

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 Ermittlung 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 Eruierung 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

---