

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</i> -PCR zum Nachweis von <i>S. calchasi</i>	58
3.3.6	Primer-Design	60
3.3.7	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	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</i> -PCR	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	Erregernachweis 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