durch Anämie für das befallene Wirtschaftsgeflügel zur Folge hat. Dennoch ist auf genetischer bzw. Transkriptebene bislang nur wenig bekannt. Um das Transkriptom von *D. gallinae* zu erhalten, wurde eine de novo-Sequenzierung mit Gesamt-RNA aller Stadien und beider Geschlechter von hungrigen sowie frisch gesogenen Milben durchgeführt. Die 454-Pyrosequenzierung ergab ca. 1,5 Millionen Sequenzen. Diese wurden geclustert und assembliert, anschließend geBLASTed und auf Sequenzhomologien mit dem Wirt „Haushuhn“ bzw. bakterielle Kontaminanten geprüft. Den letztlich resultierenden 267.464 Sequenzen (231.657 Singletons, 56 Contigs und 35.751 Isotigs) wurden Genontologien zugeordnet. Des Weiteren wurden die Milbensequenzen auf funktionelle Domänen untersucht, funktionell Stoffwechselwegen zugeordnet und in 55.129 putative Proteinsequenzen translatiert. Diese wurden in silico hinsichtlich putativer Transmembranproteine (pTM Proteine) sowie exkretorisch/sekretorischer (pES) Proteine analysiert, da diese eine favorisierte Gruppe von Antigenen zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze darstellen. Die 7.363 pTM und 3.091 pES Proteine wurden mit Hilfe eines BLASTp-Sequenzvergleichs sowie verschiedener bioinformatischer Analysen hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert. Die Analysen ergaben eine Vielfalt von Proteinen, die unter anderem voraussichtlich in wichtige Entwicklungsprozesse, das neuronalen Netzwerk und die Hämoglobinverdauung involviert sind und somit ein mögliches Repertoire von Zielmolekülen für künftige Bekämpfungsansätze darstellen. Insgesamt stellt die vorliegende Arbeit einen großen Datensatz an *D. gallinae*-Transkripten zur Verfügung, der dazu beiträgt, die Biologie der Roten Vogelmilbe auf genetischer Ebene besser zu verstehen. Ferner bildet sie ein Fundament für weitere Forschungsarbeiten und neue, an Zielproteinen ausgerichtete Interventionsstrategien, wie beispielsweise die Entwicklung einer rekombinanten Vakzine gegen diesen Geflügelparasiten.

Summary

Sabine Schicht (2013)

“Whole transcriptome, secretome and transmembranome analysis of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*”

Infestation with the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, may result in economic losses or even in death of the poultry due to anemia. Even though the poultry red mite is the most important ectoparasite in poultry farming, only little is known about the parasite on the genetic and transcriptional level. To obtain the mite's transcriptome, de novo 454-pyrosequencing including all developmental stages and sexes of starved as well as freshly blood fed mites was carried out, resulting in about 1.5 million reads. These reads were clustered and assembled and subsequently BLASTed to identify contaminating sequences of the chicken host *Gallus gallus* or bacterial endosymbionts. Finally, 267,464 sequences (231,657 singletons, 56 contigs and 35,751 isotigs) were obtained and annotated to Gene Ontology terms. Additionally, *D. gallinae* sequences were analyzed for functional domains and protein families, mapped to KEGG pathways and translated into 55,129 putative protein sequences. These protein sequences were used to identify putative transmembrane (pTM) and excretory/secretory (pES) proteins in silico, as these pTM and pES proteins represent a favored group of antigens for the development of new therapeutic solutions against parasites. The resulting 7,363 pTM and 3,091 pES proteins were BLASTed and functionally annotated using different bioinformatical tools. Analyses resulted in a pool of diverse proteins, which are suggested to be involved in different developmental processes, the neuronal network or hemoglobin digestion. Thus, they represent a repertoire of potential target molecules for new intervention strategies. The present study has made a huge data set of *D. gallinae* transcript sequences available, which helps to understand the mite's biology on the genetic level. Furthermore, it provides a foundation for further research including the development of target protein-based new therapeutically solutions, for example the development of a recombinant vaccine against this poultry pest.

Literaturverzeichnis

ABRAHAMSSON, P., O. FOSSUM u. R. TAUSON (1998):

Health of laying hens in an aviary system over five batches of birds.

Acta Vet Scand 39, 367-379

ALARCON-CHAIDEZ, F. J., J. SUN u. S. K. WIKEL (2007):

Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae).

Insect Biochem Mol Biol 37, 48-71

ALIM, M. A., TSUJI, N., MIYOSHI, T., ISLAM, M. K., T. HATTA u. K. FUJISAKI (2009):

Legumains from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis.

Int J Parasitol 39, 97-107

ANDERSON, J. M., D. E. SONENSHINE u. J. G. VALENZUELA (2008):

Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae).

BMC Genomics 9, 552

ANTELMANN, H., TJALSMA, H., VOIGT, B., OHLMEIER, S., BRON, S., J. M. VAN DIJL u. M. HECKER (2001):

A proteomic view on genome-based signal peptide predictions.

Genome Res 11, 1484-1502

ARAKI, T. u. J. MILBRANDT (1996):

Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth.

Neuron 17, 353-361

AXTELL, R. C. u. J. J. ARENDS (1990):

Ecology and management of arthropod pests of poultry.

Annu Rev Entomol 35, 101-126

- BARTLEY, K., HUNTLEY, J. F., WRIGHT, H. W., M. NATH u. A. J. NISBET (2012):
Assessment of cathepsin D and L-like proteinases of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer), as potential vaccine antigens.
Parasitology 139, 755-765
- BARTLEY, K., NISBET, A. J., OFFER, J. E., SPARKS, N. H., H. W. WRIGHT u. J. F. HUNTLEY (2009):
Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae* (De Geer): characterization and in vitro assessment as a protective antigen.
Int J Parasitol 39, 447-456
- BECK, W. u. K. PFISTER (2006):
Humanpathogene Milben als Zoonoseerreger.
Wien Klin Wochenschr 118, 27-32
- BOHLEY, P. u. P. O. SEGLEN (1992):
Proteases and proteolysis in the lysosome.
Experientia 48, 151-157
- BROCKIS, D. C. (1980):
Mite infestations.
Vet Rec 107, 315-316
- BURGESS, S. T., NISBET, A. J., F. KENYON u. J. F. HUNTLEY (2011):
Generation, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the ectoparasitic mite *Psoroptes ovis*.
Parasit Vectors 4, 145
- CABRERA, A. R., DONOHUE, K. V., KHALIL, S. M., SCHOLL, E., OPPERMAN, C., D. E. SONENSHINE u. R. M. ROE (2010):
New approach for the study of mite reproduction: The first transcriptome analysis of a mite, *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae).
J Insect Physiol 57, 52-61

CACCIA, D., DUGO, M., M. CALLARI u. I. ONGARZONE (2013):

Bioinformatics tools for secretome analysis.

Biochim Biophys Acta, *im Druck* (doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.039)

CHAUVE, C. (1998):

The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control.

Vet Parasitol 79, 239-245

CHO, W. L., TSAO, S. M., HAYS, A. R., WALTER, R., CHEN, J. S., E. S. SNIGIREVSKAYA u. A. S. RAIKHEL (1999):

Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor.

J Biol Chem 274, 13311-13321

CHOY, R. K., J. M. KEMNER u. J. H. THOMAS (2006):

Fluoxetine-resistance genes in *Caenorhabditis elegans* function in the intestine and may act in drug transport.

Genetics 172, 885-892

Choy, R. K. u. J. H. Thomas (1999):

Fluoxetine-resistant mutants in *C. elegans* define a novel family of transmembrane proteins.

Mol Cell 4, 143-152

DE GREGORIO, E., SPELLMAN, P. T., G. M. RUBIN u. B. LEMAITRE (2001):

Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays.

Proc Natl Acad Sci USA 98, 12590-12595

DZITOYEVA, S., N. DIMITRIJEVIC u. H. MANEV (2003):

Identification of a novel *Drosophila* gene, beltless, using injectable embryonic and adult RNA interference (RNAi).

BMC Genomics 4, 33

ESTRELA, A., A. SEIXAS u. C. TERMIGNONI (2007):

A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity.

Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 148, 410-416

FAGOTTO, F. (1990a):

Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres.

Arch Insect Biochem Physiol 14, 217-235

FAGOTTO, F. (1990b):

Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme.

Arch Insect Biochem Physiol 14, 237-252

FRANTA, Z., FRANTOVA, H., KONVICKOVA, J., HORN, M., SOJKA, D., M. MARES u. P. KOPACEK (2010):

Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*.

Parasit Vectors 3, 119

GARG, G. u. S. RANGANATHAN (2011):

In silico secretome analysis approach for next generation sequencing transcriptomic data.

BMC Genomics 12, 14

GOUGH, J. M. u. D. H. KEMP (1993):

Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling.

J Parasitol 79, 900-907

HAMIDI, A., SHERIFI, K., MUJI, S., BEHLULI, B., LATIFI, F., ROBAJ, A., POSTOLI, R., HESS, C., M. HESS u. O. SPARAGANO (2011):

Dermanyssus gallinae in layer farms in Kosovo: a high risk for *Salmonella* prevalence.

Parasit Vectors 4, 136

- HARRINGTON, D., DIN, H. M., GUY, J., K. ROBINSON u. O. SPARAGANO (2009a):
Characterization of the immune response of domestic fowl following immunization with proteins extracted from *Dermanyssus gallinae*.
Vet Parasitol 160, 285-294
- HARRINGTON, D., CANALES, M., DE LA FUENTE, J., DE LUNA, C., ROBINSON, K., J. GUY u. O. SPARAGANO (2009b):
Immunisation with recombinant proteins subolesin and Bm86 for the control of *Dermanyssus gallinae* in poultry.
Vaccine 27, 4056-4063
- HARRISON, F. W. u. R. F. FOELIX (1999):
Microscopic Anatomy of Invertebrates, Chelicerate Arthropoda.
Wiley-Liss, New York
- HARRISON, I. R. (1963):
Population studies on the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*.
Bull ent Res 53, 657-664
- HILBRICH, P. (1978):
In: P HILBRICH (Hrsg.): Krankheiten des Geflügels unter besonderer Berücksichtigung der Haltung und Fütterung.
Hermann Kuhn GmbH & CO. KG, Villinge-Schwenningen
- HOFFMANN, G. (1987):
Vogelmilben als Lästlinge, Krankheitserzeuger und Vektoren bei Mensch und Nutztier.
Dtsch Tierarztl Wochenschr 95, 7-10
- HORN, M., NUSSBAUMEROVA, M., SANDA, M., KOVAROVA, Z., SRBA, J., FRANTA, Z., SOJKA, D., BOGYO, M., CAFFREY, C. R., P. KOPACEK u. M. MARES (2009):
Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics.
Chem Biol 16, 1053-1063

HOY, M. A., YU, F., MEYER, J. M., TARAZONA, O. A., A. JEYAPRAKASH u. K. WU (2013):
Transcriptome sequencing and annotation of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*
(Acari: Phytoseiidae): a cautionary tale about possible contamination by prey sequences.
Exp Appl Acarol 59, 283-296

KIRKWOOD, A. C. (1967):
Anaemia in poultry infested with the red mite *Dermanyssus gallinae*.
Vet Rec 80, 514-516

KIRKWOOD, A. C. (1968):
Some observations on the feeding habits of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* and
Liponyssus sylviarum.
Entomol Experiment Appl 11, 315-320

KOENRAADT, C. J. u. M. DICKE (2010):
The role of volatiles in aggregation and host-seeking of the haematophagous poultry red mite
Dermanyssus gallinae (Acari: Dermanyssidae).
Exp Appl Acarol 50, 191-199

KUHN, C. (2005):
Charakterisierung rekombinanter immunreaktiver Antigene der Krätzmilbe *Sarcoptes scabiei*.
Berlin, Humboldt-Univ., Diss.

LOGULLO, C., VAZ IDA, S., SORGINE, M. H., PAIVA-SILVA, G. O., FARIA, F. S., ZINGALI, R.
B., DE LIMA, M. F., ABREU, L., OLIVEIRA, E. F., ALVES, E. W., MASUDA, H., GONZALES, J.
C., A. MASUDA u. P. L. OLIVEIRA (1998):
Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*.
Parasitology 116, 525-532

LOMBARDO, F., GHANI, Y., F. C. KAFATOS u. G. K. CHRISTOPHIDES (2013):
Comprehensive genetic dissection of the hemocyte immune response in the malaria mosquito
Anopheles gambiae.
PLoS Pathog 9, e1003145

MAURER, V. u. J. BAUMGARTNER (1992):

Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae).

Exp Appl Acarol 15, 27-40

MEDINA, M., P. LEON u. C. G. VALLEJO (1988):

Drosophila cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation.

Arch Biochem Biophys 263, 355-363

NISBET, A. J. u. P. F. BILLINGSLEY (2000):

A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites.

Int J Parasitol 30, 19-27

NORDENFORS, H., HOGLUND, J., R. TAUSON u. J. CHIRICO (2001):

Effect of permethrin impregnated plastic strips on *Dermanyssus gallinae* in loose-housing systems for laying hens.

Vet Parasitol 102, 121-131

NORDENFORS, H., J. HOGLUND u. A. UGGLA (1999):

Effects of temperature and humidity on oviposition, molting, and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae).

J Med Entomol 36, 68-72

NUGENT, T. u. D. T. JONES (2009):

Transmembrane protein topology prediction using support vector machines.

BMC Bioinformatics 10, 159

Nuttall, P. A., Trimnell, A. R., M. Kazimirova u. M. Labuda (2006):

Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases.

Parasite Immunol 28, 155-163

RIBEIRO J. M., LABRUNA M. B., MANS B. J., MARUYAMA S.R., FRANCISCHETTI I. M., G. C. BARIZON u. I.K. DE MIRANDA SANTOS (2012):

The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food.

Insect Biochem Mol Biol 42, 332-342

SANTAMARIA, M. E., HERNANDEZ-CRESPO, P., ORTEGO, F., GRBIC, V., GRBIC, M., I. DIAZ u. M. MARTINEZ (2012):

Cysteine peptidases and their inhibitors in *Tetranychus urticae*: a comparative genomic approach.

BMC Genomics 13, 307

SEIXAS, A., DOS SANTOS, P. C., VELLOSO, F. F., DA SILVA VAZ, I., JR., MASUDA, A., F. HORN u. C. TERMIGNONI (2003):

A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase.

Parasitology 126, 155-163

SHAHEIN, Y. E., ABOUELELLA, A. M., HUSSEIN, N. A., HAMED, R. R., EL-HAKIM, A. E., S. ABDEL-SHAIFY u. S. E. Tork (2013):

Identification of four novel *Rhipicephalus annulatus* upregulated salivary gland proteins as candidate vaccines.

Protein J 32, 392-398

SIKES, R. K. u. R. W. CHAMBERLAIN (1954):

Laboratory observations on three species of bird mites.

J Parasitol 40, 691-697

SOJKA, D., FRANCISCHETTI, I. M., E. CALVO u. M. KOTSYFAKIS (2011):

Cysteine proteases from blood feeding arthropod ectoparasites.

Adv Exp Med Biol 712, 177-191

SONENSHINE, D. E. (1991):

In: SONENSHINE, D. E. (Hrsg.): Biology of ticks (Volume 1).

Oxford University Press, New York

SPARAGANO, O., PAVLICEVIC, A., MURANO, T., CAMARDA, A., SAHIBI, H., KILPINEN, O., MUL, M., VAN EMOUS, R., LE BOUQUIN, S., K. HOEL u. M. A. CAFIERO (2009):

Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems.

Exp Appl Acarol 48, 3-10

TJALSMA, H., BOLHUIS, A., JONGBLOED, J. D., S. BRON, u. J. M. VAN DIJL (2000):

Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome.

Microbiol Mol Biol Rev 64, 515-547

UCHIDA, K., OHMORI, D., UENO, T., NISHIZUKA, M., ESHITA, Y., A. FUKUNAGA u. E. KOMINAMI (2001):

Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*.

Dev Biol 237, 68-78

VALENZUELA, J. G. (2002):

High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease.

Insect Biochem Mol Biol 32, 1199-1209

VALIENTE MORO, C., C. CHAUVE and L. ZENNER (2007):

Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*.

Vet Parasitol 146, 329-336

VAN EMOUS, R. (2005):

Wage war against the red mite!

Poul Int 44, 26-33

WILLADSEN, P. (2004):

Anti-tick vaccines.

Parasitology 129, 367-387

Literaturverzeichnis

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., G. S. COBON u. J. M. GOUGH (1989):

Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*.

J Immunol 143, 1346-1351

WINNEBECK, E. C., C. D. MILLAR u. G. R. WARMAN (2010):

Why does insect RNA look degraded?

J Insect Sci 10, 159

WOOD, H. P. (1917):

The chicken mite: Its life history and habits.

U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., Bulletin, 553: 1-14

ZEMAN, P. (1987):

Encounter the poultry red mite resistance to acaricides in Czechoslovak poultry-farming.

Folia Parasitol 34, 369-373

Danksagung

Danksagung

Meiner Supervisorin Prof. Dr. Christina Strube, PhD danke ich recht herzlich für die Bereitstellung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie ihrer unermüdlichen Unterstützung und Betreuung während der Anfertigung meiner Arbeit. Vielen Dank für die anregenden Diskussionen und Gesprächen, die in allen Lebenslagen hilfreich waren.

Den Mitarbeitern des Instituts danke ich sehr für die schöne Zeit und die vielen, netten Gesprächen, die das Arbeiten und auch die Pausen verschönerten. Ein ganz großer Dank gilt dabei meinen „Mitdoktoranden“ Liz, Annika, Birte, Valerie, Andre und Johanna, die mir nicht nur Kollegen waren sondern als Freunde stets die Zeit auch außerhalb des Instituts versüßten und somit unvergesslich machten.

Meiner lieben Zimmerpartnerin Jule möchte ich von Herzen für ihre seelische und moralische Unterstützung während der nervenaufreibenden Zeit des Schreibens danken. Auch wenn die Kekse nicht sehr Figur fördernd waren, beruhigten sie doch die Nerven!

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie in allen Lebenslagen für mich da waren und mich jeder auf seine Weise mit Rat und Tat unterstützte. Zudem bin ich sehr stolz und glücklich zwei so wundervolle Geschwister zu haben, die ich in meinem Leben nicht missen möchte. Ein ganz spezieller Dank richtet sich an Andreas, der mir nicht nur stets ein guter großer Bruder, sondern durch seinen Fleiß, Ehrgeiz und Durchhaltevermögen ein Vorbild war.

Manou, Many und Marie-Paule danke ich von ganzem Herzen für den Rat und die stete Unterstützung die mir während dieser Zeit zuteilwurden. Danke, dass es Euch gibt!