

# 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>Tetrahymenopsis 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 Gelektrophorese .....	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 Kulturmateriel .....	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-Profilin .....	43
3.2.1.2.3 PCRs zur Untersuchung auf <i>Blastocystis</i> spp. und <i>Tetrahymen</i> <i>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 Klonierungerfolges 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-Profiling .....	57
4.1.2 Entwicklung der Primer und der PCR für das C-Profiling.....	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-Profilings .....	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 <sub>2</sub> 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