

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I. Abkürzungsverzeichnis..... | 8 |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 2 Literaturübersicht..... | 3 |
| 2.1 Sarkosporidien..... | 3 |
| 2.1.1 Der zweiwirtige Lebenszyklus der Sarkosporidien..... | 5 |
| 2.1.2 <i>Sarcocystis calchasi</i> | 7 |
| 2.2 Zentralnervöse Erkrankungen durch <i>Sarcocystis</i> spp. und nah verwandte Parasiten aus dem Stamm der Apicomplexa | 8 |
| 2.2.1 Sarkosporidien mit Pathologie des ZNS bei Säugetieren..... | 8 |
| 2.2.2 Sarkosporidien mit Pathologie des ZNS bei Vögeln..... | 9 |
| 2.2.3 <i>Toxoplasma</i> und <i>Neospora</i> assoziierte Pathologie des ZNS..... | 10 |
| 2.3 Das Immunsystem | 12 |
| 2.3.1 Das angeborene Immunsystem des Vogels | 13 |
| 2.3.2 Das adaptive Immunsystem des Vogels | 14 |
| 2.3.3 Ausgewählte Zytokine..... | 15 |
| 2.3.4 Immunevasionsstrategien von <i>Sarcocystis</i> und nah verwandter Apicomplexa . | 30 |
| 3 Material und Methoden | 36 |
| 3.1 Material | 36 |
| 3.1.1 Chemikalien | 36 |
| 3.1.2 Antikörper | 38 |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterialien | 39 |
| 3.1.4 Reaktionskits | 40 |
| 3.1.5 Geräte | 40 |
| 3.1.6 Software | 42 |
| 3.1.7 Angesetzte Lösungen und Puffer (Verweis auf die Chemikalien oben) | 43 |
| 3.1.8 Versuchstiere und Probenmaterial | 45 |
| 3.2 Histologische Methoden..... | 47 |
| 3.2.1 Nachweis von <i>Sarcocystis calchasi</i> | 47 |
| 3.2.2 Charakterisierung der Immunzellinfiltration..... | 52 |
| 3.3 Molekularbiologische Untersuchung | 55 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.3.1 | RNA-Isolierung aus Taubengehirnen..... | 55 |
| 3.3.2 | Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA | 56 |
| 3.3.3 | Reverse Transkription | 56 |
| 3.3.4 | Isolierung von genomischer DNA aus Gewebeproben | 57 |
| 3.3.5 | <i>Semi-nested-PCR</i> zum Nachweis von <i>S. calchasi</i> | 58 |
| 3.3.6 | Primer-Design | 60 |
| 3.3.7 | Quantitative <i>real-time PCR</i> | 61 |
| 3.3.8 | Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Bestimmung des Zytokinexpressionsprofils..... | 63 |
| 3.3.9 | Protokoll der RT-qPCR..... | 64 |
| 3.3.10 | Bestimmung geeigneter Referenzgene..... | 65 |
| 3.3.11 | Auswertung der RT-qPCR-Daten | 69 |
| 3.3.12 | Relative Quantifizierung der Expressionsraten der Referenzgene mittels der Delta-Delta- C_T - ($\Delta\Delta C_T$) Methode | 70 |
| 3.3.13 | Effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels RT-qPCR unter Einbeziehung mehrerer validierter Referenzgene | 71 |
| 3.4 | Statistik..... | 74 |
| 4 | Ergebnisse | 75 |
| 4.1 | Ergebnisse der histologischen Methoden | 75 |
| 4.1.1 | Immunhistochemischer Nachweis von MHC-II-Molekülen, CD3 (T-Zellen) und Pax-5 (B-Zellen) | 75 |
| 4.1.2 | Sarkosporidien-Nachweis..... | 78 |
| 4.2 | Ergebnisse der molekularbiologischen Methoden | 80 |
| 4.2.1 | RNA-Konzentration und RNA-Integrität..... | 80 |
| 4.2.2 | Nachweis von Sarkozysten-DNA mit Hilfe der <i>semi-nested-PCR</i> | 82 |
| 4.2.3 | Primer-Planung..... | 82 |
| 4.2.4 | Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethoden | 84 |
| 4.2.5 | Auswahl der geeigneten Referenzgene | 100 |
| 4.2.6 | Relative Expressionsraten der Referenzgene | 104 |
| 4.2.7 | Relative Quantifizierung der Zielgene | 105 |
| 4.2.8 | Ergebnisse der Statistik | 107 |

| | |
|---|------------|
| 5 Diskussion | 109 |
| 5.1 Einleitung | 109 |
| 5.2 Erreger nachweis im Gehirn der Tauben..... | 110 |
| 5.2.1 Molekularbiologischer Nachweis der DNA von <i>S. calchasi</i> | 110 |
| 5.2.2 Lokalisierung von <i>S. calchasi</i> im Gehirn mittels immunhistochemischer Untersuchung | 110 |
| 5.3 Die Immunantwort des Zwischenwirts auf die Infektion mit <i>S. calchasi</i> | 113 |
| 5.3.1 Etablierung neuer Methoden für die Haustaube zur Darstellung des Zytokin-Expressionsprofils | 113 |
| 5.3.2 Ergebnisse des Zytokinexpressionsprofils im Vergleich der beiden Krankheitsphasen | 114 |
| 5.4 Lokalisierung von MHC-II-, CD3- und Pax-5-exprimierenden Zellen im Gehirn | 119 |
| 5.5 Ausblick | 121 |
| 6 Zusammenfassung..... | 123 |
| 7 Summary | 125 |
| 8 Tabellenverzeichnis | 127 |
| 9 Abbildungsverzeichnis | 128 |
| 10 Referenzen..... | 130 |
| 11 Anhang | 156 |
| 11.1 Tabellen..... | 156 |
| 11.2 Publikationen..... | 164 |
| Danksagung..... | 165 |
| Selbstständigkeitserklärung | 166 |