

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung und Ziele der Arbeit.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 <i>Histomonas meleagridis</i>	3
2.1.1 Allgemeines.....	3
2.1.2 Morphologie.....	3
2.1.3 Hydrogenosome.....	4
2.1.4 Stoffwechsel.....	5
2.1.4.1 Kulturbedingungen.....	5
2.1.4.2 Energiestoffwechsel.....	7
2.1.5 Taxonomie.....	8
2.1.6 Vorkommen.....	9
2.1.7 Übertragung.....	11
2.1.7.1 Übertragung zwischen einzelnen Beständen.....	11
2.1.7.2 Übertragung innerhalb eines Bestandes.....	14
2.1.8 Immunität.....	15
2.1.9 Klinik, Pathologie und Histologie.....	15
2.1.9.1 Klinische Symptome.....	15
2.1.9.2 Morbidität und Mortalität.....	16
2.1.9.3 Pathologische Veränderungen.....	16
2.1.9.4 Histopathologische Veränderungen.....	17
2.1.9.5 Andere von der Histomonose betroffene Organe.....	18

2.1.10 Diagnose.....	19
2.1.10.1 Klinik, Sektion	19
2.1.10.2 Mikroskopischer Nachweis	19
2.1.10.3 Histopathologie	20
2.1.10.4 Anzucht in vitro.....	20
2.1.10.5 Polymerase chain reaction (PCR)	21
2.1.10.6 Blutwerte	21
2.1.10.7 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)	22
2.1.10.8 In-situ Hybridisation	22
2.1.10.9 Immunohistochemischer Nachweis.....	23
2.1.10.10 Untersuchungen zur Genotypisierung.....	23
2.1.10.11 Differentialdiagnosen	24
2.1.11 Prophylaxe und Therapie	25
2.1.11.1 Herdenmanagement.....	25
2.1.11.2 Therapeutika und prophylaktisch eingesetzte Wirkstoffe.....	26
2.1.11.2.1 Ehemals verwendete Substanzen	26
2.1.11.2.2 Rechtliche Grundlagen.....	27
2.1.11.2.3 Weitere Substanzen	28
2.2 <i>Blastocystis</i> spp.	30
2.3 <i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Materialien	34
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	34
3.1.1.1 Präparation der DNA und RNA	34
3.1.1.2 PCRs und Gelelektrophorese	35
3.1.1.3 Klonierung und Plasmid-Präparation	35
3.1.1.4 Kultivierung der Histomonaden	36
3.1.3 Verwendete Puffer und Medien	37

3.1.3.1 PCR und Gelelektrophorese	37
3.1.3.2 Klonierung und Plasmidpräparation.....	37
3.1.3.3 Kultivierung von Histomonaden	39
3.1.4 Verwendete Software und Internetprogramme	39
3.1.5 Histomonaden-Probenmaterial	40
3.1.5.1 Probenmaterial zur Untersuchung von Feldproben und zur Genotypisierung.	40
3.1.5.2 Histomonadenstämme für Untersuchungen zum Kohlenhydrat-stoffwechsel.	40
3.2 Angewandte Methoden	40
3.2.1 Angewandte Methoden zu Untersuchungen von Feldproben und zur Genotypisierung	40
3.2.1.1 Extraktion der DNA	40
3.2.1.1.1 Extraktion aus Organen und Invertebraten.....	40
3.2.1.1.2 Extraktion aus Tupfern und Kulturmaterial	41
3.2.1.1.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes	41
3.2.1.2 PCRs.....	42
3.2.1.2.1 Zur Diagnostik eingesetzte Real Time-PCR (quantitative PCR, qPCR) ..	42
3.2.1.2.2 PCR für das C-Profilng	43
3.2.1.2.3 PCRs zur Untersuchung auf <i>Blastocystis</i> spp. und <i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	44
3.2.1.2.4 Gel-Elektrophorese.....	45
3.2.1.3 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierungen.....	45
3.2.1.4 Erstellung der C-Profile	45
3.2.1.5 Anlegen monoklonaler Kulturen.....	46
3.2.1.5.1 Ausgangsmaterial	46
3.2.1.5.2 Mikromanipulation.....	46
3.2.1.6 Untersuchung monoklonaler Kulturen	47
3.2.1.6.1 Gelreinigung.....	47
3.2.1.6.2 Klonierung.....	48

3.2.1.6.2.1 Ligation	48
3.2.1.6.2.2 Transformation	48
3.2.1.6.2.3 Beurteilung des Klonierungserfolges und Auswahl der Kolonien für die Plasmid-DNA-Präparation	49
3.2.1.6.2.4 Präparation der Plasmid-DNA (Mini-Präparation)	49
3.2.1.6.2.5 Überprüfung des Präparationserfolges und Sequenzierung	50
3.2.2 Angewandte Methoden zu Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel	50
3.2.2.1 Kultivierung von <i>H. meleagridis</i>	50
3.2.2.1.1 Kulturbedingungen	50
3.2.2.1.2 Bestimmung der Histomonadenzahl	50
3.2.2.2 Sequenzierung von Teilen des Alpha-Amylase- und des Glykogenphosphorylase-Gens	51
3.2.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA	51
3.2.2.2.2 Extraktion eukaryotischer mRNA	51
3.2.2.2.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	52
3.2.2.2.4 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte	53
3.2.2.3 Untersuchungen zur Genexpression	53
3.2.2.3.1 Gewinnung der cDNA	53
3.2.2.3.1.1 Extraktion der Gesamt-RNA	53
3.2.2.3.1.2 Reverse Transkription	54
3.2.2.3.2 Real Time-PCR mit EvaGreen	54
4 Ergebnisse	57
4.1 Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Genotypen	57
4.1.1 Probenmaterial für das C-Profilng	57
4.1.2 Entwicklung der Primer und der PCR für das C-Profilng	62
4.1.3 C-Profilng der ITS1-Region	64
4.1.4 C-Profilng der ITS2-Region	66
4.1.5 Anwendungen des C-Profilngs	67

4.1.5.1 Putenelterntierbetrieb	67
4.1.5.2 Gemischter Betrieb.....	67
4.1.5.3 Mastelterntierbetrieb	67
4.1.6 Anlegen monoklonaler Kulturen.....	68
4.1.6.1 Mikromanipulation.....	68
4.1.6.2 C-Profilung und Fluorogramme der monoklonalen Kulturen.....	68
4.1.7 Vorkommen von <i>Blastocystis</i> spp. und <i>T. gallinarum</i>	70
4.2 Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel.....	73
4.2.1 Versuche zur Pufferwirkung von MOPS und HEPES	73
4.2.1.1 HEPES.....	73
4.2.1.2 MOPS.....	76
4.2.2 Versuche zur Eignung unterschiedlicher Kohlenhydrate in M199 und PBS.....	78
4.2.2.1 Kultivierung in M199 basiertem Medium.....	78
4.2.2.2 Kultivierung in PBS basiertem Medium	80
4.2.2 Versuche zur Eignung von Glukose.....	82
4.2.3 Versuche zur Eignung von verschiedenen Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels als Kohlenhydratquelle in PBS.....	89
4.2.3.1 Pyruvat	90
4.2.3.2 Glukose-1-Phosphat	93
4.2.3.3 Glukose-6-Phosphat	96
4.2.3.4 Maltose.....	99
4.2.4 Versuche zum Einfluss von Sauerstoff und CO ₂ auf das Histomonaden-Wachstum	102
4.2.4.1 Einfluß des wiederholten Öffnens der Kulturgefäße.....	102
4.2.4.2 Einfluss eines anaeroben und eines mikroaerophilen Milieus	104
4.2.5 Einfluss von Pyruvat auf die Transkription verschiedener Enzyme	106
4.2.5.1 Sequenzierung von Abschnitten des Alpha-Amylase- und Glykogenphosphorylase-Gens	107

4.2.5.2 Ermittlung der Effizienzen der qPCR-Primer	107
4.2.5.3 Expression von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH unter verschiedenen Kulturbedingungen	108
5 Diskussion	114
6 Zusammenfassung	132
7 Summary	134
8 Literaturverzeichnis	136
Publikationsverzeichnis	155
Danksagungen	157
Selbstständigkeitserklärung	159