

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	3
2.1.1	Zur Geschichte des Erregers	3
2.1.2	Taxonomie und Wirtsspektrum	4
2.1.3	Entwicklungszyklus und Morphologie	6
2.1.4	Epidemiologie.....	9
2.1.5	<i>In vitro</i> Kultivierung.....	12
2.1.5.1	Enterale Zelllinien	13
2.1.5.2	Zelllinien nicht-enteralen Ursprungs	15
2.1.5.3	Zellfreie Kultivierung	19
2.1.5.4	Mediumzusätze	21
2.2	Cryptosporidiose.....	23
2.2.1	Klinik der humanen Cryptosporidiose	23
2.2.2	Klinik der bovinen Cryptosporidiose.....	24
2.2.3	Pathologische Befunde und Pathophysiologie.....	25
2.2.4	Chemotherapeutische Ansätze zur Behandlung der Cryptosporidiose.....	26
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Materialien	33
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	33
3.1.2	Geräte	33
3.1.3	Reagenzien	36
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	38
3.1.5	Medien, Nährböden und Mikroorganismen	38
3.1.6	Enzyme	39
3.1.7	Reaktionskits.....	39
3.1.8	Wirkstoffe	40
3.1.8.1	Wirkstoffformulierung.....	41
3.1.9	Software	41
3.1.10	Oocysten	42
3.1.11	Zellen	42
3.2	Methoden.....	43
3.2.1	Zellkultur.....	43
3.2.2	Zellinfektion	44
3.2.2.1	Vorversuche zur Optimierung der <i>in vitro</i> Kultivierung von <i>C. parvum</i>	45
3.2.2.1.1	Eruiung des optimalen Analysezeitpunktes für die DNA Isolation.....	45

3.2.2.1.2	Optimierung der Oocystenkonzentration	45
3.2.2.1.3	Einführung eines Zentrifugationsschrittes	46
3.2.3	Überprüfung von Substanzen auf anticryptosporidiale Wirksamkeit	46
3.2.3.1	Optimierung der DMSO-Konzentration	47
3.3	DNA-Isolation	48
3.3.1	DNA-Isolation mit dem NucleoSpin® 8 Tissue Kit (MACHERY-NAGEL)	48
3.3.2	DNA-Isolation mit dem Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (PROMEGA)	48
3.3.3	DNA-Isolation aus Oocysten	49
3.3.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	49
3.4	PCR	50
3.4.1	Konventionelle PCR	50
3.4.1.1	Optimierung konventionelle PCR	51
3.4.2	Quantitative real-time PCR (relative Quantifizierung)	52
3.4.2.1	Herstellung der Standards	54
3.4.2.2	Optimierung der qPCR	54
3.4.3	Quantitative real-time PCR (absolute Quantifizierung)	54
3.4.3.1	Herstellung der Standards	56
3.4.3.1.1	Herstellung des originären cryptosporidialen Standards	57
3.4.3.1.2	Herstellung des <i>in vitro</i> mutagenisierten cryptosporidialen Standards ..	57
3.5	Agarose-Gelelektrophorese	58
3.6	DNA-Extrahierung aus einem Agarosegel	58
3.7	Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (INVITROGEN)	59
3.7.1	Ligation	59
3.7.2	Transformation in One Shot® TOP10 Zellen (INVITROGEN)	59
3.7.3	Bakterienkulturen	60
3.7.4	Antibiotikazusätze	60
3.7.5	Glycerolstocks	60
3.8	Plasmidpräparation	60
3.8.1	Miniprep	60
3.8.2	Midiprep	61
3.8.3	Kontrolle des Inserts	61
3.8.4	Sequenzanalyse	61
3.9	Viabilitäts und- Zytotoxizitätsassays	62
3.9.1	Lactatdehydrogenase-Assay	62
3.9.1.1	Ermittlung der optimalen Zellkonzentration	64
3.9.2	WST-1-Assay	64
4	Ergebnisse	67

4.1	Vorversuche: Optimierung der (q)PCR und der <i>in vitro</i> Kultivierung von <i>C. parvum</i>	67
4.1.1	Eruiierung des optimalen Analysezeitpunktes für die DNA-Isolation	67
4.1.2	Quantitative real-time PCR (relative Quantifizierung)	68
4.1.3	Oocystenkonzentration	69
4.1.4	Einführung eines Zentrifugationsschrittes	71
4.2	Quantitative real-time PCR (absolute Quantifizierung)	72
4.3	Überprüfung von Substanzen auf anticryptosporidiale Wirksamkeit	74
4.3.1	Positiv und- Negativkontrollen	74
4.3.1.1	Positivkontrollen: Paromomycin und Nitazoxanid	74
4.3.1.2	Negativkontrollen	76
4.3.1.2.1	Optimierung der DMSO-Konzentration	76
4.3.2	Wirkstoffüberprüfung in 96-Loch Gewebekulturschalen	78
4.3.3	Wirkstoffüberprüfung in 48-Loch Gewebekulturschalen	80
4.3.4	BAY-AF76184 und BAY-AB24992	83
4.3.4.1	Lactatdehydrogenase-Assay	87
4.3.4.1.1	Ermittlung der optimalen Zellkonzentration	87
4.3.4.1.2	Zytotoxizität der Wirkstoffe	89
4.3.4.2	WST-1-Assay	91
5	Diskussion	95
5.1	Optimierung der (q)PCR und der <i>in vitro</i> Kultivierung von <i>C. parvum</i>	95
5.2	Überprüfung von Substanzen auf anticryptosporidiale Wirksamkeit	102
5.2.1	Negativkontrollen	102
5.2.2	Positivkontrollen	103
5.2.3	Wirkstoffe	104
5.3	BAY-AF76184 und BAY-AB24992	106
5.4	Schlussfolgerung	112
6	Zusammenfassung	114
7	Summary	116
8	Abkürzungsverzeichnis	118
9	Literaturverzeichnis	121
10	Anhang	137
11	Publikationsverzeichnis	150
12	Danksagung	151
13	Selbstständigkeitserklärung	152