

Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

**Hinweise auf eine Immunmodulation durch den Parasiten  
*Sarcocystis calchasi* bei der zerebralen Sarkosporidiose der  
Haustaube (*Columba livia f. dom.*)**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Anne Lisa Mulzer**  
geb. Meyer  
Tierärztin aus Bielefeld

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3675

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Jürgen Krücken  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

gene expression; cytokines; Sarcocystis; pigeons; real time PCR; encephalitis;  
immuno-modulation

Tag der Promotion: 01.08.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-524-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
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
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
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 <sub>T</sub> - ( $\Delta\Delta C_T$ ) Methode .....	70
3.3.13	Effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels RT-qPCR unter Einbeziehung mehrerer validierter Referenzgene.....	71
3.4	Statistik.....	74
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
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

---

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>109</b>
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
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>156</b>
11.1	Tabellen.....	156
11.2	Publikationen.....	164
	<b>Danksagung.....</b>	<b>165</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>166</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AIDS	engl. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
APC	engl. <i>antigen-presenting cells</i>
bp	Basenpaare
CIITA	engl. <i>class II transactivator</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4-positive T-Lymphozyten
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8-positive T-Lymphozyten
ch-	engl. <i>chicken</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...des Huhns“)
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tag(e) <i>post infectionem</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
du-	engl. <i>duck</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...der Ente“)
ELISA	eng. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISpot Assay	engl. <i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>
engl.	englisch / aus dem Englischen
EPM	Equine protozoäre Myeloenzephalitis
FC	engl. <i>fold change</i>
gDNA	genomische DNA
GM-CSF	engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulatory factor</i>
go-	engl. <i>goose</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...der Gans“)
GOI	engl. <i>gene of interest</i>
HBSS	engl. <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin Eosin
hu-	engl. <i>human</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...des Menschen“)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF-1	engl. <i>interferon regulatory factor 1</i>
Jak	Janus-Kinase
KO-Mäuse	knockout-Mäuse
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	engl. <i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
mu-	engl. <i>murine</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...der Maus“)
N.	<i>Neospora</i>

---

NF- $\kappa$ B	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
PAMPs	engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
p.i.	lat. <i>post infectionem</i>
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pi-	engl. <i>pigeon</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...der Taube“)
PPE	engl. <i>pigeon protozoal encephalitis</i>
PRR	engl. <i>pattern recognition receptors</i>
RT-qPCR	Reverse Transkriptase - quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-VM	Roswell Park Memorial Institute-Vollmedium
S.	Seite
<i>S.</i>	<i>Sarcocystis</i>
SCID	engl. <i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
STAT	engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
<i>T.</i>	<i>Toxoplasma</i>
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
T-bet	engl. <i>T-box-expressed in T-cells</i>
TBS	engl. Tris-buffered Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	<i>Toxoplasma</i> -Enzephalitis
TGF- $\beta$	engl. <i>transforming growth factor beta</i>
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TL1A	engl. <i>tumor necrosis factor ligand 1A</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
tu-	engl. <i>turkey</i> (als Vorsilbe mit der Bedeutung „...der Pute“)
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1 Einleitung

Bei der protozoären Enzephalitis der Taube (engl. *pigeon protozoal encephalitis*, PPE) handelt es sich um eine neuartige, häufig letal verlaufende zentralnervöse Erkrankung der Haustaube (*Columba livia* f. *domestica*; Olias et al. 2009b), hervorgerufen durch den protozoären Parasiten *Sarcocystis* (*S.*) *calchasi* (Olias et al. 2009a). Erstmals 2009 in Berlin beobachtet (Olias et al. 2009b) konnte der Erreger mittlerweile auch in den USA nachgewiesen werden (Wünschmann et al. 2011).

*S. calchasi* durchlebt einen zweiwirtigen Entwicklungszyklus, in welchem die Haustaube den Zwischenwirt und der Habicht (*Accipiter g. gentilis*) und vermutlich auch der Europäische Sperber (*Accipiter n. nisus*) den Endwirt darstellen (Olias 2010; Olias et al. 2011). In der Taube durchläuft *S. calchasi* eine zweiphasige Entwicklung, welche sich in einem charakteristischen, biphasischen Krankheitsverlauf widerspiegelt (Olias et al. 2010). Während der ersten Phase der Erkrankung etwa ein bis zwei Wochen *post infectionem* (p.i.) zeigen die Tiere Apathie, Polyurie und Diarrhoe. Histologisch zeigt sich in erster Linie eine hochgradige lymphohistozytäre und nekrotisierende Hepatitis (Olias 2010; Olias et al. 2010). Während insbesondere in Leber und Milz eine große Anzahl von Parasitenstadien (Schizonten) auftreten (Olias et al. 2010), konnten während dieser Phase bisher bei keinem der experimentell infizierten Tiere pathologische Veränderungen oder histologisch identifizierbare Parasitenstadien im Gehirn nachgewiesen werden (Olias 2010; Olias et al. 2009a; Olias et al. 2010). Tiere, die diese frühe Krankheitsphase überleben, sind lange Zeit klinisch unauffällig. Etwa sieben bis acht Wochen p.i. beginnt die zweite Phase der Erkrankung, gekennzeichnet durch zentralnervöse Symptome wie Lähmungen, Tortikollis und Opisthotonus (Olias 2010; Olias et al. 2010). Zu diesem Zeitpunkt entwickeln die Tiere eine hochgradige nekrotisierende und lymphohistozytäre Meningoenzephalitis. Interessanter Weise konnten trotz dieser hochgradigen Läsionen bisher keine intraläsionalen Parasitenstadien im Gehirn mittels Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung nachgewiesen werden (Olias 2010). Eine experimentelle Infektionsstudie zeigte jedoch, dass die Schwere der Erkrankung und die Ausprägung neurologischer Symptome abhängig sind von der verabreichten Dosis an Sporozysten ( $10^2$  bis  $10^5$  *per os*). Die Ausprägung der histopathologischen Veränderungen im Gehirn erscheint dagegen unabhängig von der verabreichten Parasitendosis zu sein (Olias et al. 2010). Aus den bisherigen Beobachtungen lässt sich vermuten, dass das Immunsystem der Taube nicht in der Lage ist, eine Infektion mit *S. calchasi* wirkungsvoll zu bekämpfen oder zu kontrollieren. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob der Parasit selbst oder aber ein immunpathologisches Phänomen die für die zweite Krankheitsphase typischen schwerwiegenden Läsionen im zentralen Nervensystem der Taube verursacht.

Bisher ist nur wenig über die Pathogenese von Sarkosporidieninfektionen im Allgemeinen und kaum etwas über *S. calchasi* bekannt. Von anderen nahe verwandten Apicomplexa wie

*Toxoplasma gondii* oder *Neospora caninum* weiß man jedoch, dass sie in der Lage sind, aktiv in die Immunantwort ihres Wirtes einzugreifen (Bogdan und Röllinghoff 1999; Lambert und Barragan 2010; Miller et al. 2009). Es wäre denkbar, dass auch *S. calchasi* die Immunantwort seines Zwischenwirts mit Hilfe spezifischer Immunevasionsmechanismen umgeht oder beeinflusst, um einerseits sein eigenes Überleben im Wirt zu sichern und andererseits durch die Schwächung seines Wirts seine Übertragung auf den Endwirt zu erleichtern. Aufbauend auf diesen Überlegungen wurde die der vorliegenden Dissertationsschrift zu Grunde liegende Hypothese aufgestellt:

***Sarcocystis calchasi* moduliert die Immunabwehr seines Zwischenwirts.**

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Gehirne von infizierten Tauben sowohl aus der ersten als auch der zweiten Krankheitsphase auf Anwesenheit und Lokalisation von Parasitenstrukturen untersucht werden. Da in vorangegangenen Untersuchungen mit Hilfe der HE-Färbung keine Parasiten im zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen werden konnten, fiel die Wahl auf zwei verschiedene sowohl spezifischere als auch sensitivere Untersuchungsverfahren. So wurde einerseits die qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) in Form einer *nested*-PCR gewählt, um den Erreger auf DNA-Ebene nachzuweisen. Des Weiteren wurde ein erregerspezifischer Antikörper entwickelt, um den Parasiten im Gewebe mit Hilfe eines immunhistochemischen Verfahrens genau lokalisieren zu können.

Der mögliche Einfluss von *S. calchasi* auf das Immunsystem des Wirts sollte anhand der Immunantwort während beider Krankheitsphasen sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene analysiert werden. Dazu sollte mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) ein Zytokinexpressionsprofil des Gehirns der Taube während beider Krankheitsphasen erstellt werden. Zu diesem Zweck mussten zunächst geeignete qPCR-Verfahren etabliert werden, wozu auch die Planung der dafür benötigten Primer zur Identifizierung geeigneter Referenzgene und zur anschließenden quantitativen Bestimmung ausgewählter Zytokine der Taube gehörte. Zusätzlich zum Zytokinexpressionsprofil interessierten die an den Entzündungserscheinungen im Gehirn beteiligten Immunzellen, welche mit Hilfe immunhistochemischer Methoden näher charakterisiert werden sollten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Sarkosporidien

Sarkosporidien (auch: Sarkozysten; *Sarcocystis* spp.) sind einzellige, intrazelluläre Parasiten von Wirbeltieren. Erstmals beschrieben wurden Gewebszysten dieses Erregers 1843 von Miescher als milchig-weiße Schläuche in der Muskulatur der Hausmaus. Daher stammt auch die Bezeichnung „Mieschersche Schläuche“ (Miescher 1843). Sarkosporidien gehören zum Stamm der Apicomplexa (Eckert et al. 2005). Zu den besonderen Kennzeichen der Apicomplexa gehören die Ausbildung infektiöser Sporozoiten, ein Generationswechsel zwischen geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Formen sowie das Vorliegen charakteristischer Organellen (Mikronemen, Rhoptrien, Konoid) und Zytoskelettstrukturen (apikaler Polringkomplex, subpellikuläre Mikrotubuli) im apikalen Bereich (Eckert et al. 2005), wobei Rhoptrien und Mikronemen auf die invasiven Stadien der Apicomplexa, Sporozoiten und Merozoiten, beschränkt sind (Chobotar und Scholtzsek 1982; Sellon und Dubey 2007). Heutzutage sind mehr als 200 verschiedene Sarkosporidien-Spezies bekannt. Als Wirte dienen sowohl Säugetiere, als auch Reptilien und Vögel (Box und Duszynski 1980; Gjerde und Dahlgren 2010; Levine 1986; Matuschka 1987; Rommel 1978; Rommel 1989). Die meisten Sarkosporidien sind spezies-spezifisch für ihren Zwischenwirt und familien-spezifisch für ihren Endwirt (Rommel 1978; Tenter 1995). Dabei können auch mehrere Spezies bei ein und demselben Individuum zeitgleich gefunden werden (Kutkiene et al. 2009; Olias et al. 2011).

In der Vergangenheit wurden weltweit einige wenige Fälle von Sarkosporidiose bei verschiedenen Taubenarten beschrieben. So konnten Sarkosporidien unbekannter Spezies in der Muskulatur von Trauertauben (*Zenaida macroura*) im Südosten der USA (Barrows und Hayes 1977; Conti und Forrester 1981), Weißflügeltauben (*Zenaida asiatica*) in Florida (Conti und Forrester 1981) und Palmtauben (*Streptopelia senegalensis*) in Südafrika (Kaiser und Markus 1983) nachgewiesen werden. Bei einer Luzon-Dolchstichtaube (*Gallicolumba luzonica*) in einem brasilianischen Zoo wurde eine pulmonale Sarkosporidiose festgestellt (Ecco et al. 2008). In diesem Fall waren auch verschiedene Psittaziden betroffen. Die meisten Tiere, einschließlich der Taube, zeigten dabei mittel- bis hochgradige Läsionen in Lunge und Leber. In der Lunge zeigten sich leichte bis mäßige perivaskuläre Infiltrationen mit Lymphozyten und einigen Plasmazellen im Interstitium, welche sich bei der Taube besonders prominent darstellten. In der Leber zeigte sich eine mäßig bis stark erhöhte Zelldichte mit mononuklearen Entzündungszellen in den Sinusoiden sowie eine leichte lymphoplasmozytische, periportale Infiltration. Daneben waren Herzmuskulatur und Nieren betroffen. Im Gehirn einiger Tiere zeigten sich ein mildes perivaskuläres Cuffing und eine Gliose, wobei nicht näher eingegangen wurde, ob darunter auch die Taube war. Schizonten konnten in verschiedenen Organen wie Lunge und Leber, aber auch Gehirn, Herz, Niere und

Pankreas nachgewiesen werden (Ecco et al. 2008). Nähere Untersuchungen zur Spezies des Erregers wurden in allen diesen Fällen nicht durchgeführt. Dagegen fanden sich Merozoiten von *S. falcatula* in der Lunge von plötzlich verendeten Victoria-Krontauben (*Goura victoria*) in Kansas City, Missouri (Suedmeyer et al. 2001). Natürliche Infektionen von Haustauben durch *S. falcatula* sind dagegen noch nicht beschrieben worden. Allerdings bildete *S. falcatula* in experimentellen Studien Zysten in der Muskulatur von Haustauben, jedoch ohne Ausbildung eines klinisch bedeutsamen Muskelschadens oder von Gehirnläsionen (Box et al. 1984; Box und Smith 1982; Smith et al. 1990).

Ein besonders bedeutsamer Vertreter der Sarkosporidien-Familie ist *S. neurona*, der Erreger der Equinen Protozoären Myeloencephalitis (engl. *equine protozoal myeloencephalitis*, EPM), einer bedeutenden neurologischen Erkrankung von Pferden in Amerika (siehe auch Kapitel 2.2.1, S. 8; Dubey et al. 2001b). Es wird vermutet, dass das Pferd einen Fehlwirt des Erregers und keinen echten Zwischenwirt darstellt. Endwirte sind zwei Opossum-Arten (*Didelphis virginiana* und *D. albiventris*; Dubey et al. 2001a; Fenger et al. 1997). *S. neurona* kann darüber hinaus zahlreiche weitere Wirbeltiere infizieren und als Zwischenwirt nutzen; unter anderem sind dies der Braunkopf-Kuhstärling (*Molothrus ater*), ein nordamerikanischer Singvogel aus der Familie der Stärlinge (Mansfield et al. 2008), sowie das Skunk (Cheadle et al. 2001b), der Waschbär (Dubey et al. 2001d), das Neunbinden-Gürteltier (Cheadle et al. 2001a; Tanhauser et al. 2001), die Hauskatze (Dubey et al. 2000b) und der Seeotter (Dubey et al. 2001c).

Sarkosporidien verfügen als intrazelluläre Parasiten über bestimmte Immunevasionsmechanismen, die es ihnen erlauben die Immunantwort ihres Wirtes zu umgehen und so ihr Überleben und ihre Vermehrung im Wirt zu sichern. Dazu gehört unter anderem die Fähigkeit, in die Wirtszellen einzudringen und darin zu überleben, wie auch die Ausbildung von Gewebssystemen, welche teils über mehrere Jahre im Wirtsgewebe überdauern können. Von anderen protozoären Erregern wie Toxoplasmen oder Leishmanien ist zudem bekannt, dass sie die Immunabwehr ihres Wirtes manipulieren können, indem sie die Synthese des proinflammatorischen Zytokins Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) unterdrücken (Hunter et al. 1995; Lang et al. 2007; Langermans et al. 2001) oder in dessen nachgeschaltete Signalwege eingreifen (Eckert et al. 2005; Lüder et al. 2003a) und damit dessen antiparasitäre Wirkung umgehen. Im Falle der Sarkosporidien ist die Existenz ähnlicher Mechanismen einer Immunevasion noch weitgehend ungeklärt. Initiale Untersuchungen zu *S. neurona* zeigten jedoch, dass IFN- $\gamma$  durch ein bestimmtes Oberflächenprotein des Parasiten, das SnSAG1, in peripheren Blutlymphozyten herunterreguliert wird (Spencer et al. 2005; Spencer et al. 2004).

### 2.1.1 Der zweiwirtige Lebenszyklus der Sarkosporidien

Der Zyklus der Sarkosporidien ist zweiwirtig. Anders als bei den am nächsten verwandten Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum*, durchläuft der Parasit immer eine Entwicklung im Endwirt und kann nur darüber auf andere Zwischenwirte übertragen werden. Endwirt und Zwischenwirt stehen in der Regel in einem Räuber-Beute-Verhältnis zueinander (Dubey 1976; Mehlhorn und Heydorn 1978; Rommel 1978; Rommel 1985).

Sowohl im Endwirt als auch im Zwischenwirt lassen sich zwei Phasen der Entwicklung unterscheiden (Mehlhorn und Heydorn 1978). Im Zwischenwirt erfolgt eine ungeschlechtliche Vermehrung des Parasiten in Form der Schizogonie (auch: Merogonie), wobei zunächst Schizonten in verschiedenen Organen und zu einem späteren Zeitpunkt typische, meist gekammerte Zysten in der Muskulatur und selten im ZNS gebildet werden (Mehlhorn und Heydorn 1978; Rommel 1985; Tenter 1995). Innerhalb dieser Gewebszysten entwickeln sich im Zeitraum von wenigen Wochen bis wenigen Monaten die für den Endwirt infektiösen Zystenmerozoiten (auch: Bradyzoiten; Eckert et al. 2005; Mehlhorn und Heydorn 1978). Im Darm des Endwirtes erfolgen die Gamogonie und die Sporogonie. Bei der Gamogonie handelt es sich um eine geschlechtliche Vermehrung des Parasiten mit Ausbildung einer befruchteten Eizelle (Oozyste; Tenter 1995). Im Rahmen der folgenden ungeschlechtlichen Sporogonie entwickeln sich innerhalb der Oozyste jeweils zwei Sporozysten mit jeweils vier für den Zwischenwirt infektiösen Sporozoiten (Levine 1986).

Der Zwischenwirt infiziert sich durch die Aufnahme von infektiösen Sporozysten. Im Dünndarm des Zwischenwirts werden die darin enthaltenen Sporozoiten freigesetzt, welche dann in die Darmwand eindringen und dort die erste Phase der Schizogonie durchlaufen. Bei einigen Sarkosporidien-Arten gelangen die Sporozoiten über die Blutbahn auch direkt bis in die Leber (Rommel 1978). Die Sporozoiten dringen in die Endothelzellen von Arterien und Arteriolen bzw. in die Parenchymzellen der Leber ein, runden sich ab und entwickeln sich innerhalb des Zytoplasmas zu den sogenannten Schizonten (Mutterzellen) ohne Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (Dubey et al. 1991a; Dubey und Lindsay 2006; Dubey et al. 1989). Einige Sarkosporidien-Spezies befallen auch weiße Blutzellen, darunter auch *S. neurona* (Lindsay et al. 2006; Rommel 1989). Die Schizogonie vollzieht sich nun in Form einer Endopolygenie, bei der sich an der Peripherie eines polyploiden Kerns des Schizonten viele Tochterzellen (Merozoiten) abschnüren (Mehlhorn und Heydorn 1978; Rommel 1978). Die Merozoiten werden aus den Schizonten frei, wenn die Wirtszelle rupturiert. Über den Blutweg gelangen diese Merozoiten in verschiedene Organe und dringen aktiv in weitere Wirtszellen (insbesondere Endothelzellen von Arteriolen und venösen Gefäßen) ein und differenzieren sich dort zu neuen Schizonten der zweiten Generation. Im Falle von *S. neurona* findet die Schizogonie auch im ZNS statt, wobei der Parasit sowohl Neuronen und Gliazellen als auch Entzündungszellen (eosinophile Granulozyten, Makrophagen) und Endothelzellen

befallen kann (Dubey et al. 2001b; Sellon und Dubey 2007). Die Zahl der Merozoiten innerhalb eines Schizonten variiert ebenso wie die Zahl der Schizogonie-Zyklen (meistens ein bis drei Zyklen) je nach Spezies (Dubey und Lindsay 2006; Rommel 1985; Tenter 1995). Die Merozoiten der letzten Generation dringen dann ins Muskelgewebe des Zwischenwirtes ein und bilden intrazelluläre Gewebszysten aus. Bei einigen Arten kann es auch in anderen Geweben, wie Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) oder den Purkinje-Fasern des Herzens zur Zystenbildung kommen. Beispiele dafür sind *Sarcocystis suicanis* beim Schwein, *Sarcocystis cruzi* beim Rind und *Sarcocystis capracanis* bei der Ziege (Tenter 1995). Die eingedrungenen Merozoiten werden von einer membranartigen, osmiophilen Schicht, der sogenannten Primärhülle umgeben (Mehlhorn und Scholtyseck 1973). Innerhalb dieser Primärhülle differenzieren sich die eingedrungenen Merozoiten zu einer abgerundeten Mutterzelle, dem Metrozyten. Durch mehrere Endodyogenien (innere Zweiteilung) entsteht aus primären Metrozyten eine Vielzahl von Zystozoiten (auch Zystenmerozoiten oder Bradyzoiten genannt), die je nach Spezies eine bananen- oder lanzettförmige Gestalt aufweisen (Mehlhorn und Scholtyseck 1973; Scholtyseck 1973; Scholtyseck et al. 1973). Diese Zystozoiten weisen die für die Kokzidien typischen Rhoptrien auf (Dubey und Lindsay 2006). Reife Gewebszysten stellen sich als schlauchförmige Zysten dar, die eine große Zahl der für den Endwirt infektiösen Zystozoiten enthalten.

Der Endwirt infiziert sich durch die Aufnahme von Sarkozysten-haltigem Fleisch. Nach oraler Aufnahme werden im Dünndarm die Zystozoiten freigesetzt. Diese dringen in das Darmepithel ein und differenzieren sich intrazellulär zu sogenannten Mikrogamonten und Makrogamonten, welche von einer parasitophoren Vakuole umschlossen sind (Mehlhorn und Heydorn 1979). Aus dem Mikrogamont entstehen zahlreiche, begeißelte Mikrogameten, welche nach ihrer Reifung freigesetzt werden. Der Makrogamont hingegen entwickelt sich weiter zu einem Makrogamet. Aus der Befruchtung (Syngamie) des Makrogameten mit einem Mikrogamet geht eine unsporulierte Oozyste hervor (Tenter 1995). Nach dieser geschlechtlichen Vermehrung (Gamogonie) folgt die Sporogonie. Im Gegensatz zu anderen Kokzidien-Gattungen (zum Beispiel *Toxoplasma* und *Eimeria*) vollzieht sich diese ungeschlechtliche Vermehrung bei den Sarkosporidien intrazellulär (Rommel 1978). Die Oozyste sporuliert innerhalb der Primärhülle zu zwei Sporozysten mit je vier darin enthaltenen Sporozoiten (Levine 1986). Die infektiösen, sporulierten Oozysten werden nur allmählich über einen Zeitraum von mehreren Wochen in das Darmlumen abgegeben (Rommel 1978). Häufig reißt die Oozystenhülle bereits innerhalb des Verdauungstraktes, so dass letztendlich neben den Oozysten auch bereits freigesetzte Sporozysten mit dem Kot vom Endwirt ausgeschieden werden (Rommel 1985).

### 2.1.2 *Sarcocystis calchasi*

Im Jahr 2009 wurde zum ersten Mal von einer neuartigen Sarkosporidiose bei der Brieftaube mit zentralnervöser Symptomatik berichtet (Olias et al. 2009b). Die betroffenen Tiere stammten aus drei miteinander nicht in Kontakt stehenden Beständen im Raum Berlin und zeigten massive zentralnervöse Symptome, wie Lähmungen, Tortikollis und Opisthotonus. Weitere Tiere zeigten Apathie, Ataxie und Diarrhoe. Differentialdiagnostisch wurden das *Paramyxovirus-1*, sowie *Salmonella* Typhimurium var. cop. als mögliche Krankheitsursache durch bakteriologische und mikrobiologische Untersuchungsmethoden ausgeschlossen (Olias et al. 2009b). Diese neue Sarkozysten-Spezies erhielt den Namen *Sarcocystis calchasi* (Olias et al. 2009a).

Der Erreger *S. calchasi* durchläuft wie alle Sarkosporidien einen zweiwirtigen Entwicklungszyklus. Dabei stellt der Europäische Habicht (*Accipiter g. gentilis*) den Endwirt und die Haustaube (*Columba livia* f. *domestica*) den Zwischenwirt dar (Olias 2010). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass *S. calchasi* auch durch den Europäischen Sperber (*Accipiter n. nisus*) übertragen werden kann (Olias et al. 2011). Weitere End- und Zwischenwirte sind bisher nicht bekannt, können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Der Habicht infiziert sich durch die orale Aufnahme von Sarkozysten-haltigem Fleisch. Nach einer kurzen Präpatenz von 5 Tagen beginnt am 6. Tag nach Infektion die Ausscheidung der für die Taube infektiösen Sporozysten (Olias et al. 2009a). Diese sind oval und im Durchschnitt  $7,9 \times 11,9 \mu\text{m}$  groß (Olias et al. 2009a). Der Habicht zeigt in der akuten Phase der Oozystenausscheidung eine milde Diarrhoe bei unvermindertem Appetit und ohne weitere klinische Symptome (P. Olias, persönliche Kommunikation). Die Haustaube infiziert sich durch die orale Aufnahme der Sporozysten. In der Taube durchläuft der Erreger eine zweiphasige Entwicklung, welche sich im klinischen Krankheitsverlauf widerspiegelt. Während der ersten Krankheitsphase (6. bis 12. Tag p.i.), die mit Apathie und Polyurie einhergeht, vollzieht der Erreger mindestens eine Phase der Schizogonie maßgeblich in der Leber und Milz, aber auch in den Endothelien oder in der Nähe von Blutgefäßen von Lunge, Knochenmark und dem Bindegewebe von Oesophagus und Kropf (Olias et al. 2009b). Bislang konnten bei nur einem einzelnen natürlich infizierten Tier wenige Schizonten ohne Beteiligung einer Entzündungszellinfiltration im Neuropil des Cerebrum nachgewiesen werden (Olias et al. 2009b).

Histopathologisch zeigen die Tiere eine hochgradige lymphohistiozytäre und nekrotisierende Hepatitis und Splenitis. Einige Tiere zeigen auch in weiteren Organen wie Lunge, Niere und Knochenmark entzündliche Läsionen und Nekrosen (Olias 2010; Olias et al. 2009a; P. Olias, persönliche Kommunikation). Bei hoher Infektionsdosis versterben die Tiere noch während der ersten Phase der Erkrankung. Tiere, die diese Phase überleben, bleiben lange Zeit symptomlos. Erst sieben bis acht Wochen später (51. bis 65. Tag p.i.) beginnt die zweite

Phase der klinischen Erkrankung. Die Tiere zeigen zum Teil massive neurologische Störungen einschließlich Tortikollis, Opisthotonus, Tremor und Lähmungserscheinungen. Histopathologische Untersuchungen des Gehirns zeigen eine massive, nekrotisierende und granulomatöse Meningoenzephalitis mit Enzephalomalazie jedoch ohne nachweisbare, intraläsionale Parasitenstadien im Gehirn im HE-gefärbten histologischen Schnittpräparat. Dem gegenüber stehen die Befunde in der Skelettmuskulatur. Trotz eines massiven Sarkozystenbefalls dort tritt nur partiell eine lymphohistiozytäre und gelegentlich eosinophile Myositis und Rhabdomyolyse auf. Nur bei wenigen Tieren fand sich auch eine massive Destruktion von Muskelfasern mit hochgradiger Entzündungszellinfiltration (Olias 2010; Olias et al. 2010).

Die Größe der schlanken, spindelförmigen Sarkozysten beträgt etwa  $2 \text{ mm} \times 20 - 50 \text{ }\mu\text{m}$ . Die Gewebszysten sind umgeben von einer Primärhülle. Darunter befindet sich eine elektronendichte Grundsubstanz. Von dieser ausgehend ziehen Septen ins Innere der Sarkozyste und unterteilen sie so in mehrere Kammern. In ihrem Innern befinden sich  $7,4 \times 7,1 \text{ }\mu\text{m}$  große Metrozyten beziehungsweise  $7,5 \times 1,5 \text{ }\mu\text{m}$  große lanzettförmige Zystozoen (Olias et al. 2009a; Olias et al. 2009b). Im Myokard finden sich nur wenige Sarkozysten und es liegt keine bzw. nur eine minimale lymphohistiozytäre Myokarditis vor. Bei wenigen Tieren tritt eine geringgradige lymphohistiozytäre interstitielle Nephritis und geringgradige eosinophile und lymphohistiozytäre Glomerulonephritis, sowie eine chronische folliculäre Hyperplasie der Milz auf (Olias et al. 2009b).

## **2.2 Zentralnervöse Erkrankungen durch *Sarcocystis* spp. und nah verwandte Parasiten aus dem Stamm der Apicomplexa**

### **2.2.1 Sarkosporidien mit Pathologie des ZNS bei Säugetieren**

Die vermutlich bekannteste, für ZNS-Erkrankungen verantwortliche Sarkosporidien-Spezies ist *Sarcocystis neurona*. *S. neurona* durchläuft wie alle Sarkosporidien einen zweiwirtigen Entwicklungszyklus in dem das Opossum (*Didelphis virginiana* und *D. albiventris*) den Hauptwirt darstellt. Für *S. neurona* wurden verschiedene Zwischenwirte identifiziert, darunter Braunkopf-Kuhstärlinge (*Molothrus ater*; Mansfield et al. 2008), Streifenskunne (*Mephitis mephitis*; Cheadle et al. 2001b), Waschbären (*Procyon lotor*; Dubey et al. 2001d), Neunbinden-Gürteltiere (*Dasypus novemcinctus*; Cheadle et al. 2001a; Tanhauser et al. 2001), Hauskatzen (*Felis domesticus*; Dubey et al. 2000b) und Seeotter (*Enhydra lutris*; Dubey et al. 2001c). Diese Zwischenwirte infizieren sich wiederum mit den Sporozysten die vom Opossum mit dem Kot ausgeschiedenen wurden. Nach mehreren Schizogoniezyklen mit Ausbildung von Schizonten in viszerale Organen und dem ZNS, kommt es zur Ausbildung von Gewebszysten in der Muskulatur (Dubey et al. 2000b; Speer und Dubey 2001). Normalerweise infiziert *S. neurona* seinen Zwischenwirt, ohne klinische Symptome hervorzurufen (Sellon und Dubey 2007). Dennoch wurde bei einer Reihe von Säugetieren von

dem Auftreten einer Erreger-assoziierten Enzephalomyelitis berichtet (Bisby et al. 2010; Dubey et al. 2006; Dubey und Thomas 2011; Forest et al. 2000; Hamir und Dubey 2001). Besondere Bedeutung kommt *S. neurona* als Erreger der Equinen Protozoären Myeloencephalitis (engl. *equine protozoal myeloencephalitis*, EPM) des Pferdes zu. Dabei handelt es sich um eine fokale bis multifokale asymmetrische nicht-eitrige Entzündung der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks und des Hirnstamms. Assoziiert sind die Läsionen mit dem Auftreten von intraläsionalen Schizonten und Merozoiten, jedoch keinen Gewebezysten (Dubey et al. 1991a; Dubey et al. 2001b; Sellon und Dubey 2007). Lange Zeit ging man davon aus, dass das Pferd einen Fehlwirt für den Parasiten darstellt, da nur asexuelle Parasitenstadien (Schizonten, Merozoiten) im Pferd gefunden werden konnten. Erst 2005 gelang Mullanay und Mitarbeitern in einem vier Monate alten an EPM erkrankten Shire-Fohlen der Nachweis von Sarkozysten in Zunge und Skelettmuskulatur (Mullaney et al. 2005). Das lässt vermuten, dass auch das Pferd als Zwischenwirt fungieren kann. Bisher konnte jedoch noch niemand erfolgreich alle Koch'schen Postulate durch die Isolierung des Erregers von einem experimentell infizierten Pferd und darauffolgende Reproduktion der Erkrankung in einem anderen Pferd erfüllen (Sellon und Dubey 2007).

*Sarcocystis canis* ist ein weiterer Vertreter der Sarkosporidien, der in der Lage ist eine Enzephalitis bei einem seiner Wirte, dem Hund, auszulösen. Infektionen wurden in den USA und in Spanien nachgewiesen (Dubey et al. 2003). Insgesamt ist über diesen Parasiten jedoch sehr wenig bekannt (Dubey und Speer 1991). Sicher ist, dass er beim Hund eine schwere Allgemeinerkrankung mit Hepatitis und Meningoenzephalitis verursachen kann (Dubey und Speer 1991; Eckert et al. 2005). Schizonten und Merozoiten des Erregers wurden in der Regel innerhalb der ZNS-Läsionen (Dubey und Slife 1990; Trasti et al. 1999), bei einigen Tieren vereinzelt auch außerhalb der Läsionen nachgewiesen (Dubey und Slife 1990). Der Erreger konnte beim Hund in neuronalen Zellen, Hepatozyten, Leukozyten, Histozyten und Dermalzellen nachgewiesen werden (Dubey und Speer 1991; Trasti et al. 1999). Eine durch *S. canis* verursachte Hepatitis wurde bei Hunden, Bären (Grizzly und Schwarzbär), Chinchillas, Pferden und marinen Säugern beschrieben (Dubey et al. 2003; Rakich et al. 1992; Reman et al. 1993; Resendes et al. 2002; Yantis et al. 2003). Kongenitale Infektionen wurden beim Hund beschrieben (Dubey und Speer 1991).

### 2.2.2 Sarkosporidien mit Pathologie des ZNS bei Vögeln

Über Sarkosporidien-assoziierte Enzephalitiden wurde bereits bei einigen Vogelspezies berichtet. Unter anderem finden sich Berichte zum Huhn (*Gallus gallus*), Truthuhn (*Meleagris gallopavo*), Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*), Steinadler (*Aquila chrysaetos*), Weißkopfseeadler (*Haliaeetus leucocephalus*), Amerikanischen Habicht (*Accipiter gentilis atricapillus*) und Stachelibis (*Threskiornis spinicollis*). In keinem dieser

Fallberichte wurde jedoch die Sarkozysten-Spezies näher charakterisiert (Aguilar et al. 1991; Dubey et al. 1991b; Dubey et al. 2000a; Jacobson et al. 1984; Mutalib et al. 1995; Olson et al. 2007; Spalding et al. 2002; Teglas et al. 1998). Zu erwähnen ist jedoch, dass sich die nachgewiesenen Parasitenstrukturen im Gehirn stets intraläsional befanden - im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Infektionen mit *S. calchasi*.

Einer der wenigen klassifizierten Erreger, der nachgewiesenermaßen eine Enzephalitis bei Vögeln verursachen kann ist *Sarcocystis falcatula*, der eine große Anzahl an aviären Zwischenwirten aufweist. Dazu zählen Psittaciformes, Passeriformes und Columbiformes. Anseriformes and Galliformes scheinen hingegen resistent zu sein (Box und Smith 1982). Als Hauptwirt wurde das Virginia-Opossum (*Didelphis virginiana*) identifiziert (Box et al. 1984). Charakteristisch für diesen Erreger ist die Ausbildung einer massiven interstitiellen Pneumonie insbesondere bei Psittaziden (Smith et al. 1990). Eine durch den Erreger verursachte Enzephalitis wurde bisher jedoch selten beschrieben, unter anderem bei Steinadlern, Weißkopfseeadlern und dem Virginia-Uhu (*Bubo virginianus*; Wünschmann et al. 2010; Wünschmann et al. 2009). Auch hier befanden sich die nachgewiesenen Schizonten intraläsional im Gehirn. Bei einem Steinadler (*Aquila chrysaetos*) und einem Weißkopfseeadler (*Haliaeetus leucocephalus*) wurden sowohl intraläsionale Schizonten als auch Sarkozysten im Gehirn, assoziiert mit einer lymphohistiozytären Enzephalitis, nachgewiesen. Daneben wiesen sie eine große Anzahl von Sarkozysten in der Skelett- und Herzmuskulatur auf (Wünschmann et al. 2010). Wünschmann berichtete zudem von zwei weiteren Weißkopfseeadlern, bei denen intravasale Schizonten und Merozoiten von *S. falcatula* hauptsächlich in der Lunge lokalisiert waren (Wünschmann et al. 2010). Tauben entwickelten nach experimenteller Infektion mit *S. falcatula* zwar eine typische Schizonten-assoziierte interstitielle Pneumonie und in der Muskulatur konnten zahlreiche Gewebezysten festgestellt werden, im Gehirn wurden jedoch keine signifikanten Läsionen oder Parasiten nachgewiesen (Smith et al. 1990).

### **2.2.3 *Toxoplasma* und *Neospora* assoziierte Pathologie des ZNS**

*Toxoplasma* und *Neospora* gehören wie *Sarcocystis* zum Stamm der Apicomplexa. Erreger der zoonotischen Toxoplasmose ist der Protozoon *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* durchläuft eine fakultativ heteroxene Entwicklung. Als Zwischenwirt fungiert dabei ein breites Spektrum von Säugetieren und Vogelarten. Katzen und seltener andere Feliden stellen den natürlichen Endwirt da. Im Dünndarm der Katze durchläuft der Erreger eine geschlechtliche Vermehrung (Gamogonie) mit Bildung von unsporulierten Oozysten, die durch den Kot in die Umwelt gelangen und hier sporulieren. Der Zwischenwirt infiziert sich durch die orale Aufnahme von zystenhaltigem Gewebe oder sporulierten Oozysten (Eckert et al. 2005). Gewebezysten treten vor allem in Herz-, Zwerchfell- und Skelettmuskulatur sowie im Gehirn und ZNS auf (Eckert et al. 2005; Miller et al. 2009). Diese Zysten entsprechen den Dauerstadien einer Infektion

und enthalten mehrere Tausend Bradyzoiten. Sie können ein Leben lang im Zwischenwirt überdauern, meist ohne klinische Symptome hervorzurufen (Eckert et al. 2005).

Bei immunkompetenten Wirten entsteht dabei ein Gleichgewicht zwischen der Immunantwort des Wirts, welche versucht den Parasiten zu eliminieren, und den Immunevasionsstrategien oder Immunmodulationen von *T. gondii*, welche letztendlich ein Überleben sowohl des Parasiten als auch des Wirts ermöglichen (Miller et al. 2009). So induziert *T. gondii* nach Infektion einerseits eine für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger essentielle  $T_H1$ -Immunantwort, insbesondere gekennzeichnet durch eine vermehrte Sekretion von IFN- $\gamma$  und Interleukin (IL-) 12 (Aliberti und Bafica 2005; Liu et al. 2006; Reis e Sousa et al. 1997). Gleichzeitig hat er verschiedene Immunevasionsstrategien entwickelt, um der Immunabwehr des Wirts zu entgehen und fördert die Synthese antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ , die eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern (siehe auch Kapitel 2.3.4, S. 30). Bereits kleinste Verschiebungen dieses Gleichgewichts haben dramatische Folgen. So führt der Verlust oder die Herabsetzung einer funktionierenden Immunantwort zu einer unkontrollierten Parasitenreplikation und, wenn nicht rechtzeitig behandelt, zum Tod des Wirts aufgrund der Ausbildung einer Toxoplasma-assoziierten Enzephalitis (Miller et al. 2009; Sarciron und Gherardi 2000).

Bei den meisten Vogelspezies verläuft die Toxoplasmose subklinisch. So konnten im Gehirn von Kanarienvögeln Zysten von *T. gondii* nachgewiesen werden ohne Hinweis auf entzündliche oder degenerative Veränderungen im Gewebe (Lindsay et al. 1995). Insbesondere bei Tauben und Kanarienvögeln kommt es jedoch häufig zu schweren klinischen Verläufen einhergehend mit Anorexie, Abmagerung, Schwäche, Diarrhoe, Dyspnoe, Konjunktivitis und neurologischen Symptomen (Dubey 2002; Gibbens et al. 1997; Williams et al. 2001).

Ein weiterer zu den Apicomplexa zählender Parasit ist *Neospora*, der Erreger der Neosporose bei Rind, Hund, Pferd, Vogel und anderen Tierarten. In der Gattung *Neospora* sind zwei Arten bekannt, *Neospora caninum* und *Neospora hughesi*. *N. caninum* wurde 1988 zum ersten Mal isoliert und beschrieben (Dubey et al. 1988a; Dubey et al. 1988b). Er ist in erster Linie der Verursacher von Aborten beim Rind und neuromuskulären Erkrankungen bei jungen Hunden. In den letzten Jahren konnten auch Vögel als Zwischenwirte identifiziert werden, darunter das Huhn (*Gallus domesticus*; Costa et al. 2008; Martins et al. 2011), der Haussperling (*Passer domesticus*; Gondim et al. 2010), die Elster (*Pica pica*), der Mäusebussard (*Buteo buteo*; Darwich et al. 2012) und der Kolkrabe (*Corvus corax*; Molina-López et al. 2012). Alle Vögel zeigten sich klinisch unauffällig bei positivem Antikörpernachweis. Die Haustaube stellte sich in Infektionsversuchen mit Tachyzoiten von *N. caninum* ebenfalls als empfänglich für den Parasiten dar (McGuire et al. 1999; Mineo et al.

2009). Eine natürliche Infektion konnte bei Tauben bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Für die Kontrolle einer *N. caninum*-Infektion spielen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort eine Rolle. So sind für die Elimination der Parasiten zu Beginn der Infektion eine hohe Antikörperproduktion von IgG1 erforderlich (Nishikawa et al. 2000). Mit Hilfe von Infektionsversuchen an Mäusen konnte festgestellt werden, dass *N. caninum* nach Infektion eine T-Zell-vermittelte Immunantwort induziert, wobei insbesondere vermehrt IL-12 und IFN- $\gamma$  synthetisiert werden (Khan et al. 1997). IFN- $\gamma$ -knock-out-Mäuse entwickeln 2 Wochen nach Infektion eine akute und letale Neosporose und auch IL-12-knock-out-Mäuse zeigten eine hohe Empfänglichkeit für eine akute Neosporose (Hemphill et al. 2006). Die T<sub>H</sub>1-Immunantwort scheint wie bei *T. gondii* eine protektive Rolle zu spielen. Bei Infektionen mit *T. gondii* wird hingegen durch die Förderung der IL-10- und TGF- $\beta$ -Synthese eine T<sub>H</sub>1-Antwort unterdrückt und damit eine überschießende Entzündungsreaktion verhindert (Khan et al. 1995).

Zentraler Untersuchungsschwerpunkt dieser Dissertation ist der Einfluss des Parasiten *S. calchasi* auf das Immunsystem der Haustaube und deren Modulation sowie Pathologie. Deshalb sollen hier zunächst wichtige Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Immunsystems der Vögel und der Säuger herausgearbeitet werden, wobei ein Schwerpunkt auf die Funktion der Zytokine und Chemokine gelegt werden soll.

## 2.3 Das Immunsystem

Sowohl Säuger als auch Vögel verfügen über ein komplexes immunologisches Abwehrsystem, um sich gegenüber verschiedenen Pathogenen wie Parasiten zu schützen. Um ihr Überleben im, und ihre Verbreitung durch den Wirt zu sichern, mussten intrazelluläre Parasiten wirksame Strategien entwickeln, um sich erfolgreich vor der Immunabwehr des Wirts zu schützen bzw. sie zu umgehen. Während die angeborene Immunabwehr in der Lage ist, sehr schnell auf eindringende mikrobielle Pathogene zu reagieren, benötigt das erworbene Immunsystem einen gewissen Zeitraum bis es sich adaptiert hat. Dafür zeigt es jedoch eine hohe Spezifität für bestimmte Pathogene. Das aviäre Immunsystem ist im Gegensatz zu dem der Säuger bisher noch wenig untersucht. Aufgrund seiner ökonomischen Wichtigkeit, den bereits früh zur Verfügung stehenden Inzuchtlinien und dem bereits seit 2004 vollständig entschlüsselten Genom (Hillier et al. 2004) beruhen die meisten Erkenntnisse über das aviäre Immunsystem auf Untersuchungen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*). Erst seit kurzer Zeit stehen auch die Genome der Pute (*Meleagris gallopavo*; Dalloul et al. 2010; Reed et al. 2007), der Ente (*Anas platyrhynchos*; Beijing Genomics Institute (BGI) und Duck Genome Consortium 2012) und des Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*; Warren et al. 2010) für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung. Das Genom der Taube wurde bisher noch nicht vollständig entschlüsselt.

Aufgrund der weiten phylogenetischen Entfernung zueinander verfügen Vögel und Säuger über ein unterschiedliches Repertoire an immunologischen Organen, Zellen und Molekülen. Zu den anatomischen Besonderheiten des Vogels zählt die für die B-Zell-Reifung essentielle Bursa fabricii, wo die Expansion der B-Zell-Vorläufer sowie die Diversifizierung der B-Zell-Rezeptoren stattfindet, wobei sich die Entwicklung und Funktion des B-Zell-Rezeptors beim Huhn grundlegend von denen anderer Spezies wie Mensch und Maus unterscheidet (Sayegh et al. 2000). Der Thymus stellt analog zum Säuger ein weiteres primäres lymphatisches Organ dar. Vögel besitzen keine Lymphknoten. Sie verfügen allerdings über eine Reihe anderer sekundärer lymphatischer Organe. Dazu zählen die Milz sowie das sogenannte „Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe“ (engl. *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*, MALT), ein System knotenförmiger Ansammlungen von Lymphozyten, welche in dieser Form nur teilweise beim Säuger existieren (Davison et al. 2008; Jeurissen et al. 1989). Im Gegensatz zum Thymus und der Milz findet in den sekundären lymphatischen Organen keine antigen-unabhängige Differenzierung oder Lymphozyten-Proliferation statt (Davison et al. 2008).

Vögel besitzen keine neutrophilen Granulozyten und weniger Mastzellen als Säuger (Davison et al. 2008). Das aviäre Äquivalent zu den neutrophilen Granulozyten des Säugers sind die polymorphkernigen heterophilen Granulozyten (Caxton-Martins und Daimon 1976; Penniall und Spitznagel 1975). Unterschiede zum Säuger bestehen auch im Repertoire der Zytokine, Chemokine, Toll-like-Rezeptoren (TLRs), Defensine, Antikörper und anderen immunologischen Molekülen (Kaiser 2010).

Trotz der Unterschiede zwischen Vogel und Säuger ist das Grundprinzip der Immunantwort sehr ähnlich. Wie beim Säuger unterscheidet man beim Vogel die angeborene von der erworbenen Immunantwort.

### **2.3.1 Das angeborene Immunsystem des Vogels**

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers gegenüber Krankheitserregern dar. Hauptbestandteile des aviären angeborenen Immunsystems sind Natürliche Killer- (NK-) Zellen, heterophile Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen, wobei insbesondere heterophile Granulozyten eine erste Barriere gegenüber eindringenden Pathogenen darstellen (Andreasen et al. 1991; Kaiser 2010). Werden diese durch Antigenkontakt stimuliert, wandern sie vermehrt zum Ort der Infektion (Harmon 1998) und produzieren nach Aktivierung eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen z.B. IL-1, IL-6 und IL-8 (Kogut et al. 2005; Kogut et al. 2006).

Eine der wichtigsten Aufgaben des angeborenen Immunsystems ist die sofortige und angepasste Reaktion auf eingedrungene Mikroorganismen. Dazu gehört auch die sichere Unterscheidung zwischen infektiösem körperfremdem Material und körpereigenem, nichtinfektiösem Gewebe. Diese Unterscheidung wird durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR) ermöglicht (Kaiser

2010), wozu auch die TLR (*Toll-like* Rezeptoren) gehören, die der Erkennung intrazellulärer Pathogene dienen (Miller et al. 2009). Sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cells*, APC), wozu auch die Dendritischen Zellen gehören, präsentieren das von ihnen erkannte und phagozytierte Antigen anschließend auf ihren MHC-Molekülen den T-Lymphozyten der spezifischen Immunabwehr. Die MHC-Moleküle gehören zu einem weiteren wesentlichen Bestandteil des angeborenen Immunsystems, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC; Lamont 1998). Der MHC-Komplex des Huhns ist kompakter und wesentlich kleiner als der des Säugers und weist eine geringere Variabilität der MHC-Moleküle auf (Kaspers und Goebel 2000; Kaufman et al. 1999). Es setzt sich aus 3 Subregionen zusammen. Der F-Locus kodiert für Moleküle homolog zum Säuger MHC-Klasse-I, der L-Locus kodiert für Moleküle des MHC-Klasse-II, und der G-Locus kodiert für Moleküle des hühnereigenen, auch sogenannten Klasse-IV-Locus (Hunt und Fulton 1998; Kaufman et al. 1992; Kaufman et al. 1999; Zhou und Lamont 2003; Zoorob et al. 1993). MHC-Klasse-II-Moleküle kommen auf allen Zellen vor die der Antigenpräsentation dienen, darunter Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen. Sie präsentieren den CD4<sup>+</sup>T-Zellen über Phagozytose aufgenommenen Bestandteile extrazellulärer Erreger (Janeway et al. 2001).

Ein weiterer Bestandteil des angeborenen aviären Immunsystem ist das Komplementsystem, ein System verschiedener Plasmaproteine, welches über unspezifische Rezeptoren aktiviert wird und sowohl durch Opsonierung der Pathogene, Membranschädigung, Zytolyse und Chemotaxis, als auch durch die Mobilisierung von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen zur Abwehr beiträgt. (Köhl 2006; Nonaka und Kimura 2006). Es kann wie beim Säuger über 3 verschiedene Wege (klassischer Weg, Lektinweg und Alternativer Weg) aktiviert werden (Fujita et al. 2004; Jensen und Koch 1991; Juul-Madsen et al. 2003; Kjalke et al. 1993; Lynch et al. 2005; Wathen et al. 1987).

### 2.3.2 Das adaptive Immunsystem des Vogels

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Pathogenen aus. Es beruht hauptsächlich auf der Aktivität der T- und B-Lymphozyten (auch als T- und B-Zellen bezeichnet; Houssaint et al. 1991). Deren Differenzierung und Reifung erfolgt beim Vogel im Falle der T-Lymphozyten im Thymus und im Falle der B-Lymphozyten, anders als beim Säuger, in der Bursa fabricii (Masteller et al. 1997; McCormack et al. 1991).

Die T-Lymphozyten sind Bestandteil der zellgebundenen Immunantwort. Nach ihren jeweiligen Oberflächenmolekülen werden sie wie beim Säuger in CD4-positive T-Lymphozyten und CD8-positive T-Lymphozyten eingeteilt (Göbel et al. 2001; Luhtala et al. 1993). Die CD8-positiven T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen) sind in der Lage Antigene die über MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche von APC präsentiert werden zu erkennen

(Kaspers und Goebel 2000; Yun et al. 2000b). Die CD4-positiven T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>T-Zellen) erkennen Fragmente von Antigenen, die in intrazellulären Vesikeln abgebaut wurden und dann über MHC-II-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Kaspers und Goebel 2000; Yun et al. 2000b). Dazu gehören sowohl extrazelluläre Krankheitserreger und Proteine als auch intrazelluläre Bakterien oder Protozoa, die sich in intrazellulären Vesikeln vermehren. CD4<sup>+</sup>T-Zellen wirken funktionell als sogenannte T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen). Ähnlich wie beim Säuger herrschen beim Vogel bei Infektionen mit intrazellulären Erregern T<sub>H</sub>1-assoziierte Zytokine vor, darunter IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-18, während bei einer Infektion mit extrazellulären Pathogenen in der Regel T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine wie IL-4, IL-13 und IL-19 dominieren (Kaiser 2010). Im Gegensatz zum Säuger sind beim Vogel keine T<sub>H</sub>2-assoziierten Immunpathologien bekannt (Degen et al. 2005a).

B-Lymphozyten stellen die Vorläufer der Antikörper-produzierenden Plasmazellen dar, und sind somit die Vermittler der humoralen Immunität. Ihre Reifung und Diversifizierung erfolgt in der Bursa fabricii (Masteller et al. 1997; McCormack et al. 1991). Wie beim Säuger reagieren die reifen B-Zellen auf einen Antigenkontakt mit der Bildung antigenspezifischer IgM-Antikörper (Kaspers und Goebel 2000). Erst nach wiederholter Stimulation findet ein Immunglobulin-Klassenwechsel statt und es werden IgY- (das aviäre Homolog des IgG) oder IgA-Antikörper sezerniert (Kaspers und Goebel 2000). Der Vogel verfügt über ein kleineres Repertoire an humoralen Komponenten der Immunantwort als der Säuger. So fehlen dem Vogel beispielsweise das IgE und Unterklassen von IgY (Davison et al. 2008). Es findet kein IgG-Isotypen-Klassenwechsel wie beim Säuger statt. Dennoch geht man davon aus, dass beim Geflügel ähnliche Prozesse bei der Opsonierung ablaufen (Davison et al. 2008).

### 2.3.3 Ausgewählte Zytokine

Eine Infektion mit *S. calchasi* verursacht bei Tauben einen zweiphasigen Krankheitsverlauf mit Ausbildung einer lymphohistiozytären Meningoenzephalitis in der zweiten Erkrankungsphase. Eine solche Entzündungsreaktion geht für gewöhnlich mit einer proinflammatorischen Immunantwort einher, die durch das Zusammenspiel verschiedener Zytokine und Chemokine vermittelt wird. Vom Huhn ist bekannt, dass bei Infektionen mit intrazellulären Pathogenen die Immunantwort in erster Linie von den T<sub>H</sub>1-assoziierten Zytokinen IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-18 dominiert wird (Kaiser 2010). Daneben spielen noch eine Vielzahl andere Zytokine und Chemokine eine Rolle. Im Folgenden sollen die im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift zur weiteren Untersuchung ausgewählten Zytokine vorgestellt werden.

### 2.3.3.1 Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

Das IFN- $\gamma$ , auch als Immun-Interferon oder Typ II-Interferon bezeichnet, ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Infektionen mit intrazellulären Parasiten und Bakterien sowie Pilzen spielt (Davison et al. 2008; Lertmemongkolchai et al. 2001; Trinchieri 2003). Es ist bekannt, dass IFN- $\gamma$  als Antwort auf eine Vielzahl von Pathogenen im Gehirn des Säugers ausgeschüttet wird und man betrachtet es als essentiellen Bestandteil der Immunantwort auf Infektionen des ZNS (Rottenberg und Kristensson 2002). Erst 2010 wurde das IFN- $\gamma$ -Gen der Taube (piIFN- $\gamma$ ) kloniert und sein rekombinantes Protein *in vitro* exprimiert (Fringuelli et al. 2010). Weitere aviäre Spezies deren IFN- $\gamma$  untersucht wurde sind Huhn (*Gallus gallus*; Digby und Lowenthal 1995; Weining et al. 1996), Pute (*Meleagris gallopavo*; Loa et al. 2001), Ente (*Anas platyrhynchos*; Schultz und Chisari 1999; Schultz et al. 1995), Gans (*Anser anser*; Li et al. 2007), Japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*), Fasan (*Phasianus colchicus*) und Perlhuhn (*Numida meleagris*; Kaiser et al. 1998). Das piIFN- $\gamma$  stimmt zu 84,9 % bzw. 75,8 % mit dem Hühner-IFN- $\gamma$  (chIFN- $\gamma$ ) bezüglich seiner Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz überein (Fringuelli et al. 2010).

IFN- $\gamma$  wird sowohl beim Säuger als auch beim Huhn hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen nach Stimulation durch ein Mitogen oder Antigen synthetisiert und ausgeschüttet (Davison et al. 2008; Lertmemongkolchai et al. 2001; Weber et al. 2003). Anhand von Versuchen an Mäusen konnte festgestellt werden, dass die Induktion der IFN- $\gamma$ -Synthese in T-Lymphozyten jedoch auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen kann. Einerseits kann durch das Binden eines Antigens an den TCR (engl. *T cell receptor*, T-Zell-Rezeptor) die IFN- $\gamma$ -Transkription in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen aktiviert werden. Dies geschieht bei CD4<sup>+</sup>T-Zellen abhängig, und bei CD8<sup>+</sup>T-Zellen unabhängig von STAT (engl. *signal transducer and activator of transcription*) 4. Eine zweite Möglichkeit ist die antigenunabhängige Aktivierung der IFN- $\gamma$ -Synthese mit Hilfe von IL-12 / IL-18, wobei sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>T-Zellen auf eine Aktivierung von STAT4 angewiesen sind (Carter und Murphy 1999). Göbel und Mitarbeiter zeigten 2003 auch beim Huhn, dass IL-18 die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Ausschüttung von CD4<sup>+</sup>T-Zellen stimuliert (Göbel et al. 2003). Während einer akuten Infektion wird IFN- $\gamma$  hauptsächlich von NK- und CD4<sup>+</sup>T-Zellen sezerniert. Bei länger anhaltenden bzw. chronischen Infektionen übernehmen dies vorwiegend CD8<sup>+</sup>T-Zellen (Combe et al. 2006). Daneben sind auch Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten in der Lage das Zytokin zu synthetisieren (Airoidi et al. 2000; Hochrein et al. 2001; Suzue et al. 2003; Trinchieri 2003). IFN- $\gamma$  bindet an einen Rezeptor bestehend aus zwei Ketten, der IFN- $\gamma$ R1-Kette und der IFN- $\gamma$ R2-Kette (Trinchieri 2003). Seine wichtigsten Zielzellen sind B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen (Fringuelli et al. 2010). Die Hauptaufgabe beim Vogel ist die Aktivierung von Makrophagen (Stacheli et al. 2001; Weining et al. 1996). *In vitro*-Versuche zeigten, dass sowohl das piIFN- $\gamma$  als auch das IFN- $\gamma$  des Huhns (chIFN- $\gamma$ ), der Gans (goIFN- $\gamma$ ) und der Pute (tuIFN- $\gamma$ ) in Makrophagen die

Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) induziert (Fringuelli et al. 2010; Lawson et al. 2001; Li et al. 2007; Loa et al. 2001), die wiederum bei Huhn und Pute durch eine Behandlung mit monoklonalen, gegen  $\text{chIFN-}\gamma$  gerichteten Antikörpern (Lawson et al. 2001; Loa et al. 2001) gehemmt wird. Aufgrund der hohen strukturellen Übereinstimmung des  $\text{piIFN-}\gamma$  und des  $\text{chIFN-}\gamma$  sowie der funktionellen Aktivität von  $\text{piIFN-}\gamma$  auf Hühnermakrophagen vermuten Fringuelli und Mitarbeiter eine Kreuzreaktivität des  $\text{IFN-}\gamma$  zwischen Taube und Huhn (Fringuelli et al. 2010). Beim Säuger erhöht  $\text{IFN-}\gamma$  die bakterizide Aktivität von Makrophagen indem es die Verschmelzung von Phagosomen mit Lysosomen fördert und wie beim Vogel die Synthese von NO induziert, welches eine antimikrobielle Wirkung gegenüber intrazellulären Pathogenen besitzt (Hamza et al. 2010; Kodukula et al. 1999; Murray und Nathan 1999; Pertile et al. 1996). Beim Säuger wurde außerdem beschrieben, dass  $\text{IFN-}\gamma$  die Fähigkeit der Makrophagen, Zytokine zu synthetisieren, fördert und die Expression von MHC-Molekülen und Oberflächen-Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der APC sowie die Expression von intrazellulären Enzymen erhöht, wodurch wiederum die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung unterstützt werden (Mantovani und Dejana 1989; Unanue und Allen 1987). Die Hochregulierung der Expression der MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von Makrophagen wurde auch beim Huhn bestätigt (Staeheli et al. 2001; Weining et al. 1996).

$\text{IFN-}\gamma$  ist ein wichtiger Regulator der T-Zell-Immunität. Während der TCR-abhängigen Aktivierung der T-Lymphozyten beim Säuger wird der  $\text{T}_{\text{H}1}$ -spezifische Transkriptionsfaktor T-bet durch  $\text{IFN-}\gamma$  und STAT1 induziert (Lighvani et al. 2001). Dieser kontrolliert wiederum die Expression des  $\text{IFN-}\gamma$  (Szabo et al. 2000) und verstärkt die Expression des IL-12-Rezeptors  $\beta 2$  auf der Zelloberfläche und unterstützt damit die Ausbildung einer  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort (Lighvani et al. 2001; Mullen et al. 2001; Usui et al. 2006). Gleichzeitig unterdrückt  $\text{IFN-}\gamma$  die Expression von GATA-3, dem Hauptregulator der  $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellachse und hemmt somit eine  $\text{T}_{\text{H}2}$ -Antwort (Lighvani et al. 2001; Mullen et al. 2001; Usui et al. 2006). Aufgrund der vielen funktionellen Gemeinsamkeiten des aviären  $\text{IFN-}\gamma$  mit dem des Säugers ist zu vermuten, dass beim Vogel ähnliche, wenn nicht gar gleiche Signalkaskaden ablaufen.

Infektionen mit intrazellulären Pathogenen induzieren beim Vogel typischerweise eine starke T-Zell-Antwort, welche in einer erhöhten  $\text{IFN-}\gamma$ -Synthese resultiert (Kaiser 2010). Bei Infektionen von Hühnern mit Eimerien-Spezies zeigte  $\text{IFN-}\gamma$  eine protektive Wirkung gegenüber dem Parasiten indem es die Invasion der Sporozoiten als auch deren Entwicklung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hemmte (Davison et al. 2008; Lillehoj und Choi 1998; Yun et al. 2000a). Eine bedeutende Rolle spielt  $\text{IFN-}\gamma$  außerdem bei der Kontrolle von *S. neurona*-Infektionen. So entwickeln Mäuse mit ausgeschaltetem  $\text{IFN-}\gamma$ -Gen regelmäßig nach Infektion mit Sporozoiten von *S. neurona* eine neurologische Erkrankung (Cheadle et al. 2002; Sellon und Dubey 2007). Spencer und Mitarbeiter berichteten außerdem von einer herunterregulierten  $\text{IFN-}\gamma$ -Expression bei Pferden mit klinischer EPM (Spencer et al. 2004).

Eine kontinuierliche Synthese von IFN- $\gamma$  ist auch für die Kontrolle einer akuten als auch chronischen *T. gondii*-Infektion notwendig (Aliberti und Bafica 2005; Suzuki et al. 1988; Yap und Sher 1999). Die protektive Wirkung von IFN- $\gamma$  während einer *T. gondii*-Infektion ist assoziiert mit seiner Fähigkeit Makrophagen zu aktivieren und dadurch die Replikation von *T. gondii* zu verhindern (Hunter und Remington 1994; Suzuki et al. 1988). Außerdem induziert es den Stadienwechsel von den sich schnell replizierenden Tachyzoiten zu den sich nur langsam replizierenden und Zysten-bildenden Bradyzoiten (Bohne et al. 1993) und unterdrückt während der chronischen Phase die Reaktivierung der Gewebszysten (Jones et al. 1986). Eine Neutralisierung von IFN- $\gamma$  in TE- (*Toxoplasma*-Enzephalitis-) empfänglichen Mäusen mit chronischer *T. gondii*-Infektion (Stamm ME49) erhöht den Schweregrad der Enzephalitis (Hunter und Remington 1994). Daneben aktiviert IFN- $\gamma$  die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), die den Abbau der für den Parasiten essentiellen Aminosäure Tryptophan bewirkt, wodurch das Wachstum des Parasiten gehemmt wird (Däubener et al. 1996; Miller et al. 2009). Bei einer *Neospora caninum*-Infektion unterstützt IFN- $\gamma$  die Ausbildung einer protektiven Immunantwort, indem es unter anderem peritoneale Makrophagen aktiviert (Nishikawa et al. 2001; Spencer et al. 2004). Weitere parasitische Erreger, gegenüber denen IFN- $\gamma$  eine protektive Rolle hat sind *Plasmodium chabaudi* (Su und Stevenson 2000) und *Brugia malayi* (Babu et al. 2000).

Einige protozoäre Parasiten sind in der Lage, die antiparasitäre Wirkung von IFN- $\gamma$  zu umgehen, indem sie in dessen nachgeschaltete Signalwege eingreifen. So unterdrücken beispielsweise sowohl Leishmanien als auch Toxoplasmen die IFN- $\gamma$ -abhängige Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase in Makrophagen, wodurch die Bildung des mikrobiziden NO gehemmt wird (Eckert et al. 2005; Lüder et al. 2003a). Andererseits kann auch die IFN- $\gamma$ -Synthese in Makrophagen und NK-Zellen selbst unterdrückt werden, z.B. durch die geförderte Expression von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ 2 im Falle von *T. gondii* (Hunter et al. 1995; Lang et al. 2007; Langermans et al. 2001).

*Trypanosoma brucei*, ein extrazellulärer Parasit und der Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, scheint hingegen von einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Synthese zu profitieren. Der Erreger sezerniert einen Faktor, TLTF (engl. *T-lymphocyte triggering factor*), der CD8<sup>+</sup>T-Zellen stimuliert IFN- $\gamma$  zu synthetisieren (Vaidya et al. 1997). Die T<sub>H</sub>1-Antwort wird dadurch gefördert während die T<sub>H</sub>2-Antwort unterdrückt wird. Interessanterweise korreliert die Höhe des IFN- $\gamma$ -Spiegels dabei mit dem Schweregrad der Schlafstörung (Rottenberg und Kristensson 2002).

### 2.3.3.2 Interleukin 18 (IL-18)

IL-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches der Interleukin-1 Familie zuzuordnen ist. Ursprünglich war es unter der Bezeichnung Interferon-induzierender Faktor (engl. *IFN-gamma inducing factor*, IGIF) bekannt aufgrund seiner Eigenschaft die IFN- $\gamma$ -Produktion

durch T-Zellen zu induzieren. Das aviäre Homolog für das Säuger-IL-18 wurde erstmals im Jahr 2000 für das Huhn isoliert und charakterisiert (Schneider et al. 2000). Das IL-18 des Huhns (chIL-18) besitzt etwa 30 % Übereinstimmung mit den IL-18-Vorläuferpeptiden verschiedener Säugetiere (Schneider et al. 2000). 2002 wurde die cDNA von Puten-IL-18 (tuIL-18) isoliert, dessen Aminosäuremuster zu 97,4 % mit denen des Huhns übereinstimmt (Kaiser 2002).

IL-18 wird beim Säuger sowohl von Antigen-präsentierenden Zellen (insbesondere Makrophagen und Dendritischen Zellen, Kupferzellen, Langerhans-Zellen), myelomonozytischen Zelllinien und B-Lymphozyten, als auch von nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Osteoblasten, Chondrozyten, Astrozyten, Keratinozyten, Mikrogliazellen und intestinalen Epithelzellen ausgeschüttet (Biet et al. 2002; Conti et al. 1997; Conti et al. 1999; Nakanishi et al. 2001a; Okamura et al. 1995a; Okamura et al. 1995b; Seki et al. 2001; Stoll et al. 1998; Udagawa et al. 1997). Es moduliert wiederum die Aktivität von  $T_H1$ -Zellen, zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen (Biet et al. 2002; Gracie et al. 2003).

Die biologischen Funktionen von IL-18 sind sehr vielfältig. Seine Hauptfunktion besteht in der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung durch NK-Zellen,  $CD8^+$ T-Zellen und  $CD4^+$ T-Zellen vom  $T_H1$ -Typ (Okamura et al. 1998; Okamura et al. 1995a; Okamura et al. 1995b). Auch für das chIL-18 konnte die Induktion von  $CD4^+$ T-Zellen und die damit verbundene IFN- $\gamma$ -Ausschüttung beobachtet werden (Göbel et al. 2003). Schneider und Mitarbeiter berichteten zudem, dass rekombinantes chIL-18 in der Lage ist in Hühner-Milzzellen die Expression von IFN- $\gamma$  zu induzieren (Schneider et al. 2000). Rekombinantes duIL-18 wiederum fördert die Proliferation von Enten-Splenozyten, welche zuvor mit Concanavalin A stimuliert wurden und induziert die Sekretion von IFN- $\gamma$  in der Hühner-B-Zelllinie B19-2D8 (Chen et al. 2008; Davison et al. 2008). Grundsätzlich muss für die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen eine Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors stattfinden. Vom Säuger weiß man, dass IL-18 in Kombination mit dem Zytokin IL-12 jedoch in der Lage ist, eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige IFN- $\gamma$  Sekretion zu bewirken (Okamura et al. 1998; Yoshimoto et al. 1998). Dabei bewirkt IL-12 die gesteigerte Expression des IL-18R auf T- und B-Zellen (Yoshimoto et al. 1998). Umgekehrt verstärkt IL-18 die Expression der IL-12-Rezeptorkette  $\beta_2$  auf T-Zellen (Xu et al. 1998). Beide Interleukine für sich alleine sind hingegen nur schwache Induktoren von IFN- $\gamma$  (Nakanishi et al. 2001b). Neben IFN- $\gamma$  kann IL-18 in verschiedenen Zelllinien die Produktion anderer proinflammatorischer Mediatoren hervorrufen, wie etwa Tumornekrosefaktor- (TNF-)  $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 (Netea et al. 2000). Je nach Zytokin-Milieu unterstützt IL-18 eine  $T_H1$ - bzw. eine  $T_H2$ -Immunantwort (Nakanishi et al. 2001b). Zusammen mit IL-12 fördert es die Differenzierung der naiven T-Zellen zu  $T_H1$ -T-Zellen. Bei Anwesenheit von IL-12 und IL-2 begünstigt IL-18 jedoch die Differenzierung von

T<sub>H</sub>0-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen. Ausschlaggebend dafür ist vermutlich die Freisetzung von IL-4 (Nakanishi et al. 2001b). Eine wichtige Rolle in der Regulation von IL-18 spielt das IL-18-bindende Protein (IL-18BP). Indem es mit IL-18 eine hochaffine Bindung eingeht, werden dessen biologische Funktionen inhibiert und in Folge dessen unter anderem die Produktion von IFN- $\gamma$  supprimiert (Novick et al. 1999).

IL-18 spielt sowohl in der Abwehr intrazellulärer als auch extrazellulärer Erreger eine Rolle. So zeigt es eine protektive Wirkung bei Infektionen mit Protozoen, wie *Trypanosoma cruzi* (Müller et al. 2001), *Leishmania major* (Monteforte et al. 2000) und *T. gondii* (Cai et al. 2000). Außerdem scheint IL-18 die Migration von Langerhans-Zellen als Antwort auf extrazelluläre Parasiten wie *Brugia malayi* zu induzieren (Semnani et al. 2004). Als Immunoadjuvans in Kombination mit der jeweiligen Vakzine eingesetzt, fördert IL-18 außerdem die Ausbildung einer protektiven Immunantwort gegen verschiedene Schistosoma-Spezies wie *Schistosoma japonicum* (Wei et al. 2009) oder *S. mansoni* (Dupré et al. 2001).

### 2.3.3.3 Interleukin 12 (IL-12)

IL-12, früher bekannt als NK-Zell aktivierender Faktor (NKSF) oder T-Zell Differenzierungsfaktor (TCDF), ist ein durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, bestehend aus zwei Untereinheiten von etwa 35 kDa (bekannt als p35 oder IL-12 $\alpha$ ) und 40 kDa (bekannt als p40 oder IL-12 $\beta$ ; Kobayashi et al. 1989). Das Hühner-IL-12p40 (chIL-12p40) wurde erstmals 2003 in einer EST-Datenbank identifiziert und vollständig kloniert. Die genomische Sequenz kodiert für ein 315 Aminosäuren langes Vorläufer-Protein. Es weist mit dem humanen (huIL-12) und dem murinen (muIL-12) p40 eine Identität von 46 % beziehungsweise 41 % auf. Das IL-12p40 wurde neben dem Huhn bereits für zwei weitere Vogelspezies, den Zebrafinken und die Pute, sequenziert.

IL-12 ist ein immunregulatorisches Zytokin, welches die angeborene mit der erworbenen Immunantwort verbindet (Chehimi und Trinchieri 1994; Trinchieri 1995). Wird IL-12 bereits zu Beginn einer Infektion oder Entzündung ausgeschüttet, unterstützt es die antigen-spezifische Immunantwort indem es die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen fördert und damit die zelluläre Immunantwort unterstützt, während gleichzeitig die Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen inhibiert wird, welche Teil der klassischen humoralen Immunantwort sind (Agnello et al. 2003; Hsieh et al. 1993; Trinchieri 1993). Die T<sub>H</sub>1-Antwort ist von besonderer Bedeutung bei der Reaktion auf die meisten intrazellulären Infektionen mit Bakterien, Parasiten, Pilzen oder Viren. Den Gegenspieler des IL-12 stellt in diesem Zusammenhang das IL-4 dar, welches die T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt (Trinchieri 1993). IL-12 besitzt zudem proinflammatorische Eigenschaften, welche insbesondere von IFN- $\gamma$  vermittelt werden, dessen Synthese von IL-12 induziert wird. Neben IFN- $\gamma$  werden noch weitere proinflammatorische Zytokine wie etwa GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulatory factor*) und TNF- $\alpha$  unter dem Einfluss von IL-12 durch T- und NK-Zellen

vermehrt produziert. Dies führt wiederum zu einer erhöhten phagozytischen und bakteriziden Aktivität der Phagozyten und erhöht ihre Fähigkeit IL-12 selbst und andere Zytokine auszuschütten. IL-12 besitzt zudem eine Bedeutung für die optimale Differenzierung der zytotoxischen T-Lymphozyten und LAK-Zellen (Lymphokin-aktivierte Killerzellen) und stellt einen Wachstumsfaktor für aktivierte T- und NK-Zellen dar. Zusätzlich verstärkt es die zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen und NK-Zellen (Balu und Kaiser 2003; Gately et al. 1992; Gubler et al. 1991; Kobayashi et al. 1989; Schoenhaut et al. 1992; Stern et al. 1990; Trinchieri 2003; Wolf et al. 1991). IL-12p40 besitzt eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen und fördert die Migration von stimulierten Dendritischen Zellen (Khader et al. 2006).

Für das Huhn wird diskutiert, ob sich die Regulierung der Expression von IL-12 im Vergleich zum Säuger essentiell unterscheidet. Grund dafür sind Unterschiede in ihren Promoter-Regionen, also den Regionen, welche funktionell wichtige Bausteine für die Expression des Gens beinhalten. Dazu gehören unter anderem die NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle (wird induziert im Anschluss an die TLR-Signalkette) sowie die GA12-Repressorstelle (GATA Sequenz im IL-12-Vorläufermolekül, welche essentiell ist für die IL-4-abhängige Unterdrückung der IL-12p40-Expression), die beide beim Huhn zu fehlen scheinen (Balu und Kaiser 2003). Die Arbeitsgruppe um Balu und Kaiser konnte andererseits die Expression von chIL-12p40 in einer großen Vielzahl von Organen nachweisen, darunter Milz, Lunge, Knochenmark, Tonsillen, Leber, Niere, Bursa fabricii, Gehirn, Herz und Thymus, was sie mutmaßen ließ, dass die Expression des IL-12p40 im Huhn in größerem Umfang erfolgt als es beim Säuger der Fall ist (Balu und Kaiser 2003). Transkripte des chIL12p40 konnten außerdem in diversen Zelllinien nachgewiesen werden, darunter Makrophagen-, B- und T-Zell- und NK-Zelllinien, Darm-Leukozytenlinie und Fibroblastenlinien, sowie in Hühner-Splenozyten (Degen et al. 2004; Dreisbach 2005).

Eine protektive Wirkung wird dem IL-12 bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii* (Cai et al. 2000), *Trypanosoma cruzi* (Abrahamsohn und Coffman 1996) und *Leishmania major* (Sypek et al. 1993) zugeschrieben. Diese intrazellulären Erreger induzieren die Produktion von IL-12 (hauptsächlich in Makrophagen), welches wiederum zusammen mit TNF- $\alpha$  NK-Zellen aktiviert und zur IFN- $\gamma$ -Synthese anregt und letztendlich eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort hervorruft (Gazzinelli et al. 1993). Außerdem fördert IL-12 die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen, welche ebenfalls IFN- $\gamma$  produzieren (Miller et al. 2009). Während einer akuten *T. gondii*-Infektion wird IL-12 von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Dendritischen Zellen sezerniert, wobei Dendritische Zellen die wichtigste Quelle darstellen (Aliberti und Bafica 2005; Liu et al. 2006; Reis e Sousa et al. 1997). Dieses IL-12 fördert die Synthese von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen und später auch T-Zellen. Das so synthetisierte IFN- $\gamma$  aktiviert wiederum in Synergie mit TNF weitere Makrophagen und führt zu der Synthese weiterer inflammatorischer Zytokine sowie NO als Teil der T<sub>H</sub>1-Antwort und spielt damit

eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der intrazellulären *T. gondii*-Infektion. Gleichzeitig werden Makrophagen-vermittelte Mechanismen aktiviert, die die intrazelluläre Replikation beschränken und die Beseitigung des Parasiten fördern (Zhao et al. 2007).

#### 2.3.3.4 Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ )

IL-1 $\beta$  gehört wie IL-18 zu der Interleukin-1 Familie. Es handelt sich um ein pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin. Weining et al. (1998) gelang es erstmals, die für das IL-1 $\beta$  des Huhns (chIL-1 $\beta$ ) codierende cDNA zu klonen. Diese kodiert für ein 267 Aminosäuren (AS) langes Polypeptid (Weining et al. 1998), welches zu 25 % mit seinem humanen Ortholog übereinstimmt (Wigley und Kaiser 2003). Wu et al (2006) klonierten und sequenzierten die IL-1 $\beta$ -kodierenden Gene von Huhn (*Gallus gallus*), Ente (*Anas platyrhynchos*), Gans (*Anser anser*), Pute (*Meleagris gallopavo*) und Taube (*Columba livia*) und verglichen diese miteinander. Während bei den vier erstgenannten Vogelarten die kodierenden Sequenzen jeweils 804 Nukleotide aufwiesen, welche jeweils für ein 268 AS langes Protein codierten, besteht die cDNA der Taube aus 810 Nukleotiden, welche für ein 270 AS langes Protein codierten. Phylogenetische Analysen ergaben, dass die für das IL-1 $\beta$  codierenden Sequenzen der Taube auf einem anderen phylogenetischen Ast anzusiedeln sind, als die des IL-1 $\beta$  von Huhn, Ente, Gans und Pute (Wu et al. 2007).

IL-1 $\beta$  wird von vielen verschiedenen Zelltypen sezerniert, insbesondere von Monozyten und aktivierten Makrophagen (Cheng et al. 2011; De Boever et al. 2010; Weining et al. 1998). Die Transkription von IL-1 $\beta$  erfolgt bereits innerhalb von 15 Minuten nach Bindung des Liganden an die Zielzelle (Tizard 2008). Humphrey und Mitarbeiter berichteten von einer IL-1 $\beta$ -Expression in der Milz und Leber der Ente als Antwort auf eine intravenöse Injektion von *E. coli* (Humphrey et al. 2004). Neben Pathogen-Bestandteilen (häufig Mikroorganismen oder deren Produkte und Bestandteile, wie zum Beispiel bakterielles Lipopolysaccharid (LPS)), sind körpereigene Faktoren, die an der Immunreaktion beteiligt sind, potente Induktoren für IL-1. Dazu gehören Immunkomplexe, Gerinnungs- und Komplementfaktoren, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  selbst (Dinarello 1996). IL-1 $\beta$  aktiviert eine Vielzahl von Zellen, einschließlich Makrophagen und T-Lymphozyten, welche zu der Produktion anderer Zytokine und Chemokine führen (Sick et al. 2000; Wigley und Kaiser 2003).

IL-1 $\beta$  wirkt häufig eng zusammen mit IL-6 und TNF- $\alpha$ . Diese drei Zytokine werden zum Teil von unterschiedlichen, teils von denselben Zelltypen produziert und besitzen ein weites, sich häufig überlappendes Feld von Zielzellen. IL-1 $\beta$  induziert die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6. TNF- $\alpha$  induziert wiederum die Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6. IL-6 agiert als negatives Feedback und hemmt die Expression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Davison et al. 2008). Zu den unterschiedlichen biologischen Effekten von IL-1 $\beta$  gehören die Aktivierung der Akute-Phase-Antwort in der Leber, wobei es synergistisch mit IL-6 die Akute Phase Proteine der Klasse 1 (zum Beispiel C-reaktives Protein und das Serum-Amyloid A) stimuliert, die Auslösung von

Fieber (daher auch der alte Name „*endogenous pyrogen*“) sowie die Aktivierung des Gefäßendotheliums. Weiterhin stimuliert es die T-Zell-Proliferation mittels IL-2-Induktion und es induziert die B-Zell-Reifung und Antikörperproduktion. Auch die Synthese von IL-8 und anderen CXC- und CC-Chemokinen durch Fibroblasten und Makrophagen wird von IL-1 $\beta$  induziert (Mukaida et al. 1990; Sick et al. 2000).

### 2.3.3.5 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin, welches verschiedene Aspekte der Immunantwort reguliert, sowie in der Akuten Phase von Entzündungen und der Hämatopoese eine Rolle spielt. Das Hühner-IL-6 (chIL-6) wurde erstmals von Schneider und Mitarbeitern (2001) identifiziert (Schneider et al. 2001). Das chIL-6 zeigt mit dem humanen IL-6 eine Homologie von 35 % auf Proteinebene, mit dem der Ratte 25 % (Schneider et al. 2001). Mittlerweile konnten auch das IL-6 der Gans (*Anser anser*; GenBank Accession-No. JF437643) und des Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*; NCBI Reference Sequence Accession-No. XM\_002191284.1) vollständig sequenziert werden.

IL-6 wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, darunter Endothelzellen (Jirik et al. 1989), Keratinozyten (Baumann et al. 1984), Fibroblasten (Weissenbach et al. 1980), Monozyten/Makrophagen (Baumann et al. 1984; Van Snick et al. 1986), T-Zellen (Hirano et al. 1985) und B-Lymphozyten (Horii et al. 1988). Die biologischen Funktionen von IL-6 sind sehr vielfältig. IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten. So kommt ihm auch Bedeutung bei der Regulierung der Immunglobulin-Sekretion zu (Kishimoto et al. 1995). Außerdem beeinflusst es die Differenzierung und die Funktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (Takai et al. 1988). Des Weiteren ist IL-6 in der Lage, die Differenzierung von Monozyten zu steuern (Chomarat et al. 2000; Ikebuchi et al. 1987).

Wie oben bereits angedeutet ist IL-6 (neben IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) ein wichtiger Regulator der Akute-Phase-Reaktion (APR). So bewirkt es in vielen Spezies einen Anstieg der Akute-Phase-Proteine  $\alpha$ 1-Antitrypsin,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, Haptoglobin, Hämopexin und Fibrinogen (Castell et al. 1989; Wegenka et al. 1993). Auch auf das zentrale Nervensystem nimmt IL-6 Einfluss. So ist es zusammen mit IL-1 $\beta$  ein potenter Induktor von Fieber und „sickness-behaviour“ sowohl beim Säuger (LeMay et al. 1990) als auch beim Vogel (Marais et al. 2011). Zusammen mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  beeinflusst IL-6 die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und induziert auf diesem Wege die Sekretion von Glukokortikoiden (Weining et al. 1998). Diese verstärken wiederum die Wirkung von IL-6 auf die Akute-Phase-Reaktion. Gleichzeitig hemmen Glukokortikoide die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  in Monozyten und Makrophagen (Joyce et al. 1997) und fördern die Ausbildung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort (Visser et al. 1998). Beim Vogel scheint IL-6 diesbezüglich eine ähnliche Wirkung zu

besitzen. So konnte beim Huhn *in vivo* durch Applikation von rekombinanten chIL-6 die Synthese von Kortikosteron induziert werden, allerdings weniger stark als durch rekombinantes IL-1 $\beta$  (Klaas 2003). Während entzündlicher Vorgänge im Gehirn wird die Expression von IL-6 in Astrozyten durch TGF- $\beta$ 2 induziert (Benveniste et al 1994). In Versuchen mit transgenen Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine konstitutive Expression von IL-6 im Gehirn die Entwicklung einer ausgeprägten und lebenslangen reaktiven Gliose induziert, bei der sowohl Astrozyten als auch Mikroglia involviert sind (Chiang et al. 1994).

Indem es die IL-4-Synthese induziert, fördert IL-6 maßgeblich die Ausbildung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort (Rincón et al. 1997). Gleichzeitig unterdrückt es (unabhängig von IL-4) die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort durch Induktion des SOCS-1 (engl. *suppressor of cytokine signaling-1*) in aktivierten CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Diehl et al. 2000). Dies geht einher mit einer Phosphorylierung des STAT1, welche wiederum durch IFN- $\gamma$  induziert wird. Die Hemmung des IFN- $\gamma$ -Rezeptor-vermittelten Signals durch IL-6 unterdrückt die Selbstregulation der IFN- $\gamma$ -Expression während der CD4<sup>+</sup>T-Zell-Aktivierung, wodurch letztendlich die T<sub>H</sub>1-Immunantwort unterdrückt wird (Diehl et al. 2000).

### 2.3.3.6 Tumor-Nekrose-Faktor-ähnlicher Ligand 1A (TL1A)

Der aviäre Tumor-Nekrose-Faktor-ähnliche Ligand 1A (engl. *tumor necrosis factor ligand 1A*, TL1A) ist ein proinflammatorisches Zytokin (Takimoto et al. 2008) und zählt zu der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Liganden-Superfamilie. TNF-Liganden spielen beim Säuger eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Immunantwort, sowie bei der Osteogenese, Hämatopoese und Morphogenese. Sie sind jedoch auch in pathologischen Vorgängen involviert, wie der Tumorentstehung, dem septischen Schock, der viralen Replikation, der Knochenresorption, der rheumatoiden Arthritis und dem Diabetes. Während sie auf der einen Seite die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Zellen fördern, rufen sie an anderer Stelle Apoptose hervor (Aggarwal 2003).

Das wohl wichtigste Mitglied der TNF-Liganden-Superfamilie der Säugetiere ist das TNF- $\alpha$ . Dieses spielt eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen. Es triggert lokal die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen und fördert die Adhärenz, Migration, Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten am Ort der mikrobiellen Invasion. Ein lokaler Anstieg von TNF- $\alpha$  verursacht die Kardinalzeichen einer Entzündung, einschließlich Wärme, Schwellung, Schmerz und Rötung. Ein systemischer Anstieg führt zu einem verminderten Schlagvolumen des Herzens, induziert mikrovaskuläre Thrombose und verursacht kapillare Blutungen. In hohen Konzentrationen kann es zum septischen Schock führen. Des Weiteren fördert es im weiteren Krankheitsverlauf den Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunantwort durch Unterstützung der Antigenpräsentation und die Kostimulation von T-Zellen (Tizard 2008).

TNF-ähnliche Aktivitäten konnten beim Huhn zwar unter Anderem im Überstand von kultivierten Hühner-Makrophagen beobachtet werden (Rautenschlein et al. 1999; Zhang et al. 1995), jedoch sind alle bisherigen Bemühungen TNF- $\alpha$  bei einer aviären Spezies zu klonieren bzw. nachzuweisen gescheitert (De Boever et al. 2009; Kaiser et al. 2005). Beim Huhn deutet allerdings alles darauf hin, dass das chTL1A wie sein Homolog, das humane TL1A (auch: TNFSF15), eine TNF- $\alpha$ -ähnliche proinflammatorische Aktivität zeigt.

Zu den proinflammatorischen Aktivitäten von chTL1A gehören die Modulation der T-Zell-Aktivierung und die Apoptose von Hämatozyten. So konnten Takimoto et al. (2005) zeigen, dass chTL1A als Reaktion auf eine LPS-Stimulation in der Zellkultur vermehrt exprimiert wurde und zum Zelltod der Zelllinie L929 und von Hühner-Fibroblasten führte. Bei Masthähnchen konnte nach Injektion von rekombinantem chTL1A eine verminderte Futterraufnahme, erhöhte Stickoxid-Produktion und eine erhöhte Rektaltemperatur beobachtet werden (Takimoto et al. 2005). Zudem konnten in einem anderen Experiment nach Injektion von rekombinantem chTL1A erhöhte Expressionen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$ , als auch von chTL1A selbst beobachtet werden. Zusätzlich lag 12 Stunden nach chTL1A-Injektion eine Erhöhung der Serumkonzentrationen der Akute-Phase Proteine *Ceruloplasmin* und *Saures Alpha1-Glykoprotein* vor (Takimoto et al. 2008).

Park et al (2007) berichteten von einer verstärkten Expression von chTL1A in Leber, Milz, Bursa, peripheren Blutlymphozyten und intestinalen intraepithelialen Lymphozyten nach einer Eimerien-Infektion (Park et al. 2007).

### 2.3.3.7 Lipopolysaccharid-induzierter TNF-alpha-Faktor (LITAF)

LITAF (engl. *lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor*) ist einer der Transkriptionsfaktoren, der die Expression von TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen kontrolliert. LITAF wird bei Mensch und Maus hauptsächlich in lymphatischen Geweben (insbesondere Milz, periphere Blutleukozyten und Lymphknoten) sowie der Placenta (Bolcato-Bellemin et al. 2004; Myokai et al. 1999) und beim Huhn hauptsächlich in der Milz und den interstinalen intraepithelialen Lymphozyten exprimiert. Geringere Mengen konnten beim Huhn außerdem in der Bursa, den peripheren Blutleukozyten, dem Thymus, sowie in noch geringerer Konzentration in Herz, Gehirn und Muskel nachgewiesen werden (Hong et al. 2006a).

Beim Huhn konnte die Existenz von TNF- $\alpha$  bisher noch nicht nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 2.3.3.6, S. 24). Es zeigte sich jedoch, dass durch die Stimulation von Hühner-Makrophagen mit rekombinanten chLITAF als auch mit LPS die Expression von chTL1A, einem anderen Mitglied der TNF-Liganden-Superfamilie erhöht wurde (Hong et al. 2006a). Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass beim Huhn das TL1A funktionell das TNF- $\alpha$  ersetzt. Hinzu kommt, dass sowohl rekombinantes chLITAF (Hong et al. 2006a) als auch rekombinantes chTL1A (Takimoto et al. 2005) zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Tumor-Zelllinien besitzen. Durch seine regulatorischen Eigenschaften

insbesondere bezüglich der Expression von TNF- $\alpha$  und TL1A spielt LITAF auch eine wichtige Rolle während bakterieller und parasitärer Infektionen. Beim Huhn wird die Expression von LITAF (chLITAF) hochreguliert nach *in vitro*-Stimulation von Makrophagen mittels der Endotoxine von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* (Hong et al. 2006a). Auch Infektionen mit verschiedenen Eimerien-Spezies führen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer vermehrten LITAF-Expression (Hong et al. 2006a).

### 2.3.3.8 Interleukin 15 (IL-15)

Das IL-15 der Säuger gehört zu den T-Zell-Wachstumsfaktoren und besitzt sowohl strukturelle, als auch funktionelle Gemeinsamkeiten mit IL-2. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität und bei chronisch-inflammatorischen Krankheiten. Zu den biologischen Funktionen von IL-15 gehört die Stimulation des Wachstums von T-Lymphozyten, NK-Zellen und dem intestinalen Epithelium (Kennedy und Park 1996). Außerdem induziert es die Proliferation, die Zytokinproduktion und die zytotoxische Aktivität der T- und NK-Zellen und induziert die Motilität und Migration von T-Zellen (Carson 1994; Grabstein et al. 1994; Wilkinson 1995). Ebenso fördert es die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten (Armitage et al. 1995; Kennedy und Park 1996) und es ist erforderlich zur Aufrechterhaltung der Population von Gedächtniszellen über einen langen Zeitraum (Davison et al. 2008). Im Gegensatz zu IL-2 stimuliert IL-15 beim Säuger zusätzlich die neutrophilen Granulozyten und steigert deren phagozytische Aktivität (Wigley und Kaiser 2003). Der proinflammatorische Charakter von IL-15 zeigt sich insbesondere in dessen Förderung der Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und anderen inflammatorischen Chemokinen. Dabei wird die IL-15-abhängige Synthese von IFN- $\gamma$  und TNF in NK-Zellen durch IL-12 zusätzlich gefördert (Carson 1994).

Es liegen bisher nur wenige Informationen zur biochemischen und zellulären Fähigkeit des aviären IL-15 oder dessen Rezeptor vor. Sicher ist, dass chIL-15 wie beim Säuger einen NK-Zell-Wachstumsfaktor darstellt (Davison et al. 2008) und deren biologische Aktivität fördert (Li et al. 2001). Außerdem fördert es *in vitro* die Proliferation von Milz-Lymphoblasten und erhöht nach Injektion beim Huhn die Anzahl der CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten (Li et al. 2001). IL-15 wird vorrangig von aktivierten Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Epithelzellen sezerniert (Carson et al. 1995; Doherty et al. 1996; Kaiser et al. 2002; Kennedy und Park 1996; Reinecker et al. 1996). IL-15 wird neben anderen T<sub>H</sub>1-Zytokinen vermehrt exprimiert bei Eimeria-Infektionen (Hong et al. 2006b). Als Adjuvanz in Kombination mit einer DNA-Vakzine gegen *Eimeria acervulina* fördert es die Ausbildung einer protektiven Immunität (Ma et al. 2011; Min et al. 2001). Dabei erhöht es zusammen mit IL-8 die Anzahl der CD3<sup>+</sup>T-Zellen (Min et al. 2001). Des Weiteren scheint IL-15 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der spontanen autoimmunen Thyroiditis in der Hühner-Zuchtlinie "Obese Strain" (OS) zu spielen. Diese OS-Hühner stellen ein Tiermodell für die Untersuchung der humanen

Hashimoto's Thyroiditis, einer autoimmun verursachten Schilddrüsenentzündung, dar. IL-15 scheint dabei zu einer lymphozytären Infiltration der Schilddrüse zu führen, welche letztendlich Entzündung und Gewebsschädigung hervorruft (Kaiser et al 2002).

Bei Infektionen mit intrazellulären Protozoen spielt IL-15 eine wichtige Rolle beim Aufbau der immunologischen Abwehr. Bei einer *Toxoplasma gondii*-Infektion aktiviert es die Antigen-spezifischen Gedächtnis-CD8<sup>+</sup>T-Zellen, welche unter anderem das für die Parasitenabwehr bedeutsame IFN- $\gamma$  sezernieren (Khan und Kasper 1996). Umgekehrt führt ein Fehlen von IL-15 zu einer eingeschränkten CD8<sup>+</sup>T-Zell-Antwort gegen *T. gondii*. (Bhadra et al. 2010; Khan et al. 2002). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass IFN- $\gamma$  über die STAT1 wiederum die Expression von IL-15 *in vitro* fördert (Musso et al. 1999). Mullarky und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das IL-15 daraufhin eine Suppression der Erythropoese bewirkt und damit das Bild einer Retikulozytopenie während der akuten Toxoplasmose hervorruft (Mullarky et al. 2007). Auch auf die CD4<sup>+</sup>T-Zell-Aktivierung hat IL-15 einen nicht unerheblichen Einfluss. So konnte bei mit *T. gondii* (Stamm 76K) infizierten IL-15<sup>-/-</sup> Mäusen eine Herunterregulation der CD4<sup>+</sup>T-Zell-Immunantwort beobachtet werden. Aufgrund des Mangels an IL-15 sind die Dendritischen Zellen in ihrer Funktion, die CD4<sup>+</sup>T-Zellen durch Antigenpräsentation zu aktivieren und zu prägen, eingeschränkt. Dadurch kommt es zu einer eingeschränkten Immunantwort auf den Erreger, was sich in milderen Entzündungserscheinungen im Darm der betroffenen Tiere äußert und damit trotz der vermehrten Parasitenlast die Überlebensrate der infizierten Tiere erhöht (Combe et al. 2006).

### 2.3.3.9 Interleukin 7 (IL-7)

IL-7 gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen (Isaac et al. 2010). Die cDNA des Hühner-IL-7 (chIL-7) ist 762 bp lang kodiert für ein 145 Aminosäuren langes Protein, die Funktion des chIL-7 ist bisher jedoch noch wenig untersucht. Es scheint jedoch ähnliche Funktionen zu erfüllen wie sein Säuger-Homolog. So berichteten Mukamoto und Mitarbeiter von einem IL-7-ähnlichen Faktor im Überstand von kultivierten Thymuszellen des Huhns, der vermutlich synergistisch mit SCF (engl. *stem cell factor*) zu einer Proliferation von unreifen Thymozyten führte (Mukamoto et al. 1999).

Beim Säuger spielt IL-7 eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zytokinen, die zentral im Entzündungsgeschehen involviert sind, insbesondere IFN- $\gamma$  (Aiello et al. 2007), aber auch IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  (Grabstein und Alderson 1995). Die durch IL-7 geförderte antimikrobielle und tumorizide Wirkung von Monozyten / Makrophagen wird dabei verstärkt von IFN- $\gamma$ . Es induziert die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen und fördert die Zytotoxizität von NK-Zellen und Zytotoxischen T-Lymphozyten (Kasper et al. 1995), wobei es allerdings im Gegensatz zu IL-15 nur eine kleine Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben von NK-Zellen spielt (Ma et al. 2006). Sezerniert wird IL-7 von Keratinozyten (Heufler et al. 1993), Dendritischen Zellen (Kröncke et al. 1996),

Hepatozyten (Sawa et al. 2009), Neuronen und Epithelzellen (Blank et al. 2006; Watanabe et al. 1995), sowie von den Stromazellen der lymphoiden Organe wie rotes Knochenmark und Thymus (Blank et al. 2006; Marrack et al. 2000). Es wird jedoch nicht von Lymphozyten synthetisiert. (Blank et al. 2006).

IL-7 spielt bei verschiedenen parasitären Erkrankungen eine Rolle. So stimuliert es die protektive Immunantwort in Mäusen gegen *T. gondii* (Stamm 76K). Es erhöht die Anzahl der CD8<sup>+</sup>T-Zellen, sowie der NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen. Zusätzlich wird die Synthese von IFN- $\gamma$  gesteigert und die Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten erhöht (Combe et al. 2006; Kasper et al. 1995). Dabei arbeitet es synergistisch zusammen mit IL-15 (Bhadra et al. 2010). Außerdem fördert es die Wirkung von IFN- $\gamma$  und hebt die Parasitenabhängige Herunterregulation der IL-2-Antwort auf (Kasper et al. 1995).

### 2.3.3.10 Interleukin 8 (CXCLi2)

Chemokine sind eine Familie von kleinen (8 bis 10 kDa) Proteinen, die die zelluläre Migration kontrollieren. Beim Menschen wurden bisher über 50 verschiedene charakterisiert. Je nach Anordnung ihrer Cysteinreste werden sie eingeteilt in 4 Gruppen: CXC (auch als  $\beta$ -Familie bezeichnet), CC ( $\alpha$ -Familie), XC ( $\gamma$ -Familie) und CX ( $\delta$ -Familie; Tizard 2008). Das humane Interleukin 8 (IL-8 oder CXCLi2) ist ein typisches inflammatorisches CXC-Chemokin, es wird hauptsächlich von stimulierten Makrophagen und Mastzellen synthetisiert. Hauptaufgabe des humanen IL-8 ist das Anlocken und Aktivieren von neutrophilen Granulozyten. Es sorgt dafür, dass diese den Inhalt ihrer Granula ausschütten und stimuliert den respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten. Außerdem regt es die neutrophilen Granulozyten an Leukotriene auszuschütten (Tizard 2008). Das Huhn weist ein anderes Repertoire an inflammatorischen CXCL-Chemokinen auf als das Säugetier. Das Hühner- (ch) CXCLi2 induziert bereits in geringer Konzentration die Migration von Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten (Barker et al. 1993; Poh et al. 2008; Wu et al. 2008). Für die Migration von heterophilen Granulozyten, dem aviären Äquivalent zu den neutrophilen Granulozyten des Säugers (Withanage et al. 2004), sind wesentlich höhere Konzentrationen von CXCLi2 erforderlich (Barker et al. 1993).

IL-8 wird regelmäßig an Orten von Infektionen nachgewiesen, was darauf hinweist, dass viele infektionsauslösende mikrobielle Erreger und ihre Produkte die IL-8-Synthese in einer Vielzahl von Zelllinien *in vitro* induzieren können (Mukaida 2000). IL-8 spielt auch eine wichtige Rolle bei protozoären Infektionen. So konnten erhöhte Plasmaspiegel von IL-8 bei der viszeralen Form der Leishmaniose des Menschen nachgewiesen werden (Frade et al. 2011; van Zandbergen et al. 2002). Beim Huhn berichteten sowohl die Arbeitsgruppe um Hong als auch Kim und Mitarbeiter von einer erhöhten IL-8-Expression in intestinalen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) nach einer Infektion mit *Eimeria maxima* (Hong et al. 2006b; Kim et al. 2008).

### 2.3.3.11 Transformierender Wachstumsfaktor-beta 2 (TGF- $\beta$ 2)

Der Transformierende Wachstumsfaktor beta (engl. *transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) wurde erstmals im Überstand einer Tumorzellkultur entdeckt (Roberts et al. 1990). Es handelt sich um ein stark konserviertes Protein, welches als Homodimer vorliegt. Sowohl beim Huhn als auch beim Menschen gibt es jeweils drei Vertreter, wobei TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 beider Spezies direkte Orthologe zueinander darstellen (Jakowlew et al. 1988; Jakowlew et al. 1990). Die TGF- $\beta$ -Isoformen stellen wichtige Regulatoren der Entzündungsreaktionen dar. In niedriger Konzentration wirken sie proinflammatorisch, in hoher Konzentration antiinflammatorisch (Omer et al. 2000).

Die TGF- $\beta$ -Polypeptide sind multifunktional. Sie beeinflussen die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Funktionen einer Vielzahl verschiedener Zellen (Jakowlew et al. 1990; Roberts und Sporn 1989; Schlüter et al. 1998). Von besonderer Bedeutung ist ihr Eingriff in die Immunregulation sowohl beim Säuger als auch beim Huhn (Kaiser 2007; Kaiser et al. 2005). So hemmen sie das Wachstum, die Differenzierung und die Effektorfunktionen von aktivierten T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen (Horwitz et al. 1997; Letterio und Roberts 1998; Schlüter et al. 1998; Tang et al. 1997). Dazu gehört auch, dass TGF- $\beta$  die Differenzierung der naiven T-Zellen zu  $T_H1$ -Zellen (Expressionshemmung von T-bet, dem Hauptregulator der  $T_H1$ -Entwicklung (Gorelik et al. 2002)) und zu  $T_H2$ -Zellen (Expressionshemmung von GATA-3, einem für die  $T_H2$ -Entwicklung essentiellen Transkriptionsfaktor (Gorelik et al. 2002; Heath et al. 2000)) unterdrückt. Die immunsuppressive Wirkung von TGF- $\beta$  ist insbesondere auf die Herunterregulation der Synthese verschiedener Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-7, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie der verminderten Stickoxid-Synthese zurückzuführen (Schlüter et al. 1998; Tang et al. 1997). Zusätzlich wird die Expression verschiedener Zytokinrezeptoren wie IL-1R, IL-2R und IFN- $\gamma$ R gehemmt (Schlüter et al. 1998) und so die biologische Funktion der entsprechenden Zytokine unterdrückt (Letterio und Roberts 1998).

TGF- $\beta$  ist involviert in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im Gehirn. Es reguliert das Neuritenwachstum, die Transmittersynthese und die Synapsenbildung (Abe et al. 1996; Böttner et al. 2000; Ishihara et al. 1994). Die wichtigsten Aufgaben von TGF- $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 im Nervensystem sind die Regulation der Zellteilung von Vorläuferzellen, die Migration von neuronalen Vorläufern, das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen. Eine Coexpression von TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 konnte sowohl beim Huhn als auch bei Maus und Mensch in Neuronen, Astrogliazellen und Schwannschen Zellen nachgewiesen werden (Böttner et al. 2000; Unsicker und Strelau 2000). Im adulten Gehirn wird TGF- $\beta$ 2 nach Verletzungen oder Hypoxie, sowie während Neurodegenerationen induziert. TGF- $\beta$  ist ein wichtiger Regulator der Zytokinproduktion durch Astrozyten während entzündlicher Vorgänge im Gehirn und unterdrückt die proinflammatorische Immunantwort. So konnte beim Säuger gezeigt werden, dass es indirekt

die TNF- $\alpha$ -Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene blockiert, zusammen mit IL-10 und IL-6 (Benveniste et al. 1994; Benveniste et al. 1995). Die Expression von IL-6 durch Astrozyten wird induziert und zusätzlich synergistisch von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  gefördert (Benveniste et al. 1994).

Zusammen mit TGF- $\beta$ 1 blockiert TGF- $\beta$ 2 die IFN- $\gamma$ -vermittelte Hochregulierung von MHC-Klasse II Molekülen auf Makrophagen und Mikrogliazellen (Böttner et al. 2000; Suzumura et al. 1993) sowie die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -vermittelte Hochregulierung des *interzellulären Adhäsionsmolekül 1* (Böttner et al. 2000). Obwohl TGF- $\beta$  üblicherweise eine neuroprotektive Wirkung besitzt, schränkt es nach Verletzungen die Selbstheilung des Gehirns ein, und zwar durch Proliferationshemmung der neuralen Stammzellen (Aigner und Bogdahn 2008). Insbesondere TGF- $\beta$ 2 wird nach traumatischen Hirnverletzungen durch aktivierte Astrozyten vermehrt synthetisiert (Truettner et al. 2005).

Bei Infektionen mit *T. gondii* werden TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 1 vermehrt synthetisiert und begünstigen die Parasitenreplikation (Schlüter, Bertsch et al. 1998; Nagineni, Detrick et al. 2002). Anhand eines Mausmodells, bei dem der schwach-virulente *T. gondii*-Stamm DX eingesetzt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$ 2 die Ausbildung einer *Toxoplasma*-assoziierten Enzephalitis fördert und die Parasitenlast im Gehirn erhöht. Dabei konnte ein erniedrigter Spiegel von IFN- $\gamma$  in Serum und Cerebrospinalflüssigkeit gemessen werden. Gleichzeitig erniedrigt TGF- $\beta$ 2 die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen auf Makrophagen, Mikrogliazellen und B-Zellen (Schlüter et al. 1998). Zusätzlich fördert TGF- $\beta$ 2 die Synthese von IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin, welches die Aktivierung von T<sub>H</sub>1- und CD8<sup>+</sup>T-Zellen unterdrückt und die Ausbildung einer T<sub>H</sub>2-Antwort fördert (Gaddi und Yap 2007). Außerdem vermindert es die Rekrutierung von Immunzellen ins Gehirn. Durch die Gabe von rekombinantem IFN- $\gamma$  konnte die immunsuppressive Wirkung von TGF- $\beta$ 2 aufgehoben werden (Schlüter et al. 1998).

### 2.3.4 Immunevasionsstrategien von *Sarcocystis* und nah verwandter Apicomplexa

Grundsätzlich kann von zwei Möglichkeiten einer parasitären Immunevasion ausgegangen werden. Bei der indirekten Immunevasion beeinflusst der Parasit die Expression und Sekretion von immunmodulierenden Zytokinen oder er beeinträchtigt die Überlebensfähigkeit der Immunzellen. Im Falle der direkten Immunevasion nutzt der Parasit intrazelluläre Nischen für sein Überleben, indem er gezielt in die Signalkaskaden seiner Wirtszelle eingreift und damit eine Reihe von antimikrobiellen Effektormechanismen des Wirts umgeht beziehungsweise ausschaltet (Lang et al. 2007). Diese Mechanismen führen dazu, dass der Parasit einerseits die Immunantwort des Wirts induziert, aber andererseits soweit abschwächt, dass sein Überleben im und seine Verbreitung durch den Wirt gesichert sind.

Zu möglichen Mechanismen der Immunevasion von Sarkosporidien liegen bisher kaum wissenschaftliche Erkenntnisse vor. Gesichert ist lediglich, dass durch das aktive Eindringen des Erregers in die Wirtszelle mit Hilfe besonderer Oberflächenproteine und der Ausbildung von Gewebssystemen, diese als Dauerstadien über einen langen Zeitraum areaktiv im Wirt überdauern können (siehe unten). Im Folgenden soll daher eine vergleichende Betrachtung nah verwandter Parasiten der Apicomplexa weitere Einblicke über mögliche konservierte Mechanismen dieses Parasitenstamms geben. Zu deren bestuntersuchten Parasiten gehören *T. gondii* und *Neospora caninum*. Wichtige Evasionsstrategien dieser und anderer Parasiten sind:

a) Sequestrierung:

Bei der Sequestrierung umgeht der Parasit die Wirtsabwehr indem er sich an immunologisch schwer zugänglichen Orten im Wirtsorganismus ansiedelt. Dazu gehören der Befall von bestimmten Zellen (z.B. Makrophagen, Erythrozyten) oder Organen (z.B. das Gehirn), aber auch die Bildung von Gewebssystemen mit darin eingeschlossenen, ruhenden Bradyzoiten (u.a. bei *Sarcocystis*, *Neospora* und *Toxoplasma*; Eckert et al. 2005).

Sowohl *Neospora* als auch *Toxoplasma* umgehen die wirtseigene Abwehr, indem sie aktiv in Wirtszellen eindringen (Hemphill et al. 2006; Lei et al. 2005; Morisaki et al. 1995). Dabei spielen bestimmte Oberflächenproteine der Parasiten eine wichtige Rolle. Bei *N. caninum* wurden zwei Oberflächenproteine der Tachyzoiten identifiziert: NcSAG1 und NcSRS2 (Howe et al. 1998; Schares et al. 2000; Sonda et al. 1998). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass gegen diese Oberflächenproteine gerichtete Antikörper die Adhäsion und Invasion von *N. caninum* in die Wirtszelle verhindern können (Haldorson et al. 2005; Hemphill 1996; Nishikawa et al. 2000). Auch für *S. neurona* konnten charakteristische Oberflächenproteine, Sn14 und Sn16, identifiziert werden. Beide stellen starke Immunogene dar, die vermehrt bei Pferden mit EPM nachgewiesen werden konnten (Liang et al. 1998), deren Funktion bisher jedoch ungeklärt ist.

*T. gondii* induziert eine vermehrte Expression des interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) auf Trophoblasten und Endothelzellen um die Invasion zu fördern (Miller et al. 2009). Gleichzeitig ist *T. gondii* in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Makrophagen innerhalb der ersten 24 Stunden p.i. herunter zu regulieren. Nach 48 Stunden ist dieser Effekt aufgehoben. Folge dieses Effekts ist, dass die infizierten Zellen länger in der Zirkulation verbleiben und es wird spekuliert, dass dies dem Parasiten ermöglicht, innerhalb von Makrophagen und Dendritischen Zellen in die immunprivilegierten Organe wie das ZNS zu gelangen (Da Gama et al. 2004). *T. gondii* induziert in Dendritischen Zellen eine Hypermotilität, wodurch sich diese mitsamt dem darin eingekapselten Parasiten im ganzen Körper verteilen. Vermutet wird, dass der intrazelluläre Erreger dafür eine Chemokin-Rezeptor-Signalkette aktiviert (Lambert und Barragan 2010). Lindsay und Mitarbeiter zeigten

in *in vitro*-Versuchen, dass auch die Merozoiten von *S. neurona* in equine Leukozyten (meist Monozyten) eindringen können und postulierten die Möglichkeit, dass dies für den Parasiten die Möglichkeit darstellt, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Lindsay et al. 2006). *T. gondii* und *N. caninum* sind in der Lage im Zytoplasma von Makrophagen innerhalb einer parasitophoren Vakuole zu parasitieren (Hemphill et al. 2006), welche einerseits eine Azidifikation (Sibley et al. 1985) und andererseits die Fusion von Phagosom und Lysosom verhindert (Jones und Hirsch 1972).

Die chronische Phase der Infektion mit *Sarcocystis*, als auch mit *Neospora* und *Toxoplasma* geht einher mit der Ausbildung von Gewebssystemen und darin enthaltenen langsam proliferierenden Bradyzoiten. Die gezielte Umwandlung von Tachyzoiten zum Bradyzoitenstadium und umgekehrt stellt dabei einen weiteren Evasionsmechanismus dar. Bohne und Mitarbeiter zeigten, dass im Rahmen einer *T. gondii*-Infektion NO in der Lage ist, diese Umwandlung zu triggern. Sowohl das durch die Zuführung von SNP (Nitroprussidnatrium, engl. *sodium nitroprussid*) künstlich erzeugte NO, als auch IFN- $\gamma$ , welches bei einer *T. gondii*-Infektion vermehrt exprimiert wird und eine endogene NO-Produktion stimuliert, induziert diese Umwandlung (Bohne et al. 1994). Im immunsupprimierten Wirt können sowohl von *N. caninum* als auch von *T. gondii* die Bradyzoiten in Gewebssystemen reaktiviert werden und sich als Tachyzoiten erneut im Organismus ausstreuen (Nelson und Couto 2010). Die Bradyzoiten von *N. caninum* werden während der mit einer moderaten Immunsuppression einhergehenden Trächtigkeit des Rindes reaktiviert mit nachfolgender Parasitämie und Befall der Plazenta und des Föten (Hemphill et al. 2006).

#### b) Maskierung und molekulare Mimikry

Einige Parasiten verbergen sich vor dem Immunsystem des Wirts indem sie wirtseigene Moleküle an ihre Oberfläche anlagern bzw. darin einbauen und sich auf diese Weise „maskieren“. So adsorbieren beispielsweise Schistosomen und Nematodenlarven Wirtsalbumin und Wirtsimmunglobuline an ihrer Oberfläche (Eckert et al. 2005). Manche Parasiten schützen sich andererseits durch sogenannte molekulare Mimikry, d.h. sie synthetisieren selbst wirtsähnliche Oberflächenantigene auf ihrer Oberfläche. So synthetisieren intravaskuläre Schistosomen Fc-Rezeptoren und verschiedene Komplementrezeptoren (z.B. CRIT (engl. *complement C2 receptor inhibiting trispanning*), C3-Rezeptor (engl. *C3-binding protein*), SCIP-1 (engl. *schistosome complement inhibitory protein-1*)) auf ihrer Oberfläche, welche Immunglobuline und Komplementfaktoren binden und damit gleichzeitig die Immunglobuline wirkungslos werden lassen bzw. die Komplementkaskade blockieren (Eckert et al. 2005; Skelly 2004). Ein weiteres Beispiel ist das von *Trypanosoma cruzi* synthetisierte Protein B13, welches Ähnlichkeit mit dem kardialen Myosin des Säugers besitzt (Iwai et al. 2005).

c) Antigenvariation:

Im Fall der Antigenvariation verändert der Erreger seine eigene Antigenstruktur, um sich der Immunabwehr seines Wirts zu entziehen. Dazu vollzieht der Parasit entweder einen Stadienwechsel, wobei die verschiedenen Entwicklungsstadien eines Parasiten unterschiedliche Antigene aufweisen (Eckert et al. 2005). Eine solche variierende Genexpression findet man unter anderem bei den unterschiedlichen asexuellen Entwicklungsformen von *Eimeria tenella* (Tomley 1994). Eine andere Möglichkeit ist die Veränderung des Antigenmusters des Parasiten. So besitzt *Trypanosoma brucei* ein variables Oberflächenglykoprotein (engl. *variant surface glycoprotein*, VSG), dessen aktives VSG-Gen auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert wird. Bei Bedarf wird dieses abgespalten und mit Hilfe von Genkonversion ein neues, dem Wirt und dessen Immunsystem noch unbekanntes VSG exprimiert (Borst und Ulbert 2001). Weitere Beispiele für variable Oberflächenantigene finden sich bei *Giardia intestinalis* und *Plasmodium falciparum* (Eckert et al. 2005).

d) Inaktivierung von Effektormolekülen:

Einige Parasiten wie Babesien und Plasmodien besitzen hochantigene Oberflächenmoleküle, welche leicht vom Wirt erkannt werden und die diese dann nach Antikörperbindung als Komplex abstreifen (eng. *antigen shedding*), wodurch sie in der Lage sind, bis zu ihrem erneuten Eindringen ins Zytoplasma von Erythrozyten im Plasma zu überleben (Eckert et al. 2005).

Manche Parasiten sezernieren hoch spezifische Exoenzyme welche Antikörper abbauen in dem sie den Fc-Teil des Antikörpers abspalten (Eckert et al. 2005; Lucius und Loos-Frank 2008). So sezernieren adulte Schistosomen beispielsweise IgG-Proteasen, die gebundenes IgG eliminieren (McKerrow et al. 2006).

Eine andere Strategie ist die Synthese entgiftender Substanzen und Enzyme, die zytotoxische Effektormoleküle von Immunzellen wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffprodukte abwehren. Dazu zählt z.B. das Glykoprotein gp63 von *Leishmania donovani*, welches die Invasion von Makrophagen durch die Reduktion von Sauerstoff und Wasserstoffperoxid ermöglicht (Eckert et al. 2005; McKerrow et al. 2006).

Einige Parasiten, darunter Schistosomen und *Trypanosoma cruzi*, sind außerdem in der Lage durch die Synthese bestimmter Inhibitoren die Aktivierung des Komplementsystems des Wirts zu hemmen (siehe auch unter b); Lucius und Loos-Frank 2008; Skelly 2004).

e) Modulierung der Wirtsimmunantwort:

Viele intrazelluläre Protozoen, insbesondere solche, die nicht die Fusion von Phagosom und Lysosom verhindern, hemmen direkt oder indirekt die Synthese toxischer Substanzen in ihrer Wirtszelle (Eckert et al. 2005). So unterdrücken Leishmanien aber auch *T. gondii* die IFN- $\gamma$ -abhängige Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase in Makrophagen, wodurch die

Bildung des mikrobiziden NO gehemmt wird (Eckert et al. 2005; Lüder et al. 2003a). Dies ermöglicht erst die Replikation der Erreger innerhalb der Makrophagen.

Eine weitere Möglichkeit der Immunevasion des Parasiten ist der direkte Eingriff in die komplexen Signalkaskaden der oft über Zytokine und Chemokine vermittelten Immunantwort auf ein Antigen des Parasiten. So beeinflusst *T. gondii* beispielsweise die Expression verschiedener Zytokine indem es in die Signalkaskaden innerhalb seiner Wirtszelle eingreift (Denkers et al. 2004). Während einer akuten Toxoplasmose fördert *T. gondii* die Expression von IL-10 und TGF- $\beta$ , wodurch einerseits die IFN- $\gamma$ -Synthese der NK-Zellen und Makrophagen gehemmt und andererseits die T-Zell-Proliferation unterdrückt und damit die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort verhindert wird (Hunter et al. 1995; Lang et al. 2007; Langermans et al. 2001). Die insbesondere durch IL-10 hervorgerufene T-Zell-abhängige Immunsuppression vermeidet eine überschießende Entzündungsreaktion auf den Parasiten, welche im drastischsten Fall den Tod des Wirts nach sich ziehen würde (Gazzinelli et al. 1996; Neyer et al. 1997).

In *in vitro*-Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass *T. gondii* in der Lage ist, in infizierten Makrophagen und Dendritischen Zellen die IL-12-Synthese herunter zu regulieren, wodurch der Parasit sein eigenes Überleben fördert. Dies wird erreicht, indem *T. gondii* die NF- $\kappa$ B-Signalkette untergräbt. So verhindert er in Makrophagen die Translokation von RelA und c-Rel. Dadurch wird die IL-12-Synthese der Makrophagen vorübergehend und ihre IFN- $\gamma$ -Synthese vollständig verhindert (Miller et al. 2009). Wurde die Zelle jedoch vor Infektion mit dem Erreger bereits aktiviert, findet die IL-12-Synthese unverändert statt, wodurch die Parasitenlast im Wirt reduziert wird. Fraglich ist, ob die IL-12-Suppression ein antiinflammatorischer Effekt des Wirts ist, oder aber aktiv durch *T. gondii* induziert wird (Lang et al. 2007).

Versuche mit IL-10-defizienten Mäusen zeigten, dass die IL-12-Expression in Dendritischen Zellen, die zunächst mit löslichem Tachyzoitenantigen (STAg) von *T. gondii* (virulenter RH-88 Stamm) aktiviert wurden, stark herunter reguliert wurde und die Dendritischen Zellen bezüglich ihrer IL-12-Expression für eine nachfolgende Einwirkung des Parasiten unempfindlich sind, wodurch eine Mortalität durch nachfolgende Infektion mit dem avirulenten Stamm ME-49 von *T. gondii* verhindert wurde. Man spricht dabei von einer Paralyse der Dendritischen Zellen (Reis e Sousa et al. 1999). Es entsteht der Eindruck, dass es sich hierbei um einen von *T. gondii* induzierten Kontrollmechanismus handelt, der eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen und ein damit assoziiertes pathologisches Geschehen verhindern soll (Miller et al. 2009). STAg veranlasst die Synthese des LXA<sub>4</sub> (Lipoxin A<sub>4</sub>), einem Eicosanoid mit anti-inflammatorischer Wirkung (Aliberti und Bafica 2005). *In vitro*-Versuche zeigten, dass die Zugabe von LXA<sub>4</sub> zu DC-Kulturen die STAg-induzierte DC-Migration sowie deren IL-12-Synthese hemmt (Aliberti et al. 2002).

*T. gondii* bewirkt außerdem unter Beteiligung von STAT1 $\alpha$ , welches in den Zellkern transloziert, eine Herunterregulation der Expression von MHC-II-Molekülen auf der

Oberfläche von murinen Makrophagen und damit eine verringerte Antigenpräsentation (Lüder et al. 2001). In neuronalen Zellen und APC hemmt *T. gondii* die MHC-II-Expression durch die Herunterregulation des Klasse-II-Transaktivators CIITA (Lüder et al. 2003b).

f) Beeinflussung der Apoptose von Wirtszellen:

Um das Überleben ihrer Wirtszelle und damit ihr eigenes Überleben zu sichern sind einige intrazelluläre Parasiten in der Lage die Apoptose in infizierten Wirtszellen zu unterbinden. Zu diesen Parasiten gehören die Protozoen *T. gondii*, *Eimeria bovis* und Leishmanien (Eckert et al. 2005). Von *T. gondii* ist bekannt, dass die Apoptosehemmung durch die Aktivierung von NFκB erfolgt, welches die Expression der Inhibitoren der Apoptose in Wirtszellen reguliert (Sinai et al. 2004). Andererseits ist von einigen Parasiten bekannt, dass sie die Apoptose von Immunzellen gezielt induzieren und damit die Immunantwort beeinträchtigen. So führen Infektionen mit *T. gondii*, Plasmodien und *L. donovani* zu einem vermehrten Absterben von CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Eckert et al. 2005).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

- Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 2267
- Amphotericin B, BioWest S.A.S., Nuaille, Frankreich, Artikelnummer: L0009
- Aqua purificata, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 3255.1
- Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )  $\geq 99,8$  %, pulv., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 5935.1
- Chloralhydrat  $\geq 99,5$  %, Ph.Eur., BP, USP, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: K318
- Citronensäure-Monohydrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 5110.3
- DAB Puffertabletten, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 1029240001
- Dinatrium-Ethylendiamin-Tetra-Azetat,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $> 99$  %, p.a., Fluka Chemie, Buchs, Schweiz, Artikelnummer.: 03680
- Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 1.06585.0500
- dNTP-Mix 10mM each, Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland, Artikelnummer: R0192
- Ethanol 100 % reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 100986
- Ethidiumbromid 1 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 2218.1
- Fetal Bovine Serum, BioWest S.A.S., Nuaille, Frankreich, Artikelnummer: S1900-500
- GIBCO® Goat Serum, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 16210072
- GoTaq™ Flexi DNA Polymerase, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland, Artikelnummer: M8301
- Hämatoxylin-Monohydrat, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 115938
- HANKS' Salt Solution w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , w/o Phenol red, low endotoxin, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Artikelnummer: L 2045
- HEPES Buffer 1M, 100ml, BioWest S.A.S., Nuaille, Frankreich, Artikelnummer: L0180-100

- Kalialaun: Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 1.01047.1000
- Kaliumchlorid (KCl), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 1.04933.0500
- Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 4871
- Kryoeinbettmedium: Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande, Artikelnummer: 4583
- L-Glutamine 100X, 200mM, BioWest S.A.S., Nuaille, Frankreich, Artikelnummer: X0550
- Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland, Artikelnummer: K0222
- 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnummer: M-6250
- Methanol: chemolute® Methanol, technisch, Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen, Deutschland, Artikelnummer: 1411.50000
- MgCl<sub>2</sub> (25 mMol), Promega GmbH, Mannheim, Deutschland, Artikelnummer: A351B
- Mouse, Super Sensitive™ Negative Control, BioGenex, Emergo Europe, The Hague, Niederlande, Artikelnummer: HK119-7M
- Natriumchlorid (NaCl), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 106404
- Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Best. Nr. 1.06586.0500
- Natriumhypochloridlösung 12 % Cl, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 9062
- Natriumjodat (NaJO<sub>3</sub>), EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 106525
- Natronlauge c(NaOH) = 1 mol/l (1 N) TitriPUR®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 109137
- Nukleasefreies Wasser, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland, Artikelnummer: P 119C
- PBS Dulbecco w/0 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, instamed 9.55g/l, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Artikelnummer: L182-50
- Penicillin-Streptomycin, BioWest S.A.S., Nuaille, Frankreich, Artikelnummer: L0018-100
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) -Tabletten: PBS tablets ph 7,4 , Medicago AB, Uppsala, Schweden, Artikelnummer: 09-2051-100
- Rindergalle, Schlachthof, Deutschland

- Roti®ImmunoBlock, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: T144.1
- Roti®-P / C / I (Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol) Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: A156
- RPMI 1640 w/stable Glutamine, BioWest S.A.S., Nuailé, Frankreich, Artikelnummer: L0498-500
- Salzsäure c(HCl) = 0.5 mol/l (0.5 N) TitriPUR®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer: 109058
- Sodium citrate tribasic dihydrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnummer: C0909-100G
- Tris Base C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> ≥ 99,9 %, p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 4855.2
- Triton X 100, reinst, C<sub>33</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: 3051.3
- Trypanblau 0,5 %, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Artikelnummer: L 6323
- Trypsin-Trockensubstanz, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Artikelnummer: L 2103-20G
- Vectastain, ELITE ABC Kit (Biologo, Kronshagen, Deutschland, Artikelnummer: PK-6100)
- Wasser, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: T143.4
- Wasserstoffperoxid: chemolute® Wasserstoffperoxid 30 % (stab.) z.A., Th.Geyer & Co. KG, Renningen, Deutschland, Artikelnummer: 437.1011
- Xylol: chemolute® Xylol z.A., TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland, Artikelnummer: 326.2500
- Ziegennormalserum (Tierklinik für Fortpflanzung, FU Berlin)
- Zitronensäure, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer: 38640

### 3.1.2 Antikörper

Nicht-kommerzielle Erstantikörper:

- monoklonal, Maus-anti-Huhn, 2G11

Der verwendeten Erstantikörper gegen MHC-II wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers aus dem Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Er wurde aus Zellkulturüberständen aufgereinigt.

Kommerzielle Erstantikörper:

- polyklonal, Kaninchen-anti-Mensch, *CD3*, Dako, Glostrup, Dänemark, Artikelnummer: A045229-2
- monoklonal, Maus-anti-Mensch, *Pax-5*, Klon 24, BD Biosciences, San Jose, USA, Artikelnummer: 610863

Kommerzielle Zweitantikörper, biotinyliert:

- polyklonal, Ziege-anti-Kaninchen, IgG, Vector Laboratories Inc., Burlingame-CA, USA, Artikelnummer: BA 1000)
- polyklonal, Ziege-anti-Maus, IgG, Vector Laboratories Inc., Burlingame-CA, USA, Artikelnummer: BA-9200)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Adhäsive Folie: Klebefolie, optisch klar, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummer: 95.1994
- Deckgläser: Deckgläser, 24 x 50 mm, Glasdicke 0,13-0,16, R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland, Artikelnummer: 01-2450/1
- Disposable PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland, Artikelnummer: 17-0851-01
- LYSING MATRIX D, Certified RNase & DNase free, MP Biomedicals Germany GmbH, Berlin, Deutschland, Artikelnummer: 116913100
- Mikrotom Klingen: Mikrom SEC 35p™ Low Profile Blades, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland, Artikelnummer: 152570
- Filterpapier: Faltenfilter 595 ½, Schleicher & Schnell Micro Science GmbH, Dassel, Deutschland Artikelnummer: 10311653
- Reaktionsgefäße: SafeSeal Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland,  
Artikelnummer 0,5 ml: 72.704  
Artikelnummer 1,5 ml: 72.706  
Artikelnummer 2,0 ml: 72.695
- Objektträger: Star Frost OT adhäsiv, geschnitten: Waldemar Knittel Glasbearbeitung GmbH, Braunschweig, Deutschland, Artikelnummer: VS11171 076FKA
- Parafilm®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer: H666.1
- PCR-Platten: 96 Well Multiply® PCR-Platte, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummer: 72.1978
- PCR Tubes: PCR-Einzelgefäße mit flachem Deckel 0,2 ml, Brand GmbH +Co KG, Wertheim, Deutschland, Artikelnummer: 781305

- PCR Tubes: PCR-Einzelgefäße mit gewölbtem Deckel 0,2 ml, Brand GmbH +Co KG, Wertheim, Deutschland, Artikelnummer: 781300
- Pipettenspitzen: Biosphere® Qualitäts-Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland,  
Artikelnummer 10 µl: 70.1130.210 und 70.1115.210  
Artikelnummer 100 µl: 70.760.212  
Artikelnummer 200 µl: 70.760.211  
Artikelnummer 1000 µl: 70.762.411
- Pipettenspitzen: Biosphere® Qualitäts-Pipettenspitzen ohne Filter 10 µl, 200 µl, 1000 µl; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland,  
Artikelnummer 10 µl: 70.1130  
Artikelnummer 200 µl: 70.760.002  
Artikelnummer 1000 µl: 70.762
- Zellkultur Flaschen, 75 cm<sup>2</sup>, TPP AG, Trasadingen, Schweiz, Artikelnummer: 90076
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummer: 62.554
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummer: 62.548

### 3.1.4 Reaktionskits

- iScript™cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland, Artikelnummer: 170-8890
- NucleoSpin® Extract II, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland, Artikelnummer: 740609
- NucleoSpin® RNA II, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland, Artikelnummer: 740955
- NucleoSpin® Tissue, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland, Artikelnummer: 740952

### 3.1.5 Geräte

- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland, Artikelnummer: G2940CA
- Autoklav, Systec, Wellenberg, Deutschland, Ser. Nr. 2202506
- Brutschrank Typ B 6330, Thermo Heraeus, Hanau, Deutschland
- Brutschrank Heracell 150, Thermo Heraeus, Hanau, Deutschland, Artikelnummer: 50116047
- Coverplates: Shandon Coverplate™, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland, Artikelnummer: 7219950

- Coverplate Färbekassetten: Shandon Sequenza Slide Rack, Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland, Artikelnummer: 7331017
- Eindeckautomat: Leica CV5030, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland, Artikelnummer: 14047839700
- Elektrophoresekammer: Model No. HU6 / Serial No. 3277, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Gefriertruhe: Gefriertruhe, HFC Series Freezer Chest Model 586, Heraeus-Kendro, Hanau, Deutschland, Artikelnummer: 41 12 71020
- Gelbetrachter: UV Transilluminator 2000, Biorad, München, Deutschland, Artikelnummer: 170-8110EDU
- Gradientencycler: TGradient, Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland, Artikelnummer: 050 801
- Homogenisator: Precellys 24, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland, Artikelnummer: 91-PCS24
- Kryostat: Leica CM3050 S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland, Artikelnummer: 14903050SE1
- Lichtmikroskop Zeiss IM 35, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Magnetrührer, RET basic IKAMAG® safety control, Ika®-Werke, Staufen, Deutschland, Artikelnummer: 3622000
- Rotationsmikrotom: Microm HM 325, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland, Artikelnummer: 902120
- Mikroskop: Olympus Model BX41TF, Olympus Corporation, Tokyo, Japan
- Mikrowelle, Sharp Express, Hamburg, Deutschland, Artikelnummer: R-234
- Paraffinstreckbad, Medax GmbH & Co.KG, Neumünster, Deutschland, Artikelnummer: 24900
- pH-Meter Model Knick 761, Calimatic, Niederlande
- Pipetten, Eppendorf Research Variabel, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland,  
Artikelnummer 0,5-10 µl: 3111.000.122  
Artikelnummer 10-100 µl: 3111.000.149  
Artikelnummer 20-200 µl: 3111.000.157  
Artikelnummer 100-1000 µl: 3111.000.165
- Präzisionswaage VIC-711, ACCULAB Europa, Göttingen, Deutschland, Artikelnummer: B1261-9
- Spektralphotometer: NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland, Artikelnummer: 91-ND-1000
- RT-qPCR-Cycler: Stratagene Mx3000P QPCR System, Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland, Artikelnummer: 401403

- Thermocycler: T3000 Thermocycler 48, Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland, Artikelnummer :050-723
- Thermocycler: TPersonal Combi, Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland, Artikelnummer: 050-552
- Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, Artikelnummer: 5350 000.013
- Tischzentrifuge: Micro Centrifuge, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Artikelnummer: T464.1
- Voltgerät Power PAC 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland, Artikelnummer: 17619
- Vortexer: Vortex Mixer, neoLab, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer: 7-2020
- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, Artikelnummer: 5407 000.317
- Zentrifuge Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland, Artikelnummer: 75008375
- Zentrifuge Heraeus Minifuge T, Heraeus, Berlin, Deutschland
- Zählkammer Neubauer improved, Assistent, Sondheim, Deutschland, Artikelnummer: 442/712

### 3.1.6 Software

- Agilent Expert 2100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
- GeneDoc Version 2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/> Stand: 10.05.2012)
- geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/geNorm/> Stand 10.05.2012)
- Jellyfish Software Version 1.5 (Field Scientific, LLC, Lewisburg PA, USA)
- NanoDrop 1000 V3.8.1 Windows 7 (<http://www.peqlab.de/wcms/nanodrop/nanodrop-service.php> Stand: 10.05.2012)
- MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 4.0.2 (Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe AZ, USA)
- MX Pro Software (Stratagene, La Jolla, USA)
- NetPrimer – Primer Analysis Software (PREMIER Biosoft International, Palo Alto CA, USA; <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> Stand: 10.05.2012)
- Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

### 3.1.7 Angesetzte Lösungen und Puffer (Verweis auf die Chemikalien oben)

#### Coon's-Puffer (0,1 M, pH 7,2-7,6)

3,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Darmstadt)

0,136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt)

8,77 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt)

ad 100 ml Aqua dest.

#### RPMI-VM

500 ml RPMI 1640 (BioWest S.A.S., Nuaille)

50 ml Fetal Bovine Serum (BioWest S.A.S., Nuaille)

5 ml HEPES Buffer (BioWest S.A.S., Nuaille)

5 ml L-Glutamin (BioWest S.A.S., Nuaille)

5 ml Penicillin-Streptomycin (BioWest S.A.S., Nuaille)

500 ml 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

#### EDTA, 0,5 M, pH 8,0:

186,1 g Dinatrium-Ethylendiamin-Tetra-Azetat (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz)

800 ml Aqua dest.

Das Dinatrium-Ethylendiamin-Tetra-Azetat wird unter Erwärmen im Aqua dest. gelöst und mit etwa 20 g NaOH-Pellets auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend autoklavieren.

#### PBS, pH 7,4

1 PBS-Tablette (PBS tablets pH 7,4; 500ml, Medicago AB, Uppsala, Schweden)

500 ml Aqua dest.

Einstellung des pH-Wertes der Lösung auf 7,4 mit Salzsäure-Lösung (0,5 mol/l; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

#### TBE-Vorratslösung (5 fach):

242 g Tris Base (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

800 ml Aqua dest.

27,5 g Borsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

ad 1000 ml Aqua dest.

#### TBE-Gebrauchslösung (0,5 fach):

100 ml Vorratslösung auf einen Liter Aqua dest. geben

TBS (pH 7,6)

50 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

Hämalaun nach Mayer

1 g Hämatoxylin-Monohydrat, (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

1 l Aqua dest.

0,2 g Natriumjodat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

50 g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland))

50 g Chloralhydrat (Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

1g Zitronensäure (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Vor Gebrauch filtrieren

Spülpuffer:

495 ml PBS pH 7,4

5 ml Triton X 5 %ig

Citratpuffer pH 6,0

13,5 ml Stammlösung A

61,5 ml Stammlösung B

ad 750 ml Aqua dest.

Lagerung bei 4 °C

Stammlösung A:

0,1M Zitronensäure:

21,01 g  $C_6H_8O_7 \times H_2O$  (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B:

0,1M Natriumcitrat:

29,41 g  $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$  (Sodium Citrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

1000 ml Aqua dest.

Trypsin-Lösung 1 %ig (1:250 U/mg)

200 mg Trypsin-Trockensubstanz (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

100 ml PBS pH 7,4

Gelöste Substanz mit 0,22 µm Sterilfilter steril filtrieren.

Inkubation bei 37 °C im Wasserbad

### DAB-Lösung

4 DAB-Puffertabletten (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

180 ml PBS-Lösung (pH 7,4)

Unter Rühren auflösen

Lagerung der DAB-Tabletten bei 4 °C

### **3.1.8 Versuchstiere und Probenmaterial**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Großhirn (Cerebrum) von insgesamt 27 Haustauben (*Columba livia f. dom.*) mittels immunhistochemischer und molekularbiologischer Verfahren untersucht. Die Gewebeproben wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. med. vet. P. Olias, Institut für Tierpathologie, FU Berlin, zur Verfügung gestellt.

Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um fünf gesunde Tauben (r1, r2, r3, r4 und r5) als Referenzgruppe (**Gruppe R**), 20 Tauben aus einem Infektionsversuch mit dem Erreger *Sarcocystis calchasi* und um zwei Kontrolltiere aus demselben Infektionsversuch, die später als Prozess-Kontrollen dienten (Olias et al. 2010). Die 20 Tauben aus dem Versuch wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1). Die erste Gruppe (Gruppe 1) wurde mit hohen Dosen des Erregers ( $8 \times 10^4$  bis  $3 \times 10^6$  Sporozysten pro Tier) infiziert, die zweite Gruppe (Gruppe 2) mit niedrigen Infektionsdosen (10 bis  $10^4$  Sporozysten). Die Tiere mit der hohen Infektionsdosis entwickelten starke Polyurie und Apathie und verstarben bereits nach sieben bis 12 Tagen. Die Tiere mit geringerer Infektionsdosis überlebten diese erste Phase der Erkrankung und waren symptomlos, bis sie nach etwa 51 bis 57 Tagen neurologische Symptome wie Tortikollis, Zittern, Lähmungserscheinungen und Opisthotonus zeigten. Alle Tiere mit neurologischen Symptomen wurden euthanasiert. Tiere die während der 2. Erkrankungsphase keine neurologischen Symptome zeigten wurden am 120. Tag nach Infektion euthanasiert. Diese letztgenannten Tiere wurden im Rahmen dieser Arbeit nur für die Bestimmung geeigneter Referenzgene herangezogen (siehe Kapitel 3.3.10, S. 65). Alle Experimente wurden von der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo)) genehmigt und unter staatlicher Aufsicht durchgeführt (Registriernummer 0111/08).

Tabelle 1: Übersicht der Tiere aus dem Infektionsversuch

Versuchstier	Infektionsdosis (Sporozysten / Tier)	ZNS-Symptome	Tot / Euthanasie (dpi)
<i>Gruppe 1</i>			
2	3.000.000	nein	7
3	3.000.000	nein	7
4	300.000	nein	9
5	300.000	nein	9
6	100.000	nein	8
7	100.000	nein	12
8	8 x 10.000*	nein	9
9	8 x 10.000*	nein	10
<i>Gruppe 2</i>			
L59	8 x 200*	nein	120
L60	8 x 200*	ja	59
10	10.000	ja	51
11	10.000	ja	53
12	1.000	ja	59
14	100	ja	64
15	100	ja	59
L70	10	nein	120
L71	2 x 100 (42.d)**	nein	120
L72	2 x 100 (42.d)**	nein	120
L73	2 x 1.000 (42.d)**	nein	120
L74	2 x 1.000 (42.d)**	ja	53
<i>Kontrolltiere</i>			
L61	0	nein	120
L62	0	nein	59

\* täglich eine Dosis an acht aufeinander folgenden Tagen

\*\* zweite Dosis verabreicht am 42. Tag *post infectionem* (dpi)

## 3.2 Histologische Methoden

### 3.2.1 Nachweis von *Sarcocystis calchasi*

In vorherigen Arbeiten wurden Gehirne von mit *Sarcocystis calchasi* infizierten Tauben histologisch untersucht. In Hämalaun-Eosin (HE) -gefärbten Schnittpräparaten konnten jedoch trotz teils massiver Gewebsläsionen keine intraläsionalen Parasitenstadien nachgewiesen werden (Olias et al. 2009a; Olias et al. 2009b).

Eine immunhistochemische Untersuchung bietet demgegenüber den Vorteil einer höheren Sensitivität und Spezifität. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit die Proben der mit *S. calchasi* infizierten Tiere aus der ersten und zweiten Krankheitsphase (im Weiteren als **Gruppe A** und **Gruppe B** bezeichnet) mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein des Erregers überprüft werden. Um Schizonten (erste Phase) bzw. Zystenstadien (zweite Phase) des Erregers nachweisen zu können, musste zunächst ein für *S. calchasi* spezifischer Antikörper hergestellt werden (siehe Kapitel 3.2.1.1, S. 47).

Für die Untersuchung wurde jedes Taubengehirn in 5 Stufen aufgearbeitet und von jeder Stufe Schnittpräparate angefertigt (siehe Kapitel 3.2.1.2, S. 49). Für jedes untersuchte Präparat wurde ein Nachfolgeschnitt als Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente Skelettmuskulatur einer Taube mit hochgradigem Sarkozystenbefall.

Als immunhistochemisches Verfahren wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) gewählt (siehe Kapitel 3.2.1.3.2, S. 50). Dabei wird ein zweiter, mit Biotin markierter Antikörper an den Primärantikörper gebunden. Der dabei entstehende Antikörperkomplex, der an das gesuchte Epitop im Gewebe gebunden ist, wird anschließend mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Im Falle des Sarkozysten-Nachweises wurde dafür die Verwendung des Farbstoffes DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) gewählt. Dieser wird in Anwesenheit von Peroxidase zu einem braunen Farbstoff umgesetzt. Anschließend fand eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer statt.

#### 3.2.1.1 Die Herstellung des Antikörpers

##### 3.2.1.1.1 Isolierung von Oozysten aus Darmwand eines Habichts

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Oozysten von *S. calchasi* aus dem Dünndarm eines experimentell infizierten und 14 dpi euthanasierten Habichts (*Accipiter g. gentilis*) isoliert (Olias 2010). Herr Dr. med. vet. P. Olias, Institut für Tierpathologie, FU Berlin, stellte mir diese freundlicherweise zur Verfügung. Die isolierten Oozysten wurden mit 25 ml Leitungswasser aufgelöst und mit 0,5 ml einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (100.000 U/I Penicillin G-Natriumsalz, 100 mg/l Streptomycinsulfat; BioWest, Nuaille, Frankreich) sowie 0,2 ml einer Amphotericin-Lösung (250 mg/l Amphotericin B; BioWest, Nuaille, Frankreich) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit Parafilm (Carl Roth GmbH + Co. KG,

Karlsruhe) verschlossen um eine Luftzufuhr zu gewährleisten und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

#### **3.2.1.1.2 Extraktion von Sporozoiten aus Oozysten**

In Vorbereitung auf die Zellkultur mussten zunächst Sporozoiten aus ihrer schützenden Oozystenhülle gelöst werden. Dazu wurden zunächst 5 ml der aufgereinigten Oozystenaufschwemmung in ein 50 ml-Falcon überführt und mit Leitungswasser aufgefüllt. Nach gründlichem Durchmischen wurde für 10 Minuten bei  $2688 \times g$  (Minifuge T, Heraeus, Berlin) und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Zellpellet in 50 ml Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS; Dulbecco, Biochrom AG) resuspendiert und erneut zentrifugiert ( $2.688 \times g$  für 10 min). Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 5 ml einer 5 %igen Natriumhypochloridlösung gelöst und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Parasiten erneut fünfmal mit PBS wie oben beschrieben gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet nun in 15 ml des Zellkulturmediums *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) -Vollmedium (VM; Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.7, S. 43) und 15 % filtrierte Rindergalle resuspendiert und anschließend für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit RPMI-VM wie oben beschrieben gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml RPMI-VM aufgenommen.

#### **3.2.1.1.3 Sporozoitenzählung**

Für die Zählung der Sporozoiten wurde eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, Assistent, Sondheim) verwendet. Als Vorbereitung wurde zunächst eine Trypanblaulösung (Biochrom AG, Berlin) zum Anfärben der Sporozoiten angesetzt. Dazu wurde Trypanblau 1:20 mit PBS verdünnt. Nun wurden von der gewonnenen Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 90 µl der Trypanblaulösung vermischt. Die Zählkammer wurde mit einem Deckglas versehen. Mit einer 10 µl-Pipette wurde die angefärbte Suspension in die Zählkammer überführt. Nach 2 Minuten, während der sich die Zellen am Boden der Zählkammer absetzten, wurden die Zellen ausgezählt. Aus dem Ergebnis wurde die Konzentration der Sporozoitensuspension bestimmt.

#### **3.2.1.1.4 Zellkultur**

Die Sporozoiten wurden in einem Verhältnis von 1:10 (MOI 10) zu VERO-Zellen gegeben. Als Kulturmedium diente RPMI-VM (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.7, S. 43). Anschließend wurden die Kulturen für 12 Tage bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % inkubiert. Während dieser Zeit drangen die Sporozoiten in die VERO-Zellen ein und durchliefen mehrere Zyklen einer ungeschlechtlichen Vermehrung (Schizogonie) in Form einer Endopolygenie, d.h. die Merozoiten (Tochterzellen) schnürten sich synchron an der Peripherie eines offenbar polyploiden Kerns der Mutterzelle ab. Die Zellen wurden täglich

lichtmikroskopisch beurteilt und, wenn nötig, frisches Kulturmedium hinzugefügt. Am 12. Tag der Inkubation, dem Tag an dem die höchste Anzahl an Merozoiten im Überstand bei nah verwandten Arten zu erwarten gewesen wäre (Speer et al. 2000), wurden diese vom Medium getrennt und aufgereinigt. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml-Falcon überführt. Anschließend wurden 10 ml HBSS (engl. *Hank's Buffered Salt Solution*)-Puffer kalt (4 °C) zu den Zellen hinzugefügt. Nach kurzer Inkubation wurde der HBSS-Puffer abgenommen und ebenfalls in das 50 ml-Falcon gegeben. Anschließend wurde dieses bei einer Geschwindigkeit von  $2.688 \times g$  für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das gewonnene Pelett mit 50 ml PBS gewaschen und in 2,5 ml PBS aufgenommen. Als nächster Schritt folgte die Aufreinigung der Merozoiten mit Hilfe einer PD 10 Desalting Column (GE Healthcare, Freiburg). Nach Vorbereiten und Equilibrieren der Säule mit dreimal 25 ml PBS wurde die Säule auf ein frisches 50 ml Falcon gesetzt. Dann wurde die Merozoiten-Suspension auf die Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 3,5 ml PBS gespült und der Durchlauf ebenfalls aufgefangen. Der Durchlauf wurde dann für 10 min zentrifugiert ( $2688 \times g$ ), der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Durch die Zugabe von 4 %igem Formalin wurden die Merozoiten anschließend abgetötet. Nach 30-minütiger Inkubation wurden zwei weitere Spülschritte mit PBS durchgeführt. Anschließend wurden die Merozoiten mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wie oben für die Oozysten beschrieben ausgezählt.

#### **3.2.1.1.5 Herstellung des Antikörpers**

Für die Herstellung eines gegen *S. calchasi* gerichteten polyklonalen Antikörpers wurde ein auf die Antikörperproduktion spezialisiertes Unternehmen (BioGenes GmbH, Berlin) beauftragt. Diesem wurden die in der Zellkultur zuvor gewonnenen Merozoiten zugesendet. Dort dienten sie in einer Dosierung von  $1 \times 10^7$  der Immunisierung zweier Kaninchen gegen *S. calchasi*. Nach viermaliger *Boosterung* (7., 14., 56. und 70. Tag) erfolgte nach 84 Tagen die Blutung der Tiere und die Gewinnung des polyklonalen Antiserums. Dem Antiserum wurden 0,02 % Thiomersal zur Konservierung zugesetzt.

#### **3.2.1.2 Anfertigen von Paraffinschnitten**

Bei den Proben handelt es sich um in Paraffin eingebettete Gewebeproben (Gehirn, Skelettmuskel) von mit *S. calchasi* infizierten Tauben, welche mir freundlicherweise von Herrn Dr. med. vet. P. Olias, Institut für Tierpathologie, FU Berlin, zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Immunhistochemie wurden unter Verwendung eines Mikrotoms (HM 335E, Microm GmbH, Walldorf) 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Nach Glättung für einige Sekunden in einem 60 °C warmen Wasserbad (Medax GmbH & Co.KG, Neumünster) wurden die

Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen (Star Frost adhäsiv, Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig). Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und danach noch einmal für circa 2 Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank fixiert. Anschließend wurden die Objektträger bis zu ihrer weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.2.1.3 Immunhistochemie**

#### **3.2.1.3.1 Antikörper**

Als Erstantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper (siehe Kapitel 3.2.1.1.5) verwendet, welcher gegen Merozoiten von *S. calchasi* gerichtet war. Der Erstantikörper wurde in der Verdünnung 1:40.000 eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde biotinyliertes Ziegen-anti-Kaninchen-IgG eingesetzt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt (siehe unten).

#### **3.2.1.3.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung**

Für die immunhistochemische Färbung wurden die mit Gewebsschnitten belegten Objektträger in Glasküvetten gestellt und zunächst mit Xylol (96 %ig; TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen) entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe (siehe Tabelle 2) rehydriert. Zur Hemmung von endogenen Peroxidasen wurden die Präparate anschließend für 20 min in einer Lösung aus 180 ml Methanol (Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen) und 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %ig; Th.Geyer & Co.KG, Renningen) bei Zimmertemperatur inkubiert. Damit alle Schnitte gleichmäßig von der Flüssigkeit umspült werden, fand dies unter langsamem Rühren unter Verwendung eines Magnetrührers (RET basic IKAMAG safety control, Ika-Werke, Staufen) statt. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült. Die Demaskierung des Antigens wurde in Citratpuffer (Herstellung siehe Kapitel 3.1.7, S. 43) in einer Mikrowelle bei 600 Watt für 12 min durchgeführt. Danach wurden die Schnitte im Citratpuffer 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem die Schnitte mit einer Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) gespült wurden, wurden die Objektträger auf *Coverplates* (Shandon Coverplate, Thermo Fisher, Dreieich) montiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit Spülpuffer gespült. Nun wurden pro Objektträger 90 µl Blockierungsreagenz aufgetragen. Hierzu diente RotiImmunoblock (Carl Roth, Karlsruhe) 1:10 verdünnt mit PBS (pH 7,4). Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden pro Schnitt 90 µl des Erstantikörpers mit Blockierungsreagenz aufgetragen. Anschließend wurde 20 h bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde statt des Erstantikörpers nur die Blockierungsreagenz eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die *Coverplates* für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und während dessen dreimal mit dem Spülpuffer gespült. Der Zweitantikörper wurde mit der oben genannten Blockierungsreagenz verdünnt. Nach 30 min wurden die Präparate mit je 90 µl des

verdünnten Zweitantikörpers für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen wurde das Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC)-Reagenz zugegeben (Vectastain, ELITE ABC Kit, Biologo, Kronshagen), welches 30 min lang einwirkte. Danach wurden die Objektträger wieder in Glasküvetten überführt. Die Sichtbarmachung der Reaktion erfolgte durch 3'3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen. Dazu wurden vier DAB-Puffertabletten (Merck, Darmstadt) in 180 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend filtriert. Nach Zugabe von 16 µl 30 %igem Wasserstoffperoxid (Th.Geyer, Renningen) wurden die Präparate für 6 min in der DAB-Lösung gefärbt. Anschließend wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer für 1 min mit anschließendem Bläuen für 10 min in Leitungswasser. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2) zum Wasserentzug wurden die Präparate für 10 min in Xylol (96 %ig) inkubiert und anschließend per Hand unter Nutzung eines Einschlussmittels (Roti Histokitt, Roth, Karlsruhe) eingedeckt.

Tabelle 2: Alkoholreihe

<i>absteigend:</i>		<i>aufsteigend:</i>	
Alkohol	Zeit	Alkohol	Zeit
Ethanol 100 %	3 min	Ethanol 70 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min	Ethanol 70 %	3 min
Ethanol 100 %	3 min	Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min	Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min	Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 70 %	3 min	Ethanol 100 %	3 min
Ethanol 70 %	3 min	Ethanol 100 %	3 min

### 3.2.1.4 Lichtmikroskopische Beurteilung

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Göttingen, Deutschland) vorgenommen. Es wurden pro Gehirn eines Versuchstieres fünf Schnitte aus fünf verschiedenen Stufen des Gehirns auf das Vorhandensein von Schizonten bzw. Zystenstadien untersucht. Dazu wurde der gesamte Schnitt mäanderförmig bei einer 200-fachen Vergrößerung durchgemustert. Dabei wurden sowohl die Anzahl, als auch die Lokalisation des Erregers im Gewebe registriert.

### 3.2.2 Charakterisierung der Immunzellinfiltration

Um die zelluläre Immunantwort im Gehirn auf den Erreger *S. calchasi* zu charakterisieren, sollten die an der Enzephalitis beteiligten Entzündungszellen näher bestimmt werden. Gleichzeitig interessierte auch deren Lokalisation im Gewebe. Da gegenwärtig keine Antikörper gegen immunologisch relevante Epitope der Haustaube kommerziell zu erwerben sind, wurde auf verfügbare Antikörper von Huhn, Maus und Kaninchen zurückgegriffen und diese auf ihre Kreuzreaktivität mit der Taube getestet. Drei Antikörper konnten erfolgreich etabliert werden.

Der Antikörper mit der Bezeichnung „2G11“ ist gegen MHC-Klasse-II-Moleküle gerichtet (Kaufman et al. 1990). Diese sind Teil des Haupthistokompatibilitätskomplex und dienen der Präsentation von Antigenen, die in intrazellulären Vesikeln abgebaut wurden. Sie befinden sich auf der Oberfläche von nahezu allen antigen-präsentierenden Zellen, z.B. Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen (siehe dazu auch Kapitel 2.3.1, Seite 13). In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Antikörper 2G11 mit den MHC-Klasse-II-Molekülen einer Vielzahl von aviären und nicht-aviären Spezies kreuzreagiert (Bader et al. 2010; Kaufman et al. 1990).

Der zweite etablierte Antikörper mit der Bezeichnung „CD3“ ist ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Kaninchen-Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) der gegen die hochkonservierte  $\epsilon$ -Kette des humanen CD3 gerichtet ist und als T-Zell-Marker dient. Eine Kreuzreaktivität wurde auch für diesen Antikörper bereits mit verschiedenen aviären und nicht-aviären Spezies beschrieben (Bertram et al. 1996; Jones et al. 1993).

Der dritte, ebenfalls kommerziell erhältliche und gegen das humane Pax-5 gerichtete monoklonale Mausantikörper, im Weiteren als „Pax-5“ bezeichnet, (Klon 24, BD Biosciences, San Jose, USA) dient als B-Zell-Marker. Das Protein Pax-5 ist sowohl in Pro- und Prä-B-Lymphozyten, als auch in reifen B-Lymphozyten nachweisbar. Auch für diesen Antikörper wurde bei einer Vielzahl von Tierarten eine Kreuzreaktivität beobachtet (Agostinelli et al. 2010).

Als Kontrollen für die Spezifität dienten für alle drei Antikörper Gewebsschnitte einer Hühner- und einer Taubenmilz.

Tabelle 3: Etablierte Erstantikörper

Antikörper-Bezeichnung	Antigen	Spezies	Isotyp	Referenz
2G11	MHC-Klasse-II-Molekül des Huhns	Maus	IgG1	(Kaufman et al. 1990)
CD3	$\epsilon$ -Kette des humanen CD3	Kaninchen	IgG1	(Mason et al. 1989)
Pax-5	Humanes Pax-5	Maus	IgG1	(Torlakovic et al. 2002)

### 3.2.2.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Als Vorbereitung der immunhistochemischen Untersuchung auf MHC-II wurden von bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebeproben des Gehirns sowie einer Hühner- und einer Taubenmilz mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM3050S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) 4-6  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt. Dazu wurden die Proben mit Hilfe eines Kryoeinbettmediums (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf einem Objekthalter befestigt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger (Star Frost adhäsiv, Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig) aufgezogen und bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.2 Antikörper

Der verwendete Erstantikörper *2G11* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers aus dem Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Er wurde unverdünnt eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde biotinyliertes Ziegen-anti-Maus-IgG eingesetzt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper *CD3* (DAKO, Glostrup, Dänemark) wurde in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Als Zweitantikörper diente biotinyliertes Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Der gegen das humane Pax-5 gerichtete monoklonale Mausantikörper (Klon 24, BD Biosciences, San Jose, USA) wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Als Zweitantikörper diente biotinyliertes Ziegen-anti-Maus-IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

### 3.2.2.3 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung

Für den Nachweis von MHC-II wurden die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebsschnitte zunächst 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden sie mitsamt ihrer Objektträger in Glasküvetten verbracht, 10 min in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton fixiert und danach 20 min bei Zimmertemperatur zum Trocknen gestellt. Für den Nachweis von CD3 und Pax-5 wurden zuvor angefertigte Gewebsschnitte der in Paraffin eingebetteten Proben verwendet (siehe Kapitel 3.2.1.2, S. 49). Diese wurden wie im Kapitel 3.2.1.3.2 auf S. 50 beschrieben zunächst entparaffinisiert und rehydriert. Die Hemmung von endogenen Peroxidasen wurde ebenfalls wie unter Punkt 3.2.1.3.2 beschrieben für alle Gewebsschnitte mittels Methanol und  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für den MHC-II-Nachweis in eine Glasküvette mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) verbracht. Von hier wurden die Objektträger auf Coverplates (Shandon Coverplate) montiert und dreimal mit 0,05 %iger TritonX-Lösung verdünnt mit PBS (pH 7,4) gespült. Als

Blockierungsreagenz diente RotiImmunoblock 1:10 verdünnt mit PBS / Ziegennormalserum (1/5). Davon wurden 90 µl pro Objektträger aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden pro Schnitt 90 µl des unverdünnten Erstantikörpers aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde statt dem Erstantikörper BioGenex Negative Control (Mouse; BioGenex, The Hague, Niederlande) eingesetzt, welches in einem Verhältnis von 1:50 mit PBS dem 2 %iges bovines Serumalbumin zugesetzt war, verdünnt wurde. Anschließend wurde für circa 18 – 20 h über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Coverplates für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen dreimal mit der oben genannten Spüllösung gespült. Der Zweitantikörper wurde mit PBS / Ziegennormalserum (1:5) im Verhältnis 1:200 verdünnt. Pro Objektträger wurden 90 µl davon aufgetragen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut gespült und pro Objektträger 90 µl ABC-Reagenz (siehe Kapitel 3.2.1.3.2, S. 50) zugegeben. Nach halbstündiger Inkubation wurden die Objektträger von den Coverplates abgenommen und in Glasküvetten mit destilliertem Wasser überführt. Die Sichtbarmachung der Reaktion erfolgte für den *2G11*-Antikörper mittels HistoGreen (Linaris, Wertheim-Bettingen). Dazu wurde eine Lösung mit dem Farbstoff gemäß den Empfehlungen des Herstellers angefertigt. Die Objektträger mit den Schnitten wurden kurz mit PBS (pH 7,4) gespült und in eine Färbebox verbracht. Anschließend wurden auf jeden Schnitt 100 µl der unmittelbar zuvor hergestellten Färbelösung aufgetragen und für 5 min einwirken gelassen. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült, in eine Glasküvette überführt und in PBS verbracht. Als nächstes wurde mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt.

Für den Nachweis von CD3 und Pax-5 wurde das jeweilige Antigen zunächst wie unter Punkt 3.2.1.3.2 beschrieben mittels Citratpuffer und Mikrowellenbehandlung demaskiert. Der weitere Ablauf der immunhistochemischen Färbung erfolgte wie für den Sarkozystennachweis auf S. 50 beschrieben. Als Blockierungsreagenz diente hier jedoch Ziegennormalserum 1:1 verdünnt mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (engl. *Tris-buffered saline*, TBS; 50 mM, pH 7,6). Auch die Erstantikörper wurden mit TBS verdünnt (siehe Kapitel 3.2.2.2, S. 53). Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden anstelle des Erstantikörpers kommerzielle Negativkontroll-Immunglobuline des Kaninchens (für *CD3*) bzw. der Maus (für *Pax-5*; BioGenex, The Hague, Niederlande) verwendet. Als Zweitantikörper wurden Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (für *CD3*) bzw. Ziegen-anti-Maus-IgG (für *Pax-5*) eingesetzt, welche beide zuvor mit dem Blockierungsreagenz im Verhältnis 1:200 verdünnt wurden. Es folgte die Behandlung mit ABC-Reagenz und die Färbung mittels DAB und Hämalaun nach Mayer (siehe Kapitel 3.2.1.3.2, S. 50).

Nach der Färbung erfolgte für alle drei Antikörper die Entwässerung der Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2, S. 51) mit anschließender 10-minütiger Inkubation in 96 %igem Xylol. Schließlich wurden die Schnitte unter Verwendung eines Eindeckautomaten (Leica CV5030, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) eingedeckt.

Als Positivkontrollen wurden für alle drei Antikörper Gewebsschnitte einer Taubenmilz verwendet.

### 3.3 Molekularbiologische Untersuchung

#### 3.3.1 RNA-Isolierung aus Taubengehirnen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Cerebrum von Haustauben wurde das Säulenaufreinigungssystem NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Zunächst wurden von bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebeproben des Cerebrums jeweils ca. 100 mg entnommen und wie folgt homogenisiert. Im gefrorenem Zustand wurde das Gewebe mit einer sterilen Skalpellklinge zerkleinert und in ein mit 700  $\mu\text{l}$  einer RA1 (Lysispuffer, im Kit NucleoSpin RNA II enthalten) / 2-Mercaptoethanol (100:1)-Lösung gefülltes, eisgekühltes Reaktionsgefäß (Lysis Matrix D, MP Biomedicals, Berlin) übertragen und für 15 min auf Eis gestellt. Der Lysispuffer führt durch seinen hohen Gehalt an chaotropen Ionen zu einem schnellen Aufschluss der Zellen. Zusätzlich inaktiviert er RNasen und unterstützt später die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran der RNA-Bindungssäule. Anschließend wurden die Proben in einem Homogenisator (Precellys 24, peqlab Biotechnologie, Erlangen) bei 6800 rpm für 30 s mechanisch zerkleinert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben kurz bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert ( $11.000 \times g$ ) und der Überstand in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) übertragen und zurück auf Eis gestellt. Als nächster Schritt wurden den Proben 700  $\mu\text{l}$  Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1. (Roti-P / C / I, Roth, Karlsruhe; pH 7,8) zugesetzt und nach gründlichem Vortexen für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert ( $11.000 \times g$ ). Anschließend wurde die wässrige Phase in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  einer RA1 (Lysispuffer) / 2-Mercaptoethanol (100:1)-Lösung wurde die komplette Probe auf eine im Kit (NucleoSpin RNA II) enthaltene Filtersäule gegeben und 1 min bei  $11.000 \times g$  zentrifugiert, um gröbere Partikel zu entfernen. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle weiteren Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Dem Säulen-Durchfluss wurden nun 700  $\mu\text{l}$  70 %iges Ethanol beigelegt. Nach gründlichem Mischen wurde die gesamte Probe in zwei Schritten auf eine im Kit enthaltene Silicagel-Membran-Säule geladen und 30 s bei  $11.000 \times g$  zentrifugiert, wobei die RNA an die Membran gebunden wurde. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde nun ein Entsalzungspuffer (MDB, *membrane desalting buffer*, im Kit enthalten) aufgetragen und nach erneutem Zentrifugieren (1 min /  $11.000 \times g$ ) und Durchflussentfernung erfolgte der DNA-Verdau. Dazu wurde die im Kit enthaltene RNasefreie rDNase mit dem ebenfalls im Kit bereitgestellten, dazugehörigem Reaktionspuffer (*Reaction Buffer for rDNase*) im Verhältnis 1:10 versetzt und davon jeweils 95  $\mu\text{l}$  auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  des Waschpuffers RA2, Zentrifugation (30 s /  $11.000 \times g$ ) und drei weiteren Wasch- und

Zentrifugationsschritten mit dem Waschpuffer RA3 ( $2 \times 600 \mu\text{l}$ , jeweils  $30 \text{ s} / 11.000 \times g$ ;  $1 \times 250 \mu\text{l}$ ,  $3 \text{ min} / 11.000 \times g$ ) wurde in einem letzten Schritt die Membran für  $3 \text{ min}$  mittels Zentrifugation bei  $11.000 \times g$  getrocknet. Zuletzt wurde die an die Säule gebundene RNA mit  $40 \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser von der Säule gelöst und nach Inkubation für  $1 \text{ min}$  bei Raumtemperatur für  $1 \text{ min}$  bei  $11.000 \times g$  zentrifugiert. Das Eluat mit der darin enthaltenen RNA wurde auf Eis gestellt, bzw. bis zur weiteren Verwendung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Bestimmung der Konzentration der zuvor aus den Gewebeproben isolierten RNA erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (peqlab Biotechnologie, Erlangen) in  $[\text{ng} / \mu\text{l}]$ . Dabei wurden jeweils  $2 \mu\text{l}$  Eluat eingesetzt. Gleichzeitig erfolgte eine erste Reinheitskontrolle der gewonnenen RNA durch Beurteilung des Verhältnisses der Extinktionen  $260 \text{ nm}$  und  $280 \text{ nm}$  (Bustin et al. 2009). Als ausreichend rein für die nachfolgenden Untersuchungen werden RNA-Präparationen mit einem A 260/280-Quotient von mindestens  $1,8$  angesehen (Fleige und Pfaffl 2006). Ein erniedrigter Quotient wäre ein Hinweis auf Verunreinigungen zum Beispiel mit Protein oder Phenol (Bustin et al. 2009). Die Eluate wurden im Anschluss an die Messung bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

RNasen können die RNA schädigen und damit die RNA-Qualität stark mindern. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde die RNA-Integrität mit einer miniaturisierten Kapillarelektrophorese (*Lab-on-a-chip*-Verfahren; RNA 6000 Nano Kit, Agilent, Waldbronn) nach Angaben des Herstellers unter Nutzung des Bioanalyser 2100 (Agilent) bestimmt. Hierbei wird die eingesetzte RNA elektrophoretisch aufgetrennt und fluorometrisch detektiert. Eine an das Gerät angeschlossene Software (Agilent Expert 2100, Agilent) wertet das dabei entstehende Elektropherogramm aus und ermittelt daraus die *RNA integrity number* (RIN), ein Maß für die RNA-Integrität. Die RIN-Werte reichen von  $10$  (keine Degradation) bis  $1$  (vollständige Degradation der RNA). Proben mit einer RIN unter  $5$  sollten verworfen werden (Fleige und Pfaffl 2006). Für die weitere Arbeit wurden nur Proben mit einer RIN von mindestens  $8,0$  und damit einer intakten RNA (Schroeder et al. 2006) eingesetzt.

### 3.3.3 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der zuvor isolierten RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) wurde das kommerziell erhältliche iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München) eingesetzt und die Umschreibung nach Herstellerangaben durchgeführt. Insgesamt wurden  $100 \text{ ng}$  Gesamt-RNA pro Probe und Ansatz für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die benötigte Menge an RNA wurde zusammen mit  $4 \mu\text{l}$  des im Kit enthaltenen Reaktionsmix (enthält als Primer ein Gemisch aus Oligo(dT)-Nukleotiden und random Hexamer-Oligonukleotiden) und  $1 \mu\text{l}$  Reverse Transkriptase (ebenfalls im Kit enthalten) pro

Reaktionsansatz auf Eis vermengt und der Ansatz mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde ein zyklisch programmierbarer Thermoblock (Thermocycler: TPersonal Combi, Biometra, Göttingen) mit folgenden Temperaturschritten verwandt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 25 °C wurde die RNA bei 42 °C für 30 min revers transkribiert. Durch eine fünfminütige Inkubation bei 85 °C wurde die RNA-abhängige DNA-Polymerase inaktiviert und damit die Reaktion abgestoppt. Schließlich wurde die neu synthetisierte cDNA mit 180  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser von 20  $\mu\text{l}$  auf 200  $\mu\text{l}$  verdünnt und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.3.4 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebeproben**

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus den zu untersuchenden, bei –80 °C tiefgekühlten Gewebeproben der Taubengehirne wurde das Aufreinigungssystem Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel) verwendet. Das Protokoll des Herstellers wurde dabei geringfügig modifiziert. Zunächst wurden pro Tier etwa 25 mg Gewebe des Cerebrums entnommen, mit einer sterilen Skalpellklinge fein zerkleinert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 180  $\mu\text{l}$  des Puffers T1, sowie 25  $\mu\text{l}$  einer Proteinase K-Lösung gegeben. Das ganze wurde mit Hilfe eines Vortexers gründlich durchmischt und anschließend bei 56 °C für fünf Stunden in einem Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min gemixt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Puffer B3 (Macherey-Nagel) wurde jede Probe erneut gut durchgemixt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Zu jeder Probe wurden danach 210  $\mu\text{l}$  96 %iges Ethanol gegeben und gründlich gemixt. Anschließend wurden die Proben komplett auf jeweils eine im Kit enthaltene Silicagel-Membran-Säule geladen und 1 min bei 11.000  $\times g$  zentrifugiert. Dabei wird die in der Probe enthaltene genomische DNA an die Membran gebunden. Der Durchfluss durch die Säule wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte, einmal mit 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer BW und als zweites mit 600  $\mu\text{l}$  Waschpuffer B5. Nach Zugabe der Waschpuffer wurde jeweils für 1 min bei 11.000  $\times g$  zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule durch erneutes Zentrifugieren (1 min / 11.000  $\times g$ ) getrocknet. Im letzten Schritt wurde die an die Säule gebundene gDNA mit 100  $\mu\text{l}$  des EDTA-freien Elutionspuffers BE (5 mM Tris / HCl, pH 8.5) von der Säule gelöst und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und die eluierte gDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C gelagert.

### 3.3.5 *Semi-nested-PCR zum Nachweis von S. calchasi*

Zum Nachweis von *S. calchasi* in den Organproben der Tauben wurde eine qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) in Form einer *semi-nested* (halb-verschachtelten) PCR durchgeführt. Diese Art der PCR zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber der herkömmlichen PCR aus (Habibi et al. 2005) und ist damit geeignet auch geringe spezifische DNA-Mengen sicher zu amplifizieren und nachzuweisen. Dabei werden zwei PCR hintereinander durchgeführt. Mit Hilfe eines sogenannten äußeren Primerpaares wird während der ersten PCR der gewünschte Abschnitt der DNA (Amplikon) vervielfältigt. Dabei können jedoch auch unerwünschte PCR-Nebenprodukte aufgrund unspezifischer Bindung der Primer entstehen. Das gewonnene PCR-Produkt dient in einer zweiten nachfolgenden PCR als Matrize. Hier ersetzt nun ein sogenannter innerer Primer einen der beiden äußeren Primer, wobei der innere Primer innerhalb des durch den äußeren Primer begrenzten Sequenzbereichs an die Matrize bindet. Dadurch wird der gewünschte Sequenzbereich mit einer erhöhten Spezifität amplifiziert.

Die Primer für den Nachweis von *S. calchasi* wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. med. vet. P. Olias zur Verfügung gestellt (Olias et al. 2011). Sie sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: Primer für die Semi-nested-PCR

Primer	Orientierung	Sequenz (5`-3`)	Genposition in der ITS-1 Region*
SCa1	Sense	CTCCTTGCTCGAGAATGAACATGAG	276-300
SCa2	Antisense	GATCATCTTTTCGACGACAATATCG	474-498
SNCa3	Antisense	TCCAGAGAAGATCCCCTGGCTAC	389-411

\*Gen Bank Accession No.: FJ 232948.1

Als erster Schritt wurden in zwei auf Eis gekühlten Reaktionsgefäßen die Reaktionsmischungen (Mastermix) 1 und 2 für den ersten und zweiten Schritt der *Semi-nested* PCR angesetzt. Die dafür nötigen Reagenzien wurden währenddessen ebenfalls auf Eis gekühlt. Die Zusammensetzung des Mastermix 1 und 2 sind der unten stehenden Tabelle 5 zu entnehmen. Die in der Tabelle aufgeführten Mengen entsprechen dabei jeweils einem Reaktionsansatz. Je nach Probenanzahl wurden diese Mengen für die Experimente vervielfacht.

Tabelle 5: Zusammensetzung des jeweiligen Mastermix pro PCR-Ansatz für den ersten und zweiten Amplifikationsschritt der Semi-nested PCR

Reagenzien	Mastermix 1	Mastermix 2
5 x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, Mannheim)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (c = 25 mmol/ $\mu$ l) (Promega, Mannheim)	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
dNTP-Mix (je 10 mmol/ $\mu$ l) (Fermentas, St. Leon-Roth)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer sense (c = 20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer antisense (c = 20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Go Taq Flexi Polymerase (Promega, Mannheim)	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
Ultra pure H <sub>2</sub> O (Biochrom, Berlin)	28,75 $\mu$ l	33,25 $\mu$ l

Für den ersten Amplifikationsschritt wurden von dem Mastermix 1 anschließend jeweils 45  $\mu$ l in die gekühlten PCR-Gefäße vorgelegt und anschließend jeweils 5  $\mu$ l Template hinzugefügt. Als Template diente die zuvor aus den zu untersuchenden Gewebeproben isolierte gDNA. Nach Ablauf der ersten PCR wurden jeweils 0,5  $\mu$ l der daraus hervorgegangenen Produkte 1:500 mit destilliertem, nukleasefreiem Wasser verdünnt. Für den zweiten Schritt wurden jeweils 49,5  $\mu$ l Mastermix 2 vorgelegt und dann 0,5  $\mu$ l des verdünnten PCR Produkts aus dem ersten Schritt als Template hinzu pipettiert. In beiden Schritten wurden Negativkontrollen mitgeführt, in denen zu dem Mastermix statt der Template-DNA nur destilliertes Wasser hinzugefügt wurde. Zusätzlich wurden zwei Negativkontrollen (L61, L62) über den gesamten DNA-Aufreinigungsprozess mitgeführt (Prozess-Kontrollen). Als Positivkontrolle diente gDNA, welche aus Zystenstadien von *S. calchasi* einer experimentell infizierten Taube gewonnen wurde (ebenfalls zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. med. vet. P. Olias). Für die Durchführung der PCR kam ein Thermocycler der Firma Biometra (T3000) zum Einsatz. Das verwendete Temperatur-Zeit-Profil war für beide Schritte identisch und ist in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6: Temperatur-Zeitprofil der Semi-nested PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Gehe zu Nummer	Zyklus-schleife	Zeitzulage pro Zyklus
1. Initiale Denaturierung	94 °C	2 min			
2. Denaturierung	95 °C	30 s			
3. Anlagerung	55 °C	30 s			
4. Verlängerung	72 °C	1 min	2.	40	2 s
5. Finale Verlängerung	72 °C	10 min			
6. Wartezeit bis Probenentnahme	4 °C	∞			

Die PCR-Produkte aus beiden Schritten wurden nach Abschluss der PCR zur Kontrolle auf einem Agarosegel aufgetrennt. Auf 100 ml 0,5 x TBE-Puffer wurden 2 g Agarose (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roth, Karlsruhe) für ein 2 %iges (Masse / Volumen) Gel in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und beides gründlich gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in einem Mikrowellenherd (Sharp, Hamburg) bei 560 W Leistung erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach erfolgter Abkühlung auf ca. 65 °C wurde die Lösung mit 3 µl einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung versetzt, gut gemischt und in eine vorbereitete Gelkammer mit eingestecktem Kamm blasenfrei gegossen. Nach Aushärten des Gels wurden die Kämmen entfernt und jeweils 10 µl der PCR-Produkte in die Geltaschen überführt und anschließend elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Als Längenstandard wurde eine 50 bp-Leiter (O'Gene Ruler 50 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet (UV Transilluminator 2000, Biorad, München) sowie mit Hilfe der integrierten CCD-Kamera (848 mm Zoomobjektiv, 1/2"-Sensor) und einer speziellen Software (Quantity One 1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories, München) fotografiert.

### 3.3.6 Primer-Design

Für die quantitative *real-time* PCR (qPCR) sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*sense* und *antisense* Primer) notwendig, welche für das zu untersuchende Zielgen (*gene of interest*, GOI) eine spezifische komplementäre Basensequenz aufweisen. Da für fast alle Gene der Taube die Nukleotidsequenzen noch unbekannt sind, wurden die Primer für die gesuchten Gene auf Grundlage von Homologien bekannter Gensequenzen anderer Vogelarten, insbesondere von Huhn und Zebrafink, geplant. Dazu wurden die in der Genbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) hinterlegten aviären Gensequenzen der mRNA eines GOI mit Hilfe des Computerprogramms MEGA4 (Tamura et al. 2007)

miteinander abgeglichen und auf identische Nukleotidsequenzen untersucht. Anschließend wurde innerhalb dieser Sequenzen der für das entsprechende Protein kodierende Sequenzbereich (engl. *open reading frame*, ORF) softwaregestützt ermittelt (Biowire Jellyfish, Version 1.5). Innerhalb dieser ORFs wurden wiederum durch Sequenzvergleich mit öffentlich annotierten Sequenzdatenbanken (European Bioinformatics Institute (EBI) Ensembl, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) die Grenzen zwischen benachbarten kodierenden Sequenzbereichen (Exon-Exon-Grenzen) ermittelt. Die Primer wurden schließlich innerhalb dieses ORF in die homologen Bereiche der Sequenzen gelegt, und zwar so, dass das jeweilige Primerpaar eine Exon-Exon-Grenze einschließt. Dies dient dazu, später anhand der Größe und der Nukleotidsequenz des entstandenen PCR-Produktes eine Kontamination mit gDNA überprüfen und ausschließen zu können (Bustin 2000). Bei der Planung der Primer wurde die Software NetPrimer zu Hilfe genommen (Premier Biosoft International; <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>). Angestrebt wurde eine Primerlänge von 15-25 Basenpaaren sowie ein GC-Gehalt von 20-70 % (Bustin 2000). Die PCR-Produktlänge sollte idealerweise zwischen 75 und 200 Basenpaaren liegen. Die Primer sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen (*frameshifts*) zu vermeiden. Für alle Primer wurde eine Schmelztemperatur von etwa 58 °C angestrebt. Bei Zusammenstellung der Primerpaare sollte keine Möglichkeit zur Bildung von Primer-Dimeren gegeben sein. Außerdem sollten die Primer nach Möglichkeit keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln (*hair pins*) ausbilden können, weil diese die Wahrscheinlichkeit des Hybridisierens mit der Template-DNA reduzieren (Mühlhardt 2009). Alle Primer wurden von der Firma biomers.net (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

### 3.3.7 Quantitative *real-time* PCR

Bei der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) handelt es sich um eine spezifische und sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Bustin 2000; Bustin 2002). Nach jedem Amplifikationszyklus wird hier der Gehalt an doppelsträngiger DNA (dsDNA) gemessen, wodurch sich die Zunahme an PCR-Produkten optisch in Echtzeit verfolgen lässt. Erfolgt vor der eigentlichen qPCR eine reverse Transkription der mRNA in cDNA, wie es in dieser Arbeit der Fall ist (siehe Punkt 3.3.3, S. 56), spricht man von einer Reversen Transkription-qPCR (RT-qPCR; Bustin et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Stratagene Mx3000P QPCR System (Agilent, Waldbronn) zur Durchführung der RT-qPCR genutzt. Bei diesem PCR-Cycler handelt es sich um einen, mit einer Halogenlampe ausgestatteten, multiplexfähigen Fluoreszenzdetektor mit integrierter 96-Well-Wärmeplatte. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde Sybr Green I (Fermentas, St. Leon-Rot) genutzt (Bustin 2000). Dieser Cyanin-Farbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein und sendet im gebundenen Zustand bei Anregung mit Licht ein fluoreszierendes

Signal aus. Das bedeutet, dass mit zunehmender DNA-Konzentration auch die Fluoreszenz zunimmt. Der PCR-Cycler misst diese Fluoreszenzintensität nach jedem PCR-Zyklus während des gesamten Experiments. Mit Hilfe einer direkt an das Gerät angepassten Software (MX Pro software, Stratagene, La Jolla, USA) werden diese Fluoreszenzwerte erfasst und in Form einer Amplifikationskurve dargestellt. Zu Beginn des Experiments ist der Gehalt an dsDNA und die daraus resultierende Fluoreszenz noch nicht messbar, daher zeigt die Amplifikationskurve zu diesem Zeitpunkt eine Steigung von Null (Basislinie). Sobald eine nachweisbare Menge an PCR-Produkten erreicht wird, beginnt die Amplifikationskurve bei maximaler PCR-Effizienz – das heißt, wenn sich die Menge an PCR-Produkt pro PCR-Zyklus verdoppelt – exponentiell anzusteigen. Gegen Ende des Experiments flacht die Kurve wieder ab, aufgrund des zunehmenden Substratverbrauchs, sowie durch eine Hemmung der PCR infolge zunehmender Hybridisierung von Produktfragmenten (Holzapfel und Wickert 2007). Im Idealfall ergibt sich dementsprechend ein sigmoider Kurvenverlauf. Der Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung benutzt. Dabei wird der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (Fluoreszenzschwellenwert; *cycle threshold*) als  $C_T$ -Wert (*cycle threshold value*) angegeben (Holzapfel und Wickert 2007). Auf Grundlage der  $C_T$ -Werte einer cDNA-Sequenz in unterschiedlichen Proben kann die relative Expression der korrespondierenden mRNA-Sequenz in diesen Proben berechnet werden (Livak und Schmittgen 2001).

Um die Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes zu beurteilen findet im Anschluss an die Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse statt. Dazu wird das DNA-Fragment durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen, wobei die Fluoreszenz ständig gemessen und als sogenannte Schmelzkurve aufgezeichnet wird. Das ist wichtig, da der verwendete Farbstoff Sybr Green I unspezifisch an jede vorhandene dsDNA bindet. Das hat zur Folge, dass allein anhand der Fluoreszenzsignale keine Unterscheidung zwischen dem spezifischen PCR-Produkt und anderen doppelsträngigen DNA-Molekülen wie Amplifikationsprodukten aneinander gelagerter Primer (Primerdimere) oder PCR-Beiprodukten möglich ist (Bustin 2000). Jedes PCR-Produkt bzw. andere Art der dsDNA besitzt jedoch einen spezifischen Schmelzpunkt, an dem sich die beiden DNA-Stränge voneinander trennen und damit der eingelagerte Farbstoff (Sybr Green I) freigegeben wird. In der Schmelzkurve kommt es an diesem Schmelzpunkt zu einem steilen Fluoreszenzabfall. In der negierten Ableitung der Schmelzkurve ist dieser Abfall als Maximum erkennbar. Die aus einem erfolgreichen Experiment resultierende negierte Ableitung der Schmelzkurve sollte folglich nur ein Maximum bei der für das gewünschte PCR-Produkt spezifischen Schmelztemperatur zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden für jede Probe drei RT-qPCR-Experimente pro GOI durchgeführt und in Kombination ausgewertet (Triplet-Ansatz). Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser.

### 3.3.8 Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Bestimmung des Zytokinexpressionsprofils

Ziel der Etablierung war es, für jedes gesuchte Gen einen RT-qPCR-Untersuchungsansatz (Assay) zu entwickeln, bei der ein spezifisches PCR-Produkt mit bekanntem Schmelzpunkt bei ausreichender Effizienz und Sensitivität entsteht und nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurden die Primer für das jeweilige gesuchte Gen im Triplett-Ansatz mittels RT-qPCR getestet und ausgewertet (Protokoll siehe Kapitel 3.3.9, S. 64). Die Temperatur für die Primerhybridisierung (*annealing*) und Neustrangsynthese (*elongation*) wurde dabei gemäß der Vorgabe bei der Primer-Planung (siehe Kapitel 3.3.6, S. 60) auf 58 °C festgelegt. Als Proben-DNA (*template* DNA) wurde cDNA eingesetzt. Für die Etablierung der RT-qPCR-Assays der Referenzgene wurde cDNA aus dem Cerebrum einer gesunden Taube isoliert. Im Falle der Etablierung der RT-qPCR-Assays der GOI wurde die cDNA aus der Gewebeprobe des Cerebrums einer Taube isoliert, welche experimentell mit *S. calchasi* infiziert worden war und histologisch eine hochgradige Enzephalitis aufwies. Es handelte sich dabei um die Probe L74.

Anschließend an die RT-qPCR-Experimente wurden die ermittelten Schmelzkurven analysiert. Die Schmelzkurven eines Gens durften nur einen Peak aufweisen. Außerdem wurde anhand der Schmelzkurve der spezifische Schmelzpunkt des PCR-Produktes bestimmt. Die  $C_T$ -Werte (Fluoreszenzschwellenwert, *cycle threshold*, siehe Kapitel 3.3.7, S. 61) eines Gens durften nicht mehr als 0,5  $C_T$ -Stufen voneinander abweichen (Nolan et al. 2006), andernfalls wurde das Experiment wiederholt bzw. die Primer verworfen. Positive Negativkontrollen wurden nur dann toleriert, wenn unspezifische PCR-Produkte so schwach exprimiert waren, dass sie einen  $C_T$ -Wert von mindestens 5  $C_T$ -Stufen Unterschied zur kleinsten bekannten Konzentration aufwiesen (Bustin et al. 2009). Außerdem musste ein unspezifisches Produkt der Negativkontrolle einen anderen Schmelzpunkt aufweisen als das spezifische PCR-Produkt.

Erhaltene PCR-Produkte wurden in Folge mittels Sequenzanalyse untersucht. Dazu wurde zunächst das Produkt mit dem Säulen-Aufreinigungssystem NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Kontaminanten wie Salze, Polymerase und Proteine wurden durch Waschschrte über die Membran entfernt. Mit 18 µl nukleasefreiem Wasser wurde die DNA anschließend von der Membran eluiert. Das aufgereinigte Produkt wurde zur Bestimmung der Sequenz an ein Sequenzierungslabor (seqlab, Göttingen) versandt und dort jeweils von beiden Seiten mit den zugehörigen *sense* und *antisense* Primern sequenziert. Mit Hilfe des frei zugänglichen Computerprogramms BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul et al. 1990) wurde die ermittelte Sequenz mit sämtlichen in der GenBank Datenbank gelisteten Sequenzen verglichen. Der RT-qPCR-Ansatz wurde als spezifisch angenommen, wenn die Schmelzkurve nur eine Amplitude

zeigte und die ermittelte Sequenz mit der jeweils bekannten Sequenz einer anderen Vogelspezies (Huhn oder Zebrafink) zu >80 % (Ausnahme LITAF = 69 %) übereinstimmte. Anschließend wurde die ermittelte Sequenz mit Hilfe des Software-Programms GeneDoc (Version 2.7) einem Sequenzvergleich (*alignment*) mit einer bekannten cDNA-Sequenz des jeweiligen Gens unterworfen. Sofern diese bekannt war, war dies die Sequenz des jeweiligen Tauben-Gens. In den meisten Fällen wurde jedoch das Homolog des Huhns dazu herangezogen. Mit Hilfe des Programms MEGA4 (Tamura et al. 2007) wurde zusätzlich die prozentuale Ähnlichkeit, die sogenannte *p*-Distanz (nach dem Kimura-2-Parameter-Modell) zwischen der DNA-Sequenz des PCR-Produktes und der entsprechenden Sequenz des Huhns ermittelt.

Für die Bestimmung der Effizienz und zur Kontrolle der Sensitivität des jeweiligen RT-qPCR-Ansatzes wurde eine 7-stufige  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe des entsprechenden aufgereinigten PCR-Produkts (10 pg bis 0.01 fg) hergestellt. Anschließend wurden die RT-qPCR-Experimente mit den passenden Primern wiederholt, wobei nun als Proben-DNA (*template*-DNA) die Verdünnungsstufen des PCR-Produktes eingesetzt wurden. Die niedrigste Verdünnungsstufe, bei der das zu amplifizierende PCR-Produkt noch bestimmbar war, stellt die Grenze der Sensitivität der entsprechenden RT-qPCR-Untersuchungsmethode dar und wird als Masse (fg, Femtogramm) angegeben. Die Effizienz stellt ein Maß für die Vervielfachungsrate des Produkts in einem Zyklus der RT-qPCR dar. Sie wurde auf Grundlage einer Regressionsanalyse mit Hilfe einer entsprechenden Software (MX Pro Software) ermittelt. Sie kann sowohl in Prozent (100 % entsprechen einer Verdopplung der Menge an PCR-Produkt während der exponentiellen Phase der RT-qPCR), als auch als Steigung der Regressionsgeraden (*slope*) angegeben werden. Dabei gilt:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} \quad (3.1)$$

Für die weiterführenden Untersuchungen wurden nur RT-qPCR-Assays mit einer Effizienz (E) von > 90 % gewählt.

### 3.3.9 Protokoll der RT-qPCR

Für die Herstellung des Reaktionsansatz (Mastermix) wurde die RT-qPCR-Reaktionslösung Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) verwendet. Die Tabelle 7 auf Seite 65 zeigt die eingesetzten Reagenzien und Volumina zur Herstellung des Mastermix für eine Reaktion. Diese Mengen wurden dann entsprechend der Probenansätze vervielfacht.

Tabelle 7: Komponenten eines Reaktionsansatzes der RT-qPCR

Reagenzien	Volumen
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	7,8 µl
Primer sense	0,3 µl
Primer antisense	0,3 µl
Nukleasefreies Wasser	2,6 µl

Der Mastermix wurde entsprechend der Vorgabe des Herstellers bei Raumtemperatur angefertigt. Pro Reaktion wurden 10 µl des Mastermix und 5 µl cDNA eingesetzt. Für die Negativkontrolle wurde die cDNA durch nukleasefreies Wasser ersetzt. Als Reaktionsgefäße dienten 96-Well-Platten (96 Well Multiply PCR-Platte, Sarstedt, Nümbrecht). Diese wurden auf einen eisgekühlten Kühlblock platziert. Dann wurde zunächst der Mastermix und anschließend die jeweilige cDNA (beziehungsweise das Wasser für die Negativkontrolle) hinzu gegeben. Zuletzt wurde die 96-Well-Platte mit einer Klebefolie (Klebefolie, optisch klar, Sarstedt, Nümbrecht) abgedeckt und die Platte bei 127 × g für 1 min zentrifugiert und anschließend in den PCR-Cycler (Stratagene Mx3000P QPCR System) verbracht. Für alle Proben wurde ein einheitliches Temperatur-Zeit-Profil in der RT-qPCR verwendet. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 95 °C zur Aktivierung der Polymerase folgten 40 Amplifikationszyklen mit jeweils 30 s bei 95 °C (Denaturierung) sowie 1 min bei 58 °C und 30 s bei 72 °C (Hybridisierung / Neustrangsynthese). Während dieser Zyklen findet eine Echtzeit-Datenanalyse statt. Das bedeutet, es wird die Fluoreszenz während der Hybridisierung / Neustrangsynthese fortwährend erfasst. Im Anschluss an diese Zyklen findet die Schmelzkurvenanalyse statt. Dazu werden die Proben für 1 min auf 95 °C erhitzt, dann für 30 Sekunden bei 58 °C inkubiert. Danach erfolgte eine kontinuierliche Temperaturerhöhung bis auf 95 °C. Hier wird die Temperatur für 30 Sekunden gehalten. Während dieser Temperaturerhöhung wurde die Fluoreszenz gemessen. Aus den gewonnenen Daten kann dann die Schmelzkurve erstellt werden. Am Ende des Experiments werden die Proben automatisch von dem Gerät auf 4 °C heruntergekühlt bis sie entnommen werden.

### 3.3.10 Bestimmung geeigneter Referenzgene

Um die Ergebnisse der RT-qPCR-Experimente von verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, müssen diese zunächst normalisiert werden, um eventuelle Differenzen der Effizienz der mRNA-Extraktion, der mRNA-Lagerung beziehungsweise -Handhabung (Bustin und Nolan 2004), der mRNA-Qualität (Bustin 2002), der Methode der reversen Transkription (Lekanne Deprez et al. 2002), der Konzentration der cDNA-Proben und der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren auszugleichen. Für die Normalisierung der RT-qPCR-Ergebnisse werden zuvor ausgewählte Referenzgene

eingesetzt. Dies sind Gene, die in unterschiedlichen Geweben transkribiert und nahezu unabhängig von äußeren Faktoren stabil exprimiert werden (Maccoux et al. 2007; Radonić et al. 2004).

Viele wissenschaftliche Arbeiten belegten bereits, dass es kein Referenzgen gibt das universell einsetzbar ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus drei verschiedenen Referenzgenen eingesetzt (Vandesompele et al. 2002). Da für die Taube bis zu diesem Zeitpunkt kaum Primer für den quantitativen Nachweis von Referenzgenen entwickelt wurden, war es notwendig, zunächst ein passendes System von Referenzgenen für die Taube zu entwickeln und zu etablieren, um dann letztendlich von diesen die drei stabilsten Referenzgene für das zu untersuchende Gewebe ermitteln zu können. Dafür wurden 10 bei Säugetieren allgemein üblich eingesetzte Referenzgene ausgewählt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Auswahl der potentiellen Referenzgene und ihre Funktion in eukaryontischen Zellen

Gen	Abkürzung	Funktion	Referenz
beta-actin	β-actin	Strukturprotein des Zytoskeletts	(De Boever et al. 2008; Rath et al. 2003; Yin et al. 2011; Yue et al. 2010)
Glucuronidase beta	GUSB	Lysosomales Enzym	(Dheda et al. 2004; Heidari et al. 2008; Penning et al. 2007)
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH	Enzym der Glycolyse; katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat.	(Hong et al. 2006a; Jones et al. 2008; Li et al. 2010; Park et al. 2012; Penning et al. 2007; Watson et al. 2007)
Hydroxymethylbilan-Synthase	HMBS	Drittes Enzym der Häm-Biosynthese; Katalysator der Eliminierungsreaktion und anschließenden Polymerisation von vier Porphobilinogen-Molekülen zu Hydroxymethylbilan	(Penning et al. 2007; Yin et al. 2011)

Tabelle 8 (Fortsetzung): Auswahl der potentiellen Referenzgene und ihre Funktion in eukaryontischen Zellen

Gen	Abkürzung	Funktion	Referenz
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	HPRT	Enzym im Purin-Stoffwechsel; Einführung von Hypoxathin und Guanin in den Nukleotidstoffwechsel.	(Dheda et al. 2004; Etschmann et al. 2006; Penning et al. 2007; Yin et al. 2011)
Ribosomales Protein L13	RPL13	Bestandteil der ribosomalen 60S-Untereinheit lokalisiert im Zytoplasma; Katalysator in der Proteinsynthese	(Park et al. 2012; Radonić et al. 2004)
Ribosomales Protein L19	RPL19	Bestandteil der ribosomalen 60S-Untereinheit, lokalisiert im Zytoplasma	(Dawoud Al-Bader und Ali Al-Sarraf 2005; Heidari et al. 2008)
Ribosomales Protein S7	RPS7	Bestandteil der ribosomalen 40S-Untereinheit; Quervernetzung mit tRNA-Molekülen, welche sowohl an der Aminoacetyl-tRNA- als auch der Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle des Ribosom gebunden sind.	(Penning et al. 2007)
Transferrin-Rezeptor	TFRC	aktive Aufnahme von Transferrin in die Zelle via Endozytose	(Majidzadeh-A et al. 2011)
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Ywhaz	Beteiligt an der Signaltransduktion; Umwandlung von Phospholipiden zu Arachidonat	(Penning et al. 2007; Yue et al. 2010)

Für diese 10 Gene wurden dann wie oben beschrieben die RT-qPCR-Untersuchungsmethoden etabliert. Da mit den für GAPDH und TFRC etablierten Primern nur geringe Effizienzen (78,3 bzw. 87,3) erreicht wurden, wurden diese beiden Gene bei der Auswahl für die stabilsten Referenzgene nicht berücksichtigt und aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Anschließend wurden in Vorversuchen die Expressionsraten der verbliebenen 8 Referenzgene in den insgesamt 27 zu untersuchenden cDNA Proben (siehe Kapitel 3.1.8, S. 45) ermittelt.

Mit Hilfe des Computerprogramms geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/geNorm/>; Stand 23.04.2012) wurde dann die bestmögliche Kombination von Referenzgenen festgelegt (Vandesompele et al. 2002). Dazu wurden zunächst die für jede Probe einzeln ermittelten Expressionsraten jedes Referenzgens relativiert. Dies geschieht durch relative Quantifizierung bezogen auf die Probe, die den niedrigsten  $C_T$ -Wert für das entsprechende Referenzgen aufweist (*comparative  $C_T$  method*; Etschmann et al. 2006; Livak und Schmittgen 2001). Bei dieser Umrechnung wird die Effizienz der Amplifikation berücksichtigt. Sie wurde für diese Arbeit gleich 2 gesetzt, was einer Effizienz von 100 % entspricht. Es gilt also:

$$Q = E^{(\Delta C_T)} \quad (3.2)$$

$$Q = 2^{(\min C_T - \text{sample } C_T)} \quad (3.3)$$

Dabei bedeutet:

$Q$  = Probenquantität relativ zur Probe mit der größten Expression = relative Expression

$E$  = Amplifikationseffizienz (2 = 100 %)

$\min C_T$  = kleinster  $C_T$ -Wert =  $C_T$ -Wert der Probe mit der höchsten Expression

$\text{sample } C_T$  =  $C_T$ -Wert der jeweiligen Probe

Im nächsten Schritt werden diese ermittelten Probenquantitäten aller zu testenden Referenzgene in das geNorm-Programm importiert. Das Programm ermittelt dann das stabilste, sowie das instabilste Referenzgen für die jeweils untersuchten Proben. Dazu werden die ermittelten relativen Expressionsraten aller Proben ( $a_i$ ) in allen möglichen Kombinationen von jeweils zwei Referenzgenen  $j$  und  $k$  ins Verhältnis gestellt ( $a_{ij} / a_{ik}$ ) und die Quotienten jeweils zur Basis 2 logarithmiert. Insgesamt ergibt sich daraus ein Array (Zahlengruppe,  $A_{jk}$ ) von  $n$  Elementen:

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left( \frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left( \frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left( \frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left( \frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m} \quad (3.4)$$

Dabei bedeutet:

$m$  = Anzahl der Proben

Aus diesem Array wird nun durch Anbringung der Standardabweichung die *pairwise variation* (paarweise Abweichung,  $V_{jk}$ ) für die Kombination aus je zwei Referenzgenen errechnet:

$$V_{jk} = \text{st. dev}(A_{jk}) \quad (3.5)$$

Anschließend wird aus allen Standardabweichungen, die mit Beteiligung eines Referenzgens berechnet wurden, der arithmetische Mittelwert (M) gebildet:

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n - 1} \quad (3.6)$$

Dabei bedeutet:

$n$  = Anzahl der Referenzgene

Der Mittelwert stellt dann ein Maß für die Expressionsstabilität des betreffenden Referenzgens im Vergleich mit den übrigen Referenzgenen dar. Dabei gilt, dass das Referenzgen mit der geringsten Expressionsstabilität den höchsten M-Wert aufweist (Vandesompele et al. 2002). Dieses Referenzgen wird nun aus der Gruppe der Referenzgene ausgeschlossen. Für die verbleibenden Referenzgene wird der oben beschriebene Rechenweg erneut durchgeführt und wiederum das Referenzgen mit der geringsten Expressionsstabilität ausgeschlossen. Dieses Verfahren wird solange wiederholt, bis zwei in Kombination maximal stabile Referenzgene ermittelt worden sind (Vandesompele et al. 2002).

Zur Bestimmung der optimalen Anzahl von Referenzgenen, die zur Normalisierung von Expressionsraten herangezogen werden sollten, wird von geNorm der Normalisierungsfaktor basierend auf  $n$  Referenzgenen ( $NF_n$ ) berechnet und in Form eines Balkendiagramm dargestellt. Je niedriger der V-Wert, desto geringer der Einfluss, den ein zusätzliches Referenzgen auf die Normalisierung hat. Empfohlen wird ein Wert von  $V < 0,15$  sowie die Verwendung von mindestens drei Referenzgenen ( $NF_n$ ,  $n = 3$ ) (Vandesompele et al. 2002). Die mit geNorm auf diesem Wege ermittelten drei stabilsten Referenzgene wurden in der vorliegenden Arbeit zur Normalisierung der Expressionsrate aller zu untersuchenden Gene eingesetzt.

### 3.3.11 Auswertung der RT-qPCR-Daten

Um die relative Menge der gesuchten Gene in den cDNA-Proben zu bestimmen, wurden die während der RT-qPCR gemessenen Daten der Amplifikationskurven und Schmelzkurven analysiert. Mit Hilfe der Geräte-Software (MX Pro Software) wurde für jede Amplifikationskurve ein  $C_T$ -Wert zugeordnet. Die drei  $C_T$ -Werte jedes untersuchten Gens aus den Triplet-Ansätzen wurden auf eventuelle Abweichungen voneinander überprüft. Lagen Abweichungen der  $C_T$ -Einzelwerte von mehr als 0,5 vor, wurden diese aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und die entsprechenden RT-qPCR-Experimente wiederholt. Aus den drei  $C_T$ -Einzelwerten wurden dann arithmetische Mittelwerte berechnet, die in die weiteren Untersuchungen eingingen.

Die ermittelten Schmelzkurven der einzelnen RT-qPCR-Experimente wurden mit denen aus den vorhergegangenen Etablierungsversuchen verglichen. Dabei wurde kontrolliert, ob der Schmelzpunkt des Produkts mit dem aus dem Etablierungsversuch übereinstimmt. Bei Abweichungen des Schmelzpunktes von mehr als 0,5 °C wurden die entsprechenden Experimente wiederholt.

### 3.3.12 Relative Quantifizierung der Expressionsraten der Referenzgene mittels der Delta-Delta- $C_T$ - ( $\Delta\Delta C_T$ -) Methode

Für eine sichere und korrekte Beurteilung der RT-qPCR-Ergebnisse ist es wichtig, dass die ermittelten Expressionswerte mit Hilfe von Referenzgenen normalisiert werden. Dies setzt voraus, dass die für die Normalisierung ausgewählten Referenzgene in den zu untersuchenden Geweben konstant exprimiert werden. Mit Hilfe des Computerprogramms geNorm wurden aus insgesamt acht Referenzgenen die drei stabilsten ausgewählt. Nun soll noch überprüft werden, ob die einzelnen Referenzgene im Bezug zu ihrem Median tatsächlich in den zu untersuchenden Proben in ihrer Expression nicht reguliert sind.

Um den relativen Expressionsunterschied der Referenzgene zwischen zwei unterschiedlichen Probengruppen (Kontrollgruppe und Testgruppe) zu bestimmen wurde die sogenannte Delta-Delta- $C_T$ - ( $\Delta\Delta C_T$ -) Methode zur relativen Quantifizierung nach Livak und Schmittgen herangezogen (Livak und Schmittgen 2001), wobei die Formeln entsprechend modifiziert wurden. Dabei wurden die zuvor gemittelten  $C_T$ -Werte der einzelnen Proben eingesetzt. Mit *Testgruppe* wird die Gruppe von experimentell beeinflussten Proben bezeichnet, bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll (also die Proben der experimentell mit Sarkozysten infizierten Tiere). Als *Kontrollgruppe* gelten die experimentell unbeeinflussten Proben, die als Bezug für die Testproben dienen (also die Proben der gesunden, nicht infizierten Tiere, Gruppe R). Zunächst wurde die Expression des Referenzgens in der Testprobe auf die Expression der drei zur Normalisierung ausgewählten Referenzgene bezogen, wobei für die Berechnung des  $\Delta C_T$ -Wertes einer Probe der geometrische Mittelwert (GM) der  $C_T$ -Werte dieser 3 Referenzgene von eben dieser Probe eingesetzt wurde.

$$\Delta C_T = C_{T_{\text{Referenzgen}}} - GM C_{T_{\text{Referenzgen}}} \quad (3.7)$$

Dabei bedeutet:

$C_{T_{\text{Referenzgen}}}$  =  $C_T$ -Wert des Referenzgens einer Probe

$GM C_{T_{\text{Referenzgen}}}$  = geometrischer Mittelwert der  $C_T$ -Werte der drei Referenzgene einer Probe

In einem zweiten Schritt werden die so ermittelten normalisierten Expressionsunterschiede ( $\Delta C_T$ -Werte) in der Testgruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen und man erhält den Delta-Delta- $C_T$ -Wert.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{Kontrollgruppe}} - \Delta C_{T_{Testgruppe}} \quad (3.8)$$

Dabei bedeutet:

$\Delta C_{T_{Kontrollgruppe}}$  = Median aller  $\Delta C_T$ -Werte der Proben der Kontrollgruppe

$\Delta C_{T_{Testgruppe}}$  = Median aller  $\Delta C_T$ -Werte der Proben der Testgruppe

Um den relativen Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln wird dieser Wert anschließend in die folgende Formel eingesetzt:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.9)$$

Das Ergebnis wird als FC-Wert (engl. *fold change*) angegeben und beschreibt die normalisierte Expressionsrate des Referenzgens in der Testgruppe als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des Referenzgens in der Kontrollgruppe.

Um die normalisierten Expressionsraten einzelner Testproben bezogen auf die Kontrollgruppe zu berechnen, werden statt dem Median die einzelnen  $\Delta C_T$ -Werte der Testproben in die oben stehende Gleichung (3.8) eingesetzt.

### 3.3.13 Effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels RT-qPCR unter Einbeziehung mehrerer validierter Referenzgene

Um den relativen Expressionsunterschied der Zielgene zwischen zwei unterschiedlichen Probengruppen (Kontrollgruppe und Testgruppe) zu bestimmen wurde die sogenannte effizienzkorrigierte relative Quantifizierung nach Pfaffl herangezogen (Pfaffl 2001), welche eine Weiterentwicklung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen darstellt. Dabei wurden die zuvor gemittelten  $C_T$ -Werte der einzelnen Proben eingesetzt.

Bei der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wird eine konstante Verdopplung der DNA in jedem *real-time*-PCR-Zyklus vorausgesetzt. Es findet keine Korrektur gegebenenfalls abweichender PCR-Effizienzen zwischen Ziel- und Referenzgenen statt. Stattdessen wird eine ideale PCR-Effizienz in allen Proben ( $E = 2$ , das entspricht einer Effizienz von 100 %) zugrunde gelegt.

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.10)$$

Da in der Praxis die wahren RT-qPCR-Effizienzen jedoch eher einen Wert zwischen 1,7 und 1,9 annehmen (Pfaffl 2004) und bereits geringe Schwankungen der Effizienzen von Zielgenen

zu Referenzgenen zu enormen Differenzen in den Expressionsunterschieden führen, wird heutzutage empfohlen, unterschiedliche Effizienzen bei der Bestimmung der relativen Expression der Zielgene zu berücksichtigen (Bustin et al. 2009; Pfaffl 2001; Pfaffl et al. 2004). Im Folgenden wird mit *Testgruppe* die Gruppe von experimentell beeinflussten Proben bezeichnet, bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll (also die Proben der experimentell mit Sarkozysten infizierten Tiere). Als Kontrollgruppe gelten die experimentell unbeeinflussten Proben, die als Bezug für die Testproben dienen (also die Proben der gesunden, nicht infizierten Tiere, Gruppe R).

Bei der effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung wurde nun zunächst die Expression des Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens bezogen.

$$\Delta C_T = C_{T_{Zielgen}} - C_{T_{Referenzgen}} \quad (3.11)$$

Da in der vorliegenden Arbeit insgesamt drei Referenzgene herangezogen wurden, wurde bei der Berechnung des  $\Delta C_T$ -Wertes einer Probe der geometrische Mittelwert der  $C_T$ -Werte dieser drei Referenzgene von eben dieser Probe eingesetzt.

$$\Delta C_T = C_{T_{Zielgen}} - C_{T_{GM_{Ref}}} \quad (3.12)$$

Dabei bedeutet:

$C_{T_{Zielgen}}$  =  $C_T$ -Wert des Zielgenes einer Probe

$C_{T_{Referenzgen}}$  =  $C_T$ -Wert des Referenzgens einer Probe

$C_{T_{MW_{Ref}}}$  = geometrischer Mittelwert der  $C_T$ -Werte der drei Referenzgene einer Probe

Bei der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode werden nun die so ermittelten normalisierten Expressionsunterschiede ( $\Delta C_T$ -Werte) in der Testgruppe von denen der Kontrollgruppe abgezogen und in die Gleichung  $n$ -fache Expression (Kontrollgruppe zu Testgruppe) =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  eingesetzt.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{Kontrollgruppe}} - \Delta C_{T_{Testgruppe}} \quad (3.13)$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.14)$$

Dabei bedeutet:

Ratio = relative Expressionsrate bzw. FC-Wert

Bei dem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell werden nun zusätzlich die einzelnen Effizienzen von Zielgenen und Referenzgenen mit berücksichtigt (Pfaffl 2001).

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen} \Delta C_T (Zielgen) (Kontrolle - Behandlung)}{E_{Referenzgen} \Delta C_T (Referenzgen) (Kontrolle - Behandlung)} \quad (3.15)$$

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nur ein Kontrolltier und ein krankes Tier eingesetzt wurden, sondern zwei Gruppen (Kontrollgruppe und Testgruppe) miteinander verglichen werden sollen, musste die obenstehende Gleichung noch modifiziert werden. Dazu wurden von den  $C_T$ -Werten der Kontrolltiere (Kontrolle) sowie den  $C_T$ -Werten der Proben aus der Testgruppe (Behandlung) jeweils die arithmetischen Mittelwerte gebildet und eingesetzt.

Es gilt:

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen} \Delta C_T (Zielgen) (MW Kontrolle - MW Behandlung)}{E_{Referenzgen} \Delta C_T (Referenzgen) (MW Kontrolle - MW Behandlung)} \quad (3.16)$$

Um nun noch zu berücksichtigen, dass statt nur einem Referenzgen insgesamt drei Referenzgene zur Normalisierung eingesetzt wurden, musste die relative Expressionsrate auf das geometrische Mittel dieser drei Referenzgene bezogen werden.

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen} \Delta C_T (Zielgen) (MW Kontrolle - MW Behandlung)}{GM [E_{Referenzgen} \Delta C_T (Referenzgen) (MW Kontrolle - MW Behandlung)]} \quad (3.17)$$

Dabei bedeutet:

E = Effizienz

MW = arithmetischer Mittelwert

GM = geometrisches Mittel

Das Ergebnis wird als Ratio oder FC-Wert angegeben und beschreibt die normalisierte Expressionsrate des Zielgens in der Testgruppe als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des Zielgens in der Kontrollgruppe.

Um die normalisierten Expressionsraten einzelner Testproben bezogen auf die Kontrollgruppe zu berechnen, werden statt der Mittelwerte die einzelnen  $C_T$ -Werte der Proben in die oben stehende Gleichung eingesetzt.

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen} \Delta C_T (Zielgen) (MW Kontrolle - Behandlung)}{GM [E_{Referenzgen} \Delta C_T (Referenzgen) (MW Kontrolle - Behandlung)]} \quad (3.18)$$

Aufgrund der exponentiellen Berechnungsformel ist in dem Wertebereich von  $0,5 < FC < 2$  keine zuverlässige Aussage über die Genregulation möglich. Aus diesem Grund werden solche Werte als unverändert gegenüber der Kontrolle bewertet. Zeigt das GOI in der

Testgruppe / -probe einen FC-Wert von 0 bis 0,5 gegenüber der Kontrollgruppe, so gilt es als herabreguliert. Bei FC-Werten von über 2 ist das GOI in der Testgruppe / -probe gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert.

### 3.4 Statistik

Mit Hilfe statistischer Methoden sollte herausgefunden werden, ob die ermittelten Expressionsunterschiede der Zytokine zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen (Gruppe A und Gruppe B) und der Kontrollgruppe (gesunde Tiere, Gruppe R) bzw. zwischen beiden Versuchsgruppen statistisch signifikant sind. Dazu wurden zunächst mit Hilfe des Levene-Tests für jedes Zytokin die  $\Delta C_T$ -Werte der beiden zu vergleichenden Gruppen auf ihre Varianzhomogenität überprüft. Die Signifikanzen wurden basierend auf dem Median der  $\Delta C_T$ -Werte einer Gruppe berechnet. Das Signifikanzniveau lag dabei bei 5 % ( $p = 0,05$ ). Das bedeutet, bei Signifikanzen basierend auf dem Median mit  $p > 0,05$  sind die Varianzen der beiden untersuchten Gruppen gleich. Diese Varianzhomogenität stellt eine Voraussetzung dar für jede folgende Varianzanalyse. Außerdem lässt sich bei bekannter Varianzhomogenität davon ausgehen, dass statistische Signifikanzen tatsächlich auf eine unterschiedliche Lage der Verteilung und nicht auf unterschiedliche Varianzen zurückzuführen ist.

Zur Varianzanalyse wurde der Kruskal-Wallis-Test für ordinal skalierte, nicht normalverteilte Daten bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben angewendet. Eingesetzt wurden wieder die  $\Delta C_T$ -Werte der einzelnen Zytokine. Auch hier lag das Signifikanzniveau bei 0,05. Ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen den drei Gruppen lag demnach bei  $p < 0,05$  vor. Der Kruskal-Wallis-Test erlaubt eine Aussage darüber, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen besteht. Um herauszufinden, welche zwei Gruppen sich im speziellen unterscheiden, wurde anschließend ein Paarvergleich mit Hilfe des Bonferroni post hoc Test durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Korrektur auf multiples Testen mittels einer False Discovery Rate (FDR) von 5 % durch das Benjamini-Hochberg-Verfahren angewendet.

Sowohl der Levene-Test als auch der Kruskal-Wallis-Test wurden mit Hilfe des Software-Programms SPSS (Version 20) durchgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der histologischen Methoden**

#### **4.1.1 Immunhistochemischer Nachweis von MHC-II-Molekülen, CD3 (T-Zellen) und Pax-5 (B-Zellen)**

Mittels spezifischer Antikörper sollten die an den Entzündungsvorgängen im Gehirn der Taube in der zweiten Phase der Erkrankung beteiligten Zellen näher charakterisiert werden. Drei Antikörper wurden erfolgreich auf eine Kreuzreaktivität mit der Taube getestet und eingesetzt. Der Antikörper *2G11* ist gegen das MHC-II-Molekül gerichtet, welches auf der Oberfläche von nahezu allen antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird. Der Antikörper *CD3* reagiert mit der  $\epsilon$ -Kette des CD3-Rezeptors und ermöglicht damit den Nachweis von T-Zellen. Der als *Pax-5* bezeichnete Antikörper bindet an den sowohl in Pro- und Prä-B-Lymphozyten als auch in reifen B-Lymphozyten vorkommenden Transkriptionsfaktor Pax-5 und dient damit als B-Zell-Marker.

Für MHC-II zeigte sich immunhistochemisch bei allen untersuchten Tieren der Gruppe 2 (siehe Tabelle 17) ein stark positives Signal im Gebiet von ausgeprägter Entzündungszellinfiltration rund um Blutgefäße im Virchow-Robin-Raum. Verstärkt zeigte es sich auch in Gebieten mit Nekrosen, mit Betonung einzelner Entzündungszellen sowie Gliazellansammlungen (Abbildung 1).

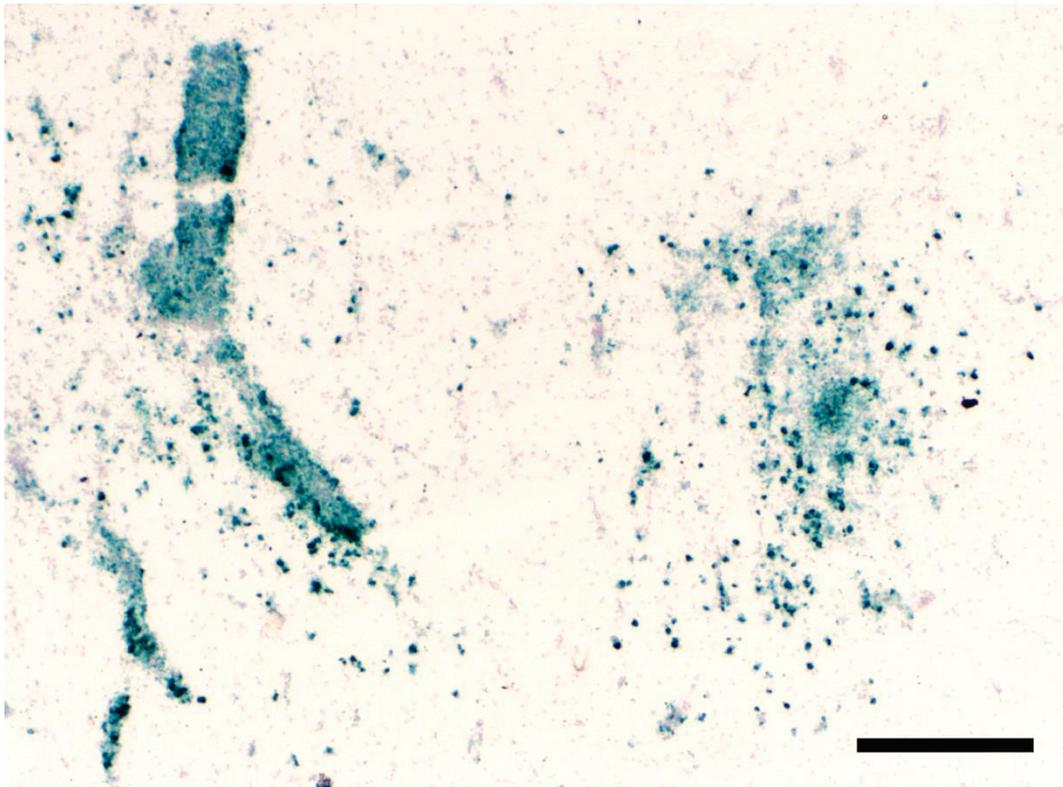


Abbildung 1: Beispielhafte immunhistochemische Darstellung der MHC-II-positiven Gebiete des Gehirns der Taube Nummer 10 mit typischen Läsionen während der zweiten, neurologischen Erkrankungsphase. Die Betonung des positiven Signals liegt klar im Bereich perivaskulärer Immunzellinfiltrate (links) und von Nekrosegebieten mit Gliazellansammlung und Entzündungszellinfiltration (rechts). Türkis = immunhistochemisches Reaktionsprodukt aus HistoGreen; Blau = Hämatoxylin-Gegenfärbung zur besseren Strukturdarstellung. Balken: 200  $\mu\text{m}$ .

Der immunhistochemische Nachweis von B- und T-Zellen mit Hilfe der gegen CD3 und Pax-5 gerichteten Antikörper erbrachte bei allen untersuchten Tieren der Gruppe 2 ein einheitliches Ergebnis. In den entzündlich veränderten Arealen des Cerebrums und insbesondere um Blutgefäße konnten maßgeblich CD3-positive Zellen (T-Zellen) und nur wenige B-Zellen (Pax-5-positiv) dargestellt werden (Abbildung 2).

Für eine Übersicht der immunhistochemischen Befunde der einzelnen getesteten Tiere siehe Tabelle 17 im Anhang.

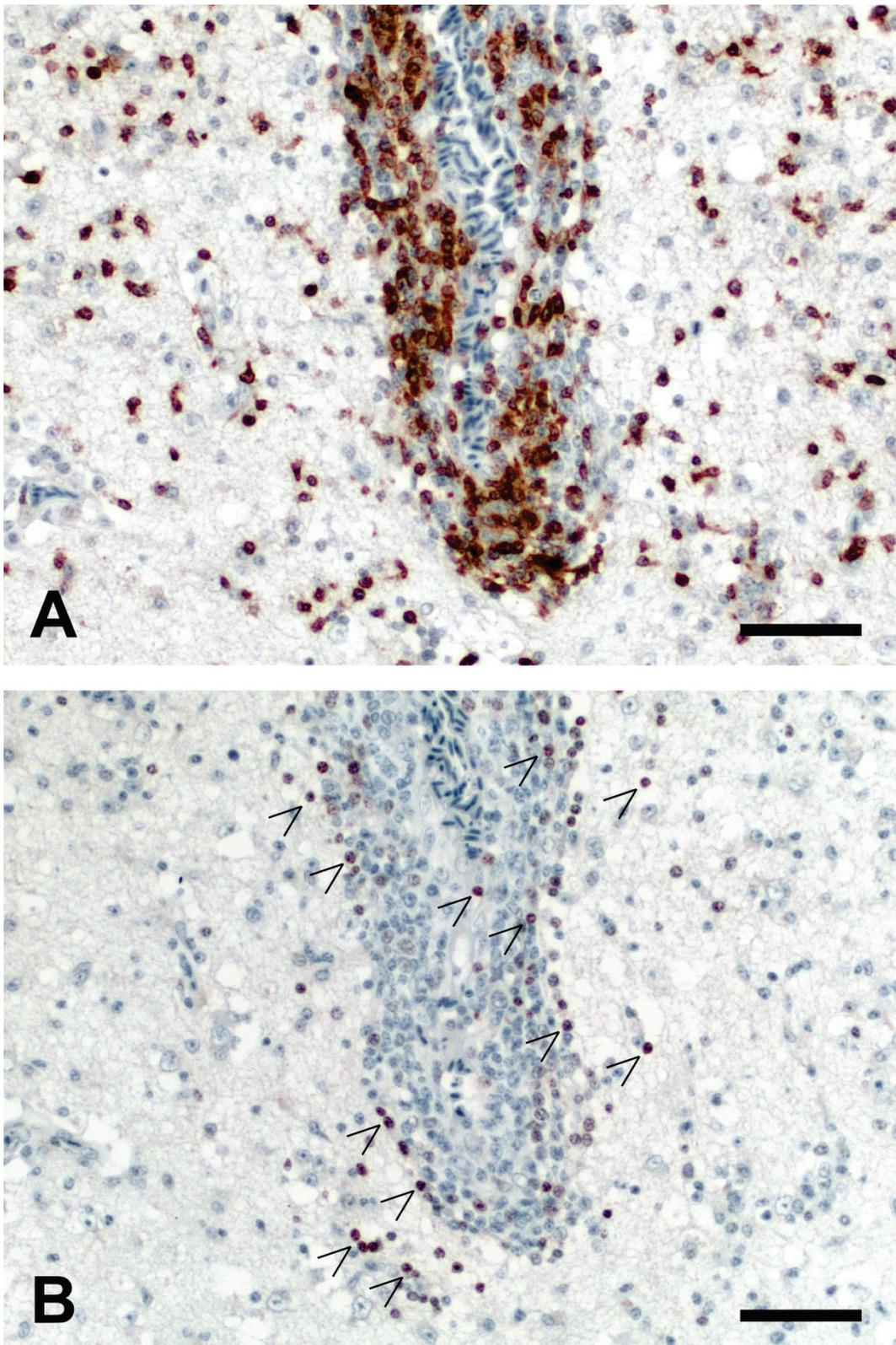


Abbildung 2: Beispielhafte immunhistochemische Darstellung von CD3-positiven T-Zellen (A) und Pax-5-positiven B-Zellen (B), dargestellt im Bereich um dasselbe Blutgefäß der Taube Nummer 12. Beachtenswert ist die deutliche Dominanz der T-Lymphozyten. Pfeile: positiv angefärbte B-Zellen. Braun = immunhistochemisches Reaktionsprodukt aus Diaminobenzidin; Blau = Hämatoxylin-Gegenfärbung zur besseren Strukturdarstellung. Balken: 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.1.2 Sarkosporidien-Nachweis

### 4.1.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von *Sarcocystis calchasi*

Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) sollten die vorliegenden Cerebrum-Proben der mit *S. calchasi* infizierten Tiere auf das Vorhandensein des Erregers untersucht werden. Dazu wurden Serienschnitte der Gewebeproben angefertigt und mit Hilfe eines spezifischen polyklonalen Antikörpers der Parasit unter Verwendung des Farbstoffes DAB braun angefärbt. Anschließend wurden die Schnittpräparate lichtmikroskopisch durchgemustert. Insgesamt konnten in insgesamt 4 von 8 Tieren aus der ersten Erkrankungsphase und in 3 von 7 Tieren aus der zweiten Erkrankungsphase Parasitenstadien nachgewiesen werden (Tabelle 9). In den Proben aus der ersten Phase handelte es sich ausschließlich um Schizonten (beispielhaft dargestellt in Abbildung 3), in der zweiten Phase allein um Gewebszysten (beispielhaft dargestellt in Abbildung 4) des Erregers. Auffällig war, dass der Parasit in beiden Phasen immer areaktiv im Gewebe lokalisiert war und nicht assoziiert mit Gewebsläsionen oder Entzündungszellinfiltraten.

Tabelle 9: Sarkosporidien-Nachweis mittels IHC

Taube	Schizonten	Zysten
<i>Gruppe A</i>		
2	1	0
3	1	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	3	0
8	1	0
9	0	0
<i>Gruppe B</i>		
10	0	8
11	0	2
12	0	0
14	0	0
15	0	0
L60	0	4
L74	0	0

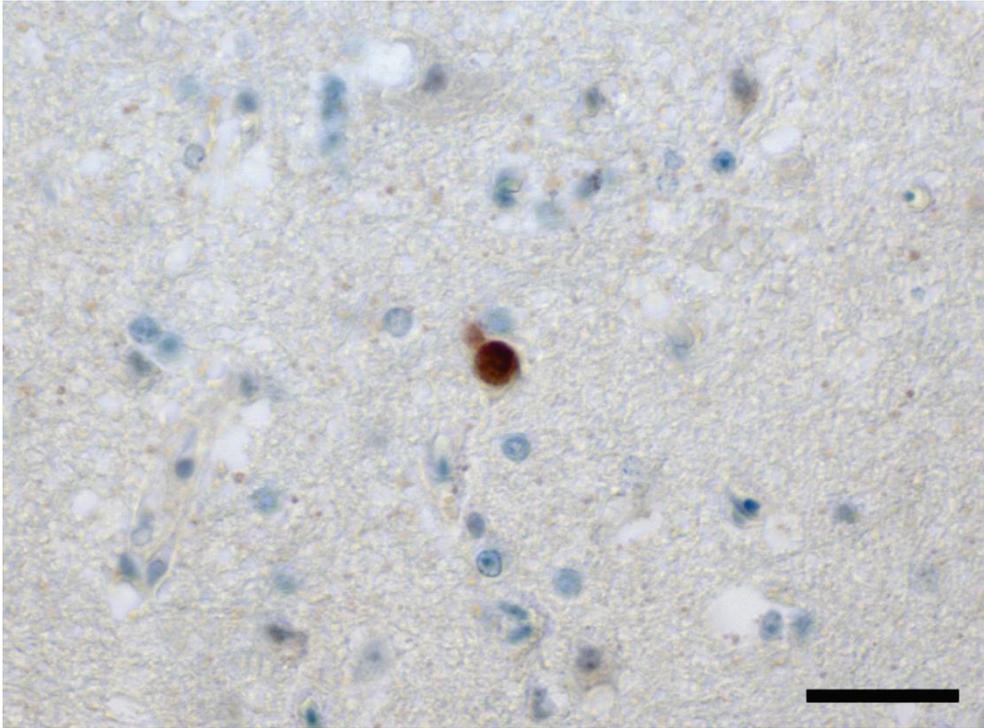


Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung eines reaktionslosen Schizonten von *S. calchasi* im Cerebrum der Taube Nummer 7 (Gruppe 1) während der ersten Krankheitsphase. Braun = immunhistochemisches Reaktionsprodukt aus Diaminobenzidin; Blau = Hämatoxylin-Gegenfärbung zur besseren Strukturdarstellung. Balken: 30  $\mu\text{m}$ .

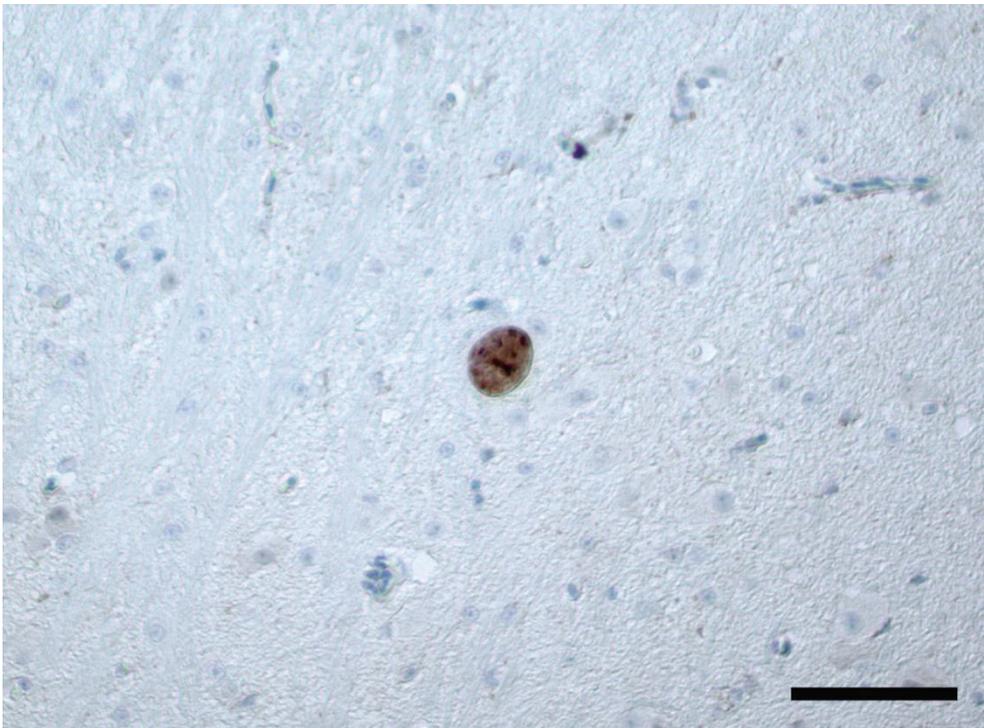


Abbildung 4: Immunhistochemische Darstellung einer reaktionslosen Gewebszyste von *S. calchasi* im Cerebrum der Taube Nummer L60 (Gruppe 2) während der zweiten Krankheitsphase. Braun = immunhistochemisches Reaktionsprodukt aus Diaminobenzidin; Blau = Hämatoxylin-Gegenfärbung zur besseren Strukturdarstellung. Balken: 30  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Methoden

### 4.2.1 RNA-Konzentration und RNA-Integrität

Die spektralphotometrische Messung der RNA-Proben ergab bei allen Proben eine ausreichende Konzentration. Diese betrug im Durchschnitt 629,4 ng/μl. Die maximale Extinktion aller Proben lag bei 260 nm. Der A 260/280-Quotient lag im Schnitt bei 2,2 jedoch nie unter 2,0. Anhand dieser Ergebnisse wurden die Proben als reine RNA-Lösungen beurteilt.

Die RNA integrity number (RIN) betrug für die RNA-Proben im Durchschnitt 8,95. Keine Probe zeigte eine RIN < 5, womit keine Probe aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden musste. Insgesamt lässt sich anhand der Ergebnisse feststellen, dass die RNA-Proben einer nur sehr gering ausgeprägten Degradation unterlagen und insgesamt eine sehr gute Qualität aufwiesen.

Die Messergebnisse für die einzelnen Proben sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA-Proben

Probenbezeichnung	RNA-Konzentration (ng / $\mu$ l)	Reinheit (A260 / A280)	RIN
<i>Gruppe R</i>			
r1	1688,0	2,2	9,2
r2	770,0	2,2	9,3
r3	754,4	2,1	9,0
r4	941,9	2,2	9,0
r5	687,7	2,1	8,8
<i>Gruppe 1</i>			
2	717,8	2,2	9,0
3	645,3	2,2	8,7
4	406,7	2,2	8,8
5	856,5	2,2	8,2
6	263,8	2,2	9,3
7	577,8	2,2	8,4
8	592,5	2,2	9,1
9	802,0	2,2	8,4
<i>Gruppe 2</i>			
L59	465,1	2,2	9,2
L60	466,6	2,2	9,1
10	581,8	2,1	9,5
11	643,0	2,1	9,3
12	400,3	2,2	9,3
14	579,8	2,1	9,0
15	578,7	2,2	9,0
L70	579,8	2,1	8,7
L71	560,6	2,1	8,9
L72	443,3	2,2	8,7
L73	482,3	2,2	8,7
L74	465,4	2,2	9,0
<i>Kontrolltiere</i>			
L61	329,2	2,1	9,2
L62	514,0	2,1	8,9

#### 4.2.2 Nachweis von Sarkozysten-DNA mit Hilfe der *semi-nested*-PCR

Zum Nachweis des Erregers *S. calchasi* in den Cerebrumproben der Versuchstiere und Kontrolltiere wurde eine qualitative PCR in Form einer *semi-nested*-PCR verwandt. In allen Gewebeproben der experimentell infizierten Tiere mit Ausnahme von Taube Nummer 14 (Gruppe B) konnte ein spezifisches DNA-Produkt amplifiziert werden (Abbildung 5). Bei allen Kontrolltieren konnte kein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass sowohl in der ersten als auch in der zweiten Phase der Erkrankung Parasiten-DNA in den Gewebeproben vorhanden ist. Das Ergebnis erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob der Parasit tatsächlich im Nervengewebe vorliegt, oder etwa in Endothelien von Blutgefäßen oder als Bruchstücke von vorhergegangenen Phagozytosevorgängen.

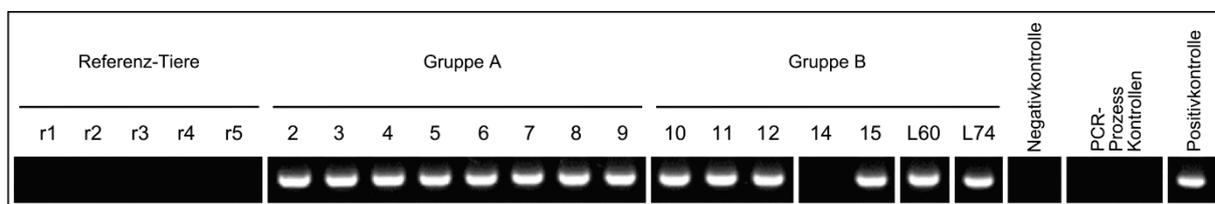


Abbildung 5: Nachweis von *S. calchasi* DNA der ITS1 Region in Gehirnen der Tauben mittels spezifischer *semi-nested*-PCR Primer. Alle Tauben der Gruppe A (Nummer 2 bis 9) und der Gruppe B (Nummer 10-12, 15, L60 und L74) mit Ausnahme von Nummer 14 zeigten ein positives Signal. Alle fünf Referenztauben, die Negativkontrolle und beide Prozess-Kontrollen (L61, L62) waren negativ in der PCR.

#### 4.2.3 Primer-Planung

Im Folgenden sollen die etablierten Primer zum Nachweis der Referenzgene wie auch der zu untersuchenden Zytokine und Chemokine dargestellt werden (Tabelle 11 und Tabelle 12). Zudem geht aus der folgenden Tabelle die Lokalisation des jeweils angestrebten Amplifikates innerhalb der mRNA-Sequenz des Huhns hervor.

Tabelle 11: Etablierte Primer für den Nachweis der Referenzgene

Referenz-gen	Orientierung	Sequenz	Lokalisation (Basenpaare)	Accession-No.**
β-actin	sense	AAGGACCTGTACGCCAACAC	939 - 958*	gi 45382926 NM_205518.1
	antisense	CCTGCTTGCTGATCCACATC	1130 - 1149*	
GAPDH	sense	GTGGTGCTAAGCGTGTTATCATC	395 - 417	gi 2687660 AF036934.1
	antisense	GGCAGCACCTCTGCCATC	646 - 663	
Gusb	sense	GGGGCAAACCTCCTTCCG	1182 - 1198*	gi 86129535 NM_001039316.1
	antisense	CATTGGCTACTGACCACATCAC	1383 - 1404*	
HMBS	sense	CTGGCCCGGATTGAGAC	98 - 114*	gi 118101809 XM_417846.2
	antisense	GCTCTTTGGTGAAGAGGCTC	232 - 251*	

Tabelle 11 (Fortsetzung): Etablierte Primer für den Nachweis der Referenzgene

Referenzgen	Orientierung	Sequenz	Lokalisation (Basenpaare)	Accession-No.**
HPRT	sense	GATGAACAAGGTTACGACCTGGA	84 - 106*	gi 45382332 NM_204848.1
	antisense	TATAGCCACCCTTGAGTACACAGAG	240 - 264*	
RPL-13	sense	CCACAAGGACTGGCAGCG	70 - 87*	gi 45384527 NM_204999.1
	antisense	ACGATGGGCCGGATGG	189 - 204*	
RPL19	sense	CCTGGATGAGGAGGATGCG	313 - 331*	gi 71896334 NM_001030929.1
	antisense	CGCTTGTTCTTGAACACGTTAC	418 - 439*	
RPS7	sense	TAGGTGGTGGCAGGAAAGC	186 - 204*	gi 118088899 XM_001234734.1
	antisense	TTGGCTTGGGCAGAATCC	324 - 341*	
TFRC	sense	GCCCTGAATGACAGGATGATG	2143 - 2163*	gi 45383949 NM_205256.1
	antisense	GTCCACGTCGCTAGGGCC	2331 - 2348*	
Ywhaz	sense	GTGGAGCAATCACAACAGGC	507 - 526*	gi 71897034 NM_001031343.1
	antisense	GCGTGCGTCTTTGTATGACTC	708 - 728*	

\* = Lokalisation basierend auf der Gensequenz des Huhns (*Gallus gallus*)

\*\*= Gensequenz, auf dessen Grundlage die Primer-Lokalisation bestimmt wurde

Tabelle 12: Etablierte Primer für den Nachweis der Zielgene (GOI)

Zielgen	Orientierung	Sequenz	Lokalisation (Basenpaare)	Accession-No.**
IL-1 $\beta$	sense	CGAGAGCAGCTACGCCG	303 - 319	gi 88702691 DQ393270.1
	antisense	GCCGCTCAGCACACACG	557 - 573	
IL-6	sense	CTGCCAAGGTGACGGAG	350 - 367*	gi 302315692 HM179640.1
	antisense	CCAGGTGCTTTGTGCTGTAGC	506 - 526*	
IL-7	sense	CAGAGTATCGTGACAGATGCTGC	167 - 189*	gi 83721987 NM_001037833.1
	antisense	ATGAGACTAATGCTGCTTTCCTTC	317 - 340*	
IL-8	sense	CAAGACGTGAAGCTGACACAGAG	145 - 167	gi 88702701 DQ393275.1
	antisense	GGTGCATCAGAATTGAGTTGAG	284 - 305	
IL-12	sense	AGTGAAGGAGTTCCCAGATGC	228 - 248*	gi 76593832 DQ202328.1
	antisense	TTCCAGAGTAGTTCTTTGCCTCAC	392 - 415*	
IL-15	sense	GAATGCCAGGAACCTGTAATG	300 - 320*	gi 303303464 HQ005358.1
	antisense	GCATTCCCTCTGTATAACCTTTAC	522 - 545*	
IL-18	sense	GCCAGTTGCTTGTGGTTCG	138 - 156	GU140077.1 (columba livia)
	antisense	TCTACCTGGACGCTGAATGC	278 - 297	
IFN-gamma	sense	CAGATGTAGCTGACGGTGGAC	137 - 157	gi 94421206 DQ479967.1
	antisense	GCTCATGCACAGCTTTGCG	394 - 412	

Tabelle 12 (Fortsetzung): Etablierte Primer für den Nachweis der Zielgene (GOI)

Zielgen	Orientierung	Sequenz	Lokalisation (Basenpaare)	Accession-No.**
LITAF	sense	CCCATCTGCACCACCTTCAT	198 - 217*	gi 45383601 NM_204267.1
	antisense	TGCTGCACATACACAGTCTGAAC	355 - 377*	
TGF- $\beta$ 2	sense	GAAGAAGCGTGCTCTAGATGC	891 - 911*	ENSGALT00000015664 (Huhn)
	antisense	CATTTCCAGCCAAGATCCC	977 - 995*	
TL1A	sense	CCTGAGTTATTCCAGCAACGCA	408 - 429*	gi 66793446 NM_001024578.1
	antisense	ATCCACCAGCTTGATGCTACTAAC	679 - 702*	

\* = Lokalisation basierend auf der Gensequenz des Huhns

\*\*= Gensequenz, auf dessen Grundlage die Primer-Lokalisation bestimmt wurde

#### 4.2.4 Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethoden

Im Rahmen der Etablierungsarbeiten wurden für jedes nachzuweisende Gen die Effizienz, die Sensitivität und Spezifität sowie der spezifische Schmelzpunkt des jeweiligen spezifischen PCR-Produktes bestimmt (siehe Kapitel 3.3.8, S. 63). Das Temperaturoptimum für die Hybridisierung und Neustrangsynthese betrug bei allen etablierten Assays 58 °C. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden im Anschluss an das RT-qPCR-Experiment mittels Sequenzanalyse untersucht und damit die Spezifität des Assays überprüft. Zur Bestimmung der Effizienz und zur Kontrolle der Sensitivität des jeweiligen RT-qPCR-Ansatzes wurde eine 7-stufige  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe des entsprechenden PCR-Produkts als Proben-DNA (*template-DNA*) mit den entsprechenden Primern in RT-qPCR-Experimenten eingesetzt, wobei die Effizienz anhand von mindestens vier zusammenhängenden Verdünnungsstufen bestimmt wurde.

##### 4.2.4.1 Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethoden für die Referenzgene

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Etablierungsarbeiten für die RT-qPCR-Assays der zehn Referenzgene der Taube in der Übersicht (Tabelle 13). Nachfolgend werden die Ergebnisse zu den einzelnen Referenzgenen detailliert dargestellt.

Tabelle 13: Etablierte Referenzgene

Referenzgen	Produktlänge (bp)	Effizienz (%)	Slope	Sensitivität (fg)	Schmelzpunkt (°C)
$\beta$ -actin	211	91,8	-3,536	0,01	85,2
GAPDH	269	78,3	-3,981	0,01	84,1
GUSB	223	92,2	-3,523	0,01	84,1

Tabelle 13 (Fortsetzung): Etablierte Referenzgene

Referenzgen	Produktlänge (bp)	Effizienz (%)	Slope	Sensitivität (fg)	Schmelzpunkt (°C)
HMBS	154	96,3	-3,414	0,01	83,1
HPRT	181	102,1	-3,273	0,01	80,5
RPL13	135	92,0	-3,529	0,1	89,3
RPL19	127	94,4	-3,465	0,01	82,6
RPS7	156	97,7	-3,378	0,01	79,5
TFRC	206	87,3	-3,668	0,01	85,1
Ywhaz	222	93,9	-3,476	0,01	79,5

bp = Basenpaare; fg = Femtogramm

### RT-qPCR Assay Etablierung für $\beta$ -actin

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von  $\beta$ -actin wurde eine Effizienz von 91,8 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 85,2 °C. Die ermittelte Sequenz des RT-qPCR-Produktes wurde wie im Folgenden auch mit Hilfe des Software-Programmes GeneDoc (Version 2.7) einem Sequenzvergleich mit der bekannten cDNA-Sequenz des  $\beta$ -actin des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_205518.1) unterworfen (siehe Abbildung 6). Die cDNA-Sequenzen sind zu 96 % identisch. Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,024.

```

      880          *          900          *          920          *          940
G. gallus : AGTCCTGTGGTATCCATGAAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGATGTGGATATCCGT AAGGATCTGTA : 949
seq b-act : ----- AAGGACTGTA : 11
                AAGGA CTGTA

      *          960          *          980          *          1000          *          1020
G. gallus : TGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGTACCACAATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACA : 1022
seq b-act : CGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGTACCACAATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACA : 84
                GCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGTACCACAATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACA

      *          1040          *          1060          *          1080          *
G. gallus : GCCCTGGCACCAGCACAATGAAAATCAAGATCATTGCCCCCCTGAGCGCAAGTACTCTGTCTGGATGGAG : 1095
seq b-act : GCCCTGGCACCAGCACAATGAAAATCAAGATCATTGCCCCCCTGAGCGCAAGTACTCTGTCTGGATGGAG : 157
                GCCCTGGCACCAGCACAATGAAAATCAAGATCATTGCCCCCCTGAGCGCAAGTACTCTGTCTGGATGGAG

      1100          *          1120          *          1140          *          1160
G. gallus : GCTCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAATCCGGACC : 1168
seq b-act : GCTCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGG----- : 211
                GCTCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGG

```

Abbildung 6: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des  $\beta$ -actin des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für GAPDH

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von GAPDH wurde eine Effizienz von 78,3 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 84,1 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 100 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des GAPDH der Haustaube (*Columba livia*; GenBank Accession No. AF036934) und zu 94 % mit der des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_204305.1; Abbildung 7). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,069.

```

G. gallus : CATGGAGAAGGCTGGGGCTCATCTGAAGGCTGGTGCTAAGCGTGTATCATCTCTGCCCCCAGCTGATGCC : 435
C. livia : CATGGAGAAGGCTGGGGCTCATCTGAAGGCTGGTGCTAAGCGTGTATCATCTCTGCCCCCAGCTGATGCT : 438
seq gapdh : -----GTGGTGCTAAGCGTGTATCATCTCTGCCCCCAGCTGATGCT : 44
          catggagaaggctggggctca ctgaaggctggtgctaaagcgtgtatcatctctgccccccagctgatgct

          40          *          460          *          480          *          500          *
G. gallus : CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA : 508
C. livia : CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA : 511
seq gapdh : CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA : 117
          CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA

          520          *          540          *          560          *          580
G. gallus : CCACCAACTGCCTGGCCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATCGTGGAGGGTCTTATGACCAC : 581
C. livia : CTACTAACTGCCTGGCCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATCGTGGAGGGTCTTATGACCAC : 584
seq gapdh : CTACTAACTGCCTGGCCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATCGTGGAGGGTCTTATGACCAC : 190
          CtActAACTGCCTGGCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATcGTGGAGGGTCTTATGACCAC

          *          600          *          620          *          640          *
G. gallus : TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT : 654
C. livia : TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT : 657
seq gapdh : TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT : 263
          TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT

          660          *          680          *          700          *          720          *
G. gallus : GCTGCCCAGAACATTAATCCAGCATCTACTGGAGCTGCTAAGGCTGTGGGAAAAGTCATCCCTGAGCTCAATG : 727
C. livia : GCTGCCCAGAACATTAATCCAGCATCTACTGGAGCTGCTAAGGCTGTGGGAAAAGTCATCCCTGAGCTCAATG : 730
seq gapdh : GCTGCCCagaaacat at ccagc tc actgg gctgctaaggctgtggg aaaagtcatcccctgagct aatg : 269
          GCTGCCCagaaacat at ccagc tc actgg gctgctaaggctgtggg aaaagtcatcccctgagct aatg

          *          380          *          400          *          420          *          4
C. livia : CATGGAGAAGGCTGGGGCTCACCTGAAGGCTGGTGCTAAGCGTGTATCATCTCTGCCCCCAGCTGATGCT : 438
seq gapdh : -----GTGGTGCTAAGCGTGTATCATCTCTGCCCCCAGCTGATGCT : 44
          GTGGTGCTAAGCGTGTATCATCTCTGCCCCCAGCTGATGCT

          40          *          460          *          480          *          500          *
C. livia : CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA : 511
seq gapdh : CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA : 117
          CCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAAAAGTATGACAAGTCCCTGAAAATGTGAGCAATGCCTCTTGCA

          520          *          540          *          560          *          580
C. livia : CTACTAACTGCCTGGCCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATCGTGGAGGGTCTTATGACCAC : 584
seq gapdh : CTACTAACTGCCTGGCCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATCGTGGAGGGTCTTATGACCAC : 190
          CTACTAACTGCCTGGCGCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTCGGCATCGTGGAGGGTCTTATGACCAC

          *          600          *          620          *          640          *
C. livia : TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT : 657
seq gapdh : TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT : 263
          TGTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACAGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGGATGGCAGAGGT

          660          *          680          *          700          *          720          *
C. livia : GCTGCCCAGAACATTAATCCAGCATCTACTGGAGCTGCTAAGGCTGTGGGAAAAGTCATCCCTGAGCTCAATG : 730
seq gapdh : GCTGCCC : 269
          GCTGCCC
  
```

Abbildung 7: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des GAPDH der Haustaube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten; Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für GUSB

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von GUSB wurde eine Effizienz von 92,2 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 84,1 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 91 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des GUSB des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_001039316.1; Abbildung 8). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,127.

```

G. gallus : *      1180      *      1200      *      1220      *      1240
seq gusb  : ----- GGGGCAAAC TCCTTCCG ACCAGCCACTACCCCTA GC GAGGAGATCATGGACCTGTG : 1241
              GGGGCAAAC TCCTTCCG ACCAGCCACTACCCCTA GC GAGGAGATCATGGACCTGTG : 61
              GGGGCAAAC TCCTTCCG ACCAGCCACTACCCCTA GC GAGGAGATCATGGACCTGTG G

G. gallus : *      1260      *      1280      *      1300      *
seq gusb  : ----- ACACCTACGGCAT GTGGTGATCGACGAGTG CCGGG GTGGG ATTAAT CCTGAGAGCTTTGGGAACAA : 1314
              ATCCTACGGCAT GTGGTGATCGACGAGTG CCGGG GTGGG ATTAAT CCTGAGAGCTTTGGGAACAA : 134
              A CCTACGGCAT GTGGTGATCGACGAGTG CCGGG GTGGG ATTAAT CCTGAGAGCTTTGGGAACAA

G. gallus : *      1320      *      1340      *      1360      *      1380
seq gusb  : ----- ATCTCTCAGCATCATCTCTGTGGTGATGGAGGAA CTGATCCGCAGGGATAAGAACAGGCC TC GTGTGTGATG : 1387
              GTCTTTCAGCATCATCTCTGTGGTGATGGAGGAA CTGATCCGCAGGGATAAGAACAGGCC TC GTGTGTGATG : 207
              TCT T CAGCATCATCT CT GTGTGATGGAGGAA CTGATCCGCAGGGATAAGAACAGGCC TC GT GTGTGATG

G. gallus : *      1400      *      1420      *      1440      *      1460
seq gusb  : ----- TGGTCAGTAGCCAATG AGCCGGCATCAGAGCTGCCCCAGCAGCTTACTACTCAAGACACTGATAGCTCACA : 1460
              TGGTCAGTAGCCAATG ----- : 223
              TGGTCAGTAGCCAATG
  
```

Abbildung 8: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des Gusb des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für HMBS

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von HMBS wurde eine Effizienz von 96,3 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 83,1 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 89 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des HMBS des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. XM\_417846.2; Abbildung 9). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,166.

```

G. gallus : *      80      *      100      *      120      *
seq. hmbs : ----- CGATCCGCGTGGGTACCCGCCGAGCCAG CTGGCCCGGATTCAGAC TGACAGCGTGGT GAGATGCTC : 136
              CTGGCCCGGATTCAGAC TGACAGCGTGGT GAGATGCTC : 39
              CTGGCCCGGATTCAGAC TGACAGCGTGGT GAGATGCTC

G. gallus : *      140      *      160      *      180      *      200
seq. hmbs : ----- CGTGAGTTTACCCTGACCTCTGCTTTGAGATTTGTTGCCATGTCTACA ACTGGAGACAAGATCTTAGA : 204
              CGTGAGTTTACCCTGACCTCTCACTTTGAGATCTGTTGCCATGTCAACGACCGGAGACAAGATTTTGA : 107
              CGTGAG T TACCCTGAC TC CTTT GAGAT GTT GCCATGT C AC AC GGAGACAAGAT TT GA

G. gallus : *      220      *      240      *      260      *
seq. hmbs : ----- TACAGCCTTTTCAAGAT TGGGAGAGAGAGCCTCTTACCCAAAGAGTGGAAAATGCACTTGAAAGGA : 272
              TACAGCCTTTTCAAGAT TGGGAGAGAGAGCCTCTTACCCAAAGAGC ----- : 154
              TACAGCCTTTTCAAGAT TGGGAGAGAGAGCCTCTTACCCAAAGAGC
  
```

Abbildung 9: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des HMBS des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für HPRT

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von HPRT wurde eine Effizienz von 102,1 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 80,5 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 95 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des HPRT des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_204848.1; Abbildung 10). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,072.

```

      *      80      *      100      *      120      *
G. gallus : ATCGTGATTGGCGATGATGAACAAGGTTACGACCTGGACTTGTTCGCATACCAAACATTATGCAGA : 136
seq hpert : -----GATGAACAAGGTTACGACCTGGACTTGTTCGCATACCAAACATTATGCAGA : 53
              GATGAACAAGGTTACGACCTGGACTTGTTCGCATACC AAACATTAT GCAGA

      140      *      160      *      180      *      200
G. gallus : CGATCTGGAGAAAGTCTATATCCTCATGGGCTCATCATGGACAGGACAGAGAGACTGGCACCTGAAA : 204
seq hpert : CGATTTGGAAAAAGTCTATATCCTCATGGGCTCATCATGGACAGGACGGAGAGGCTGGCACAGAGA : 121
              CGAT TGGAA AAAGTCTATAT CCTCATGGGCTCATCATGGACAGGAC GAGAG CTGGCACG GA A

      *      220      *      240      *      260      *
G. gallus : TTATGAAGGGCATGGGAGGACACCACATTGTAGCTCTCTGTGTACTCAAGGGTGGCTATAAATTTTTT : 272
seq hpert : TTATGAAGGGCATGGGAGGACACCACATTGTAGCTCTCTGTGTACTCAAGGGTGGCTATA----- : 181
              TTATGAAGGGCATGGGAGGACACCACATTGTAGCTCTCTGTGTACTCAAGGGTGGCTATA

```

Abbildung 10: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des HPRT des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für RPL13

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von RPL13 wurde eine Effizienz von 92,0 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,1 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 89,3 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 93 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des RPL13 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_204999.1; Abbildung 11). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,095.

```

      *      20      *      40      *      60      *
G. gallus : TTTTCCGTGGCGGGAGGCCCGAGCAGCCATGGCGCCAGCCGCAATGGCATGATCCTGAAGCCGCACTTCCACA : 74
seq RPL13 : -----CCACA : 5
              CCACA

      80      *      100      *      120      *      140
G. gallus : AGGACTGGCAGCGCGAGTGGCCACATGGTTCAACCAGCCGGCCCGCAAGATCCGCAGGAGGAAGGCCCGCCAG : 148
seq RPL13 : AGGACTGGCAGCGCGAGTGGCCACATGGTTCAACCAGCCGGCCCGCAAGATCCGCAGGAGGAAGGCCCGCCAG : 79
              AGGACTGGCAGCGCGAGTGGCCACATGGTTCAACCAGCCGGCCCGCAAGATCCGCAGGAGGAAGGCCCGCCAG

      *      160      *      180      *      200      *      220
G. gallus : GCAAGGCTCGCGCATCGCCCCCCGCCCGTGGCTGGGGCCATCCGGGCCATCGTGAGGTGCCCGACTGTCAG : 222
seq RPL13 : GCAAGGCTCGCGCATCGCCCCCCGCCCGTGGCTGGGGCCATCCGGGCCATCGT----- : 135
              GC AAGGCTCG CGCATCGC CCCC GCC CGT GCTGGGGCCATCCGGGCCATCGT

```

Abbildung 11: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des RPL13 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für RPL19

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von RPL19 wurde eine Effizienz von 94,4 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 82,6 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 96 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des RPL19 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_001030929.1; Abbildung 12). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,061.

```

      280          *          300          *          320          *          340
G. gallus : AGGGTACGGCCAACGCTCGTATGCCAGAGAAGGTGACCTGGATGAGGAGGATGCGGATTCCTCAGGCGCC : 345
seq RPL19 : -----CCTGGATGAGGAGGATGCGGATTCCTCAGGCGCC : 33
              CCTGGATGAGGAGGATGCGGAT CT AGGCGCC

          *          360          *          380          *          400          *
G. gallus : TGCTCCGCAGATACAGGGAGTCCAAGAAGATCGACCGCCATATGTATCACAGCCTGTACCTGAAGGTTA : 414
seq RPL19 : TGCTCCGCAGATACAGGGAGTCCAAGAAGATCGACCGCCATATGTATCACAGCCTGTACCTGAAGGTTA : 102
              TGCTCCGCAGATACAGGGAGTCCAAGAAGATCGACCGCCA ATGTA CACAGCCTGTACCTGAAGGT A

          420          *          440          *          460          *          480
G. gallus : AGGGTAACGTGTTCAAGAACAAGCGGATCCTGATGGAGCACATCCACAAGCTCAAGGCAGACAAAGCTC : 483
seq RPL19 : AGGGTAACGTGTTCAAGAACAAGCG----- : 127
              AGGGTAACGTGTTCAAGAACAAGCG
  
```

Abbildung 12: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des RPL19 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für RPS7

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von RPS7 wurde eine Effizienz von 97,7 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 79,5 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 97 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des RPS7 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. XM\_001234734.1; Abbildung 13). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,044.

```

      40          *          160          *          180          *          200
G. gallus : GGCTCAGCTGCGGGAGTTGAACATCACAGCAGCTAAGGAAATTGAAGTAGGTGGTGGCAGGAAAGCCAT : 207
seq RPS7 : -----TAGGTGGTGGCAGGAAAGCCAT : 22
              TAGGTGGTGGCAGGAAAGCCAT

          *          220          *          240          *          260          *
G. gallus : CATTATCTTCGTACCAGTTCCTCAGCTGAAATCTTTCCAGAAGATTCAGGTGCGGCTAGTTCGAGAGCT : 276
seq RPS7 : CATTATCTTCGTACCAGTTCCTCAGCTGAAATCTTTCCAGAAGATTCAGGTGCGGCTAGTTCGAGAGCT : 91
              CATTATCTTCGTACCAGTTCCTCAGCT AAATCTTT CAGAAGATTCAGGTGCGGCTAGTTCG GAGCT

          280          *          300          *          320          *          340
G. gallus : GGAGAAGAAATTCAGTGGCAAGCATGTGGTGTTCATTGCTCAGAGAAAGGATTCGCCCCAAGCCAAACGAG : 345
seq RPS7 : GGAGAAGAAATTCAGTGGCAAGCATGTGGTGTTCATTGCTCAGAGCAAGGATTCGCCCCAAGCCAA---- : 156
              GGAGAAGAAATTCAGTGG AAGCATGTGGTGTTCATTGCTCAGAG AAGGATTCGCCCCAAGCCAA
  
```

Abbildung 13: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des RPS7 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für TFRC

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TFRC wurde eine Effizienz von 87,3 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 85,1 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 88 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des TFRC des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_205256.1; Abbildung 14). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,170.

```

G. gallus : AAACAGTGACGGGGAGAACAGGGTCATCCGCAGGGCCCTGAATGACAGGATGATGAAGGTGGAGTATG : 2176
seq tfrc  : -----GCCCTGAATGACAGGATGATGAAGGTGGAGTATG : 34
              GCCCTGAATGACAGGATGATGAAGGTGGAGTATG

G. gallus : ACTTCCTGTCCCGTATCTCTCACCAAAAAGATGTCCCTTTGCGCCACATCTTCTTGGCAAAGGCCCC : 2244
seq tfrc  : ACTTCCTGTCCCGATACTCTCACCAAAAAGATGTCCCTTTGCGCCACATCTTCTTGGCAAAGGCTCC : 102
              ACTTCCT TCCCG TA CTCTCACCAAAAAGATGT CC TTTGCGCCACATCTTCTT GGCAAAGGC CC

G. gallus : CACACCCTGCGGAGTCTGCTGGAGCATCTGCAGCTCTTGAAAACCAACA-GGAGCAGCGTGGATCTGA : 2311
seq tfrc  : CACACCCTGCAGAGTCTGCTGGAGAACCTGGAGCAGCTGACAGCCAACAAGGAG-AGCGTGGAGCTGA : 169
              CACACCCTGC GAGTCTG TGGAG A CTG AGC G TGA A CCAACA GGAG AGCGTGGGA TGA

G. gallus : ACTTGCTGAGGGAGCAGCTGGCCCTAGCAACGTGGACCATTAAAGGGCGGCCAATGCCTTGGGAGGTTG : 2379
seq tfrc  : ACATGCTGAAAGAGCAGCTGGCCCTAGCAGCTGGAC----- : 206
              AC TGCTGA GAGCAGCTGGCCCTAGC ACGTGGAC

```

Abbildung 14: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des TFRC des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für Ywhaz

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von Ywhaz wurde eine Effizienz von 93,9 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 79,5 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 97 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des Ywhaz des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_001031343.1; Abbildung 15). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,028.

```

      480          *          500          *          520          *          540
G. gallus : GTTGCTGCTGGAGATGACAAGAAAGGGATTGTGGAGCAATCACAAACAGGCGTATCAAGAAGCTTTTGA : 544
seq ywhaz : -----GTGGAGCAATCACAAACAGGCGTATCAAGAAGCTTTTGA : 38
              GTGGAGCAATCACAAACAGGCGTATCAAGAAGCTTTTGA

          *          560          *          580          *          600          *
G. gallus : AATCAGTAAAAAGGAGATGCAGCCAACACATCCATCAGATTAGGTCTGGCTCTAAACTTCTCTGTGT : 612
seq ywhaz : AATCAGTAAAAAGGAGATGCAGCCAACACATCCATCAGATTAGGTCTGGCTCTAAACTTCTCTGTGT : 106
              AATCAGTAAAAAGGAGATGCAGCCAACACATCC ATCAGATTAGGTCTGGCTCTAAACTTCTCTGTGT

          620          *          640          *          660          *          680
G. gallus : TTTATTATGAGATTCTCAATTCCCCAGAGAAGGCCTGTTCCCTTGCAAAAACGGCTTTTGATGAAGCA : 680
seq ywhaz : TTTATTATGAGATTCTCAATTCCCCAGAGAAGGCCTGTTCCCTTGCAAAAACGGCTTTTGATGAAGCA : 174
              TTTATTATGAGATTCTCAA TCCCC GAGAA GCCTGTTCCCTTGCAAAAACGGCTTTTGATGAAGCA

          *          700          *          720          *          740
G. gallus : ATTGCTGAACTTGATACATTAAGTGAAGAGTCATACAAAGACAGCACGCTAATAATGCAGTTACTGAG : 748
seq ywhaz : ATTGCTGAACTTGATACATTAAGTGAAGAGTCATACAAAGACGCACGC----- : 222
              ATTGCTGAACTTGATACATTAAGTGAAGAGTCATACAAAGAC GCACGC

```

Abbildung 15: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des Ywhaz des Huhns (Primer eingerahmt).

#### 4.2.4.2 Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethoden für die Zielgene

Die folgende Tabelle (Tabelle 14) zeigt die Ergebnisse der Etablierungsarbeiten für die RT-qPCR-Assays der 11 Zielgene der Taube in der Übersicht, die im Folgenden dann einzeln im Detail erläutert werden.

Tabelle 14: Etablierte Zielgene

Zielgen	Produktlänge (bp)	Effizienz (%)	Slope (dR)	Sensitivität (fg)	Schmelzpunkt (°C)
IL-1	271	99,6	-3,331	0,01	88,7
IL-6	178	97,9	-3,374	0,01	80,6
IL-7	174	101,3	-3,292	0,01	76,8
IL-8	161	99,5	-3,333	0,01	82,6
IL-12	188	90,9	-3,562	0,1	79,0
IL-15	246	102,5	-3,263	0,1	76,9
IL-18	160	100,8	-3,303	0,1	81,6
IFN- $\gamma$	276	93,2	-3,497	0,01	80,0
LITAF	157	100,8	-3,303	0,01	83,6
TGF- $\beta$ 2	105	100,1	-3,320	0,01	78,5
TL1A	285	95,3	-3,439	0,01	82,6

bp = Basenpaare; fg = Femtogramm

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-1 $\beta$

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-1 $\beta$  wurde eine Effizienz von 99,6 % erreicht bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 88,7 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 100 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-1 $\beta$  der Taube (*Columba livia*; GenBank Accession No. DQ393270.1) und zu 86 % mit der des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. HM179638.1; Abbildung 16). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,176.

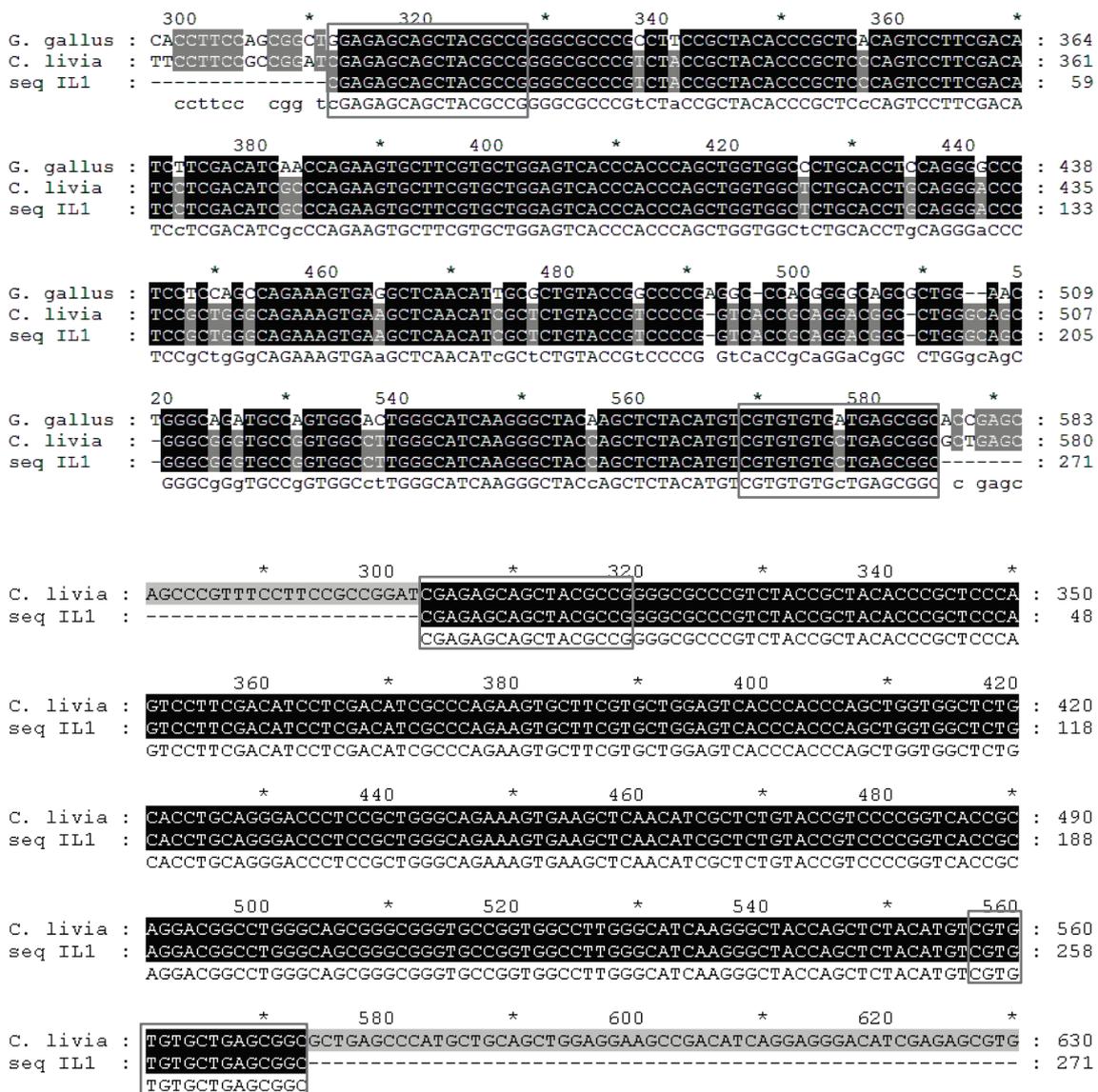


Abbildung 16: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-1 $\beta$  der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten; Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-6

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-6 wurde eine Effizienz von 97,9 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 80,6 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 81 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-6 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. HM179640.1; Abbildung 17). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,300.

```

G. gallus : CAACCTGCCCAAGGTGACGGAGGAGGACGGCTGCTGCTCGCCGGCTTCGACGAGGACAAATGCCTGAC : 414
seq IL6   : ----CTGCCCAAGGTGACGGAGGAGGACGGCTGCTGCTCGCCGGCTTCGATGAGGATAAATGCTTGAG : 65
          CTGCCCAAGGTGACGGAGGA GACGG TG CT TCGCCGGCTT GA GAGGA AAATGC TGA

G. gallus : GAAGCTCTCCAGCGGGCTTTTCCGCTTTTCAGACTTACCTGGAATTCATTCAGAGACTTTTCGATAGCGA : 483
seq IL6   : GAAATCTCCAGCGGGCTTTTACAGCTTTTCAGACTTACCTGGAATATGTAAGAAACTTTTATTAGTGA : 134
          GAA TCTCCAGCGG CT T C C TTTTCAGAC TACCT GAAT T AAGA ACTTT TAG GA

G. gallus : AAAGCAGAACGTCGACTCTCTGTGCTACAGCACAAAGCACCTGGCGGCCACGATCCGGCAGATGGTGAT : 552
seq IL6   : AAAGCAAAGCGTCGATTTCTGTGCTACAGCACAAAGCACCTGG----- : 178
          AAAGCA A CGTCGA T CTGTGCTACAGCACAAAGCACCTGG
  
```

Abbildung 17: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-6 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-7

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-7 wurde eine Effizienz von 101,3 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 76,8 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 93 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-7 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_001037833.1; Abbildung 18). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,111.

```

G. gallus : GACATCGAAGAGCTGGTAAATATGTCTGCAGAGTATCGTGACAGATGCTGCAAGAATAAAAACATGAA : 207
seq IL7   : -----CAGAGTATCGTGACAGATGCTGCAAGAATAAAAACATGAA : 41
          CAGAGTATCGTGACAGATGCTGCAAGAATAAAA ACATGAA

G. gallus : CATAATAAAGTGTTCTTCTGCAATGATACTCAGGAAATAGATCACTACAGAGTATGGCATGTAATATG : 276
seq IL7   : AATACCAAATGTTTCTTCTGCAATGATACTCAGGAAATAGATCACTACAGAGTATGGCATGTAACATG : 110
          ATA AAA TGTT TTCTGCAATGATACTCAGGAAATAG ATCACTACAGAGTATGGCATGTAA ATG

G. gallus : CTCAGATTCTTTAATAAGCAAAAAATCAACAAAGACTTACAAGGAAAGCAGCATTAGTCTCATGTGGG : 345
seq IL7   : CTCAGTTCTTTAATAAGCAAAAAATCAGCAAAGACTTACAAGGAAAGCAGCATTAGTCTCAT----- : 174
          CTCAG TTCTTT ATAAGCAAAAAATCA CAAAGA TT ACAAGGAAAGCAGCATTAGTCTCAT
  
```

Abbildung 18: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-7 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-8

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-8 wurde eine Effizienz von 99,5 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 82,6 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 100 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-8 der Taube (*Columba livia*; GenBank Accession No. DQ393275.1) und zu 89 % mit der des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. HM179639.1; Abbildung 19). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,117.

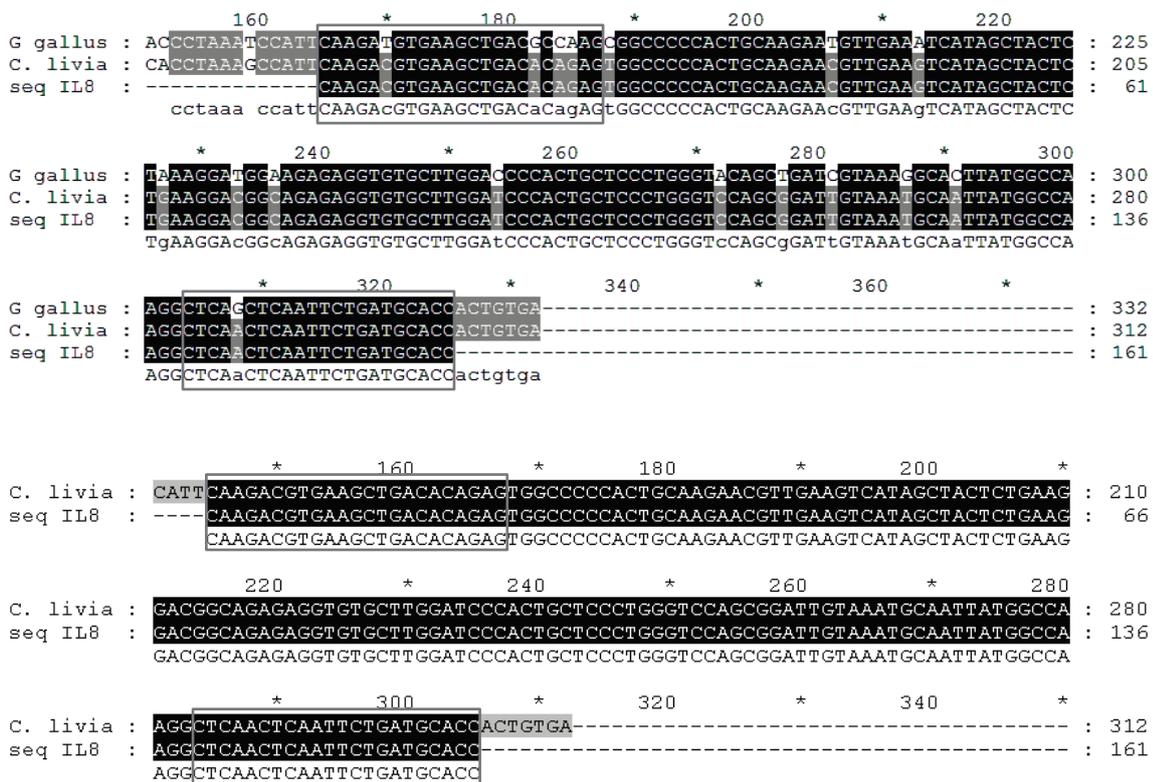


Abbildung 19: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-8 der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten; Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-12

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-12 wurde eine Effizienz von 90,9 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,1 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 79,0 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 87 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-12 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. DQ202328.1; Abbildung 20). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,194.

```

      *      220      *      240      *      260      *
G. gallus : GGAAAGACTCTGACCACCGAAGTGAAGGAGTTCCAGATGCTGGCAACTACACCTGCTGTCTGCTAA : 272
seq IL12  : -----AGTGAAGGAGTTCCAGATGCTGGCAACTACACCTCTCTGAGAGCTGA : 48
           AGTGAAGGAGTTCCAGATGCTGGCAACTACACCTG CTG GCT A

      280      *      300      *      320      *      340
G. gallus : GACCCACGAGATTATCAGCTACAGTTTCTTCTCATAACTAAAGTAGACTCAATGGGCAAATGATAC : 340
seq IL12  : TACCCATGAAATCATCAGCTATGAGTTCTTCTCATAACTAAAGTAGACTCAATGGGCAAATGATAA : 116
           ACCCA GA AT ATCAGCTA TTCTT CTCATAACTAAAGTAGACTC AATGGGCAAATGATA

      *      360      *      380      *      400
G. gallus : GGTCAATTCTGAAAAGCTATAAAGAGCCAAGCAAGACGTTCTTAAAAATGTGAGGCAAAGAACTACTCT : 408
seq IL12  : GGTCAATCTGACAAGCTTGAAGAGCCAAACAGACATTTTAAAAATGTGAGGCAAAGAACTACTCT : 184
           GGTCAAT CTGA AAGCT T AAGAGCCAA CA GAC TT TAAAAATGTGAGGCAAAGAACTACTCT

      *      420      *      440      *      460      *
G. gallus : GGAATTTTACATGTTTCATGGATGACAGAAAAATGAGAGTCCAAGTGTGAAGTTCACAATTAGGAGCCT : 476
seq IL12  : GGAA----- : 188
           GGAA

```

Abbildung 20: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-12 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-15

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-15 wurde eine Effizienz von 102,5 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,1 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 76,9 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 89 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-15 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. HQ005358.1; Abbildung 21). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,142.

```

      280      *      300      *      320      *      340
G. gallus : CTGCAAACACATACGAGGATATAGAATGCCAGGAACCTGTAATGAGATGTTTTTTT TAGAGATGAAAG : 345
seq IL15  : -----GAATGCCAGGAACCTGTAATGAGATGTTTTTTCTTAGAGATGAAAG : 46
           GAATGCCAGGAACCTGTAATGAGATG TTTTT TTAGAGATGAAAG

      *      360      *      380      *      400      *
G. gallus : TGATTCTTCACGAATGTATATCAAAAAATGTAGTAGGAAGCATGATGTACGGAACATATGGAAAAATG : 414
seq IL15  : TGATTCTTCAAGAAATGTATATCAAAAAATGCAGTAAACACAGGATGTATTGAACATATGGAAAAACG : 115
           TGATT TTCA GAATGT ATATCAAAAA TG AGTA A CA GATGTA GAACATATGGAAAAA G

      420      *      440      *      460      *      480
G. gallus : GAAATGCAAGATTTGCAACTTACCAGTTGAATTCACAACAACAAAAAATGCAAAGAATGTGAAGAGT : 483
seq IL15  : GAAACGCAAGCTTAGAAAATAACAAGTCGAATTCACAACATCAGCAAAAATGCAAAGAATGTGAAGAGT : 184
           GAAA GCAAG TT G AA T AC AGT GAATTCACAACA CA AAAATGCAAAGAATGTGAAGAGT

      *      500      *      520      *      540      *
G. gallus : ATGAAGAAAAAATTTTACAGAATTTATACAGAGTTTTGTAAAGTTATACAGAGGGAATGCAAAAAAT : 552
seq IL15  : ATGAAGAAAAAATTTTACAGAATTTATACAGAGTTTTGTAAAGTTATACAGAGGGAATGC----- : 246
           ATGAAGAAAAAATTTTACAGAATTTATACAGAGTTTTGTAAAGTTATACAGAGGGAATGC

```

Abbildung 21: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-15 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IL-18

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IL-18 wurde eine Effizienz von 100,8 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,1 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 81,6 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 91 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IL-18 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. FJ882408.1; Abbildung 22). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,141.

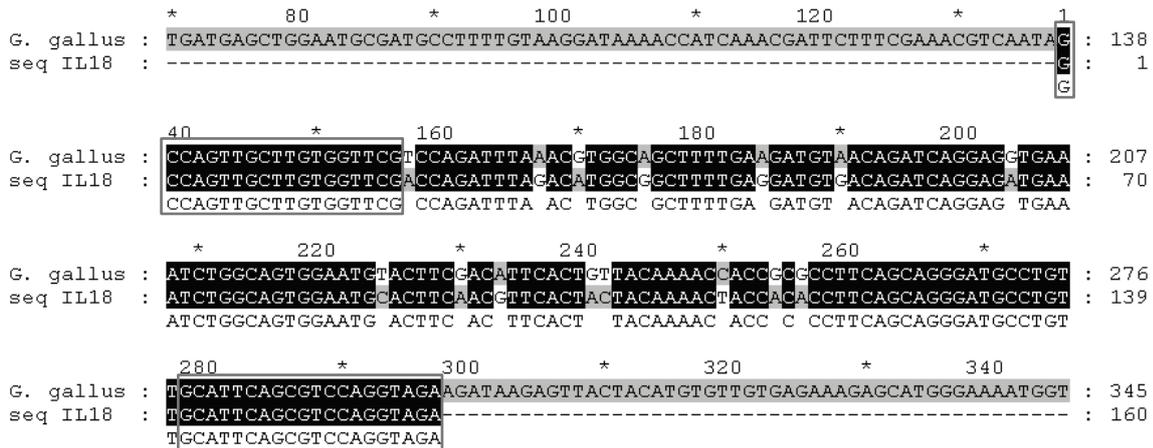


Abbildung 22: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-18 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für IFN- $\gamma$

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von IFN- $\gamma$  wurde eine Effizienz von 93,2 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 76,9 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 100 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des IFN- $\gamma$  der Taube (*Columba livia*; GenBank Accession No. DQ479967.1) und zu 85 % mit der des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. GQ421600.1; Abbildung 23). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,178.

```

      80          *          100          *          120          *          140
G. gallus : AAATCTTCTCAACTTCAAAGATGATATAGACAACCTGAAAGCTGACTTTAACTCAAGTCATT CAGAGGTAGCTG : 148
C. livia : AAATCTTCTCTCACTTCAAATGATATAGACAACCTAATAATCTGACTTTAACTCAAGTAAT CAGACGTAGCTG : 148
seq IFN-g : -----
aa tcttgc tca ctt aa atgatatagac aact aaa ctgactttaactcaagt att CAGAcGTAGCTG

      *          160          *          180          *          200          *          220
G. gallus : ACGGTGGACCTATTTTGTAGAGAACTGAAAGACTGGACAGAGAGAAATGACAAAAGGATCATCTGAGCCAG : 222
C. livia : ATGGTGGACCTATTTTACAGGCAAATTGACAGACTGGACAGAGAGAAATGAAAAGAGGATCATCTGAGCCAG : 222
seq IFN-g : ATGGTGGACCTATTTTACAGGCAAATTGACAGACTGGACAGAGAGAAATGAAAAGAGGATCATCTGAGCCAG : 86
AtGGTGGACCTATTTTAcAGGcAAAtTGAcagACTGGACAGAGAGAAATGAAaAGAGGATCATctTGAGCCAG

      *          240          *          260          *          280          *
G. gallus : ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACATCAACACATATCTGAGGA : 296
C. livia : ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACATCAACACATATCTGAGGA : 296
seq IFN-g : ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACATCAACACATATCTGAGGA : 160
ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACgTCAgACACATATCTGAGGA

      300          *          320          *          340          *          360          *
G. gallus : GCTTTATACTCTGAAAAACAGCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGCTGCAAGACCTCAAGGATCTGGCAAAGCTTC : 370
C. livia : GCTTTATACTCTGAAAAACAGCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGCTGCAAGACCTCAAGGATCTGGCAAAGCTTC : 370
seq IFN-g : GCTTTATACTCTGAAAAACAGCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGCTGCAAGACCTCAAGGATCTGGCAAAGCTTC : 234
aCTtTATACTCTGAAAAACAgCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGcTGcAAGAccTCAaGGATcTGGCaAAGCTTc

      380          *          400          *          420          *          440
G. gallus : AGATGAATGACTTGAAAACCTCAACGCAAAGCTGTGCATGAGCTTTTCAGTGTCTTACAAAACTGGTGGGATACT : 444
C. livia : AGATGAATGACTTGAAAACCTCAACGCAAAGCTGTGCATGAGCTTTTCAGTGTCTTACAAAACTGGTGGGATACT : 444
seq IFN-g : AGATGAATGACTTGAAAACCTCAACGCAAAGCTGTGCATGAGCTTTTCAGTGTCTTACAAAACTGGTGGGATACT : 276
aGATGAATGACTTGAAAACcTCAAcGCAAAGCTGTGcATGAGcT ttcag tcttaca aa ctggtggat ct

      80          *          100          *          120          *          140
C. livia : AAATCTTGTCTCACCTTGAAAATGATATAGACCAACTAAAATCTGACTTTAACTCAAGTAAT CAGACGTAGCTG : 148
seq IFN-g : -----
CAGACGTAGCTG
CAGACGTAGCTG

      *          160          *          180          *          200          *          220
C. livia : ATGGTGGACCTATTTTACAGGCAAATTGACAGACTGGACAGAGAGAAATGAAAAGAGGATCATCTGAGCCAG : 222
seq IFN-g : ATGGTGGACCTATTTTACAGGCAAATTGACAGACTGGACAGAGAGAAATGAAAAGAGGATCATCTGAGCCAG : 86
ATGGTGGACCTATTTTAcAGGcAAAtTGAcagACTGGACAGAGAGAAATGAAAaAGAGGATCATctTGAGCCAG

      *          240          *          260          *          280          *
C. livia : ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACATCAACACATATCTGAGGA : 296
seq IFN-g : ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACATCAACACATATCTGAGGA : 160
ATTGTTTCCATGTAAGTACTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCGGCACgTCAgACACATATCTGAGGA

      300          *          320          *          340          *          360          *
C. livia : ACTTTATACTCTGAAAAACAGCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGCTGCAAGACCTCAAGGATCTGGCAAAGCTTC : 370
seq IFN-g : ACTTTATACTCTGAAAAACAGCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGCTGCAAGACCTCAAGGATCTGGCAAAGCTTC : 234
ACTTTATACTCTGAAAAACAGCCTTCTCTGATGGCTTAAAGAAGCTGCAAGACCTCAAGGATCTGGCAAAGCTTC

      380          *          400          *          420          *          440
C. livia : AGATGAATGACTTGAAAACCTCAACGCAAAGCTGTGCATGAGCTTTTCAGTGTCTTACAAAACTGGTGGGATACT : 444
seq IFN-g : AGATGAATGACTTGAAAACCTCAACGCAAAGCTGTGCATGAGCTTTTCAGTGTCTTACAAAACTGGTGGGATACT : 276
AGATGAATGACTTGAAAACcTCAAcGCAAAGCTGTGcATGAGcT

```

Abbildung 23: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IFN- $\gamma$  der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten; Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für LITAF

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von LITAF wurde eine Effizienz von 100,8 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 83,6 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 97 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des LITAF der Haustaube (*Columba livia*; GenBank Accession No. XM\_005508471.1), wobei die Unterschiede im Bereich der Primer liegen, welche auf Grundlage der cDNA-Sequenz des Huhns kreiert wurden, da zu diesem Zeitpunkt die Sequenz der Taube noch unbekannt war. Zu 69 % ist die cDNA-Sequenz des

RT-qPCR-Produktes mit der bekannten cDNA-Sequenz des LITAF des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_204267.1) identisch (Abbildung 24). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,310.

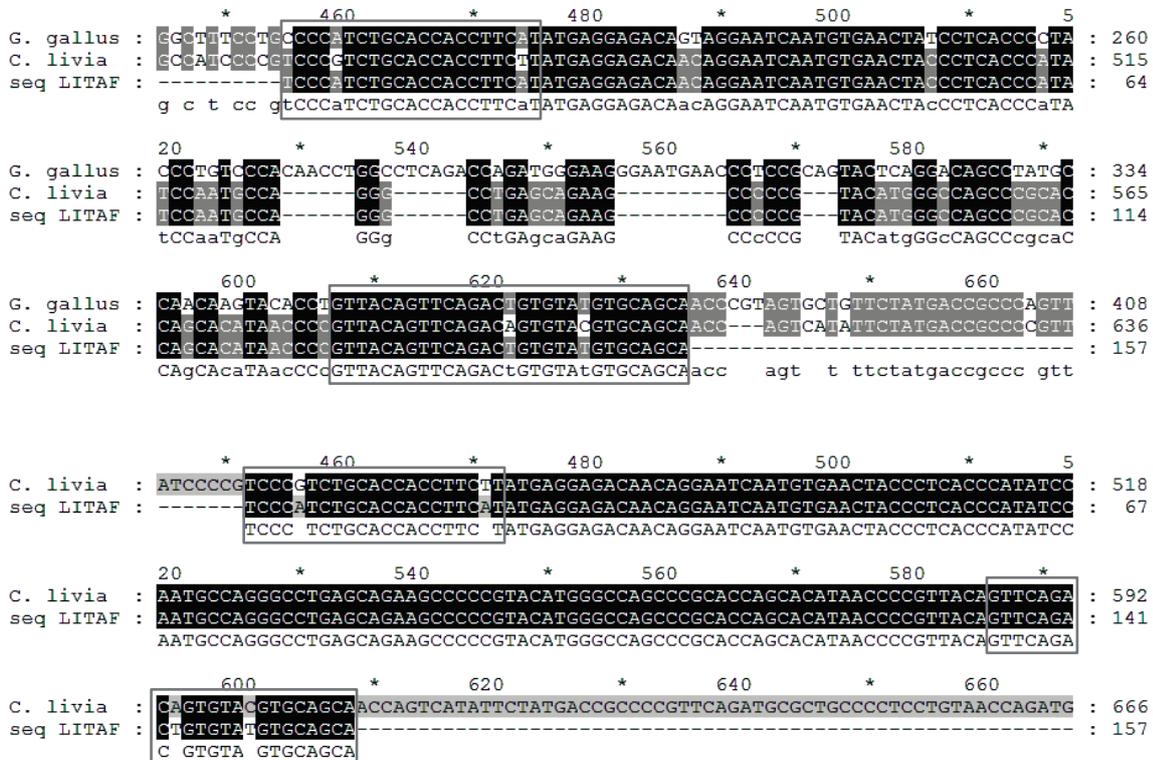


Abbildung 24: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des LITAF der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten; Primer eingerahmt).

Bei diesem Alignment erscheint der Unterschied zwischen der cDNA Sequenz der Taube und der des Huhns sehr groß, was die Frage aufwirft, ob es sich hierbei um ein Paralog statt einem Ortholog handelt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass sie sich in ihrer Funktionsweise voneinander unterscheiden müssen (Jensen 2001). Betrachtet man außerdem das gesamte Gen, so sind die für das LITAF kodierenden cDNA-Sequenzen beider Vogelarten zu 75 % identisch. Um zu gewährleisten, dass die richtigen Nukleotide miteinander verglichen wurden, wurde hier zusätzlich ein Alignment des LITAF von Huhn (GenBank Accession No. NP\_989598.1) und Taube (GenBank Accession No. XP\_005508528.1) sowie des RT-qPCR-Produktes auf Proteinebene durchgeführt (siehe Abbildung 25).

```

G. gallus : MSABSGFEA*PSAPPSYEETVGINVNYPHYPV*PQFGLRFDGKGMNPPCYSGQFEMPTSTPVTVQTVYVQ*QPVVLE : 74
C. livia  : MSABGAI*EVPSAPPSYEETVGINVNYPHYP*PMP--G--PEQK--PP--YMGQPA*PAHN*PVTVQTVYVQ*QPVI--E : 65
seq LITAF : -----PSAPPSYEETVGINVNYPHY*E*P*G--PEQK--PP--YMGQPA*PAHN*PVTVQTVYVQ*----- : 51
          msap  p  PSAPPSYEETtGINVNYPHYP P  G  PeqK  PP  YmGQPaPahnPVTVQTVYVQqpv  f

G. gallus : YDRPVQM*SCPSCNQMI*VTRIC*Y*ESGALT*WLS*CGGLF*LLG*CI*AG*CL*IP*FC*VD*ALK*DV*E*H*FC*P*NC*H*V*G*SY*KRI : 148
C. livia  : YDRPVQM*SCPSCNQMI*VTRIC*Y*DSGALT*WLS*CGGLF*LLG*CV*AG*CL*IP*FC*ID*ALK*DV*E*H*FC*P*NC*H*V*G*SY*KRI : 139
seq LITAF : -----YDRPVQM*SCPSCNQMI*VTRIC*Y*----- : -
          ydrpvqm cpscncqmivtrl y  sgaltwls*cgglfllgc agclipfc dalkdv h cpnc a  gsykrl

```

Abbildung 25: Alignment der Aminosäuresequenzen des LITAF der Taube, des Huhns und des sequenzierten RT-qPCR-Produktes.

### RT-qPCR Assay Etablierung für TGF- $\beta$ 2

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TGF- $\beta$ 2 wurde eine Effizienz von 100,1 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 78,5 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 98 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des TGF- $\beta$ 2 des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. XM\_003640970.1; Abbildung 26). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,032.

```

G. gallus : TCGGCCGAAGAAGCGT*GCTCTAGATGCTGCCTATTGTTTTAGGAA*CTGCAGGATAA*TTGCTGCTCTGC : 952
seq TGF-b : -----GAAGAAGCGT*GCTCTAGATGCTGCCTATTGTTTTAGGAA*CTGCAGGATAA*TTGCTGCTCTGC : 62
          TCGGCCGAAGAAGCGTCTAGATGCTGCCTATTGTTTTAGGAA GTGCAGGATAAATGCTG CTGC

G. gallus : GTCCACTTTATATTGACTTCAAGA*GGGATCTTGGCTGGAAATG*GATTCATGAACCTAAAGGATATCAT : 1020
seq TGF-b : GTCCACTTTATATTGACTTCAAGA*GGGATCTTGGCTGGAAATG----- : 105
          GTCCACTTTATATTGACTTCAAGA*GGGATCTTGGCTGGAAATG

```

Abbildung 26: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des TGF- $\beta$ 2 des Huhns (Primer eingerahmt).

### RT-qPCR Assay Etablierung für TL1A

In den Versuchen zur Etablierung der RT-qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TL1A wurde eine Effizienz von 95,3 % erreicht, bei einer Sensitivität von 0,01 fg. Der spezifische Schmelzpunkt des RT-qPCR-Produktes lag bei 82,6 °C. Die cDNA-Sequenz ist zu 88 % identisch mit der bekannten cDNA-Sequenz des TL1A des Huhns (*Gallus gallus*; GenBank Accession No. NM\_001024578.1; Abbildung 27). Die *p*-Distanz zwischen dem PCR-Produkt und der entsprechenden cDNA-Sequenz des Huhns beträgt 0,134.

```

      *      360      *      380      *      400
G. gallus : CCACGGGAAGCCATCTGCCCATCCTGCAGTGGGAAGACAAGCGAGGCTTGGCCTTTACCAAGAACAAC : 408
seq TL1A  : ----- : -

      *      420      *      440      *      460      *
G. gallus : CTGAGTTATTCCAGCAACGCACTGGTGATACCTGTGTCTGGGGATTACTATCTCTATGCTCAGGTCAC : 476
seq TL1A  : CTGAGTTATTCCAGCAACGCACTGGTGATACCGTGTCTGGGGACTACTAAGTCTAGCTCAGGTCAC : 68
          CTGAGTTATTCCAGCAACGCACTGGTGATACC GTGTCTGGGGA TACTA GTCTA GCTCAGGTCAC

      480      *      500      *      520      *      540
G. gallus : TTTCCGAGGGCCCACTGACACTTCAAGTAAAACCAGTTCTGTCACTGCAGTCATCACTAAAGTCACTG : 544
seq TL1A  : TTTCCGAGGGCCCATTGA-----AAGTAAAACCAATTCTGTCACTGAGATCATTACAAAAGTCACTG : 130
          TTTCCGAGGGCCCA TGA AAGTAAAACCA TTCTGTCACTG TCAT AC AAAGTCACTG

      *      560      *      580      *      600      *
G. gallus : ACAGCTACCCCGAACCCACCCAGCTGCTGACAGCACCAAGACCCTCAGTGAAAGAAAGGAACAACCTGG : 612
seq TL1A  : ATAGTTACCCCGAACCCACCCAGCTGCTGACAGGCACCAAGACCCTCAGTGAAAGGCAACAACCTGG : 198
          A AG TACCCCGA CCCACCCAGCTGCTGAC GCACCAAGACCCTCAGTGAA A AACA CTGG

      620      *      640      *      660      *      680
G. gallus : TTCCAGCCCATTTATCTGGGAGCTGTGGTTTCCTTAGAGATAGGAGACAAGCTAATGGTCAAAGTTAG : 680
seq TL1A  : TTCCAGCCCATTTATTTGGGTGCTGTGGTTTCCTTAGAAGTAGGAGACAAGCTCATGGTCAAAGTTAG : 266
          TTCCAGCCCATTTAT TGGG GCTGTGGT TCCTTAGA TAGGAGACAAGCT ATGGTCAA GTTAG

      *      700      *      720      *      740
G. gallus : TGACATCAAGCTGGTGGATTACACTAAGGAGCACAAAACCTTCTTCGGTGCCTTTTTACTGTAGGTCT : 748
seq TL1A  : TGACATCAAGCTGGTGGAT----- : 285
          TGACATCAAGCTGGTGGAT

```

Abbildung 27: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des TL1A des Huhns (Primer eingerahmt).

#### 4.2.5 Auswahl der geeigneten Referenzgene

Insgesamt wurden RT-qPCR-Untersuchungsmethoden für 10 Referenzgene etabliert. Da diese im Falle von GAPDH und TFRC jedoch nur geringe Effizienzen aufwiesen (78,3 % und 87,3 %) wurden diese beiden Referenzgene aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Um von den verbliebenen acht etablierten Referenzgenen die stabilsten, also die für die weiteren Untersuchungen am besten geeigneten drei Referenzgene auszuwählen, wurden zunächst für diese acht ihre Expressionsraten in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten cDNA-Proben mittels RT-qPCR gemessen. Um einen ersten Eindruck über die Expressionsraten und die Verteilung der einzelnen  $C_T$ -Werte eines Gens innerhalb der Proben-Gruppe zu erhalten wurde ein Boxplot-Diagramm mit Hilfe des Software-Programms SPSS erstellt (siehe Abbildung 29, S. 102). Hierbei werden die  $C_T$ -Werte als sogenannte Fünf-Punkte-Zusammenfassung dargestellt. Die Box präsentiert dabei den Bereich, in dem die mittleren 50 % der Werte liegen. Dies sind die Werte zwischen dem 25 %-Perzentil und dem 75 %-Perzentil. Der schwarze Strich innerhalb der Box kennzeichnet den Median, auch 50 %-Perzentil genannt. Werte, die außerhalb der Box liegen werden durch die sogenannten Antennen oder „Whiskers“ dargestellt, wobei die waagerechten Striche an deren Enden den größten, bzw. kleinsten Wert kennzeichnen, der nicht als Ausreißer oder Extremwert klassifiziert wird. Ausreißer sind Werte, deren Abstände vom 25 %-Perzentil nach unten, bzw. vom 75 %-Perzentil nach oben zwischen der 1,5-fachen und der 3-fachen Boxhöhe liegen. Sie werden durch einen Punkt gekennzeichnet. Werte, deren Abstände vom 25 %-

bzw. 75 %-Perzentil mehr als das 3-fache der Boxhöhe betragen, werden als Extremwerte bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit traten bei den  $C_T$ -Werten jedoch keine Extremwerte auf.

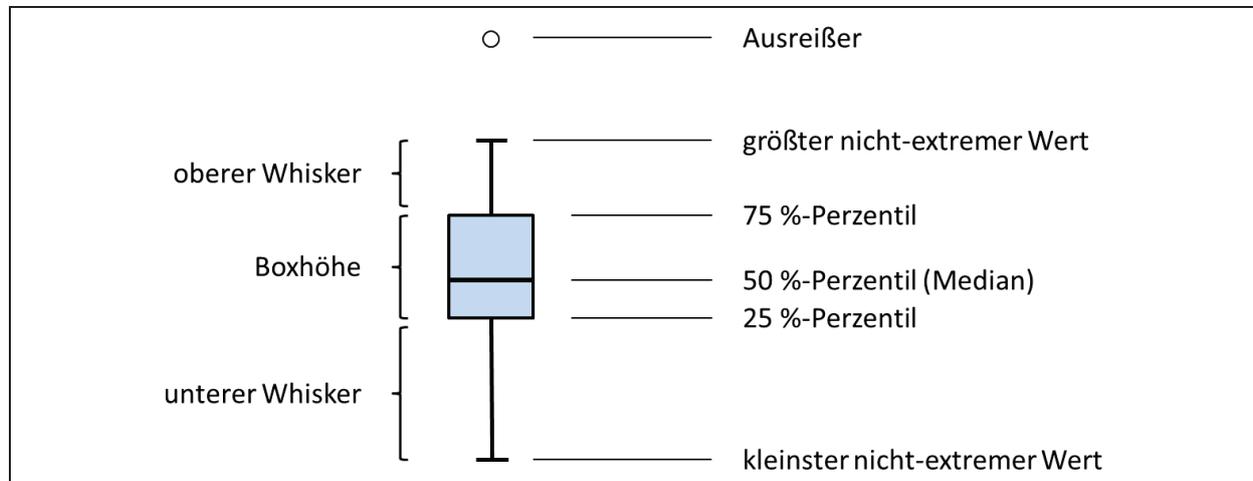


Abbildung 28: Bedeutung der Symbole in einem Boxplot

Unterteilt man die Expressionsraten willkürlich in drei Bereiche, wobei  $C_T$ -Werte unter 20 als hoch exprimiert und Werte über 30 als niedrig exprimiert anzusehen sind, erkennt man einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen den einzelnen Referenzgenen. Zu den hoch exprimierten Genen gehören  $\beta$ -actin und Ywhaz. Mittlere Expressionsraten zeigen HMBS, HPRT, RPS7, RPL13 und GUSB. Eine sehr niedrige Expression weist nur RPL19 auf. Anhand der einzelnen Boxplots lässt sich außerdem erkennen, wie weit die einzelnen  $C_T$ -Werte innerhalb der Probengruppe für die einzelnen Gene streuen. Gene mit einer geringen Spannweite von 2 bis 3  $C_T$ -Stufen sind  $\beta$ -actin, HMBS, GUSB, RPL13 und RPS7. Ywhaz zeigt eine Spannweite von 3,83  $C_T$ -Stufen Unterschied. Hohe Spannweiten von über 4  $C_T$ -Stufen zeigen HPRT und RPL19.

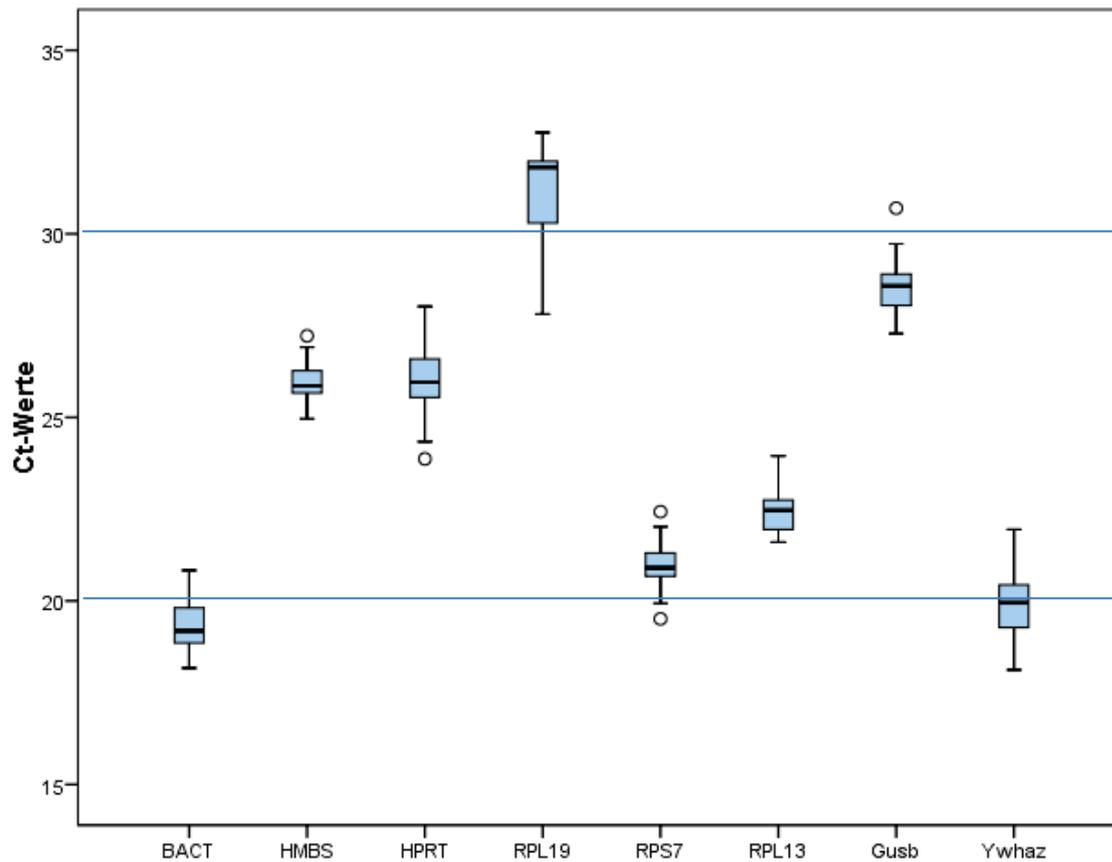


Abbildung 29: Verteilung der  $C_T$ -Werte von je 27 Proben für die jeweiligen Referenzgene.

Die Expressionsraten der ausgewählten acht Referenzgene wurden relativiert und dann in das Programm geNorm importiert. Dieses vergleicht die Expressionsstabilitäten der einzelnen Gene anhand selbstständig berechneter „M-Werte“, welche ein Maß für die Expressionsstabilität des betreffenden Referenzgens im Vergleich mit den übrigen Referenzgenen darstellen (siehe Kapitel 3.3.10, S. 65). Der schrittweise Ausschluss der Referenzgene mit der geringsten Expressionsstabilität wird von geNorm anhand eines Kurvenverlaufs der M-Werte dargestellt (siehe Abbildung 30). Dabei gilt, je größer der M-Wert ist, desto geringer ist die Expressionsstabilität des jeweiligen Gens. Damit sind RPL-19 und HPRT die am wenigsten konstant exprimierten Gene im Gehirn der Taube. Als die drei stabilsten Referenzgene wurden RPL13, HMBS und  $\beta$ -actin errechnet.

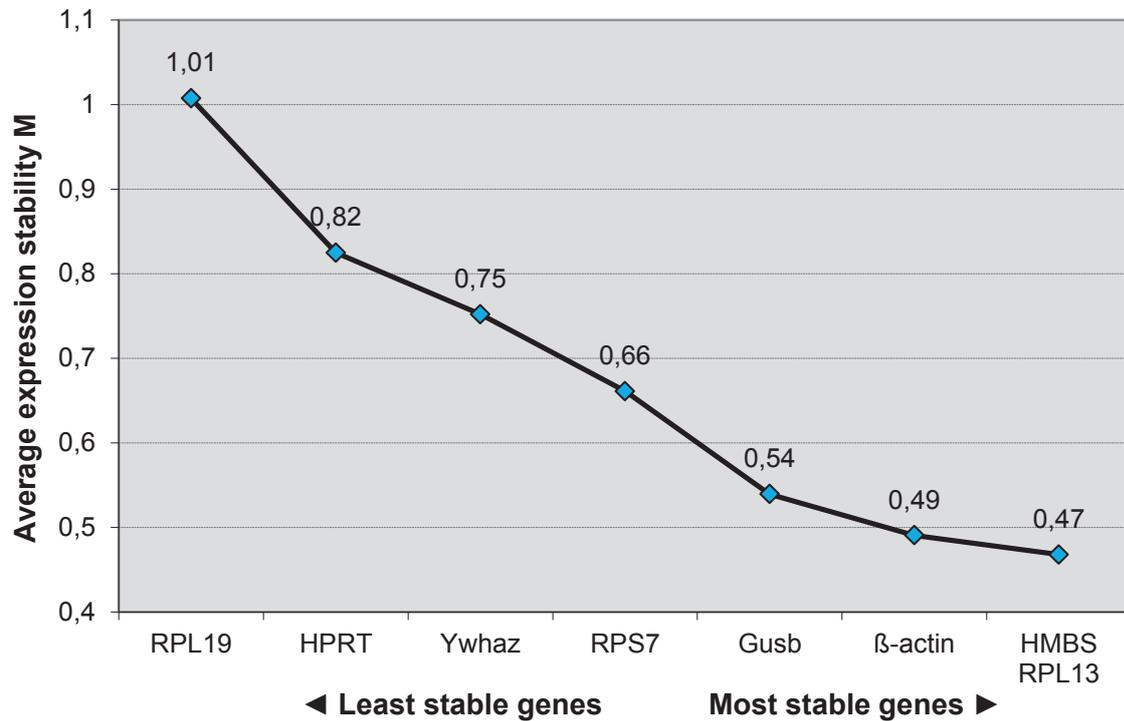


Abbildung 30: Durchschnittliche Expressionsstabilitäten der verbleibenden Referenzgene. Die Expressionsstabilitätswerte der Referenzgene wurden mittels des Programms geNorm ermittelt. Durch den schrittweisen Ausschluss des jeweiligen Gens mit der höchsten durchschnittlichen Expressionsstabilität „M“ wurde eine Stabilitätsrangfolge gebildet. Dabei nimmt die Expressionsstabilität der Referenzgene von links nach rechts zu (entsprechend der abnehmenden Größe der M-Werte). Probenzahl pro Gen: n=27.

Die optimale Anzahl der für eine Normalisierung einzusetzender Referenzgene bestimmt das geNorm-Programm mit Hilfe der Berechnung eines Normalisierungsfaktors ( $V_{NF}$ -Wert). Die Abbildung 31 auf Seite 104 zeigt die ermittelten Normalisierungsfaktoren in Abhängigkeit von der Anzahl der eingesetzten Referenzgene. So zeigt z.B.  $V_{2/3}$  die Variation von 2 Genen in Relation zu insgesamt 3 Genen an. Demnach wird bereits beim Einsatz der beiden stabilsten Referenzgene HMBS und RPL-13 ein  $V_{NF}$ -Wert von 0,148 ( $V_{2/3} = 0,148$ ) erreicht. Durch die Hinzunahme eines weiteren Referenzgens ergibt sich keine drastische Änderung dieses Wertes ( $V_{3/4} = 0,130$ ). Beide Werte liegen unter dem von Vandesompele und Mitarbeitern (Vandesompele et al. 2002) empfohlenen Grenzwert von 0,15. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre der Einsatz von nur 2 Referenzgenen für eine zuverlässige relative Quantifizierung von Genexpressionen im Taubengehirn ausreichend. Da jedoch von Vandesompele und Mitarbeitern der Einsatz von mindestens drei Referenzgenen empfohlen wird (Vandesompele et al. 2002), wurden in der vorliegenden Arbeit die drei stabilsten Referenzgene RPL13, HMBS und  $\beta$ -actin zur Normalisierung der RT-qPCR-Daten eingesetzt.

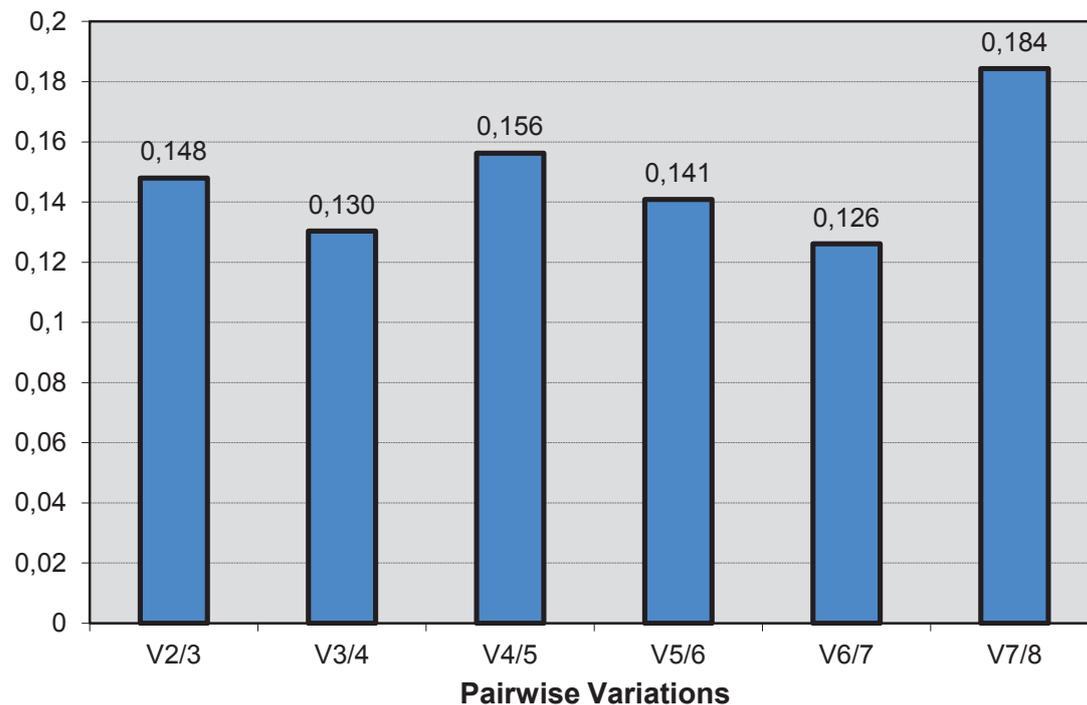


Abbildung 31: Bestimmung der optimalen Anzahl an Referenzgenen für die Normalisierung. Mit Hilfe des Programms geNorm wurde die Mindestanzahl der benötigten Referenzgene für eine optimale Normalisierung der RT-qPCR-Daten ermittelt. Dies erfolgt durch die Bestimmung eines Normalisierungsfaktors ( $V_{NF}$ -Wert) für die jeweilige Anzahl der eingesetzten Referenzgene. Ausgehend von den letzten beiden stabilen Genen wird in der Reihenfolge von links nach rechts jeweils das nächststabilste Referenzgen hinzugenommen und dessen Einfluss auf die Normalisierung berechnet. Für eine ausreichende Qualität der Normalisierung wird ein Schwellenwert für  $V_{NF} < 0,15$  empfohlen (Vandesompele et al 2002). Probenzahl pro Gen:  $n = 27$ .

#### 4.2.6 Relative Expressionsraten der Referenzgene

Für eine korrekte Normalisierung von RT-qPCR-Daten ist es wichtig, dass die zur Normalisierung herangezogenen Referenzgene in allen Proben stabil exprimiert sind. Um dies zu überprüfen, wurden die Expressionsraten der durch das Programm geNorm ausgewählten Referenzgene (RPL13, HMBS und  $\beta$ -actin) in den 20 zu untersuchenden Proben aus den Kontroll- und Testgruppen relativ zu ihrem Median quantifiziert (siehe Kapitel 3.3.12, S. 70). Dazu wurde die Delta-Delta- $C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen angewendet. Auf eine Effizienzkorrektur wurde in diesem Fall verzichtet, da die für die drei Referenzgene ermittelten Effizienzen mit  $> 90\%$  als ausreichend angesehen wurden, um die Expressionsstabilität bewerten zu können. Die dabei ermittelten Ergebnisse sind in der Abbildung 32 in Form von Boxplots (siehe Kapitel 4.2.5) graphisch dargestellt. Die ermittelten Einzelwerte können der Tabelle 22 im Anhang entnommen werden. Die ermittelten FC-Werte liegen für

alle drei Referenzgene innerhalb des als „nicht reguliert“ definierten Wertebereich von  $0,5 < FC < 2$  und sind damit ausreichend stabil exprimiert.

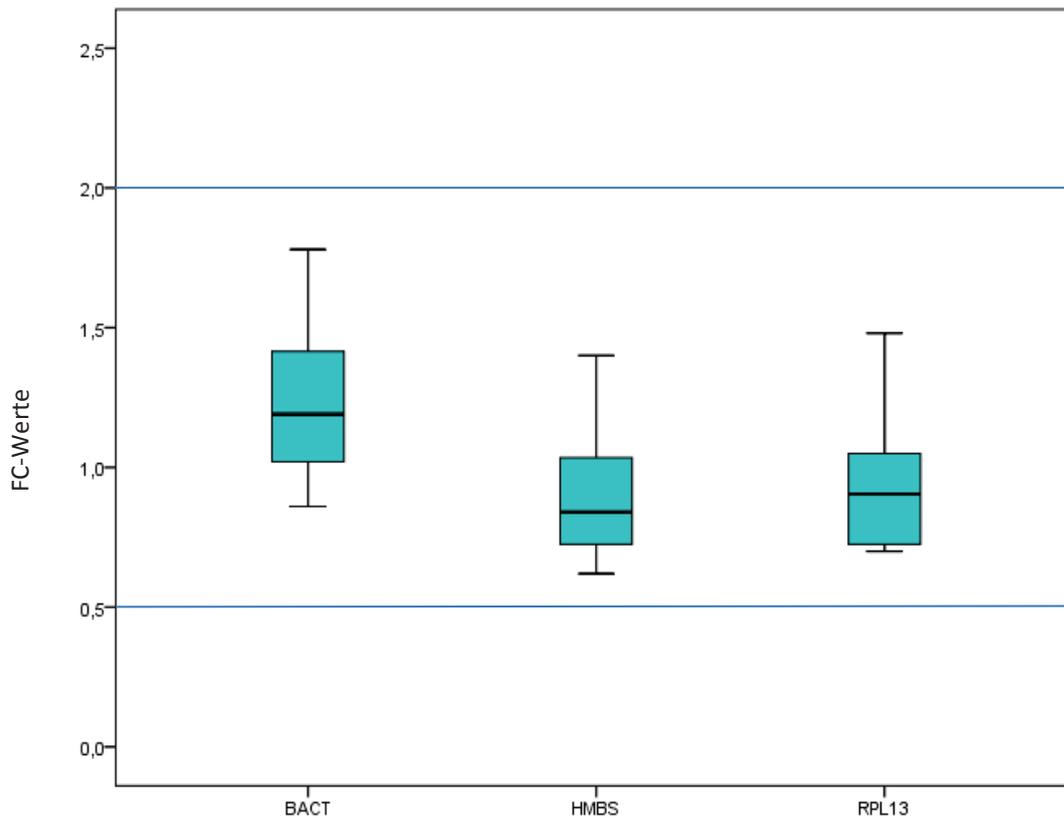


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Expressionsstabilität der zur relativen Quantifizierung ausgewählten Referenzgene. Alle Ergebnisse liegen innerhalb des durch Balken gekennzeichneten Wertebereichs  $0,5 < FC < 2$  und gelten damit als nicht reguliert. Probenzahl pro Gen:  $n = 20$ .

#### 4.2.7 Relative Quantifizierung der Zielgene

Für die Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse wurde das Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell nach Pfaffl zur relativen Quantifizierung herangezogen (Pfaffl 2001; siehe Kapitel 3.3.13, S. 71). Varianzen der Expressionsergebnisse, beruhend auf unterschiedlichen RNA-Extraktionseffizienzen, Gewebe- und Matrixeffekte oder fehlerhafte reverse Transkription innerhalb einer experimentellen Probe, werden durch diese Normalisierung reduziert, da sie gleichermaßen das Zielgen als auch das Referenzgen betreffen. Es wurden sowohl die Genexpressionen der einzelnen Proben als auch die Genexpressionen der gesamten Gruppen mit den entsprechenden Expressionswerten der Kontrollgruppe verglichen. Das Ergebnis wird als „Fold Change“ (FC) angegeben. Dieser FC-Wert stellt die normalisierte Expressionsrate des Zielgens in der Testgruppe bzw. -probe als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des Zielgens in der Kontrollgruppe dar. Ein

FC-Wert unter 0,5 gilt als herunterreguliert, ein FC-Wert über 2 als hochreguliert. Der Wertebereich zwischen 0,5 und 2 gilt als nicht reguliert.

Die Ergebnisse des Gruppenvergleichs sind in Abbildung 33 graphisch dargestellt. Mit berücksichtigt wurden statistisch signifikante Expressionsergebnisse.

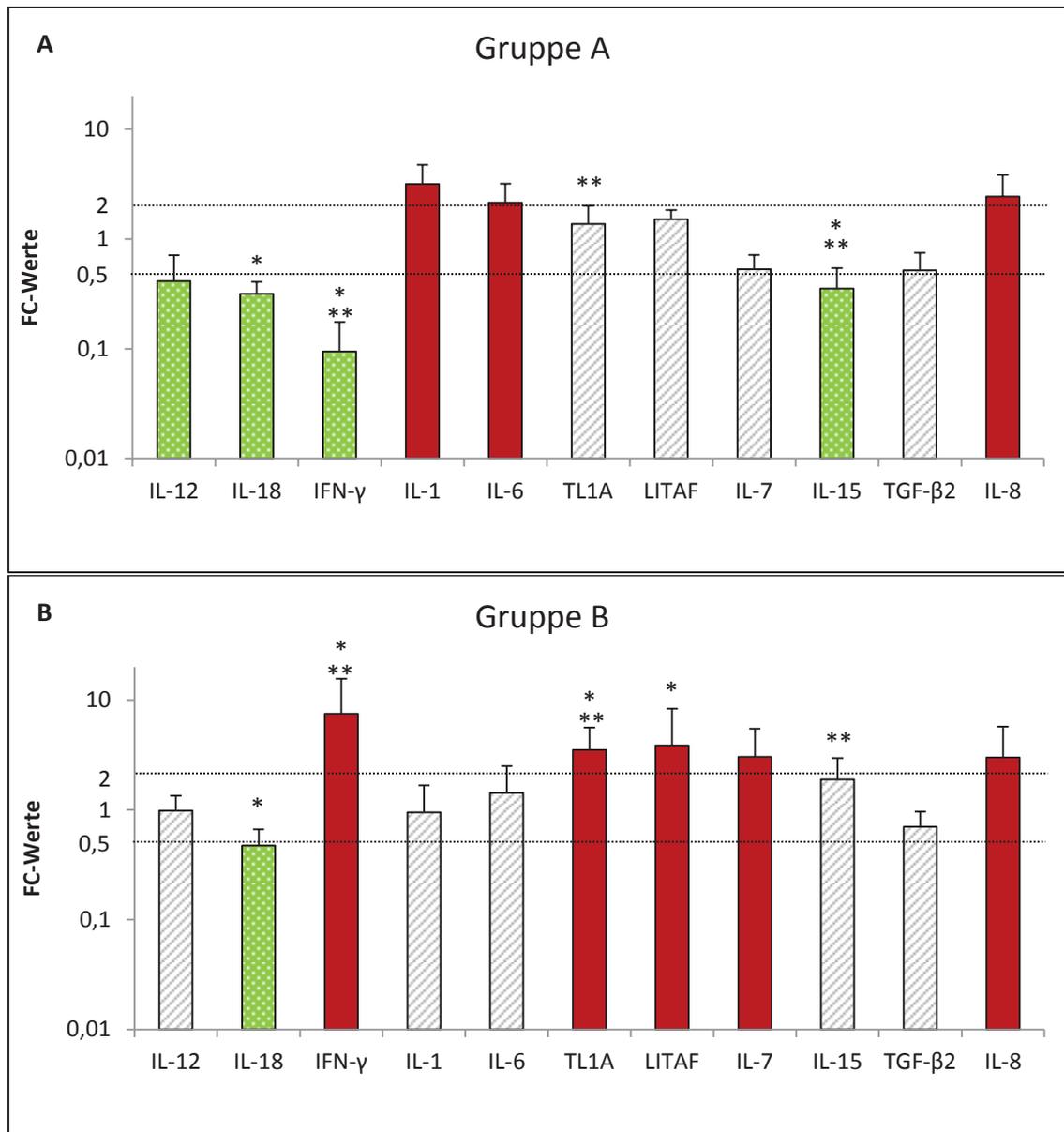


Abbildung 33: Expressionsstärken der Zytokin-mRNA-Sequenzen.

Balkenhöhe: FC-Wert (geometrisches Mittel); Whisker: Standardabweichung

Grafik A: Gruppe mit den Proben aus der ersten Erkrankungsphase (Gruppe A), n = 8.

Grafik B: Gruppe mit den Proben aus der zweiten Erkrankungsphase (Gruppe B), n = 7.

■ = herunterreguliert (FC < 0,5), ▨ = nicht reguliert (0,5 < FC < 2), ■ = hochreguliert (FC > 2).

\* = statistisch signifikanter Expressionsunterschied im Vergleich zu den gesunden Tieren (bei einem Signifikanzniveau von p = 0,05)

\*\* = statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Tieren der unterschiedlichen Krankheitsphasen (p = 0,05).

Bei den Tieren der ersten Erkrankungsphase konnte eine erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Herunterreguliert sind hingegen IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 und IL-15. Die FC-Werte von TL1A, LITAF, IL-7 und TGF- $\beta$ 2 liegen alle zwischen 0,5 und 2 gelten damit als nicht reguliert.

In der zweiten Erkrankungsphase zeigen die Tiere eine erhöhte Expression von IFN- $\gamma$ , TL1A, LITAF, IL-7 und IL-8, während IL-18 wie in der ersten Phase herunterreguliert erscheint. Im nicht regulierten Bereich liegen hier IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15 und TGF $\beta$ 2.

Die FC-Werte für die einzelnen Proben können der Tabelle 23 und Tabelle 24 im Anhang entnommen werden.

#### 4.2.8 Ergebnisse der Statistik

Mit Hilfe des Levene-Test wurden die  $\Delta C_T$ -Werte der Zielgene (GOI) der jeweils mit einander zu vergleichenden Versuchsgruppen auf ihre Varianzhomogenität untersucht. Dabei lag das Signifikanzniveau bei 5 %. Das bedeutet, wenn  $p > 0,05$ , dann sind die Varianzen der beiden verglichenen Gruppen gleich. Der Levene-Test ergab für alle miteinander verglichenen Gruppen und Zytokine eine Varianzhomogenität, womit die Voraussetzung für nachfolgende Varianzanalysen erfüllt war (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisse des Levene-Test über die differentielle Replikation der untersuchten Zytokine

GOI	Signifikanz		
	Vergleich Gruppe R/A	Vergleich Gruppe R/B	Vergleich Gruppe A/B
IFN- $\gamma$	0,819	0,588	0,486
IL-1 $\beta$	0,570	0,833	0,745
IL-6	0,566	0,665	0,781
IL-7	0,324	0,224	0,106
IL-8	0,412	0,189	0,361
IL-12	0,505	0,252	0,185
IL-15	0,981	0,825	0,884
IL-18	0,428	0,465	0,994
LITAF	0,427	0,698	0,166
TGF- $\beta$ 2	0,257	0,785	0,275
TL1A	0,116	0,214	0,687

Gruppe R = Kontrollgruppe = gesunde Tiere

Gruppe A = Versuchstiere aus der ersten Krankheitsphase

Gruppe B = Versuchstiere aus der zweiten Krankheitsphase

Anschließend wurden die Zytokin-Expressionsraten der einzelnen Gruppen verglichen. Dazu wurde zunächst ein Kruskal-Wallis Test mit einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt mit dem Ergebnis, dass für jedes Gen ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen existiert. Für eine genauere Aussage wurde anschließend ein Paarvergleich mit Hilfe des Bonferroni post hoc Test mit anschließender Korrektur auf multiples Testen mittels einer False Discovery Rate (FDR) von 5 % durch das Benjamini-Hochberg-Verfahren durchgeführt. Diese Tests ergaben beim Vergleich von Gruppe A mit der Kontrollgruppe (Gruppe R) einen signifikanten Expressionsunterschied für IL-18, IFN- $\gamma$  und IL-15. Vergleicht man die Gruppe B mit Gruppe R ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede für IL-18, IFN- $\gamma$ , TL1A und LITAF. Zusätzlich wurden die beiden Versuchsgruppen Gruppe A und Gruppe B miteinander verglichen. Dabei ergab sich für die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-15 und TL1A ein signifikanter Unterschied der Expressionsraten. Eine Übersicht über die ermittelten exakten Signifikanzen mit dem jeweiligen angepassten Signifikanzniveau  $\alpha$  ist in Tabelle 16 erstellt.

Tabelle 16: Ergebnisse des Bonferroni post hoc Test über die differentielle Replikation der untersuchten Zytokine

GOI	Gruppe R / A		Gruppe R / B		Gruppe A / B	
	p	$\alpha$	p	$\alpha$	p	$\alpha$
IFN- $\gamma$	0,004	0,033	0,009	0,05	0	0,017
IL-1 $\beta$	0,08	0,033	1	0,05	0,031	0,017
IL-6	0,035	0,017	0,784	0,05	0,273	0,033
IL-7	0,278	0,05	0,044	0,033	0	0,017
IL-8	0,098	0,033	0,038	0,017	1	0,05
IL-12	0,044	0,033	1	0,05	0,044	0,033
IL-15	0,011	0,017	0,293	0,033	0	0,017
IL-18	0	0,017	0,007	0,033	0,202	0,05
LITAF	0,972	0,05	0,007	0,017	0,037	0,033
TGF- $\beta$ 2	0,018	0,017	0,359	0,033	0,384	0,05
TL1A	1	0,05	0,002	0,017	0,004	0,033

Gruppe R = Kontrollgruppe = gesunde Tiere

Gruppe A = Versuchstiere aus der ersten Krankheitsphase

Gruppe B = Versuchstiere aus der zweiten Krankheitsphase

GOI = Genes of Interest

p = exakte Signifikanz, nach Bonferroni post hoc Test

$\alpha$  = Signifikanzniveau, korrigiert nach Benjamini-Hochberg-Prozedur

## 5 Diskussion

### 5.1 Einleitung

Erstmals wurde 2009 in Berlin von einer neuartigen letalen Sarkosporidieninfektion der Haustaube mit zentralnervöser Symptomatik berichtet (Olias et al 2009b). Als Erreger wurde eine bisher unbekannte *Sarcocystis* sp. identifiziert und in Folge *Sarcocystis calchasi* benannt (Olias et al. 2009a). *S. calchasi* durchläuft wie alle anderen Sarkosporidien-Spezies auch einen zweiwirtigen Entwicklungszyklus, wobei hier der Habicht den Endwirt und die Haustaube den Zwischenwirt darstellt. In der ersten Krankheitsphase der Taube etwa ein bis zwei Wochen p.i. zeigen die Tiere Apathie und Polyurie. In der Leber und den Endothelien finden sich Schizonten. Histologisch zeigt sich eine hochgradige lymphohistozytäre und nekrotisierende Hepatitis. Dagegen finden sich im Gehirn zu diesem Zeitpunkt noch keine pathologischen Veränderungen. In der zweiten Phase der Erkrankung etwa sieben bis acht Wochen p.i. zeigen sich massive zentralnervöse Symptome. In der quergestreiften Skelettmuskulatur finden sich ein starker Befall mit Sarkozysten und eine unterschiedlich stark ausgeprägte lymphohistozytäre Myositis. Im Gehirn tritt eine hochgradige nekrotisierende und granulomatöse Meningoenzephalitis auf. Trotz dieser massiven Läsionen konnten in der HE-Färbung bisher keine intraläsionalen Parasitenstadien im Gehirn nachgewiesen werden.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse zur Pathogenese der Erkrankung werfen eine Reihe wichtiger Fragen auf. Vordergründig stellte sich zunächst die Frage, ob der Parasit selbst oder ein immunpathologisches Phänomen die schwerwiegenden Läsionen im zentralen Nervensystem der Taube verursacht. Tatsache ist, dass *S. calchasi* in Läsionen des Gehirns bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Es wurden jedoch auch keine Hinweise auf eine andere Ursache der Pathologie gefunden. Offensichtlich war jedoch, dass *S. calchasi* über einen noch unbestimmten Mechanismus an der Pathologie der ZNS-Läsionen zumindest indirekt beteiligt sein muss. Daher wurde folgende Hypothese als Arbeitsgrundlage der hier vorliegenden Dissertationsschrift aufgestellt:

***Sarcocystis calchasi* moduliert die Immunantwort seines Zwischenwirts.**

Zur Überprüfung der Hypothese wurde zunächst die Anwesenheit und Lokalisation von Parasitenstadien im Gehirn während der ersten und zweiten Phase der Krankheit mittels PCR und immunhistologischer Analyse genauer untersucht. In einem zweiten Schritt wurde auf Seite des Zwischenwirts die Immunantwort während beider Phasen auf Ebene der RNA- und

Proteinexpression analysiert. Voraussetzung für diese Untersuchungen war es zunächst jedoch, die dafür notwendigen Nachweis- und Untersuchungsverfahren zu entwickeln und zu etablieren, da solche für die Haustaube und *S. calchasi* bisher nicht existierten. Dazu gehörte die Herstellung eines erregerspezifischen Antikörpers, als auch die Etablierung eines RT-qPCR-Assays einschließlich der Planung der dafür benötigten Primer zur Identifizierung geeigneter Referenzgene und anschließender quantitativer Bestimmung ausgewählter Zytokine der Taube.

## **5.2 Erregernachweis im Gehirn der Tauben**

Für den Nachweis von *S. calchasi* im Gehirn der experimentell infizierten Tauben kamen mit der PCR und einem immunhistochemischen Analyseverfahren zwei verschiedene Methoden zum Einsatz.

### **5.2.1 Molekularbiologischer Nachweis der DNA von *S. calchasi***

Um einer Antwort auf die Frage nach der direkten Beteiligung des Parasiten an der ZNS-Pathologie näher zu kommen, wurde zunächst die Anwesenheit von Strukturen des Parasiten auf DNA-Ebene untersucht. Zum Erregernachweis wurde eine bereits etablierte speziesspezifische nested PCR verwandt (Olias et al. 2011). Erstaunlicherweise konnte auf diese Weise in den Gehirnen fast aller experimentell infizierten Tauben sowohl in der ersten als auch in der zweiten Phase DNA von *S. calchasi* nachgewiesen werden. Da das einzige negativ getestete Tier die gleichen neurologischen Symptome wie die anderen Tiere aus seiner Versuchsgruppe zeigte und im histologischen Schnittpräparat des Gehirns in der HE-Färbung ebenfalls eine Meningoenzephalitis aufwies, ist davon auszugehen, dass auch in diesem Tier Sarkozysten im Gehirn vorhanden waren. Möglicherweise wurde für den Erregernachweis ein Teil des Gehirns verwendet, in dem nur eine geringe Anzahl an Parasiten vorhanden war, so dass in den Schnittpräparaten keine Erreger angeschnitten wurden und in der Probe keine amplifizierbare Erreger-DNA vorlag. Möglich erscheint auch, dass Entwicklungsstadien des Parasiten im Gehirn der Taube zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits durch die zelluläre Immunabwehr abgeräumt waren. Jedoch erscheint vor diesem Untersuchungsergebnis auch die These nicht abwegig, dass die Induktion der massiven Gehirnläsionen und Immunzellinfiltration nicht im direkten räumlichen Zusammenhang mit *S. calchasi* steht, sondern vielmehr eine unangemessene immunpathologische Reaktion etwa auf Stoffwechselprodukte des Parasiten oder sezernierte Virulenzfaktoren darstellen könnte.

### **5.2.2 Lokalisierung von *S. calchasi* im Gehirn mittels immunhistochemischer Untersuchung**

In einem nächsten Schritt sollte die mögliche Anwesenheit und Lokalisation von Strukturen des Parasiten im Gehirn der Tauben aufgeklärt werden. Bislang konnten mittels HE-

Histologie weder Erregerstrukturen in den Läsionen des ZNS nachgewiesen, noch Strukturen des Parasiten in der ersten Phase der Erkrankung sicher identifiziert werden. Im Vergleich zu Übersichtsfärbungen wie der HE-Färbung bietet eine immunhistochemische Untersuchung den Vorteil einer höheren Sensitivität und Spezifität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst ein anti-*S. calchasi* spezifischer Antikörper hergestellt. Bei der damit durchgeführten Untersuchung konnten so in der ersten Phase in 4 von 8 untersuchten Tieren wenige, vereinzelt vorliegende Schizonten im Neuropil des Gehirns nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion zeigte sich keinerlei feststellbare zelluläre Immunreaktion im gesamten Gehirn. Normalerweise finden sich Schizonten von Sarkozysten intrazellulär im Zytoplasma verschiedener Zellen (Mehlhorn und Heydorn 1978; Rommel 1978). Im Falle von *S. neurona* finden sich die intrazerebralen Schizonten im Zytoplasma von Neuronen als auch in Entzündungszellen ohne Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (Dubey et al. 2001b; Sellon und Dubey 2007). Ob dies hier der Fall ist, ist mittels der angewandten Technik nicht mit letzter Sicherheit feststellbar und bedarf zu einem späteren Zeitpunkt einer näheren Untersuchung.

Dagegen zeigten in der zweiten Phase der Erkrankung alle Tiere massive lymphohistiozytäre Infiltrate im Gehirn. Allerdings konnte nur in etwa der Hälfte der Tiere ein sehr schwacher Befall mit Zystenstadien des Parasiten dargestellt werden. Überraschenderweise lagen die Zysten jedoch nicht intraläsional, sondern ausschließlich in Arealen des Gehirns die frei von Immunzellinfiltraten oder Läsionen waren. Dieser Befund stellt einen entscheidenden Unterschied zu allen bisher berichteten zerebralen *Sarcocystis*-Infektionen anderer Zwischenwirte dar. Beispielsweise wurden bei *S. neurona*-Infektionen beim Pferd sowie bei anderen an einer *S. neurona*-assoziierten Enzephalitis erkrankten Tieren im ZNS Schizonten oder Merozoiten des Erregers nachgewiesen (Dubey et al. 2001b; Mullaney et al. 2005; Sellon und Dubey 2007). Schizonten und Merozoiten von *S. neurona* lagen dabei immer intraläsional entweder frei im Gewebe oder innerhalb verschiedener Zellen, darunter Neuronen, Makrophagen, Gliazellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Riesenzellen oder Zellen des vaskulären Endothelium (Dubey et al. 1991a; Dubey et al. 2001b; Sellon und Dubey 2007). Interessanterweise konnte trotz positivem Antikörper-Nachweis in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) der Parasit nur in weniger als der Hälfte der mit *S. neurona* experimentell infizierten und an EPM erkrankten Pferde im ZNS mittels Lichtmikroskopie und Immunhistochemie nachgewiesen werden (Cutler et al. 2001; Fenger et al. 1997; Saville et al. 2004; Saville et al. 2001; Sellon und Dubey 2007; Sofaly et al. 2002). Da die Parasitenstadien im ZNS des Pferdes häufig (auch in schweren Läsionen) nur in geringer Anzahl und oft nur vereinzelt auftreten ist es im Rahmen der routinemäßig durchgeführten histologischen Untersuchung insbesondere von HE-gefärbten Schnittpräparaten häufig schwer, den Parasiten im Gewebe zu lokalisieren (Dubey et al. 2001b; Sellon und Dubey 2007). Im Mausmodell für *S. neurona* mit knockout (KO)-Mäusen, deren IFN- $\gamma$ -Gen

ausgeschaltet wurde, lagen die Parasiten im ZNS ebenfalls immer intraläsional (Fritz und Dubey 2002). Dubey und Lindsay beobachteten mittels Immunhistochemie und HE-Färbung, dass *S. neurona* bei IFN- $\gamma$ -KO-Mäusen im ZNS zwar in neuronalen Zellen, nicht aber im vaskulären Endothelium lokalisiert war (Dubey und Lindsay 1998). Aufgrund der geringen Erregerzahl im Gehirn, selbst bei schweren Gewebläsionen, vermuteten Dubey und Mitarbeiter bereits im Jahr 2001 eine Beteiligung von Zytokinen bzw. Metaboliten an der Pathogenese der EPM (Dubey et al. 2001b).

Obwohl bereits in der ersten Erkrankungsphase der Taube Parasitenstadien im ZNS nachgewiesen werden konnten sind hier noch keine Läsionen im Gehirn ausgebildet. Hier stellt sich die Frage, ob der Parasit über spezifische Evasionsmechanismen verfügt, die es ihm erlauben, die Immunantwort des Wirts aktiv zu umgehen oder sie zu unterdrücken. Solche Evasionsmechanismen sind von den nah verwandten Protozoen *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* bekannt. Beide umgehen die wirtseigene Abwehr, indem sie mit Hilfe bestimmter Oberflächenproteine aktiv in Wirtszellen eindringen (Lei et al. 2005). *T. gondii* ist außerdem in der Lage, in die Signalkaskaden seiner Wirtszelle einzugreifen und beeinflusst so die Expression verschiedener Zytokine. So wird zum einen die Synthese der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  gefördert, während die Synthese des proinflammatorischen Zytokin IL-12 gehemmt wird. Dies hat unter anderem eine verminderte IFN- $\gamma$ -Synthese und eine Unterdrückung der T<sub>H</sub>1-Antwort zu Folge (Hunter et al. 1995; Lang et al. 2007; Langermans et al. 2001). Zu Evasionsmechanismen von Parasiten siehe auch Kapitel 2.3.4, S. 30. In der Tat könnten die in der vorliegenden Dissertation erlangten Ergebnisse auf eine Unterdrückung der zellulären Immunantwort im Gehirn während der akuten Infektion schließen lassen (siehe Kapitel 5.3).

Sollte *S. calchasi* tatsächlich auf ähnliche Evasionsstrategien zurückgreifen, so scheint dieser Mechanismus jedoch während der zweiten Phase aufgehoben zu sein. Obwohl der Erreger auch hier nur areaktiv im Neuropil gefunden werden konnte, kommt es an anderen Lokalisationen im Gehirn zur Ausbildung massiver Gewebläsionen. Es kann also vermutet werden, dass die Enzephalitis in der zweiten Erkrankungsphase keine direkte Reaktion auf die Irritation durch die Gewebszysten ist. Möglicherweise greift der Erreger jedoch auch gezielt mittels spezifischer Virulenzfaktoren in die Immunantwort des Wirts ein und induziert so eine überschießende Immunantwort während der zweiten, chronischen Phase der Erkrankung. Oder aber es handelt sich um eine überschießende Reaktion des Immunsystems des Wirts bei dem Versuch, den Erreger zu eliminieren. So ruft beispielsweise *T. gondii* bei immunsupprimierten Patienten häufig eine *Toxoplasma*-assoziierte Enzephalitis hervor (Sarciron und Gherardi 2000). Aviles und Mitarbeiter untersuchten die inflammatorische Immunantwort im Gehirn von Mäusen (C57BL/6-Mäuse) mit akuter Toxoplasmose und berichteten von erhöhten Plasmakonzentrationen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , während IL-10, IL-6

und IL-12 nicht nachgewiesen werden konnten, was für eine proinflammatorische T<sub>H</sub>1-Immunantwort spricht (Aviles et al. 2008).

### **5.3 Die Immunantwort des Zwischenwirts auf die Infektion mit *S. calchasi***

Grundlage der weiteren Untersuchungen war die oben beschriebene Erkenntnis, dass der Parasit zwar im Gehirn vorliegt, jedoch nach ersten Erkenntnissen offenbar nur in räumlicher Distanz zu den Läsionen der zweiten neurologischen Phase der Erkrankung. Ziel war es daher, auf Wirtsseite die möglichen Wechselwirkungen des Parasiten auf immunologischer Ebene dazustellen. Dabei sollte insbesondere herausgefunden werden, wie eine Infektion die Immunantwort sowohl in der ersten Phase als auch in der zweiten Phase moduliert. Hierfür wurde ein Nachweissystem zur Bestimmung des Zytokinexpressionsprofils im Gehirn der Taube etabliert und sowohl die erste als auch die zweite Erkrankungsphase untersucht und verglichen.

#### **5.3.1 Etablierung neuer Methoden für die Haustaube zur Darstellung des Zytokin-Expressionsprofils**

Im Huhn wurden bereits viele Zytokine identifiziert und verschiedene Methoden für deren Untersuchung etabliert. Dazu gehört unter anderem die Untersuchung von Zellkulturen mittels Zytokin-spezifischer ELISA (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), bei dem Antigene mittels eines Enzym-markierten Antikörpers gebunden und nachgewiesen werden, wobei die Reaktion üblicherweise durch Farbumschlag oder Chemolumineszenz sichtbar gemacht wird (Engvall und Perlmann 1972). Eine davon abgeleitete Methode ist der ELISpot Assay (engl. *Enzyme Linked Immuno Spot Assay*), bei dem sezernierte Zytokine oder Antikörper mittels eines an einer besonderen Membran gebundenen Erstantikörpers festgehalten und anschließend nachgewiesen werden (Czerkinsky et al. 1983). Eine andere Möglichkeit ist die Etablierung eines Zytotoxizitätstests zur Messung der funktionellen Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten (Seo und Collisson 1997). Im Allgemeinen sind jedoch all diese Zellkultur-basierten Nachweismethoden relativ schwer zu etablieren und insbesondere zu reproduzieren. Besser geeignet ist die quantitative Bestimmung der Zytokin-Genexpressionsprofile auf zellulärer oder organspezifischer Ebene mittels quantitativer oder semiquantitativer Real-Time-PCR (Degen et al. 2005b) oder Mikroarray-Analyse (Degen et al. 2006). Da für die Taube keine spezifischen Antikörper kommerziell zur Verfügung stehen (nicht zuletzt weil bisher nur sehr wenige Zytokinsequenzen der Taube identifiziert und vollständig sequenziert wurden) und um eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erzielen wurde für die vorliegende Arbeit als Nachweismethode die quantitative Real-Time-PCR mit vorhergehender reverser Transkription (RT-qPCR) gewählt und darüber die

Expressionsraten der mRNAs der Zytokine IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TL1A, LITAF, IL-7, IL-15 und TGF- $\beta$ 2, sowie des Chemokins IL-8 bestimmt.

Die benötigten Primer wurden eigenständig auf Basis des Hühner-Genoms im Vergleich mit dem Zebrafinken-Genom entworfen und für die entsprechenden RT-qPCR-Assays etabliert. Mit der Etablierung und Validierung von neu entwickelten Primerpaaren für RT-qPCR-Assays sowohl für eine Auswahl von Referenzgenen als auch für bestimmte Zytokine der Haustaube konnte ein wichtiges Werkzeug geschaffen werden, dass darüber hinaus eine zuverlässige und spezifische Anwendbarkeit für eine Vielzahl möglicher immunologischer Untersuchungen in der Haustaube verspricht.

### 5.3.2 Ergebnisse des Zytokinexpressionsprofils im Vergleich der beiden Krankheitsphasen

Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus der Expressionsanalyse der ausgewählten Zytokine sollen im Folgenden getrennt für beide Phasen des klinischen Krankheitsbildes der Taube nach experimenteller Infektion mit *S. calchasi*-Sporozysten dargestellt werden.

#### 5.3.2.1 Erste Erkrankungsphase

Bereits in der ersten Krankheitsphase, die noch ohne zentralnervöse Symptome, jedoch mit Diarrhoe, Polyurie, Apathie aber auch perakutem Verenden der Tauben einhergeht, gibt es Hinweise auf ein Eingreifen von *S. calchasi* in die Regulation der Immunantwort des Zwischenwirts. Hier fällt insbesondere die Herunterregulation der IL-12 / IL-18 / IFN- $\gamma$ -Achse auf, die einen zentralen Bestandteil der T<sub>H</sub>1-Immunantwort bei der Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen ausmacht (Kaiser 2010).

In der ersten Erkrankungsphase (1. Phase) sind die T<sub>H</sub>1-Zytokine **IL-18** und **IFN- $\gamma$**  signifikant in ihrer Expression herunterreguliert. Auch **IL-12** ist vermindert exprimiert, insbesondere im Vergleich zur 2. Phase. Diese Ergebnisse sprechen für eine unterdrückte T<sub>H</sub>1-Immunantwort und lassen vermuten, dass der Parasit aktiv in die Immunregulation des Wirtes eingreift. Da die IFN- $\gamma$ -Synthese zu einem Großteil auch durch IL-18 und IL-12 reguliert werden kann (French et al. 2006; Göbel et al. 2003; Okamura et al. 1998; Okamura et al. 1995a; Okamura et al. 1995b; Yoshimoto et al. 1998; Zhao et al. 2007), lässt sich ein Eingreifen in der Regulationskette bereits vor IL-12 und IL-18 vermuten. Andererseits könnte *S. calchasi* auch auf verschiedenen Ebenen bzw. gleichzeitig mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in die Steuerung der T<sub>H</sub>1-Immunantwort eingreifen, wie es beispielsweise bei *T. gondii* der Fall ist und im Folgenden vergleichend diskutiert werden soll.

Eine protektive Wirkung von IL-12 wurde sowohl bei Infektionen mit *T. gondii* (Gazzinelli et al. 1993) als auch bei verschiedenen anderen Protozoen, etwa *Trypanosoma cruzi* (Abrahamsohn und Coffman 1996) und *Leishmania major* (Sypek et al. 1993) beschrieben.

Einige Protozoen wie *T. gondii* aber auch *Leishmania spp.* sind jedoch in der Lage, die IL-12-Produktion zu inhibieren (Bogdan und Röllinghoff 1999; Lang et al. 2007). Der genaue Evasionsmechanismus der IL-12-Hemmung ist für *T. gondii* bereits gut untersucht. Für die Expression von IL-12 und TNF- $\alpha$  als Antwort auf mikrobielle Produkte ist die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweg notwendig (Ghosh und Karin 2002). *T. gondii* greift in diesen Signalweg ein und verhindert die Translokation des NF- $\kappa$ B in den Zellkern, wodurch die Expression von IL-12 vorübergehend und von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  vollständig verhindert wird (Butcher und Denkers 2002; Butcher et al. 2001; Miller et al. 2009; Shapira et al. 2002). Dieser Effekt lässt jedoch bereits nach 24 Stunden nach. NF- $\kappa$ B wandert danach wieder in den Zellkern und IL-12 wird als Reaktion auf LPS wieder exprimiert (Butcher und Denkers 2002). Die durch *T. gondii* hervorgerufene zeitlich begrenzte Immunsuppression ermöglicht es dem Erreger Wirtszellen zu befallen und sich zu replizieren, bevor er aufgrund der danach einsetzenden Immunantwort durch Stadienwechsel in die chronische Phase übergeht und Gewebssysteme ausbildet (Miller et al. 2009). Da bei den *S. calchasi*-infizierten Tauben die IL-12-Expression noch nach etwa einer Woche herunterreguliert ist, ist zu vermuten, dass es auch hier weitere regulatorische Mechanismen gibt. Von *T. gondii* weiß man, dass es zusätzlich die Signalweiterleitung durch STAT-3 beeinflusst. Dieses wird normalerweise durch die Bindung von IL-10 an seinen Rezeptor aktiviert. Seine Aktivierung kann unter dem Einfluss von *T. gondii* jedoch auch unabhängig von IL-10 erfolgen (Lang et al. 2007). Nachdem STAT-3 in den Zellkern gewandert ist, reguliert es die Expression von IL-10-empfindlichen Genen. Dazu gehört auch die Suppression der IL-12- und TNF- $\alpha$ -Expression. Ein weiterer Mechanismus ist die Inhibition von IL-12 durch den Eicosanoid-Mediator Lipoxin A4 (LXA4). Die LXA4-Synthese wird wiederum stimuliert durch Tachyzoiten von *T. gondii* bzw. deren spezifisches Oberflächenantigen STAg (Aliberti et al. 2002).

Auch IL-18 zeigte eine protektive Wirkung bei Infektionen mit *Trypanosoma cruzi* (Müller et al. 2001) und *L. major* (Monteforte et al. 2000). Es fördert die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie des Chemokins IL-8 beim Säuger (Netea et al. 2000). Die Unterdrückung dieses Zytokins könnte somit das Überleben und die Replikation von *S. calchasi* fördern.

IFN- $\gamma$  wird im Gehirn von infiltrierten T-Lymphozyten, aber auch von Mikroglia und Blutmakrophagen sezerniert (Carruthers und Suzuki 2007). Wie in der Literaturübersicht im Detail beschrieben, spielt es eine der zentralen Rollen bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger und ist der Hauptvermittler einer Resistenz gegenüber *T. gondii* (Suzuki et al. 1998). So verhindert es unter anderem eine Reaktivierung der persistierenden Erreger im ZNS und schützt so unter anderem vor der Ausbildung einer *Toxoplasma*-assoziierten Enzephalitis (Carruthers und Suzuki 2007). Die Hemmung der transkriptionalen Aktivität von IFN- $\gamma$  durch intrazelluläre Parasiten erscheint ausschlaggebend für deren Fähigkeit innerhalb der Wirtszelle zu überleben und eine persistente Infektion aufrecht zu erhalten.

Über die Beeinflussung der  $T_H$ -1 Immunantwort durch Sarkosporidien ist dagegen kaum etwas bekannt. Auch fehlen Daten über die Beeinflussung der Immunantwort des Vogels durch protozoäre Infektionserreger. Allerdings gibt es erste Erkenntnisse zu *S. neurona*, die deutlich auf eine Einflussnahme in den Steuermechanismen der Immunabwehr des Wirts hinweisen. So ist das Oberflächenprotein SnSAG1 der Merozoiten von *S. neurona* in vitro in der Lage, eine IFN- $\gamma$ -Synthese in peripheren Blutlymphozyten von EPM-negativen Pferden zu induzieren, jedoch nicht in Lymphozyten von EPM-positiven Pferden. Es scheint als könnte *S. neurona* eine Immunsuppression gegenüber seiner Antigene im Wirt induzieren, wodurch die Parasiten-spezifische Immunantwort reduziert ist (Spencer et al. 2004).

Ein weiteres, während der 1. Phase signifikant herunterreguliertes Zytokin ist das **IL-15** (Hong et al. 2006b). Beim Säuger fördert es zusammen mit IL-18 die Proliferation von NK-Zellen (French et al. 2006). Über die Funktionsweise des Hühner-IL-15 ist dagegen noch wenig bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass sie ähnlich der des Säugers ist (Lillehoj et al. 2001). Man weiß jedoch bereits, dass IL-15 (auch beim Huhn) einen T-Zell-Wachstumsfaktor darstellt (Kennedy und Park 1996). Während einer *T. gondii*-Infektion aktiviert es  $CD4^+$ T-Zellen und  $CD8^+$ T-Zellen. Die  $CD8^+$ T-Zellen werden dadurch wiederum angeregt, IFN- $\gamma$  zu produzieren (Khan und Kasper 1996). Bei verringerter IL-15-Synthese verringert sich demnach auch die IFN- $\gamma$ -Expression. Dies könnte in der 1. Phase mit ein möglicher Grund für die starke Herunterregulierung von IFN- $\gamma$  sein. Ein Mangel an IL-15 führt außerdem dazu, dass die Dendritischen Zellen nur noch eingeschränkt in der Lage sind  $CD4^+$ T-Zellen durch Antigenpräsentation zu aktivieren und zu prägen. Dies führt bei *T. gondii*-Infektionen zu einer eingeschränkten Immunantwort auf den Erreger, wodurch dessen Überleben gefördert wird (Combe et al. 2006).

Im Gegensatz zu den  $T_H$ 1-Zytokinen sind in der 1. Phase der Erkrankung die proinflammatorischen Zytokine **IL-1 $\beta$**  und **IL-6** in ihrer Expression hochreguliert. Beide spielen eine Rolle während der Akute-Phase-Reaktion des Körpers, wobei sie für den Anstieg bestimmter Akute-Phase-Proteine sorgen (Wegenka et al. 1993). Zudem besitzen beide Zytokine sowohl beim Säuger (LeMay et al. 1990) als auch beim Vogel (Marais et al. 2011) fieberauslösende Eigenschaften. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass das Immunsystem der Taube beginnt, sich mit dem Erreger im ZNS auseinander zu setzen. IL-1 $\beta$  und IL-6 werden auch zusammen mit TNF- $\alpha$  eine Bedeutung bei der Induktion einer angemessenen Immunreaktion gegen *T. gondii* (beim Säuger) beigemessen (Lang et al. 2007). So konnte bei *in vitro*-Versuchen in humanen Fibroblasten bereits nach zwei Stunden p.i. mit *T. gondii* eine erhöhte Regulation von IL-6 und IL-1 $\beta$  registriert werden (Carruthers und Suzuki 2007). Ebenfalls vermehrt exprimiert ist das Chemokin **IL-8**, welches insbesondere in der akuten Phase für die Rekrutierung von Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten (Barker et al. 1993; Poh et al. 2008; Wu et al. 2008) verantwortlich ist (Withanage et al. 2004). Obwohl

dieses Chemokin zusammen mit den Akute-Phase Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-6 überexprimiert wird, konnte im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen kein vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen in den Gehirnen der Tiere in der ersten Phase der Krankheit festgestellt werden. Als Grund für die fehlende Einwanderung von Entzündungszellen könnte eine Herunterregulation der T<sub>H</sub>1-Antwort vermutet werden.

Die TGF- $\beta$ 2-Expression weist im Gruppenvergleich in der ersten Krankheitsphase einen FC-Wert von 0,52 auf und gilt damit gerade noch als nicht reguliert. Schaut man sich jedoch die ermittelten Einzelwerte an (siehe Tabelle 24 im Anhang), kann man feststellen, dass insgesamt 6 von 8 Tieren einen FC < 0,5 aufweisen und damit in ihrer Expression herunterreguliert sind. Die FC-Werte der restlichen 2 Tiere liegen im nicht regulierten Bereich. Man kann also davon ausgehen, dass TGF- $\beta$ 2 in der ersten Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer exprimiert wird. TGF- $\beta$  besitzt bei Säugern üblicherweise eine neuroprotektive Wirkung (Aigner und Bogdahn 2008). Es wurde berichtet, dass verschiedene Protozoen in der Lage sind TGF- $\beta$  zu induzieren und darüber die T<sub>H</sub>1-Antwort zu unterdrücken, was sich in einer reduzierten TNF- $\alpha$ -Produktion durch Makrophagen und einer reduzierten IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen widerspiegelt. Dieser Evasionsmechanismus gegenüber der T<sub>H</sub>1-Immunantwort wurde bereits für *T. gondii*, *Trypanosoma cruzi* und verschiedenen *Leishmania spp.* aufgeklärt (Bogdan und Röllinghoff 1999; Lang et al. 2007). Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei *S. calchasi* die Hemmung der T<sub>H</sub>1-Antwort vermutlich nicht auf einer erhöhten TGF- $\beta$ 2-Expression beruht.

### 5.3.2.2 Zweite Erkrankungsphase

Die zweite Phase der Erkrankung der Tauben ist geprägt durch eine sehr stark hochregulierte IFN- $\gamma$ -Expression im Gehirn, die mit prominenten mononukleären Entzündungszellinfiltrationen korreliert. Dagegen erscheint IL-18 sogar noch weiter herunterreguliert als in der ersten Phase der Erkrankung, während IL-12 unreguliert erscheint. Normalerweise wird die IFN- $\gamma$ -Synthese durch NK-Zellen, T-Zellen und Makrophagen von IL-12 und IL-18 synergistisch gefördert (Dinarello und Fantuzzi 2003; French et al. 2006; Göbel et al. 2003; Okamura et al. 1998; Okamura et al. 1995a; Okamura et al. 1995b; Yoshimoto et al. 1998; Zhao et al. 2007). Dieses IFN- $\gamma$  aktiviert wiederum in Synergie mit TNF weitere Makrophagen und führt zu der Synthese inflammatorischer Zytokine und NO als Teil einer T<sub>H</sub>1-Antwort und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle intrazellulärer Pathogene. Gleichzeitig werden Makrophagen-vermittelte Mechanismen aktiviert, die etwa im Falle einer *T. gondii*-Infektion die intrazelluläre Replikation beschränken und die Beseitigung von Parasiten fördern (Zhao et al. 2007; siehe auch Kapitel 5.3.2.1, S. 114). Bei den *S. calchasi*-infizierten Tauben kommt es augenscheinlich während der zweiten Phase

ebenfalls zu einer überschießenden T<sub>H</sub>1-Antwort mit starken Entzündungserscheinungen im Gehirn. Da IL-18 in dieser Phase jedoch stark herunterreguliert ist, scheint es hier keine ursächliche Rolle bei dessen Entstehung zu spielen. Die Ergebnisse der Untersuchung lassen somit vermuten, dass möglicherweise auch in der 2. Phase Mechanismen wirksam sind, die weiterhin zumindest IL-18 unterdrücken während die Evasionsmechanismen des Parasiten für IFN- $\gamma$  nicht mehr greifen.

Anders herum lässt sich auch spekulieren, dass aus biologischer Sicht eine Entzündungsreaktion zu diesem Zeitpunkt dem Parasiten nützen könnte und daher eine IFN- $\gamma$ -Hochregulation eventuell sogar aktiv induziert oder nicht mehr aktiv verhindert wird. Zum Zeitpunkt des Auftretens der zentralnervösen Symptome findet sich vor allem in der Muskulatur der Taube eine große Zahl reifer Sarkozysten mit darin enthaltenen reifen und infektiösen Bradyzoiten. Die Enzephalitis ruft eine Reihe neurologischer Verhaltensänderungen bei der Taube hervor, wodurch sie mit hoher Wahrscheinlichkeit zur leichten Beute für ihren zumindest in Zentraleuropa wichtigen natürlichen Feind, den Habicht, wird. Dieser stellt gleichzeitig den Hauptwirt für *S. calchasi* dar und ist damit essentiell notwendig für die weitere Entwicklung und Verbreitung des Parasiten. Nur im Endwirt findet die geschlechtliche Vermehrung mit Ausbildung von Oozysten mit enthaltenen infektiösen Sporozoiten statt. So gesehen könnten sich aus biologischer Sicht durch eine Enzephalitis mit resultierenden zentralnervösen Symptomen in der zweiten Erkrankungsphase durchaus Vorteile für die Entwicklung und die Verbreitung von *S. calchasi* ergeben.

Mit einem Rückblick auf die 1. Phase, in der IFN- $\gamma$  stark herunterreguliert ist, lässt sich davon ausgehen, dass das IFN-System einer der zentralen Angelpunkte der Immunabwehr ist, das offenbar von *S. calchasi* beeinflusst wird. Wie oben ausführlich beschrieben ist IFN- $\gamma$  ein wichtiger Vermittler einer protektiven Immunantwort gegenüber intrazellulären Parasiten. *S. calchasi* scheint in erster Linie auf die Expression von IFN- $\gamma$  selbst einzuwirken. Um herauszufinden, ob *S. calchasi* in die IFN- $\gamma$ -nachgeschalteten Signalkaskaden eingreift müssen weitere Untersuchungen folgen.

Interessanterweise sind in der chronischen Phase neben IFN- $\gamma$  die proinflammatorischen Zytokine **TL1A** und **LITAF** überexprimiert. Die Synthese von chTL1A wird durch LITAF gefördert. Es besitzt wie TL1A zytotoxische Aktivität. Eine erhöhte Expression von LITAF trat bei Darminfektionen von Hühnern mit Eimerien auf (Hong et al. 2006a). Eine erhöhte Expression von chTL1A konnten ebenfalls bei chronischen Darminfektionen des Huhns mit Eimerien (Park et al 2007) beobachtet werden. TL1A fördert beim Huhn die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  als auch die Serumkonzentrationen der Akute-Phase-Proteine (Takimoto et al., 2008b). Beim Säuger wird TNF- $\alpha$  als Antwort auf Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die an die PRRs auf der Oberfläche von Makrophagen binden,

durch diese Makrophagen produziert. Dieses TNF- $\alpha$  aktiviert wiederum in Synergie mit IFN- $\gamma$  weitere Makrophagen und führt zu der Synthese inflammatorischer Zytokine und von NO als Teil einer T<sub>H</sub>1-Antwort und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle intrazellulärer Pathogene (Miller et al. 2009). TL1A könnte demnach eine Rolle bei der starken Hochregulation von IFN- $\gamma$  während dieser zweiten Erkrankungsphase spielen.

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen in der zweiten Erkrankungsphase eine stark exprimierte T<sub>H</sub>1-Immunantwort als Reaktion auf den Parasiten erkennen, wobei offenbar IL-12 und IL-18 nicht aktiv an dieser Aktivierung des Immunsystems beteiligt sind.

#### **5.4 Lokalisierung von MHC-II-, CD3- und Pax-5-exprimierenden Zellen im Gehirn**

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde mittels Immunhistochemie untersucht, welche Zelltypen im Gehirn am Entzündungsgeschehen mit beteiligt sind. Über dieses Verfahren ist es möglich, die genaue Lokalisation von Zielantigen im natürlichen Gewebeverband darzustellen. Auf diese Weise konnten sowohl MHC-II-Oberflächen-Moleküle als auch CD3-positive und Pax-5-positive Zellen in Entzündungsgebieten des Gehirns nachgewiesen werden.

MHC-II-positive Signale fanden sich während der 2. Krankheitsphase verstärkt in Gehirnarealen mit starker Immunzellinfiltration, um Blutgefäße, Gliazellen und Nekrosen. Verschiedene Arten von antigenpräsentierenden Zellen können MHC-II exprimieren. Dazu zählen Monozyten, Makrophagen, Mikroglia, B-Zellen und Dendritische Zellen. In der zweiten Phase der Infektion zeigt sich ein lymphohistiozytäres Entzündungsbild geprägt von einer starken Infiltration mit Lymphozyten und weniger Makrophagen. Die starke Hochregulation der IFN- $\gamma$ -Synthese spiegelt sich dabei in einem hohen Grad an infiltrierenden Lymphozyten und Makrophagen sowie einer Überexpression von TL1A / LITAF wieder. INF- $\gamma$ -aktivierte Makrophagen exprimieren mehr MHC-II auf ihrer Oberfläche (Lang et al. 2007) und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und TNF sowie Chemokine welche die Entzündungsreaktion weiter vorantreiben (Miller et al. 2009).

Das prominente immunhistochemische Signal für CD3, lokalisiert auf mononukleären Zellen, lässt auf eine maßgebliche T-Zell-Komponente der mononukleären Entzündungszellinfiltration der zweiten Erkrankungsphase schließen. Im Gegensatz dazu fanden sich nur wenige Pax-5-positive B-Zellen in den Entzündungszellinfiltraten. Die deutliche Prominenz der T-Zellen lässt sich mit der deutlichen Überexpression von IFN- $\gamma$  vereinbaren.

Die Erkenntnisse aus der immunhistochemischen Untersuchung der hier vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass während der durch *S. calchasi* ausgelösten chronischen zerebralen Immunreaktion maßgeblich eine zellvermittelte Immunreaktion vorherrscht, wie es auch bei

den Erregern *S. neurona*, *T. gondii* und *N. caninum* der Fall ist. Der Charakter der prominenten Entzündungszellinfiltrate im Gehirn, bei gleichzeitiger Abwesenheit assoziierbarer Parasitenbestandteile, lassen die Beteiligung einer Immunpathologie im Sinne einer Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV wahrscheinlich erscheinen und bedürfen weiterer Untersuchungen.

## 5.5 Ausblick

Diese Dissertationsarbeit beleuchtet die Immunantwort der Taube auf den Erreger *S. calchasi* unter experimentellen Bedingungen. Die Tauben wurden einer hohen Infektionsdosis ausgesetzt. Die daraus resultierenden teils massiven Krankheitserscheinungen in der ersten Erkrankungsphase führten bei einem großen Teil der Tiere bereits nach wenigen Tagen zum Tod. Unter natürlichen Bedingungen ist jedoch anzunehmen, dass wildlebende Tauben nie einem solch hohen Infektionsdruck ausgesetzt sind. Man kann daher davon ausgehen, dass es nicht im Sinn des Parasiten ist, seinen Wirt bereits während der ersten Krankheitsphase massiv zu schädigen oder gar zu töten. In der ersten Krankheitsphase vollzieht sich die Replikation von *S. calchasi* in Form der Schizogonie, gekennzeichnet durch die Ausbildung von Schizonten in einer Reihe von verschiedenen Organen. Da aber erst die wesentlich später ausgereiften Gewebszysten und nicht die Schizonten für den Hauptwirt infektiös sind, würde der Tod des Zwischenwirts zu diesem Zeitpunkt den Entwicklungszyklus von *S. calchasi* unterbrechen.

Auch bei Infektion mit *S. neurona* verläuft eine Infektion in der Regel ohne klinische Symptomatik des natürlichen Zwischenwirts. Nur in Ausnahmefällen, meist in Verbindung mit immunsupprimierenden Ereignissen, und bei Befall des vermeintlichen Fehlwirts, dem Pferd, führt *S. neurona* zu einer Enzephalitis mit dem entsprechenden Krankheitsbild. Auch *T. gondii*-Infektionen verlaufen bei immunkompetenten Wirten symptomlos und erhalten dadurch die Fitness des Parasiten, indem der Wirtsorganismus nicht fatal geschädigt wird.

Mit Hilfe der Aufstellung eines Zytokinexpressionsprofils konnte in der ersten Phase der Erkrankung bei Tauben eine herunterregulierte  $T_H1$ -Immunantwort festgestellt werden, unter anderem gekennzeichnet durch eine verminderte Expression von IL-12, IFN- $\gamma$  und IL-18. Von *T. gondii* ist bekannt, dass er während der akuten Phase der Infektion aktiv die proinflammatorische  $T_H1$ -Immunantwort unterdrückt, indem er in verschiedene Signalkaskaden seiner Wirtszelle eingreift, wodurch die Elimination des Parasiten durch den Wirt eingeschränkt wird und eine überschießende Entzündungsreaktion verhindert wird. Es ist denkbar, dass *S. calchasi* über ähnliche Evasionsmechanismen verfügt. Obgleich die in dieser Arbeit erlangten neuen Erkenntnisse über die Immunantwort der Taube auf den protozoalen Erreger *S. calchasi* darauf hindeuten, dass der Erreger aktiv in die Immunantwort seines Wirts eingreift und damit die initial aufgestellte Hypothese Stand hält, sind für ein besseres Verständnis der Evasionsmechanismen weiterführende Untersuchungen notwendig. Insbesondere weiterführende *in vitro* Untersuchungen könnten Aufschluss bringen, an welchen Punkten der Signalkaskaden der  $T_H1$ -Immunantwort in der Wirtszelle der Parasit genau angreift. Von besonderem Interesse ist dabei der Einfluss von *S. calchasi* auf die IFN- $\gamma$ -geförderten antiparasitischen Effektormechanismen. Um herauszufinden, ob die Herunterregulation von IFN- $\gamma$  ein konservierter Mechanismus von *Sarcocystis* ist, wäre es

von Vorteil, vergleichende Untersuchungen von *S. calchasi* und *S. neurona* in Zellkultur durchzuführen. Eine Microarray-Analyse könnte dabei neue Erkenntnisse über die von IFN- $\gamma$  regulierten Gene liefern und die Bedeutung einer möglichen Unterdrückung des IFN- $\gamma$ -*pathway* weiter beleuchten.

Etwa sieben bis acht Wochen p.i. beginnt die zweite Erkrankungsphase der Tauben, gekennzeichnet durch ein zentralnervöses Krankheitsbild und das Auftreten von Gewebszysten (extraläsional) im ZNS sowie einer starken Entzündungsreaktion im Gehirn. Damit einher geht die Ausbildung reifer und damit infektiöser Sarkozysten in der Muskulatur. Die Zytokinantwort wird dominiert von einer massiven Überexpression von IFN- $\gamma$ . Noch nicht abschließend geklärt bleibt, ob dieser Wechsel der Immunantwort von der ersten zur zweiten Erkrankungsphase von dem Parasiten bezweckt und evtl. sogar aktiv herbeigeführt wird, etwa um durch eine Verhaltensänderung der Taube seine Übertragungschancen auf den Endwirt zu erhöhen, oder ob es sich um eine durch den Wirt induzierte Abwehrreaktion handelt, welche jedoch in Anbetracht der nicht vorhandenen intraläsionalen Parasitenstadien als übersteigert erscheinen muss. Die initial aufgestellte Hypothese wird durch die hier erstellten Ergebnisse durchaus gestützt, eine abschließende Beurteilung, sowie die dabei möglicherweise beteiligten Mechanismen bedürfen jedoch der weiteren Aufklärung.

## 6 Zusammenfassung

### **Hinweise auf eine Immunmodulation durch den Parasiten *Sarcocystis calchasi* bei der zerebralen Sarkosporidiose der Haustaube (*Columba livia f. dom.*)**

Anne Lisa Mulzer (geb. Meyer)

*Sarcocystis calchasi*, ein zum Stamm der Apicomplexa zählender Parasit, wurde 2009 als Erreger der protozoären Enzephalitis der Taube (engl. *Pigeon protozoal encephalitis*, PPE) identifiziert. Diese zentralnervöse Erkrankung der Haustaube, die durch einen zweiphasigen Krankheitsverlauf gekennzeichnet ist, konnte bisher sowohl in Deutschland als auch in den USA nachgewiesen werden. Zur Pathophysiologie der PPE war bisher kaum etwas bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ausgewählte Komponenten der Immunantwort der Haustaube auf eine Infektion mit *S. calchasi* näher zu charakterisieren und Hinweise dafür zu finden, ob *S. calchasi* in der Lage ist, die Immunantwort seines Zwischenwirts zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden zunächst Gehirne von Tauben aus der ersten (n=8) und zweiten Erkrankungsphase (n=7) auf das Vorliegen des Parasiten hin untersucht. Dies geschah sowohl mit Hilfe einer nested-PCR auf DNA-Ebene als auch immunhistochemisch mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten für *S. calchasi*-spezifischen Antikörpers. Mit Hilfe der PCR konnte in den Gehirnen aller untersuchten Tiere beider Erkrankungsphasen mit einer Ausnahme in der 2. Phase DNA von *S. calchasi* nachgewiesen werden. In den Gehirnen der in der ersten Krankheitsphase verstorbenen Tiere lagen keinerlei feststellbare zelluläre Immunreaktionen vor. Dennoch konnten mit Hilfe des spezifischen Antikörpers in vier von acht untersuchten Tieren wenige, vereinzelt vorliegende Schizonten im Gehirn sichtbar gemacht werden. Die Tiere, die aufgrund starker neurologischer Symptome während der zweiten Erkrankungsphase euthanasiert wurden, zeigten hingegen massive lymphohistiozytäre Entzündungszellinfiltrate im Gehirn. Dennoch konnten nur in drei von insgesamt sieben untersuchten Tieren vereinzelt Gewebszysten des Erregers außerhalb der Gewebsläsionen in den unveränderten Gehirnarealen nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (RT-qPCR) ein Zytokinexpressionsprofil des Gehirns der infizierten Tauben für beide Krankheitsphasen erstellt. Untersucht wurden die Expressionsraten der Zytokine Interleukin (IL) 1, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumor-Nekrose-Faktor-ähnlicher Ligand 1A (TL1A), Lipopolysaccharid-induzierter TNF-alpha Faktor (LITAF), Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) und des Chemokins IL-8. Um diese relativ quantifizieren zu können, mussten passende Referenzgene ausgewählt und die entsprechenden RT-qPCR-Untersuchungsmethoden etabliert werden.

Insgesamt wurden 10 Referenzgene, nämlich  $\beta$ -actin (beta-actin), GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), Gusb (Glucuronidase, beta), HMBS (Hydroxymethylbilan-

Synthase), HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), RPL13 (ribosomales Protein L13), RPL19 (ribosomales Protein L19), RPS7 (ribosomales Protein S7), TFRC (Transferrin-Rezeptor) und Ywhaz (Tyrosin 3-Monooxygenase / Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivierungsprotein, zeta-Polypeptid) für die Taube etabliert. Zusätzlich zu den Zytokinexpressionen wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper untersucht, welche Arten von Entzündungszellen an der Ausbildung der Gehirnläsionen während der zweiten Erkrankungsphase beteiligt sind.

Im Ergebnis zeigte sich während der ersten Krankheitsphase, der Phase der Schizogonie, im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren eine Herunterregulation von IL-15, IL-18 und IFN- $\gamma$  (alle drei statistisch signifikant) sowie IL-12 und eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und des Chemokins IL-8. In der zweiten, zentralnervösen Phase hingegen erschien IFN- $\gamma$  zusammen mit TL1A und LITAF signifikant hochreguliert. Diese vermehrte Expression an proinflammatorischen Zytokinen ging einher mit einer starken Expression des Oberflächenproteins MHC-II in Läsionen des Gehirns. Der Großteil der mononuklearen Zellen wurde mittels immunhistochemischer Untersuchung als T-Lymphozyten identifiziert.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass *S. calchasi* die T<sub>H</sub>1-Immunantwort seines Zwischenwirtes während der ersten Krankheitsphase manipulieren kann und auf diesem Wege eine protektive antiparasitäre, zelluläre Immunreaktion verhindert. Während der zweiten, zentralnervösen Krankheitsphase scheint es hingegen zu einer überschießenden T-Zell-vermittelten Immunreaktion im Sinne einer Typ IV Hypersensitivitätsreaktion zu kommen, welche verantwortlich sein könnte für die massiven entzündlichen Veränderungen und Läsionen im Gehirn der Tauben. Betrachtet man beide Phasen in Kombination, scheint es durchaus plausibel, dass diese komplexe Pathologie dem Parasiten die Übertragung vom Zwischenwirt zum Endwirt erleichtern könnte.

## 7 Summary

### **Indications of immunomodulation in cerebral sarcosporidiosis in domestic pigeon (*Columba livia f. dom.*) caused by the parasite *Sarcocystis calchasi***

Anne Lisa Mulzer (geb. Meyer)

*Sarcocystis calchasi* is an apicomplexan parasite that has been described as the cause of Pigeon Protozoal Encephalitis (PPE) of pigeons in 2009. This central nervous disease of domestic pigeons which is characterized by a biphasic clinical course has so far been identified in Germany and the USA. Until now the pathophysiology of PPE has been unclear. The present work aimed at investigating the immunological response of the domestic pigeons towards an infection with *S. calchasi* and its ability to interfere with the immune response in PPE. For this reason the brains of pigeons from both clinical phases were examined for the presence of parasite DNA by nested-PCR, which found all but one pigeon positive in both disease phases. Furthermore, a specific antibody for *S. calchasi* was developed to immunohistochemically analyze the pigeons brains for the presence of parasite protein. During the first phase of disease no cellular immunological reaction was discernable. However, four of eight pigeons had a very low load of positive labeled schizonts in the neuropil. In contrast, all pigeons that had to be euthanized because of severe neurological signs during the second phase of disease had a massive lymphohistocytic immune cell infiltration in the brain. Importantly, in only three of seven pigeons few tissue cysts of the parasite could be immunohistochemically labeled in unaffected areas.

In the second part of this thesis, the expression of important cytokines in the pigeons brains during both disease phases was examined by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). In particular the expression rates of interleukin (IL) 1, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF-like factor 1A (TL1A), lipopolysaccharid-inducing TNF-alpha factor (LITAF), transforming growth factor  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) and of the chemokine IL-8 were measured. For relative quantification of gene expression suitable reference genes had to be chosen and established for RT-qPCR analysis. Therefore, ten reference genes, namely  $\beta$ -actin (beta-actin), GAPDH (glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase), Gusb (glucuronidase, beta), HMBS (hydroxymethylbilan-synthase), HPRT (hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase), RPL13 (ribosomal protein L13), RPL19 (ribosomal protein L19), RPS7 (ribosomal Protein S7), TFRC (transferrin-receptor) and Ywhaz (tyrosin 3-monooxygenase / tryptophan 5-monooxygenase activating protein, zeta-polypeptid) were established de novo for the pigeon. In addition, the composition of inflammatory cells in the brain lesions of the second disease phase was investigated by specific antibodies.

The results show that during the first disease phase (schizogony of the parasite) the cytokines IL-15, IL-18 and IFN- $\gamma$  (all of them significantly) and IL-12 were down-modulated when

compared with the control group. Proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and the chemokine IL-8 were up-modulated. In contrast, in the central nervous, second phase of disease, IFN- $\gamma$  together with TL1A and LITAF were significantly up-modulated, which correlated with a prominent MHC-II protein expression in areas of mononuclear cell infiltration and necrosis. Immunohistochemically, the mononuclear cell fraction was identified as mainly T-lymphocytes.

In conclusion, the results of the present study suggest that *S. calchasi* may be capable of manipulating the T<sub>H</sub>1 immune response of the intermediate host during the first phase of disease and by this hinder a protective anti-parasitic cellular immune response. The results further suggest that during the late central nervous phase a T-cell mediated delayed-type hypersensitivity reaction may cause the severe inflammatory cerebral lesions in the pigeons. In combination, it seems plausible that this complex pathology may aid in the spread of the parasite from the intermediate host to the definitive host.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Tiere aus dem Infektionsversuch.....	46
Tabelle 2: Alkoholreihe.....	51
Tabelle 3: Etablierte Erstantikörper .....	52
Tabelle 4: Primer für die Semi-nested-PCR.....	58
Tabelle 5: Zusammensetzung des jeweiligen Mastermix pro PCR-Ansatz für den ersten und zweiten Amplifikationsschritt der Semi-nested PCR .....	59
Tabelle 6: Temperatur-Zeitprofil der Semi-nested PCR.....	60
Tabelle 7: Komponenten eines Reaktionsansatzes der RT-qPCR .....	65
Tabelle 8: Auswahl der potentiellen Referenzgene und ihre Funktion in eukaryontischen Zellen.....	66
Tabelle 9: Sarkosporidien-Nachweis mittels IHC.....	78
Tabelle 10: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA-Proben .....	81
Tabelle 11: Etablierte Primer für den Nachweis der Referenzgene .....	82
Tabelle 12: Etablierte Primer für den Nachweis der Zielgene (GOI) .....	83
Tabelle 13: Etablierte Referenzgene .....	84
Tabelle 14: Etablierte Zielgene .....	91
Tabelle 15: Ergebnisse des Levene-Test über die differentielle Replikation der untersuchten Zytokine .....	107
Tabelle 16: Ergebnisse des Bonferroni post hoc Test über die differentielle Replikation der untersuchten Zytokine .....	108
Tabelle 17: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zur Charakterisierung der Immunzellinfiltration in den entzündlich veränderten Bereichen des Cerebrum .....	156
Tabelle 18: C <sub>T</sub> -Werte für die Referenzgene in cDNA-Proben des ersten Ansatzes der cDNA-Synthese (cDNA (1)) .....	157
Tabelle 19: C <sub>T</sub> -Werte für die Referenzgene in cDNA-Proben des zweiten Ansatzes der cDNA-Synthese (cDNA (2)) .....	158
Tabelle 20: C <sub>T</sub> -Werte für die Zielgene (GOI), Teil 1.....	159
Tabelle 21: C <sub>T</sub> -Werte für die Zielgene (GOI), Teil 2.....	160
Tabelle 22: FC-Werte der Referenzgene.....	161
Tabelle 23: FC-Werte der Zielgene (GOI), Teil 1 .....	162
Tabelle 24: FC-Werte der Zielgene (GOI), Teil 2 .....	163

## 9 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Beispielhafte immunhistochemische Darstellung der MHC-II-positiven Gebiete des Gehirns der Taube Nummer 10 mit typischen Läsionen während der zweiten, neurologischen Erkrankungsphase. ....	76
Abbildung 2: Beispielhafte immunhistochemische Darstellung von CD3-positiven T-Zellen (A) und Pax-5-positiven B-Zellen (B).....	77
Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung eines reaktionslosen Schizonten.....	79
Abbildung 4: Immunhistochemische Darstellung einer reaktionslosen Gewebszyste.....	79
Abbildung 5: Nachweis von <i>S. calchasi</i> DNA der ITS1 Region in Gehirnen der Tauben mittels spezifischer semi-nested-PCR Primer. ....	82
Abbildung 6: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des $\beta$ -actin des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	85
Abbildung 7: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des GAPDH der Haustaube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten). (Primer orange hinterlegt) .....	86
Abbildung 8: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des Gusb des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	87
Abbildung 9: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des HMBS des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	87
Abbildung 10: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des HPRT des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	88
Abbildung 11: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des RPL13 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	88
Abbildung 12: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des RPL19 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	89
Abbildung 13: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des RPS7 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	89
Abbildung 14: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des TFRC des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	90
Abbildung 15: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des Ywhaz des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	91
Abbildung 16: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-1 $\beta$ der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten). (Primer orange hinterlegt) .....	92
Abbildung 17: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-6 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	93

Abbildung 18: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-7 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	93
Abbildung 19: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-8 der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten). (Primer orange hinterlegt) .....	94
Abbildung 20: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-12 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	95
Abbildung 21: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-15 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	95
Abbildung 22: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IL-18 des Huhns. (Primer orange hinterlegt) .....	96
Abbildung 23: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des IFN- $\gamma$ der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten). (Primer orange hinterlegt) .....	97
Abbildung 24: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des LITAF der Taube und des Huhns (oben) beziehungsweise nur der Taube (unten). (Primer orange hinterlegt) .....	98
Abbildung 25: Alignment der Aminosäuresequenzen des LITAF der Taube, des Huhns und des sequenzierten RT-qPCR-Produktes.....	99
Abbildung 26: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des TGF- $\beta$ 2 des Huhns. (Primer orange hinterlegt).....	99
Abbildung 27: Alignment der sequenzierten cDNA-Sequenz des RT-qPCR-Produktes mit der Sequenz des TL1A des Huhns. (Primer orange hinterlegt).....	100
Abbildung 28: Bedeutung der Symbole in einem Boxplot .....	101
Abbildung 29: Verteilung der $C_T$ -Werte von je 27 Proben für die jeweiligen Referenzgene. ....	102
Abbildung 30: Durchschnittliche Expressionsstabilitäten der verbleibenden Referenzgene. ....	103
Abbildung 31: Bestimmung der optimalen Anzahl an Referenzgenen für die Normalisierung. ....	104
Abbildung 32: Graphische Darstellung der Expressionsstabilität der zur relativen Quantifizierung ausgewählten Referenzgene. ....	105
Abbildung 33: Expressionsstärken der Zytokin-mRNA-Sequenzen. ....	106

## 10 Referenzen

- Abe K, Chu P-j, Ishihara A, Saito H (1996) Transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes re-elongation of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research* 723(1-2), 206-209
- Abrahamsohn IA, Coffman RL (1996) Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology* 84(2), 231-244
- Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3(9), 745-756
- Agnello D, Lankford CSR, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *Journal of Clinical Immunology* 23(3), 147-161
- Agostinelli C, Sabattini E, Gjørret JO, Righi S, Rossi M, Mancini M, Piccaluga PP, Bacci F, Marafioti T, Bettini G, Falini B, Pileri SA (2010) Characterization of a New Monoclonal Antibody Against PAX5/BASP in 1525 Paraffin-embedded Human and Animal Tissue Samples. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 18(6), 561-572
- Aguilar RF, Shaw DP, Dubey JP, Redig P (1991) Sarcocystis-associated encephalitis in an immature northern goshawk (*Accipiter gentilis atricapillus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22(4), 466-469
- Aiello FB, Keller JR, Klarmann KD, Dranoff G, Mazzucchelli R, Durum SK (2007) IL-7 induces myelopoiesis and erythropoiesis. *The Journal of Immunology* 178(3), 1553-1563
- Aigner L, Bogdahn U (2008) TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell and Tissue Research* 331(1), 225-241
- Airoidi I, Gri G, Marshall JD, Corcione A, Facchetti P, Guglielmino R, Trinchieri G, Pistoia V (2000) Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *The Journal of Immunology* 165(12), 6880-6888
- Aliberti J, Bafica A (2005) Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73(3-4), 283-288
- Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa C, Serhan CN, Sher A (2002) Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nature Immunology* 3(1), 76-82
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403-410
- Andreasen CB, Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Golden JM, Brown J (1991) Heterophil function in healthy chickens and in chickens with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Veterinary Pathology Online* 28(5), 419-427
- Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH (1995) IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *The Journal of Immunology* 154(2), 483-490
- Aviles H, Stiles J, O'Donnell P, Orshal J, Leid J, Sonnenfeld G, Monroy F (2008) Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine toxoplasma infection. *The Journal of Parasitology* 94(6), 1282-1288
- Babu S, Ganley LM, Klei TR, Shultz LD, Rajan TV (2000) Role of Gamma Interferon and Interleukin-4 in Host Defense against the Human Filarial Parasite *Brugia malayi*. *Infection and Immunity* 68(5), 3034-3035
- Bader SR, Kothlow S, Trapp S, Schwarz SCN, Philipp H-C, Weigend S, Sharifi AR, Preisinger R, Schmahl W, Kaspers B, Matiasek K (2010) Acute parietic syndrome in

- juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. *J Neuroinflammation* 7, 7-7
- Balu S, Kaiser P (2003) Avian interleukin-12 $\beta$  (p40): cloning and characterization of the cDNA and gene. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 23(12), 699-707
- Barker KA, Hampe A, Stoeckle MY, Hanafusa H (1993) Transformation-associated cytokine 9E3/CEF4 is chemotactic for chicken peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology* 67(6), 3528-3533
- Barrows PL, Hayes FA (1977) Studies of endoparasites of the mourning dove (*Zenaidura macroura*) in the southeast United States. *Journal of Wildlife Diseases* 13(1), 24-28
- Baumann H, Jahreis GP, Sauder DN, Koj A (1984) Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. *Journal of Biological Chemistry* 259(11), 7331-7342
- Beijing Genomics Intitute (BGI), Duck Genome Consortium (2012) The duck (*Anas platyrhynchos*) genome. Abgerufen am: 03.02.2013, von [http://pre.ensembl.org/Anas\\_platyrhynchos/Info/](http://pre.ensembl.org/Anas_platyrhynchos/Info/).
- Benveniste EN, Kwon J, Chung WJ, Sampson J, Pandya K, Tang LP (1994) Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF- $\beta$ . *The Journal of Immunology* 153(11), 5210-5221
- Benveniste EN, Tang LP, Law RM (1995) Differential regulation of astrocyte TNF- $\alpha$  expression by the cytokines TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-10. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13(3-4), 341-349
- Bertram EM, Wilkinson RG, Lee BA, Jilbert AR, Kotlarski I (1996) Identification of duck T lymphocytes using an anti-human T cell (CD3) antiserum. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51(3-4), 353-363
- Bhadra R, Guan H, Khan IA (2010) Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 $^+$  T cell response against *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 5(5)
- Biet F, Loch C, Kremer L (2002) Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *Journal of Molecular Medicine* 80(3), 147-162
- Bisby TM, Holman PJ, Pitoc GA, Packer RA, Thompson CA, Raskin RE (2010) *Sarcocystis* sp. encephalomyelitis in a cat. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 39(1), 105-112
- Blank RB, Lamb EW, Tocheva AS, Crow ET, Lim KC, McKerrow JH, Davies SJ (2006) The common  $\gamma$  chain cytokines interleukin (IL)-2 and IL-7 indirectly modulate blood fluke development via effects on CD4 $^+$  T cells. *Journal of Infectious Diseases* 194(11), 1609-1616
- Bogdan C, Röllinghoff M (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today* 15(1), 22-28
- Bohne W, Heesemann J, Gross U (1993) Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infection and Immunity* 61(3), 1141-1145
- Bohne W, Heesemann J, Gross U (1994) Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infection and Immunity* 62(5), 1761-1767
- Bolcato-Bellemin A-L, Mattei M-G, Fenton M, Amar S (2004) Molecular cloning and characterization of mouse LITAF cDNA: role in the regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene expression. *Journal of Endotoxin Research* 10(1), 15-23
- Borst P, Ulbert S (2001) Control of VSG gene expression sites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 114(1), 17-27

- Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor- $\beta$ s: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *Journal of Neurochemistry* 75(6), 2227-2240
- Box ED, Duszynski DW (1980) Sarcocystis of passerine birds: sexual stages in the opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Wildlife Diseases* 16(2), 209-215
- Box ED, Meier JL, Smith JH (1984) Description of *Sarcocystis falcatula* stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. *The Journal of Protozoology* 31(4), 521-524
- Box ED, Smith JH (1982) The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. *The Journal of Parasitology* 68(4), 668-673
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2), 169-193
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29(1), 23-39
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4), 611-622
- Bustin SA, Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15(3), 155-166
- Butcher BA, Denkers EY (2002) Mechanism of Entry Determines the Ability of *Toxoplasma Gondii* To Inhibit Macrophage Proinflammatory Cytokine Production. *Infection and Immunity* 70(9), 5216-5224
- Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY (2001) *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *The Journal of Immunology* 167(4), 2193-2201
- Cai G, Kastelein R, Hunter CA (2000) Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 68(12), 6932-6938
- Carruthers VB, Suzuki Y (2007) Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin* 33(3), 745-751
- Carson (1994) Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 180(4), 1395-1403
- Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA (1995) Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 96(6), 2578-2582
- Carter LL, Murphy KM (1999) Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon  $\gamma$  production from CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 189(8), 1355-1360
- Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Letters* 242(2), 237-239
- Caxton-Martins AE, Daimon T (1976) Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells. *Journal of Anatomy* 122(Pt 3), 553-558
- Cheadle MA, Ginn PE, Lindsay DS, Greiner EC (2002) Neurologic disease in gamma-interferon gene knockout mice caused by *Sarcocystis neurona* sporocysts collected from opossums fed armadillo muscle. *Veterinary Parasitology* 103(1-2), 65-69
- Cheadle MA, Tanhauser SM, Dame JB, Sellon DC, Hines M, Ginn PE, MacKay RJ, Greiner EC (2001a) The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *International Journal for Parasitology* 31(4), 330-335

- Cheadle MA, Yowell CA, Sellon DC, Hines M, Ginn PE, Marsh AE, Dame JB, Greiner EC (2001b) The striped skunk (*Mephitis mephitis*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *International Journal for Parasitology* 31(8), 843-849
- Chehimi J, Trinchieri G (1994) Interleukin-12: A bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 14, 149-161
- Chen H-Y, Cui B-A, Xia P-A, Li X-S, Hu G-Z, Yang M-F, Zhang H-Y, Wang X-B, Cao S-f, Zhang L-X, Kang X-T, Tu K (2008) Cloning, in vitro expression and bioactivity of duck interleukin-18. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123(3-4), 205-214
- Cheng C-S, Chen W-T, Lee L-H, Chen Y-W, Chang S-Y, Lyu P-C, Yin H-S (2011) Structural and functional comparison of cytokine interleukin-1 beta from chicken and human. *Molecular Immunology* 48(6-7), 947-955
- Chiang C-S, Stalder A, Samimi A, Campbell IL (1994) Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Developmental Neuroscience* 16(3-4), 212-221
- Chobotar B, Scholtyseck E (1982) Ultrastructure. In: Long PL (ed) *The biology of the coccidia*. University Park Press, Baltimore, pp 101-155
- Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Karolina Palucka A (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunology* 1(6), 510-514
- Combe CL, Moretto MM, Schwartzman JD, Gigley JP, Bzik DJ, Khan IA (2006) Lack of IL-15 results in the suboptimal priming of CD4+ T cell response against an intracellular parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(17), 6635-6640
- Conti B, Jahng JW, Tinti C, Son JH, Joh TH (1997) Induction of interferon- $\gamma$  inducing factor in the adrenal cortex. *Journal of Biological Chemistry* 272(4), 2035-2037
- Conti B, Park LCH, Calingasan NY, Kim Y, Kim H, Bae Y, E. Gibson G, Joh TH (1999) Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Molecular Brain Research* 67(1), 46-52
- Conti JA, Forrester DJ (1981) Interrelationships of parasites of white-winged doves and mourning doves in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* 17(4), 529-536
- Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MAO, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LFP (2008) Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 38(2), 157-159
- Cutler TJ, MacKay RJ, Ginn PE, Gillis K, Tanhauser SM, LeRay EV, Dame JB, Greiner EC (2001) Immunoconversion against *Sarcocystis neurona* in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. *Veterinary Parasitology* 95(2-4), 197-210
- Czerkinsky CC, Nilsson L-Å, Nygren H, Ouchterlony Ö, Tarkowski A (1983) A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2), 109-121
- Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães Jr U, Arnholdt ACV (2004) Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 6(14), 1287-1296
- Dalloul RA, Long JA, Zimin AV, Aslam L, Beal K, Ann Blomberg L, Bouffard P, Burt DW, Crasta O, Crooijmans RPMA, Cooper K, Coulombe RA, De S, Delany ME, Dodgson JB, Dong JJ, Evans C, Frederickson KM, Flicek P, Florea L, Folkerts O, Groenen MAM, Harkins TT, Herrero J, Hoffmann S, Megens H-J, Jiang A, de Jong P, Kaiser

- P, Kim H, Kim K-W, Kim S, Langenberger D, Lee M-K, Lee T, Mane S, Marcais G, Marz M, McElroy AP, Modise T, Nefedov M, Notredame C, Paton IR, Payne WS, Perteau G, Prickett D, Puiu D, Qiao D, Raineri E, Ruffier M, Salzberg SL, Schatz MC, Scheuring C, Schmidt CJ, Schroeder S, Searle SMJ, Smith EJ, Smith J, Sonstegard TS, Stadler PF, Tafer H, Tu Z, Van Tassell CP, Vilella AJ, Williams KP, Yorke JA, Zhang L, Zhang H-B, Zhang X, Zhang Y, Reed KM (2010) Multi-platform next-generation sequencing of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*): genome assembly and analysis. *PLoS Biology* 8(9), e1000475-e1000475
- Darwich L, Cabezon O, Echeverria I, Pabon M, Marco I, Molina-Lopez R, Alarcia-Alejos O, Lopez-Gatius F, Lavin S, Almeria S (2012) Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. *Veterinary Parasitology* 183(3-4), 377-381
- Däubener W, Remscheid C, Nockemann S, Pilz K, Seghrouchni S, Mackenzie C, Hadding U (1996) Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: Role of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *European Journal of Immunology* 26(2), 487-492
- Davison TF, Kaspers B, Schat KA (2008) *Avian immunology*, Academic Press. - ISBN:9780123706348.)
- Dawoud Al-Bader M, Ali Al-Sarraf H (2005) Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR. *Developmental Brain Research* 156(1), 38-45
- De Boever S, Croubels S, Demeyere K, Lambrecht B, De Backer P, Meyer E (2010) Flow cytometric differentiation of avian leukocytes and analysis of their intracellular cytokine expression. *Avian Pathology* 39(1), 41-46
- De Boever S, Croubels S, Meyer E, Sys S, Beyaert R, Ducatelle R, De Backer P (2009) Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in broiler chickens. *Avian Pathology* 38(5), 403-411
- De Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys SU (2008) Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122(3-4), 312-317
- Degen WGJ, Daal Nv, Rothwell L, Kaiser P, Schijns VEJC (2005a) Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Veterinary Microbiology* 105(3-4), 163-167
- Degen WGJ, Smith J, Simmelink B, Glass EJ, Burt DW, Schijns VEJC (2006) Molecular immunophenotyping of lungs and spleens in naive and vaccinated chickens early after pulmonary avian influenza A (H9N2) virus infection. *Vaccine* 24(35-36), 6096-6109
- Degen WGJ, van Daal N, van Zuilekom HI, Burnside J, Schijns VEJC (2004) Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *The Journal of Immunology* 172(7), 4371-4380
- Degen WGJ, van Zuilekom HI, Scholtes NC, van Daal N, Schijns VEJC (2005b) Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine* 23(33), 4212-4218
- Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L (2004) Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- $\kappa$ B-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunological Reviews* 201(1), 191-205
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37(1), 112-119
- Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M (2000) Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 13(6), 805-815

- Digby MR, Lowenthal JW (1995) Cloning and expression of the chicken interferon- $\gamma$  gene. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 15(11), 939-945
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87(6), 2095-2147
- Dinarello Charles A, Fantuzzi G (2003) Interleukin-18 and host defense against infection. *The Journal of Infectious Diseases* 187(s2), 370-384
- Doherty TM, Seder RA, Sher A (1996) Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *The Journal of Immunology* 156(2), 735-741
- Dreisbach J (2005): Klonierung, Expression und funktionelle Analyse von Hühner-Interleukin-12. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Monographie. 109 S. - URL: <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/3338/>.
- Dubey JP (1976) A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169(10), 1061-1078
- Dubey JP (2002) A review of toxoplasmosis in wild birds. *Veterinary Parasitology* 106(2), 121-153
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A (1988a) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192(9), 1269-1285
- Dubey JP, Chapman JL, Rosenthal BM, Mense M, Schueler RL (2006) Clinical Sarcocystis neurona, Sarcocystis canis, Toxoplasma gondii, and Neospora caninum infections in dogs. *Veterinary Parasitology* 137(1-2), 36-49
- Dubey JP, Davis SW, Speer CA, Bowman DD, de Lahunta A, Granstrom DE, Topper MJ, Hamir AN, Cummings JF, Suter MM (1991a) Sarcocystis neurona n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *The Journal of Parasitology* 77(2), 212-218
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ (1988b) Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193(10), 1259-1263
- Dubey JP, Lindsay DS (1998) Isolation in immunodeficient mice of Sarcocystis neurona from opossum (Didelphis virginiana) faeces, and its differentiation from Sarcocystis falcatula. *International Journal for Parasitology* 28(12), 1823-1828
- Dubey JP, Lindsay DS (2006) Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 22(3), 645-671
- Dubey JP, Lindsay DS, Kerber CE, Kasai N, Pena HFJ, Gennari SM, Kwok OCH, Shen SK, Rosenthal BM (2001a) First isolation of Sarcocystis neurona from the South American opossum, Didelphis albiventris, from Brazil. *Veterinary Parasitology* 95(2-4), 295-304
- Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJA, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA (2001b) A review of Sarcocystis neurona and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology* 95(2-4), 89-131
- Dubey JP, Porter SL, Hattel AL, Kradel DC, Topper MJ, Johnson L, Porter SL (1991b) Sarcocystosis-associated clinical encephalitis in a golden eagle (Aquila chrysaetos). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22(2), 233-236
- Dubey JP, Quist CF, Fritz DL (2000a) Systemic sarcocystosis in a wild turkey from Georgia. *Journal of Wildlife Diseases* 36(4), 755-760
- Dubey JP, Rosypal AC, Rosenthal BM, Thomas NJ, Lindsay DS, Stanek JF, Reed SM, Saville WJA (2001c) Sarcocystis neurona infections in sea otter (Enhydra lutris): evidence for natural infections with sarcocysts and transmission of infection to opossums (Didelphis virginiana). *The Journal of Parasitology* 87(6), 1387-1393

- Dubey JP, Saville WJA, Lindsay DS, Stich RW, Stanek JF, Speer CA, Rosenthal BM, Njoku CJ, Kwok OCH, Shen SK, Reed SM (2000b) Completion of the life cycle of *Sarcocystis neurona*. *The Journal of Parasitology* 86(6), 1276-1280
- Dubey JP, Saville WJA, Stanek JF, Lindsay DS, Rosenthal BM, Oglesbee MJ, Rosypal AC, Njoku CJ, Stich RW, Kwok OCH, Shen SK, Hamir AN, Reed SM (2001d) *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. *Veterinary Parasitology* 100(3-4), 117-129
- Dubey JP, Slife LN (1990) Fatal encephalitis in a dog associated with an unidentified coccidian parasite. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2(3), 233-236
- Dubey JP, Speer CA (1991) *Sarcocystis canis* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), the etiologic agent of generalized coccidiosis in dogs. *The Journal of Parasitology* 77(4), 522-527
- Dubey JP, Speer CA, Fayer R (1989) *Sarcocystosis of animals and man*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. -.)
- Dubey JP, Thomas NJ (2011) *Sarcocystis neurona* retinochoroiditis in a sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*). *Veterinary Parasitology* 183(1-2), 156-159
- Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Bonn WV, Briggs M, Davis JW, Ewing R, Mense M, Kwok OCH, Romand S, Thulliez P (2003) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology* 116(4), 275-296
- Dupré Lc, Kremer L, Wolowczuk I, Riveau G, Capron A, Loch C (2001) Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. *Vaccine* 19(11-12), 1373-1380
- Ecco R, Luppi MM, Malta MCC, Araújo MR, Guedes RMC, Shivaprasad HL (2008) An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. *Avian Diseases* 52(4), 706-710
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P (2005) *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, Enke Verlag. - ISBN:3-8304-1032-8.)
- Engvall E, Perlmann P (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology* 109(1), 129-135
- Etschmann B, Wilcken B, Stoevesand K, von der Schulenburg A, Sterner-Kock A (2006) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm. *Veterinary Pathology Online* 43(6), 934-942
- Fenger CK, Granstrom DE, Gajadhar AA, Williams NM, McCrillis SA, Stamper S, Langemeier JL, Dubey JP (1997) Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). *Veterinary Parasitology* 68(3), 199-213
- Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3), 126-139
- Forest TW, Abou-Madi N, Summers BA, Tornquist SJ, Cooper BJ (2000) *Sarcocystis neurona*-like encephalitis in a Canada lynx (*Felis lynx canadensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31(3), 383-387
- Frade AF, Oliveira LCd, Costa DL, Costa CHN, Aquino D, Van Weyenbergh J, Barral-Netto M, Barral A, Kalil J, Goldberg AC (2011) TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution* 11(5), 912-916

- French AR, Holroyd EB, Yang L, Kim S, Yokoyama WM (2006) IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation. *Cytokine* 35(5–6), 229-234
- Fringuelli E, Urbanelli L, Tharuni O, Proietti PC, Bietta A, Davidson I, Franciosini MP (2010) Cloning and expression of pigeon IFN-gamma gene. *Research in Veterinary Science* 89(3), 367-372
- Fritz DL, Dubey JP (2002) Pathology of *Sarcocystis neurona* in interferon-gamma gene knockout mice. *Veterinary Pathology Online* 39(1), 137-140
- Fujita T, Matsushita M, Endo Y (2004) The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews* 198(1), 185-202
- Gaddi PJ, Yap GS (2007) Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunology and Cell Biology* 85(2), 155-159
- Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R (1992) Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cellular Immunology* 143(1), 127-142
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A (1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(13), 6115-6119
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *The Journal of Immunology* 157(2), 798-805
- Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 109 (2, Supplement 1), 81-96
- Gibbens JC, Abraham EJ, MacKenzie G (1997) Toxoplasmosis in canaries in Great Britain. *Veterinary Record* 140(14), 370-371
- Gjerde B, Dahlgren SS (2010) Corvid birds (*Corvidae*) act as definitive hosts for *Sarcocystis ovalis* in moose (*Alces alces*). *Parasitology Research* 107(6), 1445-1453
- Göbel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, Weigend S, Staeheli P, Kaspers B (2003) IL-18 stimulates the proliferation and IFN- $\gamma$  release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *The Journal of Immunology* 171(4), 1809-1815
- Göbel TWF, Kaspers B, Stangassinger M (2001) NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International Immunology* 13(6), 757-762
- Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MSA, Santos SL, Mota RA, Vilela SMO, Gondim LFP (2010) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Veterinary Parasitology* 168(1–2), 121-124
- Gorelik L, Constant S, Flavell RA (2002) Mechanism of transforming growth factor  $\beta$ -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* 195(11), 1499-1505
- Grabstein K, Alderson M (1995) Treatment of microbial infection by monocyte stimulation with interleukin-7. In: Sterling Winthrop I (ed)
- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M (1994) Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264(5161), 965-968
- Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB (2003) Interleukin-18. *Journal of Leukocyte Biology* 73(2), 213-224

- Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(10), 4143-4147
- Habibi GR, Hashemi-Fesharki R, Sadrebazzaz A, Bozorgi S, Bordbar N (2005) Seminested PCR for diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Archives of Razi* 59(1), 55-64
- Haldorson GJ, Mathison BA, Wenberg K, Conrad PA, Dubey JP, Trees AJ, Yamane I, Baszler TV (2005) Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *International Journal for Parasitology* 35(13), 1407-1415
- Hamir AN, Dubey JP (2001) Myocarditis and encephalitis associated with *Sarcocystis neurona* infection in raccoons (*Procyon lotor*). *Veterinary Parasitology* 95(2-4), 335-340
- Hamza T, Barnett JB, Li B (2010) Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International Journal of Molecular Sciences* 11(3), 789-806
- Harmon BG (1998) Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 77(7), 972-977
- Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A (2000) TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *European Journal of Immunology* 30(9), 2639-2649
- Heidari M, Zhang HM, Sharif S (2008) Marek's disease virus induces Th-2 activity during cytolytic infection. *Viral Immunology* 21(2), 203-214
- Hemphill A (1996) Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infection and Immunity* 64(10), 4279-4287
- Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A (2006) Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133(03), 261-278
- Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, Namen AE, Schuler G (1993) Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 178(3), 1109-1114
- Hillier LW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, Ponting CP, Bork P, Burt DW, Groenen MAM, Delany ME, Dodgson JB, Map Gf, Assembly SA, Chinwalla AT, Cliften PF, Clifton SW, Delehaunty KD, Fronick C, Fulton RS, Graves TA, Kremitzki C, Layman D, Magrini V, McPherson JD, Miner TL, Minx P, Nash WE, Nhan MN, Nelson JO, Oddy LG, Pohl CS, Randall-Maher J, Smith SM, Wallis JW, Yang S-P, Mapping, Romanov MN, Rondelli CM, Paton B, Smith J, Morrice D, Daniels L, Tempest HG, Robertson L, Masabanda JS, Griffin DK, Vignal A, Fillon V, Jacobsson L, Kerje S, Andersson L, Crooijmans RPM, Aerts J, Poel JJvd, Ellegren H, Sequencing c, Caldwell RB, Hubbard SJ, Grafham DV, Kierzek AM, McLaren SR, Overton IM, Arakawa H, Beattie KJ, Bezzubov Y, Boardman PE, Bonfield JK, Croning MDR, Davies RM, Francis MD, Humphray SJ, Scott CE, Taylor RG, Tickle C, Brown WRA, Rogers J, Buerstedde J-M, Wilson SA, Libraries Osa, Stubbs L, Ovcharenko I, Gordon L, Lucas S, Miller MM, Inoko H, Shiina T, Kaufman J, Salomonsen J, Skjoedt K, Wong GK-S, Wang J, Liu B, Wang J, Yu J, Yang H, Nefedov M, Koriabine M, deJong PJ, Annotation Aa, Goodstadt L, Webber C, Dickens NJ, Letunic I, Suyama M, Torrents D, Mering Cv, Zdobnov EM, Makova K, Nekrutenko A, Elnitski L, Eswara P, King DC, Yang S, Tyekucheva S, Radakrishnan A, Harris RS, Chiaromonte F, Taylor J, He J, Rijnkels M, Griffiths-Jones S, Ureta-

- Vidal A, Hoffman MM, Severin J, Searle SMJ, Law AS, Speed D, Waddington D, Cheng Z, Tuzun E, Eichler E, Bao Z, Flicek P, Shteynberg DD, Brent MR, Bye JM, Huckle EJ, Chatterji S, Dewey C, Pachter L, Kouranov A, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou AG, Paterson AH, Ivarie R, Brandstrom M, Axelsson E, Backstrom N, Berlin S, Webster MT, Pourquie O, Reymond A, Ucla C, Antonarakis SE, Long M, Emerson JJ, Betrn E, Dupanloup I, Kaessmann H, Hinrichs AS, Bejerano G, Furey TS, Harte RA, Raney B, Siepel A, Kent WJ, Haussler D, Eyraas E, Castelo R, Abril JF, Castellano S, Camara F, Parra G, Guigo R, Bourque G, Tesler G, Pevzner PA, Smit A, Management P, Fulton LA, Mardis ER, Wilson RK (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432(7018), 695-716
- Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(16), 5490-5494
- Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M (2001) Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *The Journal of Immunology* 166(9), 5448-5455
- Holzappel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 37(2), 120-126
- Hong YH, Lillehoj HS, Hyen Lee S, Woon Park D, Lillehoj EP (2006a) Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF). *Developmental & Comparative Immunology* 30(10), 919-929
- Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP (2006b) Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114(3-4), 209-223
- Horii Y, Muraguchi A, Suematsu S, Matsuda T, Yoshizaki K, Hirano T, Kishimoto T (1988) Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *The Journal of Immunology* 141(5), 1529-1535
- Horwitz DA, Gray JD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T (1997) The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF- $\beta$  and implications for autoimmunity. *Immunology Today* 18(11), 538-542
- Houssaint E, Mansikka A, Vainio O (1991) Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *The Journal of Experimental Medicine* 174(2), 397-406
- Howe DK, Crawford AC, Lindsay D, Sibley LD (1998) The p29 and p35 Immunodominant Antigens of *Neospora caninum* Tachyzoites Are Homologous to the Family of Surface Antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 66(11), 5322-5328
- Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260(5107), 547-549
- Humphrey BD, Calvert CC, Klasing KC (2004) The ratio of full length IgY to truncated IgY in immune complexes affects macrophage phagocytosis and the acute phase response of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Developmental & Comparative Immunology* 28(7-8), 665-672
- Hunt HD, Fulton JE (1998) Analysis of polymorphisms in the major expressed class I locus (B-FIV) of the chicken. *Immunogenetics* 47(6), 456-467
- Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS (1995) Transforming growth factor- $\beta$  inhibits interleukin-12-induced production of interferon- $\gamma$  by natural killer cells: A role for transforming growth factor- $\beta$  in the regulation of T cell-

- independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *European Journal of Immunology* 25(4), 994-1000
- Hunter CA, Remington JS (1994) Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases* 170(5), 1057-1067
- Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M (1987) Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(24), 9035-9039
- Isaac C, Nmorsi OG, Igbinosa IB, Imarenezor EP, Ukwandu NCD (2010) Interleukin (IL)-1a, IL-7 and IL-13 profiles among nigerians with *Trypanosoma brucei gambiense* infection. *Archives of Clinical Microbiology* 1(2)
- Ishihara A, Saito H, Abe K (1994) Transforming growth factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research* 639(1), 21-25
- Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto E (2005) T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *Journal of Autoimmunity* 24(2), 111-117
- Jacobson ER, Gardiner CH, Nicholson A, Page CD (1984) Sarcocystis encephalitis in a cockatiel. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185(8), 904-906
- Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB (1988) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 2(12), 1186-1195
- Jakowlew SB, Pamela JD, Michael BS, Anita BR (1990) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of an mRNA encoding transforming growth factor-  $\beta$ 2 from chicken embryo chondrocytes. *Growth Factors* 2, 123-133
- Janeway CA, Jr., Travers P, Walport M, et al. (2001) The major histocompatibility complex and its functions. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science, New York
- Jensen LB, Koch C (1991) An assay for complement factor B in species at different levels of evolution. *Developmental & Comparative Immunology* 15(3), 173-179
- Jensen RA (2001) Orthologs and paralogs - we need to get it right. *Genome Biology* 2(8), interactions1002.1001-interactions1002.1003
- Jeurissen SHM, Janse EM, Koch G, Boer GF (1989) Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell and Tissue Research* 258(1), 119-124
- Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M (1989) Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *The Journal of Immunology* 142(1), 144-147
- Jones M, Cordell JL, Beyers AD, Tse AG, Mason DY (1993) Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 150(12), 5429-5435
- Jones S, Pfister-Genskow M, Cirelli C, Benca RM (2008) Changes in brain gene expression during migration in the white-crowned sparrow. *Brain Research Bulletin* 76(5), 536-544
- Jones TC, Bienz KA, Erb P (1986) In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infection and Immunity* 51(1), 147-156
- Jones TC, Hirsch JG (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *The Journal of Experimental Medicine* 136(5), 1173-1194

- Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ (1997) Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflammation Research* 46(11), 447-451
- Juul-Madsen HR, Munch M, Handberg KJ, Sorensen P, Johnson AA, Norup LR, Jorgensen PH (2003) Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with avian infectious bronchitis virus. *Poultry Science* 82(2), 235-241
- Kaiser IA, Markus MB (1983) Species of *Sarcocystis* in wild South African birds. *Proc Electron Microscopy Soc South Africa* 13, 103-104
- Kaiser P (2002) Turkey and chicken interleukin-18 (IL18) share high sequence identity, but have different polyadenylation sites in their 3' UTR. *Developmental & Comparative Immunology* 26(8), 681-687
- Kaiser P (2007) The avian immune genome - a glass half-full or half-empty? *Cytogenetic and Genome Research* 117(1-4), 221-230
- Kaiser P (2010) Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathology* 39(5), 309-309
- Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Balu S, Pathania US, Hughes S, Goodchild M, Morrell S, Watson M, Bumstead N, Kaufman J, Young JR (2005) A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25(8), 467-484
- Kaiser P, Rothwell L, Vasíček D, Hala K (2002) A role for IL-15 in driving the onset of spontaneous autoimmune thyroiditis? *The Journal of Immunology* 168(8), 4216-4220
- Kaiser P, Sonnemans D, Smith LM (1998) Avian IFN- $\gamma$  genes: sequence analysis suggests probable cross-species reactivity among galliforms. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 18(9), 711-719
- Kasper LH, Matsuura T, Khan IA (1995) IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 155(10), 4798-4804
- Kaspers B, Goebel (2000) The adaptive immune system in chicken, an introduction. *Lohmann Information* 1, 27-31
- Kaufman J, Andersen R, Avila D, Engberg J, Lambris J, Salomonsen J, Welinder K, Skjødt K (1992) Different features of the MHC class I heterodimer have evolved at different rates. Chicken B-F and beta 2-microglobulin sequences reveal invariant surface residues. *The Journal of Immunology* 148(5), 1532-1546
- Kaufman J, Milne S, Göbel TWF, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, Zoorob R, Beck S (1999) The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* 401(6756), 923-925
- Kaufman J, Skjødt K, Salomonsen J, Simonsen M, Du Pasquier L, Parisot R, Riegert P (1990) MHC-like molecules in some nonmammalian vertebrates can be detected by some cross-reactive xenoantisera. *The Journal of Immunology* 144(6), 2258-2272
- Kennedy MK, Park LS (1996) Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *Journal of Clinical Immunology* 16(3), 134-143
- Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, Ghilardi N, deSavauge FJ, Lund FE, Cooper AM (2006) Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Experimental Medicine* 203(7), 1805-1815
- Khan IA, Kasper LH (1996) IL-15 augments CD8+ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *The Journal of Immunology* 157(5), 2103-2108

- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH (1995) IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunology* 17(4), 185-195
- Khan IA, Moretto M, Wei X-q, Williams M, Schwartzman JD, Liew FY (2002) Treatment with soluble interleukin-15R $\alpha$  exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8<sup>+</sup> T cell response. *The Journal of Experimental Medicine* 195(11), 1463-1470
- Khan IA, Schwartzman JD, Fonseka S, Kasper LH (1997) *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology* 85(1), 24-34
- Kim DK, Hong YH, Park DW, Lamont SJ, Lillehoj HS (2008) Differential immune-related gene expression in two genetically disparate chicken lines during infection by *Eimeria maxima*. *Developments in Biologicals* 132, 131-140
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86(4), 1243-1254
- Kjalke M, Welinder KG, Koch C (1993) Structural analysis of chicken factor B-like protease and comparison with mammalian complement proteins factor B and C2. *The Journal of Immunology* 151(8), 4147-4152
- Klaas Rw (2003): Charakterisierung der biologischen Aktivität von Hühner Interleukin-6 und erste Untersuchungen zum Toll-like Rezeptor-System des Huhnes. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss. 102 S. - URL: <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/1025/>.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 170(3), 827-845
- Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL (1999) Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *The Journal of Immunology* 162(5), 2895-2905
- Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P (2005) IFN-gamma priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25(2), 73-81
- Kogut MH, Swaggerty C, He H, Pevzner I, Kaiser P (2006) Toll-like receptor agonists stimulate differential functional activation and cytokine and chemokine gene expression in heterophils isolated from chickens with differential innate responses. *Microbes and Infection* 8(7), 1866-1874
- Köhl J (2006) The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunologic Research* 34(2), 157-176
- Kröncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J (1996) Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *European Journal of Immunology* 26(10), 2541-2544
- Kutkiene L, Prakas P, Sruoga A, Butkauskas D (2009) *Sarcocystis* in the birds family Corvidae with description of *Sarcocystis cornixi* sp. nov. from the hooded crow (*Corvus cornix*). *Parasitology Research* 104(2), 329-336
- Lambert H, Barragan A (2010) Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology* 12(3), 292-300
- Lamont SJ (1998) The chicken major histocompatibility complex and disease. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 17(1), 128-142
- Lang C, Groß U, Lüder C (2007) Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma Gondii*. *Parasitology Research* 100(2), 191-203

- Langermans JM, Nibbering Ph, Van Vuren-Van Der Hulst Meb, Van Furth R (2001) Transforming growth factor- $\beta$  suppresses interferon- $\gamma$ -induced toxoplasmatatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor- $\alpha$  production. *Parasite Immunology* 23(4), 169-175
- Lawson S, Rothwell L, Lambrecht B, Howes K, Venugopal K, Kaiser P (2001) Turkey and chicken interferon-gamma, which share high sequence identity, are biologically cross-reactive. *Developmental & Comparative Immunology* 25(1), 69-82
- Lei Y, Davey M, Ellis JT (2005) Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro. *Parasitology* 131(05), 583-590
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307(1), 63-69
- LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ (1990) Role of interleukin 6 in fever in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 258(3), 798-803
- Lertmemongkolchai G, Cai G, Hunter CA, Bancroft GJ (2001) Bystander Activation of CD8+ T Cells Contributes to the Rapid Production of IFN- $\Gamma$  in Response to Bacterial Pathogens. *The Journal of Immunology* 166(2), 1097-1105
- Letterio JJ, Roberts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 16(1), 137-161
- Levine ND (1986) The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. *The Journal of Parasitology* 72(3), 372-382
- Li G, Lillehoj HS, Lee KW, Lee SH, Park MS, Jang SI, Bauchan GR, Gay CG, Ritter GD, Bautista DA, Siragusa GR (2010) Immunopathology and cytokine responses in commercial broiler chickens with gangrenous dermatitis. *Avian Pathology* 39(4), 255-264
- Li G, Lillehoj HS, Min W (2001) Production and characterization of monoclonal antibodies reactive with the chicken interleukin-15 receptor alpha chain. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82(3-4), 215-227
- Li H-T, Ma B, Mi J-W, Jin H-Y, Xu L-N, Wang J-W (2007) Molecular cloning and functional analysis of goose interferon gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117(1-2), 67-74
- Liang FT, Granstrom DE, Zhao XM, Timoney JF (1998) Evidence that surface proteins Sn14 and Sn16 of *Sarcocystis neurona* merozoites are involved in infection and immunity. *Infection and Immunity* 66(5), 1834-1838
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ (2001) T-bet is rapidly induced by interferon- $\gamma$  in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26), 15137-15142
- Lillehoj HS, Choi KD (1998) Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avian Diseases* 42(2), 307-314
- Lillehoj HS, Min W, Choi KD, Babu US, Burnside J, Miyamoto T, Rosenthal BM, Lillehoj EP (2001) Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82(3-4), 229-244

- Lindsay DS, Mitchell SM, Yang J, Dubey JP, Goyal, Jr., Witonsky SG (2006) Penetration of equine leukocytes by merozoites of *Sarcocystis neurona*. *Veterinary Parasitology* 138(3-4), 371-376
- Liu C-H, Fan Y-t, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J (2006) Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *The Journal of Immunology* 177(1), 31-35
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4), 402-408
- Loa CC, Hsieh MK, Wu CC, Lin TL (2001) Molecular identification and characterization of turkey IFN- $\gamma$  gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 130(4), 579-584
- Lucius R, Loos-Frank B (2008) *Biologie von Parasiten*, 2. Aufl., Springer DE, Heidelberg. - ISBN:9783540377078.)
- Lüder CG, Walter W, Beuerle B, Maeurer MJ, Gross U (2001) *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1 $\alpha$ . *European Journal of Immunology* 31(5), 1475-1484
- Lüder CGK, Algner M, Lang C, Bleicher N, Groß U (2003a) Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *International Journal for Parasitology* 33(8), 833-844
- Lüder CGK, Lang C, Giraldo-Velasquez M, Algner M, Gerdes J, Gross U (2003b) *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *Journal of Neuroimmunology* 134(1-2), 12-24
- Luhtala M, Salomonsen J, Hirota Y, Onodera T, Toivanen P, Vainio O (1993) Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma* 12(6), 633-646
- Lynch NJ, Khan S-u-H, Stover CM, Sandrini SM, Marston D, Presanis JS, Schwaeble WJ (2005) Composition of the lectin pathway of complement in *Gallus gallus*: absence of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 in birds. *The Journal of Immunology* 174(8), 4998-5006
- Ma A, Koka R, Burkett P (2006) Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual Review of Immunology* 24(1), 657-679
- Ma D, Ma C, Pan L, Li G, Yang J, Hong J, Cai H, Ren X (2011) Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. *Experimental Parasitology* 127(1), 208-214
- Maccoux LJ, Clements DN, Salway F, Day PJR (2007) Identification of new reference genes for the normalisation of canine osteoarthritic joint tissue transcripts from microarray data. *BMC Molecular Biology* 8, 62-72
- Majidzadeh-A K, Esmaeili R, Abdoli N (2011) TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. *BMC Research Notes* 4(1), 215-215
- Mansfield LS, Mehler S, Nelson K, Elsheikha HM, Murphy AJ, Knust B, Tanhauser SM, Gearhart PM, Rossano MG, Bowman DD, Schott HC, Patterson JS (2008) Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. *Veterinary Parasitology* 153(1-2), 24-43
- Mantovani A, Dejana E (1989) Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunology Today* 10(11), 370-375

- Marais M, Maloney SK, Gray DA (2011) Brain IL-6 and PG-dependant actions of IL-1beta and lipopolysaccharide in avian fever. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301(3), 791-800
- Marrack P, Bender J, Hildeman D, Jordan M, Mitchell T, Murakami M, Sakamoto A, Schaefer BC, Swanson B, Kappler J (2000) Homeostasis of  $\alpha\beta$  TCR+ T cells. *Nature Immunology* 1(2), 107-111
- Martins J, Kwok OCH, Dubey JP (2011) Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Veterinary Parasitology* 182(2-4), 349-351
- Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, Crumpton M, Gatter KC (1989) Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *Journal of Clinical Pathology* 42(11), 1194-1200
- Masteller EL, Pharr GT, Funk PE, Thompson CB (1997) Avian B cell development. *International reviews of immunology* 15(3-4), 185-206
- Matuschka FR (1987) Reptiles as intermediate and/or final hosts of Sarcosporidia. *Parasitology Research* 73(1), 22-32
- McCormack WT, Tjoelker LW, Thompson CB (1991) Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annual Review of Immunology* 9(1), 219-241
- McGuire AM, McAllister M, Wills RA, Tranas JD (1999) Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columba livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology* 29(10), 1525-1529
- McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke Pn, Sajid M (2006) Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1(1), 497-536
- Mehlhorn H, Heydorn AO (1978) The sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure. *Advances in Parasitology* 16, 43-91
- Mehlhorn H, Heydorn AO (1979) Electron microscopical study on gamogony of *Sarcocystis suihominis* in human tissue cultures. *Zeitschrift Für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 58(2), 97-113
- Mehlhorn H, Scholtyseck E (1973) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cystenstadien von *Sarcocystis tenella* aus der Oesophagus-Muskulatur des Schafes. *Zeitschrift Für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 41(4), 291-310
- Miescher F (1843) Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. Bericht über die Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel 5, 198 - 202
- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC (2009) The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 39(1), 23-39
- Min W, Lillehoj HS, Burnside J, Weining KC, Staeheli P, Zhu JJ (2001) Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine* 20(1-2), 267-274
- Mineo TWP, Carrasco AOT, Marciano JA, Werther K, Pinto AA, Machado RZ (2009) Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. *Veterinary Parasitology* 159(2), 149-153
- Molina-López R, Cabezón O, Pabón M, Darwich L, Obón E, Lopez-Gatius F, Dubey JP, Almería S (2012) High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. *Research in Veterinary Science* 93(1), 300-302
- Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez-Sosa M, Akira S, David JR, Satoskar AR (2000) Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control

- cutaneous *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology* 164(11), 5890-5893
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science* 108(6), 2457-2464
- Mühlhardt C (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, 6. Aufl., Spektrum, Heidelberg. - ISBN:978-3-8274-2036-7.)
- Mukaida N (2000) Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *International Journal of Hematology* 72(4), 391-398
- Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K (1990) Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 265(34), 21128-21133
- Mukamoto M, Kodama H, Baba T (1999) Effects of cytokines from thymocytes and thymic stromal cells on chicken intrathymic T cell development. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 67(3), 223-233
- Mullaney T, Murphy AJ, Kiupel M, Bell JA, Rossano MG, Mansfield LS (2005) Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. *Veterinary Parasitology* 133(1), 27-36
- Mullarky IK, Szaba FM, Kummer LW, Wilhelm LB, Parent MA, Johnson LL, Smiley ST (2007) Gamma Interferon Suppresses Erythropoiesis via Interleukin-15. *Infection and Immunity* 75(5), 2630-2633
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao T-P, Yang SY, Reiner SL (2001) Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292(5523), 1907-1910
- Müller U, Köhler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, Brombacher F, Hölscher C (2001) IL-12-independent IFN- $\gamma$  production by T cells in experimental Chagas disease is mediated by IL-18. *The Journal of Immunology* 167(6), 3346-3353
- Murray HW, Nathan CF (1999) Macrophage Microbicidal Mechanisms In Vivo: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. *The Journal of Experimental Medicine* 189(4), 741-746
- Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, Malavasi F, Ponzi AN, Paus R, Bulfone-Paus S (1999) Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 93(10), 3531-3539
- Mutalib A, Keirs R, Maslin W, Topper M, Dubey JP (1995) *Sarcocystis*-associated encephalitis in chickens. *Avian Diseases* 39(2), 436-440
- Myokai F, Takashiba S, Lebo R, Amar S (1999) A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression: Molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(8), 4518-4523
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H (2001a) Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12(1), 53-72
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H (2001b) Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of Immunology* 19(1), 423-474
- Nelson RW, Couto CG (2010) *Innere Medizin der Kleintiere*, 2. Aufl., Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH. - ISBN:978-3-437-57041-4.)
- Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW (2000) Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *European Journal of Immunology* 30(10), 3057-3060

- Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA (1997) Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 65(5), 1675-1682
- Nishikawa Y, Inoue N, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, Mikami T (2001) Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine* 19(11-12), 1381-1390
- Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, Mikami T (2000) Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *International Journal for Parasitology* 30(1), 51-58
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protocols* 1(3), 1559-1582
- Nonaka M, Kimura A (2006) Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* 58(9), 701-713
- Novick D, Kim S-H, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M (1999) Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 10(1), 127-136
- Okamura H, Kashiwamura S-i, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K (1998) Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Current Opinion in Immunology* 10(3), 259-264
- Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S (1995a) A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infection and Immunity* 63(10), 3966-3972
- Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M (1995b) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378(6552), 88-91
- Olias P (2010) *Sarcocystis* species lethal for domestic pigeons. *Emerging Infectious Diseases* 16(3), 497-499
- Olias P, Gruber AD, Hafez HM, Heydorn AO, Mehlhorn H, Lierz M (2009a) *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia* f. *domestica*) and the Northern goshawk (*Accipiter gentilis*): light and electron microscopical characteristics. *Parasitology Research* 106(3), 577-585
- Olias P, Gruber AD, Heydorn AO, Kohls A, Hafez HM, Lierz M (2010) Unusual biphasic disease in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*) following experimental infection with *Sarcocystis calchasi*. *Avian Diseases* 54(3), 1032-1037
- Olias P, Gruber AD, Heydorn AO, Kohls A, Mehlhorn H, Hafez HM, Lierz M (2009b) A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. *Avian Pathology* 38(2), 121-121
- Olias P, Olias L, Krücken J, Lierz M, Gruber AD (2011) High prevalence of *Sarcocystis calchasi* sporocysts in European *Accipiter* hawks. *Veterinary Parasitology* 175(3-4), 230-236
- Olson EJ, Wünschmann A, Dubey JP (2007) *Sarcocystis* sp.-Associated Meningoencephalitis in a Bald Eagle (*Haliaeetus Leucocephalus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(5), 564-568
- Omer FM, Kurtzhals JAL, Riley EM (2000) Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- $\beta$ ? *Parasitology Today* 16(1), 18-23
- Park S-J, Huh J-W, Kim Y-H, Lee S-R, Kim S-H, Kim S-U, Kim H-S, Kim MK, Chang K-T (2012) Selection of internal reference genes for normalization of quantitative reverse

- transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis in the canine brain and other organs. *Molecular biotechnology* 54(1), 47-57
- Park SS, Lillehoj HS, Hong YH, Lee SH (2007) Functional characterization of tumor necrosis factor superfamily 15 (TNFSF15) induced by lipopolysaccharides and *Eimeria* infection. *Developmental & Comparative Immunology* 31(9), 934-944
- Penniall R, Spitznagel JK (1975) Chicken neutrophils: oxidative metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(12), 5012-5015
- Penning LC, Vrieling HE, Brinkhof B, Riemers FM, Rothuizen J, Rutteman GR, Hazewinkel HAW (2007) A validation of 10 feline reference genes for gene expression measurements in snap-frozen tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120(3-4), 212-222
- Pertile TL, Karaca K, Sharma JM, Walser MM (1996) An antiviral effect of nitric oxide: inhibition of reovirus replication. *Avian Diseases* 40(2), 342-348
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9), 2002-2007
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26(6), 509-515
- Poh TY, Pease J, Young JR, Bumstead N, Kaiser P (2008) Re-evaluation of chicken CXCR1 determines the true gene structure. *Journal of Biological Chemistry* 283(24), 16408-16415
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siebert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313(4), 856-862
- Rakich PM, Dubey JP, Contarino JK (1992) Acute Hepatic Sarcocystosis in a Chinchilla. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4(4), 484-486
- Rath NC, Parcells MS, Xie H, Santin E (2003) Characterization of a spontaneously transformed chicken mononuclear cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96(1-2), 93-104
- Rautenschlein S, Subramanian A, Sharma JM (1999) Bioactivities of a tumour necrosis-like factor released by chicken macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 23(7-8), 629-640
- Reed KM, Chaves LD, Mendoza KM (2007) An integrated and comparative genetic map of the turkey genome. *Cytogenetic and Genome Research* 119(1-2), 113-126
- Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK (1996) Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 111(6), 1706-1713
- Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A (1997) In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *The Journal of Experimental Medicine* 186(11), 1819-1829
- Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, Rogers N, Schito M, Aliberti J, Hieny S, Sher A (1999) Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* 11(5), 637-647
- Reman DH, Dubey JP, Robison D (1993) Fatal Hepatic Sarcocystosis in an American Black Bear. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5(3), 480-483
- Resendes AR, Juan-Sallés C, Almeria S, Majó N, Domingo M, Dubey JP (2002) Hepatic Sarcocystosis in a Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*) From the Spanish Mediterranean Coast. *Journal of Parasitology* 88(1), 206-209

- Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA (1997) Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 185(3), 461-470
- Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, Kim SJ, Sporn MB (1990) Transforming growth factor- $\beta$  : multifunctional regulator of differentiation and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 327(1239), 145-154
- Roberts AB, Sporn MB (1989) Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 140(4), 1126-1128
- Rommel M (1978) Vergleichende Darstellung der Entwicklungsbiologie der Gattungen *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Isospora*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Toxoplasma* und *Besnoitia*. *Zeitschrift Für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 57(3), 269-283
- Rommel M (1985) Sarcocystosis of domestic animals and humans. *In Practice* 7(5), 158-160
- Rommel M (1989) Recent advances in the knowledge of the biology of the cyst-forming coccidia. *Angewandte Parasitologie* 30(3), 173-183
- Rottenberg M, Kristensson K (2002) Effects of interferon- $\gamma$  on neuronal infections. *Viral Immunology* 15(2), 247-260
- Sarciron ME, Gherardi A (2000) Cytokines involved in toxoplasmic encephalitis. *Scandinavian Journal of Immunology* 52(6), 534-543
- Saville WJA, Sofaly CD, Reed SM, Dubey JP, Oglesbee MJ, Lacombe VA, Keene RO, Gugisberg KM, Swensen SW, Shipley RD, Chiang YW, Chu HJ, Ng T (2004) An equine protozoal myeloencephalitis challenge model testing a second transport after inoculation with *Sarcocystis neurona* sporocysts. *The Journal of Parasitology* 90(6), 1406-1410
- Saville WJA, Stich RW, Reed SM, Njoku CJ, Oglesbee MJ, Wunschmann A, Grover DL, Larew-Naugle AL, Stanek JF, Granstrom DE, Dubey JP (2001) Utilization of stress in the development of an equine model for equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinary Parasitology* 95(2-4), 211-222
- Sawa Y, Arima Y, Ogura H, Kitabayashi C, Jiang J-J, Fukushima T, Kamimura D, Hirano T, Murakami M (2009) Hepatic interleukin-7 expression regulates T cell responses. *Immunity* 30(3), 447-457
- Sayegh CE, Demaries SL, Pike KA, Friedman JE, Ratcliffe MJH (2000) The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunological Reviews* 175(1), 187-200
- Schares G, Zinecker CF, Schmidt J, Azzouz N, Conraths FJ, Gerold P, Schwarz RT (2000) Structural analysis of free and protein-bound glycosyl-phosphatidylinositols of *Neospora caninum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105(1), 155-161
- Schlüter D, Bertsch D, Frei K, Hübers SB, Wiestler OD, Hof H, Fontana A, Deckert-Schlüter M (1998) Interferon- $\gamma$  antagonizes transforming growth factor- $\beta$ 2-mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma* encephalitis. *Journal of Neuroimmunology* 81(1-2), 38-48
- Schneider K, Klaas R, Kaspers B, Staeheli P (2001) Chicken interleukin 6. *European Journal of Biochemistry* 268(15), 4200-4206
- Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, Elvers S, Staeheli P, Kaspers B, Weining KC (2000) cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 20(10), 879-883
- Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *The Journal of Immunology* 148(11), 3433-3440

- Scholtyssek E (1973) Die Deutung von Endodyogenie und Schizogonie bei Coccidien und anderen Sporozoen. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 42(2), 87-104
- Scholtyssek E, Mehlhorn H, Müller BEG (1973) Identifikation von Merozoiten der vier cystenbildenden Coccidien (*Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Frenkelia*) auf Grund feinstruktureller Kriterien. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 42(3), 185-206
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7(1), 3
- Schultz U, Chisari FV (1999) Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *Journal of Virology* 73(4), 3162-3168
- Schultz U, Köck J, Schlicht H-J, Staeheli P (1995) Recombinant duck interferon: a new reagent for studying the mode of interferon action against hepatitis B virus. *Virology* 212(2), 641-649
- Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji NM, Hoshino K, Adachi O, Adachi K, Futatsugi S, Kuida K, Takeuchi O, Okamura H, Fujimoto J, Akira S, Nakanishi K (2001) Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *The Journal of Immunology* 166(4), 2651-2657
- Sellon DC, Dubey JP (2007) Equine Protozoal Myeloencephalitis. In: Debra CS, DVM, PhD, Dacvim, Maureen T. Long DVM (eds) *Equine Infectious Diseases*. Saunders, Saint Louis, pp 453-464
- Semnani RT, Law M, Kubofcik J, Nutman TB (2004) Filaria-Induced Immune Evasion: Suppression by the Infective Stage of *Brugia malayi* at the Earliest Host-Parasite Interface. *The Journal of Immunology* 172(10), 6229-6238
- Seo SH, Collisson EW (1997) Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *Journal of Virology* 71(7), 5173-5177
- Shapira S, Speirs K, Gerstein A, Caamano J, Hunter CA (2002) Suppression of NF- $\kappa$ B activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Infectious Diseases* 185(1), 66-72
- Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315(6018), 416-419
- Sick C, Schneider K, Staeheli P, Weining KC (2000) Novel chicken CXC and CC chemokines. *Cytokine* 12(3), 181-186
- Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, Molestina RE (2004) Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 34(3), 381-391
- Skelly PJ (2004) Intravascular schistosomes and complement. *Trends in Parasitology* 20(8), 370-374
- Smith JH, Neill PJ, Dillard EA, 3rd, Box ED (1990) Pathology of experimental *Sarcocystis falcatula* infections of canaries (*Serinus canarius*) and pigeons (*Columba livia*). *The Journal of Parasitology* 76(1), 59-68
- Sofaly CD, Reed SM, Gordon JC, Dubey JP, Oglesbee MJ, Njoku CJ, Grover DL, Saville WJA (2002) Experimental induction of equine protozoan myeloencephalitis (EPM) in the horse: effect of *Sarcocystis neurona* sporocyst inoculation dose on the development of clinical neurologic disease. *The Journal of Parasitology* 88(6), 1164-1170
- Sonda S, Fuchs N, Connolly B, Fernandez P, Gottstein B, Hemphill A (1998) The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* 97(1-2), 97-108

- Spalding MG, Yowell CA, Lindsay DS, Greiner EC, Dame JB (2002) Sarcocystis meningoencephalitis in a northern gannet (*Morus bassanus*). *Journal of Wildlife Diseases* 38(2), 432-437
- Speer CA, Dubey JP (2001) Ultrastructure of schizonts and merozoites of *Sarcocystis neurona*. *Veterinary Parasitology* 95(2-4), 263-271
- Speer CA, Dubey JP, Mattson DE (2000) Comparative development and merozoite production of two isolates of *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula* in cultured cells. *The Journal of Parasitology* 86(1), 25-32
- Spencer JA, Deinnocentes P, Moyana EM, Guarino AJ, Ellison SE, Bird RC, Blagburn BL (2005) Cytokine gene expression in response to SnSAG1 in horses with equine protozoal myeloencephalitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(5), 644-646
- Spencer JA, Ellison SE, Guarino AJ, Blagburn BL (2004) Cell-mediated immune responses in horses with equine protozoal myeloencephalitis. *The Journal of Parasitology* 90(2), 428-430
- Staeheli P, Puehler F, Schneider K, Göbel TW, Kaspers B (2001) Cytokines of birds: conserved functions—a largely different look. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 21(12), 993-1010
- Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(17), 6808-6812
- Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Müller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH (1998) Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *European Journal of Immunology* 28(10), 3231-3239
- Su Z, Stevenson MM (2000) Central Role of Endogenous Gamma Interferon in Protective Immunity against Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* AS Infection. *Infection and Immunity* 68(8), 4399-4406
- Suedmeyer WK, Bermudez AJ, Barr BC, Marsh AE (2001) Acute pulmonary *Sarcocystis falcatula*-like infection in three Victoria crowned pigeons (*Goura victoria*) housed indoors. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians* 32(2), 252-256
- Suzue K, Asai T, Takeuchi T, Koyasu S (2003) In vivo role of IFN- $\gamma$  produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *European Journal of Immunology* 33(10), 2666-2675
- Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS (1988) Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240(4851), 516-518
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1993) Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *The Journal of Immunology* 151(4), 2150-2158
- Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of Experimental Medicine* 177(6), 1797-1802
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100(6), 655-669
- Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Herrmann SH (1988) B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 140(2), 508-512

- Takimoto T, Sato K, Akiba Y, Takahashi K (2008) Role of Chicken TL1A on Inflammatory Responses and Partial Characterization of Its Receptor. *J Immunol* 180(12), 8327-8332
- Takimoto T, Takahashi K, Sato K, Akiba Y (2005) Molecular cloning and functional characterizations of chicken TL1A. *Developmental & Comparative Immunology* 29(10), 895-905
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8), 1596-1599
- Tang J, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Ryan DH (1997) TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors. *The Journal of Immunology* 159(1), 117-125
- Tanhauser SM, Cheadle MA, Massey ET, Mayer BA, Schroedter DE, Dame JB, Greiner EC, MacKay RJ (2001) The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is naturally infected with *Sarcocystis neurona*. *International Journal for Parasitology* 31(4), 325-329
- Teglas MB, Little SE, Latimer KS, Dubey JP (1998) *Sarcocystis*-associated encephalitis and myocarditis in a wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *The Journal of Parasitology* 84(3), 661-663
- Tenter AM (1995) Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology* 25(11), 1311-1330
- Tizard IR (2008) *Veterinary Immunology*, 8. Aufl., Saunders, Saint Louis. - ISBN:1416049894.)
- Tomley F (1994) Antigenic diversity of the asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Parasite Immunology* 16(8), 407-413
- Torlakovic E, Torlakovic G, Nguyen PL, Brunning RD, Delabie J (2002) The value of anti-pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. *The American journal of surgical pathology* 26(10), 1343-1350
- Trasti SL, Dubey JP, Webb DM, Blanchard TW, Britt J, Fritz D, Lewis RM (1999) Fatal visceral and neural sarcocystosis in dogs. *Journal of Comparative Pathology* 121(2), 179-184
- Trinchieri G (1993) Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunology Today* 14(7), 335-338
- Trinchieri G (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 13(1), 251-276
- Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology* 3(2), 133-146
- Truettner JS, Suzuki T, Dietrich WD (2005) The effect of therapeutic hypothermia on the expression of inflammatory response genes following moderate traumatic brain injury in the rat. *Molecular Brain Research* 138(2), 124-134
- Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT (1997) Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *The Journal of Experimental Medicine* 185(6), 1005-1012
- Unanue ER, Allen PM (1987) The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236(4801), 551-557
- Unsicker K, Strelau J (2000) Functions of transforming growth factor  $\beta$  isoforms in the nervous system. *European Journal of Biochemistry* 267(24), 6972-6975

- Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, Strober W (2006) T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *The Journal of Experimental Medicine* 203(3), 755-766
- Vaidya T, Bakhiet M, Hill KL, Olsson T, Kristensson K, Donelson JE (1997) The gene for a T lymphocyte triggering factor from african trypanosomes. *The Journal of Experimental Medicine* 186(3), 433-438
- Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ (1986) Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(24), 9679-9683
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T (2002) Leishmania Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. *Infection and Immunity* 70(8), 4177-4184
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7), RESEARCH0034.0031-0034.0011
- Visser J, Boxel-Dezaire Av, Methorst D, Brunt T, Kloet ERd, Nagelkerken L (1998) Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood* 91(11), 4255-4264
- Warren WC, Clayton DF, Ellegren H, Arnold AP, Hillier LW, nstner A, Searle S, White S, Vilella AJ, Fairley S, Heger A, Kong L, Ponting CP, Jarvis ED, Mello CV, Minx P, Lovell P, Velho TAF, Ferris M, Balakrishnan CN, Sinha S, Blatti C, London SE, Li Y, Lin Y-C, George J, Sweedler J, Southey B, Gunaratne P, Watson M, Nam K, Backstr, m N, Smeds L, Nabholz B, Itoh Y, Whitney O, Pfenning AR, Howard J, Iker M, Skinner BM, Griffin DK, Ye L, McLaren WM, Flicek P, Quesada V, Velasco G, Lopez-Otin C, Puente XS, Olender T, Lancet D, Smit AFA, Hubley R, Konkel MK, Walker JA, Batzer MA, Gu W, Pollock DD, Chen L, Cheng Z, Eichler EE, Stapley J, Slate J, Ekblom R, Birkhead T, Burke T, Burt D, Scharff C, Adam I, Richard H, Sultan M, Soldatov A, Lehrach H, Edwards SV, Yang S-P, Li X, Graves T, Fulton L, Nelson J, Chinwalla A, Hou S, Mardis ER, Wilson RK (2010) The genome of a songbird. *Nature* 464(7289), 757-762
- Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H (1995) Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* 95(6), 2945-2953
- Wathen LK, LeBlanc D, Warner CM, Lamont SJ, Nordskog AW (1987) A chicken sex-limited protein that crossreacts with the fourth component of complement. *Poultry Science* 66(1), 162-165
- Watson S, Mercier S, Bye C, Wilkinson J, Cunningham AL, Harman AN (2007) Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses. *Virology Journal* 4(1), 130.
- Weber F, Kochs G, Haller O, Staeheli P (2003) Viral evasion of the interferon system: old viruses, new tricks. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 23(4), 209-213
- Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heinrich PC, Horn F (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated

- by interleukin-6 at the posttranslational level. *Molecular and Cellular Biology* 13(1), 276-288
- Wei F, Liu Q, Zhai Y, Fu Z, Liu W, Shang L, Men J, Gao S, Lian H, Jin H, Chen C, Lin J, Shi Y, Xia Z, Zhu X-Q (2009) IL-18 enhances protective effect in mice immunized with a *Schistosoma japonicum* FABP DNA vaccine. *Acta Tropica* 111(3), 284-288
- Weining KC, Schultz U, Münster U, Kaspers B, Staeheli P (1996) Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma. *European Journal of Immunology* 26(10), 2440-2447
- Weining KC, Sick C, Kaspers B, Staeheli P (1998) A chicken homolog of mammalian interleukin-1 $\beta$ : cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *European Journal of Biochemistry* 258(3), 994-1000
- Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, Wallach D, Perricaudet M, Tiollais P, Revel M (1980) Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(12), 7152-7156
- Wigley P, Kaiser P (2003) Avian cytokines in health and disease. *Brazilian Journal of Poultry Science* 5(1), 1-14
- Wilkinson (1995) Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *The Journal of Experimental Medicine* 181(3), 1255-1259
- Williams SM, Fulton RM, Render JA, Mansfield L, Bouldin M (2001) Ocular and encephalic toxoplasmosis in canaries. *Avian Diseases* 45(1), 262-267
- Withanage GSK, Kaiser P, Wigley P, Powers C, Mastroeni P, Brooks H, Barrow P, Smith A, Maskell D, McConnell I (2004) Rapid Expression of Chemokines and Proinflammatory Cytokines in Newly Hatched Chickens Infected with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* 72(4), 2152-2159
- Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferez C, Hewick RM (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *The Journal of Immunology* 146(9), 3074-3081
- Wu YF, Liu HJ, Chiou SH, Lee LH (2007) Sequence and phylogenetic analysis of interleukin (IL)-1 $\beta$ -encoding genes of five avian species and structural and functional homology among these IL-1 $\beta$  proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116(1-2), 37-46
- Wu YF, Shien JH, Yin HH, Chiow SH, Lee LH (2008) Structural and functional homology among chicken, duck, goose, turkey and pigeon interleukin-8 proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125(3-4), 205-215
- Wünschmann A, Armien AG, Reed L, Gruber AD, Olias P (2011) *Sarcocystis calchasi*-associated neurologic disease in a domestic pigeon in North America. *Transboundary and Emerging Diseases* 58(6), 526-530
- Wünschmann A, Rejmanek D, Conrad PA, Hall N, Cruz-Martinez L, Vaughn SB, Barr BC (2010) Natural fatal *Sarcocystis falcatula* infections in free-ranging eagles in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22(2), 282-289
- Wünschmann A, Rejmanek D, Cruz-Martinez L, Barr BC (2009) *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21(2), 283-287
- Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY (1998) Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *The Journal of Experimental Medicine* 188(8), 1485-1492

- Yantis D, Moeller R, Braun R, Gardiner CH, Aguirre A, Dubey JP (2003) Hepatitis Associated with a *Sarcocystis canis*-like Protozoan in a Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). *Journal of Parasitology* 89(6), 1258-1260
- Yap GS, Sher A (1999) Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine* 189(7), 1083-1092
- Yin R, Liu X, Liu C, Ding Z, Zhang X, Tian F, Liu W, Yu J, Li L, Hrabé de Angelis M, Stoeger T (2011) Systematic selection of housekeeping genes for gene expression normalization in chicken embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413(4), 537-540
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S-i, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *The Journal of Immunology* 161(7), 3400-3407
- Yue H, Lei X-w, Yang F-l, Li M-Y, Tang C (2010) Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. *Virologica Sinica* 25(6), 425-431
- Yun CH, Lillehoj HS, Choi KD (2000a) *Eimeria tenella* Infection Induces Local Gamma Interferon Production and Intestinal Lymphocyte Subpopulation Changes. *Infection and Immunity* 68(3), 1282-1288
- Yun CH, Lillehoj HS, Lillehoj EP (2000b) Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental & Comparative Immunology* 24(2-3), 303-324
- Zhang S, Lillehoj HS, Ruff MD (1995) In vivo role of tumor necrosis-like factor in *Eimeria tenella* infection. *Avian Diseases* 39(4), 859-866
- Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS (2007) Rapid Elimination of *Toxoplasma gondii* by Gamma Interferon-Primed Mouse Macrophages Is Independent of CD40 Signaling. *Infection and Immunity* 75(10), 4799-4803
- Zhou H, Lamont SJ (2003) Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. *Immunogenetics* 55(3), 133-140
- Zoorob R, Bernot A, Renoir DM, Choukri F, Auffray C (1993) Chicken major histocompatibility complex class II B genes: analysis of interallelic and inter-locus sequence variance. *European Journal of Immunology* 23(5), 1139-1145

# 11 Anhang

## 11.1 Tabellen

Tabelle 17: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zur Charakterisierung der Immunzellinfiltration in den entzündlich veränderten Bereichen des Cerebrum

Versuchstier (Gruppe 2)	MHC-II-positive Zellen	T-Zellen (CD3-Positiv)	B-Zellen (Pax-5-positiv)
L60	n	+++	+
10	+++	+++	+
11	+++	+++	+
12	n	+++	+
14	n	+++	++
15	++	+++	+
L72	+++	n	n
L74	n	+++	+

+++ = hochgradige Infiltration

++ = mittelgradige Infiltration

+ = geringgradige Infiltration

n = nicht untersucht

Tabelle 18: C<sub>T</sub>-Werte für die Referenzgene in cDNA-Proben des ersten Ansatzes der cDNA-Synthese (cDNA (1))

Proben cDNA (1)	β-actin	HMBS	RPL13	HPRT	RPS7	Ywhaz	SDHA	Gusb
<i>Gruppe R</i>								
r1	19,81	25,43	22,81	24,79	20,78	20,42	23,88	29,73
r2	20,52	26,91	23,67	27,34	21,34	21,48	24,45	29,15
r3	19,81	25,86	22,22	26,53	20,96	20,54	23,81	27,94
r4	20,83	26,52	23,11	27,77	21,30	21,95	24,86	28,70
r5	18,95	25,16	21,60	25,89	21,50	19,82	22,81	27,28
<i>Kontrolltiere</i>								
L61	19,38	26,38	22,81	24,34	20,83	19,62	23,91	29,40
L62	18,87	25,47	21,96	23,87	20,87	18,94	22,85	28,96
<i>Gruppe 1</i>								
2	18,87	25,97	21,83	25,65	21,20	18,98	22,51	28,11
3	19,53	26,51	21,89	25,97	22,02	19,44	23,10	28,79
4	19,50	26,13	22,31	26,15	21,93	18,84	22,63	28,68
5	20,79	27,22	22,69	27,35	20,63	20,07	23,95	29,50
6	18,77	25,37	21,62	25,76	20,68	19,35	22,92	27,72
7	19,00	26,16	21,93	25,94	21,97	18,80	22,93	27,98
8	18,85	24,96	21,82	25,68	20,90	18,53	21,97	27,92
9	19,87	25,68	22,68	25,96	22,43	19,20	22,28	28,24
<i>Gruppe 2</i>								
L59	19,88	26,61	23,06	27,05	21,31	20,54	23,82	28,68
L60	18,86	25,79	22,52	26,64	19,93	20,29	23,62	27,94
10	18,17	25,65	22,11	24,58	19,51	19,83	24,15	28,50
11	18,42	25,57	22,24	25,44	20,10	20,51	24,73	28,70
12	18,82	25,68	22,47	24,78	20,71	19,98	23,97	28,89
14	18,80	25,81	21,91	24,91	20,82	18,12	21,85	27,86
15	20,55	26,91	23,95	25,91	20,91	20,34	24,62	30,70
L70	19,32	25,99	22,91	26,43	20,55	19,95	23,32	28,36
L71	19,19	25,92	22,62	26,23	21,00	19,96	23,55	28,41
L72	19,40	25,77	22,66	26,55	21,08	20,15	23,40	28,58
L73	18,88	25,80	22,23	26,63	20,48	20,45	23,60	28,45
L74	18,74	26,06	22,58	28,02	20,66	21,58	24,96	28,91

Tabelle 19: C<sub>T</sub>-Werte für die Referenzgene in cDNA-Proben des zweiten Ansatzes der cDNA-Synthese (cDNA (2))

Proben cDNA (2)	β-actin	HMBS	RPL13
<i>Gruppe R</i>			
r1	19,93	24,12	22,87
r2	20,77	26,92	23,68
r3	20,17	26,82	23,80
r4	21,09	26,33	23,61
r5	19,22	27,12	23,99
<i>Kontrolltiere</i>			
L61	19,51	24,97	22,81
L62	19,00	24,54	22,94
<i>Gruppe 1</i>			
2	18,45	26,39	23,21
3	19,16	27,30	24,24
4	19,08	27,87	24,33
5	20,38	25,67	23,00
6	18,12	24,59	22,69
7	18,61	27,87	23,94
8	18,46	25,91	23,13
9	19,09	27,19	24,95
<i>Gruppe 2</i>			
L59	20,14	27,37	23,78
L60	19,13	24,32	22,46
10	18,30	23,94	21,96
11	18,55	24,47	22,32
12	18,93	24,91	22,93
14	18,46	25,57	22,99
15	20,68	25,47	23,04
L70	19,58	25,02	23,19
L71	19,46	25,57	22,89
L72	19,66	25,17	23,46
L73	19,14	24,80	22,71
L74	18,97	26,06	22,58

Tabelle 20: C<sub>T</sub>-Werte für die Zielgene (GOI), Teil 1

Proben- bezeichnung	IFN- gamma	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-7	IL-8	IL-12
<i>Gruppe R</i>						
r1	32,94	26,87	30,53	31,98	31,66	30,75
r2	31,54	30,00	30,60	34,48	32,63	31,48
r3	32,41	29,97	30,29	32,25	31,16	31,76
r4	33,48	30,74	30,68	33,32	31,73	31,31
r5	32,88	27,33	29,18	32,54	30,15	31,06
<i>Gruppe A</i>						
2	33,16	26,07	28,27	33,09	29,14	31,33
3	nb	26,61	28,87	34,43	30,82	33,10
4	nb	27,99	29,72	33,35	30,17	33,14
5	nb	27,11	30,01	34,73	31,09	32,31
6	32,43	28,01	29,17	32,98	29,81	33,61
7	33,98	27,14	28,29	33,51	29,30	31,18
8	35,34	26,03	27,91	32,73	29,35	32,07
9	34,60	27,30	27,93	32,88	28,82	31,33
<i>Gruppe B</i>						
L60	28,16	27,55	30,28	29,75	29,39	30,72
10	28,19	26,61	28,56	29,44	27,74	29,77
11	28,18	26,74	29,61	30,19	28,29	30,40
12	28,49	27,86	28,86	30,16	29,84	nb
14	32,50	26,72	29,26	33,14	31,84	30,02
15	31,40	31,18	30,86	33,79	31,06	32,29
L74	27,25	28,88	27,85	30,01	28,11	32,12

nb = nicht bestimmbar, da Expressionsrate unterhalb der Nachweisgrenze

Tabelle 21: C<sub>T</sub>-Werte für die Zielgene (GOI), Teil 2

Proben- bezeichnung	IL-15	IL-18	LITAF	TGF-β2	TL1A
<i>Gruppe R</i>					
r1	31,03	30,55	35,47	23,72	31,55
r2	30,83	31,66	34,12	25,81	33,19
r3	31,64	29,66	32,97	25,56	33,14
r4	31,45	31,31	34,51	25,39	33,34
r5	30,94	30,77	32,06	25,83	33,11
<i>Gruppe A</i>					
2	31,77	31,97	33,15	25,88	32,27
3	32,24	32,88	33,02	25,89	32,89
4	33,18	31,91	33,26	26,72	33,21
5	33,36	33,69	nb	24,87	31,12
6	31,15	31,53	32,34	24,94	31,84
7	33,69	31,52	32,67	26,85	32,27
8	31,49	31,21	31,92	25,54	30,97
9	31,48	31,93	32,74	26,75	32,28
<i>Gruppe B</i>					
L60	29,71	31,32	32,15	24,10	29,60
10	29,10	31,06	30,82	23,77	28,11
11	28,52	30,99	29,21	23,69	29,18
12	29,07	30,48	31,52	24,71	29,84
14	30,76	31,96	32,86	24,93	30,13
15	32,20	32,97	33,00	24,96	32,83
L74	29,79	nb	30,82	26,42	29,13

nb = nicht bestimmbar, da Expressionsrate unterhalb der Nachweisgrenze

Tabelle 22: FC-Werte der Referenzgene

Proben- bezeichnung	$\beta$ -actin	HMBS	RPL13
<i>Gruppe R</i>			
r1	1,40	1,00	0,76
r2	1,00	1,21	0,83
r3	0,99	0,95	1,09
r4	1,15	0,86	1,08
r5	0,97	1,04	1,00
<i>Gruppe A</i>			
2	0,67	1,33	1,04
3	0,62	1,13	1,33
4	0,82	1,17	1,01
5	0,73	0,91	1,48
6	0,83	1,17	0,98
7	0,64	1,33	1,06
8	1,09	1,09	0,85
9	1,23	1,00	0,86
<i>Gruppe B</i>			
L60	0,85	1,51	0,72
10	0,69	1,78	0,70
11	0,79	1,63	0,70
12	0,88	1,48	0,72
14	0,72	1,35	0,95
15	1,07	1,28	0,73
L74	0,73	1,70	0,72

Tabelle 23: FC-Werte der Zielgene (GOI), Teil 1

Proben- bezeichnung	IL-12	IL-18	IFN- $\gamma$	IL-1	IL-6	TL1A
<i>Gruppe A</i>						
2	0,62	0,28	0,08	4,77	2,51	0,95
3	0,27	0,20	nb	5,90	2,21	1,13
4	0,26	0,39	nb	2,59	1,24	1,04
5	0,81	0,21	nb	2,91	1,87	2,56
6	0,12	0,32	0,10	0,69	1,11	0,70
7	0,75	0,43	0,04	3,85	2,72	1,61
8	0,31	0,38	0,09	4,33	2,54	2,00
9	0,88	0,41	0,25	4,10	4,46	1,90
<i>Gruppe B</i>						
L60	1,03	0,498	13,88	1,06	0,71	3,52
10	1,44	0,45	10,35	1,39	1,75	6,53
11	1,03	0,51	11,12	1,64	0,91	4,11
12	nb	0,86	10,68	1,04	1,79	3,63
14	1,40	0,28	0,69	2,42	1,24	3,16
15	0,96	0,40	4,20	0,18	1,22	0,84
L74	0,44	nb	26,49	0,62	3,91	7,06

nb = nicht bestimmbar, da Expressionsrate unterhalb der Nachweisgrenze

Tabelle 24: FC-Werte der Zielgene (GOI), Teil 2

Probe- bezeichnung	LITAF	IL-7	IL-15	TGF- $\beta$ 2	IL-8
<i>Gruppe A</i>					
2	1,04	0,57	0,43	0,42	3,23
3	1,51	0,30	0,41	0,74	1,34
4	1,27	0,63	0,21	0,47	2,11
5	nb	0,44	0,34	1,04	2,06
6	1,49	0,504	0,54	0,44	1,66
7	1,59	0,47	0,12	0,36	3,17
8	1,94	0,58	0,41	0,46	2,21
9	1,94	0,94	0,74	0,46	5,67
<i>Gruppe B</i>					
L60	2,32	6,59	2,03	0,89	3,03
10	4,46	6,22	2,37	0,76	7,19
11	14,63	3,93	3,82	1,04	5,25
12	3,44	4,73	3,05	0,70	2,12
14	1,23	0,53	0,84	0,64	0,48
15	3,28	1,00	0,89	1,01	2,44
L74	6,15	5,76	2,01	0,26	7,68

nb = nicht bestimmbar, da Expressionsrate unterhalb der Nachweisgrenze\*

## 11.2 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Olias P, Meyer A, Klopffleisch R, Lierz M, Kaspers B, Gruber AD. (2013)

**Modulation of the host Th1 immune response in pigeon protozoal encephalitis caused by *Sarcocystis calchasi*.**

Veterinary Research 2013, 44(1):10

## Danksagung

Meinem Betreuer Herrn Dr. Philipp Olias danke ich herzlich für die jederzeit gewährte freundliche und fachliche Unterstützung, das Korrekturlesen und die zahlreichen ermutigenden Worte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas und seine fortwährende und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers aus dem Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die freundliche Bereitstellung des monoklonalen Antikörpers 2G11 und die fachliche Begleitung zu Fragen der aviären Immunologie.

Frau Monika Schaerig, Frau Jana Enders und Frau Michaela Dauer möchte ich für ihre unschätzbare Unterstützung im Labor danken.

Herrn Prof. Jörg Aschenbach aus dem Institut für Veterinär-Physiologie danke ich für die Möglichkeit, den Agilent Bioanalyser nutzen zu dürfen und die hilfreiche und freundliche Einweisung am Gerät.

Allen Mitdoktoranden und Mitarbeitern am Institut für Tierpathologie danke ich für ein humorvolles und hilfsbereites Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit am Institut.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die mich durch die Höhen und Tiefen der Doktorarbeit begleitet haben und die mit vielen schönen Unternehmungen für ein Leben auch außerhalb der wissenschaftlichen Welt sorgten. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch meinem Freund und Ehemann Tasso für seine unendliche Geduld und seine unschätzbare Hilfe bei sämtlichen Computerfragen.

Und schließlich danke ich von Herzen meinen Eltern und meiner lieben Oma, die mir Studium und Promotion erst ermöglicht haben, sowie meinen Brüdern für ihre immerwährende Unterstützung und unseren familiären Zusammenhalt. Ohne euch hätte ich all das nicht geschafft. Danke!

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 23. September 2013

Anne Mulzer