

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Entwicklung eines Zellkultur-basierten Testverfahrens zur Evaluierung potentieller Wirkstoffe
gegen *Cryptosporidium parvum*

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

vorgelegt von
Maja Schupfner
Tierärztin aus Reinbek

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3728

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl-Hans Zessin
Dritter Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cell culture, Cryptosporidium parvum, drug effects, drug therapy, drug toxicity,
in vitro culture, real time PCR, screening, treatment

Tag der Promotion: 02.06.2015

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: 978-3-86387-603-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015

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 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

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

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

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

1 Einleitung

Das Protozoon *Cryptosporidium (C.) parvum* ist ein weltweit verbreiteter Verursacher von Darminfektionen und zählt aufgrund seines zoonotischen Charakters sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin zu den relevantesten parasitären Enteritiserregern. Der Verlauf der namentlich als Cryptosporidiose bezeichneten Darmerkrankung ist eng assoziiert mit dem Immunstatus des Wirtes und eine Infektion mit diesem Parasiten ist somit von großer Bedeutung für immundefiziente Personen, bei denen sich das bei infizierten immunkompetenten Personen zu beobachtende akute, selbstlimitierende Durchfallgeschehen zu einer chronischen und lebensbedrohlichen Erkrankung entwickeln kann (Chen et al., 2002; Current und Garcia, 1991; Farthing, 2000; Tzipori, 1988). In veterinärmedizinischer Hinsicht sind in besonderem Maße Neonaten durch ihr unausgereiftes Immunsystem und eine sehr geringe Infektionsdosis, gepaart mit einer nahezu ubiquitären Umweltkontamination mit *C. parvum* von einer Cryptosporidiose betroffen. So gehört *C. parvum* beispielsweise neben enterotoxischen *Escherichia coli* (ETEC), Rota- und Coronaviren zu den Hauptverursachern der neonatalen Diarrhoe beim Kalb und ist demzufolge als einer der wichtigsten Verursacher für Verluste in der Kälberaufzucht und damit assoziierte wirtschaftliche Einbußen zu bezeichnen (de Graaf et al., 1999; Kaske et al., 2008; Santin, 2013).

Ogleich in der Human- und in der Veterinärmedizin zur Behandlung bzw. Pro- und Metaphylaxe zugelassene Wirkstoffe (Nitazoxanid, Halofuginon) existieren, so ist durch deren Einsatz nicht in allen Fällen einer humanen und bovinen Cryptosporidiose eine effektive Behandlung gewährleistet. Nach wie vor sind keine uneingeschränkt wirksamen Chemotherapeutika zur Behandlung dieser Erkrankung verfügbar (Cabada und White, 2010; Gargala, 2008; Shahiduzzaman und Dauschies, 2012; Stockdale et al., 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Zellkultur-basiertes Testverfahren etabliert werden, um eine anticryptosporidiale Wirksamkeit bis dato noch nicht überprüfter, potentieller Substanzen evaluieren zu können. Wenngleich eine *in vitro* attestierte Wirksamkeit nicht zwangsläufig beweisend für eine Wirksamkeit *in vivo* sein kann, eignet sich eine *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* dennoch zur Vorselektion von solchen Substanzen, die in nachfolgenden Tierversuchen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit positive Resultate zeigen könnten (Mead, 2002; Stockdale et al., 2008). In der Konsequenz würde durch ein vorgeschaltetes Zellkultur-basiertes Testverfahren somit die Anzahl an erfolglos in Tierversuchen überprüften Wirkstoffen auf ein Minimum reduziert werden können. Zudem eröffnet eine *in vitro* Kultivierung die Möglichkeit, parallel zur Wirkstoffüberprüfung zytotoxische und/oder die Wirtszellproliferation beeinflussende Effekte der Substanzen mikroskopisch beobachtet zu können, bzw. solche Effekte durch weitere Testverfahren (z.B. Laktatdehydrogenase-Assay, WST-1-Assay) nachzuweisen.

Zur Evaluation einer anticryptosporidialen Wirksamkeit einer Substanz kommen in der Wissenschaft verschiedene Verfahren zur Anwendung, die eine Wirkstoff-bedingte Reduktion der intrazellulären Entwicklungsstadien von *C. parvum* abbilden; hierzu zählen beispielsweise der "chemiluminescence immunoassay" (CLIA), der "microtiter enzyme-linked immunosorbant assay" (ELISA), die "quantitative real-time polymerase chain reaction" (qPCR) und die "reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction" (RT-qPCR) (Cai et al., 2005; MacDonald et al., 2002; Woods et al., 1995; You et al., 1996b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkultursystem zur *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* etabliert, das eine Überprüfung potentieller anticryptosporidialer Substanzen ermöglichte (*C. parvum* Inhibitionsassay). Anhand einer nachfolgenden qPCR wurde eine relative Quantifizierung der Entwicklung des Erregers durchgeführt, so dass eine Aussage zu einer potentiell anticryptosporidialen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen getroffen werden konnte.

2 Literaturübersicht

2.1 *Cryptosporidium parvum*

2.1.1 Zur Geschichte des Erregers

Die Entdeckung und Namensgebung der Gattung *Cryptosporidium* (C.) geht auf Ernest Edward Tyzzer (1875-1965) zurück. Bei seinen Forschungsarbeiten konnte Tyzzer wiederholt einen parasitischen Erreger in den Magendüsen von Hausmäusen (*Mus musculus*) nachweisen und beschrieb bereits 1907 dessen asexuelle und sexuelle Entwicklungsstadien (Sporoziten, Schizonten, Mikrogamont, Mikrogameten, Makrogamont, Spore (Oocyste)), sowie deren Besonderheit in Form eines "organ of attachment". Auch äußerte Tyzzer damals schon den Verdacht eines monoxen Entwicklungszyklus und eines fäkal-oralen Übertragungsweges. Aufgrund des Fehlens eines gesicherten taxonomischen Status wählte Tyzzer für seine Entdeckung den Namen *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907).

Im Jahr 1910 verfasste Tyzzer eine detailliertere Beschreibung des Erregers, welche zudem ein größeres Wirtsspektrum umfasste und die Hypothese einer möglichen Autoinfektion beinhaltete. Er schlug im Rahmen dessen die Schaffung des Genus *Cryptosporidium* (C.) und der entsprechenden Spezies *C. muris* vor (Tyzzer, 1910).

Bis auf die Tatsache, dass Tyzzer die Lokalisation der Entwicklungsstadien als extrazellulär beschrieb, konnten all seine mikroskopischen Beobachtungen zum Entwicklungszyklus von *C. muris* elektronenmikroskopisch bestätigt werden (Fayer et al., 1990).

Zwei Jahre später beschrieb Tyzzer eine weitere neue Spezies, *C. parvum*, welche er ebenfalls bei Hausmäusen nachweisen konnte. Diese Spezies unterschied sich sowohl morphologisch (kleinere Oocysten) als auch in ihrer Prädilektionsstelle (Dünndarmepithel) von *C. muris* (Tyzzer, 1912).

In den folgenden Jahren wurden zur Erforschung dieses Parasiten keine weiteren Studien durchgeführt, da ihm weder wirtschaftliche noch (veterinär)medizinische Bedeutung zugemessen wurde. Zwar wurde 1955 eine neue Spezies dieser Gattung, namentlich *Cryptosporidium meleagridis*, mit Diarrhoe und Todesfällen bei Putenküken assoziiert (Slavin, 1955), dennoch rückten diese Protozoen erst in den frühen 70er Jahren mit der Veröffentlichung erster Fallberichte Cryptosporidien-assoziiertes Kälberdurchfälle in den veterinärmedizinischen Fokus (Meutin et al., 1974; Panciera et al., 1971). Allerdings konnte erst in den 80er Jahren von Tzipori et al. (1980b; 1983) und Heine et al. (1984) nachgewiesen werden, dass es sich bei Cryptosporidien um ein primäres Enteropathogen handelt, welches auch in Abwesenheit von anderen viralen oder bakteriellen Erregern neonatale Kälberdiarrhoe verursachen kann. Im Jahr 1976 wurden die ersten beiden Fallberichte humaner Cryptosporidiose publiziert (Meisel et al., 1976; Nime et al., 1976);

dennoch verdeutlichte erst ein 1982 veröffentlichter Bericht des "Center for Disease Control" (CDC) die humanmedizinische Relevanz der Cryptosporidien. Es wurden protrahierte, Cryptosporidiose-induzierte Durchfallerkrankungen bei insgesamt 21 AIDS-Patienten beschrieben, die seit 1979 an das CDC gemeldet worden waren. Die meisten dieser Fälle erwiesen sich als therapieresistent und einige nahmen einen letalen Ausgang (Unbekannt, 1982). In Folge des Berichts nahm weltweit das Interesse an diesem Parasiten zu und er entwickelte sich zum Forschungsobjekt vieler Studien (Fayer et al., 1990).

Flächenhafte Cryptosporidioseausbrüche in den USA (1993, ca. 403.000 geschätzte Erkrankte) und in Großbritannien (1988/89, ca. 516 Erkrankte), die in beiden Fällen auf kontaminiertes Trinkwasser zurückzuführen waren (Mac Kenzie et al., 1994; Richardson et al., 1991), forcierten erneut die Forschungsbemühungen in den Bereichen Prävention, Behandlung und Nachweismethoden (Fayer, 2008).

C. parvum zählt noch heute sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zu den relevantesten parasitären Enteritiserregern; nicht zuletzt, da der Schweregrad der Erkrankung eng mit dem Immunstatus des Trägers assoziiert ist (Chen et al., 2002; Current und Garcia, 1991; Farthing, 2000; Tzipori, 1988) und eine kausale Therapie für immundefiziente Erkrankte noch immer nicht zur Verfügung steht (Graczyk et al., 2011).

2.1.2 Taxonomie und Wirtsspektrum

Der taxonomische Status der Gattung *Cryptosporidium* ist bis heute nicht endgültig geklärt sondern unterliegt durch neue (molekularbiologische) Erkenntnisse stetigen Veränderungen. Traditionell werden diese dem Phylum Apikomplexa zugeordneten Protozoen aufgrund großer Ähnlichkeiten im Entwicklungszyklus der Klasse der Kokzidien zugeordnet, wenngleich Cryptosporidien Eigentümlichkeiten aufweisen, die sie von allen anderen Kokzidien unterscheiden (Hijjawi et al., 2002); hierzu zählen die intrazelluläre aber extrazytoplasmatische Erregerlokalisation, die Formierung eines "feeder" Organells, die Bildung zweier sowohl morphologisch (dick- und dünnwandig) als auch funktionell (Neu- versus Autoinfektion) verschiedener Oocystentypen, die geringe Oocystengröße, fehlende morphologische Charakteristika wie zum Beispiel Sporozysten oder Mikropylen sowie die Unempfindlichkeit der Cryptosporidien gegenüber allen bis dato getesteten antikomplexidialen Verbindungen (Hijjawi et al., 2002; Smith und Corcoran, 2004).

Eine phylogenetische Studie von Carreno et al. (1999) basiert auf dem Vergleich von "small-subunit ribosomal RNA" Gensequenzen und lässt auf eine nähere Verwandtschaft zu den Gregarinen schließen. Bestärkt wird diese These durch Studien von Hijjawi et al. (2002) und Rosales et al. (2005), in denen diese bei der *in vitro* Erregerkultivierung "gregarine-like" Entwicklungsstadien des Parasiten beobachteten. Weitere Indikatoren für eine mögliche Verwandtschaft zu den Gregarinen werden in einer Publikation von Karanis und Aldeyarbi (2011) ausführlich dargelegt.

Namensgeber dieser Gattung als auch der ersten beschriebenen Spezies, *C. muris*, ist Tyzzer (1907) (siehe Kapitel 2.1.1), welcher in Ermangelung eines gesicherten taxonomischen Status für seine Entdeckung in Anlehnung an morphologische Unterschiede zu bisher beschriebenen Protozoen ('*Cryptosporidium*' von crypticus, lat = verborgen; hier verborgene Sporozyste) und an die Wirtstierart diesen Namen wählte. Zwar beschrieb Tyzzer 1912 in derselben Wirtstierart erneut einen Parasiten dieser Gattung, wählte aber aufgrund der geringeren Oocystengröße und der unterschiedlichen Prädilektionsstelle eine neue Speziesbezeichnung, *C. parvum* (O'Donoghue, 1995; Tyzzer, 1912). Lange dienten Charakteristika wie Morphologie der endogenen und exogenen Entwicklungsstadien, Prädilektionsstelle und Wirtsspezifität der Speziesidentifizierung- und Benennung der Apikomplexa (Fayer, 2010). Die Speziesbenennung nach dem Prinzip der Wirtsspezifität wurde auch für die Gattung *Cryptosporidium* angewendet; beispielsweise wurden in Lämmerkot nachgewiesene Oocysten als *Cryptosporidium agni* (agni, lat.= das Lamm) bezeichnet (Barker und Carbonell, 1974). Folglich listete O'Donoghue 1995 noch 21 verschiedene *Cryptosporidium* spp., deren Namensgebung vornehmlich auf Basis des Vorkommens in einem bestimmten Wirt erfolgte. Die Gültigkeit dieser Spezies stellte er allerdings in Frage, unter anderem basierend auf den Ergebnissen verschiedener Kreuzinfektionsstudien, die der These der Wirtsspezifität widersprachen (O'Donoghue, 1995; Tzipori, 1983; Tzipori et al., 1980a). Tzipori et al., als Durchführer einer solchen Studie, resümierten sogar, dass es sich bei *Cryptosporidium* vielmehr um eine "monotypic (single species)" Gattung handle (Tzipori et al., 1980a), räumten aber ein, dass es durchaus stammspezifische Variationen geben könnte (Tzipori, 1983) und sich für verschiedene Stämme unterschiedliche Prädilektionsstellen abzeichneten (Tzipori, 1988).

Der Mangel an unverwechselbaren morphologischen Kennzeichen des einzigen exogenen Stadiums, der Oocyste (nur geringe Größenvariationen), ermöglichte lange keine eindeutige Spezieszuordnung. Erst durch das Aufkommen molekularbiologischer Methoden können Unterschiede in den Gensequenzen, wie beispielsweise in der Basenabfolge der 18S ribosomalen "Ribonucleic acid" (rRNA), des Acetyl-CoA-Synthetase Gens oder des "Cryptosporidium oocyst wall protein" (COWP) als speziesspezifische Charakteristika herangezogen werden und eine definitive Identifizierung ermöglichen (Morgan et al., 1997; Morgan et al., 1998; Nichols et al., 1991; Spano et al., 1997b; Xiao, 2010; Xiao et al., 1999). So haben molekularbiologische Methoden auch zu der Erkenntnis geführt, dass die beiden verschiedenen Infektionswege der humanen Cryptosporidiose (anthroponotisch und zoonotisch) mit zwei unterschiedlichen Genotypen von *C. parvum* zusammenhängen (Fayer, 2010; Peng et al., 1997). Der Genotyp, der für die Mensch zu Mensch Übertragung verantwortlich ist, wurde als Genotyp I oder als „humaner Genotyp“ bezeichnet, wohingegen der über Tierkontakt übertragene Genotyp als Genotyp II oder „boviner Genotyp“ titulierte

wurde. Erstgenannter Genotyp wurde später als eigene Spezies definiert und in *C. hominis* umbenannt und der zweitgenannte Genotyp wurde weiterhin unter *C. parvum* geführt (Morgan-Ryan et al., 2002).

Fayer listete im Jahr 2010 18 morphologisch, biologisch und molekularbiologisch bestätigte unterschiedliche *Cryptosporidium* Spezies, denen sowohl Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere (Stand 2008 laut Fayer: 157 Säugetierarten) als Wirt dienen (Fayer, 2008, 2010). Zwölf der 18 Spezies wurden erstmals bei Säugetieren beschrieben, hierzu zählen: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. macropodum*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. suis* und *C. wrairi*. Bei den drei ursprünglich aus Vögeln isolierten Spezies handelt es sich um *C. baileyi*, *C. galli* und *C. meleagridis*, wohingegen *C. serpentis* und *C. varanii* aus Reptilien und *C. fragile* aus Amphibien isoliert wurde (Fayer, 2010). Von einer tatsächlichen Wirtsspezifität der einzelnen Spezies kann in den meisten Fällen nicht gesprochen werden und nachdem *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. bovis*, *C. suis*, *C. andersoni* und *C. muris* auch bei humanen Cryptosporidiosen nachgewiesen werden konnten, müssen neben *C. parvum* auch diese Spezies als potentiell zoonotisch angesehen werden (Caccio et al., 2002; Ditrich et al., 1991; Guyot et al., 2001; Helmy et al., 2013; Khan et al., 2010; Morgan et al., 2000; Pedraza-Diaz et al., 2001; Pedraza-Diaz et al., 2000; Xiao, 2010; Xiao et al., 2001; Xiao und Feng, 2008).

Weiterhin existieren zu mehr als 40 aus Wirbeltieren stammenden Isolaten Gensequenz-Daten; da diesen Isolaten aber bisher noch kein taxonomischer Status zugeordnet werden konnte, werden sie mit namentlichen Bezug zu dem Wirt in der Literatur lediglich als Genotypen geführt (Fayer, 2010).

2.1.3 Entwicklungszyklus und Morphologie

C. parvum ist ein in der Regel im Gastrointestinaltrakt parasitierendes Protozoon mit monoxenem Entwicklungszyklus (Lebenszyklus), welcher sich in eine asexuelle (Sporogonie und Schizogonie/Merogonie) und sexuelle Phase (Gamogonie) unterteilen lässt.

Bei dem eine Infektion einleitenden Agens handelt es sich um eine sporulierte dickwandige Oocyste, welche mit dem Kot infizierter Wirte in die Umwelt gelangt. Die ca. 5 µm×4,5 µm großen Oocysten sind von sphärischer bis ovoider Gestalt und enthalten neben einem Residualkörper vier bananen- bzw. kommaförmige Sporozoiten mit einem spitz zulaufenden Vorder- und einem stumpfen Hinterende, in dessen hinterem Drittel der Zellkern lokalisiert ist (Current und Reese, 1986; Fayer und Ungar, 1986; Upton und Current, 1985). Der ca. 2,4 µm×2,5 µm große Residualkörper besteht aus einem sphärischen bis ovoiden membrangebundenen Kügelchen (ca. 1,5 µm×1,6 µm), umgeben von zahlreichen kleinen Granula (Durchmesser ca. 0,2 bis 1,2 µm). Ihm liegen die längsseits und parallel zueinander ausgerichteten Sporozoiten eng an (Upton und Current, 1985). Kennzeichnend für die Gattung *Cryptosporidium* ist, dass die Sporozoiten nicht zusätzlich von einer Sporozyste

umschlossen sind. Die glatte, farblose Oocystenwand ist zweischichtig (eine äußere und eine innere Schicht) und eine präformierte Nahtstelle erstreckt sich als blasse Linie von einem Pol bis teilweise über die Zirkumferenz der Oocyste reichend (Vandepitte et al., 1985) bzw. laut Studien von Upton und Current (1985) und Reduker et al. (1985) ist selbige von einem Oocystenpol diagonal bis zu einem Drittel (maximal der Hälfte) des Oocystenumfangs verlaufend. Aus dieser präformierten Nahtstelle schlüpfen im Gastrointestinaltrakt unter dem Einfluss von Temperatur- sowie pH-Wert-Veränderungen, CO₂, Gallensalzen und Pankreasenzymen die ca. 4,9 µm×1,2 µm langen Sporozoiten (Upton und Current, 1985; Vandepitte et al., 1985). Allerdings scheinen die drei letztgenannten Faktoren für die Exzystierung nicht zwingend erforderlich zu sein, so dass auch eine extraintestinale Besiedlung zum Beispiel des Respirationstraktes ermöglicht wird (Fayer und Leek, 1984; Reduker und Speer, 1985). Die frei gewordenen Sporozoiten adhärieren mit ihrem proximalen Ende am Mikrovillussaum der Enterozyten und lösen damit ihre Internalisierung aus. Für humane ileocaecale Adenokarzinomzellen (HCT-8 Zellen) und primäre ileale Enterozyten neonataler Mäuse (Alter fünf Tage) wurde bei diesem Prozess eine Beteiligung des Sporozoiten-Oberflächenproteins *C. parvum* (CP) 47 in der Funktion eines Liganden nachgewiesen. Der zugehörige Wirtszellrezeptor ist ein 57 kDa Protein (p57) (Nesterenko et al., 1999). Ebenfalls scheinen auch die 40 kDa und >900 kDa Sporozoiten-Glykoproteine (GP40, GP900) und das "circumsporozoite-like" (CSL) Glykoprotein am Adhäsions- und Invasionsprozess beteiligt zu sein (Barnes et al., 1998; Cevallos et al., 2000; O'Hara und Chen, 2011; Smith et al., 2005). In der Folge werden die Sporozoiten von einer durch den Parasiten modifizierten Wirtszellmembran umschlossen, so dass eine parasitophore Vakuole innerhalb des Bürstensaums des Enterozyten entsteht; eine von den anderen Apikomplexa abweichende Lokalisation der parasitophoren Vakuole, die häufig mit intrazellulär, jedoch extrazytoplasmatisch umschrieben wird (Current und Reese, 1986; Deng et al., 2004; McDonald et al., 1995; O'Hara et al., 2004).

Im Rahmen der Internalisierung entsteht an der Kontaktstelle zwischen Sporozoit und Wirtszellmembran eine einzigartige, mehrfach/extensiv gefaltete Membranstruktur, das sogenannte "feeder" Organell. Über dieses erfolgt mutmaßlich die Nährstoffversorgung des heranreifenden Parasiten. Zapata et al. (2002) konnten in einer Lokalisationsstudie gehäuft das "ATP-binding cassette" (ABC) Protein CpABC1 (*C. parvum* ABC Protein) in einer hemisphärischen Struktur im Grenzbereich zwischen Wirtszelle und reifem Meronten nachweisen. Sie leiten hieraus die Hypothese ab, dass dieses Protein Bestandteil der an dieser Kontaktstelle vorkommenden Membranen und somit auch des "feeder" Organells ist. Da es sich bei den meisten ABC Proteinen um ATP-abhängige Membrantransporter handelt, liegt der Verdacht nahe, dass CpABC1 in eben dieser Funktion an metabolischen Stoffwechselbeziehungen zwischen Wirtszelle und heranreifenden Parasiten beteiligt ist. Im

Anschluss an den Internalisierungsprozess differenziert der Sporozoit innerhalb der parasitophoren Vakuole zu einem ca. $3,8\ \mu\text{M} \times 3,7\ \mu\text{M}$ großen, kugelförmigen Trophozoiten mit exzentrisch liegendem Zellkern (geringfügige Isolat-abhängige Größenvariationen). In Folge dreier ungeschlechtlicher Teilungen (Merogonie/Schizogonie) entwickelt sich dieser zu einem ca. $5,2\ \mu\text{M} \times 5,1\ \mu\text{M}$ großen Meronten vom Typ I (geringfügige Isolat-abhängige Größenvariationen), welcher sechs (als Folge asynchroner Zellkernteilung) bis acht Merozoiten enthält. Der Zellkern dieser motilen Stadien liegt im Vergleich zu dem der Sporozoiten eher zentral (Current und Reese, 1986). Ansonsten ähneln die Merozoiten den Sporozoiten in Gestalt und Größe und haben mit diesen auch einige Epitope gemein (Bjorneby et al., 1990).

Nach dem Verlassen der parasitophoren Vakuole initiieren die Merozoiten entweder einen weiteren asexuellen Zyklus, indem sie analog zu den Sporozoiten weitere Epithelzellen befallen und sich wieder zu Meronten vom Typ I entwickeln oder sie leiten die sexuelle Entwicklungsphase ein, indem sie eine Stadienkonversion zu dem etwas kleineren Meronten vom Typ II durchlaufen. Innerhalb dieses Meronten-Typs entstehen durch ungeschlechtliche Teilung vier Merozoiten, welche nach dem Befall weiterer Enterozyten zu Mikro- und Makrogamonten differenzieren (Gamogonie). Die sphärischen ca. $4,8\ \mu\text{M} \times 4,5\ \mu\text{M}$ großen unreifen Mikrogamonten (geringfügige Isolat-abhängige Größenvariationen) beinhalten bis zu 16 peripher liegende kompakte Zellkerne, Vorläufer der sich entwickelnden Mikrogameten. Selbige sind von geschossförmiger Gestalt mit stumpfem Vorderende, unbegeißelt und werden von ihrem Zellkern nahezu ausgefüllt. Die reifen Mikrogameten verlassen ihre Wirtszelle und befruchten die ca. $5,2\ \mu\text{M} \times 5,2\ \mu\text{M}$ großen, einkernigen Makrogameten (geringfügige Isolat-abhängige Größenvariationen). Diese sind ebenfalls annähernd kugelförmig und durch ein granuliertes Zytoplasma und exzentrisch liegende Hüllbildungskörper leicht von anderen Entwicklungsstadien zu unterscheiden (Current und Reese, 1986). Durch die Syngamie entsteht das einzige diploide Entwicklungsstadium der Cryptosporidien, die Zygote. Selbige vollzieht anschließend einen der Meiose ähnelnden Prozess, die sogenannte Sporogonie, und es entstehen noch in der parasitophoren Vakuole dünn- oder dickwandige Oocysten mit je vier haploiden Sporozoiten (sporulierte Oocysten) (O'Hara und Chen, 2011). Erstgenannte Oocysten (ca. 20 %) exzystieren bereits im Intestinaltrakt des Wirtes und verursachen eine endogene Autoinfektion, während die dickwandigen, äußerst resistenten Oocysten (ca. 80 %) mit den Faeces in die Umwelt gelangen. Sie repräsentieren somit das einzige exogene Stadium dieses Parasiten (Current und Reese, 1986).

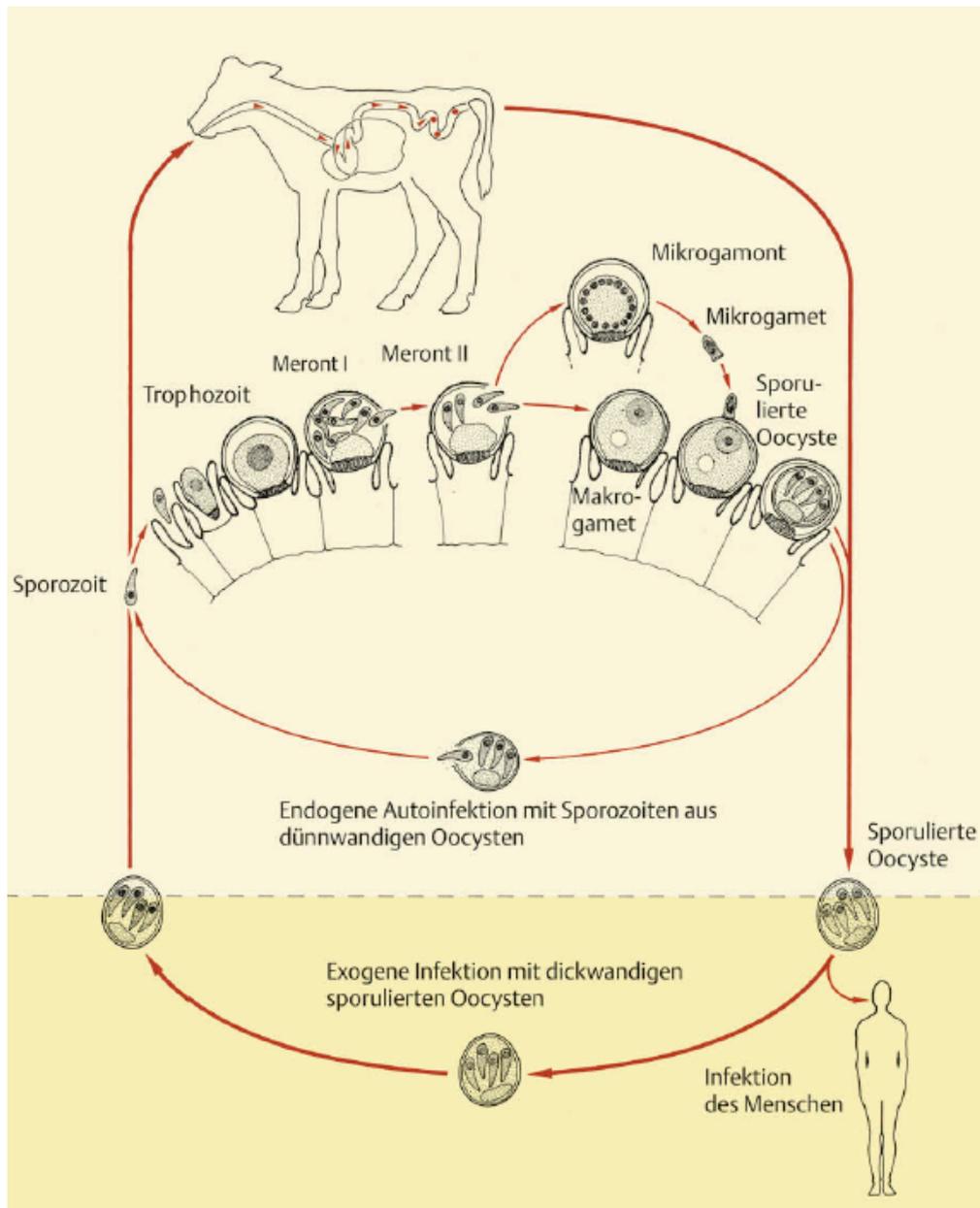


Abb. 2.1.3.1 Entwicklungszyklus von *C. parvum* aus: Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 2008, Seite 106 – mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe.

2.1.4 Epidemiologie

Cryptosporidiose ist eine weltweit verbreitete Darminfektion, die durch Parasiten der Gattung *Cryptosporidium* verursacht wird. Bei dem infektiösen Stadium handelt es sich um eine endogen sporulierte Oocyste, welche somit bereits in dieser Form von einem befallenen Wirt in großer Menge mit den Faeces (bei experimentellen Infektionen von Kälbern wurden bis zu 4×10^7 Oocysten pro Gramm Kot nachgewiesen (Fayer et al., 1998)) bzw. im Falle einer respiratorischen Cryptosporidiose mit dem Bronchialsekret ausgeschieden wird und unmittelbar die Umwelt kontaminiert. Selbige Oocysten sind nicht nur gegenüber Umwelteinflüssen sehr resistent (Fayer et al., 2000), erschwerend kommt hinzu, dass nur

wenige der herkömmlich verwendeten chemischen Desinfektionsmittel gegen Bakterien oder Viren aufgrund der harten, nahezu undurchdringlichen Oocystenwand in den üblichen Anwendungskonzentrationen eine Wirksamkeit gegen diese Dauerstadien zeigen (Fayer, 2008; Fayer et al., 1996). Aus diesem Grund ist zur Desinfektion die Verwendung eines als antikozydial wirksam gelisteten Präparats der Desinfektionsmitteliste (für Tierhaltung) der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) zu empfehlen, auch wenn entsprechend der „Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln“ der DVG Oocysten von *Eimeria tenella* und nicht von *C. parvum* als Testorganismus für eine antiparasitäre Wirkungsprüfung in Bezug auf Kokzidien fungieren. Für einige der als antikozydial wirksam gelisteten Präparate (Neopredisan® 135-1, KokziDes®) der aktuellen 13. Desinfektionsmittelliste für die Tierhaltung (Stand Mai 2013) wurde anhand eines Zellkultur-basierten Testverfahrens eine anticryptosporidiale Wirksamkeit verifiziert (Shahiduzzaman et al., 2010).

Bei der bovinen Cryptosporidiose infizieren sich die Kälber in der Regel über eine orale Aufnahme der in die Umwelt gelangten Oocysten. Mögliche Infektionsquellen sind neben infizierten und ausscheidenden Nachbartieren auch kontaminierte Stallungen, sowie kotbesmutzte Zitzen und Euter säugender Mutterkühe (Angus, 1990). Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang klinisch inapparent erkrankten Tieren zu, welche trotz fehlender klinischer Symptomatik als Oocystenausscheider fungieren können und so zu einer Verbreitung des Erregers im Bestand beitragen. Subklinische Infektionen wurden nicht nur bei Kälbern sondern auch bei adulten Rindern nachgewiesen (Lorenzo Lorenzo et al., 1993; Mann et al., 1986; Villacorta et al., 1991a), so dass auch diese Altersgruppe als potentielles Erregerreservoir nicht auszuschließen ist (Angus, 1990). Auch kann eine Einschleppung des Parasiten über das in den Stallungen beschäftigte Personal erfolgen (verschmutzte Schuhe, Kleidung, Bedarfsgegenstände wie Schubkarren, nicht ausreichend gereinigte Fütterungsutensilien etc.), sowie über infizierte oder äußerlich kontaminierte Nagetiere, Hunde, Katzen, Wildtiere, Insekten (Fliegen, Kakerlaken, Dungkäfer) und freilebende Amöben (Angus, 1990; Fayer et al., 2000; Scheid und Schwarzenberger, 2011). Neben enterotoxischen *E. coli* (ETEC), Rota- und Coronaviren zählt *C. parvum* zu den Hauptverursachern der neonatalen Diarrhoe beim Kalb und ist folglich einer der wichtigsten Verursacher für Verluste in der Kälberaufzucht und daraus resultierende wirtschaftliche Einbußen (de Graaf et al., 1999; Kaske et al., 2008; Santin, 2013). Die berichteten Prävalenzen für die bovine Cryptosporidiose bewegen sich in einem Bereich von null bis 100 %, bei abnehmender Tendenz mit steigendem Alter der Tiere (Santin und Trout, 2008). Studien aus den USA belegen zudem eine altersbezogene Spezies-Variation bei den mit Cryptosporidien infizierten Kälbern. Bei den bis zu acht Wochen alten Kälbern ist *C. parvum* die dominierende Spezies, wohingegen bei den zwei bis

elf Monate alten Kälbern *C. bovis*, eine Wirts-adaptierte Spezies, deren Befall bisher nicht mit einer tatsächlichen Klinik assoziierte wurde (Fayer et al., 2005), diese Rolle zukommt (Fayer et al., 2007; Santin et al., 2008; Santin et al., 2004). In Deutschland lag die Einzeltier-Prävalenz von *C. parvum* einer Studie von Joachim et al. (2003) zufolge, in der Daten aus dem Zeitraum von 1993 bis 1997 zusammengefasst wurden, bei ca. 19 bis 36 %. Die Daten wurden durch fünf veterinärmedizinische Laboratorien erhoben, in denen sowohl sämtliche eingesandten Kälberkotproben routinemäßig auf Cryptosporidien untersucht wurden und deren Obduktionen von an Durchfall erkrankten Kälbern mit einem Alter von bis zu vier Wochen auch die koproscopische Untersuchung auf diesen Parasiten umfasste (Joachim et al., 2003). Leider fanden sich in dieser Studie keinerlei Angaben zu dem Alter der untersuchten Kälber und folglich wurde auch keine Unterteilung in verschiedene Altersgruppen vorgenommen, was im Hinblick auf die Datenauswertung insofern interessant gewesen wäre, da die Prävalenz von *C. parvum* bei Saugkälbern am höchsten ist (de Graaf et al., 1999; Fayer, 2004; Henriksen und Krogh, 1985).

Humane Cryptosporidien werden hauptsächlich durch *C. parvum*, der zoonotischen Spezies, deren Infektion in den meisten Fällen auf Tierkontakt zurückzuführen ist, und durch *C. hominis* verursacht (Lendner et al., 2011). Zwar finden sich in der Literatur auch vereinzelt Nachweise von Infektion mit *C. meleagridis*, *C. felis* und *C. canis*, allerdings ist deren zoonotisches Potential grundsätzlich wohl eher als gering einzuschätzen, wenn auch von Bedeutung für immunsupprimierte Personen (Fayer, 2004; Lendner et al., 2011). Die Anzahl der in 2011 gemäß den Referenzdefinitionen an das Robert-Koch-Institut (RKI) übermittelten humanen Cryptosporidien betrug 942, was einer Zunahme von ca. 1 % gegenüber dem Vorjahr entspricht (934 Fälle im Jahr 2010) (Abu Sin et al., 2012). Die für 2011 ermittelte bundesweite Inzidenz der humanen Cryptosporidiose lag bei 1,2 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner und somit knapp unter dem Median der vorangegangenen fünf Jahre (Median: 1,4 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) (Abu Sin et al., 2012). Zu diesen Zahlen ist anzumerken, dass zwar laut Infektionsschutzgesetz (IfSG) nur der Nachweis von *C. parvum* meldepflichtig ist, das IfSG aber der taxonomischen Ausgliederung von *C. hominis* (ehemals Genotyp I von *C. parvum*) noch keine Rechnung getragen hat. Folglich ist unbekannt, ob ausschließlich *C. parvum* induzierte Erkrankungen an das RKI übermittelt wurden, da die eingegangenen Meldungen keine Angaben zur Erregerspezies enthielten (Abu Sin et al., 2012).

Ausbrüche einer humanen Cryptosporidiose sind häufig auf kontaminiertes Trinkwasser zurückzuführen (Fayer, 2004); exemplarisch stehen hierfür zwei massive Cryptosporidiose-Ausbrüche in den USA und in Großbritannien (GB) Ende der 80er/Anfang der 90er Jahre (in den USA geschätzte 403.000 an Diarrhoe erkrankte Personen, 516 Fälle in GB), welche zum damaligen Zeitpunkt die Bedeutung von *C. parvum* als wichtigen Krankheitserreger

verdeutlichten (Mac Kenzie et al., 1994; Richardson et al., 1991). Weitere Verbreitungswege des Erregers sind kontaminierte Lebensmittel (beispielweise durch den Verzehr von rohem Obst oder Gemüse, welches durch Düngen mit kontaminiertem Abwasser in Kontakt gekommen ist), Personenkontakt (Krankenhäuser, Kindertagesstätten, Schulen, auch eine sexuelle Übertragung kann nicht ausgeschlossen werden), aerogene Übertragung und Kontakt zu Tieren (vor allem Kälbern) (Fayer, 2004; Nichols, 2008). So führte beispielsweise im Jahr 2011 der Besuch eines deutschen Rinderstalls in einer Kindergruppe zu einem Cryptosporidiose-Ausbruch mit zwölf Erkrankten (Abu Sin et al., 2012). Eine nicht unwichtige Infektionsquelle scheinen auch Badegewässer und Schwimmbäder darzustellen, da sie unter anderem leicht durch menschliche und tierische Ausscheidungen verunreinigt werden und deren Wasseraufbereitung in vielen Fällen nicht ausreichend bzw. ineffektiv ist (Fayer, 2004; Nichols, 2008).

Weltweit betrachtet werden ca. 60 % aller humanen Cryptosporidiosen durch *C. hominis* verursacht, während auf Europa bezogen *C. parvum* für den Großteil der humanen Cryptosporidiose-Fälle verantwortlich ist (Lendner et al., 2011).

2.1.5 In vitro Kultivierung

Ogleich bereits 1976 die ersten Fallberichte humaner Cryptosporidiose veröffentlicht wurden (Meisel et al., 1976; Nime et al., 1976), gelangten Cryptosporidien erst in den frühen 80er Jahren mit dem Aufkommen von lebensbedrohlichen Cryptosporidium-induzierten Erkrankungen bei HIV/AIDS-Patienten in den wissenschaftlichen Fokus (Fayer et al., 1990; Unbekannt, 1982). Durch eine *in vitro* Kultivierung des Erregers sollten Forschungsarbeiten zur Biologie, Immunologie und den Infektionsmechanismen von *Cryptosporidium* spp. sowie die Austestung potentieller anticryptosporidialer Substanzen ermöglicht werden. In den Bemühungen, eine dauerhafte, reproduzierbare und produktive *in vitro* Kultivierung zu etablieren, wurden seit dem ersten erfolgreichem Kultivierungsversuch von Woodmannsee und Pohlenz im Jahr 1983 nicht nur über 20 verschiedene Zelllinien auf ihre dahingehende Eignung untersucht, sondern weiterhin Optimierungsversuche durch Austestung verschiedener Kultivierungsbedingungen und/oder Mediensupplementierungen unternommen (Gut et al., 1991; Meloni und Thompson, 1996; Upton et al., 1995; Woods und Upton, 2007; Yu et al., 2000).

Viele der untersuchten Zelllinien erwiesen sich für eine Infektion mit *C. parvum* als empfänglich, wenngleich sich in einigen von ihnen nur die asexuelle Entwicklungsphase und nicht der komplette Entwicklungszyklus des Erregers nachvollziehen ließ (Arrowood, 2008; Karanis und Aldeyarbi, 2011; Rochelle und Leon, 2001). Trotz großer Bemühungen bleibt die Möglichkeit, den Entwicklungszyklus des Erregers *in vitro* zu reproduzieren, aber limitiert (Karanis und Aldeyarbi, 2011). Selbst beim Einsatz großer Oocysten-Inocula vollziehen *in vitro* nur wenige der Parasiten die nächsten Entwicklungsstufen und im Falle des Ablaufens

eines kompletten Entwicklungszyklus, ist die Anzahl der neugebildeten Oocysten immer niedriger als die ursprünglich zur Infektion der Zellen eingesetzte Menge (Karanis und Aldeyarbi, 2011; Rochelle und Leon, 2001).

Die Historie der *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* wurde von Arrowood bereits sehr detailliert in einem Review skizziert und ebenso in Form eines Buchkapitels umfangreich beschrieben (Arrowood, 2008; Arrowood, 2002). Auch Karanis und Aldeyarbi fassen in einem Review die bisherigen Erkenntnisse zu den Kultivierungsmöglichkeiten dieses Erregers zusammen, wobei sie ihren Focus primär auf Forschungsarbeiten nach 2002 legen (Karanis und Aldeyarbi, 2011).

2.1.5.1 Enterale Zelllinien

Die erste erfolgreiche *in vitro* Kultivierung von *Cryptosporidium* sp. gelang Woodmansee und Pohlenz im Jahr 1983 (Arrowood, 2008). Nachdem humane Rektumkarzinomzellen ("human rectal tumor", HRT Zellen) mit zunächst aufgereinigten und dann einer Exzystierungsbehandlung unterzogenen Oocysten/Sporozoiteneines bovinen Isolats aus experimentell infizierten Kälber inokuliert wurden, konnten in den folgenden drei Tagen asexuelle aber keinerlei sexuelle Entwicklungsstadien in den Monolayern nachgewiesen werden (Arrowood, 2008). Bonnin et al. gelang 1990 durch Giemsa Färbung und/oder elektronenmikroskopisch der Nachweis asexueller Entwicklungsstadien in von Lewis Ratten stammenden Dünndarmkarzinomzellen ("Lewis rat small intestine carcinoma", LGA Zellen), nachdem selbige sowohl mit einem humanen als auch mit einem bovinen *Cryptosporidium* Isolat infiziert wurden (Arrowood, 2008; Arrowood, 2002). Kuhls et al. nutzten humane embryonale Darmzellen (Intestine 407) zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kohlenhydrat- und Lektinzusätze im Kultivierungsmedium auf die Adhäsions- und Invasionsprozesse von Sporozoiteneines bovinen *C. parvum* Isolat (IOWA) und die über einen Zeitraum von 12 bis 18 h p.i. erhobenen Daten zeigten eine deutliche Beeinflussung der Anzahl ausgebildeter asexueller Entwicklungsstadien (Meronten) durch einige der verwendeten Zusätze (Kuhls et al., 1991). Flanigan et al. (1991) untersuchten vergleichend differenzierte und undifferenzierte humane Kolonadenokarzinomzellen (HT29.74 Zellen) auf ihre Eignung, das Wachstum von *C. parvum* zu unterstützen. Bei der HT29.74 Zelllinie handelt es sich um einen Subklon der HT29 Zelllinie, welche einem humanen Kolonkarzinom entstammt. Beide Zelllinien differenzieren bei glukosefreier Kultivierung sowohl morphologisch als auch funktionell zu Dünndarmepithelzellen ähnlichen Zellen, was sich unter anderem in der Ausbildung von "tight junctions" und einem Mikrovillisaum incl. damit assoziierter Proteine und Enzyme bemerkbar macht (Zweibaum et al., 1985). Die Infektionsraten der untersuchten Zellen wurden lichtmikroskopisch quantifiziert und das Vorhandensein intrazellulärer asexueller Entwicklungsstadien elektronenmikroskopisch bestätigt (Flanigan et al., 1991). Zum

Zeitpunkt 24 Stunden p.i. konnten neben Trophozoiten auch (un)reife und teilweise rupturierte Meronten (acht Merozoiten beinhaltend) nachgewiesen werden, was auf das Ablaufen einer asexuellen Entwicklung hinweist. Der Nachweis einer sexuellen Vermehrung konnte nicht erbracht werden. Im Vergleich erwiesen sich die differenzierten HT29.74 Zellen als fünfmal effizienter zu infizieren, als die undifferenzierten (Flanigan et al., 1991). Entgegen der Ergebnisse von Flanigan et al. (1991) konnten Maillot et al. nach einer erfolgreichen Infektion von HT29 Zellen mit *C. parvum* Oocysten/Sporozoiten auch sexuelle Entwicklungsstadien des Erregers im undifferenzierten HT29 Zellmonolayer nachweisen (Maillot et al., 1997). Adams et al. (1994) nutzen polarisierte humane Kolonkarzinomzellen (T84 Zellen) zur Untersuchung der pathophysiologischen Prozesse und Veränderungen an der Wirtszellmembran in Folge einer *C. parvum* Infektion. Im Anschluss an eine Infektion mit Oocysten eines bovinen Isolats konnten dicht unterhalb der apikalen Zellmembran verschiedene Erregerentwicklungsstadien (Trophozoiten, Meronten) nachgewiesen werden, deren Vorhandensein sowohl zeit- als auch von der Menge der applizierten Oocysten abhängig die Barrierefunktion der Wirtszellmembran herabsetzte (Adams et al., 1994).

Bei den bei weitem am häufigsten verwendeten enteralen Zelllinien zur *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* handelt es sich um humane Kolonadenokarzinomzellen (Caco-2 Zellen) und um humane ileocaecale Adenokarzinomzellen (HCT-8 Zellen).

Die erste erfolgreiche Erregerkultivierung eines humanen *Cryptosporidium* Isolats in Caco-2 Zellen gelang Datry et al. (1989) bereits in den späten 80er Jahren (Arrowood, 2008). Obgleich eine klare Identifizierung asexueller und sexueller Entwicklungsstadien nach einer Infektion der Monolayer mit aufgereinigten Sporozoiten nicht erfolgte, konnten doch eindeutig neugebildete Oocysten in den Zellkulturen nachgewiesen werden; ein Hinweis auf den Ablauf eines vollständigen Entwicklungszyklus des Parasiten (Arrowood, 2008). Buraud et al. bestätigten zwei Jahre später die Ergebnisse von Datry et al. (1989), indem ihnen licht- und elektronenmikroskopisch eine definitive Identifizierung der verschiedenen geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Entwicklungsstadien gelang (Buraud et al., 1991). In einer umfangreichen Studie untersuchten Upton et al. vergleichend elf verschiedene Zelllinien auf ihre Eignung, die Entwicklung eines bovinen *C. parvum* Isolats zu unterstützen (Upton et al., 1994a). Zu den untersuchten Zelllinien, die alle epithelähnliche Charakteristika, einen Mikrovillisaum und/oder eine Muzin-Produktion aufwiesen, gehörten neben den als Referenz dienenden bovinen Nierenzellen ("Madin-Darby bovine kidney", MDBK Zellen) auch canine Nierenzellen ("Madin-Darby canine kidney", MDCK Zellen), HT29, HCT-8 und Caco-2 Zellen. Als maßgebliches Kriterium wurde bei der Auswertung der Versuche die Anzahl an Parasitenstadien im untersuchten Monolayer herangezogen, ohne dass dabei eine Differenzierung der Entwicklungsstadien vorgenommen wurde. Hierbei zeigte sich, dass MDCK und Caco-2 Zellen das cryptosporidiale Wachstum in gleichem Maße wie die

Referenzzelllinie unterstützen, die HCT-8 Zellen aber den MDBK Zellen deutlich überlegen waren; selbst bei verschiedenen zur Infektion eingesetzten Oocystenkonzentrationen (Upton et al., 1994a). Folglich postulierten Upton et al. HCT-8 Zellen als die am besten geeignete Wirtszelllinie für *C. parvum* unter den Kultivierungsbedingungen der durchgeführten Studie (Upton et al., 1994a). Hingegen zeigte eine vergleichende Studie von Maillot et al. keine signifikanten Unterschiede zwischen HCT-8 und Caco-2 Zellen in Bezug auf ihre Empfänglichkeit für eine Infektion mit *C. parvum* (Maillot et al., 1997). Auch die HT29 Zellen, welche sich in der Studie von Upton et al. (1994a) als deutlich unterlegen gegenüber der Referenzzelllinie und somit auch gegenüber den HCT-8 und Caco-2 Zellen darstellten, unterstützten laut Maillot et al. die Erregerentwicklung in gleichem Maße, wie die anderen untersuchten Zelllinien (Maillot et al., 1997). Im Gegensatz zu Maillot et al. (1997) bestätigten Meloni und Thompson die Überlegenheit der HCT-8 Zellen gegenüber den Caco-2, MDCK und HT29 Zellen und konnten durch eine Modifikation des von Upton et al. (1995) verwendeten Kultivierungsmediums (siehe Kapitel 2.1.5.4) das Wachstum von *C. parvum* in HCT-8 Zellen sogar noch weiter steigern (Meloni und Thompson, 1996). Anzumerken bleibt, dass die weitere Modifikation des Mediums zwar eine Erhöhung der endogenen Entwicklungsstadien des Erregers im HCT-8 Monolayer bedingte, aber nicht in der Komplettierung des vollständigen Entwicklungszyklus resultierte. Obgleich Gamonten in den Zellkulturen nachgewiesen wurden, konnten keinerlei Oocysten identifiziert werden (Meloni und Thompson, 1996); ein Ergebnis, das die Autoren als deckungsgleich mit den Ergebnissen von Upton et al. (1995) erachteten, welche von einer limitierten Oocystenreubildung in HCT-8 Zellen berichteten (Meloni und Thompson, 1996).

2.1.5.2 Zelllinien nicht-enteralen Ursprungs

Neben Zelllinien enteralen Ursprungs wurden ebenfalls Zellen anderer Gewebeherkunft auf ihre Eignung untersucht, das Wachstum von *C. parvum* zu unterstützen. Obgleich selbige nicht den primären Besiedelungsort des Erregers und somit nicht die physiologischen Bedingungen widerspiegeln, ließ sich der Erreger in verschiedenen extraintestinalen Geweben erfolgreich kultivieren.

Im Jahr 1983, demselben Jahr, in dem Woodmansee und Pohlenz erstmals die erfolgreiche *in vitro* Kultivierung von *Cryptosporidium* sp. in HRT Zellen gelang, berichteten auch Current und Long von einer erfolgreichen Kultivierung von *Cryptosporidium* spp. in Endodermzellen der Chorioallantoismembran (CAM) embryonierter Hühnereier, nachdem selbige mit einem humanen oder einem bovinen Isolat infiziert wurden (Current und Long, 1983; Woodmansee und Pohlenz, 1983). Die verwendeten Erreger-Isolate waren bei dieser Form der Anzucht in ihren Entwicklungsstadien morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden und durchliefen beide den kompletten Entwicklungszyklus bis hin zur Formierung infektiöser

Oocysten (Current und Long, 1983). Die Ergebnisse dieser Studie konnten allerdings in keiner unabhängigen Studie vollständig reproduziert werden (Arrowood, 2008).

Als Schlussfolgerung einer Tierversuchsstudie konstatierten Liebler et al. die Möglichkeit einer potentiellen Besiedelung des Fortpflanzungstraktes durch *Cryptosporidium* sp. (Lieber et al., 1986). Nach experimenteller Infektion von weiblichen, adulten BALB/c Mäusen mit einem bovinen Erreger-Isolat konnten sie bei 50 % der Tiere eine Besiedelung der Uterusmukosa und das Ablaufen des kompletten Erregerzyklus incl. Oocystenformierung und Oocystenausscheidung nachweisen (Lieber et al., 1986). Datry et al. (1989) gelang nicht nur in Caco-2 Zellen eine erfolgreiche Erregerkultivierung (siehe Kapitel 2.1.5.1), sondern auch in primären Rattenhepatozyten (Arrowood, 2008). Nach einer Infektion des Monolayers mit Sporozoiten konnten sie in den Hepatozyten sämtliche Entwicklungsstadien einschließlich neu gebildeter Oocysten klar identifizieren (Arrowood, 2008). Angeregt durch eine Publikation von Current und Haynes (1984) unternahmen McDonald et al. den Versuch, die *in vitro* Kultivierung speziell an *C. parvum* zu adaptieren, um im Anschluss den Effekt 20 bekannter antimikrobieller Substanzen auf die Entwicklung dieses Erregers *in vitro* zu untersuchen (McDonald et al., 1990). In den als Wirtszellen verwendeten murinen Fibroblasten (L929) konnten sowohl asexuelle, als auch sexuelle Entwicklungsstadien nachgewiesen werden, wobei erstgenannte deutlich überwogen. Martinez et al. konnten 1992 den Beweis erbringen, dass der Parasit auch in murinen peritonealen Makrophagen seinen kompletten Entwicklungszyklus durchläuft (Martinez et al., 1992). Sämtliche Entwicklungsstadien incl. reifer Oocysten konnten in den Makrophagen nachgewiesen werden, zum Teil wurden auch Mehrfachinvasionen einer Zelle beobachtet (Martinez et al., 1992). Bei dem Versuch, diese Erkenntnisse auch auf murine alveoläre Makrophagen zu übertragen, erwiesen sich diese Zellen jedoch als weniger geeignet (Martinez et al., 1997). Eventuell durch die Entdeckung von Liebler et al. (1986) inspiriert untersuchten Rasmussen et al. die Eignung einer humanen Endometriumkarzinomzelllinie (RL95-2), das Wachstum von *C. parvum* zu unterstützen (Rasmussen et al., 1993). Im Anschluss an eine Infektion der Monolayer mittels einer aufgereinigten Sporozoitensuspension eines *C. parvum* Isolats (IOWA) konnten Rasmussen et al. licht- und elektronenmikroskopisch Meronten, Gamonten und Oocysten darstellen (Rasmussen et al., 1993). Yang et al. nutzen ebenfalls erfolgreich Zellen des Fortpflanzungstraktes zur *in vitro* Kultivierung von *C. parvum*, allerdings handelte es sich dabei um primäre bovine Eileiterepithelzellen ("bovine fallopian tube epithelial", BFTE Zellen) (Yang et al., 1996). Unabhängig von dem verwendeten infektiösen Agens (Sporozoiten/Oocysten) resultierte eine Infektion der Zellen in dem Ablaufen des kompletten Erregerzyklus, vom Sporozoiten bis zur matura Oocyste, deren Infektiosität zusätzlich in einem immunsupprimierten Mausmodell bestätigt wurde. Die parallel untersuchten MDCK Zellen unterlagen den bovinen Eileiterepithelzellen in der Anzahl der sich entwickelnden

Parasitenstadien, auch wenn das Entwicklungsmuster des Erregers in beiden Zelllinien ähnlich war (Yang et al., 1996). Auch Healey et al. nutzten BFTE Zellen zur *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* (Healey et al., 1997). Ihr Versuch, die primären Zellkulturen via Transfektion zu immortalisieren, resultierte in einem reduzierten Zellwachstum und einer herabgesetzten Infektionsempfänglichkeit für den Parasiten (Healey et al., 1997). Verdon et al. versuchten, ein *in vitro* Modell der biliären Cryptosporidiose zu etablieren, um eine Möglichkeit zu schaffen, die diesbezüglichen Infektionsmechanismen zu untersuchen und potentielle Wirkstoffe zur Behandlung einer solchen extraintestinalen Manifestation zu überprüfen (Verdon et al., 1997). Alle drei untersuchten humanen intrahepatischen Gallengangsepithelzelllinien (H59, H69, H75) erwiesen sich für eine Infektion mit *C. parvum* (GCH1 Isolat) als empfänglich, wobei sich die Zelllinie H69 als die am besten geeignete herausstellte. In den Zellkulturen ließen sich zwar Trophozoiten, Meronten und Gamonten, nachweisen, allerdings konnten keine Beweise für eine Oocystenreuebildung und somit für das Ablaufen des kompletten Erregerzyklus erbracht werden (Verdon et al., 1997). Der Nachweis einer vollständig ablaufenden Entwicklung bis hin zur Formierung maturer und infektiöser Oocysten konnte für eine mit einem bovinen Isolat (VC1) infizierte primäre leporine Chondrozytenkultur (VELI Zellen) erbracht werden (Lacharme et al., 2004). Die Infektiosität der neu gebildeten Oocysten wurde anhand eines Nagermodells bestätigt (Lacharme et al., 2004).

Besonders häufig wurden Nierenzelllinien zur Etablierung eines *in vitro* Kultivierungsmodells von *C. parvum* herangezogen. Bereits 1984 veröffentlichten Current und Haynes eine Publikation, in der sie von einer erfolgreichen *in vitro* Kultivierung eines humanen *Cryptosporidium* Isolats sowohl in humanen fetalen Lungenzellen ("human fetal lung", HFL Zellen) als auch in primären Hühnernierenzellen ("primary chicken kidney", PCK Zellen) und Schweinenierenzellen ("porcine kidney", PK-10 Zellen) berichteten (Current und Haynes, 1984). Bei dem verwendeten *Cryptosporidium* Isolat handelte es sich vermutlich um *C. parvum*, denn wenngleich es humanen Ursprungs war, so konnten die isolierten Oocysten doch erfolgreich in Ziegen passagiert werden, was aufgrund von dessen anthroponotischem Charakter gegen *C. hominis* spricht (Arrowood, 2008). In den drei untersuchten Zelllinien konnten sämtliche Entwicklungsstadien vom Sporozoiten bis hin zur maturen Oocyste (mit Ausnahme dünnwandiger Oocysten) nachgewiesen werden, wobei die Anzahl der Entwicklungsstadien in den HFL Zellen im Vergleich zu den untersuchten Nierenzelllinien größer war (Current und Haynes, 1984). Deng und Cliver verwendeten eine kontinuierliche Nierenzelllinie einer äthiopische Grünen Meerkatze (BS-C-1 Zellen) zur *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* (Deng und Cliver, 1998). Diese Zelllinie erwies sich als voll empfänglich und es ließen sich sämtliche Erregerentwicklungsstadien in den Monolayern nachweisen. Fünf Stunden p.i. konnten intrazellulär (in Kernnähe) die ersten Parasitenstadien beobachtet

werden, deren totale Anzahl 48 Stunden p.i. ihren Höhepunkt erreichte. Das Maximum der Anzahl neugebildeter Oocysten wurde 72 Stunden p.i. registriert; zeitgleich begann die totale Parasitenanzahl abzunehmen. Im Vergleich mit einer Oocysten-induzierten Infektion (Vorbehandlung der Oocysten mit Natriumhypochlorit) resultierte eine Infektion mit einer aufgereinigten Sporozoitensuspension in einer reduzierten Anzahl der Erregerstadien und der neugebildeten Oocysten (Deng und Cliver, 1998).

Als besonders geeignet zur Kultivierung von *C. parvum* erwiesen sich MDBK und MDCK Zellen, welche sich laut Upton et al. (1994a) zur Erregerkultivierung in gleichem Maße eignen wie Caco-2 Zellen, den HCT-8 Zellen aber in dieser Hinsicht unterlegen seien (Kapitel 2.1.5.1). Schon Lumb et al. (1988) nutzten zum Studium der in den ersten Stufen der Sporozoitenanheftung an die Wirtszelle auftauchenden ultrastrukturellen Veränderungen MDCK Zellen, beschränkten sich aber dem Studienziel entsprechend auf die Beschreibung der ersten (asexuellen) Entwicklungsstadien. Im Jahr 1991 veröffentlichten Gut et al. die Ergebnisse einer *in vitro* Kultivierungsstudie, in deren Verlauf sie sämtliche Entwicklungsstadien von *C. parvum* sowohl in MDCK als auch in MDBK Zellen nachweisen konnten, nachdem selbige mit einem bovinen Erregerisolat infiziert wurden (Gut et al., 1991). Rosales et al. bestätigten zwei Jahre später diese Erkenntnisse für MDCK Zellen und ergänzten selbige noch um den Nachweis maturer Oocysten 48 Stunden p.i. (Rosales et al., 1993). Zur Evaluierung potentieller anticyptosporidialer Effekte von Wirkstoffen kamen MDCK Zellen beispielsweise in Studien von Arrowood et al. (1996; 1994) und You et al. (1996a, b) zum Einsatz.

Auftretende Komplikationen bei der Erregerkultivierung in einer adhärent wachsenden Zelllinie, wie beispielsweise die Überwucherung der Monolayer oder das Ablösen der Zellen im Anschluss an eine Infektion, versuchten Lawton et al. (1996; 1997) mittels einer Suspensionskultur zu umgehen. Die verwendete humane myelomonozytische Zelllinie THP-1 erwies sich für *C. parvum* als voll empfänglich. In histologisch angefärbten Ausstrichen ließen sich sowohl Trophoziten und Meronten als auch Makro- und Mikrogamonten bis hin zu maturen Oocysten nachweisen. Neben der klassischen intrazellulären aber extrazytoplasmatischen Erregerlokalisierung konnten verschiedene Entwicklungsstadien auch direkt im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden. Viele Wirtszellen wiesen Mehrfachinfektionen auf (bis zu 24 Parasiten in einer Zelle). Entgegen der Hoffnung einer möglichen Langzeitkultivierung konnte eine erfolgreiche Subkultivierung nicht erreicht werden (Lawton et al., 1996; Lawton et al., 1997). Der Versuch, die Infektion dieses Kultivierungsmodells durch eine gemeinsame Zentrifugation der Zell- und Oocystensuspension auf Percoll zu optimieren, bedingte zwar nur eine Infektionsrate von ca. 4,5 % der gesamten Zellen, ermöglichte aber eine deutliche Verkürzung der Inkubationszeit der Oocysten von vormals vier bis 16 Stunden auf 1,5 Stunden (Lawton et al., 2001). Das

optimierte THP-1 Zellmodell wurde in einer späteren Studie zur Evaluierung eines potentiellen anticryptosporidialen Effekts von Dideoxyinosin erfolgreich eingesetzt (Lawton et al., 1999).

2.1.5.3 Zellfreie Kultivierung

Im Jahr 2004 berichteten Hijjawi et al. erstmals von einer gelungenen zellfreien Kultivierung des Parasiten *C. parvum* (Hijjawi et al., 2004), was die bisherige Anschauung dieses Parasiten als obligat intrazellulär in Frage stellte. Die in der Studie verwendeten aufgereinigten Oocysten des in Mäusen passagierten Erregers vom Genotyp II (Swiss cattle C26) wurden für 20 min einem Exzystierungsmedium ausgesetzt, bevor sie in ein mono- oder diphasisches Medium überführt wurden. Als "maintenance medium" fungierte hierbei RPMI 1640 Medium, welches auf 100 ml gerechnet mit 0,03 g L-Glutamin, 0,3 g Natriumbikarbonat, 0,02 g Rindergalle, 0,1 g Glukose, 25 µg Folsäure, 100 µg para-Aminobenzoessäure, 50 µg Kalziumpantothenat, 875 µg Ascorbinsäure, 1 % fötalem Kälberserum, 0,36 g HEPES, 10.000 U Penicillin G, 0,01 g Streptomycin versetzt und anschließend auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde.

Ein diphasisches Medium wurde erreicht, indem Serum vom neugeborenen Kalb mit Hilfe eines auf 70-80 °C temperierten Wasserbades innerhalb der verwendeten Zellkulturflaschen inkubiert wurde, bis es eine gelartige Konsistenz erlangte. Anschließend wurde es mit dem "maintenance medium" überschichtet. In beiden Medien konnten über den gesamten Studienzeitraum von vier Monaten sämtliche bis dato bekannten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden, wobei die totale Anzahl der Entwicklungsstadien im diphasischen Medium höher lag und auch nur in diesem Medium "gamont-like" Stadien nachgewiesen werden konnten. Die Infektiösität der während der zellfreien Kultivierung neu gebildeten Oocysten wurde in einem Tierversuch mit sieben bis acht Tage alten ARC/Swiss Mäusen bestätigt (Hijjawi et al., 2004). Bemühungen von Girourad et al. (2006), die von Hijjawi et al. (2004) gemachten Entdeckungen auf weitere *C. parvum* Stämme (Moredun (MD), IOWA) und auf einen *C. hominis* Stamm (TU502) zu übertragen, blieben trotz exakter Einhaltung der von Hijjawi et al. beschriebenen Arbeitsanweisungen erfolglos. In den zellfreien Kulturen konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt via mikroskopischer Untersuchung von Tropfpräparaten, indirekter Immunfluoreszenzverfahren oder Elektronenmikroskopie andere Entwicklungsstadien als Oocysten, Oocystenfragmente, leere Oocystenhüllen und einige motile Sporozoitien nachgewiesen werden (Girouard et al., 2006). Zusätzlich wurden die zellfreien Kulturen während des Versuchs anhand einer PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Methode mit positivem Befund auf cryptosporidiale DNA untersucht; ein Ergebnis, das den Autoren zufolge wahrscheinlich den toten Sporozoitien oder Oocysten geschuldet ist. Die Infektiösität der zellfreien Kulturen wurde von Girouard et al. sowohl *in vitro* mittels MDBK Zellen als auch *in vivo* anhand zweier

Nagermodelle überprüft. In keinem der Modelle konnten Parasitenstadien nachgewiesen werden, die eine Infektion durch die zellfreien *C. parvum* und *C. hominis* Kulturen bestätigten (Girouard et al., 2006). Girouard et al. (2006) äußern Unsicherheit in Bezug auf die Interpretation der von Hijjawi et al. (2004) gemachten Beobachtungen, da diese keine genetischen, antigen-spezifischen oder ultrastrukturellen Beweise für die Präsenz des Parasiten liefern, räumen aber ein, dass, sollten die Beobachtungen alle korrekt sein, es sich bei der zellfreien *Cryptosporidium* spp. Kultivierung nicht um ein universelles Phänomen handelt und dass diese Kultivierungsform in der Durchführung keinesfalls einfach sei. Woods und Upton (2007) ziehen eine mögliche Missinterpretation der von Hijjawi et al. (2004) veröffentlichten Mikrofotografien in Betracht. Bei einigen Abbildungen vermeintlicher Entwicklungsstadien von *C. parvum* handle es sich wahrscheinlicher um im Medium enthaltenden Debris, knospende Hefen und Pilzkonidien (Woods und Upton, 2007); eine These, die in Anbetracht eines fehlenden Antimykotikum-Zusatzes im verwendeten "maintenance medium" nicht per se entkräftet werden kann. Auch Karanis et al. (2008) versuchten anhand der Angaben von Hijjawi et al. (2004) eine dauerhafte zellfreie Kultivierung eines *C. parvum* Isolates (HNJ-1 Stamm, Genotyp II) zu etablieren, konnten diese Art der Kultivierung aber nur 48 Stunden aufrechterhalten. Sowohl Hijjawi et al. (2004) als auch Karanis et al. (2008) beschrieben unter anderem ein motiles, rundes bis spindelförmiges Parasitenstadium, welches im monophasischen Medium beobachtet werden konnte. Hijjawi et al. (2004) identifizierten selbiges Entwicklungsstadium, welches sie nach 24-stündiger Inkubation entdeckten, als Trophozoiten, wohingegen Karanis et al. (2008) es als Merozoiten ansprachen, die neben Sporozoiten direkt aus den Oocysten freigesetzt wurden (Petry et al., 2009). Petry et al. (2009) ziehen hinsichtlich der Natur dieses Parasitenstadiums entsprechend ihrer eigenen Studien in Erwägung, dass es sich hierbei eher um gealterte Sporozoiten, als um ein aus der zellfreien Kultivierung resultierendes extrazelluläres Entwicklungsstadium handelt. Dieser These setzen Karanis und Aldeyarbi (2011) entgegen, dass Petry et al. (2009) ihrerseits die von ihnen (Karanis et al., 2008) und Hijjawi et al. (2004) beschriebenen ovalen und bohnenförmigen Zellen missinterpretiert und daraus resultierend falsche Schlüsse gezogen haben könnten (Karanis und Aldeyarbi, 2011). Boxwell et al. (2008) konnten das von ihren Arbeitsgruppenmitgliedern Hijjawi et al. (2004) beschriebene zellfreie Kultivierungssystem für ihre eigenen Forschungsarbeiten erfolgreich nutzen. In einer Studie verglichen sie verschiedene Methoden zur Visualisierung von cryptosporidialen Entwicklungsstadien im Rahmen einer zellfreien Kultivierung. Hierfür verwendeten sie dasselbe *C. parvum* Isolat wie zuvor Hijjawi et al. (2004) (Boxwell et al., 2008). Im Jahr 2009 untersuchten Zhang et al. via quantitativer PCR (qPCR) die Proliferation von *C. parvum* in zellfreien Kulturen. Über eine Zeitpanne von fünf Tagen konnte ein DNA Anstieg um das Fünffache nachgewiesen werden, was einer moderaten Proliferation von

C. parvum entspricht. Mittels Immunfluoreszenzverfahren zur Visualisierung der verschiedenen Entwicklungsstadien konnte ebenfalls eine Proliferation des Erregers im zellfreien Medium bestätigt werden (Zhang et al., 2009). Auch wenn Hijjawi (2010) einräumt, dass den erfolglosen zellfreien *C. parvum* Kultivierungsversuchen von Girouard et al. (2006) und Karanis et al. (2008) eventuell einige Diskrepanzen und unklare Erklärungen zugrunde liegen, so bleibt die Möglichkeit dieser Kultivierungsform umstritten (Müller und Hemphill, 2013).

2.1.5.4 Mediumzusätze

Im Rahmen der Bemühungen ein reproduzierbares, produktives und kontinuierliches *in vitro* Kultivierungsmodell für *C. parvum* zu etablieren, wurden verschiedenste Substanzen in Form von Mediumzusätzen auf potentiell die Erregerentwicklung fördernde Effekte untersucht.

Gut et al. (1991) erzielten durch die Verwendung eines Kulturmediums bestehend aus einem serumhaltigen (1 % fötales bovines Serum (FBS)) RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (2 mM), welches zusätzlich mit Natriumhydrogenkarbonat (2,5 g/L), HEPES (25 mM), Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), nichtessentiellen Aminosäuren, Insulin (0,24 U/ml), Hypoxanthin (13,6 mg/L), Thymidin (2,9 mg/L), Mercaptoethanol (50 µM), Hefextrakt (0,1 %), Ficoll 400 (1 %), Glukose (4,5 g/L) und Kaninchengalle (0,1 %) angereichert wurde, in bis zu 90 % der verwendeten MDCK Zellen eine Infektion mit *C. parvum*. Nachdem Upton et al. in einem Vergleich mit zehn anderen Zelllinien HCT-8 Zellen als die am besten geeignetste Zelllinie für die *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* herausstellten (Upton et al., 1994a), untersuchten sie in einer Folgestudie anhand 25 ausgesuchter Mediumzusätze, ob und in wieweit diese die Entwicklung von *C. parvum* in HCT-8 Zellen zusätzlich verstärken (Upton et al., 1995). Als Referenz-Wachstumsmedium wurde RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin verwendet, welches mit 15 mM HEPES, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B supplementiert wurde (pH-Wert 7,4). Das entsprechend ihren Untersuchungen modifizierte finale Wachstumsmedium mit den weiteren Zusätzen in Form von 50 mM Glukose, 35 µg/ml Ascorbinsäure, 1 µg/ml Folsäure, 4 µg/ml para-Aminobenzoesäure, 2 µg/ml Kalziumpanthothenat und 0,1 U/ml Insulin bewirkte einen ca. zehnfachen Anstieg der totalen Anzahl an Parasitenentwicklungsstadien im Vergleich mit dem Referenz-Wachstumsmedium; auch konnten bei einer Verlängerung der Kultivierungsdauer neben Makro- und Mikrogamonten einige wenige neugebildete Oocysten in der Zellkultur nachgewiesen werden (Upton et al., 1995). Meloni und Thompson (1996) hingegen erzielten in einem Entwicklungsassay verbessertes *C. parvum* Wachstum in HCT-8 Zellen, indem sie RPMI 1640 Medium verwendeten, welches im Vergleich mit dem von Upton et al. (1995) optimierten Wachstumsmedium deutlich geringere Konzentrationen an Glukose (5,5 mM anstelle von 50 mM), Folsäure (0,25 µg/ml anstelle von 1 µg/ml), para-Aminobenzoesäure

(1 µg/ml anstelle von 4 µg/ml), Kalziumpantothenat (0,5 µg/ml anstelle von 2 µg/ml), Ascorbinsäure (8,75 µg/ml anstelle von 35 µg/ml) und FBS (1 % anstelle von 10 %) enthielt. Zudem wurde anstelle von HEPES Natriumhydrogenkarbonat (3 mg/ml) als Puffer verwendet und das Insulin durch Rindergalle (0,2 mg/ml) ersetzt (Meloni und Thompson, 1996). Entgegen Upton et al. (1995) belegten Melonis und Thompsons Forschungsergebnisse, dass ein FBS Zusatz von mehr als 2 % das Wachstum von *C. parvum* reduzierte und zudem die Visualisierung der endogenen Entwicklungsstadien in Folge forcierter Zellüberwucherung erschwerte (Meloni und Thompson, 1996). Im Gegensatz zu den Studien von Gut et al. (1991) führe ein gänzlicher Wegfall des Serumzusatzes im Vergleich zur Erregerkultivierung mit Serumzugabe sogar zu einer Erhöhung der Parasitenanzahl, allerdings mit dem Nachteil einer Verschlechterung des HCT-8 Zellwachstums behaftet; ein Umstand, den die Autoren mit einem Zusatz von 1 % FBS zu reduzieren suchten. Yu et al. stellten in einer Studie nicht nur heraus, dass unter den insgesamt vier untersuchten Zelllinien (humane Magenadenokarzinomzellen (AGS), MDCK, HCT-8, Caco-2), AGS Zellen zur Kultivierung von *C. parvum* am besten geeignet seien, sondern sie überprüften zudem sieben Mediumsupplemente (FBS, Pyruvat, Ascorbinsäure, Folsäure, para-Aminobenzoesäure, Kalziumpantothenat, Natriumcholat) in verschiedenen Konzentrationen auf einen möglichen die Erregerentwicklung fördernden Effekt in der jeweiligen Zelllinie (Yu et al., 2000). Die eruierte optimale Serumkonzentration variierte in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie. Bei den AGS- und HCT-8 Zellen betrug die FBS Konzentration mit dem besten Effekt 10 %, die für die MDCK Zellen belief sich auf 1 %. Auch für die anderen Mediumsupplemente, mit Ausnahme von Folsäure (gar kein Effekt), konnte nicht einheitlich, sondern nur zelllinienspezifisch, eine fördernde Wirkung nachgewiesen werden. Im Unterschied zu Upton et al. (1995) und Meloni und Thompson (1996) konnten für Ascorbinsäure, Folsäure, para-Aminobenzoesäure und Kalziumpantothenat keine entwicklungsfördernden Effekte bei der Anzucht von *C. parvum* in HCT-8 Zellen nachgewiesen, wohl aber der von Meloni und Thompson (1996) postulierte positive Effekt von Gallensalzen bestätigt werden. Ein weiterer positiver Effekt auf die Anzucht in HCT-8 Zellen wird entgegen den Ergebnissen von Upton et al. (1995) dem Supplement Pyruvat zugesprochen (Yu et al., 2000). Upton et al. erklärten seinerzeit die effektlose Pyruvatsupplementierung mit dem Unvermögen des Erregers, dieses Zwischenprodukt in Folge fehlender Mitochondrien als Energiequelle nutzen zu können (Upton et al., 1995). Yu et al. versuchen, ihre diesbezüglich gegenläufigen Ergebnisse teilweise mit der Verwendung eines anderen *C. parvum* Stammes zu erklären (Yu et al., 2000). Um die Variabilität der vorhandenen *in vitro* Systeme zur Kultivierung von *C. parvum* weiter einzuschränken, untersuchten Woods und Upton zwölf kommerziell erhältliche serumfreie Medien auf ihre Eignung, das Wachstum von *C. parvum* in HCT-8 Zellen zu unterstützen (Woods und Upton, 2007). Ziel war es, die Variable FBS bei der *in*

in vitro Kultivierung eliminieren zu können, da bei dieser Komponente Qualität und Zusammensetzung je nach Charge und Anbieter unterschiedlich sein können. Als Referenz diente ein serumhaltiges (2 % FBS) Standard-Wachstumsmedium, eine modifizierte Form (keine Insulinzugabe) des 1995 von Upton et al. veröffentlichten optimierten Wachstumsmediums (Upton et al., 1995; Woods et al., 1995). Bei dieser Studie zeigte sich, dass ca. die Hälfte der getesteten serumfreien Medien das Wachstum von *C. parvum* in HCT-8 Zellen in demselben Maße unterstützen wie das Standard-Wachstumsmedium; vier der getesteten Medien (MDCK, PC-1, UltraCulture, UltraDOMA) bewirkten sogar eine signifikante Erhöhung der *C. parvum* Entwicklung im Vergleich zum Standard-Wachstumsmedium ($P < 0,05$), nachdem auch diese mit 50 mM Glukose, 35 µg/ml Ascorbinsäure, 1 µg/ml Folsäure, 4 µg/ml para-Aminobenzoessäure und 2 µg/ml Kalziumpanthothenat supplementiert wurden. Allerdings resultierte die verstärkte *C. parvum* Entwicklung in keinem der vier genannten Medien in einer Oocystenformierung (Woods und Upton, 2007). Des Weiteren bestätigten die Autoren Melonis und Thompsons (1996) Beobachtungen, dass sich ansteigende FBS Konzentrationen im Wachstumsmedium von bis zu 10 % inhibierend auf die Entwicklung von *C. parvum* auswirken (Woods und Upton, 2007). Trotz aller Bemühungen ein optimales (zelllinienspezifisches) Wachstumsmedium zur *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* zu kreieren, konnte durch die Forschungen auf diesem Bereich bis dato zwar die Infektionsrate verbessert, aber keine dauerhafte und produktive Erregerkultivierung erreicht werden.

2.2 Cryptosporidiose

2.2.1 Klinik der humanen Cryptosporidiose

Der klinische Verlauf einer Cryptosporidiose ist stark abhängig vom Alter und dem Immunstatus des jeweiligen Patienten (Chen et al., 2002; Current und Garcia, 1991; Farthing, 2000; Tzipori, 1988). Bei immunkompetenten Personen folgt auf eine Inkubationszeit von ca. fünf bis 21 Tagen eine akute, selbstlimitierende Durchfallerkrankung, welche in der Regel ca. drei bis 12 Tage andauert. Das Hauptsymptom der mittleren bis starken, profusen, wässrigen bis katarrhalischen Diarrhoe wird häufig von abdominalen Krämpfen, Nausea, Vomitus, Inappetenz und Müdigkeit begleitet. Allerdings sind auch asymptomatische Verlaufsformen möglich (Current und Garcia, 1991; Farthing, 2000; Fayer und Ungar, 1986).

Im Gegensatz zum selbstlimitierenden Krankheitsgeschehen bei immunkompetenten Patienten kann sich die Cryptosporidiose bei immundefizienten Personen zu einer chronischen und lebensbedrohlichen Erkrankung entwickeln (Farthing, 2000). Besonders betroffen sind Menschen, deren T-Zell Funktion in Folge eines genetischen Immundefektes (z.B. Hyper-IgM-Syndrom) beeinträchtigt oder deren Anzahl an CD4-Lymphozyten durch erworbene Ursachen (z.B. HIV-Infektion, immunsuppressive Therapie nach

Organtransplantation) stark reduziert ist (Hunter und Nichols, 2002); die Anzahl der CD4⁺ Zellen scheint maßgeblich für den Schweregrad der Erkrankung zu sein (Blanshard et al., 1992; Cabada und White, 2010; Colford et al., 1996; Navin et al., 1999). Bei diesem Personenkreis können auch extraintestinale Formen der Cryptosporidiose auftreten; so wurden beispielsweise bei HIV/AIDS-Patienten Cryptosporidien im Gallengangssystem und im Respirationstrakt nachgewiesen (Lopez-Velez et al., 1995). Die Besiedelung des letztgenannten Organsystems muss nicht mit klinischen Beschwerden assoziiert sein (Hunter und Nichols, 2002). Auch bei Patienten, die an (primären) schweren kombinierten Immundefekten leiden, welche eine Insuffizienz der zellvermittelten Immunität zur Folge haben, treten extraintestinale Formen unter anderem in den Bronchiolen und dem Ductus pancreaticus auf (Kocoshis et al., 1984).

Die Frage, in wieweit *C. parvum* auch an der Genese von tumorösen Geschehnissen beteiligt sein könnte, wird zur Zeit von einigen Arbeitsgruppen intensiv untersucht. In einem Nagermodell konnte bereits für zwei *C. parvum* Stämme tierischen Ursprungs (IOWA und TUM1) ein karzinogenes Potential nachgewiesen werden. Dexamethason-behandelte SCID ("severe combined immunodeficiency") Mäuse entwickelten in der Folge einer experimentellen Infektion Neoplasien mit invasivem Charakter im Gastrointestinaltrakt (Certad et al., 2010a; Certad et al., 2010b; Certad et al., 2007). Kürzlich konnte dieser Nachweis auch für einen Stamm humanen Ursprungs (IIaA15G2R1 Genotyp) erbracht werden, wobei bei diesem Stamm zusätzlich die Induktion eines Gallengangkarzinoms beobachtet werden konnte (Certad et al., 2012).

2.2.2 Klinik der bovinen Cryptosporidiose

C. parvum gehört zusammen mit ETEC, Rota- und Coronaviren zu den Hauptverursachern der neonatalen Diarrhoe beim Kalb (Durchfallerkrankung innerhalb der ersten drei Lebenswochen) und ist somit als einer der wichtigsten Verursacher für Verluste in der Kälberaufzucht und damit verbundene wirtschaftliche Einbußen zu nennen (de Graaf et al., 1999; Kaske et al., 2008; Santin, 2013).

Das klinische Bild der neonatalen Diarrhoe ist im Rahmen einer Mono- oder auch Mischinfektion mit *C. parvum* geprägt von profusem, gelblichem Durchfall und dessen Folgen, wie Exsikkose, metabolischer Azidose und Elektrolytverlusten (Heine et al., 1984; Kaske et al., 2008; Tzipori et al., 1980b; Tzipori et al., 1983). Diese manifestieren sich unter anderem in Form von eingesunkenen Bulbi, herabgesetztem Hautturgor, kühlen Akren und allgemeiner Hinfälligkeit.

Die wirtschaftlichen Verluste ergeben sich kurzfristig aus den anfallenden Kosten zur Behandlung des Durchfalls (Tierarztkonsultation, Medikamente zur Flüssigkeitstherapie, Elektrolytsubstitution, Metaphylaxe, erhöhter Betreuungsaufwand) und längerfristig durch Wachstumsverzögerung, verminderte Gewichtszunahme (reduziertes Schlachtgewicht) und

eine erhöhte Mortalität bei den erkrankten Tieren (de Graaf et al., 1999). Für die Fleischrassen Charolais, Blauer Belgier und Limousin wird eine Rassedisposition in Bezug auf eine erhöhte Mortalitätsrate vermutet (Peeters et al., 1992). Auch ist „[...] die zügige Aufzucht gesunder weiblicher Kälber entscheidende Voraussetzung für die zukünftige Remontierung leistungsfähiger Milchkühe und ein niedriges Erstkalbealter [...]“ (Kaske et al., 2008) und somit eine beeinträchtigte Kälberaufzucht nicht folgenlos für die künftige Milchproduktion (Kaske et al., 2008).

Die klinisch manifeste bovine Cryptosporidiose ist auf Neonaten beschränkt (Harp et al., 1990). Dauer und Schweregrad der Erkrankung sind wahrscheinlich abhängig von einer erworbenen Immunität (durch bereits vorangegangene Exposition mit sehr niedrigen Infektionsdosen) und dem Alter des Tieres und der damit einhergehenden Reifung des Immunsystems per se (Current und Garcia, 1991; Harp et al., 1990).

2.2.3 Pathologische Befunde und Pathophysiologie

C. parvum verursacht bei Kälbern vorrangig im distalen Dünndarm (Ileum) akute bis chronische, primär katarrhalische Enteritiden, aber auch im Duodenum und in Abschnitten des Dickdarms (Zäkum und Kolon) konnten Stadien dieses Parasiten nachgewiesen werden (Sanford und Josephson, 1982; Tzipori et al., 1983). Die Mukosa der befallenen Bereiche ist hyperämisch und ödematös (Tzipori et al., 1983). Die Mesenteriallymphknoten sind teilweise vergrößert und ebenfalls ödematös (Fayer et al., 1990; Tzipori et al., 1983). Zu den histologischen Befunden gehören milde bis moderate Villusatrophie sowie gelegentliche Villusfusion; teilweise sind die Krypten der betroffenen Areale dilatiert und enthalten Debris und neutrophile Granulozyten (Pohlenz et al., 1978; Sanford und Josephson, 1982; Tzipori et al., 1983). Auch in der Lamina propria mucosae konnten bei histopathologischen Untersuchungen von Sanford und Josephson (1982) sowie von Tzipori et al. (1983) neutrophile Granulozyten und eine massive mononukleare Zellinfiltration (unter anderem Makrophagen) nachgewiesen werden.

Des Weiteren führt eine Cryptosporidieninfektion beim Kalb zu vielseitigen Veränderungen des Oberflächenepithels: Zelldegeneration (Heine et al., 1984; Sanford und Josephson, 1982), Metaplasie von physiologisch hochprismatischen zu isoprismatischen (kubischen) Villusepithelzellen (Heine et al., 1984; Pohlenz et al., 1978), hyperplastisches Kryptenepithel (Heine et al., 1984), Verdrängung der Mikrovilli im Bereich der Anheftungszone der intrazellulären Parasitenstadien (Sanford und Josephson, 1982) und ungewöhnlich lange, dem Parasitenstadium direkt benachbarte Mikrovilli (Heine et al., 1984).

Die genannten pathologischen Veränderungen resultieren in einer Verringerung der totalen resorptionsaktiven Darmsurface und gehen folglich mit einer Malabsorption einher. Das hyperplastische Kryptenepithel ist Ausdruck des kompensatorischen Versuchs, die geschädigten Villusepithelzellen zu ersetzen. Die nachgeschobenen Enterozyten aus der

proliferativen Zone sind jedoch noch undifferenziert und besitzen somit überwiegend sekretorische Kapazität. In Folge ihrer Chloridsekretion kommt es zu einer Verschiebung von Wasser aus dem Blut in das Darmlumen. Zusätzlich führen die Schädigungen des Darmepithels zu einer reduzierten Aktivität der bürstensaummembranständigen Enzyme (Glucoamylase, alpha-Dextrinase, Saccharase, Lactase), wodurch die Verdauungskapazität für Kohlenhydrate im Dünndarm überschritten wird; ein Umstand der nur teilweise durch gesteigerten mikrobiellen Abbau von Kohlenhydraten zu kurzkettigen Fettsäuren im Dickdarm kompensiert werden kann. In der Folge verbleiben vermehrt osmotisch wirksame Teilchen im Darmlumen, wodurch eine Wasserresorption verhindert wird und eine osmotische Diarrhoe entsteht. Zusätzlich werden als immunologische Antwort auf die Membranschädigungen der Enterozyten von intra- und subepithelialen Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen Prostaglandine synthetisiert, die ihrerseits neben erhöhter Gefäßpermeabilität und Schmerzen eine gesteigerte Chloridsekretion in das Darmlumen induzieren (Angus, 1987; Holland et al., 1989; Kaske, 2004; Tzipori et al., 1983).

Auch die Bildung eines cholera-ähnlichen Toxins durch Cryptosporidien wurde als auslösendes Agens einer sekretorischen Diarrhoe ätiologisch für das Durchfallgeschehen in Betracht gezogen (Angus, 1990); bisher konnte ein solches Toxin, auch Sekretagogum genannt, aber noch nicht nachgewiesen werden (Warren und Guerrant, 2008).

Auch für den Menschen ist der pathophysiologische Mechanismus des Hauptsymptoms Diarrhoe im Rahmen einer Cryptosporidieninfektion noch nicht vollständig aufgeklärt. Fallstudien berichten sowohl von einer sekretorisch als auch von einer osmotisch induzierten Diarrhoe bei mit Cryptosporidien infizierten AIDS-Patienten (Warren und Guerrant, 2008).

2.2.4 Chemotherapeutische Ansätze zur Behandlung der Cryptosporidiose

In den vergangenen Jahren wurden weit über 100 Wirkstoffe auf ihre Eignung als anticryptosporidiales Chemotherapeutikum untersucht (Mead, 2002; O'Donoghue, 1995; Stockdale et al., 2008; Woods et al., 1996). Obgleich zahlreiche Wirkstoffe in *in vitro* Studien eine anticryptosporidiale Aktivität zeigten, bewiesen deutlich weniger Verbindungen in Tierversuchsmodellen ein signifikantes Potential und viele Wirkstoffe mit zunächst positiven Ergebnissen erwiesen sich letztlich als ineffektiv oder nur partiell wirksam (Mead, 2002; Stockdale et al., 2008). Zu den untersuchten Wirkstoffgruppen zählen (i) verschiedenste Antibiotika (Spiramycin, Azithromycin, Clarithromycin, Roxithromycin, Paromomycin, Kanamycin, Rifabutin, Sinefungin, Erythromycin, Enrofloxacin, Monensin, Gentamicin, Neomycin, Polymyxin B, Streptomycin), (ii) Makrozyklische Laktone (Ivermectin), (iii) Antimykotika (Amphotericin B), (iv) Imidazole (Levamisol), (v) Benzimidazole (Thiabendazol), (vi) Ionophore (Maduramicin, Alborixin, Lasalocid), (vii) Herbizide (Trifluralin, Oryzalin), (viii) Alkaloide (Halofuginon), (ix) Guanidine (Robenidin), (x) Proteaseinhibitoren (Ritonavir, Saquinavir, Indinavir), (xi) Triazine (Diclazuril, Letrazuril), (xii) Difluormethyl-

Ornithin/Eflornithin, (xiii) Atovaquon, (xiv) Curcumin, (xv) Nitrofurane (Furazolidon), (xvi) Thiazolide (Nitazoxanid und dazugehörige Derivate), (xvii) Adenosin Analoga, (xviii) verschiedene Antikozidia (Clopidol, Decoquinat, Nicarbazin) und (xix) viele andere (Arai et al., 2011; Fritzier und Zhu, 2012; Gargala et al., 2010; Shahiduzzaman et al., 2009a; Shahiduzzaman et al., 2009b; Stockdale et al., 2008).

Eine kausale medikamentöse Therapie zur Behandlung einer patenten bovinen Cryptosporidiose ist trotz zahlreicher Studien und Austestungen diverser Wirkstoffe derzeit nicht verfügbar (Shahiduzzaman und Dauschies, 2012). Aktuell ist in Europa nur ein einziger Wirkstoff, Halofuginon, ein bromo-chloriniertes Chinazolinderivat, zur pro- und metaphylaktischen Behandlung zugelassen, so dass nach wie vor der Prävention die größte Bedeutung im Rahmen der Bekämpfung dieser Erkrankung zukommt. Halofuginon wird in Form von Halofuginonlactat als orale Lösung unter dem Handelsnamen Halocur® durch die Firma Intervet Deutschland GmbH (Unterschleissheim) vertrieben und soll entsprechend der Dosierungsempfehlung von 100 µg Halofuginon/kg Körpergewicht (KGW) einmal täglich nach der Fütterung an sieben aufeinander folgenden Tagen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Auftreten einer Durchfallsymptomatik an Kälber verabreicht bzw. als prophylaktische Maßnahme innerhalb der ersten 24 bis 48 Lebensstunden appliziert werden (www.vetidata.de). Eine exakte Einhaltung der Dosisberechnung ist dringend notwendig, da der therapeutische Index dieses Wirkstoffes sehr gering ist (Peregrine, 1994); Vergiftungserscheinungen in Form von Diarrhoe, Blutbeimengungen im Kot, Rückgang der Milchaufnahme, Dehydratation, Apathie und Entkräftung können bereits ab einer zweifachen therapeutischen Dosis auftreten (www.vetidata.de; Silverlas et al., 2009).

Die anticryptosporidiale Wirkung von Halofuginon wurde in zahlreichen *in vivo* (Angus et al., 1984; Jarvie et al., 2005; Joachim et al., 2003; Lallemand et al., 2006; Lefay et al., 2001; Naciri et al., 1993; Rehg, 1995; Villacorta et al., 1991b) und *in vitro* (Castro-Hermida et al., 2004; Linder et al., 2007; McDonald et al., 1990; Najdrowski et al., 2007; Shahiduzzaman et al., 2009b) Studien untersucht, die aber zum Teil in ihren Ergebnissen in Bezug auf die im Kälberversuch beobachteten Wirkungseffekte divergieren (Silverlas et al., 2009). So beschrieben Villacorta et al. (1991b) eine Beendigung der Oocystenausscheidung und der damit assoziierten Diarrhoe bei natürlich mit *C. parvum* infizierten neonatalen Kälbern (drei bis sechs Tage alt), nachdem diese über einen Zeitraum von drei bis 14 Tagen oral in verschiedenen Dosierungen (60, 125, 250 µg/kg KGW) mit Halofuginonlactat behandelt wurden. Sieben bis zehn Tage nach Absetzen der medikamentösen Behandlung konnten allerdings bei einigen Tieren wieder Oocysten in den Faeces nachgewiesen werden (Villacorta et al., 1991b). Toxische Nebenwirkungen des Wirkstoffs wie Depression, Gewichtsverlust und das vermehrte Auftreten flüssiger Diarrhoen seien lediglich bei einer Dosierung von 500 µg/kg KGW aufgetreten (Villacorta et al., 1991b). Naciri et al. (1993)

konnten in einer Studie mit experimentell mit *C. parvum* infizierten neonatalen Kälbern (zwei Tage alt) ebenfalls positive Effekte für Halofuginonlactat-Behandlungen (in Dosierungen von 60 und 120 µg/kg KGW an sieben aufeinander folgenden Tagen) verzeichnen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führte die Verabreichung von Halofuginonlactat bei den behandelten Kälbern zu einer deutlichen Verbesserung der Klinik (keine Mortalität, bei einigen der Kälber nur geringgradige Veränderung der Faeceskonsistenz zu pastös), zu einer erhöhten Gewichtszunahme (betrachtet über einen Zeitraum von 31 Tagen nach experimenteller Infektion) und unter der Behandlung zu einer Beendigung der Oocystenausscheidung (Naciri et al., 1993). Aber genau wie Villacorta et al. (1991b) beobachteten auch Naciri et al. (1993) nach Absetzen des Wirkstoffs eine erneute Oocystenausscheidung bei den behandelten Kälbern. Aufgrund der separaten Haltungsbedingungen der Kälber und der nur einmaligen Oocystenexposition am Tag der experimentellen Infektion schließen Naciri et al. (1993) in diesem Fall die von Villacorta et al. (1991b) propagierte These einer möglichen Reinfektion als Folge einer durch die Medikamentengabe unzureichenden Immunitätsausbildung aus; die Möglichkeit einer Reinfektion sei unter den gegebenen Bedingungen sehr limitiert gewesen. Vielmehr ziehen Naciri et al. (1993) eine lediglich cryptosporidiostatische Wirkung von Halofuginonlactat als Ursache in Betracht, die mit dem Absetzen des Medikaments aufgehoben wurde, so dass das Anlaufen der experimentellen Infektion nicht länger unterdrückt wurde. Lefay et al. (2001) untersuchten in einer Studie speziell die potentiell prophylaktische Wirksamkeit von Halofuginonlactat. Hierfür wurde eine sieben Tage dauernde Behandlung mit Halofuginonlactat (120 µg/kg KGW/Tag) bei 78 Saugkälbern (Alter sechs Stunden bis zwei Tage) innerhalb der ersten 48 Lebensstunden begonnen und über 21 Tage der Gesundheitsstatus, der Dehydratationsgrad, die Faecesbeschaffenheit und die Menge an ausgeschiedenen Oocysten untersucht (Lefay et al., 2001). Im Vergleich zu einer Placebo-behandelten Kontrollgruppe (80 Kälber) wurde durch die Verabreichung des Wirkstoffs eine Verzögerung des Beginns der Oocystenausscheidung (Ausscheidungspeak bei der Kontrollgruppe am siebten Tag, bei der behandelten Gruppe am Tag 14) bei gleichzeitig reduzierter Ausscheidungsmenge erzielt und ebenfalls die Häufigkeit einer Durchfallsymptomatik gesenkt (Lefay et al., 2001). In einer sich über 21 Tage erstreckenden Placebo-kontrollierten Feldstudie von Joachim et al. (2003) wurde die metaphylaktische Wirksamkeit von Halofuginonlactat untersucht, indem allen Kälbern beim Auftreten erster Diarrhoe-Symptome innerhalb der Untersuchungsgruppe (Alter der Kälber zu diesem Zeitpunkt vier bis 14 Tage) täglich über sieben Tage Halocur® (Intervet, Unterschleißheim) in einer Dosierung von 100 µg Wirkstoff/kg KGW verabreicht wurde. An allen fünf Untersuchungszeitpunkten (exklusive Tag 0) war die *C. parvum* Prävalenz in der behandelten Kälbergruppe am niedrigsten und die Medikation bewirkte im Vergleich zur

unbehandelten Kontrollgruppe eine deutliche Reduzierung der Menge an ausgeschiedenen Oocysten bei den erkrankten Tieren (Joachim et al., 2003). Obgleich sich der Gesundheitsstatus der Tiere (Kriterien: Dehydratation, Diarrhoe und grundsätzliche Kondition) in beiden Gruppen verschlechterte, so führte die Halofuginon-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe doch zu einer Verbesserung desselben (Joachim et al., 2003). Jarvie et al. (2005) bestätigten anhand einer 31 Bullenkälber umfassenden Studie ebenfalls die reduzierende Wirkung von Halofuginonlactat auf die Menge ausgeschiedener Oocysten von *C. parvum* infizierten Kälbern, indem selbige für sieben Tage vom Tag ihrer Geburt an mit 5 mg Halofuginonlactat behandelt wurden (Dosierung entspricht bei dem in der Studie ermittelten durchschnittlichen Geburtsgewicht der Kälber von 45,4 kg ca. 110 µg/kg KGW). Des Weiteren beschrieben sie ein um ca. drei Tage verzögertes Auftreten der Diarrhoe sowie des Beginns der Oocystenausscheidung bei den behandelten Kälbern im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrollgruppe (Jarvie et al., 2005). Im Gegensatz zu Joachim et al. (2003) konnten Lallemand et al. (2006) durch die Verabreichung von Halofuginon keine Verbesserung des Gesundheitsstatus bei an Cryptosporidien erkrankten Kälbern beobachten (keine Speziesidentifizierung erfolgt). Anhand einer Feldstudie mit sieben bis zehn Tage alten Kälbern untersuchten sie über 28 Tage den Effekt der oralen Verabreichung von 100 µg Halofuginonhydrobromid/kg KGW auf den Gesundheitsstatus (Kriterien: Dehydratation, Diarrhoe) und die Oocystenausscheidung infizierter Tiere. Am Tag der Ankunft (Tag Null) schieden bereits 28 der insgesamt 90 Kälber Oocysten aus (Lallemand et al., 2006). Die an Tag eins begonnene und sieben Tage dauernde medikamentöse Behandlung zeigte keine signifikanten Effekte auf die Anzahl der an Diarrhoe erkrankten Tiere, die Beschaffenheit des Durchfalls (semi-flüssig, flüssig), die Gewichtszunahme oder den Dehydratationsgrad; einzig eine Reduktion der Anzahl ausgeschiedener Oocysten konnte durch die Wirkstoff-Verabreichung nachgewiesen werden (Lallemand et al., 2006). Auch Nitazoxanid, ein Nitrothiazolbenzamid, wurde aufgrund seiner Zulassung im Jahr 2005 durch die "Food and Drug Administration" (FDA) für die Behandlung der humanen Cryptosporidiose bei Erwachsenen und Kindern älter als ein Jahr in zwei Studien auf seine Eignung als wirksames Therapeutikum zur Behandlung der bovinen Cryptosporidiose untersucht (Fox und Saravolatz, 2005; Hemphill et al., 2006). Zur Evaluierung der Wirksamkeit von Nitazoxanid behandelten Ollivett et al. (2009) 13 von insgesamt 20 neonatalen, experimentell mit *C. parvum* Oocysten infizierten Kälbern über fünf Tage zweimal täglich mit 1,5 g des Wirkstoffs (bei dem in dieser Studie durchschnittlichen Gewicht der Kälber von 48,6 kg entspricht dies einer Tagesdosis von ca. 61,73 mg/kg KGW), nachdem die Infektion mindestens fünf bis sieben Tage zurücklag und sich die Faeceskonsistenz in Richtung Diarrhoe zu verändern begann. Den verbliebenen sieben Kälbern wurde nach den gleichen Kriterien anstelle von Nitazoxanid lediglich der Trägerstoff

verabreicht, so dass diese als Kontrollgruppe fungierten (Ollivett et al., 2009). Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes von 16 Tagen schieden nur noch 15 % der behandelten Tiere Oocysten aus, wohingegen dies in der Kontrollgruppe noch auf 85 % der Tiere zutraf. Neben der Reduzierung der Oocystenausscheidungsdauer schrieben Ollivett et al. (2009) Nitazoxanid ebenfalls einen mildernden Effekt auf den Schweregrad der Diarrhoe zu, der sich in einer Verbesserung der Faeceskonsistenz äußerte; toxische Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt. Hingegen beobachteten Schnyder et al. (2009) in einer Studie mit ebenfalls neonatalen (ein bis drei Tage alt), experimentell mit *C. parvum* Oocysten infizierten Kälbern keine positiven Effekte auf das klinische Erscheinungsbild und auf die Oocystenausscheidung, weder durch eine therapeutische (Behandlungsbeginn bei Manifestation der Diarrhoe) noch durch eine prophylaktische (Behandlungsbeginn einen Tag vor experimenteller Infektion) Verabreichung von Nitazoxanid (Dosierung: zweimal täglich 15 mg/kg KGW, an zehn aufeinander folgenden Tagen). Vielmehr war die Anzahl der Tage, an denen die Kälber unter flüssiger Diarrhoe litten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe bei der therapeutisch behandelten Gruppe signifikant erhöht; und sogar nicht infizierte Kälber, die in einem Vorversuch in der gleichen Dosierung über zehn Tage mit Nitazoxanid behandelt wurden, entwickelten eine über durchschnittlich 15,3 Tage andauernde Durchfallsymptomatik, was den Verdacht nahe legt, dass die Diarrhoe in diesem Fall durch die Nitazoxanid-Behandlung verursacht wurde (Schnyder et al., 2009).

Auch das Aminoglykosid-Antibiotikum Paromomycin, welches trotz divergierender Ergebnisse klinischer Studien (Cabada und White, 2010; Stockdale et al., 2008) oft in der Humanmedizin zur Behandlung einer Cryptosporidiose Anwendung findet (Mead, 2002) und als Goldstandard für die *in vitro* Entwicklungsinhibition von *C. parvum* gilt (Cai et al., 2005), wurde in Kälberstudien auf eine potentielle anticryptosporidiale Wirkung untersucht. Zur Überprüfung eines prophylaktischen Effekts begannen Fayer und Ellis (1993) bei 12 neonatalen Kälbern eine elf Tage dauernde Paromomycinbehandlung, einen Tag bevor selbige Kälber experimentell mit *C. parvum* infiziert wurden (Alter der Kälber zum Infektionszeitpunkt maximal sieben Tage). Durch eine Tagesdosis von 100 mg Paromomycin/kg KGW konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe sowohl die Anzahl der Tage an denen die Kälber Oocysten ausschieden als auch die Menge ausgeschiedener Oocysten pro Gramm Kot signifikant reduziert werden. Des Weiteren wurde durch diese Dosierung eine Milderung des Schweregrads des Durchfalls und eine Verkürzung der Anzahl der Tage, an denen die Tiere unter Diarrhoe litten, beobachtet. Die klinische Durchfall-Symptomatik wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ebenfalls durch niedrigere Tagesdosen (50, 25 mg/kg KGW) verbessert, dennoch begannen die mit diesen Dosierungen behandelten Tiere wenige Tage nach Absetzen der Medikation Oocysten auszuscheiden, wohingegen bei den mit 100 mg Paromomycin/kg KGW

behandelten Kälbern bis zum 28. Lebenstag keine Oocystenexkretion beobachtet wurde (Fayer und Ellis, 1993). Grinberg et al. (2002) überprüften, ob die von Fayer und Ellis (1993) beobachteten positiven Effekte von Paromomycin in einer Dosierung von 100 mg/kg KGW ebenfalls in einem 22-tägigen Feldversuch bestätigt werden können. Leider stellte sich die propagierte prophylaktische Wirkung unter natürlichen Bedingungen vielmehr als ein rein zeitlicher Aufschub heraus, laut Autor als eine Verlängerung der Präpatenzperiode (Grinberg et al., 2002); ca. zwei bis sechs Tage nach dem Absetzen des Wirkstoff begannen die behandelten Kälber ebenfalls Oocysten auszuscheiden und eine Durchfall-Symptomatik zu entwickeln (Grinberg et al., 2002). Grinberg et al. (2002) vermuten, dass die anticryptosporidiale Wirkung der Paromomycin-Behandlung eine unzureichende Aktivierung des Immunsystems bei dem Erstkontakt mit dem Erreger zur Folge hat, so dass sich die Erkrankung hier in Form einer Reinfektion manifestieren konnte.

Zur Behandlung einer humanen Cryptosporidiose wurden im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien an immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten Makrolidantibiotika (Spiramycin, Azithromycin, Clarithromycin, Roxithromycin), Rifamycinantibiotika (Rifabutin), Aminoglykosidantibiotika (Paromomycin), Triazine (Diclazuril, Letrazuril), Difluormethyl-Ornithin/Eflornithin, Atovaquon und Thiazolide (Nitazoxanid) auf ihre anticryptosporidiale Wirkung untersucht; leider konnte für keinen der Wirkstoffe anhand der Studien einhellig ein vollständiger anticryptosporidialer Effekt konstatiert werden (Cabada und White, 2010; Gargala, 2008; Stockdale et al., 2008).

Auch Nitazoxanid ist nicht in allen Fällen einer humanen Cryptosporidiose wirksam, da seine Wirkung ohne ein effizientes Immunsystem eingeschränkt zu sein scheint, weshalb einige Autoren von einer nur partiellen Wirksamkeit sprechen (Abubakar et al., 2007; Cabada und White, 2010; Hemphill et al., 2006). Ausschlaggebend für die Wirkungsentfaltung scheint das Vorhandensein einer bestimmten Anzahl von CD4⁺ Zellen zu sein. So zeigte sich beispielsweise in einer Studie von Rossignol et al. (1998), dass nur HIV-Patienten mit einer CD4⁺ Zellanzahl von >50/mm³ positiv auf eine Nitazoxanidbehandlung ansprachen, wohingegen für Rezipienten mit einer geringeren CD4⁺ Zellanzahl kein Unterschied zur Placebo-behandelten Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Interessanterweise wurde die Unterschreitung dieser CD4⁺ Zellanzahl (50/mm³) auch mit einem fulminanten und/oder letalen Verlauf einer Cryptosporidiose bei HIV/AIDS-Patienten assoziiert (Blanshard et al., 1992; Colford et al., 1996). Das Aufkommen der "highly-active anti-retroviral therapy" (HAART), einer Kombinationstherapie bestehend aus antiretroviralen Wirkstoffen (mindestens zwei nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren in Kombination mit Proteaseinhibitoren oder nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren) (Ives et al., 2001), führte zu einer deutlichen Cryptosporidiose-Inzidenzsenkung bei den HIV/AIDS-Patienten (Brady et al., 2010; Guillen et al., 2010; Mead, 2002). Neben der Stärkung des

Immunsystems durch eine HAART konnte für die Proteaseinhibitoren Indinavir, Saquinavir und Ritonavir sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zusätzlich ein direkter inhibitorischer Effekt auf die Entwicklung von *C. parvum* nachgewiesen werden (Hommer et al., 2003; Mele et al., 2003), so dass auch die Gruppe der Proteaseinhibitoren in den Focus von Forschungsarbeiten zur Identifizierung eines geeigneten anticryptosporidialen Chemotherapeutikums gelangt ist.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

BIOHIT, Helsinki, Finnland

Pipettenfilter, Pipettenspitzen 100-5000 µl, Filtertips 5-300 µl

BIOZYM, Hessisch Oldendorf, Deutschland

BZO Seal Film (adhesive optical Film), Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl), 0,2 ml Soft Tubes, PCR 96-Well TW-MT Platte (weiß)

GREINER BIO-ONE, Solingen, Deutschland

96-Loch Gewebekulturschalen (Wachstumsfläche 0.32 cm²/Vertiefung), Kryoröhrchen

ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Autoklavierband, Chemikalienlöffel, Gewindefalschen (0,1 l, 0,25 l, 0,5 l, 1 l), KIMTECH Mehrfachwischtücher, Latexhandschuhe, Nitrilhandschuhe, Parafilm M, Rotibo®-Skalpells, Rotizell® Tissue-Tücher, Wägeschälchen

SARSTEDT, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland

Gewebekulturschalen (Wachstumsbereich/cm² 58), Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml), Serologische Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Safe Seal Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)

THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland

6-Loch Gewebekulturschalen (Wachstumsfläche 9,6 cm²/Vertiefung)

48-Loch Gewebekulturschalen (Wachstumsfläche 0.75 cm²/Vertiefung)

3.1.2 Geräte

ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland

Thermomixer TMix

BIOHIT, Helsinki, Finnland

Elektrische Pipette: eLINE 100-5000 µl, eLINE 10-300 µl

BIOMETRA, Göttingen, Deutschland

Standard Power Pack P25, Power Pack P25 T

BIO-RAD, München, Deutschland

C1000™ Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Gießstände, S1000™ Thermal Cycler, Mini-Sub@Cell GT PowerPac Universal Power Supply, Wide Mini-Sub@Cell GT

BIOSAN, Riga, Lettland

Thermoschüttler für Mikrotiterplatten PST-60HL-4

BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland

Synergy 4, Epoch

BOSCH, Stuttgart, Deutschland

Kühl-Gefrier-Kombination

CARL ZEISS AG, Oberkochen, Deutschland

Binokulares Hellfeld Mikroskop Axiostar

EPENDORF, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5430 R (Rotoren: FA-45-30-11, A-2-MTP, F-35-6-30), Kolbenhubpipetten Eppendorf Research: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl

HERAEUS SEPATECH, Osterode, Deutschland

Biofuge pico, Biofuge 13

HUND, Wetzlar, Deutschland

Inversmikroskop

IKA, Staufen, Deutschland

Magnetrührer IKAMAG®RET, IKA® Vortex GENIUS 3

KNICK, Berlin, Deutschland

pH-Meter 761 Calimatic

KÖTTERMANN, Uetze/Hänigsen, Deutschland

Wasserbad

LIEBHERR, Deutschland

Gefrierschrank Comfort, Kühl-Gefrier-Kombination Comfort NoFrost

LMS-GROUP, Tokyo, Japan

Minizentrifuge MCF-2360

MACHERY-NAGEL, Düren, Deutschland

NucleoVac 96 Vacuum Manifold

MEMMERT, Schwabach, Deutschland

Wasserbäder

OHAUS CORPORATIONS, Nänikon, Schweiz

Feinwaage Discovery DV215CDM

PROMEGA, Madison, USA

MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand, Maxwell® 16 Research Instrument System

ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Kryo-Einfriergerät – Mr Frosty, Kryo-Schwimmständer, Handstückzähler, LABOPORT® Mini-Membran-Vakuumpumpe, Zählkammer Neubauer improved

SANYO, München, Deutschland

CO₂-Inkubator MCO-15AC

SARTORIUS LABORATORY, Göttingen, Deutschland

Präzisionswaage LC220 S, Waage Acculab ALC-1100.2

SCOTSMAN, Mailand, Italien

Flockeneisbereiter Scotsman® AF 100

SHARP, Hamburg, Deutschland

Großraummikrowelle

SHP STERILTECHNIK AG, Magdeburg, Deutschland

Autoklav

SIEMENS, München, Deutschland

Gefrierschrank ÖKO plus electronic, Kühl-Gefrier-Kombination AntiBacteria

SONY, Berlin, Deutschland

Digital Graphic Printer UP-D897

SYNGENE, Cambridge, Großbritannien

Geldokumentation G:Box

THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland

Labor-Tiefkühlschrank Freeze Paket, Sicherheitswerkbank MSC-Advantage,
Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000

TKA WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME, Niederelbert, Deutschland

TKA-GenPure

VWR, Darmstadt, Deutschland

Pipettierhilfe Pipetus®, Gas-Sicherheitsbrenner, Gasprofi 1 SCS micro

WELCH-ILMVAC, Ilmenau, Deutschland

Vakuumpumpe

3.1.3 Reagenzien

APPLIED BIOSYSTEMS, Carlsbad, USA

Oligonukleotide

BODE CHEMIE, Hamburg, Deutschland

Bacillo® plus

FERMENTAS, St.Leon-Rot, Deutschland

dNTP Mix (10 mM each), Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Glycogen RNA Grade, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3, 25 mM MgCl₂

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland

Oligonukleotide

LABGENE SCIENTIFIC SA, Chatel-St-Denis, Schweiz
GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Stain

LYSOFORM, Berlin, Deutschland
Händedesinfektionsmittel AHD 2000®

MENNO CHEMIE VERTRIEB GMBH, Norderstedt, Deutschland)
Neopredisan® 135-1

PAA, Cölbe, Deutschland
Accutase, Dulbecco's PBS (1×) without Ca & Mg, Fötales bovines Serum Standard EU approved, Hanks BSS (1×), RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin und mit 25 mM HEPES mit Phenolrot

ROCHE, Grenzach, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST-1

ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Akasolv Aqua Care® Wasserbadschutz, Agarose NEEQ Ultra Qualität Roti®garose, Carbenicillin Dinatriumsalz >90 % für die Biochemie, Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie ≥99,5 %, EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Ethanol 99,8 % DAB reinst, Glycerin, 2-Propanol (reinst), Kanamycinsulfat, LB Medium (Luris/Miller), Natriumhydroxid Plätzchen, Wasser (nukleasefrei)

SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Ascorbat, Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Folsäure ≥ 97 %, D-(+)-Glukose-Lösung (45 %), Kalziumpantothenat, para-Aminobenzoessäure, Paromomycinsulfat

TH GEYER, Renningen, Deutschland
Bakto Agar

WAK-CHEMIE, Steinbach, Deutschland
AquaClean® (Microbiocidal additive for water baths for use in research laboratories), Biocidal ZF™ (Spray-disinfectant for incubators & sterile cabinets in cell culture area for use in research laboratories)

3.1.4 Puffer und Lösungen

0,8 %, 1 %, 1,5 %, 2 % Agarosegele	0,8 % (w/v), 1 % (w/v), 1,5 % (w/v), 2 % (w/v) Agarose in 1×TAE-Puffer aufkochen, bis sich die gesamte Agarose gelöst hat. Lagerung bei 65 °C im Wasserbad. Direkt vor Überführung in Gelkammer mit 1 µl GRGreen pro 10 ml Agarose versetzen
DEPC-Wasser	Aqua bidest. mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetzten, 12 h rühren, anschließend autoklavieren
DEPC-Ethanol 75 %	75 % (v/v) Ethanol in DEPC-Wasser
Ladungspuffer für Agarosegele (6×Loading Dye)	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 % Glycerol, 0.03 % Bromphenolblau, 60 mM EDTA
50×TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	2 M Tris, 5,71 % (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA (pH 8,0) in Aqua bidest.
1×TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	50×TAE-Puffer verdünnt in Aqua bidest.

3.1.5 Medien, Nährböden und Mikroorganismen

One Shot® TOP10 Zellen (INVITROGEN) chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(araIeu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Transformationseffizienz ~1×10 ⁹ cfu/µg DNA)
Laura Bertani (LB)-Medium (ROTH)	25 g/l (entspricht 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl (pH 7,0); autoklavieren
LB-Agarplatten	15 g Agar in einem Liter LB-Medium anrühren und autoklavieren
Nährmedium	RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 25 mM HEPES und Phenolrot, supplementiert mit einem oder zehn Prozent fötalem Kälberserum (FBS)

Wachstumsmedium RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 25 mM HEPES und Phenolrot, supplementiert mit einem oder zehn Prozent fötalem Kälberserum, 1 µg/ml Folsäure, 35 µg/ml Ascorbat, 4 µg/ml para-Aminobenzoessäure, 2 µg/ml Kalziumpantothenat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B und 50 mM Glukose

3.1.6 Enzyme

FERMENTAS, St.Leon-Rot, Deutschland

EcoRI, Maxima® Hot Start *Taq* DNA Polymerase, Maxima®Probe/ ROX Master Mix (2×), Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2×)

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland

AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase System

PROMEGA, Madison, USA

GoTaq® qPCR Master Mix

3.1.7 Reaktionskits

INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland

TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing

MACHERY-NAGEL, Düren, Deutschland

NucleoSpin® Plasmid, NucleoSpin® Tissue, NucleoSpin® 8 Tissue

PROMEGA, Madison, USA

PureYield™ Plasmid Midiprep System, Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit

ROCHE, Grenzach, Deutschland

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)

3.1.8 Wirkstoffe

Lfd. Nr.	Wirkstoff	Bezugsquelle
1	Isotianil	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
2	Pyrimethanil	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
3	Fluotrimazol	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
4	Halofuginonhydrobromid	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
5	Boscalid	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
6	Fenfuram	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
7	Thiabendazole	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
8	Ethionamid	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
9	Carpropamid	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
10	Spiroxamin	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
11	BAY-AB24992	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
12	BAY-AF76184	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
13	Isoniazid	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
14	Syringomycin E	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
15	CRP-B-21	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
16	CRP-B-22	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
17	CRP-B-23	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
18	CRP-B-24	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
19	CRP-B-25	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
20	CRP-B-26	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
21	CRP-B-27	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
22	CRP-B-28	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
23	CRP-B-29	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
24	CRP-B-30	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
25	CRP-B-31	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
26	CRP-B-32	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
27	CRP-B-33	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
28	CRP-B-34	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
29	CRP-B-35	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
30	Paromomycinsulfat	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland
31	Nitazoxanid	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, USA

Zusätzlich wurden 21 weitere Verbindungen untersucht, die namentlich aus patentrechtlichen Gründen nicht aufgelistet werden dürfen.

Mit Ausnahme von Nitazoxanid wurden alle Wirkstoffe in mindestens drei verschiedenen Konzentration überprüft.

3.1.8.1 Wirkstoffformulierung

Sämtliche Wirkstoffe wurden in Form von Feststoffen geliefert. Gelöst in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden von den Wirkstoffen eins bis drei, fünf bis 29 und 31 hochkonzentrierte Lösungen derart angelegt, dass bei der späteren Wirkstoffüberprüfung im Infektionsversuch bei gewünschter Wirkstoffkonzentration nur eine 0,5%ige DMSO Konzentration in jeder Vertiefung der jeweiligen Gewebekulturschale vorlag.

Bei den wasserlöslichen Wirkstoffen vier und 30 wurde anders verfahren und zur Erstellung von hochkonzentrierten Lösungen Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO als Solvenz eingesetzt.

Die hochkonzentrierten Wirkstofflösungen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren aufbewahrt und unmittelbar vor der Wirkstoffüberprüfung aufgetaut.

3.1.9 Software

BioEdit (Hall, 1999)	(Hall, 1999)
Bio-Rad CFX Manager 2.0	Bio-Rad, München, Deutschland
Clonemanager professional 9	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Corel DRAW Graphic Suites X5	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
End Note X5	Thomson Reuters, San Francisco, USA
Gene Snap 7.09.06	Syngene, Cambridge, UK
GraphPad Prism 5.03	GraphPat Prism, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
NCBI	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blst.cgi)
Primer Express® Software V. 3.0	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Sigma Plot	Systat Software, Chicago, USA

3.1.10 Oocysten

Universität Zürich, Institut für Parasitologie, Schweiz

Cryptosporidium parvum Isolat IPZ: CH-Crypto_K6769P2

Genotyp: IIA16G2R1

Universität Leipzig, Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Parasitologie

Genotyp: IIA15G2R1

Beide Isolate wurden bereits in aufgereinigter Form von den oben genannten Instituten bezogen.

Das verwendete Isolat der Universität Zürich wurde aus einem klinischen Fall gewonnen und nach Bestätigung des Kälber-Typs (Sequenzierung) in einem Kalb passagiert. Zur Isolierung der *C. parvum* Oocysten aus dem Kälberkot wurde selbiger in einem Verhältnis von 1:1 mit 5%igem Kaliumdichromat versetzt und anschließend durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte grob gereinigt. Fette wurden durch eine Etherextraktion mit anschließender Zentrifugation entfernt. Bevor das Sediment auf einen Ficoll-Gradienten geladen wurde, erfolgten erneute Waschungen und Filtrationsschritte. Die nach der Zentrifugation in der Interphase sichtbar gewordenen Oocysten wurden abpipettiert, mehrfach gewaschen und anschließend zur Lagerung (bei 4 °C) in PBS mit Zusatz von "Antibiotic Antimycotic Solution" resuspendiert (persönliche Mitteilung von Dr. C. Lippuner, 2010).

Die Oocyten vom Genotyp IIA15G2R1 wurden ursprünglich ebenfalls aus einem natürlich infizierten Kalb isoliert und anschließend in neonatalen Kälbern passagiert. Die Aufreinigung der Oocysten erfolgte mit Hilfe einer kombinierten Sedimentations-Flotationstechnik (Najdrowski et al., 2007; Schupfner et al., 2013). Im Anschluss wurden die aufgereinigten Oocysten in mit Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B angereichertem PBS bei 4 °C gelagert.

3.1.11 Zellen

European Collection of Cell Cultures (ECACC), HPA Culture Collections, Salisbury, Vereintes Königreich

humane ileocaecale Adenokarzinomzellen (HCT-8 Zellen), Katalognummer: 90032006

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (THERMO SCIENTIFIC) durchgeführt, die vor jedem Arbeitsbeginn gründlich mit Bacillol® plus (BODE CHEMIE) desinfiziert wurde.

Alle zur Zellanzucht verwendeten Flüssigkeiten wurden aus sterilen Ausgangskomponenten hergestellt (Nährmedium) bzw. bereits in sterilisierter Form (Hanks BSS, Accutase) erworben. Sämtliche Verbrauchsmaterialien (serologische Pipetten, Zellkulturschalen) wurden steril erworben oder vor der Verwendung autoklaviert (Reaktionsgefäße, Erlenmeyerkolben). Gefäße, die in die Werkbank verbracht werden sollten, wurden zuvor mit Bacillol® plus abgewischt. Bei der Arbeit wurden grundsätzlich Handschuhe getragen und die behandschuhten Handflächen zusätzlich mit Bacillol® plus abgerieben.

Für die Infektionsversuche wurden adhärente, epitheliale humane ileocaecale Adenokarzinomzellen, HCT-8-Zellen, verwendet (Upton et al., 1994a). Diese Zelllinie wurde käuflich bei European Collection of Cell Cultures (ECACC) erworben. Als Nährmedium diente mit 10 % fötalem Kälberserum supplementiertes RPMI 1640 Medium, mit L-Glutamin, 25 mM HEPES und Phenolrot.

Nach Erhalt der in einem 2 ml-Kryoröhrchen befindlichen tiefgefrorenen Zellen mit einer Passagenummer +5 wurden diese in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut. Der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens wurde in ein mit 10 ml vorerwärmtem Nährmedium befülltes 50 ml Plastikröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei 800×g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert, die Zellsuspension in eine Zellkulturschale überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Upton et al., 1994b).

Im Abstand von drei bis vier Tagen, das heisst, sobald der Zellrasen eine nahezu vollständige Konfluenz aufwies, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das auf den Zellen befindliche Nährmedium abgenommen, die Zellen mit 37 °C warmen Hanks BSS gewaschen und anschließend mit ca. 3 ml Accutase überschichtet. Nach einer Inkubation von ca. 10-15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ und damit einhergehender Ablösung der Zellen vom Zellkulturschalenboden wurden 7 ml frisches Nährmedium zu den Zellen hinzugegeben, die Zellen kräftig auf- und abpipetiert und ein Aliquot der Zellsuspension (gewöhnlich ein Fünftel des Gesamtvolumens) in eine neue mit 8 ml frischem Nährmedium beschickte Zellkulturschale überführt.

Nach drei erfolgten Passagen wurden von den Zellen Dauerkulturen hergestellt, die in einem Stickstoffbehälter bei -196 °C gelagert wurden. Hierfür wurde wie bei der Passage der Zellen verfahren, allerdings erfolgte nach dem Ablösen der Zellen und der Zugabe frischen

Nährmediums eine Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Plastikröhrchen mit anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 800×g. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in Nährmedium, versetzt mit 20 % fötalem bovines Serum und 10 % DMSO, resuspendiert und die Zellsuspension anschließend in 1 ml Portionen in Kryoröhrchen überführt.

Die befüllten Kryoröhrchen wurden ca. 2 h bei 4 °C in einem Kryo-Einfriergerät gelagert, bevor sie über Nacht mitsamt dem Einfriergerät in einen -80 °C Tiefkühlschrank überführt wurden. Bevor die Zellen zur langfristigen Lagerung in einem Stickstoffbehälter (Gasphase) gelagert wurden, erfolgte eine Kontrolle des Einfriervorganges. Hierfür wurde ein Kryoröhrchen aus dem -80 °C Tiefkühlschrank entnommen, dessen Inhalt im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, mit erwärmtem (37 °C) Nährmedium gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Nach einer Resuspension des Zellpellets in 10 ml Nährmedium wurde die Zellsuspension über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend das Zellwachstum mikroskopisch beurteilt. Zeigten die Zellen eine hohe Anheftungsrate (>90 %), wurden die restlichen in einer Kryobox gelagerten Kryoröhrchen in einen Stickstoffbehälter (Gasphase) überführt.

3.2.2 Zellinfektion

Die Infektion der Zellen erfolgte in 48-Loch Gewebekulturschalen. Hierfür wurden die Zellen in einer geeigneten Anzahl ($7,9 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung) in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml im Rahmen der routinemäßigen Passage in die einzelnen Vertiefungen der 48-Loch Gewebekulturschalen ausgesät. Die verwendete Zellkonzentration wurde in Anlehnung an Shahiduzzaman et al. (2009b) proportional dem Flächeninhalt der einzelnen Vertiefungen angepasst.

Zur Herstellung der Zellsuspension mit der gewünschten Anzahl an Zellen wurde die Zellkonzentration der im Rahmen der Passagierung gewonnenen Zellsuspension mittels der Neubauer Zählkammer "improved" ermittelt und diese Zellsuspension durch Zusatz von Nährmedium auf die erforderliche Zellkonzentration eingestellt. Die Zellen wurden anschließend ca. 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, so dass ein Monolayer mit einer Konfluenz von ca. 80 % ausgebildet werden konnte. Um den Zellrasen im Folgenden mit den Erregern zu infizieren, wurde nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit das Nährmedium abpipettiert und durch ein mit Oocysten angereichertes Wachstumsmedium ersetzt. Die Oocystenkonzentration betrug $4,94 \times 10^5$ Oocysten je Vertiefung in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml. Um die gewünschte Erreger-Konzentration in dem mit Oocysten angereicherten Wachstumsmedium zu erzielen, wurde erst die Konzentration der bezogenen Oocystensuspension (siehe Kapitel 3.1.10) mittels der Neubauer Zählkammer "improved" ermittelt und anschließend ein Aliquot dessen mittels Wachstumsmedium soweit verdünnt, bis die gewünschte Oocysten-Konzentration vorlag.

Vor jedem Infektionsversuch wurden ca. 100 ml des Wachstumsmediums frisch angesetzt. Als Basis für das Wachstumsmedium wurde RPMI 1640 Medium, mit L-Glutamin, 25 mM HEPES und Phenolrot verwendet, welches in Anlehnung an Upton et al. (1995) in modifizierter Form mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 µg/ml Folsäure, 35 µg/ml Ascorbat, 4 µg/ml para-Aminobenzoessäure, 2 µg/ml Kalziumpantothenat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B und 50 mM Glukose angereichert wurde. Nach dem Aufbringen der Oocysten wurden die 48-Loch Gewebekulturschalen für 5 min bei 410×g zentrifugiert und anschließend für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation der Oocysten wurden die Zellen zweimal mit Nährmedium (37 °C) gewaschen, anschließend mit 0,2 ml Wachstumsmedium überschichtet und für weitere 54 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei nach 27 h ein Wechsel des Wachstumsmediums erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abpipettiert, der Monolayer zweimal mit PBS gewaschen und die DNA-Isolation (siehe Kapitel 3.3) eingeleitet.

3.2.2.1 Vorversuche zur Optimierung der *in vitro* Kultivierung von *C. parvum*

3.2.2.1.1 Eruierung des optimalen Analysezeitpunktes für die DNA Isolation

Anhand einer kinetischen Studie wurde der optimale Analysezeitpunkt für eine DNA-Isolation bestimmt und somit die Länge der Kultivierungsdauer festgelegt. Hierfür wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die DNA infizierter Zellkulturen isoliert und anschließend in einer PCR untersucht.

Im Rahmen der routinemäßigen Passage wurden HCT-8 Zellen in einer geeigneten Anzahl (1×10^6 Zellen/Vertiefung) in einem Gesamtvolumen von 2,0 ml in die einzelnen Vertiefungen einer 6-Loch Gewebekulturschale ausgesät. Anschließend wurden die Zellen ca. 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem ein Monolayer mit einer Konfluenz von ca. 80 % ausgebildet wurde, wurde das Nährmedium durch Oocysten-haltiges Wachstumsmedium ersetzt. Die Oocystenkonzentration betrug $2,5 \times 10^5$ Oocysten je Vertiefung in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml. Im Anschluss an eine zweistündige Inkubation der Oocysten bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Monolayer zweimal mit Nährmedium (37 °C) gewaschen und anschließend mit 2,0 ml Wachstumsmedium überschichtet. An den Zeitpunkten 26, 50 und 56 h p.i., wobei Null h p.i den Zeitpunkt des Aufbringens der Oocysten markiert, wurde das Wachstumsmedium zweier biologischer Replikate abpipettiert, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und die DNA-Isolation eingeleitet.

3.2.2.1.2 Optimierung der Oocystenkonzentration

Zur Ermittlung der optimalen Oocystenkonzentration wurden drei verschiedene Oocystenkonzentrationen ($1,97 \times 10^4$, $9,87 \times 10^4$, $4,94 \times 10^5$) im Infektionsversuch ausgetestet.

Die niedrigste verwendete Oocystenkonzentration ($1,97 \times 10^4$) wurde einer Publikation von Shahiduzzaman et al. (2009b) entlehnt und proportional dem Flächeninhalt einer Vertiefung einer 48-Loch Gewebekulturplatte angepasst.

Hierfür wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben HCT-8 Zellen in 48-Loch Gewebekulturschalen ausgesät und nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einem Oocysten-haltigen Wachstumsmedium überschichtet. Die einfache (niedrigste) Infektionsdosis betrug $1,97 \times 10^4$ Oocysten/Vertiefung, die fünffache Infektionsdosis $9,87 \times 10^4$ Oocysten/Vertiefung und die 25fache Infektionsdosis $4,94 \times 10^5$ Oocysten/Vertiefung. Jede Zellinfektion wurde in Form von zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Nach einer sich daran anschließenden zweistündigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Nährmedium (37 °C) gewaschen, mit 0,2 ml Wachstumsmedium überschichtet und für weitere 54 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Auch in diesem Versuchsaufbau erfolgte nach 27 h ein Wachstumsmediumwechsel. Nach Ablauf der 54 h wurde das Wachstumsmedium abpipettiert, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die DNA-Isolation eingeleitet.

Die DNA Proben wurden im Anschluss mittels einer quantitativen PCR untersucht (siehe Kapitel 3.4.2).

3.2.2.1.3 Einführung eines Zentrifugationsschrittes

Die Infektionsversuche zur Ermittlung der optimalen Oocystenkonzentration wurden auf zwei 48-Loch Gewebekulturschalen als Doppelansatz durchgeführt. Eine 48-Loch Gewebekulturschale wurde, wie bei King et al. (2011) beschrieben, direkt nach dem Aufbringen der Oocystensuspensionen 5 min bei $410 \times g$ zentrifugiert, bevor sie, wie auch die andere 48-Loch Gewebekulturschale, nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ zweimal mit Nährmedium gewaschen und anschließend mit Wachstumsmedium bestückt wurde. Nach Ablauf der 54-stündigen Inkubation mit erfolgtem Wachstumsmediumwechsel nach 27 h wurde das Medium von den Monolayern abpipettiert, diese zweimal mit PBS gewaschen und die DNA-Isolation eingeleitet. Die DNA Proben beider Ansätze wurden im Anschluss mittels einer quantitativen PCR untersucht (siehe Kapitel 3.4.2).

3.2.3 Überprüfung von Substanzen auf anticryptosporidiale Wirksamkeit

Mit Hilfe des Infektionsversuches wurden insgesamt 51 Wirkstoffe (siehe Wirkstoffauflistung Kapitel 3.1.8) auf ihre anticryptosporidiale Wirksamkeit untersucht. Wirkstoff 31, Nitazoxanid, wurde nur vorübergehend als Positivkontrolle mitgeführt.

Alle Wirkstoffe wurden in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen (1, 10 und 100 ppm) bei einer DMSO-Konzentration von 0,5 % ausgetestet. Bei den Wirkstoffen 11 und 12 wurden insgesamt acht verschiedene Konzentrationen (höchste Konzentration 100 ppm, gefolgt von einer Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2), ebenfalls bei einer DMSO-

Konzentration von 0,5 %, untersucht. Eine solche Verdünnungsreihe wurde auch von dem Wirkstoff 4, Halofuginonhydrobromid, überprüft, mit einer verwendeten Höchstkonzentration von 1 µM. Der Wirkstoff 30, Paromomycinsulfat (Paromomycin), wurde bei jeder Wirkstoffüberprüfung als Positivkontrolle in einer Konzentration von 3 mM (entspricht 2141,5 ppm) mitgeführt, um eine ca. 90%ige Hemmung des *Cryptosporidium*wachstums zu erzielen. Die eingesetzte Konzentration wurde in Anlehnung an Publikationen von Cai et al. (2005) und Theodos et al. (1998) gewählt. Als weitere Positivkontrolle fungierte vorübergehend der Wirkstoff 31, Nitazoxanid, welcher in einer Konzentration von 30 µM (entspricht 9,21 ppm) eine Inhibition des cryptosporidialen Wachstums in derselben Größenordnung bewirkt (Cai et al., 2005; Theodos et al., 1998). Nitazoxanid wurde bei einer DMSO-Konzentration von 1 % je Vertiefung eingesetzt. Auch von der Positivkontrolle Paromomycin wurden jeweils acht verschiedene Verdünnungsstufen (höchste Konzentration selbige, die eine 90%ige Inhibition des *Cryptosporidium*wachstums bedingen sollte, gefolgt von einer Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2) ausgetestet. Als Negativkontrollen wurden bei jedem Infektionsversuch, der der Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen gegen *C. parvum* diene, vier biologische Replikate eines unbehandelten infizierten Monolayers mitgeführt. Jede Wirkstoffkonzentration wurde in Form eines biologischen Replikates im Doppelansatz untersucht.

Die Wirkstoffapplikation erfolgte im Anschluss an die zweistündige Inkubationsphase der Oocysten. Nachdem die Monolayer zweimal mit Nährmedium (37 °C) gewaschen wurden, um restliche Oocysten und andere nicht invasive Stadien vom Zellrasen zu entfernen, wurde in die Vertiefungen der Gewebekulturschale jeweils soviel Wachstumsmedium vorgelegt, dass nach Wirkstoffzugabe ein Gesamtvolumen von 0,2 ml mit einer DMSO-Konzentration von 0,5 % und der gewünschten Wirkstoffkonzentration erreicht wurde. Die Negativkontrollen wurden mit jeweils 0,2 ml Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO-Zusatz überschichtet. Nach einer 27-stündigen Inkubationsphase bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Wirkstoffe wurden erneut appliziert. Außerdem wurden die Monolayer zu diesem Zeitpunkt makroskopisch als auch mikroskopisch auf Veränderungen und eventuelle Präzipitatbildungen untersucht. Im Weiteren wurde so verfahren, wie im Infektionsversuch beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2).

3.2.3.1 Optimierung der DMSO-Konzentration

Um einen möglichen Effekt der DMSO-Konzentration auf den Infektionserfolg zu überprüfen, wurde ein Infektionsversuch durchgeführt, bei dem infizierte Monolayer für 54 h mit reinem Wachstumsmedium, Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO und mit Wachstumsmedium mit 1 % DMSO überschichtet wurden. Die innerhalb dieses Infektionsversuches isolierte DNA wurde im Anschluss mittels einer quantitativen PCR untersucht (siehe Kapitel 3.4.2).

3.3 DNA-Isolation

3.3.1 DNA-Isolation mit dem NucleoSpin® 8 Tissue Kit (MACHERY-NAGEL)

Bei den Infektionsversuchen mit den Wirkstoffen 1 bis 3, 5 bis 10 sowie 13, 14 und 31 wurde die DNA-Isolation mit dem Kit NucleoSpin® 8 Tissue der Firma MACHERY-NAGEL nach Herstelleranweisung mit Hilfe einer Vakuumpumpe vorgenommen. Hierzu wurde jeder der im letzten Schritt des Infektionsversuches mit PBS gewaschenen Monolayer mit 200 µl eines homogenen Gemisches aus 180 µl Lysispuffer T1 und 25 µl Proteinase K (alle Puffer und Proteinase K im Kit enthalten) überschichtet und über Nacht bei 56 °C im Thermoschüttler bei 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Bindungspuffer BQ1 und 200 µl Ethanol 99,8 % in jede Vertiefung hinzugeben, die Flüssigkeiten durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gründlich miteinander vermischt und auf Säulen mit Silicamatrix geladen. Nach dem Anlegen eines Vakuums (-0,2 bar für 5 min) wurden die Säulen nacheinander mit 600 µl Waschpuffer BW (Vakuum -0,2 bar für 5 min) und zweimal mit 900 µl Waschpuffer B5 (Vakuum -0,2 bar für 5 min) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde für 10 min ein Vakuum mit -0,6 bar angelegt, um letzte Ethanolreste zu entfernen und um die Membranen zu trocknen. Anschließend wurden auf jede Säule 100 µl Elutionspuffer BE aufgetragen, welcher zuvor im Thermoschüttler auf 70 °C erhitzt wurde. Nach einer dreiminütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur wurde ein Vakuum mit -0,4 bar für 2 min angelegt und die gelöste DNA in Reaktionsgefäße überführt.

3.3.2 DNA-Isolation mit dem Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (PROMEGA)

Bei den Infektionsversuchen mit den Wirkstoffen 4, 11 und 12 sowie 15 bis 30 wurde die DNA-Isolation mit dem Maxwell® 16 Research Instrument System der Firma PROMEGA unter Verwendung des Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kits (PROMEGA) durchgeführt.

Jeder der im letzten Schritt des Infektionsversuches mit PBS gewaschenen Monolayer wurde mit 200 µl Lysispuffer und 30 µl Proteinase K (alle Puffer und Proteinase K im Kit enthalten) überschichtet und über Nacht bei 56 °C im Thermoschüttler bei 250 rpm inkubiert.

Anschließend wurden weitere 500 µl Lysispuffer in jede Vertiefung gegeben, die Flüssigkeiten durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gründlich miteinander vermischt und der gesamte Inhalt in die Bindungspuffer enthaltende Vertiefung 1 der Maxwell® 16 LEV DNA Purification Kartuschen überführt. Als Elutionsvolumen wurden 50 µl Elutionspuffer in die im Kit enthaltenen Elutionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde das Protokoll "Blood", "DNA" gestartet (gewähltes Kit sowie verwendete Volumina der Puffer und Protokoll entsprechend Herstellerankunft zur DNA-Isolation aus adhären Zellen). Die DNA enthaltenden Elutionsgefäße wurden nach Beendigung des Protokolls für ca. 5 min in einen MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand gestellt, bevor die eluierte DNA abpipettiert und in beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurde.

3.3.3 DNA-Isolation aus Oocysten

Zur Isolation von DNA aus Oocysten wurde das Kit NucleoSpin® Tissue der Firma MACHERY-NAGEL verwendet. Hierzu wurde der Überstand von 50 µl der bereits aufgereinigten, in PBS mit Zusatz von "Antibiotic Antimycotic Solution" resuspendierten Oocysten vom Genotyp IIA16G2R1 (mittels der Neubauer Zählkammer "improved" ermittelte Konzentration ca. 1×10^8 Oocysten/ml) nach einer 7,5-minütigen Zentrifugation bei $20000 \times g$ abgenommen und die Oocysten anschließend in 200 µl des im Kit enthaltenen Puffers T1 resuspendiert. Um die harte Wand der Oocysten aufzubrechen und somit eine Lysis selbiger zu begünstigen, wurde diese Oocystensuspension vier Zyklen einer "freeze-thaw" Behandlung unterzogen, bevor die DNA-Isolation entsprechend der Herstelleranweisungen durchgeführt wurde. Ein "freeze-thaw" Zyklus umfasste eine dreiminütige Inkubation des Oocystensuspension-enthaltenden Reaktionsgefäßes in einem auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Ethanolbad, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ mit Hilfe eines Thermoblocks (Vorgehen nach Lee et al. (2008), modifiziert). Im Anschluss an den letzten "freeze-thaw" Zyklus wurden nach Abkühlen der Oocystensuspension auf ca. $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer B3 (alle Puffer und Proteinase K im Kit enthalten) zu der Oocystensuspension hinzupipettiert und dieses Gemisch für 10 min bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermoblock inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, Zugabe von 210 µl Ethanol 99,8 % und gründlichem Vermischen der Flüssigkeiten mittels eines Vortexers wurde das homogene Gemisch auf eine Säule mit Silicamatrix (Bestandteil des Kits) geladen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei $11000 \times g$ wurde die Säule nacheinander mit 500 µl Puffer BW ($11000 \times g$ für eine Minute) und 600 µl Puffer B5 ($11000 \times g$ für eine Minute) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule erneut für eine Minute bei $11000 \times g$ zentrifugiert, um letzte Ethanolreste zu entfernen und um die Membranen zu trocknen. Anschließend wurde die Säule in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und 50 µl des auf $70 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmten Elutionspuffers BE auf die Säule aufgetragen. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß mit enthaltener Säule bei $11000 \times g$ für eine Minute zentrifugiert und somit die gelöste DNA in das Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsschritt wurde ein zweites Mal wiederholt und anschließend wurden beide Eluate gepoolt.

3.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Im Anschluss an jede DNA-Isolation wurde der DNA-Gehalt der Proben photometrisch mit Hilfe des Synergy 4 (BIOTEK) bestimmt. Hierzu wurden 2 µl der Proben im Doppelansatz auf eine Take3™ Multi-Volume Platte (BIOTEK) aufgetragen und deren Absorption bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm gemessen.

Bei der Wellenlänge von 320 nm handelt es sich um die Referenzwellenlänge, das heisst, reine Nukleinsäuren zeigen bei dieser Wellenlänge eine Absorption von null. Mit Hilfe der

Referenzwellenlänge können Verunreinigungen der Probe erfasst und die Messwerte dahingehend korrigiert werden.

Bei der Wellenlänge von 260 nm absorbieren hingegen alle Nukleinsäuren. Die optische Dichte einer reinen doppelsträngigen DNA mit einem Gehalt von 50 µg/ml beträgt bei dieser Wellenlänge 1. Somit kann anhand folgender Formel der DNA-Gehalt einer Probe ermittelt werden:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = ((\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml})$$

Um Aussagen zur Verunreinigung der Probe mit Proteinen treffen zu können, wurde die Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren zwar zu einem geringen Teil auch Nukleinsäuren, vor allem aber aromatische Aminosäuren. Über den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ kann folglich der Grad der Reinheit der DNA Probe ermittelt werden. Eine optimale Reinheit entspricht einem Quotienten von 1,8 bis 2. Der Quotient sinkt mit steigender Protein-Kontamination der DNA-Probe (Sambrook und Russel, 2001).

3.4 PCR

3.4.1 Konventionelle PCR

Die im Rahmen der Infektionsversuche isolierte DNA wurde in der PCR eingesetzt und die gewählte Zielsequenz mittels Primern amplifiziert. Die für die PCR benötigten Reagenzien wurden aliquotiert und entweder bei Raumtemperatur (nukleasefreies Wasser, ROTH) oder bei -20 °C eingefroren aufbewahrt. Zum Ansetzen eines Mastermixes wurden die einzelnen Bestandteile vor Arbeitsbeginn aufgetaut und der Mastermix selbst während der darauf folgenden Arbeitsschritte auf Eis gelagert. Das Ansetzen des Mastermixes und die Zugabe der DNA-Proben erfolgte in separaten Räumen.

Die verwendeten Primer wurden von Awad-el-Kariem et al. (1994) auf Basis der Sequenz des 18S rRNA Gens entwickelt.

Tab. 3.4.1.1 Verwendete Primer nach Awad-el-Kariem et al. (1994) zum Nachweis cryptosporidialer DNA (V= Vorwärtsprimer, R= Rückwärtsprimer, Ref.-Nr.= Referenznummer entsprechend verwendeter Sequenz in GenBank)

Zielgen	Typ	Name	Sequenz (5'-3')	Nukleotid-position	Sequenz-größe [bp]	Ref.-Nr.
18S rDNA	V	CP18S-995F	TAGAGATTGGAGGTTGTTCCCT	985-1005	255	AB513881
	R	CP18S-1206R	CTCCACCAACTAAGAACGGCC	1239-1219		

Die numerische Benennung der Primer erfolgte durch Rochelle et al. (1997), welche in einer Studie unter anderem die von Awad-el-Kariem et al. (1994) designten Primer verwendeten, die Awad-el-Kariem et al. in ihrer Publikation aus dem Jahr 1994 ursprünglich nur als "internal Primer" einer "nested" PCR bezeichneten. Ein textlicher Verweis, auf

welchen Eintrag in GenBank sich diese numerische Benennung bezieht, fehlt in der Publikation von Rochelle et al. (1997). Die durch Rochelle et al. (1997) erfolgte numerische Benennung wurde in späteren Publikation von Abrahamsen und Schroeder (1999) und von Cai et al. (2005) übernommen und somit auch in dieser Arbeit weitergeführt.

Sowohl der Vorwärtsprimer CP18S-995F als auch der Rückwärtsprimer CP18S-1206R wurden in lyophilisiertem Zustand bei der Firma INVITROGEN bezogen, in nukleasefreiem Wasser in einer Konzentration von 100 µM gelöst und bei -20 °C eingefroren aufbewahrt.

Die Amplifizierung der 255 bp langen Zielsequenz erfolgte mittels der Maxima® Hot Start Taq Polymerase (FERMENTAS). Ein 50 µl Volumen umfassender PCR-Reaktionsansatz beinhaltete 5 µl 10× Maxima® Hot Start Taq buffer, 200 µM Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP Mix, 10 mM each, FERMENTAS), 1,5 mM Magnesiumchlorid (25 mM MgCl₂, FERMENTAS), 0,3 µM Vorwärtsprimer, 0,3 µM Rückwärtsprimer, 2,5 U Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase, 1 µl der isolierten DNA (verdünnt auf eine Konzentration von 300 ng/µl) und 32,5 µl nukleasefreies Wasser. An eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min schlossen sich 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Primerhybridisierung ("Annealing") bei 60 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 30 s an. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurden die Proben bis zur Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 4 °C gekühlt gelagert. Die Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch in 1×TAE-Puffer auf 1,5%igen Agarosegelen. Als Größenstandard diente ein 100 bp Marker (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, FERMENTAS). Bei jeder Untersuchung der DNA-Proben wurde eine Kontrolle ohne Template (NTC) mitgeführt.

3.4.1.1 Optimierung konventionelle PCR

Neben den Primern von Awad-el-Kariem et al. (1994) wurden drei weitere Primerpaare von Lee et al. (2008) zum Nachweis cryptosporidialer DNA verwendet (siehe Tabelle 3.4.1.1.1).

Tab. 3.4.1.1.1 Verwendete Primer nach Lee et al. (2008) zum Nachweis cryptosporidialer DNA (V= Vorwärtsprimer, R= Rückwärtsprimer, Ref.-Nr.= Referenznummer entsprechend verwendeter Sequenzen in GenBank)

Zielgen	Typ	Name	Sequenz (5'-3')	Nukleotid-position	Sequenz-größe [bp]	Ref.-Nr.
CP2	V	CP2-F	AAAACAAAACTACTCAGACTCAAG	1520–1544	223	AY471868
	R	CP2-R	GGGTTGTAACTTCATTGACTTT	1743–1721		
COWP	V	Cp-COWP-F	TTCAATTTGTCAGGACAACA	1173–1192	247	Z22537
	R	Cp-COWP-R	GGTTGAGTTGGAGCAGAAC	1420–1402		
18S rRNA	V	Cp-18S-F	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	192–217	189	AF164102
	R	Cp-18S-newA	TCTCAGGCTCCCTCTCC	380–364		

Auch bei Verwendung der oben genannten Primer nach Lee et al. (2008) erfolgte die Amplifizierung der Zielsequenzen mittels der Maxima® Hot Start *Taq* Polymerase (FERMENTAS). Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze war wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Das PCR-Protokoll umfasste eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min, 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primerhybridisierung ("Annealing") bei 50 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 60 s, sowie eine finale Extension bei 72 °C für 10 min. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe mit Hilfe von 1,5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.2 Quantitative real-time PCR (relative Quantifizierung)

Die im Rahmen der Infektionsversuche und Wirkstoffüberprüfung isolierte DNA wurde mittels einer quantitativen real-time PCR (qPCR) untersucht. In jeder DNA-Probe mit einem Gehalt ≥ 40 ng/ μ l wurde anhand zweier qPCR-Durchläufe sowohl der Gehalt an cryptosporidialer 18S rDNA als auch an 18S rDNA humanen (zellulären) Ursprungs ermittelt. Der Nachweis der humanen 18S rDNA fungierte als interne Kontrolle. Auf diese Weise konnte für jede DNA-Probe der ermittelte Gehalt an cryptosporidialer 18S rDNA normiert werden (relative Quantifizierung). Diese Form der Datenauswertung wurde mit der Software Bio-Rad CFX Manager 2.0 durchgeführt und entspricht der $\Delta\Delta Cq$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienzen nach Hellemans et al. (2007). Der Terminus „relative *C. parvum* Entwicklung“ bezeichnet daher im Folgenden das so berechnete relative Verhältnis von cryptosporidialer zu humaner (zellulärer) 18S rDNA, normiert auf die jeweilige Kontrolle, deren Mittelwert daher immer gleich eins ist.

Die verwendeten Primer zum spezifischen Nachweis humaner 18S rDNA wurden von Cai et al. (2005) auf Basis eines Vergleichs zwischen veröffentlichten Sequenzen für das cryptosporidiale und humane 18S rRNA Gen (NCBI Reference Sequence: NR_003286.2, Gene ID: 100008588 RN18S1) entwickelt (siehe Tabelle 3.4.2.1).

Tab. 3.4.2.1 Verwendete Primer nach Cai et al. (2005) zum Nachweis humaner (zellulärer) DNA (V= Vorwärtsprimer, R= Rückwärtsprimer, Ref.-Nr.= Referenznummer entsprechend verwendeter Sequenz in GenBank)

Zielgen	Typ	Name	Sequenz (5'-3')	Nukleotid-position	Sequenz-größe [bp]	Ref.-Nr.
18S rDNA	V	Hs18S-F1373	CCGATAACGAACGAGACTCTGG	1373-1394	189	NR_003286
	R	Hs18S-R1561	TAGGGTAGGCACACGCTGAGCC	1561-1540		

Mit Hilfe des Vorwärtsprimers Hs18S-F1373 und des Rückwärtsprimers Hs18S-R1561 wurde ein 189 bp langes Amplifikat erzeugt. Die verwendeten Primer zum Nachweis der cryptosporidialen 18S rDNA sind identisch zu den in der konventionellen PCR verwendeten

(siehe Tabelle 3.4.1.1). Beide Primerpaare wurden in lyophilisiertem Zustand bei der Firma INVITROGEN bezogen, in nukleasefreiem Wasser in einer Konzentration von 100 µM gelöst und bei -20 °C eingefroren aufbewahrt. Sämtliche für die qPCR benötigten Reagenzien wurden aliquotiert und entweder bei Raumtemperatur (nukleasefreies Wasser, mit GoTaq® qPCR Master Mix mitgeliefert, PROMEGA) oder bei -20 °C eingefroren aufbewahrt. Erst unmittelbar vor Arbeitsbeginn wurden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsmixes aufgetaut.

Die Amplifizierung beider Zielsequenzen erfolgte mittels des GoTaq® qPCR Master Mixes (PROMEGA). Ein PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl beinhaltete 12,5 µl GoTaq® qPCR Master Mix, 0,3 µM Vorwärtsprimer, 0,3 µM Rückwärtsprimer, 9 µl nukleasefreies Wasser und 2 µl der isolierten DNA. Das oben beschriebene Verfahren der relativen Quantifizierung ermöglichte das Entfallen des Einstellens des Templates auf eine einheitliche Konzentration.

Entsprechend der Probenanzahl incl. Standardreihe und NTC wurde ein Vielfaches der Bestandteile eines Reaktionsansatzes in einem Reaktionsgefäß vereinigt, dieser "Mastermix" gründlich mit Hilfe eines Vortexers (IKA) durchmischt, kurz zentrifugiert (Minizentrifuge MCF-2360, LMS-GROUP) und anschließend wurden 23 µl dieses Gemisches mit einer elektronischen Pipette (BIOHIT) in die Vertiefungen einer weißen 96-Loch PCR-Platte vorgelegt. Die Zugabe der DNA-Proben erfolgte in einem separaten Raum. Nach Zugabe der DNA wurde die 96-Loch PCR-Platte mit einer klaren, adhäsiven Folie verschlossen und für 30 s bei 1000×g zentrifugiert, bevor sie in den Cycler (CFX96™ Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD) gestellt und das Programm gestartet wurde. Das Programm bestand aus folgenden Schritten: einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 2 min und 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 20 s, Primerhybridisierung ("Annealing") bei 60 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 30 s. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse im Temperaturbereich von 65-95 °C (Protokoll nach Cai et al. (2005), modifiziert).

Jede DNA-Probe wurde im Doppelansatz untersucht. Des Weiteren wurde bei jeder qPCR eine Standardreihe mitgeführt, die das Erstellen einer Standardkurve ermöglichte. Mittels dieser Kurve konnte dem in der qPCR ermittelten Cq-Wert ("quantification cycle") einer DNA-Probe die darin enthaltene Kopienanzahl der Zielsequenz zugeordnet werden. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden definierte Anzahlen von Kopien der Zielsequenzen (cryptosporidiale und humane 18S rDNA) als Template in die qPCR eingesetzt. Auch die Standardkurve wurde als Doppelansatz durchgeführt. Bei der NTC wurden 2 µl nukleasefreies Wasser anstelle des Templates eingesetzt.

Eine Auswertung der Proben erfolgte nur vorbehaltlich keiner Amplifikation der NTCs.

3.4.2.1 Herstellung der Standards

Zur Etablierung einer qPCR ist die Herstellung eines Standards Voraussetzung. Als Standard fungierten in beiden qPCRs Plasmide, in die die jeweilige Zielsequenz (d.h. exakt das Amplikon der jeweiligen qPCR) ligiert worden war. Mit Hilfe der Plasmide konnten definierte Mengen der Zielsequenzen in der qPCR als Template eingesetzt werden. Im Falle der cryptosporidialen Zielsequenz erstreckten sich die als Template eingesetzten Kopienzahlen über Verdünnungsstufen von 10^6 bis 10^1 , für die humane Zielsequenz über 1:10 Verdünnungen mit 10^7 bis 10^2 Kopienzahlen. Anschließend wurde anhand der Verdünnungsstufen eine Standardkurve mit einer linearen Beziehung zwischen dem ermittelten C_q-Wert und der jeweils eingesetzten Templatemenge generiert. So konnte im Folgenden über den ermittelten C_q-Wert einer unbekanntes DNA-Probe, die darin ursprünglich enthaltene Templatemenge zugeordnet werden.

Zur Herstellung der Standards wurde nach erfolgreicher Infektion der HCT-8 Zellen die DNA isoliert (siehe Kapitel 3.3) und diese mit den spezifischen Primern für cryptosporidiale und humane 18S rDNA im Rahmen einer konventionellen PCR amplifiziert. Nach einer Überprüfung der gewünschten Größe der PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5), wurden die PCR-Produkte erneut auf ein Agarosegel aufgetragen. Diesmal wurde der gesamte restliche PCR-Ansatz einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen und die DNA anschließend wieder aus dem Agarosegel extrahiert (siehe Kapitel 3.6). Die somit aufgereinigte DNA wurde kloniert (siehe Kapitel 3.7), das Plasmid durch eine Miniprep extrahiert (siehe Kapitel 3.8.1) und die korrekte Basenpaarabfolge durch eine externe Sequenzierung (siehe Kapitel 3.8.4) bestätigt. Indem der ermittelte DNA-Gehalt (siehe Kapitel 3.3.4) der isolierten DNA von ng/μl in Kopienanzahl/μl umgerechnet wurde, konnten anschließend definierte Kopienzahlen als Template in den qPCRs eingesetzt werden.

3.4.2.2 Optimierung der qPCR

Nach Austestung verschiedener Annealingtemperaturen (Temperaturgradient von 50-60 °C) wurde diese, abweichend von der von Cai et al. (2005) genutzten Annealingtemperatur (50 °C), auf 60 °C erhöht.

3.4.3 Quantitative real-time PCR (absolute Quantifizierung)

Die im Rahmen eines Infektionsversuches isolierte DNA sollte zusätzlich mittels einer sondenbasierten qPCR auf den Gehalt an cryptosporidialer 18S rDNA untersucht werden. In diesem Versuch wurde Paromomycin in acht Verdünnungsstufen (höchste Konzentration 3 mM, anschließend 1:2 Verdünnungen) als Wirkstoff eingesetzt. Indem jeder Probe unmittelbar vor der DNA-Isolation ein externer Standard in definierter Anzahl (5×10^5 Kopien je Probe) zugesetzt wurde, sollte eine absolute Quantifizierung ermöglicht werden.

Zur DNA-Isolation wurde hier ebenfalls das Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (PROMEGA) genutzt, welches laut Herstellerangabe auch zur parallelen Isolation von genomischer DNA und Plasmid-DNA geeignet ist.

Aufgrund der Zugabe des externen Standards in Form von Plasmiden und der damit einhergehenden Verfälschung des DNA-Gehaltes des Proben erfolgte im Anschluss an die DNA-Isolation an dieser Stelle keine photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes.

Die verwendeten Primer und Sonden wurden auf Basis der Sequenz des cryptosporidialen Standards, welcher im Rahmen der qPCR zur relativen Quantifizierung hergestellt wurde, mittels Primer Express® V. 3.0 entwickelt (siehe Tabelle 3.4.3.1).

Tab. 3.4.3.1 Verwendete Primer und Sonden zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA im Rahmen einer quantitativen real-time PCR mit dem Ziel einer absoluten Quantifizierung (V= Vorwärtsprimer, R= Rückwärtsprimer, S =Sonde, Nukleotidpositionen entsprechend verwendeter Sequenz AB513881 in GenBank)

Zielgen	Typ	Name	Sequenz (5'-3')	Nukleotidposition	Sequenzgröße [bp]
18S rDNA	V	FPCPMGB1	GATTGGAGGTTGTTCCCTTACTCCTT	989-1013	67
	R	RPCPMGB1	TCCCCCAGAACCCAAAG	1055-1038	
	S	ProbeCPMGB1	CACCTTATGAGAAATCA	1017-1033	
18S rDNA, mutagenisiert	S	ProbeCPmutVMGB2	CACCTTAACTCAAATCAA	1017-1034	

Mit Hilfe des Vorwärtsprimers FPCPMGB1 und des Rückwärtsprimers RPCPMGB1 wurde ein 67 bp langes Amplifikat erzeugt. Bei der verwendeten Sonde zum Nachweis der cryptosporidialen 18S rDNA handelt es sich um eine TaqMan Minor Groove Binder (MGB) Sonde, bei der FAM als Fluorophor gewählt wurde (ProbeCPMGB1).

Als externer Standard fungierte die eigentliche Zielsequenz, welche durch *in vitro* Mutagenese derart verändert wurde, dass innerhalb des Abschnitts, an den die Sonde ProbeCPMGB1 bindet, vier Basen ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 3.4.3.1). Somit wurde der externe Standard mit den oben genannten Primern im Rahmen der qPCR mitamplifiziert, aber dessen Amplifizierung durch eine zweite MGB Sonde (ProbeCPmutVMGB2), welche spezifisch an die veränderte Sequenz bindet, detektiert. Als Fluorophor für die zweite Sonde wurde VIC gewählt. Sowohl Primer als auch Sonden wurden bei APPLIED BIOSYSTEMS bezogen.

originäre Zielsequenz

5'-GATTGGAGGTTGTTCCCTTACTCCTTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA-3'

veränderte Zielsequenz

5'-GATTGGAGGTTGTTCCCTTACTCCTTCAGCACCTTAACTCAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA-3'

Abb. 3.4.3.1 Originäre und durch *in vitro* Mutagenese veränderte Zielsequenz der sondenbasierten qPCR (Vorwärtsprimer in rot, Rückwärtsprimer in blau, Sondenbereich in grün abgebildet; Basenaustausch im Sondenbereich durch rote rechteckige Umrandung markiert)

Die Amplifizierung der Zielsequenzen erfolgte mittels des Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (2×) (FERMENTAS). Ein PCR-Reaktionsansatz beinhaltete 12,5 µl Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (2×), 0,3 µM Vorwärtsprimer, 0,3 µM Rückwärtsprimer, 0,2 µM ProbeCPMGB1, 0,2 µM ProbeCPmutVMGB2, 2 µl der isolierten DNA und wurde mit 8 µl nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Wie bei der qPCR mit dem Ziel einer relativen Quantifizierung wurde entsprechend der Probenanzahl incl. Standardreihe und NTC ein Vielfaches der Bestandteile eines Reaktionsansatzes in einem Reaktionsgefäß vereinigt, dieser Mastermix gründlich mit Hilfe eines Vortexers (IKA) durchmischt, kurz zentrifugiert (Minizentrifuge MCF-2360, LMS-GROUP) und anschließend wurden 23 µl dieses Gemisches mit einer elektronischen Pipette (BIOHIT) in die Vertiefungen einer weißen 96-Loch PCR-Platte vorgelegt. Auch hier erfolgte die Zugabe der DNA-Proben in einem separaten Raum. Nach Zugabe der DNA wurde die 96-Loch PCR-Platte mit einer klaren, adhäsiven Folie verschlossen und für 30 s bei 1000×g zentrifugiert, bevor die Platte in den Cyclex (CFX96™ Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD) gestellt und das Programm gestartet wurde. Das Programm bestand aus folgenden Schritten: einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 min und 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Primerhybridisierung ("Annealing") bei 61 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 30 s. Jede DNA-Probe wurde im Doppelansatz untersucht.

Die bei jeder qPCR mitgeführte Standardreihe ermöglichte das Erstellen zweier Standardkurven. Als Template für die Standardkurven wurde ein Mix mit jeweils 10¹ bis 10⁶ Kopien der originären und veränderten Zielsequenz eingesetzt. Mittels dieser Kurven sollte dann der Gehalt an zugegebenem externen Standard und an in der DNA-Probe enthaltender cryptosporidialer 18S rDNA ermittelt werden. Auch die Standardreihe wurde als Doppelansatz durchgeführt. Bei der NTC wurden 2 µl nukleasefreies Wasser anstelle des Templates eingesetzt.

3.4.3.1 Herstellung der Standards

Als Standard fungierten in der sondenbasierten qPCR ebenfalls Plasmide, in die die jeweilige Zielsequenz ligiert worden war und mit Hilfe derer definierte Anzahlen der Zielsequenzen in der qPCR als Template eingesetzt werden konnten.

Als Template wurde ein Mix der beiden Plasmide eingesetzt, welcher eine Gesamtmenge von 2×10^1 bis 2×10^6 Kopien der Zielsequenzen je 2 μl enthielt, wobei beide Zielsequenzen zu gleichen Teilen enthalten waren. Somit konnten anhand der Verdünnungsstufen parallel zwei Standardkurven mit einer linearen Beziehung zwischen dem ermittelten Cq-Wert und der jeweils eingesetzten Templatemenge generiert werden.

3.4.3.1.1 Herstellung des originären cryptosporidialen Standards

Um die für die sondenbasierte qPCR bestimmten Primer (siehe Tabelle 3.4.3.1) auszutesten, wurde eine *Bryt™ Green* (im *GoTaq® qPCR Master Mix* von *PROMEGA* enthaltener Fluoreszenzfarbstoff) basierte qPCR mit einem Temperaturgradienten durchgeführt. Als Template wurde zum einen aus *C. parvum* Oocysten isolierte DNA (Verfahren siehe Kapitel 3.3.3) und zum anderen aus HCT-8 Zellen isolierte DNA eingesetzt. Somit konnte im Rahmen dieser qPCR neben der Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur (61 °C), welche auch später für den *Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (2×)* (*FERMENTAS*) bestätigt werden konnte, auch die Spezifität der Primer anhand der Schmelzkurvenanalyse überprüft werden. Im Anschluss an die qPCR wurde die gewünschte Größe des PCR-Produktes, bei dem cryptosporidiale DNA als Template eingesetzt wurde und dem die optimale Annealingtemperatur zugeordnet werden konnte, durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5) bestätigt. In einer zweiten Agarose-Gelelektrophorese wurde der gesamte restliche PCR-Ansatz aufgetragen und die DNA anschließend wieder aus dem Agarosegel extrahiert (siehe Kapitel 3.6). Die somit aufgereinigte DNA wurde kloniert (siehe Kapitel 3.7), das Plasmid durch eine Miniprep extrahiert (siehe Kapitel 3.8.1) und die korrekte Basenpaarabfolge durch eine externe Sequenzierung (siehe Kapitel 3.8.4) bestätigt. Nach Umrechnung des ermittelten DNA-Gehalts (siehe Kapitel 3.3.4) der isolierten DNA von ng/ μl in Kopienanzahl/ μl , konnten anschließend definierte Kopienzahlen als Template in der qPCR eingesetzt werden.

3.4.3.1.2 Herstellung des *in vitro* mutagenisierten cryptosporidialen Standards

Die Zielsequenz mit den gewünschten Basenaustauschen im Sondenbereich wurde von *INVITROGEN* synthetisiert und anschließend in einer konventionellen PCR mit dem Vorwärtsprimer *FPCPMGB1* (5'-GAT TGG AGG TTG TTC CTT ACT CCT T-3') und dem Rückwärtsprimer *RPCPMGB1* (5'-TCC CCC CAG AAC CCA AAG-3') als Template verwendet (siehe Tabelle 3.4.3.1). Der PCR-Reaktionsansatz beinhaltete 0,625 U *Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase* (*FERMENTAS*), 2,5 μl *10× Maxima® Hot Start Taq buffer*, 100 μM Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP Mix, 10 mM each, *FERMENTAS*), 0,75 mM Magnesiumchlorid (25 mM MgCl_2 , *FERMENTAS*), 0,3 μM Vorwärtsprimer, 0,3 μM Rückwärtsprimer, 1 μl Template (6000 Kopien der Zielsequenz beinhaltend) und wurde mit 17,5 μl nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 μl aufgefüllt. Das PCR-

Protokoll umfasste eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min und 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primerhybridisierung bei 61 °C für 30 s und Extension bei 72 °C für 60 s, gefolgt von einer finalen Extension bei 72 °C für 5 min. Mit dem PCR-Produkt wurde anschließend verfahren wie in 3.4.3.1.1 beschrieben.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch in Agarosegelen verschiedener Konzentrationen (0,8%ig, 1,5%ig, 2,5%ig) in 1×TAE-Puffer. Zur Herstellung der Gele wurde die erforderliche Menge an Agarose abgewogen und in 500 ml 1×TAE-Puffer aufgekocht, bis eine klare Flüssigkeit entstanden war. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 65 °C wurde ein Aliquot zur späteren Anfärbung der DNA mit GRGreen (LABGENE SCIENTIFIC SA) in einer Konzentration von 0,1 µl je ml Agarose versetzt. Anschließend wurde das Gel zum Aushärten in einen mit einem Kamm bestückten Gelträger gegossen. Nach dem Aushärten des Gels, ersichtlich an der opaken Trübung des ursprünglich klaren Gels, wurde selbiges in eine mit 1×TAE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer überführt, der Kamm vorsichtig entfernt und die nun als Taschen dienenden Vertiefungen mit den einzelnen DNA-Proben und dem gewählten Größenstandard befüllt. Die Proben wurde unmittelbar vor dem Befüllen der Geltaschen mittels destilliertem Aqua bidest. und sechsfach konzentriertem Ladungspuffer (d.h. dessen Volumen sollte ein sechstel des gesamten Probenvolumens betragen), auf 24 µl Probenvolumen aufgefüllt. Der gewählte als Größenstandard fungierende Marker wurde mittels destilliertem Aqua bidest. und sechsfach konzentriertem Ladungspuffer auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt, bevor die für den Marker vorgesehenen Geltaschen mit einem Volumen von 5 µl befüllt wurden (entsprechend 125 ng).

Nach der Präparation des Gels wurde eine Spannung von 3-4 V/cm angelegt, so dass die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels des fluoreszierenden GRGreen auf einem UV-Tisch oder unter Blaulicht visualisiert und konnten photographiert oder zur Weiterverarbeitung (DNA-Extrahierung) ausgeschnitten werden.

3.6 DNA-Extrahierung aus einem Agarosegel

Eine Anhäufung gleich großer, mittleres GRGreen angefärbter DNA-Fragmente erscheint unter UV-Licht als helle Bande, die, soweit klar abgesetzt und abgrenzbar, eine Rückgewinnung der DNA aus dem verwendeten Agarosegel ermöglicht. Hierfür wurde die entsprechende Bande, möglichst ohne überschüssige Gelanteile, unter Verwendung eines mit Blaulicht-Konverter ausgestatteten UV-Tisches, mittels einer Skalpellklinge quaderförmig aus dem Gel ausgeschnitten. Der die DNA-Bande enthaltende Quader wurde anschließend auf den Filter einer gekürzten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß befindlichen 1000 µl Pipettenfilterspitze

überführt. Nach einem zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei ca. 11000×g und der damit verbundenen Auftrennung von flüssigen und festen Gelbestandteilen, wurde das Volumen des Durchflusses bestimmt. Eine Fällung der im Durchfluss enthaltenen DNA wurde erreicht, indem dem Durchfluss nacheinander 1 µl Glykogen (20 mg/ml, FERMENTAS), 1/10 des Durchflussvolumens 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und im Verhältnis 1:1 Isopropanol zugesetzt wurde. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Probe bei 4 °C für 45 min bei 20817×g zentrifugiert, so dass sich die gefällte DNA in Form eines Pellets am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzt hatte. Der Überstand wurde abpipettiert und die DNA mit 75%igem DEPC-Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4 °C für 10 min bei 20817×g. Dieser Waschschrift wurde ein Mal wiederholt. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet für ca. 5 min an der Luft getrocknet, bevor die konzentrierte DNA in 10 µl autoklaviertem Aqua bidest. gelöst wurde und für weitere Anwendungen genutzt werden konnte.

3.7 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (INVITROGEN)

Bei einer Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing wird ein via *Taq*-Polymerase amplifiziertes PCR-Produkt in einen Plasmidvektor ligiert. Anschließend wird dieser modifizierte Plasmidvektor in chemisch kompetente *E. coli* Zellen eingeschleust, so dass diese selbigen bei der Zellteilung mitvermehren.

3.7.1 Ligation

Bei der Amplifizierung mittels einer *Taq*-Polymerase werden am 3'-Ende des PCR-Produktes A-Überhänge, sogenannte "sticky ends", produziert. Der Plasmidvektor des verwendeten Kits, pCR®4-TOPO®, ist zur erfolgreichen Ligation mit T-Überhängen ausgestattet, an welche die A-Überhänge der PCR-Produkte ligiert werden können. Der Ligationsschritt wird durch eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase katalysiert.

Die Ligation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl Salzlösung (im Kit enthalten) und 0,5 µl pCR®4-TOPO® Vektor, in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.7.2 Transformation in One Shot® TOP10 Zellen (INVITROGEN)

Im Anschluss an die Ligation wurden die modifizierten Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Hierfür wurden die bei -80 °C gelagerten One Shot® TOP10 Zellen ca. zehn bis 15 min auf Eis aufgetaut, bevor 2 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase auf Eis wurden die Zellen für 30 s einem Hitzeschock in einem auf 42 °C temperierten Wasserbad ausgesetzt. Anschließend wurden zu dem Ansatz 250 µl erwärmtes (37 °C) S.O.C Medium (im Kit enthalten) hinzugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm im Wärmeschüttelschrank inkubiert. Nach

der einstündigen Inkubationsphase wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin oder Kanamycin-Zusatz (siehe Kapitel 3.7.4) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C erneut im Wärmeschüttelschrank inkubiert.

3.7.3 Bakterienkulturen

Von den bewachsenen LB-Agarplatten wurden ca. vier bis fünf Einzelkolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und mitsamt der Spitze einzeln in mit 5 ml LB-Medium befüllte Röhrchen überführt. Das LB-Medium enthielt den gleichen Antibiotika-Zusatz wie die zuvor verwendeten LB-Agarplatten. Das beimpfte Medium wurde anschließend ca. 14 h bei 37 °C und 200 rpm im Wärmeschüttelschrank inkubiert, bevor mit der Plasmidpräparation begonnen wurde. Wurden größere Ausbeuten benötigt, z.B. für eine Midiprep (siehe Kapitel 3.8.2), wurde entsprechend mehr LB-Medium beimpft.

3.7.4 Antibiotikazusätze

Der verwendete Plasmidvektor, pCR®4-TOPO®, besitzt neben den T-Überhängen noch weitere Modifikationen. Er trägt unter anderem sowohl ein Resistenzgen für Kanamycin als auch für Ampicillin. Diese Resistenzgene dienen der Selektion erfolgreich transformierter Zellen, indem dem verwendeten Wachstumsmedium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt werden. Nicht transformierte Zellen werden durch diese Zusätze am Wachstum gehindert. Als Zusatz zum LB-Medium und LB-Agar wurden Kanamycin oder Carbenicillin in Konzentrationen von 50 µg/ml verwendet. Carbenicillin wurde anstelle von Ampicillin verwendet, da dieses semisynthetische Penicillin-Analogon ebenfalls zu den β -Lactam Antibiotika zählt, aber gegenüber β -Lactamasen eine höhere Stabilität aufweist.

3.7.5 Glycerolstocks

Um für spätere Verwendungen Bakterienkulturen langfristig zu lagern, wurden 500 µl der flüssigen Bakterienkultur mit 500 µl autoklavierter Glycerollösung vermischt. Das Gemisch wurde 2 h auf Eis inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Glycerolstocks aufgetaut und anschließend ein fraktionierter Ausstrich auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum-Zusatz durchgeführt.

3.8 Plasmidpräparation

3.8.1 Miniprep

Zur Plasmidpräparation wurde der NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma MACHERY&NAGEL verwendet. Hierfür wurden 2 ml der Flüssigkulturen in Reaktionsgefäße überführt und diese für 30 s bei 11000×g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal in demselben Reaktionsgefäß wiederholt. Die restliche Flüssigkeit der Flüssigkultur wurde zur Herstellung von Glycerolstocks (siehe Kapitel 3.7.5) und ggf. zum Animpfen einer weiteren Flüssigkultur

verwendet. Die Plasmidpräparation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die einzige Abweichung vom Herstellerprotokoll bestand in der Verwendung von autoklaviertem, auf ca. 65 °C vorerwärmtem Aqua bidest. anstelle des im Kit mitgelieferten Elutionspuffers.

3.8.2 Midiprep

Sollten im Rahmen der Plasmidpräparation größere Erträge erzielt werden, wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep System der Firma PROMEGA verwendet. Hierfür wurden großvolumigere Flüssigkulturen (50 ml) mit den transformierten *E. coli* Zellen beimpft und ca. 16 h bei 37 °C und 200 rpm im Wärmeschüttelschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmidpräparation nach Herstellerangaben. Ergänzend zum Herstellerprotokoll wurde das zur Elution verwendete nukleasefreie Wasser (im Kit enthalten) auf ca. 65 °C erwärmt.

3.8.3 Kontrolle des Inserts

Der pCR®4-TOPO® Vektor weist zwei das Insert flankierende *EcoRI*-Schnittstellen in der "multiple cloning site" auf. Dadurch besteht die Möglichkeit, das Insert unter Verwendung des entsprechenden Enzyms aus dem Vektor herauszuschneiden und in einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5) auf seine gewünschte Größe zu überprüfen. Die Reaktion zum Restriktionsenzymverdau mit dem Enzym *EcoRI* wurde wie folgt angesetzt:

16,5 µl autoklaviertes Aqua bidest.

2,5 µl 10×Puffer (FERMENTAS)

0,5 µl *EcoRI* (10 U/µl, FERMENTAS)

1,0 µl Plasmid-DNA

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel analysiert (siehe Kapitel 3.5). Des Weiteren wurde die Menge an isolierter Plasmid-DNA, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, bestimmt.

3.8.4 Sequenzanalyse

Um Plasmid-Inserts auf ihre korrekte Sequenz hin zu überprüfen, wurde die gewonnene Plasmid-DNA durch ein externes Unternehmen, GATC Biotech AG in Konstanz, unter Verwendung der Standardprimer M13-FP (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') und M13-RP (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3') sequenziert.

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte ebenfalls durch dieses Unternehmen. Hierfür wurden neben dem PCR-Produkt die in der jeweiligen PCR genutzten Primer an die GATC Biotech AG in Konstanz versendet.

Anschließend wurden die Sequenzen mit Hilfe des Programms "Clone Manager Professional 9" und dem "basic local alignment search tool" (BLAST) der NCBI Datenbank bearbeitet und ausgewertet.

3.9 Viabilitäts und- Zytotoxizitätsassays

3.9.1 Lactatdehydrogenase-Assay

Der Lactatdehydrogenase-Assay wurde mit dem Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} (LDH) der Firma ROCHE durchgeführt. Bei diesem Assay handelt es sich um ein kolorimetrisches Testverfahren zur Quantifizierung der Zytotoxizität. Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches durch Beschädigung der Zellmembran (Zytolyse) aus den Zellen freigesetzt und in den Überstand der Zellkultur abgegeben wird.

Bei der Oxidation von Laktat zu Pyruvat reduziert LDH gleichzeitig NAD^+ zu NADH. Durch Zugabe eines im Kit enthaltenen Katalysators, Diaphorase, wird ein Reduktionsäquivalent auf das Tetrazoliumsalz INT übertragen und selbiges somit zu einem wasserlöslichen Formazan-Produkt reduziert. Dieser Reduktionsschritt führt zu einem Farbumschlag von blassgelb nach rot. Je mehr Zellen geschädigt werden, umso höher ist die im Überstand vorliegende LDH-Aktivität und somit in der Folge die Menge an gebildetem Formazan. Da die Menge an gebildetem Formazan-Produkt direkt mit der Höhe der LDH-Aktivität korreliert, ist die Menge an gebildetem Farbstoff proportional zur Anzahl der lysierten Zellen.

Die Absorption der Formazan-Produkte wurde bei einer Testwellenlänge von 490 nm gemessen, als Referenzwellenlänge wurden 690 nm festgelegt.

Mit Hilfe des LDH-Assays wurden insgesamt vier Wirkstoffe in acht verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 3.9.1.1) bei einer DMSO-Konzentration von 0,5 % auf zytotoxisches Potential untersucht: Paromomycin, Halofuginonhydrobromid (Halofuginon), BAY-AB24992 und BAY-AF76184. Jede Wirkstoffkonzentration wurde in mindestens drei Versuchsdurchläufen als Dreifachansatz überprüft.

Tab. 3.9.1.1 Im LDH-Assay überprüfte Wirkstoffe und verwendete Konzentrationen [μM] (ppm)

Wirkstoff	überprüfte Konzentrationen [μM] (ppm)							
BAY-AB24992	259,05 (100,00)	129,53 (50,00)	64,76 (25,00)	32,38 (12,50)	16,19 (6,25)	8,10 (3,13)	4,05 (1,56)	2,02 (0,78)
BAY-AF76184	285,70 (100,00)	142,85 (50,00)	71,43 (25,00)	35,71 (12,50)	17,86 (6,25)	8,93 (3,13)	4,46 (1,56)	2,23 (0,78)
Halofuginon	1,00 (0,50)	0,50 (0,25)	0,25 (0,12)	0,13 (0,06)	0,06 (0,03)	0,03 (0,02)	0,02 (0,01)	0,01 (0,00)
Paromomycin	3000,00 (2141,50)	1500,00 (1070,75)	750,00 (535,38)	375,00 (267,69)	187,50 (133,84)	93,75 (66,92)	46,88 (33,46)	23,44 (16,73)

Zur Ermittlung der Zytotoxizität wurden bei jeder Assay-Durchführung folgende Kontrollen als Dreifachansätze mitgeführt: "Background" Kontrollen, "Low" Kontrollen, "High" Kontrollen und Überstandskontrollen. Die "Background" Kontrollen wurden zur Bestimmung der LDH-Aktivität im reinen Wachstumsmedium verwendet. Die "Low" Kontrollen dienten der Erfassung der spontanen LDH-Freisetzung aus unbehandelten Zellen. Durch die "High" Kontrollen wurde die maximal mögliche LDH-Freisetzung durch Zugabe eines Lysis-Reagenzes (im Kit enthalten) bestimmt. Das Detergenz in dem verwendeten Lysis-Reagenz kann bei einigen

Zelllinien zu einer geringfügigen Erhöhung der LDH-Aktivität in den "High" Kontrollen führen. Die Überstandskontrollen dienten der Korrektur der erhobenen "High" Kontrollwerte um eben diesen zelllinienspezifischen Faktor. Der zelllinienspezifische Faktor wurde ermittelt, indem zu der Hälfte der Überstände, welche zuvor von denen als Überstandskontrollen fungierenden Monolayern abpipettiert und in andere Vertiefungen überführt wurden, Lysis-Reagenz hinzugegeben wurde. Erzielten die mit Lysis-Reagenz behandelten Überstände höhere Messwerte als die unbehandelten Überstände, wurden die Messwerte der "High" Kontrollen um diese Differenz korrigiert.

Zur Durchführung des LDH-Assays wurden $6,25 \times 10^3$ Zellen in einem Volumen von 100 μl in die Vertiefungen einer 96-Loch Gewebekulturschale ausgesät. Nach Ablauf einer ca. 24-stündigen Inkubationsphase bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die gebildeten Monolayer einmal mit Wachstumsmedium mit 1 % FBS gewaschen. Anschließend wurde in die Vertiefungen jeweils soviel Wachstumsmedium mit 1 % FBS vorgelegt, dass nach Wirkstoffzugabe ein Gesamtvolumen von 100 μl mit einer DMSO-Konzentration von 0,5 % und der gewünschten Wirkstoffkonzentration erreicht wurde. Für die "Background" Kontrollen wurden zellfreie Vertiefungen mit 100 μl Wachstumsmedium mit 1 % FBS und 0,5 % DMSO befüllt. Die Monolayer der "Low" Kontrollen, "High" Kontrollen und Überstandskontrollen wurden ebenfalls mit 100 μl Wachstumsmedium mit 1 % FBS und 0,5 % DMSO überschichtet. Im Anschluss an die Wirkstoffzugabe wurden die Zellen für weitere 8 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden zu den "High" Kontrollen und der Hälfte der Zellüberstände der Überstandskontrollen 5 μl Lysis-Reagenz hinzugegeben und die Gewebekulturschalen für 15 min bei 37 °C und 250 rpm im Thermoschüttler (BIOSAN) geschüttelt. Anschließend wurden zu allen Proben und allen Kontrollen 100 μl eines frisch angesetzten homogenen Reaktionsmixes, bestehend aus 2,5 μl Katalysator-Lösung und 112,5 μl Färbelösung (beide im Kit enthalten) je Probe, dazu pipettiert und die Gewebekulturschalen bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Stop-Lösung je Vertiefung, wurden die Platten in den Synergy 4 (BIOTEK) gestellt und bei mittlerer Intensität für 10 s geschüttelt, bevor die Absorption der Proben und Kontrollen bei 490 und 690 nm gemessen wurde.

Um die Zytotoxizität in Prozent zu bestimmen, wurden zuerst alle Messwerte um den gemittelten Messwert der "Background" Kontrollen korrigiert. Anschließend wurde für alle Messwerte die Differenz zwischen Absorption bei 490 nm und Absorption bei 690 nm gebildet ($\text{Absorption}_{(\text{OD } 490 - \text{OD } 690)}$). Aus den auf diese Weise korrigierten Messwerten wurde für die Dreifachansätze aller Proben und Kontrollen das arithmetische Mittel gebildet. Nach Korrektur der "High" Kontrollen um den zellspezifischen Faktor wurden die gemittelten Werte in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = (\text{Messwert Probe} - \text{"Low" Kontrolle}) \div (\text{"High" Kontrolle} - \text{"Low" Kontrolle}) \times 100$$

3.9.1.1 Ermittlung der optimalen Zellkonzentration

In einem Vorversuch wurde die optimale Zellkonzentration für den LDH-Assay bestimmt. Als optimale Zellkonzentration gilt laut Handbuch für das Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} (LDH) die Zellkonzentration, bei der die Differenz der Messwerte zwischen den "High" Kontrollen und "Low" Kontrollen am größten ist, wobei für die "High" Kontrollen eine lineare Beziehung zwischen Zellkonzentration und LDH Signalintensität vorliegen sollte.

Zur Durchführung des Vorversuchs wurden sieben verschiedene Zellkonzentrationen (von 781 bis 5×10^4 Zellen je Vertiefung) durch eine 1:2 Verdünnungsserie hergestellt, diese als Sechsfachansatz in die Vertiefungen einer 96-Loch Gewebekulturschale ausgesät ("High" Kontrollen und "Low" Kontrollen als Triplikate) und ca. 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Wachstumsmedium mit 1 % FBS wurden die Monolayer mit 100 µl selbigen Wachstumsmediums überschichtet und für weitere 8 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Herstellung der "High" Kontrollen durch Zugabe des Lysis-Reagenzes wurde weiter verfahren wie oben beschrieben (siehe Kapitel 3.9.1).

3.9.2 WST-1-Assay

Auch beim "water soluble tetrazolium" (WST)-1-Assay handelt es sich um ein kolorimetrisches Testverfahren, das auf dem Nachweis eines wasserlöslichen WST-1-Spaltproduktes in Form eines Formazans basiert. Aufgrund der Beteiligung mitochondrialer Enzyme, die zur Formazanbildung führen, dient es im Unterschied zum LDH-Assay nicht dem Nachweis einer Zytotoxizität, sondern erfasst vielmehr die Anzahl metabolisch aktiver, d.h. lebender Zellen.

Sämtliche im LDH-Assay überprüften Wirkstoffe wurden in den gleichen Konzentration mit Hilfe des Cell Proliferation Reagent WST-1 (ROCHE) auf mögliche das Zellwachstum inhibierende Effekte untersucht. Ein Anstieg der Anzahl lebender Zellen führt zu einer Erhöhung der gesamten mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität. Diese Enzymaktivitätssteigerung katalysiert die Formazanbildung, welche daher direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen korreliert. Ist die Formazanbildung im Vergleich zu einem unbehandelten Monolayer bei einem mit Wirkstoff behandelten Monolayer reduziert, liegt ein inhibitorischer Effekt vor.

Bei dem Cell Proliferation Reagent WST-1 handelt es sich um eine klare, leicht rötliche "ready-to-use"-Lösung, die das Tetrazoliumsalz WST-1 und ein "electron coupling reagent" enthält. Wird WST-1 zu Formazan reduziert, geht damit ein Farbumschlag von hellrot nach dunkelrot einher (siehe Abbildung 3.9.2.1).

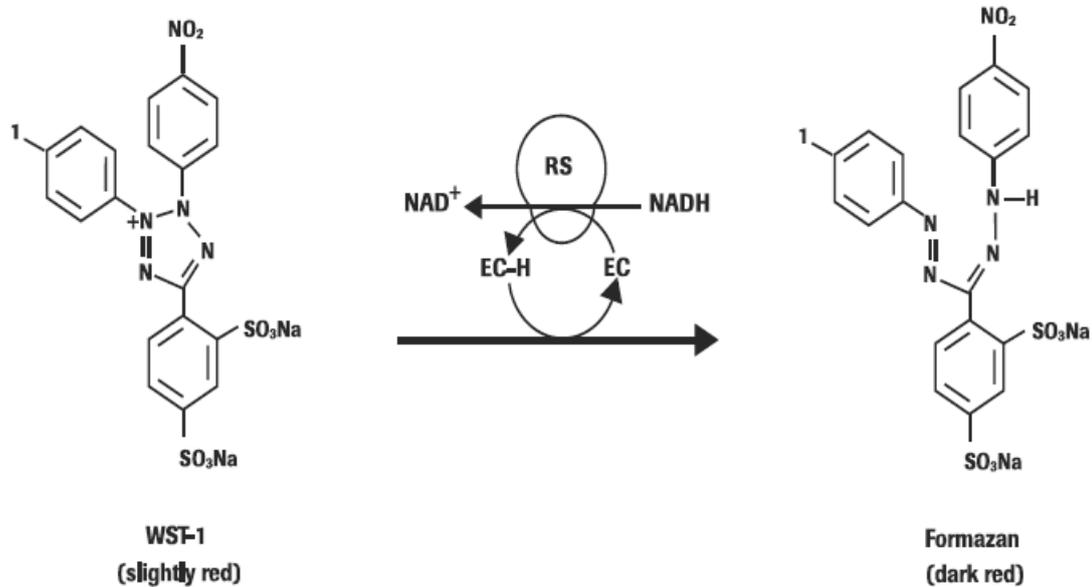


Abb. 3.9.2.1 Spaltung des Tetrazoliumssalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) zu Formazan (EC= "electron coupling reagent", RS= mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System). Aus der Produktinformation des Cell Proliferation Reagent WST-1 (ROCHE).

Die Testwellenlänge zum Nachweis des Formazans betrug 450 nm. Als Referenzwellenlänge wurden entsprechend der Herstellerangaben 690 nm festgelegt.

Der Aufbau des WST-1-Assays entsprach im Prinzip dem des Infektionsversuches.

In 48-Loch Gewebekulturschalen wurden HCT-8 Zellen in einer Konzentration von $7,9 \times 10^4$ Zellen je Vertiefung in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml Nährmedium ausgesät und anschließend ca. 26 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, so dass es zu einer Monolayerausbildung mit einer Konfluenz von ca. 80 % kam. Als Inkubationszeit wurden hier 26 h gewählt, da der Infektionsschritt entfiel, aber dem Zeitplan entsprechend die Wirkstoffe aufgebracht werden sollten. Hierfür wurde das auf den Monolayern befindliche Medium abpipettiert und anschließend durch jeweils soviel Wachstumsmedium mit 10 % FBS ersetzt, dass nach Wirkstoffzugabe ein Gesamtvolumen von 0,2 ml mit einer DMSO-Konzentration von 0,5 % und der gewünschten Wirkstoffkonzentration erreicht wurde. Bis zur Durchführung der Absorptionsmessungen wurden die Zellen für weitere 54 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei auch in diesem Assay nach 27 h ein Medium- und Wirkstoffwechsel durchgeführt wurde.

Als Negativkontrollen fungierten unbehandelte Monolayer, welche mit jeweils 0,2 ml Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO-Zusatz überschichtet wurden. Im Anschluss an die 54-stündige Inkubationsphase wurde von allen Monolayern der Überstand abgenommen und durch 110 µl eines frisch angesetzten, homogenen Gemisches aus 100 µl Wachstumsmedium und 10 µl WST-1 Reagenz je Vertiefung ersetzt. Zusätzlich wurden zwei

weitere Vertiefungen der Gewebekulturschale als "Background" Kontrollen mit dem gleichen Volumen an Medium und WST-1 Reagenz befüllt. Um eine Beeinflussung der Absorptionswerte durch das verwendete Nährmedium oder durch das WST-1 Reagenz selbst auszuschließen, wurden diese "Background" Kontrollen später als Leerwerte für den ELISA-Reader genutzt. Nach einem weiteren einstündigen Inkubationsschritt bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Gewebekulturschalen in den Synergy 4 (BIOTEK) gestellt, dort bei mittlerer Intensität für eine Minute geschüttelt und anschließend die Absorptionsmessungen durchgeführt.

Um einen inhibitorischen Effekt der Wirkstoffe zu ermitteln, wurden zuerst alle Messwerte um den gemittelten Wert der "Background" Kontrollen korrigiert. Anschließend wurde für alle Messwerte die Differenz zwischen Absorption bei 450 nm und Absorption bei 690 nm gebildet. Um einen möglichen inhibitorischen Effekt abzubilden, wurde aus den auf diese Weise korrigierten Messwerten und dem arithmetischen Mittel der Negativkontrollen der Quotient gebildet und selbiger dann mit 100 multipliziert. Dadurch wird das Wachstum der behandelten Monolayer als Verhältnis zu den unbehandelten Monolayern (Negativkontrollen) in Prozent ausgedrückt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche: Optimierung der (q)PCR und der *in vitro* Kultivierung von *C. parvum*

4.1.1 Eruierung des optimalen Analysezeitpunktes für die DNA-Isolation

Im Rahmen der kinetischen Studie zur Eruierung des optimalen Analysezeitpunktes (siehe Kapitel 3.2.2.1.1) wurde DNA infizierter Monolayer an den Zeitpunkten 26, 50 und 56 h p.i. isoliert und im Anschluss in einer konventionellen PCR untersucht. Zum Nachweis cryptosporidialer DNA wurden die Primer von Awad-el-Kariem et al. (1994) (siehe Kapitel 3.4.1) und drei weitere Primerpaare von Lee et al. (2008) (siehe Tabelle 3.4.1.1.1) verwendet. In der sich der PCR anschließenden Gelelektrophorese konnten zu keinem Isolationszeitpunkt PCR-Produkte für die Zielgene CP2 und COWP nachgewiesen werden. Es gelang ausschließlich die Amplifikation der cryptosporidialen 18S rDNA, sowohl mit den Primern von Lee et al. (2008), als auch mit denen von Awad-el-Kariem et al. (1994), wobei sich die Bande der PCR-Produkte bei Verwendung letzterer Primer viel prominenter darstellte (siehe Abbildung 4.1.1.1 A, Angaben zu den DNA-Gehalten der untersuchten Proben siehe Tabelle A1 des Anhangs).

Im elektrophoretischen Vergleich der amplifizierten PCR-Produkte, bei denen die zu unterschiedlichen Zeitpunkten isolierte DNA als Template diente, gelang mit den Primern von Awad-el-Kariem et al. die sensitivste Detektion cryptosporidialer DNA zum Zeitpunkt 56 h p.i. (Awad-el-Kariem et al., 1994). Hier zeigte sich auf dem Gelbild die markanteste Bande (siehe Abbildung 4.1.1.1 A, Angaben zu den DNA-Gehalten der untersuchten Proben finden sich in Tabelle A1 des Anhangs).

Mögliche Fehler im PCR-Protokoll zur Amplifizierung der Sequenzen der Zielgene CP2 und COWP konnten ausgeschlossen werden, da bei Verwendung direkt aus Oocysten isolierter DNA elektrophoretisch PCR-Produkte in gewünschter Größe nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 4.1.1.1 B, Angaben zum Gehalt der aus Oocysten isolierten DNA finden sich in Tabelle A2 des Anhangs).

Zur Bestätigung ihrer Identität wurden alle PCR-Produkte mindestens einmal sequenziert (siehe Kapitel 3.8.4).

Anhand dieser Ergebnisse wurden sowohl der Analysezeitpunkt des *C. parvum* Inhibitionsassays als auch die Primer zum Nachweis cryptosporidialer DNA für die (q)PCR festgelegt.

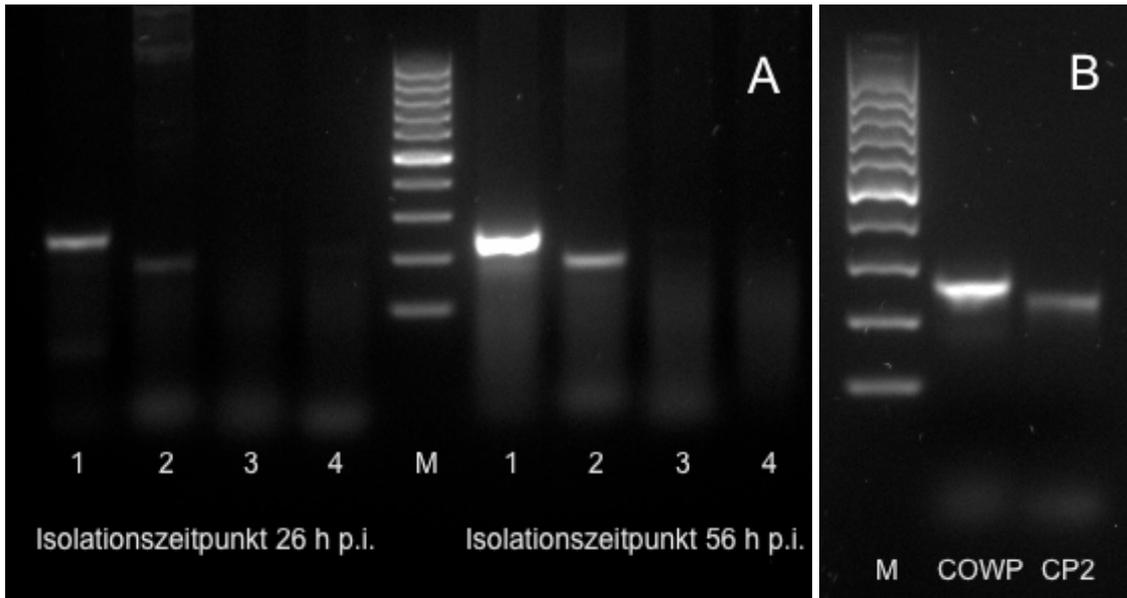


Abb. 4.1.1.1 (A) Im Rahmen einer konventionellen PCR erzeugte PCR-Produkte unter Verwendung der Primer zum Nachweis cryptosporidialer 18 S rDNA nach Awad-el-Kariem et al. (1) und Lee et al. (2), sowie unter Verwendung der Primer zum Nachweis der Zielgene COWP (3) und CP2 (4), ebenfalls nach Lee et al. (Awad-el-Kariem et al., 1994; Lee et al. 2008), aufgetragen auf einem 1,5 %igen Agarosegel (M: 100 bp DNA-Marker). Als Template diente zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (26 h p.i. und 56 h p.i.) aus mit *C. parvum* infizierten HCT-8 Monolayern isolierte DNA (DNA-Gehalte der untersuchten Proben finden sich in Tabelle A1 des Anhangs). (B) zeigt die auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte für die Zielsequenzen COWP und CP2, die bei Einsatz von aus Oocysten isolierter DNA mittels der Primer nach Lee et al. (2008) amplifiziert wurden (M: 100 bp DNA-Marker; Angaben zum Gehalt der aus Oocysten isolierten DNA finden sich in Tabelle A2 des Anhangs).

4.1.2 Quantitative real-time PCR (relative Quantifizierung)

Die zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA ausgewählten Primer nach Awad-el Kariem et al. (1994) (siehe Kapitel 3.4.1) wurden im Rahmen einer qPCR erneut auf ihre Spezifität hin überprüft. Hierfür wurde als Template sowohl isolierte DNA von infizierten Monolayern als auch von reinen HCT-8 Zellen eingesetzt. Bei einer Annealingtemperatur von 50 °C entsprechend dem Protokoll von Cai et al. (2005) wurde auch bei Verwendung der reinen HCT-8 Zell-DNA ein PCR-Produkt erzeugt (siehe Abbildung 4.1.2.1). Eine Sequenzierung des PCR-Produktes (siehe Kapitel 3.8.4) ergab eine Länge von 162 bp und bestätigte die Amplifikation eines PCR-Produktes zellulären (humanen) Ursprungs. Anhand der Durchführung eines Gradienten im Temperaturbereich von 50 bis 60 °C (50 °C, 50,7 °C, 52 °C, 53 °C, 56,3 °C, 58,3 °C, 59,4 °C, 60 °C) mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (65-95 °C) konnte für die gewählten Primer in einer weiteren qPCR eine optimierte Annealingtemperatur (60 °C) ermittelt werden, bei der nur spezifische PCR-Produkte cryptosporidialer Herkunft amplifiziert wurden. Die DNA-Proben ausschließlich zellulärer Herkunft gaben bei dieser Annealingtemperatur kein Signal (siehe Abbildung 4.1.2.1).

Detaillierte Informationen zu der entsprechenden qPCR (DNA-Gehalt der Proben, einzelne Cq-Werte) sind in Tabelle A3 des Anhangs zu finden.

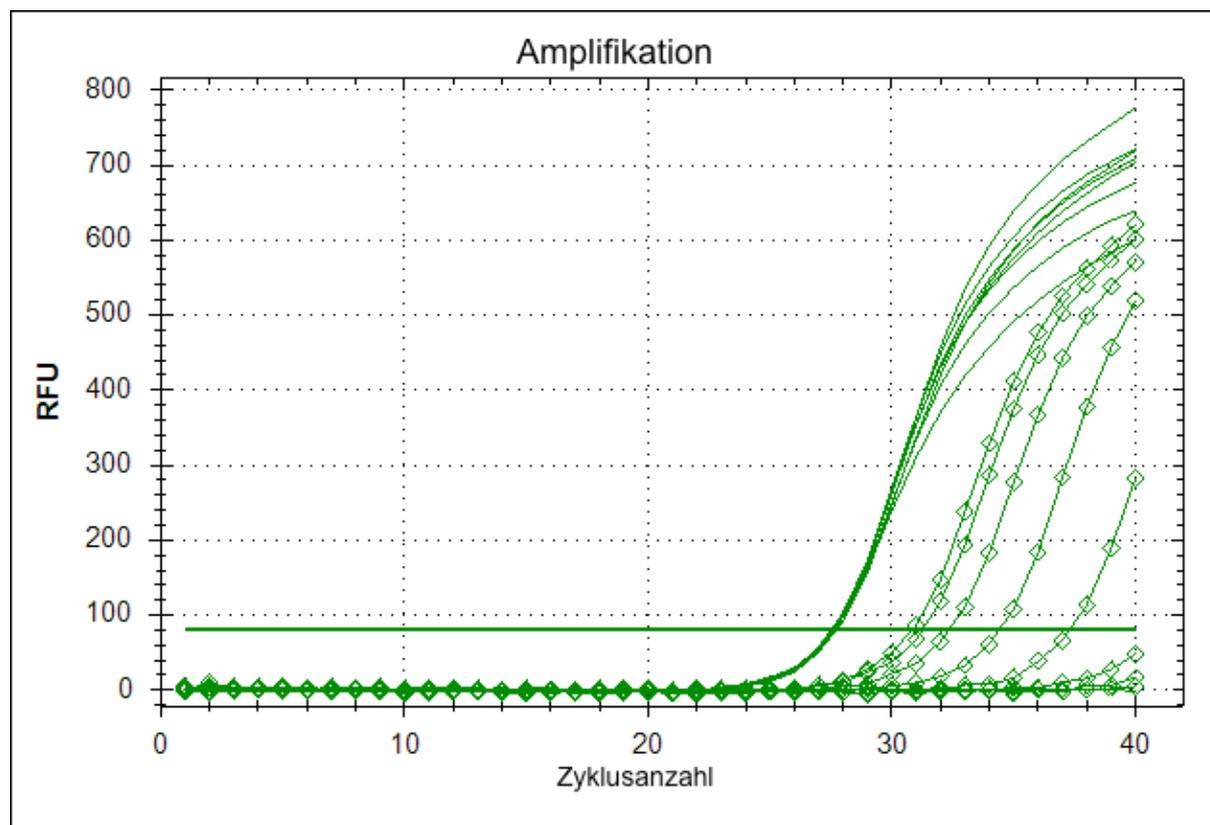


Abb. 4.1.2.1 Einfluss der Annealingtemperatur bei Verwendung der Primer nach Awad-el-Kariem et al. (1994) zum Nachweis cryptosporidaler DNA; dargestellt ist sowohl der Amplifikationsverlauf der qPCR beim Einsatz von DNA, die aus mit *C. parvum* infizierten Monolayern isoliert wurde (grüne, durchgezogene Linien) als auch bei Verwendung von aus reinen HCT-8 Zellen isolierter DNA (grüne Linien mit Diamanten) als Template. Bei Einsatz beider Templates verschob sich die Amplifikationskurve mit steigender Annealingtemperatur (Gradient im Temperaturbereich 50 bis 60 °C, 8 unterschiedliche Temperaturstufen) weiter nach rechts, wobei sich der Cq-Wert bei Verwendung der DNA aus mit *C. parvum* infizierten Zellkulturen nur geringgradig veränderte. Die anhand der qPCR den Proben zugeordneten temperaturspezifischen Cq-Werte sowie Angaben zu den DNA-Gehalten der Proben finden sich in Tabelle A3 des Anhangs (RFU : "relative fluorescence unit").

Auch für die Primer zur Amplifikation der humanen 18S rDNA wurde nach der Durchführung eines Gradienten im Temperaturbereich von 50 bis 60 °C mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (65-95 °C) die von Cai et al. (2005) genutzte Annealingtemperatur von 50 °C auf 60 °C erhöht.

Keine der obligatorisch in den qPCRs mitgeführten NTCs zeigte eine Amplifikation.

4.1.3 Oocystenkonzentration

Die isolierte DNA der Infektionsversuche, bei denen drei verschiedene Oocystenkonzentrationen ($1,97 \times 10^4$, $9,87 \times 10^4$, $4,94 \times 10^5$) zur Infektion der HCT-8 Zellen

eingesetzt wurden (siehe Kapitel 3.2.2.1.2), wurde mittels einer qPCR, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, untersucht.

Wählte man bei der Auswertung die Probe mit der niedrigsten Infektionsdosis als Kontrolle, was bedeutet, dass dieser Probe der Wert eins ($SD \pm 0,46$) zugeordnet wurde, so betrug die relative *C. parvum* Entwicklung (Terminus für das relative Verhältnis von cryptosporidialer zu humaner (zellulärer) 18S rDNA, normiert auf die jeweilige Kontrolle, siehe auch Kapitel 3.4.2) der Probe mit der mittleren Infektionsdosis 4,44 ($SD \pm 2,68$) und die der Probe mit der höchsten Infektionsdosis 40,35 ($SD \pm 9,07$).

Die Ergebnisse dieses Vorversuchs sind in Abbildung 4.1.3.1 graphisch dargestellt. Ausführlichere Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A4 des Anhangs.

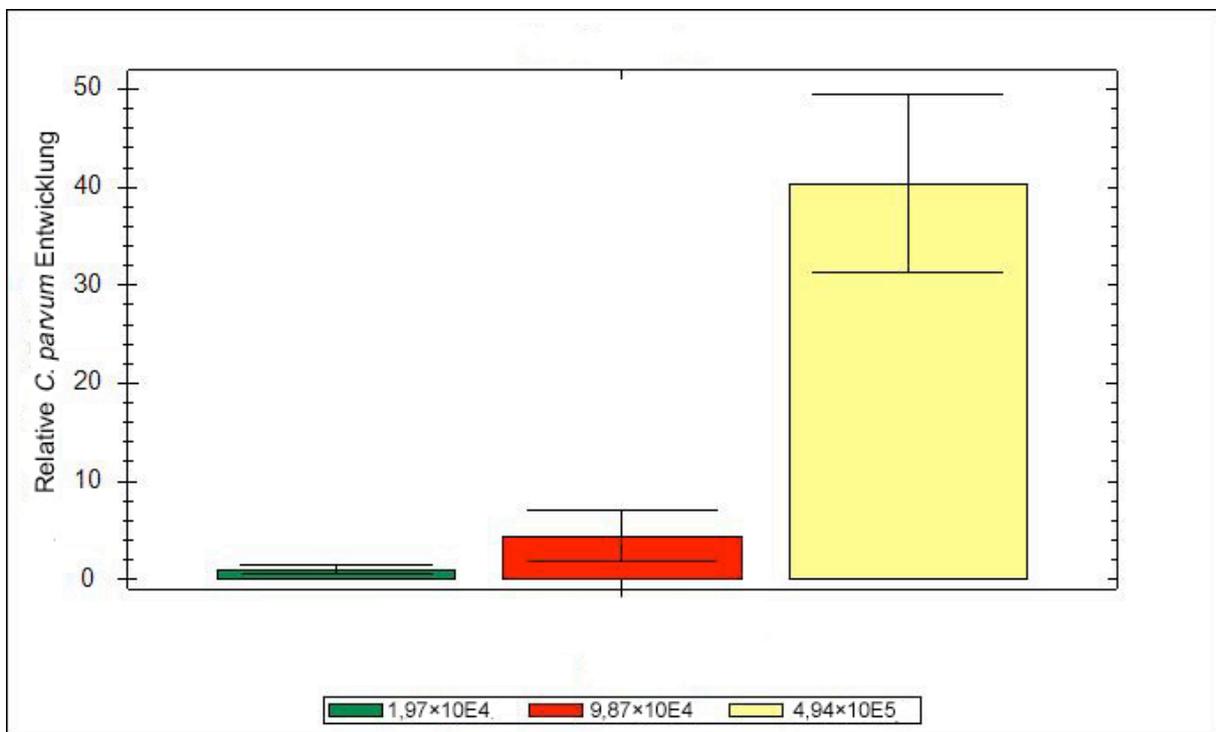


Abb. 4.1.3.1 Ermittelte Werte der relativen *C. parvum* Entwicklung bei Verwendung verschiedener Infektionsdosen (*C. parvum* Oocysten) je Vertiefung zur HCT-8 Zellinfektion in 48-Loch Gewebekulturschalen (Infektionsdosis mit $1,97 \times 10^4$ Oocysten in grün dargestellt (einfache Infektionsdosis), Infektionsdosis mit $9,87 \times 10^4$ Oocysten in rot dargestellt (fünffach erhöht), Infektionsdosis mit $4,94 \times 10^5$ Oocysten in gelb dargestellt (25-fach erhöht). Der Terminus „relative *C. parvum* Entwicklung“ bezeichnet das relative Verhältnis von cryptosporidialer zu humaner (zellulärer) 18S rDNA, normiert auf die jeweilige Kontrolle (in diesem Falle die niedrigste Infektionsdosis), deren Mittelwert daher immer gleich eins ist (siehe auch Kapitel 3.4.2). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung. Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A4 des Anhangs.

4.1.4 Einführung eines Zentrifugationsschrittes

Im Rahmen der Infektionsversuche zur Ermittlung der optimalen Oocystenkonzentration wurde zusätzlich der Einfluss eines Zentrifugationsschrittes (410×g, 5 min) auf den Infektionserfolg überprüft (siehe Kapitel 3.2.2.1.3). Bei einer Infektionsdosis von $1,97 \times 10^4$ Oocysten je Vertiefung führte die Einführung des Zentrifugationsschrittes zu einem Anstieg der relativen *C. parvum* Entwicklung von eins auf 1,71. Auch bei der verwendeten mittleren Infektionsdosis von $9,87 \times 10^4$ Oocysten führte der Zentrifugationsschritt zu einer ca. 1,7-fachen Erhöhung des Wertes. Die durch die höchste Infektionsdosis von $4,94 \times 10^5$ Oocysten erzielte relative *C. parvum* Entwicklung wurde durch die Einführung des Zentrifugationsschrittes ca. um den Faktor 1,5 reduziert (siehe Tabelle 4.1.4.1 und Abbildung 4.1.4.1, sowie Tabelle A4 des Anhangs für detaillierte Angaben (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) zu den einzelnen qPCRs).

Obgleich die Einführung eines Zentrifugationsschrittes bei der für die Wirkstoffüberprüfungen verwendeten Infektionsdosis von $4,94 \times 10^5$ Oocysten in diesem Vorversuch zu einer Reduktion des Infektionserfolges führte, wurde selbiger in den Aufbau des *C. parvum* Inhibitionsassays integriert. Die Ergebnisse der Studie von King et al. (2011) sind überzeugend und die Schlussfolgerung, dass eine Zentrifugation zu einer Beschleunigung des Kontakts zwischen Sporozoiten/Oocysten und Zellrasen führt, logisch.

Zudem sind in beiden Versuchen mit der Infektionsdosis von $4,94 \times 10^5$ Oocysten die relativ großen Standardabweichungen überlappend, was verdeutlicht, dass der beobachtete Effekt nicht signifikant war und die Zentrifugation die Zellinfektion zumindest nicht negativ beeinflusst hat.

Tab. 4.1.4.1. Einfluss eines Zentrifugationsschrittes (410×g, 5 min) auf den Infektionserfolg von *C. parvum* Oocysten bei Verwendung verschiedener Infektionsdosen zur HCT-8 Zellinfektion in 48-Loch Gewebekulturschalen. Angegeben ist jeweils der Wert der relativen *C. parvum* Entwicklung mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD). Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie Anzahl der biologischen Replikate und deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A4 des Anhangs.

Infektionsdosis/ Vertiefung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
$1,97 \times 10^4$ Oocysten	1,00	0,46
$1,97 \times 10^4$ Oocysten, Platte zentrifugiert	1,71	0,40
$9,87 \times 10^4$ Oocysten	4,44	2,68
$9,87 \times 10^4$ Oocysten, Platte zentrifugiert	7,56	0,90
$4,94 \times 10^5$ Oocysten	40,35	9,07
$4,94 \times 10^5$ Oocysten, Platte zentrifugiert	26,84	6,87

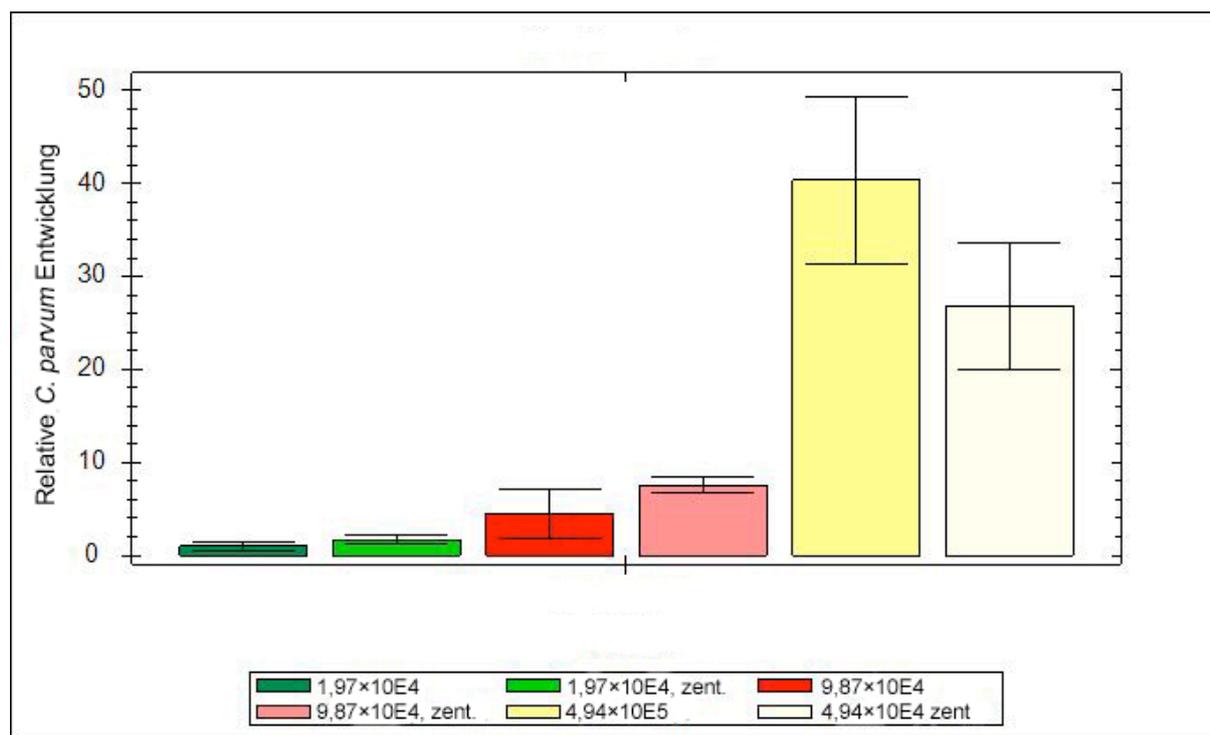


Abb. 4.1.4.1 Einfluss eines Zentrifugationsschrittes ($410 \times g$, 5 min) auf den Infektionserfolg von *C. parvum* Oocysten bei Verwendung verschiedener Infektionsdosen zur HCT-8 Zellinfektion in 48-Loch Gewebekulturschalen. Darstellung des Einflusses des Zentrifugationsschrittes durch einen Vergleich zwischen einer nicht zentrifugierten und einer zentrifugierten Gewebekulturschale (zent.) bei Verwendung der gleichen Infektionsdosis (Infektionsdosis mit $1,97 \times 10^4$ Oocysten in grün dargestellt (einfache Infektionsdosis), Infektionsdosis mit $9,87 \times 10^4$ Oocysten in rot dargestellt (fünffach erhöht), Infektionsdosis mit $4,94 \times 10^5$ Oocysten in gelb dargestellt (25-fach erhöht)).

Aufgetragen sind die ermittelten Werte der relativen *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Proben, wobei die Probe mit der niedrigsten Infektionsdosis ohne zusätzlichen Zentrifugationsschritt als Kontrolle gewählt und dieser somit der Wert eins zugeordnet wurde (Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung). Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A4 des Anhangs.

4.2 Quantitative real-time PCR (absolute Quantifizierung)

Bei der Auswertung der in Kapitel 3.4.3. beschriebenen, sondenbasierten qPCR zeigte sich die Detektion des zugegebenen externen Standards nicht einheitlich, obgleich zu jeder untersuchten DNA-Probe (im Rahmen eines Infektionsversuches zur Austestung von Paromomycin in acht verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen (siehe Tabelle 3.9.1.1) isoliert) zuvor dieselbe Menge externen Standards (5×10^5 Kopien je Probe) hinzu pipettiert wurde. Die nachgewiesene Kopienzahl des externen Standards erstreckte sich von ca. $1,5 \times 10^1$ bis $3,9 \times 10^3$ Kopien je Probe (siehe Abbildung 4.2.1). Des Weiteren wich das Signal des externen Standards der untersuchten Proben von dem Kurvenverlauf der dazugehörigen Standardkurve ab (siehe Abbildung 4.2.1).

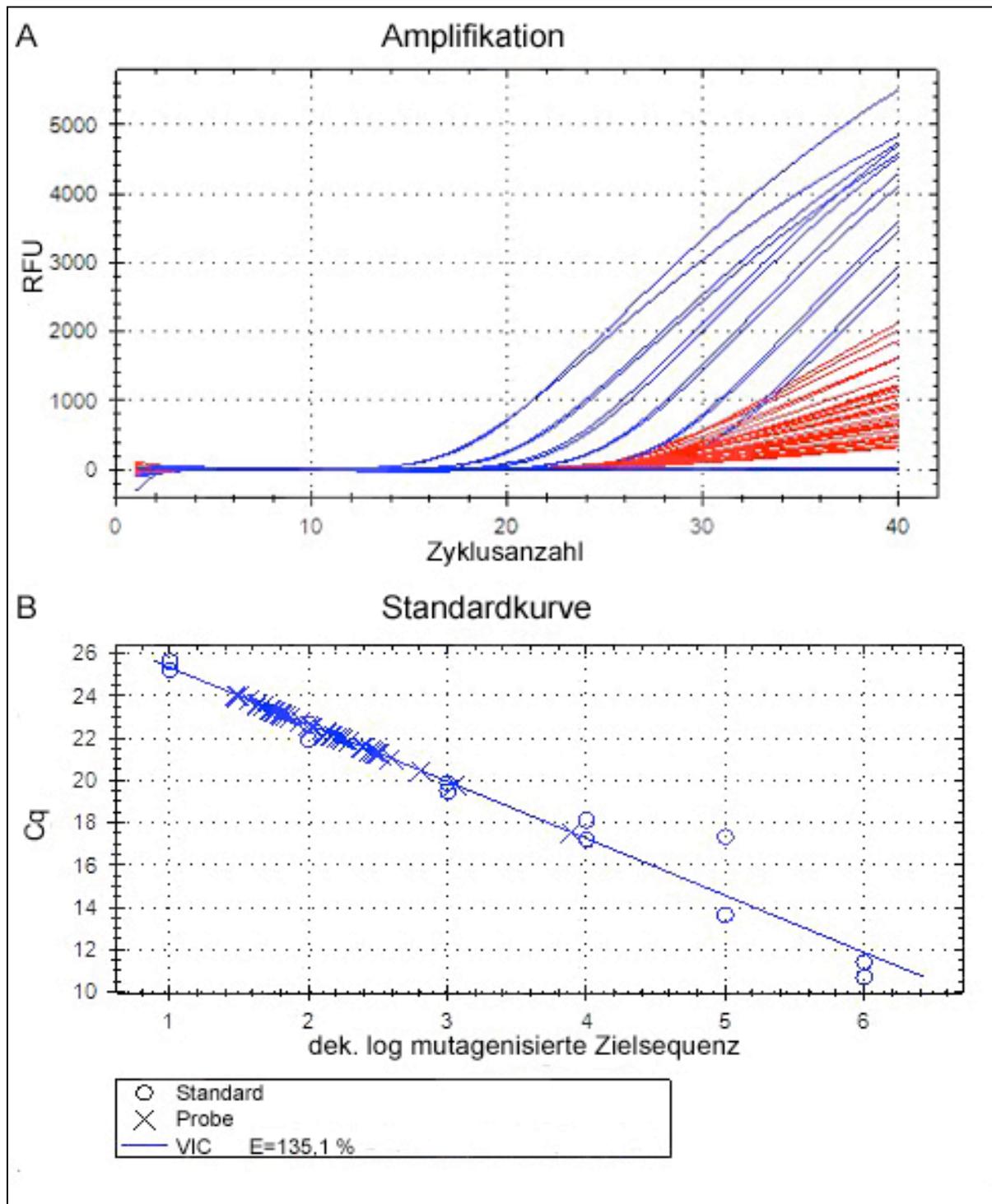


Abb. 4.2.1 Graphische Darstellung der Kurvenverläufe während der Amplifikation bei Einsatz definierter Templatemengen der mutagenisierten Zielsequenz als Standard (10^1 - 10^6 Kopien, in blau, Detektion über das an die Sonde gekoppelte Fluorophor VIC) und der untersuchten DNA-Proben (im Rahmen eines Invektionsversuches zur Austestung von acht verschiedenen Paromomycin-Konzentrationen (siehe Tabelle 3.9.1.1) isoliert, in rot), zu denen vor der DNA-Isolation 5×10^5 Kopien des externen Standards in Form von Plasmiden hinzupipettiert wurden (A). (B) zeigt die mit einer Effizienz (E) von 135,1 % generierte Standardkurve durch Verwendung definierter Templatemengen der mutagenisierten Zielsequenz; die Signale der Standards sind in Form von Kreisen dargestellt und die der untersuchten Proben in Form von Kreuzen auf der Kurve aufgetragen.

Eine aussagekräftige Auswertung dieser qPCR mit dem Ziel einer absoluten Quantifizierung der cryptosporidialen 18S rDNA war somit auf diese Weise nicht möglich.

4.3 Überprüfung von Substanzen auf anticryptosporidiale Wirksamkeit

Neben der qPCR basierten Untersuchung auf eine anticryptosporidiale Wirksamkeit der in Kapitel 3.1.8 gelisteten Wirkstoffe (Ergebnisse siehe Tabelle 4.3.2.1, 4.3.3.1, 4.3.4.1 bis 4.3.4.5 und Abbildung 4.3.4.1) wurden die infizierten und behandelten Monolayer bei der Durchführung des Infektionsversuches zusätzlich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf morphologische Veränderungen und eventuelle Präzipitatbildungen der Wirkstoffe untersucht. Bei den verwendeten Höchstkonzentrationen einiger Wirkstoffe, zum Beispiel der Wirkstoffe 1, 5, 6, und 7, waren schon mit bloßem Auge Niederschläge und/oder Trübungen in den Vertiefungen der Gewebekulturschalen sichtbar. Bei den mikroskopischen Untersuchungen konnten die Morphologie des Zellrasens betreffend von verlangsamtem Zellwachstum über vereinzelt abgestorbene Zellen bis hin zu großflächigen Ablösungen des gesamten Monolayers viele verschiedene Formen der Beeinflussung des Zellrasens beobachtet werden. Auch die Wirkstoffpräzipitate zeigten sich mikroskopisch betrachtet sehr vielgestaltig (siehe Abbildung 4.3.1). Detaillierte Angaben zu beobachteten makroskopischen und mikroskopischen Auffälligkeiten finden sich in Tabelle A5 des Anhangs.

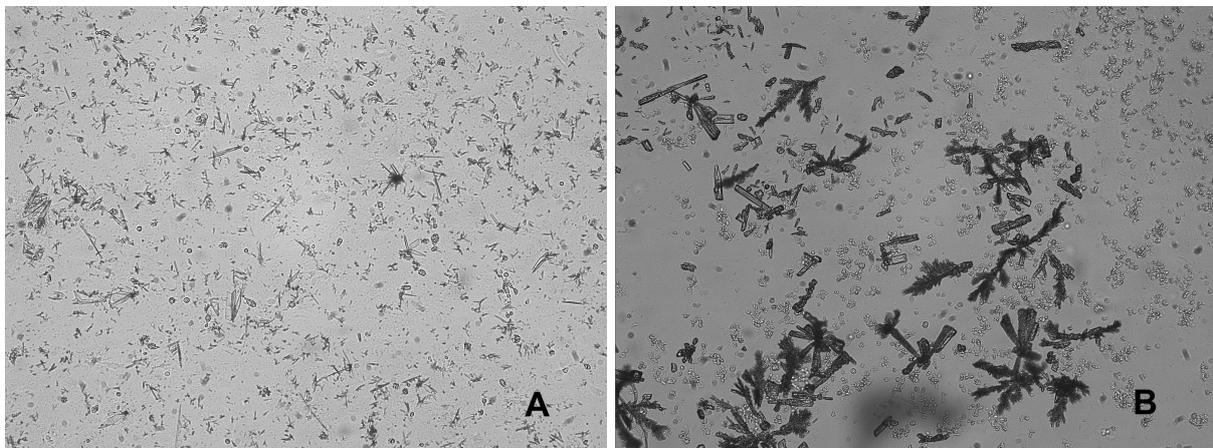


Abb. 4.3.1 Exemplarische Wirkstoffpräzipitate 46 h nach Zugabe zur Zellkultur. (A) Beobachtete Präzipitatbildung des Wirkstoffs 1 bei einer Wirkstoffkonzentration von 20 ppm; (B) Wirkstoffpräzipitate des Wirkstoffs 3 bei einer Wirkstoffkonzentration von 200 ppm (Original-Bildgröße 1425,14×1064,76 μ M durch 10fache Vergrößerung).

4.3.1 Positiv und- Negativkontrollen

4.3.1.1 Positivkontrollen: Paromomycin und Nitazoxanid

Der Wirkstoff 30, Paromomycin, wurde bei jeder Wirkstoffüberprüfung als Positivkontrolle in einer Konzentration von 3 mM (entspricht 2141,5 ppm) mit einem DMSO Gehalt von 0,5 % mitgeführt, um eine ca. 90%ige Hemmung des Cryptosporidiumwachstums zu bewirken. Die

eingesetzte Konzentration wurde in Anlehnung an Publikationen von Cai et al. (2005) und Theodos et al. (1998) gewählt. Neben Paromomycin fungierte der Wirkstoff 31, Nitazoxanid, als weitere Positivkontrolle. In einer Konzentration von 30 μM (entspricht 9,21 ppm) sollte dieser ebenfalls eine ca. 90%ige Inhibition des cryptosporidialen Wachstums bewirken (Cai et al., 2005; Theodos et al., 1998).

Bei der Auswertung der Proben im Rahmen einer qPCR wurde die Negativkontrolle (unbehandelte infizierte Monolayer mit Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO-Zusatz inkubiert) als Kontrolle gewählt, so dass dieser ein Wert von eins für die relative *C. parvum* Entwicklung zugeordnet wurde.

In einem Vorversuch zur Validierung der verwendeten Konzentrationen betrug der inhibitorische Effekt von Paromomycin 85,26 % (SD \pm 5 %). Nitazoxanid bewirkte bei der Konzentration von 30 μM eine Reduktion des cryptosporidialen Wachstums um 91,58 % (SD \pm 3 %). Die obligatorisch mitgeführten NTCs zeigten keine Amplifikation.

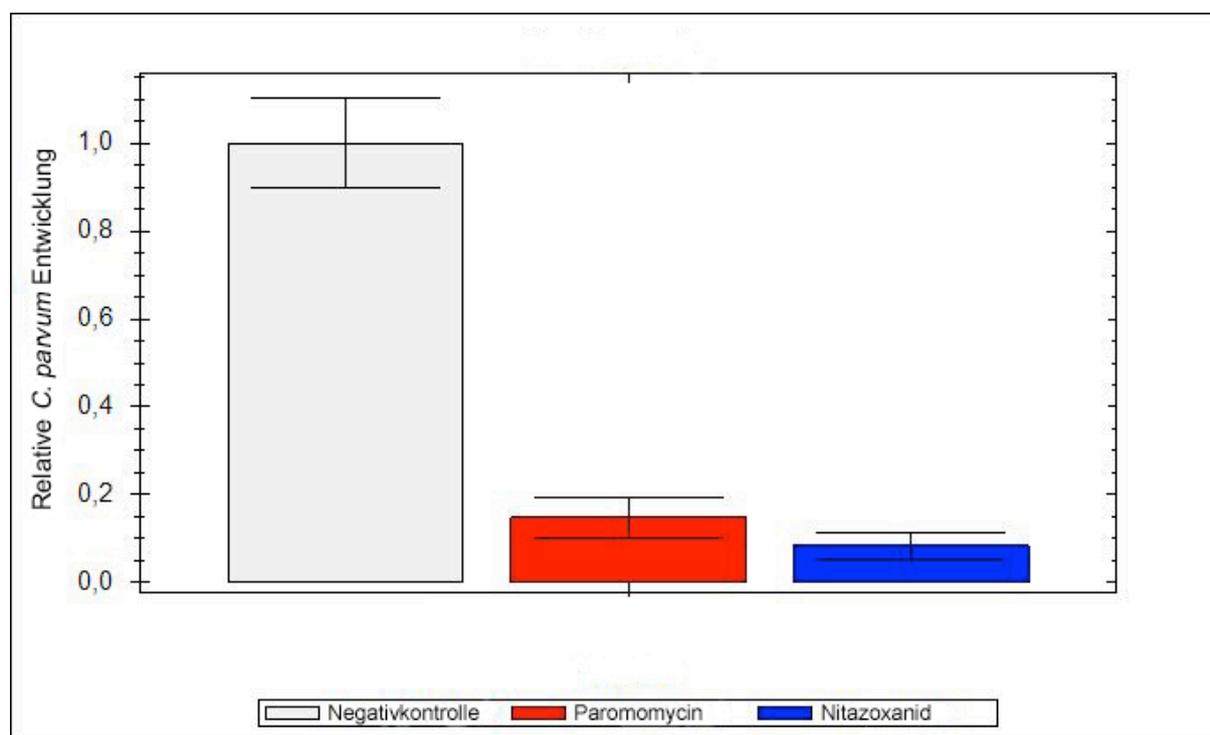


Abb. 4.3.1.1.1 Validierung des Infektionsmodells mit den als Positivkontrollen verwendeten bekannten *in vitro* Entwicklungsinhibitoren Paromomycin und Nitazoxanid (verwendete Konzentrationen: Nitazoxanid (blau) 30 μM , Paromomycin (rot) 3 mM; Negativkontrolle in grau dargestellt). Im Vergleich zur Negativkontrolle bewirkte Paromomycin eine Reduktion der relativen *C. parvum* Entwicklung auf ca. 0,15 (SD \pm 5). Der inhibitorische Effekt von Nitazoxanid belief sich auf 91,58 % (SD \pm 3 %). Die Standardabweichung wird durch Fehlerbalken visualisiert. Detaillierte Informationen zur Anzahl der ausgewerteten Proben sowie zu deren DNA-Gehalten und den durch die qPCRs ermittelten Cq-Werten finden sich in Tabelle A6 des Anhangs.

Die Ergebnisse dieses Vorversuches sind in Abbildung 4.3.1.1.1 graphisch dargestellt; Anzahl der ausgewerteten Proben sowie deren DNA-Gehalte und ermittelte Cq-Werte finden sich in Tabelle A6 des Anhangs.

Unter der Wirkung von Nitazoxanid in der verwendeten Konzentration von 30 µM zeigte der Zellrasen ein deutlich verlangsamtes Zellwachstum. Mikroskopisch betrachtet waren die Zellen im Vergleich zu einem unbehandelten Monolayer größer, der Zellrasen insgesamt weniger dicht und erschien von Lakunen durchsetzt (siehe Abbildung 4.3.1.1.2).

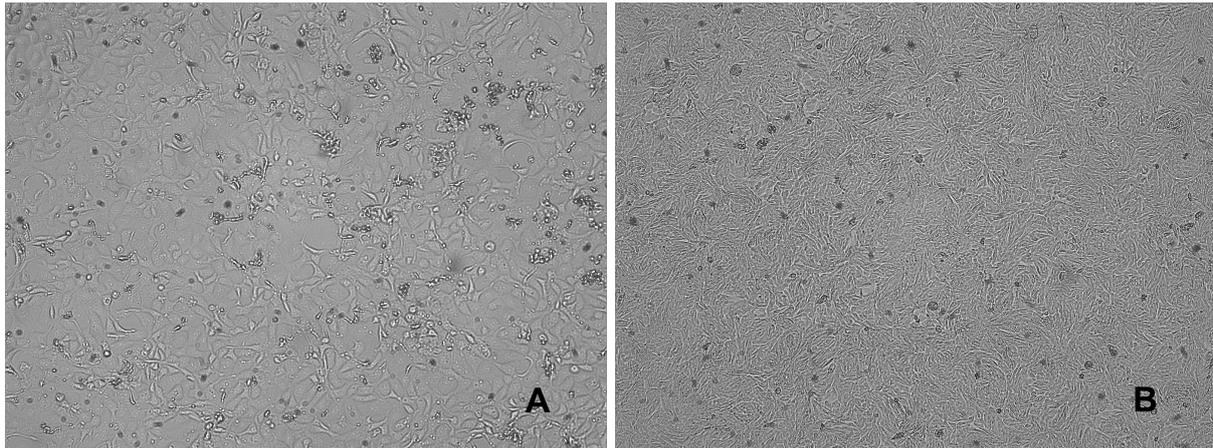


Abb. 4.3.1.1.2 Beeinflussung des Wachstumsverhaltens eines HCT-8 Monolayers durch Zugabe des Wirkstoffs Nitazoxanid in einer Konzentration von 30 µM bei einer Einwirkzeit von 50 h (A); im Vergleich ein als Negativkontrolle fungierender gleichaltes unbehandelter Zellrasen (B) (Aufnahme bei 10facher Vergrößerung).

Dieser Effekt spiegelte sich auch in einem deutlich geringeren Gehalt der isolierten DNA-Proben wieder (siehe Tabelle A8 des Anhangs), was bei einer Überprüfung der Wirkstoffe in 96-Loch Gewebekulturschalen dazu führte, dass in der qPCR keine aussagekräftigen Ergebnisse mehr erzeugt werden konnten (siehe Tabelle 4.3.2.1 sowie Tabelle A8 des Anhangs). Aus diesem Grunde wurde im endgültigen "Setup" des Assays zur Wirkstoffüberprüfung einzig Paromomycin als Positivkontrolle mitgeführt.

4.3.1.2 Negativkontrollen

4.3.1.2.1 Optimierung der DMSO-Konzentration

Als Negativkontrollen wurden bei jedem Infektionsversuch unbehandelte, mit *C. parvum* infizierte HCT-8 Monolayer mitgeführt, welche zum Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation ausschließlich mit Wachstumsmedium mit einem 0,5%igen DMSO-Gehalt überschichtet wurden. Dieser DMSO-Gehalt wurde zuvor ermittelt, indem in einem Infektionsversuch ein möglicher Effekt der verwendeten DMSO-Konzentration auf den Infektionserfolg überprüft wurde. Hierzu wurden infizierte Monolayer für 54 h mit reinem Wachstumsmedium, mit Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO und mit Wachstumsmedium mit 1 % DMSO inkubiert.

Die innerhalb dieses Infektionsversuches isolierte DNA wurde im Anschluss mittels einer qPCR (siehe Kapitel 3.4.2) untersucht.

Wurde die Negativkontrolle, welche nur mit Wachstumsmedium ohne DMSO-Zusatz überschichtet wurde, bei der Auswertung als Kontrolle gewählt und dieser somit der Wert eins ($SD \pm 0,22$) für die relative *C. parvum* Entwicklung zugeordnet, reduzierte im Vergleich dazu ein Zusatz von 0,5 % DMSO den Wert der relativen *C. parvum* Entwicklung um ca. 16 % auf 0,84 ($SD \pm 0,44$). Durch einen Zusatz von 1 % DMSO zum Wachstumsmedium wurde die relative *C. parvum* Entwicklung um 58 % auf 0,42 ($SD \pm 0,09$) gesenkt (siehe auch Abbildung 4.3.1.2.1.1, sowie Tabelle A7 des Anhangs mit detaillierteren Informationen zur Anzahl der ausgewerteten Proben, deren DNA-Gehalten sowie in den qPCRs ermittelten Cq-Werten).

Da sämtliche überprüften Wirkstoffe in 100 % DMSO gelöst wurden (Ausnahme Wirkstoffe 4 und 30) und somit aus Gründen der Vergleichbarkeit eine Negativkontrolle ohne DMSO-Zusatz nicht gewählt werden konnte, wurde sowohl bei den Wirkstoffüberprüfungen als auch bei den Negativkontrollen ein DMSO-Zusatz von 0,5 % verwendet.

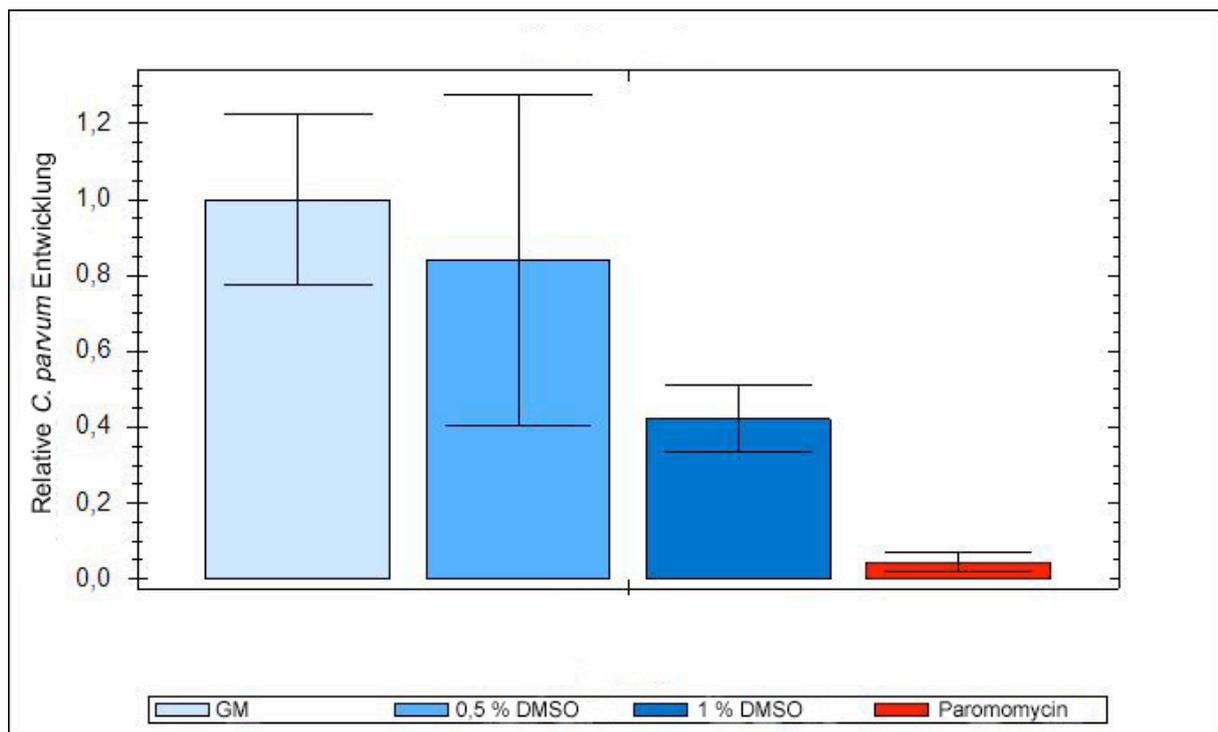


Abb. 4.3.1.2.1.1 Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen auf den Infektionserfolg von *C. parvum* in HCT-8 Zellen (GM: "Growth Medium" = Wachstumsmedium, Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung). Detaillierte Informationen zur Anzahl der ausgewerteten Proben sowie zu deren DNA-Gehalten und den durch die qPCRs ermittelten Cq-Werten finden sich in Tabelle A7 des Anhangs.

4.3.2 Wirkstoffüberprüfung in 96-Loch Gewebekulturschalen

Im Rahmen der Optimierung des Versuchsaufbaus wurden die Infektionsversuche zum Ziele der Wirkstoffüberprüfung nach einer Etablierung und Validierung des Modells mit den bekannten *in vitro* Entwicklungsinhibitoren Paromomycin und Nitazoxanid zunächst in 96-Loch Gewebekulturschalen durchgeführt, um eine möglichst hohe Anzahl an Wirkstoffen parallel in einem Versuchsdurchlauf überprüfen zu können.

Die zu überprüfenden Wirkstoffkonzentrationen waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht einheitlich auf 1, 10 und 100 ppm festgelegt. Weiterhin erfolgte die Wirkstoffüberprüfung im 96-Loch Gewebekulturschalen-Format noch bei einer 1%igen DMSO-Konzentration.

Zur Austestung einer potentiellen anticryptosporidialen Wirksamkeit der Substanzen wurden die verwendeten Zell- und Oocystenmengen in Anlehnung an Shahiduzzaman et al. (2009b) proportional dem Flächeninhalt der einzelnen Vertiefungen angepasst. Abweichend von den verwendeten Zell- und Oocystenmengen und dem Ausbleiben des Zentrifugationsschrittes bei 410×g für 5 min wurde hierbei wie in Kapitel 3.2.3 für die 48-Loch Gewebekulturschalen beschrieben verfahren.

Bei der Überprüfung der Wirkstoffe eins bis drei und fünf bis sieben betrug die Gesamtmenge an isolierter DNA maximal 64 ng/µl bei den unbehandelten Monolayern (Negativkontrollen). Bei den verwendeten Höchstkonzentrationen einiger Wirkstoffe, zum Beispiel der Wirkstoffe zwei und zehn betrug der DNA-Gehalt der isolierten Proben ≤ 2,6 ng/µl (siehe Tabelle A8 des Anhangs). Wurden diese Proben in der qPCR als Template eingesetzt, konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die Wirkstoffüberprüfungen anschließend in 48-Loch Gewebekulturschalen durchgeführt. Die Ergebnisse der Wirkstoffüberprüfungen, welche in 96-Loch Gewebekulturschalen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 4.3.2.1 aufgelistet, sowie detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (Anzahl der ausgewerteten Proben, deren DNA-Gehalte sowie in den qPCRs ermittelte C_q-Werte) in Tabelle A8 des Anhangs.

In diesem Format wurden außerdem sechs weitere Verbindungen auf die gleiche Art und Weise untersucht. Vier dieser Wirkstoffe erzielten mit Hilfe mindestens einer der überprüften Wirkstoffkonzentrationen eine über 80%ige Inhibition des cryptosporidialen Wachstums. Detaillierte Ergebnisse zu diesen Wirkstoffen können aus patentrechtlichen Einschränkungen nicht veröffentlicht werden.

Bei keiner der obligatorisch mitgeführten NTCs konnte in den qPCRs eine Amplifikation detektiert werden.

Tab. 4.3.2.1 qPCR Ergebnisse der im 96-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffe; angegeben ist die jeweilige relative *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Probe mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) (N/A= Probe nicht auswertbar). Die Überprüfung der aufgelisteten Wirkstoffe erfolgte in mehreren Infektionsversuchen, die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Für jeden durchgeführten Infektionsversuch sind die dazugehörigen Negativ- und Positivkontrollen gemeinsam mit den in diesem Lauf überprüften Wirkstoffen in einem Block (dickere Umrahmung) dargestellt. Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (Anzahl der ausgewerteten Proben, deren DNA-Gehalte und in den qPCRs ermittelte Cq-Werte) finden sich in Tabelle A8 des Anhangs.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [ppm]	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		1	0,22
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,25	0,14
Positivkontrolle Nitazoxanid	9,21	1,05	0,29
WS 1 Isotianil	2	0,86	0,32
WS 1 Isotianil	20	0,93	0,16
WS 1 Isotianil	200	0,64	0,15
WS 2 Pyrimethanil	2	0,98	0,16
WS 2 Pyrimethanil	20	0,99	0,25
WS 2 Pyrimethanil	200	1,92	2,06
WS 3 Fluotrimazol	2	1,23	0,32
WS 3 Fluotrimazol	20	1,15	0,28
WS 3 Fluotrimazol	200	N/A	N/A
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		1	0,48
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,10	0,02
Positivkontrolle Nitazoxanid	9,21	N/A	N/A
WS 5 Boscalid	1	0,47	0,52
WS 5 Boscalid	10	0,26	0,28
WS 5 Boscalid	200	0,21	0,13
WS 6 Fenfuram	1	1,39	0,33
WS 6 Fenfuram	10	0,15	0,10
WS 6 Fenfuram	200	0,30	0,06
WS 7 Thiabendazol	1	1,59	1,30
WS 7 Thiabendazol	10	0,48	0,40
WS 7 Thiabendazol	200	0,53	0,45
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		1	0,21
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,99	1,03
Negativkontrolle, ohne DMSO		2,37	0,53
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,11	0,06
WS 8 Ethionamide	1	0,92	0,62
WS 8 Ethionamide	10	1,41	0,34
WS 8 Ethionamide	100	0,44	0,10
WS 9 Carpropamid	1	0,74	0,16
WS 9 Carpropamid	10	0,13	0,01
WS 9 Carpropamid	100	0,36	0,07
WS 10 Spiroxamin	10	1,23	0,41
WS 10 Spiroxamin	100	0,52	0,32

4.3.3 Wirkstoffüberprüfung in 48-Loch Gewebekulturschalen

Die insgesamt 15 zuvor im 96-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffe konnten aufgrund technischer Ursachen (kompletter gelieferter Feststoff des Wirkstoffs bereits dergestalt in 100 % DMSO gelöst, dass eine anschließende Wirkstoff-Überprüfung mit einem 0,5%igen DMSO-Gehalt bei den gewünschten Konzentrationen nicht möglich war) leider nicht erneut im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüft werden.

Zur Überprüfung der Wirkstoffe 11 bis 29 (Ergebnisse für die Wirkstoffe 11 und 12 siehe Kapitel 4.3.4.) wurden HCT-8 Zellen in 48-Loch Gewebekulturschalen ausgesät und mit einer optimierten *C. parvum* Oocystenkonzentration und unter Zuhilfenahme eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes infiziert (siehe Kapitel 3.2.2). Nach einer 54-stündigen Einwirkzeit der Wirkstoffe (detaillierter Versuchsaufbau siehe Kapitel 3.2.3) wurde die DNA der Proben isoliert und in einer qPCR (siehe Kapitel 3.4.2) eine potentielle anticryptosporidiale Wirksamkeit ermittelt.

Die Ergebnisse der im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format durchgeführten Wirkstoffüberprüfungen sind in Tabelle 4.3.3.1 aufgeführt, sowie detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben, Anzahl biologischer Replikate sowie deren DNA-Gehalte) in Tabelle A10 des Anhangs aufgelistet.

Tab. 4.3.3.1 qPCR Ergebnisse der im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffe; angegeben ist die jeweilige relative *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Probe mit dazugehöriger Standardabweichung (SD). Die Überprüfung der aufgelisteten Wirkstoffe erfolgte in mehreren Infektionsversuchen, die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Für jeden durchgeführten Infektionsversuch sind die dazugehörigen Negativ- und Positivkontrollen gemeinsam mit den in diesem Lauf überprüften Wirkstoffen in einem Block (dickere Umrahmung) dargestellt. Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte sowie Anzahl biologischer Replikate inklusive deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A10 des Anhangs.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [ppm]	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,30
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,21	0,07
WS 13 Isoniazid	1	0,74	0,15
WS 13 Isoniazid	10	0,43	0,06
WS 13 Isoniazid	100	0,91	0,61
WS 14 Syringomycin E	1	0,60	0,20
WS 14 Syringomycin E	10	0,14	0,04
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,27
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,11	0,02
WS 16 CRP-B-22	1	0,29	0,00
WS 16 CRP-B-22	10	0,30	0,05
WS 17 CRP-B-23	1	0,29	0,02
WS 17 CRP-B-23	10	0,24	0,07
WS 17 CRP-B-23	100	0,42	0,03
WS 18 CRP-B-24	1	0,91	0,35
WS 18 CRP-B-24	10	0,45	0,02

WS 18 CRP-B-24	100	0,04	0,00
WS 19 CRP-B-25	1	0,88	0,45
WS 19 CRP-B-25	10	0,45	0,08
WS 19 CRP-B-25	100	0,36	0,04
WS 20 CRP-B-26	1	1,17	0,34
WS 20 CRP-B-26	10	0,62	0,09
WS 21 CRP-B-27	1	1,37	0,51
WS 21 CRP-B-27	10	1,63	0,58
WS 21 CRP-B-27	100	0,78	0,11
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,26
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,12	0,05
WS 15 CRP-B-21	1	0,32	0,04
WS 15 CRP-B-21	10	0,04	0,01
WS 22 CRP-B-28	1	0,65	0,09
WS 22 CRP-B-28	10	0,38	0,05
WS 23 CRP-B-29	1	0,93	0,54
WS 24 CRP-B-30	1	0,78	0,34
WS 25 CRP-B-31	1	0,99	0,48
WS 25 CRP-B-31	10	1,04	0,28
WS 25 CRP-B-31	100	1,22	0,24
WS 26 CRP-B-32	1	1,86	0,32
WS 26 CRP-B-32	10	0,34	0,09
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,24
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	0,07	0,02
WS 27 CRP-B-33	1	0,22	0,03
WS 27 CRP-B-33	10	0,35	0,15
WS 27 CRP-B-33	100	0,04	0,01
WS 28 CRP-B-34	1	0,33	0,08
WS 28 CRP-B-34	10	0,15	0,09
WS 29 CRP-B-35	1	0,88	0,27
WS 29 CRP-B-35	10	0,11	0,03

Zusätzlich wurden mit Hilfe dieses Verfahrens 15 weitere Verbindungen auf die gleiche Art und Weise untersucht, von denen in den überprüften Wirkstoffkonzentrationen allerdings nur zwei Wirkstoffe eine über 80%ige Inhibition des cryptosporidialen Wachstums erzielten. Detaillierte Ergebnisse zu diesen Wirkstoffen können aus patentrechtlichen Einschränkungen nicht veröffentlicht werden.

Eine exemplarische Standardkurve mit dem Nachweis von minimal 10 Kopien der cryptosporidialen Zielsequenz (Standard) sowie ein exemplarischer Amplifikationsverlauf der eingesetzten Templatmengen des cryptosporidialen Standards (10^1 bis 10^6 Kopienzahlen der cryptosporidialen Zielsequenz) zeigen die Abbildungen 4.3.3.1 und 4.3.3.2.

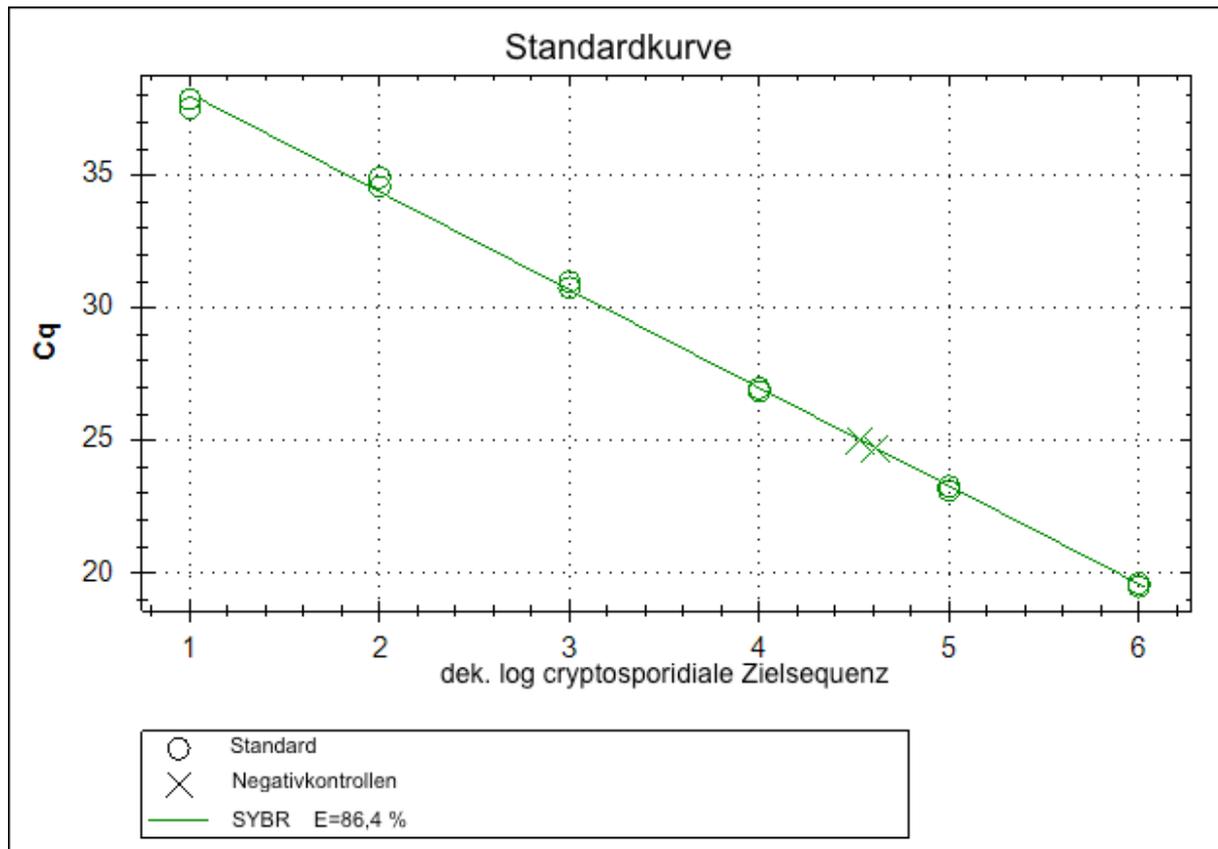


Abb. 4.3.3.1 Durch Einsatz definierter Templatmengen der cryptosporidialen Zielsequenz (10^1 bis 10^6 Kopien) generierte Standardkurve mit einer Effizienz (E) von 86,4 % (Fluoreszenz-Detektion via SYBR-Kanal; Cq: "quantification cycle"). Die jeweils im Doppelansatz (technische Replikate) ausgewerteten Standards unterschiedlicher Kopienanzahl sind in Form von Kreisen auf der Kurve aufgetragen; die technischen Replikate einer Negativkontrolle (mit *C. parvum* infizierter HCT-8 Monolayer in Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO inkubiert) sind anhand von Kreuzen dargestellt. Detaillierte Informationen zu den durch die qPCR ermittelten Cq-Werten sowie zum DNA-Gehalt der untersuchten Negativkontrolle finden sich in Tabelle A9 des Anhangs.

Der mittels des Standards obligatorisch geführte Nachweis von 10 Kopien der cryptosporidialen Zielsequenz verdeutlicht die hohe Sensitivität der qPCR. Im Genom von *C. parvum* sind insgesamt fünf 18S rDNA Gene annotiert (cryptodb.org); folglich entspricht der Nachweis von 10 Kopien der cryptosporidialen Zielsequenz einer Sensitivität von 2 Genomen. Ein Meront der ersten Generation (Typ I) beinhaltet sechs bis acht haploide Merozoitien, ein Meront der zweiten Generation (Typ II) enthält dergleichen vier. Somit entspricht die erzielte Sensitivität 0,25 Meronten vom Typ I und 0,5 Meronten vom Typ II.

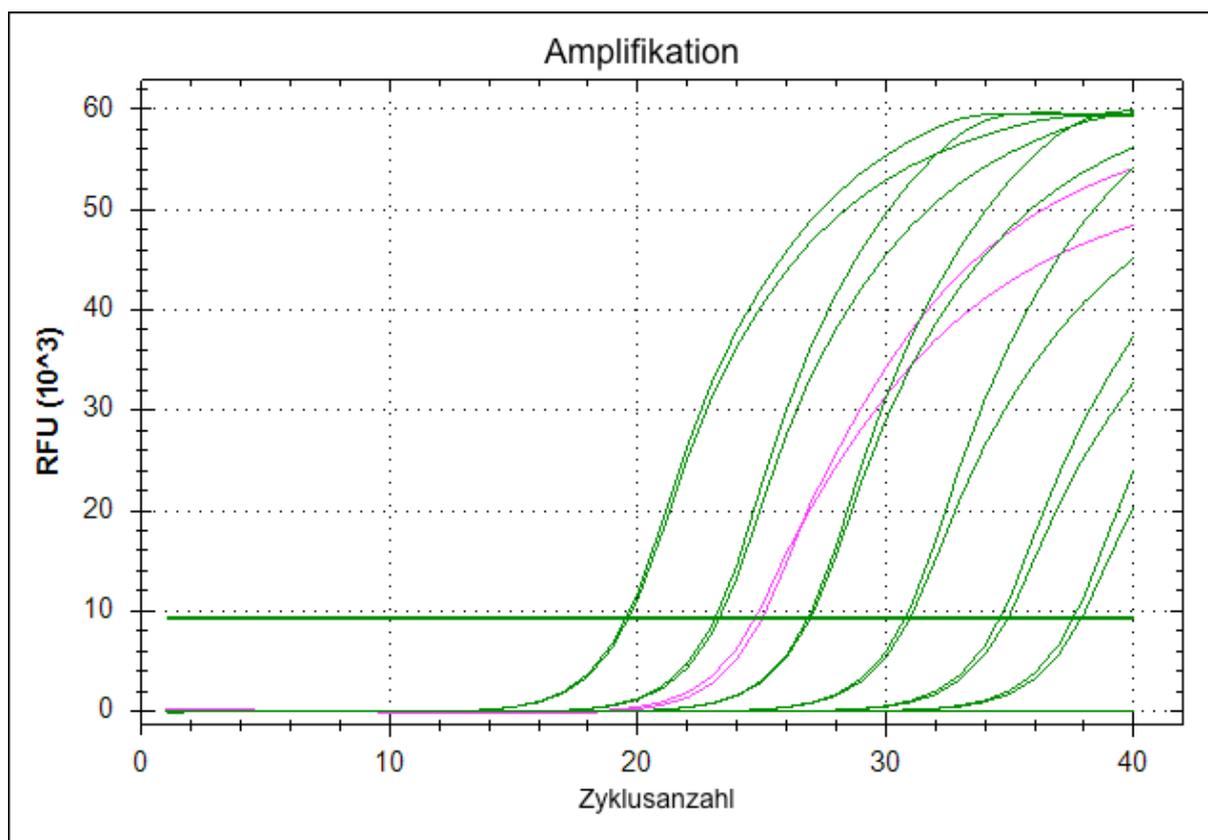


Abb. 4.3.3.2 Graphische Darstellung der Kurvenverläufe während der Amplifikation bei Einsatz definierter Templatemengen der cryptosporidialen Zielsequenz als Standard (10^1 bis 10^6 Kopien, in grün, in Abbildung von links nach rechts abnehmende Konzentration der Zielsequenz; RFU: "relative fluorescence unit") und einer Negativkontrolle (mit *C. parvum* infizierter HCT-8 Monolayer in Wachstumsmedium mit 0,5 % DMSO inkubiert, in pink). Ausführlichere Informationen zu den durch die qPCR ermittelten Cq-Werten sowie zum DNA-Gehalt der untersuchten Negativkontrolle finden sich in Tabelle A9 des Anhangs.

4.3.4 BAY-AF76184 und BAY-AB24992

Die Wirkstoffe 11, BAY-AB24992, und 12, BAY-AF76184, wurden in insgesamt acht verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 3.9.1.1) auf eine anticryptosporidiale Wirksamkeit getestet. Zusätzlich wurde in einem LDH-Assay (siehe Kapitel 3.9.1 und 4.3.4.1) die Zytotoxizität dieser Wirkstoffe ermittelt und anhand eines Viabilitätsassays (siehe Kapitel 3.9.2 und 4.3.4.2) mögliche das Zellwachstum inhibierende Effekte der Substanzen untersucht.

Sowohl bei der Wirkstoffüberprüfung als auch bei den Viabilitäts- und Zytotoxizitätsassays wurden der Wirkstoff 4, Halofugionhydrobromid (Halofuginon), und der als Positivkontrolle fungierende Wirkstoff 30, Paromomycin, in ebenfalls acht verschiedenen Konzentrationen mitgeführt (verwendete Konzentrationen siehe Tab. 3.9.1.1).

Sämtliche Versuche zur Überprüfung einer anticryptosporidialen Wirksamkeit (*C. parvum* Inhibitionsassay) wurden mindestens zweifach wiederholt, wobei jede Wirkstoffkonzentration

als biologisches Duplikat geführt wurde. Von jedem biologischen Duplikat wurden in der qPCR jeweils zwei technische Replikate überprüft. Abweichend von den zuvor beschriebenen Infektionsversuchen wurden hier aus Gründen der Verfügbarkeit Oocysten vom Genotyp IlaA15G2R1 zur Infektion der HCT-8 Zellen verwendet. Ein direkter Vergleich der beiden Isolate anhand eines parallel angesetzten Infektionsversuches konnte leider nicht erfolgen, da beim Eintreffen der Lieferung der Oocysten vom Genotyp IlaA15G2R1 keine vitalen Oocysten vom Genotyp IIA16G2R1 mehr verfügbar waren.

Die Überprüfung der Wirkstoffe BAY-AF76184 und BAY-AB24992 wurde parallel durchgeführt, so dass die Positiv- und Negativkontrollen hier identisch sind. Paromomycin und Halofuginon wurden in zwei separaten Versuchsdurchläufen überprüft. Für die einzelnen Wirkstoffe sind die im Rahmen einer repräsentativen qPCR ermittelten Ergebnisse in den Tabellen 4.3.4.1 bis 4.3.4.4 aufgelistet. Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte C_q-Werte und Anzahl der biologischen Replikate der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A11 des Anhangs.

Zur statistischen Auswertung dieser Daten wurden mit Hilfe von GraphPad 5.03 nicht-lineare Regressionen mit einem logistischen vier Parameter-Model berechnet, nachdem die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe dekadisch logarithmiert wurden. Für untere ("bottom") und obere ("top") Grenzwerte (Asymptoten) wurden hierbei Größenordnungen definiert. Der untere Grenzwert wurde „zwischen null und eins“ eingeeengt und der obere wurde auf „konstant gleich eins“ festgelegt.

Die so vorgenommenen Auswertungen für die einzelnen Wirkstoffe sind in der Abbildung 4.3.4.1 graphisch dargestellt.

In einem repräsentativen Infektionsversuch zur Austestung der verschiedenen Paromomycin-Konzentrationen bewirkte die verwendete Höchstkonzentration von 3000 µM eine 92,77%ige Inhibition des cryptosporidialen Wachstums; d.h. im Vergleich zu einem unbehandelten infizierten Zellrasen (Negativkontrolle) betrug die relative Menge von *C. parvum* 0,07 mit einer Standardabweichung (SD) von ±0,01. Mit Abnahme der Wirkstoffkonzentration sank der inhibitorische Effekt von Paromomycin bis auf 44,34 % (Details siehe Tab. 4.3.4.1 und Tabelle A11 des Anhangs). Der errechnete EC₅₀-Wert betrug 69,5 µM mit einem 95 % Konfidenzintervall (95 % KI) von 38,6 bis 125,2 µM. Der Pearson Korrelationskoeffizient R² belief sich auf 0,93 (siehe Tab. 4.3.4.5).

Tab. 4.3.4.1 qPCR Ergebnisse des im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffs Paromomycin (Positivkontrolle); angegeben ist die relative *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Probe mit dazugehöriger Standardabweichung (SD). Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte und Anzahl der biologischen Replikate der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A11 des Anhangs.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [µM]	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,19
Paromomycin	23,44	0,30	0,13
Paromomycin	46,88	0,56	0,08
Paromomycin	93,75	0,45	0,09
Paromomycin	187,5	0,34	0,08
Paromomycin	375	0,27	0,03
Paromomycin	750	0,16	0,04
Paromomycin	1500	0,11	0,01
Paromomycin	3000	0,07	0,01

Auch für den Wirkstoff BAY-AF76184 konnte anhand der qPCR Ergebnisse eines repräsentativen Infektionsversuches eine Konzentrations-Wirkungskurve berechnet werden. Der EC₅₀-Wert betrug hier 2,37 µM (95 % KI: 2,11-2,65 µM) und der Pearson Korrelationskoeffizient war R²=0,95 (siehe Tabelle 4.3.4.5). Im Vergleich mit der Negativkontrolle konnte durch die verwendete Höchstkonzentration von 285,7 µM die relative *C. parvum* Entwicklung auf 0,03 (SD ± 0,01) gesenkt werden, was einer inhibitorischen Wirkung von 97,49 % entspricht. Die verwendete geringste Konzentration des Wirkstoffes in Höhe von 2,23 µM reduzierte das Cryptosporidienwachstum um 57,83 % (siehe Tabelle 4.3.4.2 und Tabelle A11 des Anhangs).

Tab. 4.3.4.2 qPCR Ergebnisse des im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffs BAY-AF76184; angegeben ist die relative *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Probe mit dazugehöriger Standardabweichung (SD). Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A11 des Anhangs.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [µM]	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,13
Positivkontrolle Paromomycin	3000	0,03	0,01
BAY-AF76184	2,23	0,58	0,11
BAY-AF76184	4,46	0,22	0,06
BAY-AF76184	8,93	0,07	0,01
BAY-AF76184	17,86	0,18	0,04
BAY-AF76184	35,71	0,15	0,02
BAY-AF76184	71,43	0,05	0,01
BAY-AF76184	142,85	0,04	0,01
BAY-AF76184	285,7	0,03	0,01

Mittels des Wirkstoffes BAY-AB24992 konnte in der verwendeten Höchstkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle eine Reduktion der relativen *C. parvum* Entwicklung auf 0,12 (SD \pm 0,06) erzielt werden. Der anticryptosporidiale Effekt dieser Substanz war nicht reproduzierbar konzentrationsabhängig; daher konnte für diesen Wirkstoff anhand der Daten keine eindeutige Konzentrations-Wirkungskurve berechnet werden (siehe Abbildung 4.3.4.1, Tabelle 4.3.4.3 sowie Tabelle A11 des Anhangs).

Tab. 4.3.4.3 qPCR Ergebnisse des im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffes BAY-AB24992; angegeben die relative *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Probe mit dazugehöriger Standardabweichung (SD). Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) sind in Tabelle A11 des Anhangs.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [μ M]	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,13
Positivkontrolle Paromomycin	3000	0,03	0,01
BAY-AB24992	2,02	0,29	0,08
BAY-AB24992	4,05	0,48	0,10
BAY-AB24992	8,10	0,62	0,13
BAY-AB24992	16,19	0,46	0,17
BAY-AB24992	32,38	0,29	0,04
BAY-AB24992	64,76	0,15	0,05
BAY-AB24992	129,53	0,20	0,05
BAY-AB24992	259,05	0,12	0,06

Auch für Halofuginon konnte aus denselben Gründen keine Konzentrations-Wirkungskurve berechnet werden. Für die verwendete Halofuginon-Höchstkonzentration von 1 μ M wurde eine inhibitorische Wirkung von 96,54 % in der qPCR nachgewiesen; der inhibitorische Effekt zeigte sich in den darauf folgenden Verdünnungsreihen aber nicht konzentrationsabhängig (siehe Abbildung 4.3.4.1, Tabelle 4.3.4.4 und Tabelle A11 des Anhangs).

Tab. 4.3.4.4 qPCR Ergebnisse des im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffes Halofuginonhydrobromid (Halofuginon); angegeben die relative *C. parvum* Entwicklung der untersuchten Probe mit dazugehöriger Standardabweichung (SD). Detaillierte Angaben zu den einzelnen qPCRs (ermittelte Cq-Werte der untersuchten Proben sowie deren DNA-Gehalte) finden sich in Tabelle A11 des Anhangs.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [μ M]	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung	rel. <i>C. parvum</i> Entwicklung SD
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		1,00	0,13
Positivkontrolle Paromomycin	3000	0,03	0,01
Halofuginon	0,01	0,54	0,19
Halofuginon	0,02	0,81	0,06
Halofuginon	0,03	1,33	0,16
Halofuginon	0,06	1,06	0,12
Halofuginon	0,13	0,83	0,19
Halofuginon	0,25	0,26	0,06
Halofuginon	0,5	0,10	0,02
Halofuginon	1	0,03	0,01

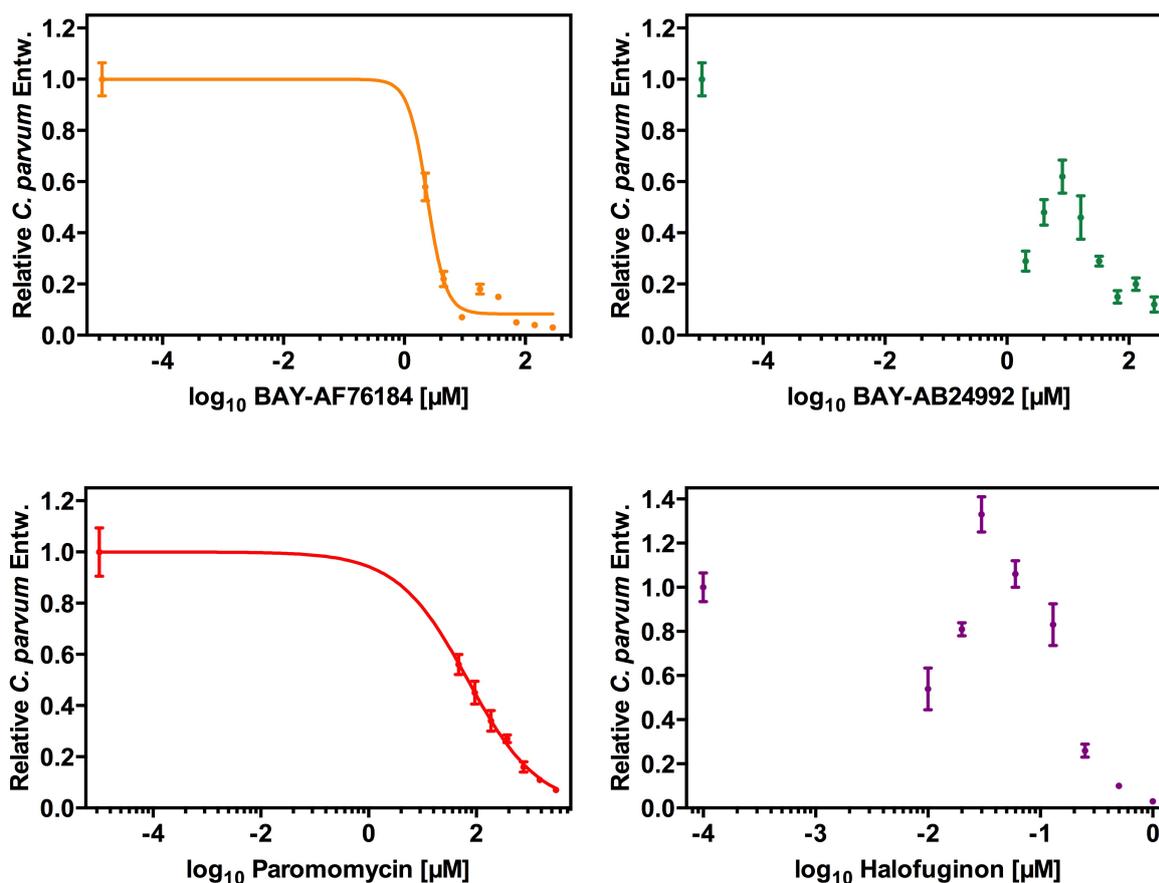


Abb. 4.3.4.1 Effekte der untersuchten Wirkstoffe BAY-AF76184, BAY-AB24992, Paromomycin und Halofuginonhydrobromid (Halofuginon) auf die Entwicklung von *C. parvum*; aufgetragen sind die verwendeten logarithmierten Wirkstoffkonzentration gegen die dazugehörigen in der qPCR ermittelten Werte für die relative *C. parvum* Entwicklung mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) (siehe auch Tab. 4.3.4.5, sowie Tabelle A11 des Anhangs).

Tab. 4.3.4.5 EC_{50} -Werte und Angaben zum Kurvenverlauf der Konzentrations-Wirkungskurven bei der Behandlung von infizierten HCT-8 Monolayern mit Paromomycin und BAY-AF76184 aus Abbildung 4.3.4.1.

Wirkstoff	EC_{50}	Hill-Steigung	R^2
Paromomycin	69,5 μM (95 % KI: 38,6-125,2 μM)	-0,66 (95 % KI: -1,04--0,29)	0,93
BAY-AF76184	2,37 μM (95 % KI: 2,11 bis 2,66 μM)	-2,81 (95 % KI: -3,90 bis -1,71)	0,95

4.3.4.1 Lactatdehydrogenase-Assay

4.3.4.1.1 Ermittlung der optimalen Zellkonzentration

Zur Bestimmung der optimalen Zellkonzentration für den LDH-Assay wurden in einem Vorversuch sieben verschiedene HCT-8 Zellkonzentrationen ausgetestet (siehe Kapitel 3.9.1.1). Die Messwerte für die "High" Kontrollen (repräsentieren die maximal mögliche LDH-

Freisetzung aus den Zellen, induziert durch Zugabe eines Lysis-Reagenzes) und "Low" Kontrollen (fungieren als Maß für die spontane LDH-Freisetzung aus unbehandelten Zellen) wurden um den gemittelten Messwert der "Background" Kontrollen korrigiert, bevor für diese Messwerte die Differenz der Absorption bei 490 nm und bei 690 nm gebildet wurde ($Absorption_{(OD\ 490-OD\ 690)}$). Für die "High" Kontrollen konnte eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten HCT-8 Zellkonzentration und der LDH Signalintensität gezeigt werden. Die Ergebnisse dieses Vorversuches sind in der in der Abbildung 4.3.4.1.1.1 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.3.4.1.1.1 aufgelistet.

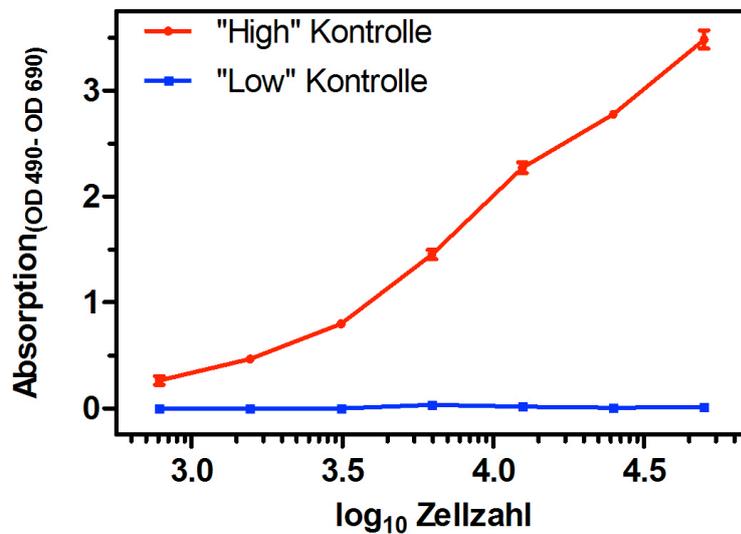


Abb. 4.3.4.1.1.1 Lineare Beziehung zwischen HCT-8 Zellkonzentration und der $Absorption_{(OD\ 490-OD\ 690)}$ als Maß für die LDH Signalintensität. In den "Low" Kontrollen wurde die spontane LDH-Freisetzung aus unbehandelten Zellen erfasst, wohingegen in den "High" Kontrollen durch Zugabe eines Lysis-Reagenzes die maximal mögliche LDH-Freisetzung für die jeweils verwendete Zellkonzentration ermittelt wurde.

Tab. 4.3.4.1.1.1 Im Rahmen eines Vorversuchs ermittelte Messwerte $Absorption_{(OD\ 490-OD\ 690)}$ der "High" - und "Low" Kontrollen bei Verwendung verschiedener HCT-8 Zellkonzentrationen. Der Vorversuch diente der Bestimmung der optimalen Zellkonzentration für den LDH-Assay.

verwendete Zellkonzentration je Vertiefung		"High" Kontrollen $Absorption_{(OD\ 490-OD\ 690)}$		"Low" Kontrollen $Absorption_{(OD\ 490-OD\ 690)}$	
absolute Zellzahl	logarithmierte Zellzahl (\log_{10})	Mean	SD	Mean	SD
50000,00	4,70	3,48	0,15	0,01	0,00
25000,00	4,40	2,78	0,04	0,01	0,02
12500,00	4,10	2,27	0,09	0,02	0,01
6250,00	3,80	1,45	0,08	0,03	0,04
3125,00	3,49	0,80	0,02	0,00	0,00
1562,50	3,19	0,47	0,03	-0,01	0,00
781,25	2,89	0,26	0,07	0,00	0,02

Laut Handbuch für das Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} (LDH) gilt die Zellkonzentration als optimal für den Assay, bei der die Differenz der Messwerte zwischen den "High" Kontrollen und "Low" Kontrollen am größten ist. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung einer linearen Beziehung zwischen Zellkonzentrationen und LDH Signalintensität bei den "High" Kontrollen. Bei photometrischen Messungen kann eine lineare Abhängigkeit zwischen gemessener optischer Dichte und der Konzentration des absorbierenden Farbstoffs nur bei Absorptionsmessungen bis ca. 1,2 als gesichert gelten.

Entsprechend den Meßergebnissen dieses Vorversuchs wurde für den LDH-Assay eine Zellkonzentration von $6,25 \times 10^3$ Zellen je Vertiefung festgelegt. Bei dieser Zellkonzentration wurde eine Absorption_(OD 490- OD 690) von 1,45 gemessen, die nur geringgradig oberhalb des Wertes von 1,2 liegt und zugleich die größte Differenz der Messwerte zwischen den "High" Kontrollen und "Low" Kontrollen bei Vorliegen einer linearen Beziehung für die "High" Kontrollen zwischen Zellkonzentrationen und LDH Signalintensität aufweist.

4.3.4.1.2 Zytotoxizität der Wirkstoffe

Mittels des LDH-Assays (siehe Kapitel 3.9.1) wurde die Zytotoxizität der Wirkstoffe 11, BAY-AB24992, und 12, BAY-AF76184 quantifiziert. Insgesamt wurden die gleichen acht verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe wie auch im *C. parvum* Inhibitionsassay untersucht (verwendete Konzentrationen siehe Tabelle 3.9.1.1). Zusätzlich wurden auch hier die Wirkstoffe Paromomycin und Halofuginonhydrobromid (Halofuginon) in ebenfalls acht verschiedenen Konzentrationen mitgeführt.

Sämtliche Versuche wurden dreifach wiederholt, wobei die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen jeweils als biologische Triplikate geführt wurden.

Zur statistischen Auswertung dieser Versuche wurden zuerst alle Messwerte um den gemittelten Messwert der "Background" Kontrollen korrigiert, bevor für diese die Differenz zwischen Absorption bei 490 nm und Absorption bei 690 nm gebildet wurde (Absorption_(OD 490-OD 690)). Aus den auf diese Weise korrigierten Messwerten wurde für die Dreifachansätze aller Proben und Kontrollen das arithmetische Mittel gebildet. Nachdem die "High" Kontrollen um den zellspezifischen Faktor korrigiert wurden, wurden die gemittelten Werte in folgende Formel eingesetzt, um die Zytotoxizität der Substanzen in Prozent zu bestimmen:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = (\text{Messwert Probe} - \text{"Low" Kontrolle}) \div (\text{"High" Kontrolle} - \text{"Low" Kontrolle}) \times 100$$

Anschließend wurden wie auch bei der statistischen Auswertung des *C. parvum* Inhibitionsassays mit Hilfe von GraphPad 5.03 nicht-lineare Regressionen mit einem logistischen vier Parameter-Model berechnet, nachdem die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe dekadisch logarithmiert wurden. Im Unterschied zur Auswertung des *C. parvum*

Inhibitionsassays wurden hier keine Größenordnungen für die oberen und unteren Grenzwerte definiert.

Da die Werte der Negativkontrollen unmittelbar in die Berechnung der Zytotoxizität einfließen, wurden sie nicht in die Berechnung der Konzentrations-Wirkungskurven einbezogen.

Für Paromomycin, Halofuginon und BAY-AB24992 konnten in den überprüften Konzentrationsspektren keine konzentrationsabhängigen Zytotoxizitäten festgestellt werden. Paromomycin erreichte bei einer Konzentration von 750 µM eine maximale Zytotoxizität von 2,6 % mit einer Standardabweichung von ± 1,27 %. Die niedrigste Zytotoxizität in Höhe von 0,67 % (SD ± 1,99 %) wurde für die Wirkstoffkonzentration von 23,44 µM berechnet. Die Zytotoxizität von Halofuginon erstreckte sich über einen Bereich von 0,14 % mit einer Standardabweichung von ± 0,99 % (Wirkstoffkonzentration 0,01 µM) bis 1,57 % (SD ± 2,33 %) (Wirkstoffkonzentration 0,06 µM).

Für die Substanz BAY-AB24992 betrug der geringste berechnete Zytotoxizitätswert 3,58 % (SD ± 7,12 %) bei einer Konzentration von 4,05 µM. Eine maximale Zytotoxizität des Wirkstoffes von 8,05 % (SD ± 3,63 %) wurde bei der Verwendung der zweithöchsten Wirkstoffkonzentration (129,53 µM) erreicht.

Einzig für den Wirkstoff BAY-AF76184 konnte anhand der Daten eine Konzentrations-Wirkungskurve berechnet werden. Die verwendete Höchstkonzentration von 285,7 µM wies eine Zytotoxizität von 26,88 % (SD ± 3,53 %) auf. Eine maximale Zytotoxizität in Höhe von 29,2 % (SD ± 5,37 %) wurde für die zweithöchste verwendete Konzentration nachgewiesen. Mit abnehmender Wirkstoffkonzentration sank die Zytotoxizität bis auf den Wert von 5,21 % (SD ± 4,52 %) bei der zweitniedrigsten überprüften Konzentration des Wirkstoffes (4,46 µM). Der errechnete EC₅₀-Wert betrug 48,78 µM (95 % KI: 32,61-72,97 µM) und der Pearson Korrelationskoeffizient belief sich auf 0,80 (siehe auch Tabelle 4.3.4.1.2.1).

Tab. 4.3.4.1.2.1 EC₅₀-Wert und Angaben zum Kurvenverlauf der auf Basis der im LDH-Assay ermittelten Zytotoxizitätswerte berechneten Konzentrations-Wirkungskurve für den Wirkstoff BAY-AF76184.

Wirkstoff	EC ₅₀	Hill-Steigung	max. Zytotoxizität [%]*	R ²
BAY-AF76184	48,78 µM (95 % KI: 32,61-72,97 µM)	1,37 (95 % KI: 0,65-2,08)	30,36 (95 % KI: 25,15-35,57)	0,80

* bzw. berechneter Wert der oberen Asymptote der Konzentrations-Wirkungskurve

Die Auswertungen für die einzelnen Wirkstoffe sind in Abbildung 4.3.4.1.2.1 graphisch dargestellt.

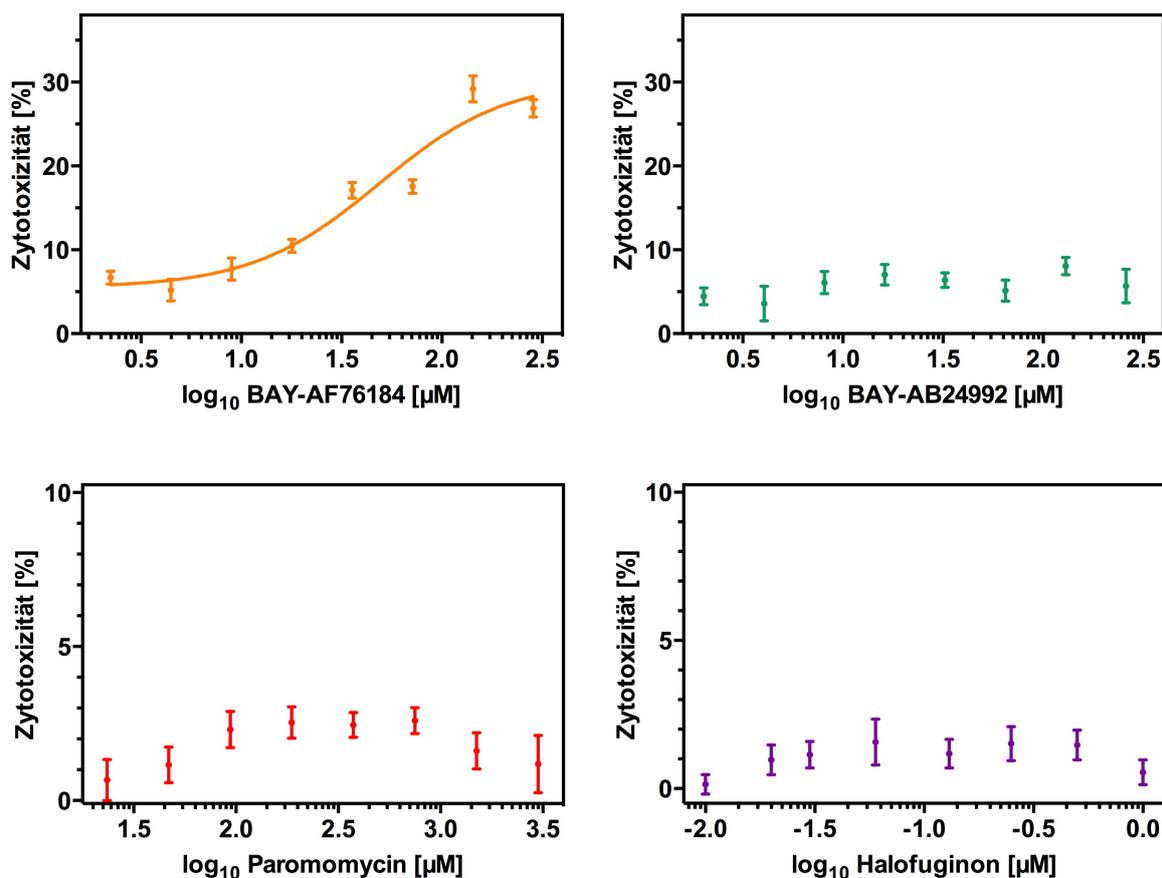


Abb. 4.3.4.1.2.1 Anhand eines LDH-Assays bestimmte zytotoxische Effekte der untersuchten Wirkstoffe BAY-AF76184, BAY-AB24992, Paromomycin und Halofuginonhydrobromid (Halofuginon) auf die verwendete HCT-8 Zelllinie; aufgetragen sind die verwendeten logarithmierten Wirkstoffkonzentration gegen die dazugehörigen berechneten Zytotoxizitätswerte [%] mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) (siehe auch Tabelle 4.3.4.1.2.1).

4.3.4.2 WST-1-Assay

Anhand des WST-1-Assays (siehe Kapitel 3.9.2) wurde die Anzahl (noch) metabolisch aktiver, d.h. lebender Zellen nach Wirkstoffapplikation ermittelt, um mögliche die Zellproliferation inhibierende Effekte der Substanzen zu untersuchen.

In diesen Assay eingesetzte Wirkstoffe und verwendete Konzentrationen sind deckungsgleich mit den im *C. parvum* Inhibitionsassay und LDH-Assay verwendeten.

Sämtliche Versuche wurden mindestens dreifach wiederholt, wobei die einzelnen Wirkstoffkonzentrationen jeweils als biologische Duplikate geführt wurden.

Um einen inhibitorischen Effekt der Wirkstoffe abzubilden, wurde das Wachstum der behandelten Monolayer als Verhältnis zu den unbehandelten Monolayern (Negativkontrollen) in Prozent errechnet. Hierfür wurden zuerst alle Messwerte um den gemittelten Wert der "Background" Kontrollen korrigiert und anschließend für alle Messwerte die Differenz zwischen Absorption bei 450 nm und Absorption bei 690 nm gebildet.

Aus den auf diese Weise korrigierten Messwerten und dem arithmetischen Mittel der Negativkontrollen wurde der Quotient gebildet und selbiger mit 100 multipliziert.

Zur statistischen Auswertung dieser Daten wurden hier ebenfalls wie bei dem *C. parvum* Inhibitionsassay und dem LDH-Assay mit Hilfe von GraphPad 5.03 nicht-lineare Regressionen mit einem logistischen vier Parameter-Model berechnet, nachdem die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe dekadisch logarithmiert wurden. Für die Substanz Halofuginon wurde als einziges der untere Grenzwert ("bottom") „zwischen null und 100“ eingengt. Bei den anderen drei Wirkstoffen erfolgte keine Definition für die Größenordnungen der Grenzwerte. Die Werte der Negativkontrollen sind in die Berechnungen der Konzentrations-Wirkungskurven nicht mit einbezogen worden. Sie sind lediglich in den Abbildungen als durchgezogene Linie bei 100 % dargestellt. Die Standardabweichungen der Negativkontrollen sind in Form gestrichelter Linien abgebildet.

Die vorgenommenen Auswertungen sind in Abbildung 4.3.4.2.1 graphisch dargestellt.

Für den Wirkstoff BAY-AF76184 konnte im WST-1 Assay, wie auch in dem *C. parvum* Inhibitionsassay und in dem LDH-Assay, eine konzentrationsabhängige Wirkung festgestellt werden. Mit steigender Wirkstoffkonzentration ging das Zellwachstum im Vergleich zu einem unbehandelten Zellrasen deutlich zurück. Die verwendete Höchstkonzentration von 285,7 μM reduzierte das Zellwachstum auf 32,46 % mit einer SD von $\pm 7,38$ %. Das berechnete minimale Zellwachstum bei hohen Wirkstoffkonzentrationen (untere Asymptote) lag bei ca. 32,98 % (95 % KI: 13,59-52,37). Der errechnete EC_{50} -Wert betrug 9,07 μM mit einem 95 % KI von 3,41 bis 24,15 μM und der Pearson Korrelationskoeffizient war $R^2=0,81$ (siehe auch Tabelle 4.3.4.2.1).

Für die Wirkstoffe Paromomycin und BAY-AB24992 konnte anhand der Daten keine Konzentrations-Wirkungskurve berechnet werden. Im WST-1 Assay konnte für beide Substanzen ein konzentrationsabhängiger das Zellwachstum inhibierender Effekt genauso wenig nachgewiesen werden wie eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität anhand des LDH-Assays.

Paromomycin bewirkte in der verwendeten Höchstkonzentration von 3000 μM eine Wachstumsinhibition der HCT-8 Zellen um 10,42 % mit einer SD von $\pm 19,11$ %. In einer Konzentration von 1500 μM reduzierte diese Substanz das Zellwachstum auf 95,69 % (SD $\pm 5,11$ %), eine Größenordnung, die bereits von den Negativkontrollen abgedeckt wurde. Die als Negativkontrollen fungierenden unbehandelten Monolayer wiesen bei 100 % Wachstum eine SD von $\pm 5,23$ % auf. Auch die Reduktion des Zellwachstums um 2,75 % (SD $\pm 1,97$ %) durch die nächstfolgende Verdünnungsstufe des Wirkstoffes Paromomycin (750 μM) fiel in den Schwankungsbereich der Negativkontrollen. In den weiteren verwendeten Wirkstoffkonzentrationen führte Paromomycin zu keiner Wachstumsinhibition.

Für die Substanz BAY-AB24992 konnte für keine der verwendeten Wirkstoffkonzentrationen ein das Zellwachstum inhibierender Effekt verzeichnet werden.

Halofuginon wirkte in den drei höchsten verwendeten Wirkstoffkonzentrationen inhibierend auf das Wachstum der HCT-8 Zellen. Die Höchstkonzentration von 1 μM reduzierte das Zellwachstum auf 33,12 % (SD \pm 18,18 %), gefolgt von einer Wachstumsinhibition in Höhe von 31,93 % (SD \pm 18,22 %) bei einer Konzentration von 0,5 μM . Die nächstfolgende Verdünnungsstufe (0,25 μM) reduzierte das Zellwachstum im Vergleich mit der Negativkontrolle auf 84,44 % (SD \pm 10,7 %). Entsprechend den Berechnungen der Konzentrations-Wirkungskurve betrug der EC_{50} -Wert 0,35 μM mit einem 95 % KI von 0,19 bis 0,65 μM und der Pearson Korrelationskoeffizient $R^2=0,86$ (siehe auch Tabelle 4.3.4.2.1). Bei allen Substanzen konnte reproduzierbar in den verwendeten niedrigeren Konzentrationen ein erhöhtes Zellwachstum im Vergleich zu den Negativkontrollen beobachtet werden (siehe Abbildung 4.3.4.2.1).

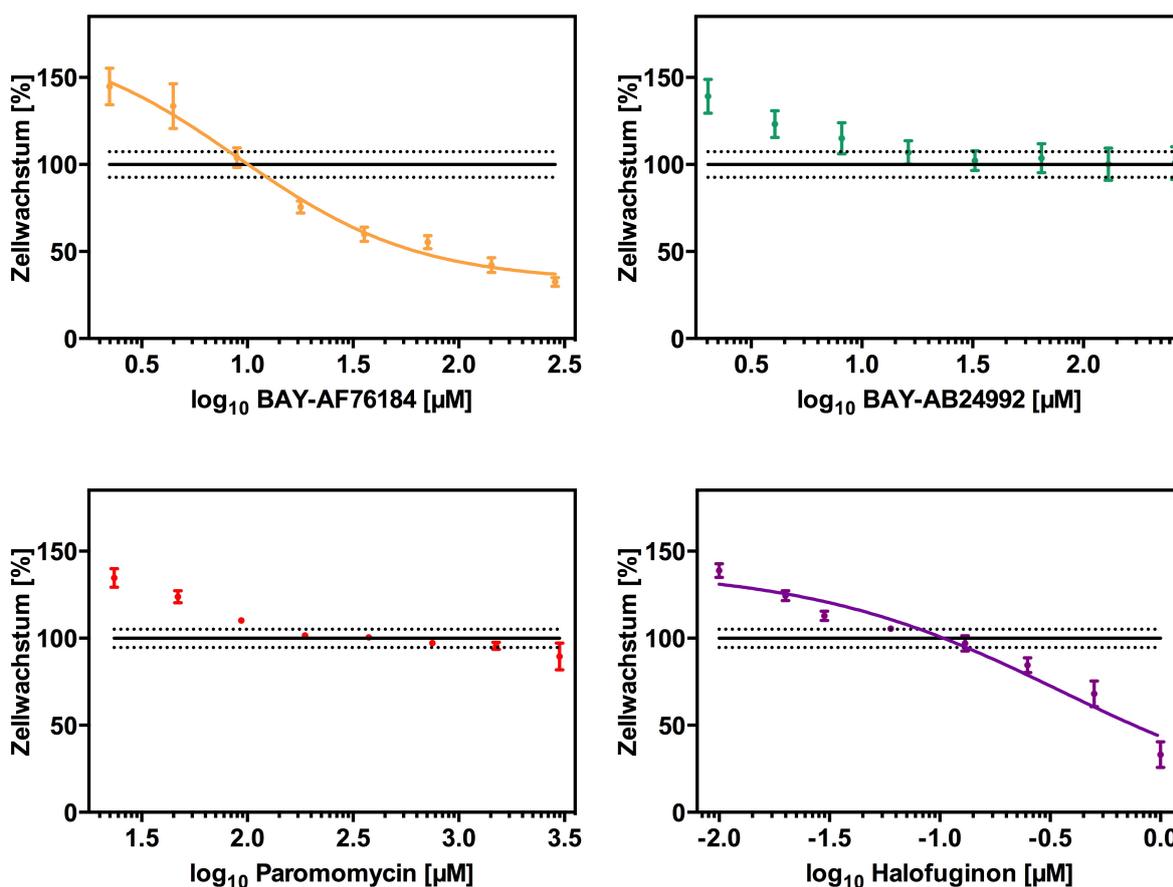


Abb. 4.3.4.2.1 Mittels eines WST-1-Assays bestimmter antiproliferativer Effekt der untersuchten Wirkstoffe BAY-AF76184, BAY-AB24992, Paromomycin und Halofuginonhydrobromid (Halofuginon); aufgetragen sind die verwendeten logarithmierten Wirkstoffkonzentration gegen die dazugehörigen berechneten Zellwachstumswerte [%] mit dazugehöriger Standardabweichung (SD) (siehe auch Tabelle 4.3.4.2.1). Die durchgezogene Linie bei 100 % kennzeichnet das Wachstum der mitgeführten Negativkontrollen. Die gestrichelten Linien markieren deren Standardabweichung.

Tab. 4.3.4.2.1 EC₅₀-Werte und Angaben zum Kurvenverlauf der Konzentrations-Wirkungskurven von BAY-AF76184 und Halofuginon basierend auf den im WST-1-Assay ermittelten Werten zur Abbildung inhibitorischer Effekte auf das HCT-8 Zellwachstum.

Wirkstoff	EC ₅₀	Hill-Steigung	min. Zellwachstum [%]*	R ²
BAY-AF76184	9,07 µM (95 % KI: 3,41-24,15 µM)	-1,02 (95 % KI: -1,83--0,21)	32,98 (95 % KI: 13,59-52,37)	0,81
Halofuginon	0,35 µM (95 % KI: 0,19-0,65 µM)	-0,76 (95 % KI: -1,21--0,31)	2,83E-10 (95 % KI: 0,0-35,07)	0,86

*bzw. berechneter Wert der unteren Asymptote der Konzentrations-Wirkungskurve

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Zellkultur-basierten Testverfahrens zur Evaluierung potentieller Wirkstoffe gegen *Cryptosporidium parvum*.

Hintergrund dieser Studie sind bis heute fehlende in allen Fällen effektive Chemotherapeutika zur Behandlung einer durch dieses zoonotische Protozoon verursachten humanen und bovinen Cryptosporidiose (Cabada und White, 2010; Gargala, 2008; Shahiduzzaman und Dauschies, 2012; Stockdale et al., 2008). Zwar existieren sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zur Behandlung bzw. Pro- und Metaphylaxe zugelassene Wirkstoffe (Nitazoxanid, Halofuginon), selbige erwiesen sich aber in verschiedenen Studien als nur partiell wirksam und führen nicht in allen Fällen einer Cryptosporidiose zur Eliminierung des Erregers (siehe Kapitel 2.2.4).

In vitro Kultivierungsmodelle eignen sich sehr gut als initiale "Screening"-Methode zur Identifikation und Vorselektion vielversprechender Wirkstoffe, deren tatsächliche anticryptosporidiale Wirksamkeit in nachfolgenden *in vivo* Testverfahren validiert werden kann/muss (Armson et al., 1999; Woods et al., 1995). Eine *in vitro* nachgewiesene Wirksamkeit lässt nicht zwangsläufig auf eine Wirksamkeit *in vivo* schließen, viele der positiv *in vitro* getesteten Substanzen erwiesen sich in Tiermodellen oder klinischen Studien als unwirksam (Mead, 2002; Stockdale et al., 2008; Theodos et al., 1998). Dennoch kann durch ein Zellkultur-basiertes Testverfahren zumindest eine Vorselektion der Substanzen erfolgen, welche in nachfolgenden Tierversuchen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit positive Resultate zeigen könnten, wodurch die Anzahl der *in vivo* überprüften Wirkstoffe deutlich reduziert werden kann. Andersherum ist eine anticryptosporidiale *in vivo* Wirksamkeit ohne das Vorhandensein einer Wirksamkeit *in vitro* unwahrscheinlich (Theodos et al., 1998). Zudem ermöglicht eine Wirksamkeitsüberprüfung *in vitro* im Vergleich zu Tiermodellen die Überprüfung einer weit höheren Anzahl an Substanzen und durch weitere Zellkultur-basierte Testverfahren (z.B. LDH-Assay, WST-1-Assay) können bereits auf dieser Ebene der Wirkstoffüberprüfung eventuelle zytotoxische oder zytostatische Effekte auf die gewählte Zelllinie beobachtet werden.

Folglich eignen sich verhältnismäßig günstige und einfach zu handhabende *in vitro* Testverfahren als eine erste Stufe der Wirksamkeitsüberprüfung, ethisch bedenkliche, zeitaufwendige und kostenintensive Tierversuche zumindest partiell zu ersetzen bzw. diese in ihrer Anzahl und in ihrem Umfang drastisch zu reduzieren (Armson et al., 1999; Rochelle et al., 2002).

5.1 Optimierung der (q)PCR und der *in vitro* Kultivierung von *C. parvum*

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Kultivierung von *C. parvum* HCT-8 Zellen genutzt, denn obgleich sich auch Zelllinien nicht-enteralen und nicht-epithelialen Ursprungs zur Anzucht des Erregers eignen, wurde durch die Wahl dieser Zelllinie versucht, möglichst die

natürlichen und physiologischen Verhältnisse zu imitieren, sowie die primäre Prädilektionsstelle des Erregers widerzuspiegeln. Der Anspruch einer einfachen Zellkultivierung schloss die Verwendung primärer Darmzellen aus, welche zu diesem Zweck theoretisch am besten geeignet wären und zudem der Donor entsprechend dem Erregerisolat gewählt werden könnte (Najdrowski, 2006; Pickartz, 2002). Des Weiteren erwiesen sich in verschiedenen Studien HCT-8 Zellen in puncto Infektionsfähigkeit und Entwicklung von *C. parvum* gegenüber anderen Zelllinien als überlegen, weshalb die Wahl auf diese Zelllinie fiel (Meloni und Thompson, 1996; Upton et al., 1994a).

Eine Intensivierung der *in vitro* Erregerentwicklung kann einigen Autoren zufolge durch zusätzliche Supplementierungen des Kultivierungsmediums z.B. in Form von Aminosäuren, Vitaminen, Monosacchariden und Hormonen erzielt werden (siehe Kapitel 2.1.5.4). Ein allgemein gültiges, die Entwicklung von *C. parvum* förderndes Wachstumsmedium ist im Schrifttum nicht beschrieben, vielmehr werden die positiven Effekte der Mediumzusätze als zelllinienspezifisch deklariert (Yu et al., 2000). Auch zu den einzelnen zelllinienspezifischen Medienkomponenten finden sich in der Literatur verschiedene Angaben, sowohl was generell ihren fördernden Effekt anbelangt, als auch die einzusetzenden Konzentrationen der Supplemente. So konnten beispielsweise Yu et al. (2000) im Unterschied zu Upton et al. (1995) und Meloni und Thompson (1996) für Ascorbinsäure, Folsäure, para-Aminobenzoessäure und Kalziumpantothenat keine entwicklungsfördernden Effekte bei der Anzucht von *C. parvum* in HCT-8 Zellen nachweisen, bestätigten aber entgegen der Ergebnisse von Meloni und Thompson (1996) die von Upton et al. (1995) postulierte optimale FBS-Konzentration in Höhe von 10 %. Trotz divergierender Ergebnisse in Bezug auf die Komposition eines optimierten zelllinienspezifischen Kulturmediums wird zur Kultivierung von *C. parvum* in HCT-8 Zellen häufig ein nach Upton et al. (1995) supplementiertes Wachstumsmedium verwendet (eventuell mit geringgradigen Abänderungen), das dem Autor zufolge einen ca. zehnfachen Anstieg der totalen Anzahl an Entwicklungsstadien im Vergleich zum einem in der Studie verwendeten Referenz-Wachstumsmedium bewirken konnte (Cai et al., 2004; Cai et al., 2005; Hommer et al., 2003; Jakobi und Petry, 2006; Mauzy et al., 2012; Upton et al., 1995; Woods et al., 1995). Auch in dieser Arbeit wurde zur Erregerkultivierung eine leicht modifizierte Form des Wachstumsmediums nach Upton et al. (1995) verwendet (kein Insulinzusatz). Zur Zellinfektion wurden die Oocysten in frisch angesetztem, auf 37 °C vorerwärmten Wachstumsmedium auf den zu ca. 80 % konfluenten HCT-8 Monolayer verbracht und die Gewebekulturschale anschließend für 5 min bei 410×g zentrifugiert. Einmal freigesetzte Sporoziten sind im Gegensatz zu den Oocysten nur sehr kurzlebig und unterliegen sehr schnell verlaufenden physiologischen Veränderungen, zu denen auch die für die Zellinvasion zwingend notwendige Freisetzung des Inhalts der Organellen des Apikalkomplexes gehört

(Chen et al., 2004; Widmer et al., 2007). Zudem ist auch die Motilität der Sporozysten zeitlich begrenzt, so dass ihre Exzystierung inklusive der Freisetzung des Inhalts der Organellen des Apikalkomplexes für eine erfolgreiche Infektion möglichst in sehr engem räumlichen Kontakt zu einer empfänglichen Wirtszelle erfolgen sollte (King et al., 2009; Widmer et al., 2007). King et al. (2011) beschrieben in einer Studie, dass eine verbesserte Zellinfektionsrate durch eine zusätzliche Zentrifugation direkt nach dem Aufbringen der Oocystensuspension zu erreichen sei, da bei alleiniger Ausnutzung der Sedimentationsgeschwindigkeit nicht alle im Medium suspendierten Oocysten/Sporozysten innerhalb des zur Infektion zur Verfügung stehenden Zeitfensters den Monolayer erreichen würden. Obgleich der Zentrifugationsschritt in einem Vorversuch bei der finalen in den Wirkstoffüberprüfungen verwendeten Infektionsdosis von $4,94 \times 10^5$ Oocysten im Vergleich mit einer nicht zentrifugierten Gewebekulturschale zu einer Reduktion des Infektionserfolges um den Faktor 1,5 führte, wurde selbiger in den Aufbau des *C. parvum* Inhibitionsassays integriert. Die Ergebnisse der Studie von King et al. (2011) sind überzeugend und die Schlussfolgerung, dass eine Zentrifugation zu einer Beschleunigung des Kontakts zwischen Sporozysten/Oocysten und Zellrasen führt und somit in der Folge zu einer verbesserten Infektionsrate, logisch. Zudem sind die relativ großen Standardabweichungen der im Vorversuch mittels qPCR ermittelten Werte der relativen *C. parvum* Entwicklung überlappend, was verdeutlicht, dass der beobachtete Effekt nicht signifikant war und die Zentrifugation die Zellinfektion zumindest nicht negativ beeinflusst hat.

Fayer und Leek (1984) proklamierten, dass auch einzig eine Erwärmung des Oocysten-beinhaltenden Mediums auf 37° C zur Induktion einer Exzystierung ausreichend sei, weshalb auf eine vorgeschaltete Exzystierungsbehandlung (mit Natriumhypochlorit oder Gallensalzen) verzichtet wurde. Im Anschluss an eine zweistündige Inkubationsphase bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die infizierten Monolayer zur Entfernung nicht invadierter Oocysten und Sporozysten gründlich mit Nähmedium gewaschen, bevor die Wirkstoffapplikation erfolgte. Während der 54-stündigen Wirkstoffbehandlung wurde nach der Hälfte der Zeit ein Medium- und Wirkstoffwechsel vorgenommen, um über die gesamte Versuchsdauer einen konstanten pH-Wert, sowie eine gleichbleibende Nährstoffversorgung und Wirkstoffkonzentration zu gewährleisten.

Der optimale Analysezeitpunkt und somit der Zeitpunkt der DNA-Isolation wurde im Vorfeld anhand einer kinetischen Studie eruiert. DNA infizierter Monolayer wurde an den Zeitpunkten 26, 50 und 56 h p.i. isoliert und im Anschluss in einer konventionellen PCR mit Primerpaaren von Awad-el-Kariem et al. (1994) (Zielsequenz: 18S rDNA) und Lee et al. (2008) (Zielsequenzen: 18S rDNA, CP2, COWP) auf cryptosporidiale DNA untersucht (siehe Kapitel 3.2.2.1.1). Zu keinem der Isolationszeitpunkte konnten PCR-Produkte für die Zielsequenzen CP2 und COWP nachgewiesen werden. Es gelang ausschließlich die Amplifikation der

cryptosporidialen 18S rDNA, wobei sich hierfür die Primer von Awad-el-Kariem et al. (1994) als geeigneter erwiesen und zum Isolationszeitpunkt 56 h p.i. die sensitivste Detektion ermöglichten (siehe Kapitel 4.1.1), womit der Analysezeitpunkt für das *C. parvum* Inhibitionsassay festgelegt wurde.

Über eine relative Quantifizierung der Entwicklung von *C. parvum* unter Stoffeinfluss sollte eine Aussage zu einer potentiell anticryptosporidialen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen ermöglicht werden. Hierfür wurde in einer qPCR eine 255 bp umfassende Zielsequenz innerhalb des cryptosporidialen 18S rDNA Gens verwendet, deren Gehalt in jeder einzelnen Probe anhand einer internen Kontrolle normiert und, soweit durch Stoffeinfluss im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollinfektion reduziert, als Indikator für ein anticryptosporidiales Potential der Substanz angesehen wurde. Als interne Kontrolle fungierte der quantitative Nachweis humaner 18S rDNA in der jeweils untersuchten Probe mittels einer zweiten qPCR (siehe Kapitel 3.4.2). Zur Amplifizierung der cryptosporidialen 18S rDNA wurden die ursprünglich von Awad-el-Kariem et al. (1994) designten Primer entsprechend einem leicht modifizierten Protokoll nach Cai et al. (2005) genutzt. Die Modifizierung des Protokolls bestand in einer Erhöhung der Annealingtemperatur von 50 °C auf 60 °C, nachdem eine externe Sequenzierung die Amplifikation eines zellulären (humanen) PCR-Produktes mit den genannten Primern bei der Verwendung reiner HCT-8 Zell-DNA bestätigte. Anhand eines Temperaturgradienten mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde für die gewählten Primer eine Annealingtemperatur (60 °C) ermittelt, bei der nur spezifische PCR-Produkte cryptosporidialer Herkunft amplifiziert wurden. Die für die Spezifität der Primer notwendige Erhöhung der Annealingtemperatur könnte in der Verwendung eines anderen qPCR Master Mixes oder auch in der Nutzung eines anderen Cyclers begründet sein; denn auch Cai et al. (2005) bestätigten anhand einer Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese bei dem von ihnen verwendeten Protokoll mit einer Annealingtemperatur von 50 °C die Amplifikation ausschließlich spezifischer PCR-Produkte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Amplifikation des unspezifischen PCR-Produktes bei der Verwendung des Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2×) der Firma FERMENTAS registriert, dessen dazugehöriger Puffer laut dem Hersteller neben dNTPs, der Polymerase und SYBR® Green I dye auch KCl and (NH₄)₂SO₄ enthält. Cai et al. (2005) nutzen einen "2× SYBR® Green RT-PCR Reaction Mix" (Bestandteil des iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green, BIO-RAD), zu dessen Komponenten unter anderem die Polymerase, SYBR® Green I dye, dNTPs und MgCl₂ zählen (Herstellerangaben entnommen). Unterschiedliche Pufferzusammensetzungen können bei der Verwendung derselben Primer divergierende Annealingtemperaturen erfordern (Bustin, 2010). Zudem wurden in beiden Arbeiten unterschiedliche Cycler genutzt (Cai et al (2005): iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection

System, BIO-RAD; vorliegende Arbeit: CFX96™ Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD), ein Umstand, der ebenfalls die Abänderung eines PCR-Protokolls erforderlich machen kann (Bustin, 2010). Auch für die Cai et al. (2005) entlehnten Primer zur Amplifikation der humanen 18S rDNA wurde nach der Durchführung eines Temperaturgradienten die ursprünglich im Protokoll der Verfasser angegebene Annealingtemperatur von 50 °C auf 60 °C erhöht; eine erforderliche Abänderung, die ebenfalls oben beschriebenen Umständen geschuldet sein dürfte.

Im Gegensatz zu Cai et al. (2005) wurde in der vorliegenden Arbeit DNA anstelle von RNA als Template zur relativen Quantifizierung der *C. parvum* Entwicklung genutzt. Unter anderem begründeten Cai et al. (2005) ihre Wahl mit dem schnelleren Abbau von RNA (99 % in ~ 3 h) gegenüber dem von DNA (99 % in ~ 24 bis 48 h), wodurch sich den Autoren zufolge die Menge an vorhandener RNA besser dazu eigne, die Anzahl tatsächlich noch lebender Parasiten nach Wirkstoffbehandlung widerzuspiegeln. Die Verwendung von DNA zur Quantifizierung der Erregerentwicklung könnte ihnen zufolge zu einer Unterbewertung eines anticryptosporidialen Effekts einer untersuchten Substanz führen, da durch den vergleichsweise langsamen Abbau der DNA auch die DNA bereits abgestorbener Parasiten detektiert würde (Cai et al., 2005). Bei näherer Betrachtung der von Cai et al. (2005) veröffentlichten Ergebnisse stellte sich der zeitliche Verlauf des Abbaus der DNA wie folgt dar: nach 3 h waren 56,2 % abgebaut, weitere 3 h später bereits 87 %, nach 16 h 96,5 % und nach 48 h waren noch 0,9 % der Ausgangsmenge an DNA nachweisbar. Cai et al. (2005) schlussfolgerten, dass Wirkstoffe, die erst auf die späteren Entwicklungsstadien von *C. parvum* wirken, daher in ihrem anticryptosporidialen Effekt unterschätzt werden könnten, da ein signifikanter Anteil an DNA bereits abgetöteter Erreger (3,5 %) noch für 16 h nachweisbar wäre. In wieweit eine 18S rRNA basierte qPCR grundsätzlich dazu geeignet ist, zuverlässig anticryptosporidiale Effekte (auch auf spätere Entwicklungsstadien) des Erregers abzubilden, ist fraglich; denn anhand einer sich über 96 h p.i. erstreckenden Expressionsstudie von Jakobi und Petry (2006) zeigte sich, dass die Amplifikation der 18S rRNA nach einem Anstieg in dem Zeitraum 2 bis 8 h p.i. zwar für 18 h ein konstantes Level erreichte (bis 26 h p.i.), anschließend aber abfiel, was folglich bei einer Kultivierungsdauer von über 26 h p.i. zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen könnte (Jakobi und Petry, 2006). Zur Erfassung inhibitorischer stadienspezifischer Effekte erscheinen andere Zielsequenzen auf RNA Ebene wie beispielsweise das COWP vielversprechender; aufgrund seiner Lokalisation in den "wall forming bodies" der frühen und späten Makrogameten und der dadurch bedingten nicht vor 48 bis 50 h p.i. nachweisbaren Expression, eignete es sich zuverlässiger als Marker für spätere Entwicklungsstadien von *C. parvum* (Abrahamsen und Schroeder, 1999; Jakobi und Petry, 2006; Spano et al., 1997a). Des Weiteren ist unbekannt, in wieweit die Expression der humanen (zellulären) 18S rDNA Schwankungen unterliegt und

sich diese Zielsequenz somit auf RNA-Ebene als interne Kontrolle zur relativen Quantifizierung der cryptosporidialen 18S rRNA eignet. Hingegen sollte eine Quantifizierung auf DNA-Ebene aufgrund des einheitlich für jede Zelle festgelegten Genoms stets akkurat die Anzahl der vorhandenen Zellen reflektieren. Negative Beeinflussungen des Wirtszellmetabolismus durch die untersuchten Wirkstoffe bleiben daher auf DNA-Ebene unerheblich, wohingegen eine Toxizität deutlich durch einen reduzierten DNA-Gehalt angezeigt wird. Inwiefern sich möglicherweise vorhandene metabolische Effekte der untersuchten Wirkstoffe auf RNA-Ebene manifestieren, d.h. die absolute Menge an Wirtszell-rRNA beeinflussen würden, ist unbekannt und bedarf einer eingehenderen Untersuchung. Ohne das Vorliegen valider Daten bezüglich metabolischer Effekte der untersuchten Wirkstoffe scheint die Verwendung von DNA als Template die gesichertere Herangehensweise darzustellen.

Weiterhin birgt die Nutzung von DNA als Template die Vorteile eines einfacheren Handlings, geringeren Arbeitsaufwandes (Arbeitsschritte entfallen) und schlussendlich auch reduzierter Kosten; Fakten, die zusammengenommen mit den zuvor angeführten Überlegungen zu der Entscheidung gegen eine RT-qPCR basierte Evaluierung einer anticryptosporidialen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen in der vorliegenden Arbeit führten.

Im Verlauf der Etablierung des *C. parvum* Inhibitionsassays wurden basierend auf qPCR Ergebnissen vorangegangener Infektionsversuche verschiedene Modifikation vorgenommen, um in dem finalen "Setup" des Testverfahrens bei hoher Sensitivität gleichzeitig eine möglichst große Anzahl an Substanzen parallel in einem Versuchsdurchlauf überprüfen zu können. Nachdem eine erste Validierung anhand der bekannten *in vitro* Entwicklungsinhibitoren Paromomycin und Nitazoxanid in 6-Loch Gewebekulturschalen erfolgte, wurde auf die gleiche Art und Weise eine Validierung für 96-Loch Gewebekulturschalen vorgenommen. Dabei wurde die ursprünglich bei Shahiduzzaman et al. (2009b) verwendete Zell- und Oocystenkonzentration proportional dem Flächeninhalt der einzelnen Vertiefungen angepasst. Zur Wirkstoffüberprüfung erwies sich das 96-Loch Gewebekulturschalen-Format allerdings als wenig geeignet. Einige Wirkstoffe führten in ihren verwendeten Höchstkonzentration zu so geringen DNA-Gehalten in den isolierten Proben, dass anhand der qPCR keine aussagekräftigen Ergebnisse ermittelt werden konnten (siehe Kapitel 4.3.2). Das 48-Loch Gewebekulturschalen-Format erwies sich als passend und ermöglichte die parallele Überprüfung von zumindest sechs bis sieben Wirkstoffen je Gewebekulturschale (drei Konzentrationen je Wirkstoff in Form zweier biologischer Replikate, vier Negativkontrollen, Paromomycin als Positivkontrolle im Doppelansatz). Die höchste Infektionsrate wurde in diesem Format durch eine 25fache Erhöhung der ursprünglich zur Zellinfektion genutzten Oocystenmenge erzielt (siehe Kapitel 4.1.3); mittels dieser Infektionsdosis konnte zuverlässig eine Zellinfektion induziert und

anhand eines Vergleichs zwischen Negativkontrollen und behandelten infizierten Monolayern ein anticryptosporidialer Effekt der untersuchten Wirkstoffe abgebildet werden.

Eine verbesserte Zellinfektion hätte eventuell auch durch eine zusätzliche Exzystierungsbehandlung der Oocysten erreicht werden können. Wenngleich das Freisetzen der Sporozoiten aus den Oocysten auch alleinig durch eine Erwärmung auf 37 °C induziert werden kann, so ist die Exzystierungsrate ohne weitere die Exzystierung fördernde Zusätze (wie beispielsweise Taurocholat) doch vergleichsweise gering (Fayer und Leek, 1984; Widmer et al., 2007). Allerdings wird durch eine Exzystierungsbehandlung und die Ermittlung des Erfolgs dieses Verfahrens nur die Vitalität der Oocysten und nicht deren tatsächliche Infektiosität erfasst; so können beispielsweise durch eine Behandlung freigesetzte Sporozoiten zwar erfolgreich in eine Wirtszelle eindringen, deren dortige Replikation aber fehlschlagen (Arrowood, 2008). Dennoch würde durch eine gesteigerte Exzystierungsrate und folglich die vermehrte Freisetzung von Sporozoiten die Wahrscheinlichkeit einer Zellinfektion erhöht.

Bei dem Versuch einer absoluten Quantifizierung der cryptosporidialen 18S rDNA mittels einer sondenbasierten qPCR (siehe Kapitel 3.4.3) erwies sich die beschriebene Vorgehensweise als ungeeignet. Zum einen wurden anhand dieser qPCR in den Proben, zu denen vor der DNA-Isolation einheitlich dieselbe Menge an externem Standard hinzugefügt wurde, sehr unterschiedliche Kopienzahlen der mutagenisierten Zielsequenz nachgewiesen und zum anderen wich das Signal der untersuchten Proben von dem Kurvenverlauf der dazugehörigen Standardkurve ab. Auch die Effizienz der Amplifikation lag mit ca. 135 % außerhalb des tolerablen und gewünschten Bereichs von 90 bis 110 % (Taylor et al., 2010). Eine mögliche Optimierungsoption stellt die Austestung anderer Polymerasen dar. So zeigten Kreuzer et al. (2000) dass bei einer sondenbasierten qPCR die Wahl der genutzten DNA Polymerase entscheidend für die Leistungsfähigkeit des gesamten Assays ist. Das Prinzip einer sondenbasierten qPCR ist unabdingbar mit der 5'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase verknüpft, da die Fragmentierung/Spaltung der Sonde die Basis für die Funktionalität dieses Verfahrens darstellt. Anhand eines Vergleichs 15 verschiedener Polymerasen konnten Kreuzer et al. (2000) nicht nur eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen nachweisen, welche in der Konsequenz zu sich signifikant unterscheidenden Effizienzen führten, vielmehr erwiesen sich einige der untersuchten Polymerasen trotz erklärter 5'-Exonuklease Aktivität als vollkommen ungeeignet für eine sondenbasierte Methodik. Weiterhin konnte nur für eine einzige Polymerase ein sigmoidaler Kurvenverlauf beobachtet werden, der bei einer exponentiellen Reaktionskinetik wie der Amplifikation zu erwarten wäre (Kreuzer et al., 2000).

Weiterhin wäre es empfehlenswert zu überprüfen, inwieweit der Zeitpunkt der Zugabe des externen Standards zu den zu untersuchenden Proben die Ergebnisse beeinflusst. Der von

der dazugehörigen Standardkurve abweichende Kurvenverlauf des Signals des externen Standards könnte ein Hinweis auf eine Beschädigung des Plasmids durch die DNA-Isolation sein. Bisher wurden die als externe Standards fungierenden Plasmide bereits mit dem Lysis-Puffer und der Proteinase K zu den gewaschenen Monolayern hinzugegeben und folglich ebenfalls über Nacht bei 56 °C und 250 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Es wäre interessant zu überprüfen, ob eine Aussparung dieser Inkubationsphase die Detektion des externen Standards verbessern würde.

Leider konnten aufgrund von Zeitmangel beide Verbesserungsansätze nicht verfolgt werden.

5.2 Überprüfung von Substanzen auf anticryptosporidiale Wirksamkeit

5.2.1 Negativkontrollen

In jedem Infektionsversuch wurden Negativkontrollen in Form von unbehandelten mit *C. parvum* infizierten HCT-8 Monolayern mitgeführt, welche im Anschluss an die zweistündige Inkubationsphase ausschließlich mit Wachstumsmedium mit einem 0,5%igen DMSO-Gehalt überschichtet wurden. Ihnen wurde bei der qPCR-Auswertung die Funktion der Kontrolle und somit der Wert eins zugeordnet, so dass die inhibitorische Wirkung der untersuchten Substanzen als Differenz zwischen dem Wert der relativen *C. parvum* Entwicklung der Negativkontrollen und dem Wert der *C. parvum* Entwicklung unter Stoffeinfluss ausgedrückt werden konnte.

Die verwendete DMSO-Konzentration wurde anhand eines Vorversuchs ermittelt, in dessen Verlauf sich zeigte, dass durch einen DMSO-Zusatz von 1 % im Vergleich zu keinem DMSO-Zusatz der Infektionserfolg von *C. parvum* um ca. 58 % reduziert wurde. In der qPCR betrug die relative *C. parvum* Entwicklung im Vergleich zu der als Kontrolle gewählten Probe ohne DMSO-Zusatz lediglich 0,42 (SD ± 0,09). Da aber für alle überprüften Wirkstoffe 100 % DMSO als Solvenz fungieren sollte (Ausnahme Wirkstoffe 4 und 30) und somit aus Gründen der Vergleichbarkeit eine Negativkontrolle ohne DMSO-Zusatz nicht gewählt werden konnte, wurde in den Infektionsversuchen sowohl für die Negativkontrollen als auch für die Wirkstoffüberprüfungen ein DMSO-Zusatz von 0,5 % verwendet. Dieser führte im Vergleich zur Probe ohne DMSO-Zusatz nur zu einer Reduktion der relativen *C. parvum* Entwicklung um ca. 16 % auf 0,84 (SD ± 0,44).

Ob diese Beobachtung auf einen direkten Effekt von DMSO auf *C. parvum* zurückzuführen ist oder das Resultat einer konzentrationsabhängigen Zytotoxizität und/oder einer Beeinflussung zellulärer Funktionen der HCT-8 Zellen darstellt, bleibt offen. Forman et al. (1999) zeigten, dass bereits eine 1%ige DMSO-Konzentration im Wachstumsmedium zu einer Zytotoxizitäts-assoziierten Veränderung der Morphologie von HeLa Zellen führte (veränderte Zellform/Gestalt, eine den Nukleus umgebende Körnigkeit, Schädigung der Zellmembranen), nachdem selbige für zwei bis drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert

wurden. Des Weiteren konnte bei Konzentrationen von $\geq 1\%$ DMSO bereits nach 24-stündiger Inkubation ein negativer Effekt auf die Zellproliferation nachgewiesen werden, der im Vergleich mit der Negativkontrolle (HeLa Zellen in Wachstumsmedium ohne DMSO-Zusatz unter den gleichen Bedingungen inkubiert) durch eine herabgesetzte Konfluenz des gebildeten Zellrasens und durch das Fehlen mitotischer Figuren angezeigt wurde. Anhand eines Chemilumineszenzverfahrens zur Quantifizierung der intrazellulären ATP-Konzentration konnte sogar für bis auf 0,1 % reduzierte DMSO-Zusätze ein negativer Effekt auf die Zellphysiologie nachgewiesen werden, der bei der rein mikroskopischen Betrachtung noch nicht ersichtlich war (Forman et al., 1999). Auch Timm et al. (2013) konnten für bereits sehr niedrige DMSO-Konzentrationen im Wachstumsmedium von 0,25 %, 0,5 % und 1 % Effekte auf die Zellfunktionalität immunologischer Zellkultursysteme nachweisen. Die Evaluierung eines möglichen Effektes durch einen DMSO-Zusatz im Wachstumsmedium erfolgte durch eine Quantifizierung der Interleukin-6- und reaktiven Sauerstoffspeziesproduktion im Anschluss an eine Lipopolysaccharid Stimulation. Für sämtliche untersuchten Zelltypen (humane monozytische Zellen: Zelllinie Mono Mac 6, zu Neutrophilen-ähnlichen differenzierte Promyelozytenleukämie-Zellen: Zelllinie HL-60, murine monozytische Zellen: Zelllinie RAW 264.7, humane periphere Leukozyten, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurde einheitlich eine suppressive Wirkung durch DMSO-Konzentrationen $> 1\%$ konstatiert, wohingegen bei den niedrigeren Konzentrationen für einige Zelltypen inhibitorische und für andere Zelltypen stimulatorische Effekte beobachtet werden konnten (Timm et al., 2013). Die Beobachtungen von Forman et al. (1999) und von Timm et al. (2013) lassen die These eines herabgesetzten Infektionserfolgs in den Negativkontrollen mit einem 1%igen DMSO-Zusatz als das Resultat einer veränderten Zellfunktion der HCT-8 Zellen wahrscheinlicher erscheinen, dennoch kann eine direkte Wirkung von DMSO auf *C. parvum* nicht ausgeschlossen werden.

5.2.2 Positivkontrollen

Zur Validierung des Infektionsmodells wurde bei jeder Wirkstoffüberprüfung der als Goldstandard bezeichnete *in vitro* Entwicklungsinhibitor Paromomycin in Konzentrationen von ca. 3 mM mitgeführt, um als Positivkontrolle eine ca. 90%ige Hemmung des Cryptosporidienwachstums zu erzielen. Die eingesetzte Konzentration wurde in Anlehnung an Publikationen von Cai et al. (2005) und Theodos et al. (1998) gewählt. In dem optimierten *C. parvum* Inhibitionsassay zur Überprüfung einer anticryptosporidialen Wirksamkeit der einzelnen Substanzen erzielte die gewählte Paromomycin-Konzentration eine Inhibition des cryptosporidialen Wachstums von durchschnittlich 87,46 % (SD $\pm 5,2\%$), womit sich Paromomycin in der verwendeten Konzentration als eine geeignete Positivkontrolle für das etablierte *C. parvum* Inhibitionsassay bewies.

Der einzige zur Behandlung einer humanen Cryptosporidiose zugelassene Wirkstoff Nitazoxanid wurde ebenfalls auf seine Eignung als Positivkontrolle untersucht. Die eingesetzte Konzentration in Höhe von 30 μM wurde wie bei Paromomycin Publikationen von Cai et al. (2005) und Theodos et al. (1998) entlehnt. Cai et al. (2005) beobachteten eine nahezu vollständige Inhibition des cryptosporidialen Wachstums, nachdem infizierte HCT-8 Zellen mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht ca. 40 μM) Nitazoxanid inkubiert wurden. Theodos et al. (1998) erzielten durch eine Wirkstoffkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht 32 μM) eine Entwicklungshemmung von ca. 93 % in mit *C. parvum* infizierten MDBK Zellen. Der in der vorliegenden Arbeit in Vorversuchen eruierte inhibitorische Effekt von Nitazoxanid belief sich bei der gewählten Konzentration von 30 μM auf 91,58 % und entsprach somit der gewünschten Größenordnung. Allerdings konnte unter dem Einfluss dieser Wirkstoffkonzentration ein deutlich verlangsamtes Zellwachstum beobachtet werden, was sich mikroskopisch in einer veränderten Zellmorphologie (Zellen größer) und einer geringeren Konfluenz des Zellrasens (maschenartige Zellanordnung, Zellrasen wirkt wie von Lakunen durchsetzt) bemerkbar machte. Bei der Wirkstoffüberprüfung in 96-Loch Gewebekulturschalen spiegelte sich dieser Effekt in deutlich geringeren DNA-Gehalten der untersuchten Proben wider, so dass eine aussagekräftige Auswertung anhand einer qPCR nicht mehr möglich war. Infolge dessen wurde im endgültigen "Setup" des *C. parvum* Inhibitionsassays einzig Paromomycin als Positivkontrolle mitgeführt. Auch Theodos et al. (1998) beschrieben eine Nitazoxanid-assoziierte zytotoxische Wirkung auf die von ihnen verwendeten MDBK Zellen, welche sie mit Hilfe eines kolorimetrischen Testverfahrens quantifizierten, das auf der Reduktion eines Tetrazoliumsalzes zu einem Formazan-Produkt mittels zellulärer Dehydrogenasen basierte. Allerdings stufen die Autoren die Zytotoxizität von Nitazoxanid mit Ausnahme der ausgetesteten Höchstkonzentration von 325 μM (74,1 % Toxizität) als mild (bis 25 % Toxizität) ein. Für die niedrigste Wirkstoffkonzentration in Höhe von 0,325 μM wurde eine Toxizität von 18 % ermittelt, wohingegen die Toxizität bei einer Konzentration von 3,25 μM nur 11,3 % betrug und für eine 32,5 μM Nitazoxanid-Konzentration gar keine Toxizität nachgewiesen werden konnte (Theodos et al., 1998). Auch wenn aus den Ergebnissen von Theodos et al. (1998) keine konzentrationsabhängige Zytotoxizität für Nitazoxanid abgeleitet werden kann, so bestätigen die Beobachtungen dennoch die bereits bei geringen Konzentrationen auftretende zytotoxische Wirkung dieser Substanz.

5.2.3 Wirkstoffe

Zur Überprüfung einer anticryptosporidialen Wirksamkeit wurden in einem ersten Schritt sämtliche in Form von Feststoffen gelieferten Substanzen in 100 % DMSO gelöst (ausgenommen Wirkstoffe 4 und 30). Mit Hilfe dieses organischen Lösungsmittels ist es möglich, eine große Bandbreite an Substanzen verschiedenster chemischer Eigenschaften

in Lösung zu bringen. Es ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar und weist zudem nur eine relativ geringe Toxizität (sowohl für Zellkultursysteme als auch für den Anwender) auf; Eigenschaften, die es zu dem Solvenz der Wahl für "high-throughput screenings" werden ließen (Waybright et al., 2009). Von den zu überprüfenden Wirkstoffen wurden hochkonzentrierte Lösungen dergestalt angelegt, dass beim *C. parvum* Inhibitionsassay bei gewünschter Wirkstoffkonzentration eine nur 0,5%ige DMSO-Konzentration in jeder Vertiefung der jeweiligen Gewebekulturschale vorlag. Innerhalb eines Zellkultur-basierten Testverfahrens ist die Aufrechterhaltung einer konstanten Solvenz-Konzentration aus Gründen der Vergleichbarkeit zwingend erforderlich, da unter Umständen das Solvenz selbst konzentrationsabhängige Effekte auf die gewählte Zelllinie haben kann, wie für DMSO in Kapitel 4.3.1.2.1 beschrieben (Timm et al., 2013). Für die Wirkstoffe 4 und 30 (Halofuginonhydrobromid und Paromomycinsulfat) wurde aufgrund ihres bekannten Löslichkeitsverhaltens Wachstumsmedium mit einem 0,5%igen DMSO-Gehalt als Solvenz verwendet. Alle Substanzen wurden in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen (finale überprüfte Wirkstoffkonzentrationen 1, 10 und 100 ppm) ausgetestet.

Bei einigen Wirkstoffen traten Präzipitatbildungen in den Gewebekulturschalen auf, nachdem die in DMSO gelösten Substanzen zu dem vorgelegten Wachstumsmedium hinzupipettiert wurden, wobei die gebildete Menge des Niederschlags mit sinkender Wirkstoffkonzentration abnahm (siehe Kapitel 4.3). Die durch die Präzipitatbildung bedingte heterogene Verteilung des Wirkstoffes schließt eine einheitlich auf die Zellinfektion wirkende Wirkstoffkonzentration aus. Zudem ist die Aufrechterhaltung einer konstanten Wirkstoffkonzentration über den gesamten Verlauf des *C. parvum* Inhibitionsassays erschwert, da bei dem nach 27-stündiger Inkubation erfolgten Medium- und Wirkstoffwechsel sicherlich nicht sämtliche Wirkstoffpräzipitate entfernt werden konnten und es so unter Umständen zu einer Akkumulation des Wirkstoffs in den Vertiefungen der Zellkulturschale kam. Des Weiteren kann eine direkte mechanische Beschädigung der HCT-8 Zellen durch die Präzipitate nicht ausgeschlossen werden. Eine zuverlässige und vor allem konzentrationsbezogene Interpretation der qPCR Ergebnisse kann für solche Wirkstoffe folglich nicht erfolgen.

Bei der obligatorischen makro- und mikroskopischen Untersuchung der Monolayer im Rahmen der Wirkstoffüberprüfung konnten neben Präzipitatbildungen ebenfalls morphologische Veränderungen des Zellrasens beobachtet werden. Die ausgetesteten Höchstkonzentrationen einiger Wirkstoffe führten von einem verlangsamten Zellwachstum über vereinzelt abgestorbene, von der Unterfläche abgelöste Zellen bis hin zu flächenartigen Ablösungen von großen Teilen des Zellrasens. Diese Veränderungen wurden als Indikatoren für potentielle inhibitorische oder zytotoxische Wirkungen der Substanzen angesehen, vermerkt und in den Fällen der Wirkstoffe BAY-AF76184 und BAY-AB24992 anhand weiterer

Zellkultur-basierter Testverfahren einer eingehenderen Untersuchung unterzogen (siehe Kapitel 4.3.4 und Kapitel 5.3).

5.3 BAY-AF76184 und BAY-AB24992

Zwei der auf anticryptosporidiale Wirksamkeit zu überprüfenden Substanzen wurden in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht. Bei den Substanzen handelt es sich um ein heterozyklisch substituiertes 1,2,4-Triazin (BAY-AB24992) und um ein substituiertes Benzimidazol (BAY-AF76184).

Ein bekannter Vertreter der Triazine ist beispielsweise Toltrazuril, welches in der Veterinärmedizin zur Behandlung verschiedener durch Kokzidien verursachter Erkrankungen u.a. erfolgreich bei Kälbern, Ferkeln, Geflügel und Lämmern eingesetzt wird (Le Sueur et al., 2009; Mengel et al., 2012; Mundt et al., 2003; Ramadan et al., 1997). Eine anticryptosporidiale Wirksamkeit von Toltrazuril wurde bisher zwar noch nicht beschrieben, aber eine Behandlung von chronisch an Cryptosporidiose erkrankten HIV/AIDS-Patienten mittels Letrazuril, ebenfalls einem Triazin, führte nachweislich in vielen Fällen zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik des Cryptosporidien-assoziierten Durchfallgeschehens und in einigen Fällen sogar zur Eliminierung des Erregers (Harris et al., 1994; Loeb et al., 1995; Murdoch et al., 1993; Victor et al., 1993).

Auch für einige Benzimidazol Derivate konnte bereits *in vitro* eine Wirksamkeit gegen *C. parvum* gezeigt werden (Graczyk et al., 2011).

Doch nicht nur die Wirkstoffklasse dieser Substanzen gab die Veranlassung zu einer umfassenderen Untersuchung dieser Wirkstoffe, weiterhin konnte bereits in vorangegangenen Studien eine Wirksamkeit dieser und/oder ähnlicher Verbindungen zur Bekämpfung einiger Kokzidienarten gezeigt werden (Greif und Mundt, 2011a, b).

Parallel zu BAY-AB24992 und BAY-AF76184 wurden Paromomycin, als bekannter *in vitro* Entwicklungsinhibitor, und Halofuginon, als einziger zugelassener Wirkstoff zur pro- und metaphylaktischen Behandlung einer bovinen Cryptosporidiose, in jeweils acht verschiedenen Konzentrationen untersucht (siehe Kapitel 4.3.4).

Die anticryptosporidiale Wirksamkeit von Paromomycin wurde bereits in zahlreichen *in vitro* Studien anhand verschiedener Zelllinien untersucht und bestätigt (Egraz-Bernard et al., 1996; Favennec et al., 1994; Gargala et al., 1999; Hommer et al., 2003; Marshall und Flanigan, 1992; Perkins et al., 1998; Phelps et al., 2001; Theodos et al., 1998; Woods et al., 1995; You et al., 1996a, b; You et al., 1998). Im Vergleich der Studien untereinander wird deutlich, dass durch den Einsatz einer definierten Wirkstoffkonzentration keine einheitliche Wachstumsinhibition von *C. parvum* in derselben prozentualen Größenordnung zu erzielen ist, die auf alle untersuchten Zelllinien und *C. parvum* Stämme gleichermaßen zutrifft bzw. durch die verschiedenen, angewendeten Nachweisverfahren eruiert werden kann. Dieser Umstand spiegelt sich auch, soweit in den Publikationen angegeben, in den berechneten

EC₅₀-Werten wider. Hierbei ist zu beachten, dass sich die in den einzelnen Publikationen ermittelten EC₅₀-Werte [M] nicht unmittelbar miteinander vergleichen lassen, wenn sich keine differenzierte Angabe zum verwendeten Wirkstoff in den Publikationen findet. Dies ist insofern relevant, da verschiedene Handelsformen von Paromomycin erhältlich sind bzw. waren, die sich in ihrem Molekulargewicht deutlich unterscheiden (z.B. Paromomycinsulfat 713,71 g/mol, „reines“ Paromomycin 615,63 g/mol).

So ermittelten Egraz-Bernard et al. (1996) in einem Caco-2 basierten *C. parvum* Inhibitionsassay mittels eines Immunofluoreszenz-Verfahrens einen EC₅₀-Wert von 1047 µM entsprechend einer Wirkstoffkonzentration von 887,6 µg/ml (das daraus errechnete Molekulargewicht für Paromomycin beträgt hier folglich 847,76 g/mol; leider beinhaltet die Publikation keine differenzierte Angabe zur verwendeten Paromomycinverbindung), wohingegen Perkins et al. (1998) anhand derselben Zelllinie und ebenfalls eines "immunofluorescence assay" (IFA) einen deutlich niedrigeren EC₅₀-Wert in Höhe von 85 µM berechneten. Perkins et al. (1998) beschreiben ihre Ergebnisse als mit denen von Woods et al. (1995) vergleichbar, die mit einem KSU-1-Stamm infizierte HCT-8 Zellen zur Wirkstoffüberprüfung nutzen und mittels eines ELISA die Entwicklung des Erregers quantifizierten. Der von ihnen ermittelte EC₅₀-Wert ist mit einer Paromomycin-Konzentration von 48,2 µg/ml angegeben, was bei einem über die Artikelnummer zugeordnetem Molekulargewicht von 713,71 g/mol 67,5 µM entspricht (Woods et al., 1995). Auch der in der vorliegenden Arbeit berechnete EC₅₀-Wert rangiert mit 69,5 µM in der gleichen Größenordnung und die Verwendung von DNA als Template führte entgegen der Vermutungen von Cai et al. (2005) nicht zu einer Unterschätzung der anticryptosporidialen Wirksamkeit dieser Substanz; vielmehr lagen die von Cai et al. (2005) mittels einer RT-qPCR ermittelten EC₅₀-Werte bei Verwendung der gleichen Zelllinie, der gleichen Primer und einem sehr ähnlichen Aufbau des Testverfahrens mit 89,7 µg/ml für einen IOWA-Stamm und mit 119 µg/ml für einen KSU-1-Stamm deutlich höher (diese Wirkstoffkonzentrationen entsprechen bei einem gesetzten Molekulargewicht von 713,71 g/mol 126 µM respektive 166 µM). Aber auch You et al. (1996a, 1996b) bestimmten für Paromomycin, verglichen mit den bereits angeführten Studien, höhere EC₅₀-Werte. Nach der Anzucht eines IOWA-Stammes in MDCK-Zellen wurde die anticryptosporidiale Wirksamkeit von u.a. Paromomycin anhand eines CLIA und eines IFA ermittelt. Interessanterweise wurde mittels des erstgenannten Testverfahrens ein EC₅₀-Wert von 133,6 µM eruiert, wohingegen sich der über das zweitgenannte Testverfahren ermittelte EC₅₀-Wert auf 92,3 µM belief (You et al., 1996a, b). Diese Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss der zur Quantifizierung des Erregers gewählten Nachweismethode auf die Berechnungen zur Konzentrations-Wirkungsbeziehung einer Substanz. Dieser Sachverhalt wird durch die Tatsache bestärkt, dass die Kultivierung des Erregers in der Studie incl. Wirkstoffapplikation und Einwirkdauer unter den exakt

gleichen Bedingungen und unter Verwendung desselben Wirkstoffs durchgeführt wurde (You et al., 1996a).

Auch die Verwendung des zur Infektion genutzten *C. parvum* Isolats hat großen Einfluss auf die Ergebnisse eines *C. parvum* Inhibitionsassays, was durch die oben angeführte Studie von Cai et al. (2005) belegt wird. Anhand des gleichen Zellkultur-basierten Testverfahrens wurden für zwei verschiedene *C. parvum* Stämme unterschiedliche EC₅₀-Werte für Paromomycin eruiert (Cai et al., 2005).

Obleich in all den angeführten Studien für Paromomycin einhellig ein entwicklungshemmender Effekt auf den *in vitro* kultivierten Erreger nachgewiesen werden konnte, existieren in einem Zellkultur-basierten Testverfahren zur Evaluierung einer potentiellen anticryptosporidialen Wirksamkeit von Substanzen offensichtlich sehr viele Variablen, die einen direkten Vergleich von Ergebnissen verschieden konzipierter Studien erschweren. Aus denselben Gründen wie die EC₅₀-Werte unterscheiden sich auch die Paromomycin-Konzentrationen, durch deren Einsatz den Autoren zufolge eine ca. 90%ige Inhibition der *C. parvum* Entwicklung erzielt werden kann. So gaben beispielsweise Theodos et al. (1998) eine Wirkstoffkonzentration von 3,2 mM (2000 µg/ml) an, mit der sie die Erregerentwicklung eines *C. parvum* Isolats (GCH1) in MDBK Zellen um 81,9 % reduzierten. Hingegen erzielten Phelps et al. (2001) durch den Einsatz von 500 µg/ml Paromomycin, was bei einem gesetzten Molekulargewicht von 713,71 g/mol einer Konzentration von 0,7 mM entspricht, eine ca. 97,8%ige Entwicklungshemmung eines *C. parvum* Isolats (Beltsville) in HCT-8 Zellen. Im Vergleich zu Theodos et al. (1998) erzielten Phelps et al. (2001) also mit einem Viertel der Wirkstoffkonzentration eine über 10 % höhere Inhibition. Für Substanzen, die eine anticryptosporidiale Wirkung und zudem eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität aufweisen, sind solche Konzentrationsunterschiede im Hinblick auf die therapeutische Breite von immenser Bedeutung. Viele der zuvor genannten Autoren haben parallel zur Wirkstoffüberprüfung anhand verschiedener Testverfahren die Zytotoxizität von Paromomycin überprüft und konnten ebenso wie in der vorliegenden Arbeit keinen (signifikanten) zytotoxischen oder antiproliferativen Effekt, auch nicht bei den eingesetzten Höchstkonzentrationen, auf die verwendeten Zelllinien attestieren (Egraz-Bernard et al., 1996; Gargala et al., 1999; Marshall und Flanigan, 1992; Perkins et al., 1998; You et al., 1996a). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Überprüfung eines möglichen entwicklungshemmenden Effektes der Wirkstoffe auf die Zellproliferation ein Testverfahren verwendet, das auf dem Nachweis eines wasserlöslichen WST-1-Spaltproduktes in Form eines Formazans basiert (siehe Kapitel 3.9.2). Eine potentielle Zytotoxizität wurde anhand eines LDH-Assays überprüft (siehe Kapitel 3.9.1). Im Aufbau sollten beide Testverfahren möglichst dem des *C. parvum* Inhibitionsassays entsprechen; da aber die LDH-Aktivität im extrazellulären Medium mit einer Halbwertszeit von 9 h abnimmt, musste die Einwirkdauer

der Substanzen im LDH-Assay von 54 auf 8 h reduziert werden, womit in der Folge nur eine akute Zytotoxizität der Wirkstoffe erfasst werden konnte.

Die Evaluierung einer konzentrationsabhängigen Zytotoxizität vielversprechender Substanzen ist aber nicht nur im Hinblick auf deren therapeutische Breite relevant, sondern zudem notwendig, um eine potentielle tatsächliche anticryptosporidiale Wirkung von einer rein Zytotoxizitäts-assoziierten Wirkung abzugrenzen. Eine hohe Zytotoxizität könnte in der Folge eine nur geringe Detektion der cryptosporidialen DNA bedingen, so dass anhand der qPCR Ergebnisse unter Umständen ein anticryptosporidialer Effekt des Wirkstoffs angenommen wird, der aber de facto nur auf dem Zerstören bzw. Fehlen adäquater Wirtszellen zur Erregerentwicklung basiert.

Auch die anticryptosporidiale Wirksamkeit von Halofuginon wurde bereits anhand verschieden konzipierter *in vitro* Studien von einigen Arbeitsgruppen untersucht (Castro-Hermida et al., 2004; Linder et al., 2007; McDonald et al., 1990; Najdrowski et al., 2007; Shahiduzzaman et al., 2009b). So behandelten McDonald et al. (1990) mit *C. parvum* Oocysten eines bovinen Isolats infizierte L929 Zellen mit Halofuginon und quantifizierten die Erregerentwicklung 24 h p.i. mikroskopisch. Insgesamt wurden fünf Wirkstoffkonzentrationen ausgetestet (4 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,032 µg/ml, 0,064 µg/ml), denen je nach gesetztem Molekulargewicht für Halofuginonhydrobromid (495,59 g/mol) oder Halofuginonlactat (504,76 g/mol) Wirkstoffkonzentrationen in Höhe von 8 µM, 1,61 µM, 0,32 µM, 0,06 µM und 0,01 µM respektive 7,92 µM, 1,58 µM, 0,32 µM, 0,06 µM und 0,01 µM entsprechen. Den Autoren zufolge konnte mittels der Höchstkonzentration eine über 90%ige Inhibition der Entwicklung von *C. parvum* erzielt werden (McDonald et al., 1990); die Berechnung einer Konzentrations-Wirkungskurve wurde nicht vorgenommen, aber entsprechend der tabellarischen Auflistung wurden mittels der nachfolgenden Konzentrationen entwicklungs-inhibitorische Effekte in Höhe von ca. 89 %, 86 %, 65 % und 44 % im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle erzielt. Shahiduzzaman et al. (2009b) bewirkten mit einer Wirkstoffkonzentration von 1 µM Halofuginonhydrobromid eine nahezu 98%ige Inhibition der *C. parvum* Entwicklung in HCT-8 Zellen; ein fast deckungsgleiches Ergebnis mit dem der vorliegenden Arbeit, in der diese eingesetzte Konzentration eine ca. 97%ige Inhibition erzielte. Weiterhin war es Shahiduzzaman et al. (2009b) möglich, anhand der von ihnen verwendeten Konzentrationen (25 µM, 5 µM, 1 µM, 0,2 µM und 0,04 µM) eine Konzentrations-Wirkungskurve mit einem EC₅₀-Wert von 0,15 µM und einem Pearson Korrelationskoeffizienten von R²=0,61 zu generieren, wohingegen eine Konzentrationsabhängigkeit in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden konnte. Ursächlich hierfür könnten zu einem die deutlich niedrigeren ausgetesteten Wirkstoffkonzentrationen (Maximum 1 µM, gefolgt von sieben weiteren durch 1:2 Verdünnungen hergestellten Konzentrationen) sein, deren zugehörige qPCR Ergebnisse sich

ab einer Konzentration von $< 0,25 \mu\text{M}$ extrem variabel und somit nicht reproduzierbar konzentrationsabhängig zeigten. Alle der von Shahiduzzaman et al. (2009b) überprüften Konzentrationen erzielten hingegen Inhibitionen des cryptosporidialen Wachstums im Größenbereich von 74 bis 99 %, wobei anzumerken bleibt, dass die verwendeten Konzentrationen nicht nur zum Teil deutlich höher lagen, sondern dass auch die Anzahl der insgesamt ausgetesteten Konzentrationen geringer war und selbige zudem über 1:4 Verdünnungen hergestellt wurden. Zum anderen sind sowohl das Nachweisverfahren als auch der gesamte Infektionsversuchsaufbau mit Ausnahme der verwendeten Zelllinie in beiden Studien verschieden. Im Einklang mit den eigenen mikroskopischen Beobachtungen und denen im WST-1-Assay berechneten Ergebnissen zu einer inhibitorischen Wirksamkeit auf die HCT-8 Zellentwicklung befinden sich auch die mikroskopischen Befunde von Shahiduzzaman et al. (2009b), die eine veränderte Zellmorphologie bei der Verwendung von Wirkstoffkonzentrationen ab $0,2 \mu\text{M}$ bei einer Einwirkdauer von 45 h beschrieben. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit für Halofuginonhydrobromid anhand des LDH-Assays keine akute Toxizität nachgewiesen werden, aber im WST-Assay zeigte sich deutlich der antiproliferative Effekt dieser Substanz ab einer Wirkstoffkonzentration von $0,25 \mu\text{M}$ (siehe Kapitel 4.3.4.2). Im Gegensatz hierzu wurden weder von McDonald et al. (1990) noch von Najdrowski et al. (2007) durch die Wirkstoffapplikation hervorgerufene Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet, obgleich das Konzentrationsspektrum in beiden Untersuchungen deutlich über der Konzentration lag, ab der inhibitorische Effekte auf das HCT-8 Zellwachstum ersichtlich wurden. Allerdings verwendeten McDonald et al. (1990) auch eine murine Fibroblasten Zelllinie, die eventuell etwas weniger sensitiv reagiert und zudem erstreckte sich der Infektionsversuch und somit auch die Einwirkdauer des Wirkstoffes auf nur 24 h p.i.. Die Einwirkdauer von Halofuginonhydrobromid betrug in der Studie von Najdrowski et al. (2007) ebenfalls nur 24 h und mit der Ausbildung eines konfluenten Monolayers, selbst bei Verwendung der Höchstkonzentration von $50 \mu\text{M}$, argumentierten die Autoren für eine nicht vorhandene Zytotoxizität des Wirkstoffes. Hingegen war laut Shahiduzzaman et al. (2009b) bereits nach 15-stündiger Wirkstoffinkubation eine Beeinflussung der Zellrasenmorphologie durch Wirkstoffkonzentration in Höhe von 5 und $25 \mu\text{M}$ zu beobachten, was selbige Autoren als Indikator für eine Zelltoxizität der Substanz interpretierten. Najdrowski et al. (2007) nutzten ebenfalls HCT-8 Zellen zur Kultivierung des Erregers und quantifizierten nach oben angegebener Einwirkdauer die Entwicklung von *C. parvum* anhand einer Kombination von Immunfluoreszenz-Antikörper-Test und digitaler Bildanalyse, um den inhibitorischen Effekt verschiedener Halofuginonhydrobromid-Konzentrationen abzubilden. Hierzu wurden 3 überlappende Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:2 ausgetestet; die erste beginnend mit $50 \mu\text{M}$ (gefolgt von sieben weiteren Konzentrationen), die zweite mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration von $4 \mu\text{M}$

(insgesamt acht Konzentrationen) und die dritte erstreckte sich mit zehn ausgetesteten Konzentrationen über einen Bereich von 0,2 bis 0,000391 μM (Najdrowski et al., 2007). Mit einer Konzentration von $\geq 12,5 \mu\text{M}$ erzielten die Autoren eine über 90%ige Inhibition der Erregerentwicklung gegenüber der Negativkontrolle und trotz einiger Diskrepanzen in den Ergebnissen der zweiten und dritten Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 0,025 bis 0,25 μM beschrieben sie eine Reduktion der Erregerentwicklung von über 80 % durch den Einsatz von Konzentrationen oberhalb von 0,05 μM . Unterhalb einer Konzentration von 0,00625 μM verzeichneten sie einen abrupten Anstieg des Parasitenwachstums in den HCT-8 Zellen (Najdrowski et al., 2007). Wie bereits erwähnt, führten Konzentrationen unterhalb von 0,25 μM in der vorliegenden Arbeit zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen, die die Berechnung einer Konzentrations-Wirkungskurve ausschlossen. Auch in der Studie von Najdrowski et al. (2007) traten unterhalb dieser Wirkstoffkonzentrationen Diskrepanzen auf, die jedoch nicht von so eklatantem Ausmaß waren, als dass sie eine Ergebnisinterpretation verhindert hätten. Dennoch markiert diese Konzentrationen offensichtlich einen Schwellenwert, unterhalb dessen sich mehr oder weniger große Variabilitäten in den Ergebnissen manifestieren.

Für den Wirkstoff BAY-AF71184 konnte ebenso wie für Paromomycin ein konzentrationsabhängiger anticryptosporidialer Effekt nachgewiesen werden, wohingegen der Wirkstoff BAY-AB24992 zwar in den höchsten Konzentrationen eine Wirksamkeit gegen *C. parvum* zeigte, sich aber in seiner Wirkung sehr variabel und nicht konzentrationsabhängig darstellte; ähnlich wie auch für Halofuginon beobachtet. Für den unter dem Aspekt der anticryptosporidialen Wirksamkeit als vielversprechend anzusehenden Wirkstoff BAY-AF76184 konnte leider ebenfalls ein konzentrationsabhängiger das Zellwachstum inhibierender Effekt und auch eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung der jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurven zeigt sich aber, dass die EC_{50} -Werte der unerwünschten Effekte deutlich höher liegen als der des erwünschten anticryptosporidialen Effekts. Der mittels des LDH-Assays ermittelte EC_{50} -Wert für eine akute Zytotoxizität ist mit 48,78 μM um das ca. 20fache gegenüber dem EC_{50} -Wert für den anticryptosporidialen Effekt erhöht (2,37 μM); und der EC_{50} -Wert für die inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum der HCT-8 Zellen liegt mit 9,07 μM im Vergleich um den Faktor 3,8 höher. Bei der Bewertung des EC_{50} -Wertes zur inhibitorischen Wirkung auf das Zellwachstum ist weiterhin zu berücksichtigen, dass bei allen vier Wirkstoffen, so auch bei BAY-AF71184, reproduzierbar in den verwendeten niedrigeren Konzentrationen ein erhöhtes Zellwachstum im Vergleich zu den Negativkontrollen beobachtet werden konnte (die niedrigste Konzentration von BAY-AF71184 bewirkte im Vergleich zu den Negativkontrollen ein Zellwachstum von ca. 145 %). Da alle ermittelten Werte in die Berechnung der Konzentrations-Wirkungskurve eingeflossen sind, markiert

dieser EC_{50} -Wert nicht die Konzentration, bei der das Zellwachstum im Vergleich zur Negativkontrolle tatsächlich um 50 % reduziert ist. So liegt das Zellwachstum bei einer Wirkstoffkonzentration von 8,93 μM , die annähernd dem EC_{50} -Wert des antiproliferativen Effekts mit 9,07 μM entspricht, bei ca. 104 % ($SD \pm 16$ %). Durch selbige Wirkstoffkonzentration lässt sich entsprechend der qPCR-Auswertung zur anticryptosporidialen Wirksamkeit immer noch eine ca. 90%ige Inhibition der Entwicklung von *C. parvum* in HCT-8 Zellen erzielen, welche dann mit einer Zytotoxizität von ca. 7,7 % ($SD \pm 4,5$ %) assoziiert ist. Die nächst niedrigere Wirkstoffkonzentration in Höhe von 4,46 μM bewirkt bei einem Zellwachstum von 133 % ($SD \pm 36,6$ %) und einer sehr geringen Zytotoxizität von 5,2 % ($SD \pm 4,5$ %) eine Reduktion der Erregerentwicklung um ca. 78 %. Somit scheint es sich bei BAY-AF76184 ebenso wie bei BAY-AB24992, der zwar nur in den höchsten Konzentrationen wirksam gegen *C. parvum* wirksam war, dafür aber keinerlei antiproliferative Effekte und auch nur eine geringe Zytotoxizität aufwies, um vielversprechende Substanzen zu handeln, deren anticryptosporidiale Wirksamkeit in nachfolgenden *in vivo* Tests überprüft werden sollte.

5.4 Schlussfolgerung

Mittels des in dieser Arbeit vorgestellten Zellkultur-basierten Testverfahrens wird eine relative Quantifizierung der *in vitro* Entwicklung von *C. parvum* unter dem Einfluss verschiedenster Wirkstoffe ermöglicht. Anhand der Ergebnisse lassen sich Aussagen in Bezug auf eine potentielle anticryptosporidiale Wirksamkeit der untersuchten, bis dato noch nicht ausgetesteten Substanzen treffen. Weiterhin können vielversprechend erscheinende Wirkstoffe, wie z.B. BAY-AF71184 und BAY-AB24992, anhand der ebenfalls etablierten LDH- und WST-1-Assays auf potentielle zytotoxische und antiproliferative Effekte auf die verwendete Zelllinie untersucht werden. Alle Ergebnisse zusammengenommen erlauben eine Schlussfolgerung, in wieweit eine nachfolgende Untersuchung der Substanzen in *in vivo* Testverfahren empfehlenswert erscheint, bzw. welche Wirkstoffe bei Vorliegen unerwünschter zytotoxischer und zytostatischer Wirkungen noch einmal einer Untersuchung in einem anderen Konzentrationsspektrum unterzogen werden sollten und/oder sich zumindest als Leitstruktur zur Entwicklung neuer Wirkstoffe eignen.

Eine allgemeingültige, für alle *C. parvum* Isolate/Stämme geltende Aussage zur Größenordnung des anticryptosporidialen Effekts eines untersuchten Wirkstoffes ist auch anhand des hier beschriebenen Testverfahrens nicht zu treffen (siehe auch Kapitel 5.3). Umso bedauerlicher ist daher die Tatsache, dass ein direkter Vergleich der zwei in dieser Arbeit verwendeten *C. parvum* Isolate (Genotyp: IIA16G2R1 und IIA15G2R1) aus Verfügbarkeitsgründen nicht stattfinden konnte.

In Bezug auf den *C. parvum* Inhibitionsassay wäre weiterhin wünschenswert gewesen zu untersuchen, in wieweit sich eine zusätzlich vorgenommene Exzystierungsbehandlung der

Oocysten positiv auf den Infektionserfolg des Erregers ausgewirkt hätte. Als weiterer Arbeitsschritt erhöhte dies zwar den Arbeitsaufwand des Testverfahrens, könnte aber eventuell die für eine zuverlässige Infektion einzusetzende Oocystenkonzentration reduzieren.

Die angewendete qPCR-Methode zur relativen Quantifizierung des Erregers ist sensitiv und sehr zuverlässig. Weiterhin birgt diese Form des Nachweises durch die Verwendung von DNA als Template im Vergleich mit einer RT-qPCR die Vorteile eines geringeren Arbeits- und Kostenaufwandes sowie eines einfacheren Handlings. Dennoch erfordert diese Vorgehensweise mit der Durchführung von insgesamt zwei qPCRs gegenüber der vorgestellten qPCR mit dem Ziel einer absoluten Quantifizierung (siehe Kapitel 3.4.3) einen nicht unerheblich höheren Zeit- und Kostenaufwand. Die Verfolgung der angeführten Optimierungsoptionen, wie die Austestung anderer Polymerasen oder die Variation des Zeitpunktes der Zugabe des externen Standards zu den zu untersuchenden Proben (siehe Kapitel 5.1), wäre empfehlenswert.

6 Zusammenfassung

Entwicklung eines Zellkultur-basierten Testverfahrens zur Evaluierung potentieller Wirkstoffe gegen *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidiose ist eine sowohl bei Menschen als auch bei Tieren weltweit auftretende gastrointestinale Infektion, die durch das zoonotische Protozoon *C. parvum* und weitere Vertreter derselben Gattung verursacht wird.

Der klinische Verlauf einer durch *C. parvum* induzierten Darminfektion ist eng mit dem Immunstatus des Wirtes assoziiert. Bei immunkompetenten Personen tritt als Folge einer Infektion mit diesem Erreger in der Regel eine akute, selbstlimitierende Durchfallerkrankung auf, die sich im Gegensatz dazu bei immundefizienten Personen zu einer chronischen und lebensbedrohlichen Erkrankungen mit unter Umständen (zusätzlichen) extraintestinalen Manifestationen entwickeln kann. Aber nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Veterinärmedizin zählt *C. parvum* zu den relevantesten parasitären Enteritisserregern. Durch ihr noch unausgereiftes Immunsystem sind in besonderem Maße Neonaten für eine Infektion mit diesem Erreger empfänglich und infizieren sich regelmäßig durch eine orale Aufnahme der ubiquitär vorkommenden und gegenüber Umwelteinflüssen und Chemikalien sehr resistenten Dauerstadien (Oocysten). Als einer der Hauptverursacher der neonatalen Diarrhoe beim Kalb ist *C. parvum* verantwortlich für Verluste in der Kälberaufzucht, ein mit einem retardierten Wachstum einhergehendes vermindertes Schlachtgewicht und folglich Verursacher von erheblichen wirtschaftlichen Verlusten in der Landwirtschaft.

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin existieren zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung bzw. Pro- und Metaphylaxe einer humanen bzw. bovinen Cryptosporidiose. Leider erweist sich deren Einsatz nicht in allen Fällen einer Cryptosporidiose als effektiv, so dass uneingeschränkt wirksame Chemotherapeutika bis heute nicht verfügbar sind, aber dringend benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Evaluierung einer anticryptosporidialen Wirksamkeit potentieller bis dato noch nicht überprüfter Wirkstoffe etabliert. Bei dem als „*C. parvum* Inhibitionsassay“ bezeichneten Testverfahren handelt es sich um eine Kombination aus einer *in vitro* Kultivierung von *C. parvum* in HCT-8 Zellen und einer quantitativen real-time PCR (qPCR).

Die qPCR ermöglichte eine relative Quantifizierung der Erregerentwicklung unter Stoffeinfluss, so dass eine Aussage zu einer potentiell anticryptosporidialen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen getroffen werden konnte. Als Zielsequenz fungierte hierbei ein 255 bp umfassender Abschnitt der cryptosporidialen 18S rDNA, dessen Gehalt in jeder einzelnen Probe anhand einer internen Kontrolle normiert wurde. Als interne Kontrolle wurde eine 189 bp umfassende Sequenz innerhalb des zellulären (humanen) 18S rDNA Gens

verwendet, deren Gehalt in den einzelnen Proben anhand einer zweiten qPCR ermittelt wurde.

Insgesamt wurden 51 Wirkstoffe in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen überprüft. Zwei vielversprechend erscheinende Wirkstoffe, ein heterozyklisch substituiertes 1,2,4-Triazin (BAY-AB24992) und ein substituiertes Benzimidazol (BAY-AF76184), wurden eingehender untersucht. Ihr mittels des *C. parvum* Inhibitionsassays überprüfetes Konzentrationsspektrum umfasste insgesamt acht Verdünnungsstufen und selbige Konzentrationen wurden ebenfalls mittels eines Lactatdehydrogenase (LDH)-Assays und eines WST-1-Assays auf zytotoxische und zytostatische Effekte auf die gewählte Wirtszelllinie untersucht.

Für die Substanz BAY-AF76184 konnte eine gute konzentrationsabhängige Wirksamkeit gegen *C. parvum* mit Inhibitionen des cryptosporidialen Wachstums im Größenbereich von maximal 97 % gezeigt werden. Der ermittelte EC₅₀-Wert belief sich auf 2,37 µM. Obgleich für diesen Wirkstoff auch konzentrationsabhängige antiproliferative und zytotoxische Effekte auf die HCT-8 Zelllinie nachgewiesen werden konnten, ist eine weitere Überprüfung in niedrigen Dosierungen in Tiermodellen angeraten. Selbst sehr niedrige Wirkstoffkonzentrationen in Höhe von 4,46 µM, die nicht mehr mit zytostatischen Effekten und einer nur sehr geringen Zytotoxizität assoziiert waren, erzielten *in vitro* noch Wachstumsinhibitionen von *C. parvum* im Größenbereich von ca. 78 %, weshalb diese Substanz trotz seiner unerwünschten Eigenschaften durchaus als vielversprechend gelten kann.

Auch für BAY-AB24992 scheint eine nachfolgende *in vivo* Überprüfung empfehlenswert. Zwar war für diese Substanz keine Konzentrationsabhängigkeit nachweisbar und *in vitro* bewirkten nur die vier höchsten Konzentrationen eine über 60%ige Wachstumsinhibition von *C. parvum* (ca. 71 bis 88 %), allerdings konnten für diesen Wirkstoff keinerlei antiproliferative Effekte und auch nur eine sehr geringe Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Insgesamt betrachtet stellt das hier etablierte *C. parvum* Inhibitionsassay eine Methode dar, die eine schnelle und zuverlässige parallele Überprüfung mehrerer Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegen das Protozoon *C. parvum* ermöglicht. Es ist folglich dazu geeignet, ethisch bedenkliche, kostenintensive und arbeitsaufwendige Tierversuche zumindest partiell zu ersetzen. Obgleich von einer attestierten Wirksamkeit *in vitro* nicht zwangsläufig auf eine Wirksamkeit *in vivo* geschlossen werden kann, so eignet sich ein Zellkultur-basiertes Testverfahren dennoch zur Vorselektion solcher Wirkstoffe, die in nachgeschalteten Tierversuchen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit positive Ergebnisse erzielen könnten.

7 Summary

Development of a cell culture-based assay for the evaluation of putative compounds against *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidiosis is a common gastro-intestinal infection in both, humans and animals, worldwide caused by the zoonotic protozoan *C. parvum* and other members of the same genus.

The clinical course of *C. parvum* infections is highly dependent on the immune status of the individual host. While in immunocompetent individuals *Cryptosporidium* infections most commonly result in acute but self-limiting gastroenteritis, in immunodeficient or immunosuppressed individuals cryptosporidiosis can become a chronic and life-threatening diarrhoeal disease and also (additional) extraintestinal infections may occur. Not only in human medicine but also in veterinary medicine *C. parvum* ranks among the most relevant parasitic enteritis pathogens. Due to their immature immune system neonates are highly susceptible for infections with this parasite and routinely get infected by oral uptake of the ubiquitous oocysts which are very resistant against environmental changes and chemicals. As one of the major pathogens causing neonatal diarrhoea in calves, *C. parvum* is responsible for fatalities and retarded weight gain in calf rearing and therefore the cause of significant economical losses in agriculture.

Even though approved agents for the treatment of cryptosporidiosis and for prophylactic use are available in human as well as in veterinary medicine, fully effective drugs in all cases of cryptosporidiosis are still missing but urgently needed.

In the present work a method was established to evaluate the efficacy of putative anticryptosporidial compounds which had not been tested yet. The so-called "C. parvum inhibition assay" is a combination of *in vitro* cultivation of *C. parvum* in HCT-8 cells and quantitative real-time PCR (qPCR).

The qPCR-based method used here allowed the relative quantification of the development of *C. parvum* under drug exposure, therefore the efficacy of the tested compound could be determined. For the detection of the parasite DNA a target sequence of 255 bp within the cryptosporidial 18S rDNA gene was used. The amount of this target sequence was normalised to an internal control for each sample. As internal control a sequence with a size of 189 bp from the human host cell 18S rDNA gene was amplified in a second qPCR.

Overall 51 compounds were tested in at least three different concentrations. Two promising compounds, a heterocyclic substituted 1,2,4-triazinedione (BAY-AB24992) and a substituted benzimidazole (BAY-AF76184), were examined in more detail. Both compounds were tested in eight different concentrations for their ability to interfere with *C. parvum* development *in vitro*. Furthermore the same concentrations were also used in a lactate dehydrogenase and a

WST-1 assay to analyse potential cytotoxic and anti-proliferative effects on the chosen host cell line, respectively.

The drug BAY-AF76184 displayed a good concentration-dependent inhibition of *C. parvum* growth with a maximum inhibition of 97%. The concentration response curve had an EC₅₀ value of 2.37 µM. Although this compound also showed concentration-dependent antiproliferative and cytotoxic effects on HCT-8 cells, further *in vivo* tests at low dosages are advisable. Even a concentration of 4.46 µM, which was associated with low cytotoxicity and no cytostatic effect, reached an inhibition of the growth of *C. parvum in vitro* of approximately 78%. Therefore BAY-AF76184 can be considered a promising/putative compound despite its unwanted side effects.

Future *in vivo* testing of BAY-AB24992 also appears to be recommendable. This compound did not inhibit *C. parvum* growth in a concentration-dependant manner but also showed good *in vitro* efficacy against *C. parvum*. At least the four highest concentrations yielded an inhibition of more than 60% (approx. 71-88%). Additionally this drug had neither anti-proliferative nor cytotoxic effects.

Overall the established *C. parvum* inhibition assay displays a fast and reliable method for assessing drug efficacy against the protozoan *C. parvum*. Consequently it is suitable to at least partially replace expensive and labour-intensive animal experiments which are also of ethical concern. Although there is of course no guarantee that drugs with good *in vitro* activity will also perform *in vivo*, a cell culture-based assay nevertheless improves prediction for overall success of consecutive *in vivo* tests.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	"ATP-binding cassette"
AGS	humane Magenadenokarzinomzelllinie
AIDS	"Acquired Immune Deficiency Syndrome"
ATP	Adenosintriphosphat
BFTE	"bovine fallopian tube epithelial" (primäre bovine Eileiterepithelzellen)
BHK	"baby hamster kidney"
bidst. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BS-C-1	kontinuierliche Nierenzelllinie einer äthiopischen Grünen Meerkatze
bzw.	beziehungsweise
ca.	lat.: circa (ungefähr, annähernd)
Caco-2	humane Kolonadenokarzinomzellen
CAM	Chorioallantoismembran
CDC	"Center for Disease Control"
cDNA	"complementary DNA"
cfu	"colony-forming unit" (koloniebildende Einheit)
CLIA	"chemiluminescence immunoassay"
COWP	" <i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein"
Cq	"quantification cycle"
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Lat.: destilata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"desoxyribonucleic acid" (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ELISA	"microtiter enzyme-linked immunosorbant assay"
et al.	lat.: et alii (und andere)
etc.	lat.: et cetera (und so weiter)
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
FBS	fötales bovines Serum
FDA	"Food and Drug Administration"
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GM	"Growth Medium" (Wachstumsmedium)

h	lat.: hora (Stunde)
H59	intrahepatische Gallengangsepithelzelllinie
H69	intrahepatische Gallengangsepithelzelllinie
H75	intrahepatische Gallengangsepithelzelllinie
HAART	"highly-active anti-retroviral therapy" (hochaktive antiretrovirale Therapie)
HCT-8	"human colonic tumor", auch "human ileocecal adenocarcinoma" (humane ileocaecale Adenokarzinomzellen)
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie
HFL	"human fetal lung" (humane fötale Lungenzelllinie)
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRT	"human rectal tumor" (humane Rektumkarzinom/Mastdarmtumorzellen)
HT29	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
HT29.74	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
IFA	"immunofluorescence assay"
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Intestine 407	humane embryonale Darmzelllinie
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KI	Konvidenzintervall
L	Liter
L929	murine Fibroblastenzelllinie
LB	Luria broth
LDH	Lactatdehydrogenase
LGA	von Lewis Ratten stammenden Dünndarmkarzinomzellen
M	Mol/L
m	milli (10^{-3}); Meter
MDBK	"Madin-Darby bovine kidney" (bovine Nierenzelllinie)
MDCK	"Madin-Darby canine kidney" (canine Nierenzelllinie)
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	"messenger" RNA (Boten-RNA)
n	nano (10^{-9})
NTC	"no template control" (Kontrolle ohne Template)
OD	optische Dichte

PBS	"phosphate buffered saline" (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCK	"primary chicken kidney" (primäre Hühnernierenzellen)
PCR	"polymerase chain reaction" (Polymerase Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
p.i.	lat.: post infectionem
PK-10	"porcine kidney" (primäre Schweinenierenzellen)
ppm	"parts per million"
qPCR	quantitative real-time PCR
RKI	Robert-Koch-Institut
RL95-2	humane Endometriumkarzinomzelllinie
RNA	"ribonucleic acid" (Ribonukleinsäure)
rpm	"rounds per minute" (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	"reverse transcription"
s	Sekunde
SD	"standard deviation" (Standardabweichung)
SCID	"severe combined immunodeficiency"
ss rRNA	"small-subunit ribosomal RNA"
T84	humane Kolonkarzinomzellen
Tab.	Tabelle
THP-1	humane myelomonozytische Zelllinie
U	"Unit"
UV	ultraviolett
VELI	primäre leporine Chondrozytenkultur
WST	"water soluble tetrazolium"
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro (10 ⁻⁶);
%	Prozent
°C	Grad Celsius

9 Literaturverzeichnis

Abrahamsen, M.S., Schroeder, A.A., 1999. Characterization of intracellular *Cryptosporidium parvum* gene expression. *Molecular and biochemical parasitology* 104, 141-146.

Abu Sin, M., Alpers, K., Askar, M., Bernard, H., Buchholz, U., Brodhun, B., Buda, S., Deleré, Y., Eckmanns, T., Falkenhorst, G., Fiebig, L., Frank, C., Gillesberg Lassen, S., Haas, W., Haller, S., Hamouda, O., Hellenbrand, W., Koch, J., Marcus, U., Matysiak-Klose, D., Neifer, J., Offergeld, R., Reuß, A., Rosner, B., Schielke, A., Schöneberg, I., Schweickert, B., Siedeler, A., Stark, K., Takla, A., Velasco, E., Wadl, M., Werber, D., Wichmann, O., Wilking, H., Zimmermann, R., 2012. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011*. Robert-Koch-Institut, Berlin.

Abubakar, I., Aliyu, S.H., Arumugam, C., Usman, N.K., Hunter, P.R., 2007. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology* 63, 387-393.

Adams, R.B., Guerrant, R.L., Zu, S., Fang, G., Roche, J.K., 1994. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. *The Journal of infectious diseases* 169, 170-177.

Angus, K.W., 1987. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. In *Practice* 9, 47-49.

Angus, K.W., 1990. Cryptosporidiosis in Ruminants, in: Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, pp. 83-103.

Angus, K.W., Hutchison, G., Campbell, I., Snodgrass, D.R., 1984. Prophylactic effects of anticoccidial drugs in experimental murine cryptosporidiosis. *The Veterinary record* 114, 166-168.

Arai, T., Kimata, I., Kitade, Y., Nakamoto, K., Tokoro, M., 2011. In vitro assessment of anticryptosporidial efficacy and cytotoxicity of adenosine analogues using a SYBR Green real-time PCR method. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66, 560-563.

Armson, A., Meloni, B.P., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C., 1999. Assessment of drugs against *Cryptosporidium parvum* using a simple in vitro screening method. *FEMS microbiology letters* 178, 227-233.

Arrowood, M., 2008. In Vitro Cultivation, in: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, pp. 499-525.

Arrowood, M.J., 2002. In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 390-400.

Arrowood, M.J., Mead, J.R., Xie, L., You, X., 1996. In vitro anticryptosporidial activity of dinitroaniline herbicides. *FEMS microbiology letters* 136, 245-249.

Arrowood, M.J., Xie, L.T., Hurd, M.R., 1994. In vitro assays of maduramicin activity against *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of eukaryotic microbiology* 41, 23S.

Awad-el-Kariem, F.M., Warhurst, D.C., McDonald, V., 1994. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitology* 109 (Pt 1), 19-22.

- Barker, I.K., Carbonell, P.L., 1974. *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambs, and *cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. *Z Parasitenkd* 44, 289-298.
- Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J., Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Petersen, C., 1998. A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Molecular and biochemical parasitology* 96, 93-110.
- Bjorneby, J.M., Riggs, M.W., Perryman, L.E., 1990. *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. *J Immunol* 145, 298-304.
- Blanshard, C., Jackson, A.M., Shanson, D.C., Francis, N., Gazzard, B.G., 1992. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *The Quarterly journal of medicine* 85, 813-823.
- Bonnin, A., Salimbeni, I., Dubremetz, J.F., Harly, G., Chavanet, P., Camerlynck, P., 1990. Mise au point d'un modèle expérimental de culture in vitro des stades asexués de *Cryptosporidium* sp. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 64, 41-43.
- Boxell, A., Hijjawi, N., Monis, P., Ryan, U., 2008. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Experimental parasitology* 120, 67-72.
- Brady, M.T., Oleske, J.M., Williams, P.L., Elgie, C., Mofenson, L.M., Dankner, W.M., Van Dyke, R.B., 2010. Declines in mortality rates and changes in causes of death in HIV-1-infected children during the HAART era. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53, 86-94.
- Buraud, M., Forget, E., Favennec, L., Bizet, J., Gobert, J.G., Deluol, A.M., 1991. Sexual stage development of cryptosporidia in the Caco-2 cell line. *Infection and immunity* 59, 4610-4613.
- Bustin, S.A., 2010. Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods* 50, 217-226.
- Cabada, M.M., White, A.C., Jr., 2010. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Current opinion in infectious diseases* 23, 494-499.
- Caccio, S., Pinter, E., Fantini, R., Mezzaroma, I., Pozio, E., 2002. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerging infectious diseases* 8, 85-86.
- Cai, X., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Zhu, G., 2004. Intron-containing beta-tubulin transcripts in *Cryptosporidium parvum* cultured in vitro. *Microbiology (Reading, England)* 150, 1191-1195.
- Cai, X., Woods, K.M., Upton, S.J., Zhu, G., 2005. Application of quantitative real-time reverse transcription-PCR in assessing drug efficacy against the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 4437-4442.
- Carreno, R.A., Martin, D.S., Barta, J.R., 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology research* 85, 899-904.
- Castro-Hermida, J.A., Pors, I., Ares-Mazas, E.C.C., 2004. In vitro activity on *Cryptosporidium parvum* oocyst of different drugs with recognized anticryptosporidial efficacy. *Revue de Medecine Veterinaire* 155, 453-456.

- Certad, G., Benamrouz, S., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Delhaes, L., Coiteux, V., Delaire, B., Praet, M., Cuvelier, C., Gosset, P., Dei-Cas, E., Creusy, C., 2012. Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model. *Applied and environmental microbiology* 78, 1746-1751.
- Certad, G., Creusy, C., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Pinon, A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Praet, M., Cuvelier, C., Dei-Cas, E., 2010a. Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* TUM1 strain. *International journal for parasitology* 40, 1469-1475.
- Certad, G., Creusy, C., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Fleurisse, L., Pinon, A., Delhaes, L., Dei-Cas, E., 2010b. Development of *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82, 257-265.
- Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J.C., Dei-Cas, E., Creusy, C., 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious agents and cancer* 2, 22.
- Cevallos, A.M., Bhat, N., Verdon, R., Hamer, D.H., Stein, B., Tzipori, S., Pereira, M.E., Keusch, G.T., Ward, H.D., 2000. Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. *Infection and immunity* 68, 5167-5175.
- Chen, X.M., Keithly, J.S., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 2002. Cryptosporidiosis. *The New England journal of medicine* 346, 1723-1731.
- Chen, X.M., O'Hara, S.P., Huang, B.Q., Nelson, J.B., Lin, J.J., Zhu, G., Ward, H.D., LaRusso, N.F., 2004. Apical organelle discharge by *Cryptosporidium parvum* is temperature, cytoskeleton, and intracellular calcium dependent and required for host cell invasion. *Infection and immunity* 72, 6806-6816.
- Colford, J.M., Jr., Tager, I.B., Hirozawa, A.M., Lemp, G.F., Aragon, T., Petersen, C., 1996. Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival. *American journal of epidemiology* 144, 807-816.
- Current, W.L., Garcia, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 4, 325-358.
- Current, W.L., Haynes, T.B., 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 224, 603-605.
- Current, W.L., Long, P.L., 1983. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *The Journal of infectious diseases* 148, 1108-1113.
- Current, W.L., Reese, N.C., 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of protozoology* 33, 98-108.
- Datry, A., Danis, M., Gentilini, M., 1989. Développement complet de *Cryptosporidium* en culture cellulaire: applications. *Méd Sci* 5, 762-766.
- de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International journal for parasitology* 29, 1269-1287.

- Deng, M., Rutherford, M.S., Abrahamsen, M.S., 2004. Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Advanced drug delivery reviews* 56, 869-884.
- Deng, M.Q., Cliver, D.O., 1998. *Cryptosporidium parvum* development in the BS-C-1 cell line. *The Journal of parasitology* 84, 8-15.
- Ditrich, O., Palkovic, L., Sterba, J., Prokopic, J., Loudova, J., Giboda, M., 1991. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitology research* 77, 44-47.
- Egraz-Bernard, M., Favennec, L., Agnamey, P., Ballet, J.J., Brasseur, P., 1996. Inhibition of complete development of *Cryptosporidium parvum* in Caco-2 cells. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 15, 897-900.
- Farthing, M.J., 2000. Clinical Aspects of Human Cryptosporidiosis, in: Petry, F. (Ed.), *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*. KARGER, pp. 50-74.
- Favennec, L., Egraz-Bernard, M., Comby, E., Lemeteil, D., Ballet, J.J., Brasseur, P., 1994. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium parvum* in Caco-2 cells: a new screening method for anticryptosporidial agents. *The Journal of eukaryotic microbiology* 41, 39S.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology* 126, 37-56.
- Fayer, R., 2008. General Biology, in: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, pp. 1-42.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental parasitology* 124, 90-97.
- Fayer, R., Ellis, W., 1993. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *The Journal of parasitology* 79, 771-774.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D., 1998. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International journal for parasitology* 28, 49-56.
- Fayer, R., Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Trout, J.M., 1996. Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and environmental microbiology* 62, 3908-3909.
- Fayer, R., Leek, R.G., 1984. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *The Journal of protozoology* 31, 567-569.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International journal for parasitology* 30, 1305-1322.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary parasitology* 145, 260-266.
- Fayer, R., Santin, M., Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of parasitology* 91, 624-629.
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P., 1990. General Biology of *Cryptosporidium*, in: Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, pp. 1-29.

- Fayer, R., Ungar, B.L., 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological reviews* 50, 458-483.
- Flanigan, T.P., Aji, T., Marshall, R., Soave, R., Aikawa, M., Kaetzel, C., 1991. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infection and immunity* 59, 234-239.
- Forman, S., Kas, J., Fini, F., Steinberg, M., Ruml, T., 1999. The effect of different solvents on the ATP/ADP content and growth properties of HeLa cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 13, 11-15.
- Fox, L.M., Saravolatz, L.D., 2005. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40, 1173-1180.
- Fritzler, J.M., Zhu, G., 2012. Novel anti-*Cryptosporidium* activity of known drugs identified by high-throughput screening against parasite fatty acyl-CoA binding protein (ACBP). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67, 609-617.
- Gargala, G., 2008. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite* 15, 275-281.
- Gargala, G., Delaunay, A., Favennec, L., Brasseur, P., Ballet, J.J., 1999. Enzyme immunoassay detection of *Cryptosporidium parvum* inhibition by sinefungin in sporozoite infected HCT-8 enterocytic cells. *International journal for parasitology* 29, 703-709.
- Gargala, G., Le Goff, L., Ballet, J.J., Favennec, L., Stachulski, A.V., Rossignol, J.F., 2010. Evaluation of new thiazolide/thiadiazolide derivatives reveals nitro group-independent efficacy against in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 1315-1318.
- Girouard, D., Gallant, J., Akiyoshi, D.E., Nunnari, J., Tzipori, S., 2006. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *The Journal of parasitology* 92, 399-400.
- Graczyk, Z., Chomicz, L., Kozłowska, M., Kazimierczuk, Z., Graczyk, T.K., 2011. Novel and promising compounds to treat *Cryptosporidium parvum* infections. *Parasitology research* 109, 591-594.
- Greif, G., Mundt, H.C., 2011a. Novel Antiparasitic combination of active Substances, A61K 31/53 (2006.01); AO1N 43/52 (2006.01) ed, Deutschland.
- Greif, G., Mundt, H.C., 2011b. Use of heterocyclically substituted 1,2,4-Triazine Diones, A61K 31/53 (2006.01); A61P 33/02 (2006.01) ed, Deutschland.
- Grinberg, A., Markovics, A., Galindez, J., Lopez-Villalobos, N., Kosak, A., Tranquillo, V.M., 2002. Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. *The Veterinary record* 151, 606-608.
- Guillen, S., Garcia San Miguel, L., Resino, S., Bellon, J.M., Gonzalez, I., Jimenez de Ory, S., Munoz-Fernandez, M.A., Navarro, M.L., Gurbindo, M.D., de Jose, M.I., Mellado, M.J., Martin-Fontelos, P., Gonzalez-Tome, M.I., Martinez, J., Beceiro, J., Roa, M.A., Ramos, J.T., 2010. Opportunistic infections and organ-specific diseases in HIV-1-infected children: a cohort study (1990-2006). *HIV medicine* 11, 245-252.
- Gut, J., Petersen, C., Nelson, R., Leech, J., 1991. *Cryptosporidium parvum*: in vitro cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of protozoology* 38, 72S-73S.

- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of clinical microbiology* 39, 3472-3480.
- Harp, J.A., Woodmansee, D.B., Moon, H.W., 1990. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infection and immunity* 58, 2237-2240.
- Harris, M., Deutsch, G., MacLean, J.D., Tsoukas, C.M., 1994. A phase I study of letrazuril in AIDS-related cryptosporidiosis. *AIDS* 8, 1109-1113.
- Healey, M.C., Yang, S., Du, C., Liao, S.F., 1997. Bovine fallopian tube epithelial cells, adult C57BL/6 mice, and non-neonatal pigs as models for cryptosporidiosis. *The Journal of eukaryotic microbiology* 44, 64S-65S.
- Heine, J., Pohlenz, J.F., Moon, H.W., Woode, G.N., 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *The Journal of infectious diseases* 150, 768-775.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology* 8, R19.
- Helmy, Y.A., Krucken, J., Nockler, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Zessin, K.H., 2013. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Veterinary parasitology* 193, 15-24.
- Hemphill, A., Mueller, J., Esposito, M., 2006. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert opinion on pharmacotherapy* 7, 953-964.
- Henriksen, S.A., Krogh, H.V., 1985. Bovine cryptosporidiosis in Denmark. 1. Prevalence, age distribution, and seasonal variation. *Nordisk veterinærmedicin* 37, 34-41.
- Hijjawi, N., 2010. *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Experimental parasitology* 124, 54-60.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C., 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International journal for parasitology* 34, 769-777.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ryan, U.M., Olson, M.E., Thompson, R.C., 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International journal for parasitology* 32, 1719-1726.
- Holland, R.E., Herdt, T.H., Refsal, K.R., 1989. Pulmonary excretion of H2 in calves with *Cryptosporidium*-induced malabsorption. *Digestive diseases and sciences* 34, 1399-1404.
- Hommer, V., Eichholz, J., Petry, F., 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 52, 359-364.
- Hunter, P.R., Nichols, G., 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 15, 145-154.

- Ives, N.J., Gazzard, B.G., Easterbrook, P.J., 2001. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic. *The Journal of infection* 42, 134-139.
- Jakobi, V., Petry, F., 2006. Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes encoding sporozoite surface antigens in infected HCT-8 host cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8, 2186-2194.
- Jarvie, B.D., Trotz-Williams, L.A., McKnight, D.R., Leslie, K.E., Wallace, M.M., Todd, C.G., Sharpe, P.H., Peregrine, A.S., 2005. Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. *Journal of dairy science* 88, 1801-1806.
- Joachim, A., Krull, T., Schwarzkopf, J., Dauschies, A., 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Veterinary parasitology* 112, 277-288.
- Karanis, P., Aldeyarbi, H.M., 2011. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *International journal for parasitology* 41, 1231-1242.
- Karanis, P., Kimura, A., Nagasawa, H., Igarashi, I., Suzuki, N., 2008. Observations on *Cryptosporidium* life cycle stages during excystation. *The Journal of parasitology* 94, 298-300.
- Kaske, M., 2004. Pathophysiologie der Diarrhoe, in: Engelhardt, W., Breves, G. (Eds.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, pp. 412-416.
- Kaske, M., Smolka, K., Andresen, U., 2008. Neonatal diarrhea in the calf - Etiology and pathophysiology. *Der Praktische Tierarzt* 89, 852-859.
- Khan, S.M., Debnath, C., Pramanik, A.K., Xiao, L., Nozaki, T., Ganguly, S., 2010. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Veterinary parasitology* 171, 41-47.
- King, B.J., Hoefel, D., Lim, S.P., Robinson, B.S., Monis, P.T., 2009. Flow cytometric assessment of distinct physiological stages within *Cryptosporidium parvum* sporozoites post-excystation. *Parasitology* 136, 953-966.
- King, B.J., Keegan, A.R., Robinson, B.S., Monis, P.T., 2011. *Cryptosporidium* cell culture infectivity assay design. *Parasitology* 18, 1-11.
- Kocoshis, S.A., Cibull, M.L., Davis, T.E., Hinton, J.T., Seip, M., Banwell, J.G., 1984. Intestinal and pulmonary cryptosporidiosis in an infant with severe combined immune deficiency. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 3, 149-157.
- Kreuzer, K.A., Bohn, A., Lass, U., Peters, U.R., Schmidt, C.A., 2000. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Molecular and cellular probes* 14, 57-60.
- Kuhls, T.L., Mosier, D.A., Crawford, D.L., 1991. Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. *The Journal of protozoology* 38, 74S-76S.
- Lacharme, L., Villar, V., Rojo-Vazquez, F.A., Suarez, S., 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6, 566-571.

- Lallemand, M., Villeneuve, A., Belda, J., Dubreuil, P., 2006. Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinate in the treatment of cryptosporidiosis in veal calves. *The Veterinary record* 159, 672-676.
- Lawton, P., Hejl, C., Sarciron, M.-E., Mancassola, R., Naciri, M., Petavy, A.-F., 1999. Use of a non-adherent cell culture system for testing the effect of 2',3'-dideoxyinosine against *Cryptosporidium parvum*. *FEMS microbiology letters* 176, 235-240.
- Lawton, P., Mancassola, R., Naciri, M., Petavy, A.F., 2001. Use of Percoll for the infection of cells in vitro with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of microbiological methods* 46, 81-84.
- Lawton, P., Naciri, M., Mancassola, R., Petavy, A.-F., 1996. Cultivation of *Cryptosporidium parvum* in a non-adherent human monocytic cell line. *Journal of microbiological methods* 27, 165-173.
- Lawton, P., Naciri, M., Mancassola, R., Petavy, A.F., 1997. In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* in the non-adherent human monocytic THP-1 cell line. *The Journal of eukaryotic microbiology* 44, 66S.
- Le Sueur, C., Mage, C., Mundt, H.C., 2009. Efficacy of toltrazuril (Baycox 5% suspension) in natural infections with pathogenic *Eimeria* spp. in housed lambs. *Parasitology research* 104, 1157-1162.
- Lee, S.U., Joung, M., Ahn, M.H., Huh, S., Song, H., Park, W.Y., Yu, J.R., 2008. CP2 gene as a useful viability marker for *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology research* 102, 381-387.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2001. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *The Veterinary record* 148, 108-112.
- Lendner, M., Etzold, M., Dauschies, A., 2011. Cryptosporidiosis-an update. *Berliner und Muenchener tieraerztliche Wochenschrift* 124, 473-484.
- Liebler, E.M., Pohlenz, J.F., Woodmansee, D.B., 1986. Experimental intrauterine infection of adult BALB/c mice with *Cryptosporidium* sp. *Infection and immunity* 54, 255-259.
- Linder, M.R., Heckerroth, A.R., Najdrowski, M., Dauschies, A., Schollmeyer, D., Miculka, C., 2007. (2R,3S)-(+)- and (2S,3R)-(-)-Halofuginone lactate: synthesis, absolute configuration, and activity against *Cryptosporidium parvum*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17, 4140-4143.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loeb, M., Walach, C., Phillips, J., Fong, I., Salit, I., Rachlis, A., Walmsley, S., 1995. Treatment with letrozuril of refractory cryptosporidial diarrhea complicating AIDS. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 10, 48-53.
- Lopez-Velez, R., Tarazona, R., Garcia Camacho, A., Gomez-Mampaso, E., Guerrero, A., Moreira, V., Villanueva, R., 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 14, 677-681.
- Lorenzo Lorenzo, M.J., Ares-Mazas, E., Villacorta Martinez de Maturana, I., 1993. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary parasitology* 47, 9-15.

- Lumb, R., Smith, K., O'Donoghue, P.J., Lanser, J.A., 1988. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitology research* 74, 531-536.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., et al., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *The New England journal of medicine* 331, 161-167.
- MacDonald, L.M., Sargent, K., Armson, A., Thompson, R.C., Reynoldson, J.A., 2002. The development of a real-time quantitative-PCR method for characterisation of a *Cryptosporidium parvum* in vitro culturing system and assessment of drug efficacy. *Molecular and biochemical parasitology* 121, 279-282.
- Maillot, C., Favennec, L., Francois, A., Ducrotte, P., Brasseur, P., 1997. Sexual and asexual development of *Cryptosporidium parvum* in five oocyst- or sporozoite-infected human enterocytic cell lines. *The Journal of eukaryotic microbiology* 44, 582-585.
- Mann, E.D., Sekla, L.H., Nayar, G.P., Koschik, C., 1986. Infection with *Cryptosporidium* spp. in humans and cattle in Manitoba. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 50, 174-178.
- Marshall, R.J., Flanigan, T.P., 1992. Paromomycin inhibits *Cryptosporidium* infection of a human enterocyte cell line. *The Journal of infectious diseases* 165, 772-774.
- Martinez, F., Mascaro, C., Rosales, M.J., Diaz, J., Cifuentes, J., Osuna, A., 1992. In vitro multiplication of *cryptosporidium parvum* in mouse peritoneal macrophages. *Veterinary parasitology* 42, 27-31.
- Martinez, F., Rosales, M.J., Diaz, J., Mascaro, C., 1997. The effects of IFN- γ activated mouse peritoneal and alveolar macrophages on *Cryptosporidium parvum* development. *Veterinary parasitology* 68, 305-308.
- Mauzy, M.J., Enomoto, S., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., 2012. The *Cryptosporidium parvum* transcriptome during in vitro development. *PloS one* 7, e31715.
- McDonald, V., McCrossan, M.V., Petry, F., 1995. Localization of parasite antigens in *Cryptosporidium parvum*-infected epithelial cells using monoclonal antibodies. *Parasitology* 110 (Pt 3), 259-268.
- McDonald, V., Stables, R., Warhurst, D.C., Barer, M.R., Blewett, D.A., Chapman, H.D., Connolly, G.M., Chiodini, P.L., McAdam, K.P., 1990. In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34, 1498-1500.
- Mead, J.R., 2002. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 5, 47-57.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70, 1156-1160.
- Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., Pozio, E., 2003. Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both in vitro and in vivo models. *International journal for parasitology* 33, 757-764.

- Meloni, B.P., Thompson, R.C., 1996. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. *The Journal of parasitology* 82, 757-762.
- Mengel, H., Kruger, M., Kruger, M.U., Westphal, B., Swidsinski, A., Schwarz, S., Mundt, H.C., Dittmar, K., Dauschies, A., 2012. Necrotic enteritis due to simultaneous infection with *Isospora suis* and clostridia in newborn piglets and its prevention by early treatment with toltrazuril. *Parasitology research* 110, 1347-1355.
- Meutin, D.J., Van Kruiningen, H.J., Kein, D.H., 1974. Cryptosporidiosis in a calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 165, 914-917.
- Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, R.C., Ndiritu, W., Lal, A., Moore, A., Deplazes, P., 2000. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of clinical microbiology* 38, 1180-1183.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A., Thompson, R.C., 1997. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *The Journal of parasitology* 83, 825-830.
- Morgan, U.M., Sargent, K.D., Deplazes, P., Forbes, D.A., Spano, F., Hertzberg, H., Elliot, A., Thompson, R.C., 1998. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* 117 (Pt 1), 31-37.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A., Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of eukaryotic microbiology* 49, 433-440.
- Müller, J., Hemphill, A., 2013. In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *International journal for parasitology* 43, 115-124.
- Mundt, H.C., Dauschies, A., Uebe, F., Rinke, M., 2003. Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. *Parasitology research* 90 Suppl 3, S166-167.
- Murdoch, D.A., Bloss, D.E., Glover, S.C., 1993. Successful treatment of cryptosporidiosis in an AIDS patient with letrozuril. *AIDS* 7, 1279-1280.
- Naciri, M., Mancassola, R., Yvore, P., Peeters, J.E., 1993. The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Veterinary parasitology* 45, 199-207.
- Najdrowski, M., 2006. Etablierung eines In-vitro-Infektionsmodells zur Vitalitätsbeurteilung von *Cryptosporidium-parvum*-Oozysten, Veterinärmedizinische Fakultät, Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Parasitologie. Dissertation Universität Leipzig, Leipzig.
- Najdrowski, M., Heckerroth, A.R., Wackwitz, C., Gawlowska, S., Mackenstedt, U., Kliemt, D., Dauschies, A., 2007. Development and validation of a cell culture based assay for in vitro assessment of anticryptosporidial compounds. *Parasitology research* 101, 161-167.
- Navin, T.R., Weber, R., Vugia, D.J., Rimland, D., Roberts, J.M., Addiss, D.G., Visvesvara, G.S., Wahlquist, S.P., Hogan, S.E., Gallagher, L.E., Juraneck, D.D., Schwartz, D.A., Wilcox, C.M., Stewart, J.M., Thompson, S.E., 3rd, Bryan, R.T., 1999. Declining CD4+ T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 20, 154-159.

- Nesterenko, M.V., Woods, K., Upton, S.J., 1999. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. *Biochimica et biophysica acta* 1454, 165-173.
- Nichols, G., 2008. Epidemiology, in: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, pp. 79-118.
- Nichols, G.L., McLauchlin, J., Samuel, D., 1991. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. *The Journal of protozoology* 38, 237S-240S.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592-598.
- O'Donoghue, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International journal for parasitology* 25, 139-195.
- O'Hara, S.P., Chen, X.M., 2011. The cell biology of cryptosporidium infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13, 721-730.
- O'Hara, S.P., Yu, J.R., Lin, J.J., 2004. A novel *Cryptosporidium parvum* antigen, CP2, preferentially associates with membranous structures. *Parasitology research* 92, 317-327.
- Ollivett, T.L., Nydam, D.V., Bowman, D.D., Zambriski, J.A., Bellosa, M.L., Linden, T.C., Divers, T.J., 2009. Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. *Journal of dairy science* 92, 1643-1648.
- Pancieria, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M., 1971. Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathology* 8, 479-484.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J., McLauchlin, J., 2001. Unusual cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *Journal of medical microbiology* 50, 293-296.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., McLauchlin, J., 2000. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS microbiology letters* 189, 189-194.
- Peeters, J.E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vandergheynst, D., Naciri, M., Ares-Mazas, E., Yvore, P., 1992. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infection and immunity* 60, 2309-2316.
- Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S., Mac Kenzie, W.R., Lal, A.A., Beard, C.B., 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging infectious diseases* 3, 567-573.
- Peregrine, A.S., 1994. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Veterinary parasitology* 54, 223-248.
- Perkins, M.E., Wu, T.W., Le Blancq, S.M., 1998. Cyclosporin analogs inhibit in vitro growth of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 843-848.
- Petry, F., Kneib, I., Harris, J.R., 2009. Morphology and in vitro infectivity of sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of parasitology* 95, 1243-1246.

- Phelps, K.K., Lindsay, D.S., Sumner, S.S., Fayer, R., 2001. Immunohistochemistry based assay to determine the effects of treatments on *Cryptosporidium parvum* viability. *The Journal of eukaryotic microbiology Suppl*, 40S-41S.
- Pickartz, S., 2002. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung boviner Darmepithelzellen. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Pohlenz, J., Moon, H.W., Cheville, N.F., Bemrick, W.J., 1978. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172, 452-457.
- Ramadan, A., Abo el-Sooud, K., el-Bahy, M.M., 1997. Anticoccidial efficacy of toltrazuril and halofuginone against *Eimeria tenella* infection in broiler chickens in Egypt. *Research in veterinary science* 62, 175-178.
- Rasmussen, K.R., Larsen, N.C., Healey, M.C., 1993. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infection and immunity* 61, 1482-1485.
- Reduker, D.W., Speer, C.A., 1985. Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *The Journal of parasitology* 71, 112-115.
- Reduker, D.W., Speer, C.A., Blixt, J.A., 1985. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. *The Journal of protozoology* 32, 708-711.
- Rehg, J.E., 1995. The activity of halofuginone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 35, 391-397.
- Richardson, A.J., Frankenberg, R.A., Buck, A.C., Selkon, J.B., Colbourne, J.S., Parsons, J.W., Mayon-White, R.T., 1991. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiology and infection* 107, 485-495.
- Rochelle, P.A., De Leon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Applied and environmental microbiology* 63, 106-114.
- Rochelle, P.A., Leon, R.D., 2001. A review of methods for assessing the infectivity of *Cryptosporidium parvum* using in-vitro cell culture, in: Smith, M., Thompson, K.C. (Eds.), *Cryptosporidium: The Analytical Challenge*. The Royal Society of Chemistry, pp. 88-95.
- Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S., De Leon, R., 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and environmental microbiology* 68, 3809-3817.
- Rosales, M.J., Cifuentes, J., Mascaro, C., 1993. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. *Experimental parasitology* 76, 209-212.
- Rosales, M.J., Cordon, G.P., Moreno, M.S., Sanchez, C.M., 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta tropica* 95, 74-78.
- Rossignol, J.F., Hidalgo, H., Feregrino, M., Higuera, F., Gomez, W.H., Romero, J.L., Padierna, J., Geyne, A., Ayers, M.S., 1998. A double-'blind' placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92, 663-666.

- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford, S.E., Josephson, G.K., 1982. Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and Pathological Findings in Forty-two Scouring Neonatal Calves. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 23, 343-347.
- Santin, M., 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand veterinary journal* 61, 1-10.
- Santin, M., Trout, J.M., 2008. Livestock, in: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, pp. 451-483.
- Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary parasitology* 155, 15-23.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary parasitology* 122, 103-117.
- Scheid, P.L., Schwarzenberger, R., 2011. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitology research* 109, 499-504.
- Schnyder, M., Kohler, L., Hemphill, A., Deplazes, P., 2009. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Veterinary parasitology* 160, 149-154.
- Schupfner, M., Greif, G., Lendner, M., Dausgchies, A., Lippuner, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Krucken, J., 2013. Evaluation of putative anti-cryptosporidial drugs in an in vitro culture system. *Parasitology research* 112 Suppl 1, 149-162.
- Shahiduzzaman, M., Dausgchies, A., 2012. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary parasitology* 188, 203-214.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Keidel, J., Schmaschke, R., Dausgchies, A., 2010. Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. *Veterinary parasitology* 167, 43-49.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Khalafalla, R.E., Desouky, A.Y., Dausgchies, A., 2009a. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitology research* 105, 1155-1161.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Obwaller, A., Unglaube, S., Dausgchies, A., 2009b. Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary parasitology* 162, 271-277.
- Silverlas, C., Bjorkman, C., Egenvall, A., 2009. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Preventive veterinary medicine* 91, 73-84.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of comparative pathology* 65, 262-266.
- Smith, H.V., Corcoran, G.D., 2004. New drugs and treatment for cryptosporidiosis. *Current opinion in infectious diseases* 17, 557-564.

- Smith, H.V., Nichols, R.A., Grimason, A.M., 2005. Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in parasitology* 21, 133-142.
- Spano, F., Puri, C., Ranucci, L., Putignani, L., Crisanti, A., 1997a. Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitology* 114 (Pt 5), 427-437.
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A., 1997b. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS microbiology letters* 150, 209-217.
- Stockdale, H.D., Spencer, J.A., Blagburn, B.L., 2008. Prophylaxis and Chemotherapy, in: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, pp. 255-287.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., Nguyen, M., 2010. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50, S1-5.
- Theodos, C.M., Griffiths, J.K., D'Onfro, J., Fairfield, A., Tzipori, S., 1998. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 1959-1965.
- Timm, M., Saaby, L., Moesby, L., Hansen, E.W., 2013. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*.
- Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 5, 12-13.
- Tyzzer, E.E., 1910. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *The Journal of medical research* 23, 487-510 483.
- Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26, 394-412.
- Tzipori, S., 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological reviews* 47, 84-96.
- Tzipori, S., 1988. Cryptosporidiosis in perspective. *Advances in parasitology* 27, 63-129.
- Tzipori, S., Angus, K.W., Campbell, I., Gray, E.W., 1980a. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Infection and immunity* 30, 884-886.
- Tzipori, S., Campbell, I., Sherwood, D., Snodgrass, D.R., Whitelaw, A., 1980b. An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *The Veterinary record* 107, 579-580.
- Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K.W., Sherwood, D., Campbell, I., 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *The Veterinary record* 112, 116-120.
- Unbekannt, 1982. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 31, 589-592.
- Upton, S.J., Current, W.L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *The Journal of parasitology* 71, 625-629.

- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1994a. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS microbiology letters* 118, 233-236.
- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1994b. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* in MDBK and HCT-8 cells under select atmospheres. *Biomed Lett* 49, 265-271.
- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1995. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *Journal of clinical microbiology* 33, 371-375.
- Vandepitte, J., Robrechts, J., Vanneste, S., 1985. *Cryptosporidium* causing severe enteritis in a Belgian immunocompetent patient. *Acta clinica Belgica* 40, 43-47.
- Verdon, R., Keusch, G.T., Tzipori, S., Grubman, S.A., Jefferson, D.M., Ward, H.D., 1997. An in vitro model of infection of human biliary epithelial cells by *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of infectious diseases* 175, 1268-1272.
- Victor, G.H., Conway, B., Hawley-Foss, N.C., Manion, D., Sahai, J., 1993. Letrazuril therapy for cryptosporidiosis: clinical response and pharmacokinetics. *AIDS* 7, 438-440.
- Villacorta, I., Ares-Mazas, E., Lorenzo, M.J., 1991a. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Veterinary parasitology* 38, 249-252.
- Villacorta, I., Peeters, J.E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazas, E., Theys, H., 1991b. Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35, 283-287.
- Warren, C.A., Guerrant, R.L., 2008. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, pp. 235-253.
- Waybright, T.J., Britt, J.R., McCloud, T.G., 2009. Overcoming problems of compound storage in DMSO: solvent and process alternatives. *Journal of biomolecular screening* 14, 708-715.
- Widmer, G., Klein, P., Bonilla, R., 2007. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology* 134, 1583-1588.
- Woodmansee, D.B., Pohlenz, J.F.L., 1983. Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line, Proceedings of the 4th International Symposium on Neonatal Diarrhea. *Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan*, pp. 306-319.
- Woods, K.M., Nesterenko, M.V., Upton, S.J., 1995. Development of a microtitre ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum* in vitro. *FEMS microbiology letters* 128, 89-94.
- Woods, K.M., Nesterenko, M.V., Upton, S.J., 1996. Efficacy of 101 antimicrobials and other agents on the development of *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Annals of tropical medicine and parasitology* 90, 603-615.
- Woods, K.M., Upton, S.J., 2007. In vitro development of *Cryptosporidium parvum* in serum-free media. *Letters in applied microbiology* 44, 520-523.
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology* 124, 80-89.

- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A., 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of infectious diseases* 183, 492-497.
- Xiao, L., Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS immunology and medical microbiology* 52, 309-323.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and environmental microbiology* 65, 3386-3391.
- Yang, S., Healey, M.C., Du, C., Zhang, J., 1996. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. *Infection and immunity* 64, 349-354.
- You, X., Arrowood, M.J., Lejkowski, M., Xie, L., Schinazi, R.F., Mead, J.R., 1996a. A chemiluminescence immunoassay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* growth in vitro. *FEMS microbiology letters* 136, 251-256.
- You, X., Arrowood, M.J., Lejkowski, M., Xie, L., Schinazi, R.F., Mead, J.R., 1996b. In vitro evaluation of anticryptosporidial agents using MDCK cell culture and chemiluminescence immunoassay. *The Journal of eukaryotic microbiology* 43, 87S.
- You, X., Schinazi, R.F., Arrowood, M.J., Lejkowski, M., Juodawlkis, A.S., Mead, J.R., 1998. In-vitro activities of paromomycin and lasalocid evaluated in combination against *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41, 293-296.
- Yu, J.R., Choi, S.D., Kim, Y.W., 2000. In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *The Korean journal of parasitology* 38, 59-64.
- Zapata, F., Perkins, M.E., Riojas, Y.A., Wu, T.W., Le Blancq, S.M., 2002. The *Cryptosporidium parvum* ABC protein family. *Molecular and biochemical parasitology* 120, 157-161.
- Zhang, L., Sheoran, A.S., Widmer, G., 2009. *Cryptosporidium parvum* DNA replication in cell-free culture. *The Journal of parasitology* 95, 1239-1242.
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J.L., Rousset, M., 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of cellular physiology* 122, 21-29.

10 Anhang

Tab. A1 Mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalte der untersuchten Proben zur Ermittlung des optimalen Analysezeitpunktes für die DNA-Isolation beim *C. parvum* Inhibitionsassay.

Probe	DNA-Isolationszeitpunkt	DNA-Gehalt [ng/μl]
Mit <i>C. parvum</i> infizierter HCT-8 Zellrasen	26 h post infectionem	375,99
Mit <i>C. parvum</i> infizierter HCT-8 Zellrasen	50 h post infectionem	471,50
Mit <i>C. parvum</i> infizierter HCT-8 Zellrasen	56 h post infectionem	562,18

Tab. A2 Mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmter DNA-Gehalt der aus *C. parvum* Oocysten (ca. 5×10^6 Stück) isolierten DNA.

Probe	DNA-Gehalt [ng/μl]
<i>C. parvum</i> Oocysten (ca. 5×10^6 Stück)	375,99

Tab. A3 Detaillierte Angaben zur Eruiierung der optimalen Annealingtemperatur bei der qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA bei Verwendung der Primer nach Awad-el-Kariem et al. (1994). Als Template dienten 300 ng isolierter DNA rein zellulären Ursprungs (HCT-8 Monolayer mit Wachstumsmedium mit 1 % DMSO überschichtet) als auch eines mit *C. parvum* Oocysten infizierten HCT-8 Zellrasens (ebenfalls in Wachstumsmedium mit 1 % DMSO kultiviert) je PCR-Ansatz. Aufgeführt sind sowohl die mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmten, ursprünglichen DNA-Gehalte der isolierten Proben, als auch die in der qPCR ermittelten Cq-Werte der einzelnen Proben bei der jeweiligen Annealingtemperatur.

Probe	DNA-Gehalt [ng/μl]	Annealingtemperatur [°C]	Cq-Wert
DNA rein zellulären Ursprungs (HCT-8 Zellen, 1 % DMSO im Wachstumsmedium)	153,70	50,0	30,84
		50,7	31,25
		52,0	32,35
		53,0	34,42
		56,3	37,30
		58,3	0,00
		59,4	0,00
DNA eines mit <i>C. parvum</i> Oocysten infizierten HCT-8 Zellrasens (1 % DMSO im Wachstumsmedium)	155,09	60,0	0,00
		50,0	27,61
		50,7	27,51
		52,0	27,56
		53,0	27,70
		56,3	27,53
		58,3	27,54
59,4	27,74		
		60,0	27,69

Tab. A4 Detaillierte Angaben zu den Infektionsversuchen zur Ermittlung der optimalen Oocystenkonzentration sowie zur Überprüfung des Einflusses eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes (410×g, 5 min) auf den Infektionserfolg beim *C. parvum* Inhibitionsassay; Von jeder der insgesamt sechs überprüften Variationen (drei unterschiedliche Oocystenkonzentrationen zur Zellinfektion, sowohl unter Einfluss eines Zentrifugationsschrittes (zent.) als auch ohne zusätzliche Zentrifugation der Gewebekulturschale p.i.) wurden vier biologische Replikate (A, B, C, D) untersucht, wobei in den qPCRs aus einem biologischen Replikat jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden. Angegeben sind die in beiden qPCRs ermittelten Mittelwerte der Cq-Werte der Proben, die sich bei der Auswertung durch die Zusammenfassung der biologischen Replikate ergaben. „Mittelwert Cq-Wert CP“ steht für den Wert, der durch die qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA für die untersuchten Proben ermittelt wurde und der „Mittelwert Cq-Wert HS“ gibt den Wert wieder, der durch die qPCR zum Nachweis humaner (zellulärer) 18S rDNA denselben Proben zugeordnet wurde. Weiterhin wird der mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Proben aufgeführt.

Infektionsdosis/Vertiefung	biol. Replikate	DNA-Gehalt [ng/μl]	Mittelwert Cq-Wert CP	Mittelwert Cq-Wert HS
1,97×10 ⁴ Oocysten	A	175,83	30,63	20,59
	B	177,55		
	C	170,66		
	D	141,47		
1,97×10 ⁴ Oocysten, zent.	A	172,48	29,58	20,41
	B	201,24		
	C	220,98		
	D	171,35		
9,87×10 ⁴ Oocysten	A	119,21	29,88	22,10
	B	179,81		
	C	173,03		
	D	128,57		
9,87×10 ⁴ Oocysten, zent	A	214,62	27,32	20,51
	B	191,48		
	C	197,67		
	D	106,61		
4,94×10 ⁵ Oocysten	A	106,79	25,51	21,31
	B	141,75		
	C	133,44		
	D	59,55*		
4,94×10 ⁵ Oocysten, zent	A	120,34	24,97	20,20
	B	182,67		
	C	205,70		
	D	146,57		

*Elutionspuffer bei DNA-Isolation nicht vorerwärmt, daher geringere DNA-Ausbeute.

Tab. A5 Detaillierte Angaben zu beobachteten makroskopischen und mikroskopischen Auffälligkeiten bei der Wirkstoffüberprüfung im Vergleich zu einem unbehandelten HCT-8 Zellrasen (+++ = Präzipitat makroskopisch sichtbar, ++ = Präzipitat mikroskopisch sichtbar, + = Präzipitat mikroskopisch sichtbar, vereinzelt, - = keine Auffälligkeit bzw. unverändert).

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoffkonz. [ppm]	Präzipitat	morphologische Veränderungen des HCT-8 Zellrasens
WS 1 Isotianil	2	+	-
WS 1 Isotianil	20	++	-
WS 1 Isotianil	200	+++	Zellrasen weniger dicht
WS 2 Pyrimethanil	2	-	-
WS 2 Pyrimethanil	20	+	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert), eher netzartige als flächige Besiedelung des Bodens der Gewebekulturschale (kein konfluenter Monolayer)
WS 2 Pyrimethanil	200	++	Kein Zellrasen, eher vereinzelt adhärenente Zellen, viele abgestorbene Zellen im Kulturmedium
WS 3 Fluotrimazol	2	+	-
WS 3 Fluotrimazol	20	++	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert), eher netzartige als flächige Besiedelung des Bodens der Gewebekulturschale (kein konfluenter Monolayer)
WS 3 Fluotrimazol	200	+++	Kein Zellrasen, eher vereinzelt adhärenente Zellen, viele abgestorbene Zellen im Kulturmedium
WS 4 Halofuginon	≤0,06	-	-
WS 4 Halofuginon	0,12	-	Zellrasen konfluent, Zellgröße geringgradig erhöht
WS 4 Halofuginon	0,25	-	Zellrasen fast konfluent (punktuell kleine, freie Flächen), Zellgröße erhöht
WS 4 Halofuginon	0,5	-	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert), eher netzartige als flächige Besiedelung des Bodens der Gewebekulturschale (kein konfluenter Monolayer), Zellgröße erhöht
WS 5 Boscalid	1	-	-
WS 5 Boscalid	10	+	-
WS 5 Boscalid	200	+++	Zellrasen erscheint weniger dicht, ist morphologisch aber aufgrund der Präzipitate (große eiskristallartige Strukturen) nur eingeschränkt zu beurteilen
WS 6 Fenfuram	1, 10	-	-
WS 6 Fenfuram	200	+++	Durch Präzipitate (krümelige/kornartige Strukturen) nicht zu beurteilen
WS 7 Thiabendazol	1, 10	-	-
WS 7 Thiabendazol	200	+++	Durch Präzipitate (Strukturen erinnern an Harnkristalle) nicht zu beurteilen
WS 8 Ethionamide	1, 10	-	-
WS 8 Ethionamide	100	++	-
WS 9 Carpropamid	1	-	-
WS 9 Carpropamid	10	-	Zellveränderungen (Abrundungen) und Ablösungen aus dem Zellverband sichtbar
WS 9 Carpropamid	100	+++	Zellveränderungen (Abrundungen) und Ablösungen aus dem Zellverband sichtbar
WS 10 Spiroxamin	1, 10	-	-

WS 10 Spiroxamin	100	-	Zellrasen erscheint weniger dicht, ist morphologisch aber aufgrund der Präzipitate (Kokkenartige Strukturen) nur sehr eingeschränkt zu beurteilen
WS 11 BAY-AB24992	≤25	-	-
WS 11 BAY-AB24992	50	+	-
WS 11 BAY-AB24992	100	+++	-
WS 12 BAY-AF76184	≤6,25	+	-
WS 12 BAY-AF76184	12,5	+	Konfluenter Monolayer, gerindgradig erhöhte Zellgröße
WS 12 BAY-AF76184	25	+	Zellrasen fast konfluent (punktuell kleine, freie Flächen), Zellgröße erhöht
WS 12 BAY-AF76184	50	++	Zellrasen vernetzter als bei 100 ppm, aber noch nicht konfluent (wirkt wie von Lakunen durchsetzt), Zellgröße erhöht
WS 12 BAY-AF76184	100	++	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert), eher netzartige als flächige Besiedelung des Bodens der Gewebekulturschale (kein konfluenter Monolayer), Zellgröße erhöht
WS 13 Isoniazid	1, 10, 100	-	-
WS 14 Syringomycin E	1	-	-
WS 14 Syringomycin E	10	-	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert)
WS 14 Syringomycin E	100	-	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert)
WS 15 CRP-B-21	1	-	-
WS 15 CRP-B-21	10	-	Zellrasen weniger dicht (Zellwachstum reduziert) mit geringgradigen, flächigen Ablösungen, Zellen z.T. sehr groß
WS 15 CRP-B-21	100	-	Zellrasen nicht mehr vollständig adhärent (flächige Ablösungen)
WS 16 CRP-B-22	1	-	-
WS 16 CRP-B-22	10	-	Zellgröße z.T. erhöht, maschenartiger Zellrasen (löchrig)
WS 16 CRP-B-22	100	-	Zellrasen nicht mehr vollständig adhärent (flächige Ablösungen)
WS 17 CRP-B-23	1, 10	-	-
WS 17 CRP-B-23	100	-	Vereinzelt Zellgröße erhöht
WS 18 CRP-B-24	1	-	-
WS 18 CRP-B-24	10	-	Zellrasen weniger dicht, z.T. Zellgröße erhöht
WS 18 CRP-B-24	100	-	Monolayer seit Wirkstoffapplikation unverändert, d.h. keine Wachstumszunahme
WS 19 CRP-B-25	1	-	-
WS 19 CRP-B-25	10	+	-
WS 19 CRP-B-25	100	++	Vereinzelte Ablösungen von Zellen aus dem Zellverband
WS 20 CRP-B-26	1, 10	-	-
WS 20 CRP-B-26	100	-	Kaum Zellrasenwachstum nach Applikation des Wirkstoffs
WS 21 CRP-B-27	1, 10, 100	-	-
WS 22 CRP-B-28	1	-	-
WS 22 CRP-B-28	10	+	Zellen erscheinen kleiner und runder
WS 22 CRP-B-28	100	++	Durch Präzipitate (moosartiges Erscheinungsbild) nicht zu beurteilen
WS 23 CRP-B-29	1	-	-
WS 23 CRP-B-29	10	-	Zellrasen nicht mehr vollständig adhärent
WS 23 CRP-B-29	100	-	Kein adhärenter Zellrasen (viele kleine, runde, im Kulturmedium schwimmende

			Zellen, z.T. im Verband)
WS 24 CRP-B-30	1	-	-
WS 24 CRP-B-30	10	-	flächige Zellrasen-Ablösungen, kaum zusammenhängende Zellrasenausbildung
WS 24 CRP-B-30	100	-	Untypische Zellrasenmorphologie: Zellen sehr klein, dicht, leicht moosiges Erscheinungsbild
WS 25 CRP-B-31	1, 10	-	-
WS 25 CRP-B-31	100	-	Vereinzelt kleine, flächige Ablösungen aus Zellrasen
WS 26 CRP-B-32	1	-	-
WS 26 CRP-B-32	10	-	Vereinzelt kleine, flächige Ablösungen von zusammenhängenden, kleinen, kugeligen Zellen aus dem Zellrasen
WS 26 CRP-B-32	100	+	kaum Zellrasenwachstum seit Wirkstoffapplikation, Zellrasen erscheint z.T. wie von Lakunen durchsetzt
WS 27 CRP-B-33	1, 10	-	-
WS 27 CRP-B-33	100	-	Zellen z.T. relativ groß, kleine, flächige Ablösungen aus dem Zellrasen
WS 28 CRP-B-34	1, 10	-	-
WS 28 CRP-B-34	100	-	Zellen sind klein, versprengt, kaum vernetzt
WS 29 CRP-B-35	1, 10	-	-
WS 29 CRP-B-35	100	-	Zellrasen nur noch punktuell an Gewebekulturschale anhaftend (spinnennetzartige Verbindung zur Wachstumsfläche); beweglicher „Zellschleier“ bereits makroskopisch sichtbar
WS 30 Paromomycin	≤2141,5	-	-
WS 31 Nitazoxanid	9,21	-	Zellrasen weniger dicht, von Lakunen durchsetzt, Zellgröße erhöht

Tab. A6 Detaillierte Angaben zum Infektionsversuch mit dem Ziel der Validierung des Infektionsmodells mittels der bekannten *in vitro* Entwicklungsinhibitoren Paromomycin und Nitazoxanid; von jeder der überprüften Wirkstoffkonzentrationen als auch von der Negativkontrolle wurden zwei biologische Replikate (A, B) untersucht, wobei in den qPCRs aus einem biologischen Replikate jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden. Angegeben sind die in beiden qPCRs ermittelten Mittelwerte der Cq-Werte der Proben, die sich bei der Auswertung durch die Zusammenfassung der biologischen Replikate ergaben. „Mittelwert Cq-Wert CP“ steht für den Wert, der durch die qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA für die untersuchten Proben ermittelt wurde und der „Mittelwert Cq-Wert HS“ gibt den Wert wieder, der durch die qPCR zum Nachweis humaner (zellulärer) 18S rDNA denselben Proben zugeordnet wurde. Weiterhin wird der mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Proben aufgeführt.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoffkonz. [µM]	biol. Replikate	DNA-Gehalt [ng/µl]	Mittelwert Cq-Wert CP	Mittelwert Cq-Wert HS
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		A	63,66	27,17	17,01
		B	171,73		
Paromomycin	3000	A	60,23	30,26	17,01
		B	88,10		
Nitazoxanid	30	A	145,04	31,85	17,68
		B	136,43		

Tab. A7 Detaillierte Angaben zu dem Infektionsversuch zur Ermittlung der optimalen DMSO-Konzentration für das *C. parvum* Inhibitionsassay; von jeder der überprüften DMSO-Konzentrationen der Negativkontrollen als auch von der Positivkontrolle (Paromomycin) wurden zwei biologische Replikate (A, B) untersucht, wobei in den qPCRs aus einem biologischen Replikat jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden. Angegeben sind die in beiden qPCRs ermittelten Mittelwerte der Cq-Werte der Proben, die sich bei der Auswertung durch die Zusammenfassung der biologischen Replikate ergaben. „Mittelwert Cq-Wert CP“ steht für den Wert, der durch die qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA für die untersuchten Proben ermittelt wurde und der „Mittelwert Cq-Wert HS“ gibt den Wert wieder, der durch die qPCR zum Nachweis humaner (zellulärer) 18S rDNA denselben Proben zugeordnet wurde. Weiterhin wird der mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Proben aufgeführt.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [µM]	biol. Replikate	DNA-Gehalt [ng/µl]	Mittelwert Cq-Wert CP	Mittelwert Cq-Wert HS
Negativkontrolle, 0,0 % DMSO		A B	91,99 81,52	32,91	21,06
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A B	92,09 134,81	33,05	20,92
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		A B	76,73 91,26	34,01	20,74
Positivkontrolle Paromomycin	3000	A B	105,05 90,99	37,97	20,88

Tab. A8 Detaillierte Angaben zu den im 96-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffen; von jeder der überprüften Wirkstoffkonzentrationen, sowie der Negativ- und Positivkontrollen wurden ein bis vier biologische Replikate (A, B, C, D) untersucht, wobei in den qPCRs aus einem biologischen Replikat jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden. Angegeben sind die in beiden qPCRs ermittelten Mittelwerte der Cq-Werte der Proben, die sich bei der Auswertung durch die Zusammenfassung der biologischen Replikate ergaben. „Mittelwert Cq-Wert CP“ steht für den Wert, der durch die qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA für die untersuchten Proben ermittelt wurde und der „Mittelwert Cq-Wert HS“ gibt den Wert wieder, der durch die qPCR zum Nachweis humaner (zellulärer) 18S rDNA denselben Proben zugeordnet wurde (N/A= Probe nicht auswertbar). Weiterhin wird der mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Proben aufgeführt. Die Form der Auflistung ist analog den Tabellen im Ergebnisteil, d.h. für jeden durchgeführten Infektionsversuch sind die dazugehörigen Negativ- und Positivkontrollen gemeinsam mit den in diesem Lauf überprüften Wirkstoffen in einem Block (dickere Umrahmung) dargestellt.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [ppm]	biol. Replikate	DNA-Gehalt [ng/µl]	Mittelwert Cq-Wert CP	Mittelwert Cq-Wert HS
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		A B	29,73 28,79	29,41	22,20
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A B	23,53 31,87	31,92	22,43
Positivkontrolle Nitazoxanid	9,21	A B	10,32 10,76	32,07	24,85
WS 1 Isotianil	2	A B	31,84 36,86	29,40	21,96
WS 1 Isotianil	20	A	32,20	29,15	21,84

		B	32,66		
WS 1 Isotianil	200	A	18,42	29,88	21,95
		B	21,98		
WS 2 Pyrimethanil	2	A	33,27	29,28	22,05
WS 2 Pyrimethanil	20	A	31,59	29,01	21,79
		B	37,91		
WS 2 Pyrimethanil	200	A	2,55	31,19	24,95
		B	1,43		
WS 3 Fluotrimazol	2	A	25,19	29,62	22,73
		B	30,61		
WS 3 Fluotrimazol	20	A	16,36	30,41	23,39
		B	16,36		
WS 3 Fluotrimazol	200	A	17,82	29,65	23,21
		B	18,19		
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		A	58,36	34,93	22,76
		B	45,98		
		C	63,65		
		D	59,51		
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A	25,12	38,48	22,74
		B	24,09		
Positivkontrolle Nitazoxanid	9,21	A	16,02	N/A	24,27
WS 5 Boscalid	1	A	46,80	36,67	23,34
		B	46,78		
WS 5 Boscalid	10	A	42,29	37,18	22,90
		B	41,17		
WS 5 Boscalid	200	A	18,61	38,49	23,94
		B	23,36		
WS 6 Fenfuram	1	A	52,54	34,01	22,35
		B	54,93		
WS 6 Fenfuram	10	A	46,82	37,38	22,24
		B	51,53		
WS 6 Fenfuram	200	A	13,55	38,01	23,99
		B	16,73		
WS 7 Thiabendazol	1	A	21,84	34,88	23,44
		B	41,88		
WS 7 Thiabendazol	10	A	39,80	36,85	23,54
		B	40,67		
WS 7 Thiabendazol	200	A	16,45	37,78	24,64
		B	20,61		
Negativkontrolle, 1,0 % DMSO		A	76,73	34,01	20,74
		B	91,26		
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A	92,09	33,05	20,92
		B	134,81		
Negativkontrolle, 0,0 % DMSO		A	91,99	32,91	21,06
		B	81,52		
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A	105,05	37,97	20,88
		B	90,99		
WS 8 Ethionamide	1	A	97,27	34,41	20,97
		B	89,29		
WS 8 Ethionamide	10	A	98,97	33,98	21,23
		B	102,63		
WS 8 Ethionamide	100	A	48,64	36,87	22,04
		B	65,39		
WS 9 Carpropamid	1	A	75,23	34,85	21,03
		B	77,42		
WS 9 Carpropamid	10	A	56,70	38,68	21,75
		B	64,20		
WS 9 Carpropamid	100	A	25,06	37,60	22,39
		B	29,54		

WS 10 Spiroxamin	10	A B	49,87 61,94	34,18	21,19
WS 10 Spiroxamin	100	A B	1,59 2,34	38,95	24,11

Tab. A9 Detaillierte Angaben zu der in Abbildung 4.3.3.1 graphisch dargestellten, exemplarischen Standardkurve der cryptosporidialen Zielsequenz (18S rDNA), sowie zu der abgebildeten Negativkontrolle und der Kontrolle ohne Template (NTC); angegeben ist die jeweilige Anzahl der in der qPCR ausgewerteten Replikate der einzelnen Proben, deren mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt (sofern verfügbar) sowie die anhand der qPCR ermittelten Cq-Werte inklusive deren Standardabweichung (SD). Abbildung 4.3.3.2 basiert auf denselben Daten.

Probe	Replikate	DNA-Gehalt [ng/μl]	Cq-Wert	Cq-Wert SD
Standard, 10 ¹ Kopien	2	-	37,54 37,88	0,24
Standard, 10 ² Kopien	2	-	34,58 34,91	0,23
Standard, 10 ³ Kopien	2	-	30,76 30,99	0,16
Standard, 10 ⁴ Kopien	2	-	26,86 26,97	0,08
Standard, 10 ⁵ Kopien	2	-	23,12 23,27	0,11
Standard, 10 ⁶ Kopien	2	-	19,49 19,60	0,08
Kontrolle ohne Template	1	-	0,00	-
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO	2	193,01	25,02 24,71	0,22

Tab. A10 Detaillierte Angaben zu den im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffen; von jeder der überprüften Wirkstoffkonzentrationen, sowie der Negativ- und Positivkontrollen wurden zwei bis vier biologische Replikate (A, B, C, D) untersucht, wobei in den qPCRs aus einem biologischen Replikat jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden. Angegeben sind die in beiden qPCRs ermittelten Mittelwerte der Cq-Werte der Proben, die sich bei der Auswertung durch die Zusammenfassung der biologischen Replikate ergaben. „Mittelwert Cq-Wert CP“ steht für den Wert, der durch die qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA für die untersuchten Proben ermittelt wurde und der „Mittelwert Cq-Wert HS“ gibt den Wert wieder, der durch die qPCR zum Nachweis humaner (zellulärer) 18S rDNA denselben Proben zugeordnet wurde. Weiterhin wird der mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Proben aufgeführt. Die Form der Auflistung ist analog den Tabellen im Ergebnisteil, d.h. für jeden durchgeführten Infektionsversuch sind die dazugehörigen Negativ- und Positivkontrollen gemeinsam mit den in diesem Lauf überprüften Wirkstoffen in einem Block (dickere Umrahmung) dargestellt.

Der Vollständigkeit halber sind auch die isolierten Proben aufgelistet, die aufgrund einer DNA-Konzentration von ≤ 40 ng/ μ l nicht quantitativ ausgewertet wurden (NA= nicht ausgewertet). Konnte bei Vorhandensein mehrerer biologischer Replikate ein Replikat aufgrund eines zu geringen DNA-Gehaltes nicht ausgewertet werden, so ist sowohl die Bezeichnung (A, B, C oder D) als auch der dazugehörige DNA-Gehalt in Klammern gesetzt.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoff-konz. [ppm]	biol. Replikate	DNA-Gehalt [ng/ μ l]	Mittelwert Cq-Wert CP	Mittelwert Cq-Wert HS
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A	98,31	28,70	21,15
		B	78,87		
		C	79,26		
		D	69,20		
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A	78,82	30,86	20,88
		B	66,99		
WS 13 Isoniazid	1	A	93,84	28,94	20,92
		B	88,92		
WS 13 Isoniazid	10	A	90,79	29,65	20,78
		B	73,53		
WS 13 Isoniazid	100	A	130,08	28,63	20,94
		B	82,77		
WS 14 Syringomycin E	1	A	75,71	29,63	21,27
		B	67,87		
WS 14 Syringomycin E	10	A	51,77	30,53	19,89
		B	75,07		
WS 14 Syringomycin E	100	A	10,63	NA	NA
		B	9,12		
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A	166,74	27,58	20,84
		B	146,54		
		C	153,24		
		D	159,27		
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A	129,35	31,85	21,59
		B	130,82		
WS 16 CRP-B-22	1	A	177,14	29,24	20,48
WS 16 CRP-B-22	10	A	77,31	30,80	22,10
		B	79,75		
WS 16 CRP-B-22	100	A	20,73	NA	NA
		B	21,54		
WS 17 CRP-B-23	1	A	195,56	30,36	21,63

		(B)	(19,75)		
WS 17 CRP-B-23	10	A B	139,76 140,77	29,95	20,89
WS 17 CRP-B-23	100	A B	93,21 133,83	29,99	21,86
WS 18 CRP-B-24	1	A B	148,45 201,23	27,70	20,82
WS 18 CRP-B-24	10	A (B)	110,41 (3,12)	29,11	21,09
WS 18 CRP-B-24	100	(A) B	(17,98) 97,83	34,82	23,02
WS 19 CRP-B-25	1	A B	128,55 88,71	28,93	21,97
WS 19 CRP-B-25	10	A B	97,38 108,90	28,93	20,91
WS 19 CRP-B-25	100	A B	75,17 82,48	29,51	21,14
WS 20 CRP-B-26	1	A B	152,78 167,34	27,49	21,00
WS 20 CRP-B-26	10	A B	91,38 97,59	28,98	21,46
WS 20 CRP-B-26	100	A B	14,33 14,52	NA	NA
WS 21 CRP-B-27	1	A B	138,93 157,62	27,28	21,05
WS 21 CRP-B-27	10	A B	106,67 134,01	27,86	21,89
WS 21 CRP-B-27	100	A B	78,86 77,75	29,36	22,22
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A B C	173,82 166,38 197,44	26,45	20,01
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A B	143,57 128,82	30,54	20,67
WS 15 CRP-B-21	1	A B	179,00 164,89	28,59	20,33
WS 15 CRP-B-21	10	A B	51,91 46,83	33,01	21,29
WS 15 CRP-B-21	100	A B	21,84 21,84	NA	NA
WS 22 CRP-B-28	1	A B	140,83 169,30	27,47	20,32
WS 22 CRP-B-28	10	A B	79,37 98,89	29,30	21,26
WS 22 CRP-B-28	100	A B	15,69 18,78	NA	NA
WS 23 CRP-B-29	1	A B	172,67 154,03	26,78	20,21
WS 23 CRP-B-29	10	A B	2,95 2,76	NA	NA
WS 23 CRP-B-29	100	A B	18,45 21,04	NA	NA
WS 24 CRP-B-30	1	A B	128,36 97,80	27,65	20,77
WS 24 CRP-B-30	10	A B	14,70 16,18	NA	NA
WS 24 CRP-B-30	100	A B	21,42 16,86	NA	NA
WS 25 CRP-B-31	1	A B	185,73 181,01	26,51	20,05

WS 25 CRP-B-31	10	A B	169,04 149,62	26,82	20,41
WS 25 CRP-B-31	100	A B	131,84 136,14	26,67	20,52
WS 26 CRP-B-32	1	A B	163,99 150,70	26,18	20,68
WS 26 CRP-B-32	10	A B	95,91 86,62	28,53	20,34
WS 26 CRP-B-32	100	A B	27,94 23,48	NA	NA
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A B C	230,39 202,00 193,59	28,63	19,67
Positivkontrolle Paromomycin	2141,5	A B	185,79 173,80	32,58	19,32
WS 27 CRP-B-33	1	A B	178,37 186,22	31,73	20,28
WS 27 CRP-B-33	10	A B	165,15 157,83	31,02	20,36
WS 27 CRP-B-33	100	A B	50,75 45,48	35,90	21,79
WS 28 CRP-B-34	1	A B	165,61 156,83	31,24	20,47
WS 28 CRP-B-34	10	A B	95,50 74,43	32,91	20,81
WS 28 CRP-B-34	100	A B	17,91 16,55	NA	NA
WS 29 CRP-B-35	1	A B	171,13 193,91	29,27	20,10
WS 29 CRP-B-35	10	A B	95,28 109,23	32,95	20,42
WS 29 CRP-B-35	100	A B	17,29 17,96	NA	NA

Tab. A11 Detaillierte Angaben zu den im 48-Loch Gewebekulturschalen-Format überprüften Wirkstoffen BAY-AF76184, BAY-AB24992, Halofuginonhydrobromid (Halofuginon) und Paromomycin (Positivkontrolle); von jeder der überprüften Wirkstoffkonzentrationen, sowie der Negativ- und Positivkontrollen wurden zwei bis vier biologische Replikate (A, B, C, D) untersucht, wobei in den qPCRs aus einem biologischen Replikat jeweils zwei technische Replikate hergestellt wurden. Angegeben sind die in beiden qPCRs ermittelten Mittelwerte der Cq-Werte der Proben, die sich bei der Auswertung durch die Zusammenfassung der biologischen Replikate ergaben. „Mittelwert Cq-Wert CP“ steht für den Wert, der durch die qPCR zum Nachweis cryptosporidialer 18S rDNA für die untersuchten Proben ermittelt wurde und der „Mittelwert Cq-Wert HS“ gibt den Wert wieder, der durch die qPCR zum Nachweis humaner (zellulärer) 18S rDNA denselben Proben zugeordnet wurde. Die Überprüfung der genannten Wirkstoffe erfolgte in mehreren Infektionsversuchen, die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Für jeden durchgeführten Infektionsversuch sind die dazugehörigen Negativ- und Positivkontrollen gemeinsam mit den in diesem Lauf überprüften Wirkstoffen in einem Block (dickere Umrahmung) dargestellt. Weiterhin wird der mittels des Synergy 4 photometrisch bestimmte DNA-Gehalt der Proben aufgeführt.

überprüfter Wirkstoff	Wirkstoffkonz. [μM]	biol. Replikate	DNA-Gehalt [$\text{ng}/\mu\text{l}$]	Mittelwert Cq-Wert CP	Mittelwert Cq-Wert HS
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A B C D	195,15 148,37 137,64 188,14	23,36	19,68
Positivkontrolle Paromomycin	3000	A B	188,47 197,10	29,12	19,87
WS 4 Halofuginon	0,01	A B	119,99 144,18	24,73	20,05
WS 4 Halofuginon	0,02	A B	143,80 153,42	23,61	19,60
WS 4 Halofuginon	0,03	A B	115,03 131,46	23,26	20,02
WS 4 Halofuginon	0,06	A B	133,74 152,80	22,92	19,35
WS 4 Halofuginon	0,13	A B	99,18 120,41	24,03	20,04
WS 4 Halofuginon	0,25	A B	99,07 84,08	26,42	20,53
WS 4 Halofuginon	0,5	A B	82,40 66,58	28,16	20,75
WS 4 Halofuginon	1	A B	35,69 34,44	30,75	21,59
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A B C D	195,15 148,37 137,64 188,14	23,37	19,80
Positivkontrolle Paromomycin	3000	A B	188,47 197,10	29,41	20,03
WS 11 BAY-AB24992	2,02	A B	198,07 213,40	25,45	19,83
WS 11 BAY-AB24992	4,05	A B	162,27 200,99	24,76	19,96
WS 11 BAY-AB24992	8,10	A B	146,70 201,89	24,27	19,90
WS 11 BAY-AB24992	16,19	A B	138,67 192,97	24,75	19,88

WS 11 BAY-AB24992	32,38	A B	117,41 171,66	26,09	20,42
WS 11 BAY-AB24992	64,76	A B	84,43 130,22	27,24	20,49
WS 11 BAY-AB24992	129,53	A B	58,29 109,36	27,64	21,31
WS 11 BAY-AB24992	259,05	A B	66,49 89,32	28,74	21,48
WS 12 BAY-AF76184	2,23	A B	143,45 147,63	24,81	20,29
WS 12 BAY-AF76184	4,46	A B	99,59 100,52	26,56	20,44
WS 12 BAY-AF76184	8,93	A B	55,66 54,62	29,22	21,12
WS 12 BAY-AF76184	17,86	A B	47,00 48,76	28,22	21,62
WS 12 BAY-AF76184	35,71	A B	44,78 43,78	28,48	21,61
WS 12 BAY-AF76184	71,43	A B	44,67 33,37	30,26	21,58
WS 12 BAY-AF76184	142,85	A B	32,66 38,43	30,72	21,60
WS 12 BAY-AF76184	285,7	A B	25,22 21,00	32,28	22,38
Negativkontrolle, 0,5 % DMSO		A B C D	147,82 137,55 128,83 109,31	22,06	19,58
WS 30 Paromomycin	23,44	A B	229,00 227,48	24,40	19,89
WS 30 Paromomycin	46,88	A B	134,48 144,15	23,44	19,94
WS 30 Paromomycin	93,75	A B	145,06 147,37	23,48	19,65
WS 30 Paromomycin	187,5	A B	150,49 96,35	24,39	20,07
WS 30 Paromomycin	375	A B	154,05 158,92	24,73	20,04
WS 30 Paromomycin	750	A B	148,66 159,64	25,51	19,88
WS 30 Paromomycin	1500	A B	213,13 151,29	26,31	20,08
WS 30 Paromomycin	3000	A B	152,45 172,62	27,09	20,14

11 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits im Vorfeld auf Tagungen (in Form eines Vortrags und eines Posters) bzw. in einem Artikel veröffentlicht.

Wissenschaftlicher Vortrag

2. bis 4. Juli 2012

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Hannover, Deutschland. S. 36.

Schupfner, M., Krücken, J., Greif, G., von Samson-Himmelstjerna, G.

„Evaluierung potentieller Wirkstoffe gegen *Cryptosporidium parvum* in einem Zellkultur basierten Testverfahren“

Posterpräsentation

25. bis 29. August 2013

The 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Perth, Australien. S. 563.

Schupfner, M., Greif, G., Lendner, M., Dauschies, A., Lippuner, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J.

„Evaluation of putative anti-cryptosporidial drugs in an *in vitro* culture system“

Artikel

Schupfner, M., Greif, G., Lendner, M., Dauschies, A., Lippuner, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J., 2013. Evaluation of putative anti-cryptosporidial drugs in an *in vitro* culture system. Parasitology Research 112 Suppl 1, 149-162.

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna für die Überlassung des interessanten Themas, seine fachliche Betreuung und die stets hilfreiche und freundliche Unterstützung sowie für die kritische Korrektur meines Manuskriptes.

Darüber hinaus danke ich herzlich Herrn PD. Dr. Jürgen Krücken für seine kompetente, engagierte und motivierende Unterstützung in allen Phasen des Projektes, die Anregungen und kritischen Rückmeldungen, ein stets offenes Ohr und nicht zu vergessen für die ausführliche Einweisung in die Arbeit im Zellkulturlabor.

Außerdem möchte ich der Bayer Animal Health GmbH für das Interesse an dem von mir bearbeiteten Projekt, die freundliche Bereitstellung eines Großteils der ausgetesteten Wirkstoffe, sowie die finanzielle Förderung danken.

Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Gisela Greif.

Ich danke auch Herrn Dr. Christoph Lippuner sowie Herrn Dr. Matthias Lendner für die freundliche Überlassung der Oocysten, die an Ihren Instituten passagiert und aufgereinigt wurden.

Frau PD. Dr. Kerstin Borchers und Herrn Prof. Dr. Karl-Hans Zessin danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Und ich möchte den Paradoxs danken, die ich hier nur der Form halber mit „c“ schreibe.
Ein gutes und kollegiales Arbeitsklima ist wünschenswert - unseres war großartig.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir wie immer, so auch während dieser Zeit, eine große Stütze waren, indem sie mich aufgemuntert, motiviert, ertragen, abgelenkt und einfach in jeder Hinsicht bereichert haben.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen einfach für alles!

13 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, 19.03.2014

Maja Schupfner