

***In vivo* und *in vitro* Untersuchungen**
zur Immunantwort und Parasitenentwicklung
bei Infektionen mit dem Darmparasiten
Cryptosporidium parvum

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vera Jakobi

geboren am 9.10.1975

in Groß-Gerau

Mainz 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Erreger <i>Cryptosporidium parvum</i>	1
1.1.1	Zur Geschichte des Erregers	1
1.1.2	Taxonomie und Wirtsspektrum	2
1.1.3	Entwicklungszyklus und Wirtszellspezifität	4
1.1.4	Epidemiologie	8
1.1.5	Transmission	10
1.2	Die Erkrankung Kryptosporidiose	12
1.2.1	Klinische Manifestation und Pathophysiologie	12
1.2.2	Diagnostik einer Kryptosporidien-Infektion	13
1.2.3	Serologie	13
1.2.4	Therapieansätze	14
1.2.5	Immunisierungsstrategien gegen Kryptosporidiose	16
1.3	Immunologie der Kryptosporidiose	18
1.3.1	Zelluläre Immunantwort	19
1.3.2	T _H 1-Zytokine	20
1.3.3	T _H 2-Zytokine	21
1.3.4	Parasiten-spezifische Antikörper	22
1.4	Sporozoitenproteine	23
1.5	<i>In vitro</i> Kultivierung von <i>C. parvum</i>	28
1.6	Zielsetzung der Arbeit	29
2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Parasiten	32
2.1.2	Bakterienstämme	32
2.1.3	Zelllinien	32
2.1.4	Tiere	33

2.1.5	Plasmide zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i>	33
2.1.6	Primer	34
2.1.7	DNA-Längenstandards	37
2.1.8	Protein-Molekulargewichtsmarker	37
2.1.9	Antikörper	37
2.1.10	Enzyme	38
2.1.11	Antibiotika und Antimykotika	39
2.1.12	Proteaseinhibitoren	39
2.1.13	Reagenzien und Chemikalien	39
2.1.14	Medien	41
2.1.15	Puffer und Lösungen	43
2.1.16	Geräte, Glas- und Kunststoffartikel	48
2.2	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	49
2.2.1.1	Klonierung der Sporozoit-Oberflächenproteine P23 und CP17	49
2.2.1.2	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischen Nukleinsäuren und cDNA verschiedener Maus-Zytokine	50
2.2.2	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	51
2.2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA	51
2.2.2.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von RNA	51
2.2.3	Enzymatische Modifikation von DNA	52
2.2.3.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
2.2.3.2	Dephosphorylierung von DNA	52
2.2.3.3	Ligation	52
2.2.4	Transformation von Bakterien	53
2.2.5	Reinigung von Nukleinsäuren	54
2.2.5.1	Reinigung von PCR-Produkten	54
2.2.5.2	Elution von DNA aus Agarosegelen	54
2.2.5.3	Präparation von Plasmid-DNA	54
2.2.5.4	Präparation von genomischer DNA	55
2.2.5.5	Präparation von Gesamt-RNA	55
2.2.6	cDNA-Synthese	56
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	56

2.2.8	DNA-Sequenzierung	56
2.3	Zellbiologische Methoden	57
2.3.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	57
2.3.1.1	Kultur von <i>E. coli</i> -Stämmen	57
2.3.1.2	Kultivierung von Säugetierzellen	57
2.3.2	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	58
2.3.3	<i>In vitro</i> Kultursystem von <i>C. parvum</i>	59
2.3.4	<i>In vitro</i> Exzystierung von <i>C. parvum</i>	59
2.4	Proteinchemische Methoden	60
2.4.1	Antigenpräparation aus <i>C. parvum</i> -Oozysten (Parasitenlysat)	60
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	60
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
2.4.4	Westernblot	62
2.4.4.1	Nachweis von Parasitenlysat-, P23- und CP17-reaktiven Antikörpern	62
2.4.5	ELISA	63
2.4.5.1	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischen Antikörpern	63
2.4.5.2	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischen Antikörpern in Seren und Vaginalspülungen infizierter bzw. immunisierter Mäuse	64
2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenz	65
2.4.6.1	Nachweis von intrazellulären Parasitenstadien	65
2.4.6.2	Quantitative Bestimmung der Oozystenausscheidung in Stühlen infizierter Mäuse	66
2.4.6.3	Nachweis von Oozysten- bzw. Sporozoiten-Antigenen von <i>C. parvum</i>	66
2.4.7	Modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung	67
2.4.8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	67
2.4.9	Proteinchemische Reinigungen von rekombinanten <i>C. parvum</i> -Proteinen	68
2.4.9.1	Herstellung von <i>E. coli</i> -Zelllysat	68
2.4.9.2	Proteinchemische Reinigung durch FPLC	68
2.5	Tierexperimente	70
2.5.1	Infektion von Mäusen mit <i>C. parvum</i>	70
2.5.2	Immunisierungen	70
2.5.2.1	Protein-Immunisierung von Mäusen	70

2.5.2.2	Herstellung von polyklonalem Antiserum in Kaninchen	71
2.5.3	Probengewinnung und -aufbereitung	72
2.5.3.1	Serum von Kaninchen und Mäusen	72
2.5.3.2	Stuhlproben von Mäusen	72
2.5.3.3	Vaginalspülungen bei Mäusen	73
2.5.3.4	Präparation von Ileum und Ileummukosa von Mäusen	73
2.5.3.5	Herstellung von Paraffinschnitten von Mäuse-Ileum	73
2.6	Statistik	75
3	Ergebnisse	76
3.1	Infektion von IFN-γ- und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit <i>Cryptosporidium parvum</i>	76
3.1.1	Infektion und Quantifizierung der Parasitenausscheidung	77
3.1.1.1	Parasitenausscheidung nach Infektion	78
3.1.1.2	Parasitenausscheidung nach Reinfektion	80
3.1.2	Histologischer Nachweis einer Infektion im Ileum	84
3.1.3	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischen Nukleinsäuren im Ileum	85
3.1.3.1	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischer genomischer DNA	86
3.1.3.2	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischer RNA	87
3.1.4	Charakterisierung der Antikörperantwort	89
3.1.4.1	Nachweis von Parasitenlysat-reaktiven Serum-Antikörpern im ELISA	90
3.1.4.2	Nachweis von P23- und CP17-reaktiven Serum-Antikörpern im ELISA	94
3.1.4.3	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischen Serum-Antikörpern im Westernblot	100
3.1.4.4	Nachweis von Parasitenlysat-reaktivem IgA in Vaginalspülungen im ELISA	107
3.1.5	Nachweis der mRNA verschiedener Maus-Zytokine im Ileum nach einer Infektion	109
3.2	Immunisierung von IFN-γ- und IL-12 p40-Knockout-Mäusen	113
3.2.1	Intranasale und intraperitoneale Immunisierung mit Parasitenlysat ohne Adjuvans	114
3.2.1.1	Immunisierung	115
3.2.1.2	Infektion der immunisierten Knockout-Mäuse mit <i>C. parvum</i> -Oozysten	117
3.2.2	Intranasale und subkutane Immunisierung mit Parasitenlysat und AbISCO	

	als Adjuvans	124
3.2.2.1	Immunisierung	125
3.2.2.2	Infektion der immunisierten Mäuse mit <i>C. parvum</i> -Oozysten	127
3.2.2.3	Reinfektion der immunisierten Knockout-Mäuse mit <i>C. parvum</i> -Oozysten	134
3.3	<i>In vitro</i> Kultivierung von <i>C. parvum</i> in HCT-8-Zellen	135
3.3.1	Infektion von HCT-8-Zellen mit <i>C. parvum</i> -Oozysten	136
3.3.2	Nachweis von intrazellulären Stadien durch indirekte Immunfluoreszenz	137
3.3.3	Nachweis von <i>C. parvum</i> -spezifischer genomischer DNA	142
3.3.4	Untersuchung zur differentiellen Expression von <i>C. parvum</i> -Genen in infizierten HCT-8-Zellen	143
4	Diskussion	147
4.1	Infektion von IFN-γ- und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit <i>Cryptosporidium parvum</i>	147
4.1.1	Infektionsverlauf nach Infektion	148
4.1.2	Antikörperantwort nach Infektion	155
4.1.2.1	Parasitenlysat-spezifische Antikörper	155
4.1.2.2	Spezifische Antikörper gegen P23 und CP17	158
4.1.3	Infektionsverlauf nach Reinfektion	160
4.1.4	Schlussfolgerung und Ausblick	162
4.2	Immunisierung von IFN-γ- und IL-12 p40-Knockout-Mäusen	165
4.2.1	Intranasale Immunisierungen	166
4.2.2	Intraperitoneale und subkutane Immunisierungen	169
4.2.3	Schlussfolgerung und Ausblick	171
4.3	<i>In vitro</i> Kultivierung von <i>C. parvum</i> in HCT-8-Zellen	172
4.3.1	Intrazelluläre Entwicklung von <i>C. parvum</i> in infizierten HCT-8-Zellen	172
4.3.2	Differentielle Expression von <i>C. parvum</i> -Genen in infizierten HCT-8-Zellen	175
4.3.3	Schlussfolgerung und Ausblick	179
5	Zusammenfassung	181
6	Literaturverzeichnis	184

Anhang **202**

Publikationen und Tagungsbeiträge **204**

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
C-terminal	carboxyterminal
Da	Molekulargewicht in Dalton
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
FPLC	fast protein liquid chromatography
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GKO	IFN- γ -Knockout-Maus
GRO- α	growth related oncogene alpha
GST	Glutathion-S-Transferase
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	human immunodeficiency virus
ID ₅₀	Infektionsdosis, bei der 50 % der Exponierten infiziert werden
IFN- γ	Interferon-gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL12KO	IL-12 p40-Knockout-Maus
ISCOM	immunostimulating complex
K	elektrische Leitfähigkeit
kb	Kilobasen
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
mS	Milli-Siemens
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte

PCR	polymerase chain reaction
p.i.	<i>post infectionem</i>
POX	Peroxidase
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rb	rabbit
SCID	severe combined immune deficiency
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
spp.	species
TGF- β	transforming growth factor-beta
T _H	T-Helfer
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight

1 Einleitung

1.1 Der Erreger *Cryptosporidium parvum*

1.1.1 Zur Geschichte des Erregers

1907 entdeckte der amerikanische Parasitologe Ernest Edward Tyzzer (1875-1965) einen Parasiten in der Magenschleimhaut von Labormäusen (*Cryptosporidium muris*), dessen Entwicklungsstadien Ähnlichkeiten zu anderen, damals bekannten Kokzidienarten aufwiesen (Tyzzer, 1907). Aufgrund des Fehlens einer die Sporozoitin umhüllenden Sporozyste innerhalb der Oozyste, schlug er für diese neue Gattung den Namen '*Cryptosporidium*' (= verborgene Sporozyste) vor. Tyzzer beschrieb bereits damals erstaunlich genau die asexuellen und sexuellen Stadien (Sporozoitin, Schizonten, Merozoitien, Mikrogametozyten, Makrogametozyten und 'Sporen' = Oozysten). Seine Darstellung des Entwicklungszyklus wurde bis auf die Tatsache, dass es sich um intrazelluläre Entwicklungsstadien handelt, durch Elektronenmikroskopie bestätigt und hat heute noch Gültigkeit. 1912 beschrieb Tyzzer die Morphologie und den Entwicklungszyklus einer zweiten Spezies, *Cryptosporidium parvum*, die sich von *C. muris* durch ihre Entwicklung im Dünndarmepithel und kleinere Oozysten unterscheidet (Tyzzer, 1912).

In den darauf folgenden Jahrzehnten wurde diesen Protozoen kaum Beachtung geschenkt, da man ihnen weder eine veterinär- noch humanmedizinische Relevanz zusprach. Erst 1955 wurde die Kryptosporidiose mit Morbidität und Mortalität in Verbindung gebracht. Slavin berichtete von schweren Diarrhöen bei Truthähnen, die in einigen Fällen zum Tod führten, und beschrieb als infektiöses Agens eine neue Spezies, *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin, 1955). *C. parvum* erreichte in der Veterinärmedizin erst 1971 Aufmerksamkeit, als zum ersten Mal von einer Verbindung zu Diarrhöen bei Rindern berichtet wurde (Panciera et al., 1971). Seitdem häuften sich die Berichte über Kryptosporidiosen bei verschiedenen Tierarten und *C. parvum* wurde als eine wichtige Ursache von neonataler Diarrhöe bei Kälbern und Lämmern erkannt.

Die ersten beiden Fälle einer humanen Kryptosporidiose wurden 1976 beschrieben (Meisel et al., 1976; Nime et al., 1976). Bis 1982 folgten jedoch nur wenige Beschreibungen weiterer Fälle beim Menschen. Durch das vermehrte Auftreten von HIV-Infektionen gab es

Anfang der achtziger Jahre erste Berichte, die *C. parvum* mit AIDS in Verbindung brachten (Ma & Soave, 1983). *C. parvum* gilt derzeit als einer der lebensbedrohenden, opportunistischen Erreger bei AIDS- und immunkompromittierten Patienten. Im gleichen Zeitraum erschienen Publikationen, die von *C. parvum* auch als weit verbreitete Ursache für akute Diarrhöen bei Erwachsenen (Current et al., 1983; Jokipii et al., 1983) und Kindern (Tzipori et al., 1983; Heidl et al., 1986) berichteten. Seitdem wurde eine große Anzahl von Fallbeschreibungen und Prävalenzstudien veröffentlicht.

Cryptosporidium parvum gilt heute neben *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* und *Entamoeba histolytica sens. stric.* als einer der wichtigsten parasitären Enteritiserreger in der Humanmedizin.

1.1.2 Taxonomie und Wirtsspektrum

Die Mitglieder der Gattung *Cryptosporidium* zählen als intrazelluläre, protozoische Parasiten zu dem Phylum Apikomplexa (früher Sporozoa). Das namensgebende Merkmal dieses Phylums ist ein Komplex von Organellen am apikalen Pol der extrazellulären, invasiven Zystenstadien (Apikalkomplex).

Die weitere Klassifizierung der Apikomplexa wird in der Literatur zurzeit noch sehr stark diskutiert und deshalb unterschiedlich vollzogen. Die im Folgenden beschriebene Taxonomie entspricht der von Fayer et al. (1997). *Cryptosporidium* spp. wird hier der Klasse der Coccidea zugeordnet, die sich durch das Auftreten von Dauerstadien (Oozysten), welche die aus einer Sporulation resultierenden Sporozoiten beherbergen, durch sexuelle und asexuelle Reproduktion und die Fortbewegung durch Biegen („flexing“), Gleiten („gliding“) und Undulation auszeichnet. Die Ordnung der Eucoccidiorida weist eine asexuelle Schizogonie (Merogonie) auf und infiziert sowohl Invertebraten als auch Vertebraten. Zu den Eucoccidiorida zählen neben *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Isospora* spp. und *Sarcocystis* spp. auch die humanpathogenen Erreger der Malaria (*Plasmodium* spp.) und der Toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*). Die Familie der Cryptosporidiidae ist vor allem durch das Fehlen einer die Sporozoiten umhüllenden Sporozyste innerhalb der Oozysten gekennzeichnet.

Da sich die Kryptosporidien von anderen Arten der Coccidea jedoch durch eine recht große Anzahl an Eigenheiten unterscheiden (Petry, 2004), gibt es mittlerweile Bestrebungen, sie im Phylum Apikomplexa taxonomisch an anderer Stelle anzusiedeln

(Carreno et al., 1999; Tenter et al., 2002). So entwickeln sie sich zwar intrazellulär aber extrazytoplasmatisch, bilden zwei verschiedene Typen von Oozysten (dünn- und dickwandig) aus, die per se eine abweichende Größe und Morphologie besitzen und von denen die Dünnwandigen die Fähigkeit zur Autoinfektion aufweisen, und sie zeigen eine Unempfindlichkeit gegenüber den meisten bisher getesteten anticoccidialen Agenzien.

Auch die Taxonomie innerhalb der Gattung *Cryptosporidium* ist derzeit noch weit davon entfernt, festgelegt zu sein, da die Zuordnung der bisher beschriebenen Kryptosporidien-Isolate auf Spezies-Ebene schwierig ist. Xiao et al. (2004) beschreiben insgesamt 13 gültige Arten mit sehr verschiedenen Wirtsspektren, wovon alleine sieben bei Säugetieren gefunden werden können. *C. parvum* infiziert hauptsächlich Rinder, Schafe, Ziegen und den Menschen, aber auch Wild, Mäuse und Schweine. *C. hominis* besitzt als Hauptwirt den Menschen, wurde mittlerweile jedoch auch in Affen, Seekühen und Schafen detektiert. *C. muris* infiziert Nagetiere und eine limitierte Anzahl anderer Säugetierspezies. *C. andersoni* findet man bei Rindern, *C. felis* bei Katzen, *C. canis* bei Hunden und *C. wrairi* wurde aus Meerschweinchen isoliert. *C. meleagridis*, *C. baileyi* und *C. galli* infizieren Vögel, *C. molnari* Fische und *C. serpentis* und *C. saurophilum* Reptilien. Erst kürzlich wurde eine neue Art bei Schweinen, *C. suis*, beschrieben (Ryan et al., 2004). Für eine Vielzahl weiterer *Cryptosporidium*-Isolate und -Genotypen ist die Zugehörigkeit zu einer eigenen Spezies bisher noch ungeklärt.

Die meisten Kryptosporidien-Isolate können nicht nur bei ihren Hauptwirten, sondern zusätzlich noch bei einer Vielzahl untergeordneter Wirte nachgewiesen werden. Eine Einteilung aufgrund ihrer Wirtsspezifität ist daher in den meisten Fällen schwierig. Weitere Kriterien zur Unterscheidung liefern die Morphologie der Oozysten, die Infektiosität, Abweichungen im Entwicklungszyklus, der Infektionsort, die Antigenität und biochemische Unterschiede. Der verstärkte Einsatz molekularer Techniken zur Typisierung von Kryptosporidien-Isolaten und die Entdeckung einer großen genetischen Diversität zeigten, dass die Zusammensetzung der Gattung *Cryptosporidium* sehr viel komplexer ist als bisher angenommen. Die Identifizierung morphologisch nicht unterscheidbarer Spezies macht es möglich, die Verwandtschaft einzelner Arten, potentielle Wirte und Übertragungswege zu ermitteln.

Die am häufigsten in der Literatur beschriebene Spezies ist *Cryptosporidium parvum*. *C. parvum* wurde bisher in 155 Säugetierspezies identifiziert (Fayer, 2004), wobei die

meisten Beschreibungen auf mikroskopischen Befunden beruhen und eine eindeutige Zuordnung zu dieser Spezies zum Teil ungewiss bleibt. Aufgrund molekularer Charakterisierungen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Kryptosporidien in Säugetieren eine stärkere Wirtsspezifität aufweisen als zunächst angenommen. Einige wirtsspezifische Genotypen von *C. parvum* stellen heute eigene Spezies dar (z.B. *C. canis*; Fayer et al., 2001). Auch *C. hominis*, bis 2002 noch als Genotyp 1 oder humaner Genotyp von *C. parvum* beschrieben, wurde aufgrund molekularer und biologischer Unterschiede als eigene Spezies abgegrenzt (Morgan-Ryan et al., 2002). Bei Infektionen von gnotobiotischen Schweinen zeigten die beiden Spezies sehr deutliche Unterschiede im Krankheitsbild (Pereira et al., 2002). In *in vitro* Kultursystemen konnte eine unterschiedliche Wirtszellspezifität (Hashim et al., 2004; Hashim et al., 2006) nachgewiesen werden. *C. parvum* entspricht heute dem früheren Rindergenotyp oder Genotyp 2. Innerhalb dieser Spezies wurde jedoch noch eine große Anzahl weiterer wirtsspezifischer Genotypen identifiziert, die möglicherweise auch eigene Spezies darstellen (Thompson et al., 2005).

1.1.3 Entwicklungszyklus und Wirtszellspezifität

Der Entwicklungszyklus von *Cryptosporidium parvum* (Abb. 1.1.1) ist wie auch der Entwicklungszyklus der Gattungen *Eimeria* und *Isospora* monoxenisch. Zur Vollendung des Zyklus wird nur eine Wirtsspezies benötigt, d.h. es werden keine Vektoren oder Zwischenwirte in den Lebenskreislauf eingeschaltet. Der Entwicklungszyklus von *C. parvum* kann in drei Hauptabschnitte unterteilt werden: die asexuelle Schizogonie (Merogonie), die sexuelle Gamogonie und die asexuelle Sporogonie. Die meisten Stadien sind haploid, lediglich die Zygote ist diploid. Damit zählen die Kryptosporidien zu den Haplonten.

Der Entwicklungszyklus beginnt mit der oralen Aufnahme von Dauerstadien, den Oozysten, die von Infizierten in großen Mengen ausgeschieden werden. Die Oozysten haben einen Durchmesser von circa 5 µm und zeichnen sich durch eine besonders ausgeprägte Resistenz gegen Umwelteinflüsse aus. Auch die Magenpassage mit dem damit verbundenen extremen pH-Abfall wird unbeschadet überstanden. Die infektiösen, bananenförmigen Sporozoiten (1x5 µm) exzystieren im Dünndarm und infizieren die Epithelzellen des Intestinaltrakts. Die Bedingungen des intestinalen Milieus, einschließlich

der Körpertemperatur, des leicht alkalischen pH-Wertes, der reduzierenden Bedingungen und der Aussetzung von Pankreasenzymen und Gallensalzen ermöglichen die Einleitung der Exzystierung. Jedoch sind die meisten Faktoren *in vitro* keine zwingende Voraussetzung für eine Exzystierung, wie bei den meisten Kokzidienarten, können diese aber verstärken.

Sobald die exzystierten Sporozoiten in die Nähe der Mikrovilli gelangen, adhäreren sie mit ihrem proximalen Ende an die Oberfläche von Epithelzellen. Sie dringen in die Wirtszelle ein und nisten sich direkt unter der Mikrovillusmembran ein, wobei der Mikrovillisaum aufgegeben wird. Die Internalisierung in die Darmepithelzellen erfolgt wahrscheinlich in einem relativ schnellen, aktiven Prozess und ist nicht mit Phagozytosevorgängen vergleichbar (Dubremetz et al., 1998). Studien an anderen Apikomplexa zeigten zum Beispiel, dass die Invasion bei *Toxoplasma gondii* binnen 10-30 Sekunden abgeschlossen ist (Bommer, 1969). Von der Bindung von *C. parvum*-Sporozoiten bis zum vollständigen Eindringen in Caco-2-Zellen dauert es circa 3 Minuten (Langer & Riggs, 1999). Die Motilität und die aktive Penetration der Wirtszellen beruht auf einem bei den Apikomplexa konservierten Aktin-Myosin-Motor (Wetzel et al., 2005). Es folgt die Ausbildung einer Parasitophoren Vakuole, welche eine einzigartige intrazelluläre, aber extrazytoplasmatische Nische darstellt und innerhalb derer der Parasit seine gesamte intrazelluläre Entwicklung durchläuft. An der Basis der Parasitophoren Vakuole bildet sich eine für diese Spezies einzigartige multilamelläre Struktur (feeder organelle membrane, FOM) aus, die dem Parasiten die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Zytoplasma der Wirtszelle ermöglicht (Lumb et al., 1988).

Das proximale Ende der Sporozoiten enthält den Apikalkomplex, welcher sich aus Polarringen, Rhoptrien, Mikronemen und Dichten Granula zusammensetzt. Den membranumgebenen, sekretorischen Organellen des Apikalkomplexes (Rhoptrien, Mikronemen und Dichte Granula) wird in Analogie zu anderen Parasiten der Apikomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*) eine entscheidende Rolle bei der Bindung, Wirtszellinvasion und der Etablierung des Parasiten in der Wirtszelle zugesprochen (Dubremetz et al., 1998). Die Mikronemenproteine sollen eine Funktion bei der Bindung der Sporozoiten an die Zielzelle haben und wären somit für die frühe Interaktion zwischen Parasit und Wirt verantwortlich. Diese Hypothese wird durch den Nachweis einer Exozytose von Mikronemenproteinen bei der Invasion von *Sarcocystis*, *Eimeria*, *Plasmodium* und *Toxoplasma* unterstützt. Des Weiteren sind einige Mikronemenproteine

in Kriechspuren der Sporozoiten nachweisbar. Sie sollen daher auch bei der gleitenden Fortbewegung der Sporozoiten eine Rolle spielen. Rhoptrien sekretieren ihren Inhalt während der Internalisierung des Parasiten. Die Rhoptrienproteine sind in der sich bildenden Membran der Parasitophoren Vakuole bzw. im Lumen der Vakuole nachweisbar und scheinen daher maßgeblich an der Bildung der Vakuole beteiligt zu sein. Die Proteine der Dichten Granula werden erst nach Abschluss der Invasion sekretiert und sind mit der Membran der Parasitophoren Vakuole und intravakuolären Strukturen assoziiert. Sie sind demzufolge für die Ausgestaltung der Membran und damit für die Etablierung des Parasiten in der Wirtszelle verantwortlich.

Bei der Infektion vollzieht die Wirtszelle, aber auch der extrazelluläre Sporozoit, eine tief greifende morphologische und funktionelle Umwandlung. Während dieser Stadienkonversion differenziert der Sporozoit zum intrazellulären Trophozoiten. Trophozoiten sind für die Nahrungsaufnahme umstrukturiert. Der Apikalkomplex ist bei ihnen nicht mehr nachweisbar. Aus den Trophozoiten entstehen am Ende der Wachstumsphase Schizonten (Meronten). *C. parvum* besitzt zwei Typen von Meronten, die im Rahmen einer asexuellen Zerfallsteilung (Schizogonie = Merogonie) Merozoiten freisetzen. Meronten vom Typ I entlassen acht Merozoiten, die mit ihrem Apikalkomplex an benachbarte Zellen adhären, eindringen, zu Trophozoiten differenzieren und durch die Wiederholung der Merogonie zu einer Ausbreitung des Parasiten im Wirt führen. Einige Merozoiten differenzieren zu Meronten vom Typ II. Diese beenden den Zyklus der Merogonie und leiten die Gamogoniephase ein. Sie entlassen vier Merozoiten, die nach der Penetration in Wirtszellen sexuelle Stadien, Makrogametozyten und Mikrogametozyten, ausbilden. Die Gamogonie verläuft als Oogamie. Der Makrogametozyt wandelt sich direkt in einen Makrogameten um und bleibt einkernig. Der Mikrogametozyt bildet nach einer Reihe weiterer Kernteilungen bis zu sechzehn Mikrogameten aus. Die Mikrogameten befruchten die Makrogameten und führen damit zur Bildung diploider Zygoten. Diese differenzieren intrazellulär zu Oozysten (Sporogonie). Im Verlaufe einer mit meiotischen Reduktionsteilungen verknüpften Vermehrungsphase (Sporulation) entstehen vier Sporozoiten pro Oozyste.

Die Zygote kann zwei verschiedenen Entwicklungswegen folgen. Zu circa 80 % entstehen aus den Zygoten dickwandige Oozysten, die mit den Fäzes ausgeschieden werden. Sie sind sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und Chemikalien und sind ohne weitere Reifung sofort infektiös. Der andere Teil der Zygoten differenziert zu dünnwandigen

Oozysten, die bei Körpertemperatur exzystieren und zur Autoinfektion in der Lage sind. Autoinfektionen, bei denen die asexuellen und sexuellen Stadien des Entwicklungszyklus wiederholt werden, sind bei anderen Kokzidienarten nicht üblich. Oozysten von *Eimeria*, *Hammondia*, *Isospora* und *Toxoplasma* müssen außerhalb des Wirtes sporulieren, um infektiös zu werden. Oozysten von *Sarcocystis* sporulieren zwar auch innerhalb des Wirtes, sind aber nur für eine andere Wirtsspezies infektiös. Die Präpatenz, das heißt der Zeitraum von der Aufnahme der infektiösen Oozysten bis zur Ausscheidung von Oozysten nach Durchlaufen des kompletten Entwicklungszyklus dauert 3 bis 5 Tage (Fayer, 2004). Übersichten zum Entwicklungszyklus von *Cryptosporidium parvum* findet man bei Tyzzer (1912), Fayer et al. (1990) und Current & Garcia (1991).

Auch wenn *C. parvum* ein recht großes Wirtsspektrum bei Säugetieren besitzt, scheint die Wirtszellspezifität sehr begrenzt. Im immunkompetenten Wirt beschränkt sich die Infektion in der Regel auf die Epithelzellen des Intestinaltrakts. Bei immundefizienten Patienten bzw. Patienten mit chronischer Diarrhöe kann sich die Infektion auch auf extraintestinale Epithelien beispielsweise die der Gallenwege, des respiratorischen Trakts und des Pankreas ausbreiten. Eine Infektion anderer Zelltypen des Körpers, wie bei zum Beispiel bei *Toxoplasma gondii*, wurde bisher nicht beobachtet.

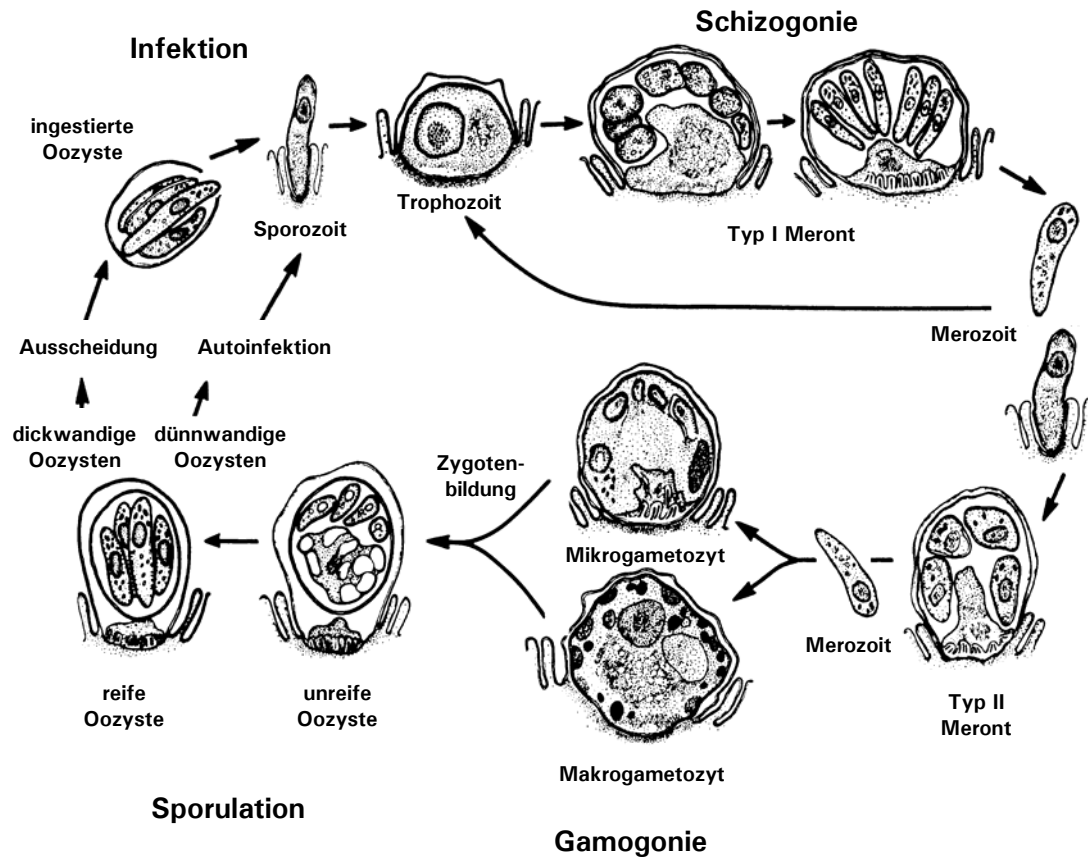


Abb. 1.1.1: Entwicklungszyklus von *Cryptosporidium parvum*
nach Fayer & Ungar (1986), verändert von Petry (1998b)

1.1.4 Epidemiologie

Kryptosporidien werden heute weltweit als bedeutende Erreger von Durchfallerkrankungen beim Menschen angesehen. Über Infektionen wurde von sechs Kontinenten berichtet wobei Patienten jeden Alters betroffen waren (Current & Garcia, 1991; Flanigan & Soave, 1993). Für die meisten Kryptosporidiosen beim Menschen sind zwei *Cryptosporidium* spp., *C. parvum* und *C. hominis*, verantwortlich. *C. parvum* infiziert fast alle Säugetiere einschließlich des Menschen, *C. hominis* hauptsächlich den Menschen. Bei immunkompromittierten Personen wurden jedoch auch Infektionen mit *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. baileyi* und *C. muris* beschrieben (Xiao et al., 2004; Fayer, 2004).

Die Kryptosporidiose ist die häufigste Ursache von persistierenden Diarrhöen bei unterernährten Kindern in den so genannten Entwicklungsländern. Bei einem direkten Erregernachweis in Stuhlproben reichten die Prävalenzraten bis zu 31,8 % der Erkrankten

in einer Studie aus Gabon (Duong et al., 1995). In Uganda zeigten 25 % von 1779 Kindern im Alter von 3 bis 36 Monaten mit Diarrhöe eine Kryptosporidiose (Tzipori & Ward, 2002). Es kann eine Assoziation von Kryptosporidiose und Kindern mit gehemmter Entwicklung und Unterernährung beobachtet werden (Macfarlane & Horner Bryce, 1987; Ramirez et al., 2004). Es ist jedoch noch zu klären, ob unterernährte Kinder besonders anfällig für eine Kryptosporidiose sind oder ob eine Infektion mit *C. parvum* verstärkt zu Unterernährung führt (Molbak et al., 1997).

Eine weitere Risikogruppe stellen immunkompromittierte Menschen dar. Schwere Fälle von Kryptosporidiose wurden vor allem bei HIV-Patienten, aber auch bei Personen mit genetischen Immundefekten, wie Hypogammaglobinämie oder schweren kombinierten Immundefekten (SCID), und bei Immunsupprimierten nach Organtransplantationen und Tumorpatienten während einer Strahlen- oder Chemotherapie beschrieben. Weltweit haben bis zu 24 % aller AIDS-Patienten mit Diarrhöen eine Kryptosporidiose (Guerrant, 1997). Der Ausprägungsgrad der Erkrankung ist abhängig vom Grad der Immunsuppression bzw. Immunschwäche eines Patienten. AIDS-Patienten mit weniger als 150 CD4-Zellen/ μ l Blut entwickeln oft schwere, lebensbedrohliche Diarrhöen (Flanigan et al., 1992; Farthing, 2000; Tzipori & Ward, 2002). Seit den 80er Jahren zählt die Kryptosporidiose zu den AIDS-definierenden Erkrankungen und ist nach wie vor eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei Patienten ohne Zugang zur hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART).

Aber nicht nur immundefiziente Personen, sondern auch die Allgemeinbevölkerung ist der Gefahr einer Kryptosporidiose vor allem durch kontaminiertes Trinkwasser oder eine fäkal verunreinigte Umgebung ausgesetzt. In einer epidemiologischen Studie zur Prävalenz von anti-*C. parvum*-Antikörpern in Seren von Personen ohne Nachweis einer Kryptosporidiose konnte gezeigt werden, dass circa 15 % der Personen spezifisches IgG besitzen (Petry, 1998a). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch in Deutschland ein erheblicher Prozentsatz der Bevölkerung mit dem Erreger konfrontiert ist, der vergleichbar mit den Zahlen anderer Industrieländer ist (Zu et al., 1994). Es ist aber nicht abzuschätzen, inwieweit die humorale Antwort auf klinisch inapparente oder nicht diagnostizierte Infektionen beruht. Besonders gefährdete Gruppen stellen Säuglinge und Kinder in Tagesstätten, Kontaktpersonen von Menschen mit einer Kryptosporidiose, in der Viehzucht (vor allem von Kälbern und Lämmern) arbeitende Personen und Personen in Regionen mit geringen hygienischen Standards und/oder mangelhafter Trinkwasseraufbereitung dar. Hier kann eine deutlich erhöhte Seroprävalenz festgestellt

werden.

In der Tierwelt ist *C. parvum* vor allem bei Kälbern eines der am häufigsten detektierten Enteropathogene und ist weltweit in Rinderherden, aber auch in Schaf- und Ziegenherden weit verbreitet. Die Diarrhöe bei neugeborenen Kälbern kann zu Gewichtsverlusten bzw. zu verzögerter Gewichtszunahme führen, die wirtschaftlich bedeutende Ausmaße annehmen können. Die Fäzes infizierter Kälber können mehrere Millionen Oozysten pro Gramm enthalten. Infektionen von Wiederkäuern in der Zucht, aber auch von vielen anderen Haus- und Wildsäugetieren stellen eine der größten Ursachen der Kontamination der Umwelt mit Oozysten dar.

1.1.5 Transmission

Die Transmission von Kryptosporidien-Oozysten erfolgt fäkal-oral durch den direkten Kontakt von Tier zu Tier, von Tier zu Mensch aber auch von Mensch zu Mensch. Die Kryptosporidiose stellt daher neben einer Zoonose und Zooanthroponose auch eine Anthroponose dar. Infektionen beim Menschen werden hauptsächlich durch *C. parvum* (früher *C. parvum* Genotyp 2 bzw. Rinder-Typ) und *C. hominis* (früher *C. parvum* Genotyp 1 bzw. humaner Typ) verursacht, wobei die meisten Infektionen auf *C. hominis* zurückzuführen sind (Xiao et al., 2000). Transmissionsstudien haben gezeigt, dass für *C. parvum* keine engen Wirtsgrenzen bestehen. Oozysten aus Nutztieren führen zu Infektionen beim Menschen und umgekehrt sind die Oozysten aus Menschen auch infektiös für zum Beispiel Kälber, Lämmer und Ziegen. Eine Fallkontrollstudie in England und Wales zeigte, dass als signifikante Risikofaktoren für sporadisch auftretende Kryptosporidiose-Erkrankungen generell Patientenkontakt, für *C. hominis* vor allem Auslandsreisen und das Wechseln von Windeln und im Falle von *C. parvum* direkter Kontakt zu Vieh zu nennen sind (Hunter et al., 2004).

Kryptosporidien können auch indirekt über fäkal verunreinigtes Trinkwasser oder Nahrung übertragen werden. Es gab zahlreiche große, durch kontaminiertes Trinkwasser ausgelöste Ausbrüche einer Kryptosporidiose mit einer Häufung in den USA und Großbritannien (Fayer et al., 2000). In Milwaukee, Wisconsin kam es 1993 zu der bisher größten Epidemie einer durch kontaminiertes Trinkwasser ausgelösten Kryptosporidiose, von der 403000 Menschen betroffen waren (Mac Kenzie et al., 1994). Bei Ausbrüchen wie diesen stammte

das Trinkwasser meist aus verunreinigten Oberflächenwasserquellen wie Flüssen oder Seen. Aber auch Schwimmbadwasser oder unbehandeltes Grund- und Quellwasser wurden als Kontaminationsquellen beschrieben. Bei der Trinkwassergewinnung überstehen die Oozysten die Aufbereitung durch chemische Behandlung. Sie können im Wasser monatelang infektiös bleiben und sind resistent gegenüber Chlor- und Ozonkonzentrationen, die die in der Trinkwasseraufbereitung zugelassenen Konzentrationen weit übersteigen (Korich et al., 1990; Juranek, 1995). Da die üblichen trinkwasserhygienischen Kriterien (zum Beispiel die Anzahl coliformer Keime) keine Aussage über den Gehalt an infektiösen Kryptosporidien-Oozysten zulassen, wird eine Kontamination nur schwer bemerkt. *C. parvum* ist daher heute einer der wichtigsten Problemorganismen bei der Trinkwasseraufbereitung und wird als eine Gefahr für die Trinkwasserversorgung in den USA (Guerrant, 1997) aber auch in Europa angesehen. Die neue Trinkwasserverordnung von 2001 versucht dem Rechnung zu tragen. Bei Trinkwasser, das von Oberflächenwassern stammt oder von diesem beeinflusst wird, ist mittlerweile eine Untersuchung auf *Clostridium perfringens* und dessen Sporen, welche eine vergleichbare Chlorresistenz wie Parasitendauerformen aufweisen, als Indikatorparameter vorgeschrieben.

Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion nach erfolgter Transmission ist recht hoch. Die Infektionsdosis (ID_{50}) von *C. parvum* (IOWA-Isolat) liegt durchschnittlich bei nur 132 Oozysten für gesunde Personen ohne Nachweis einer früheren Kryptosporidien-Infektion (DuPont et al., 1995). Sie liegt damit im Bereich der infektiösen Dosis von Shigellen und ist circa hundert- bis tausendfach geringer als bei Salmonellen. Infektionsstudien an gesunden Freiwilligen haben Unterschiede in der ID_{50} in Abhängigkeit des verwendeten *C. parvum*-Isolates beschrieben. Je nach Isolat reicht die infektiöse Dosis von nur 9 bis 1042 Oozysten (Okhuysen et al., 1999).

1.2 Die Erkrankung Kryptosporidiose

1.2.1 Klinische Manifestation und Pathophysiologie

Die Symptome der Kryptosporidiose unterscheiden sich in ihrer Ausprägung je nach Alter und Immunstatus des infizierten Individuums (Current & Garcia, 1991; Farthing, 2000; Chen et al., 2002; Ramirez et al., 2004). In immunkompetenten Menschen und Tieren ist die Kryptosporidiose eine Durchfallerkrankung, die in der Regel 3 bis 12 Tage anhält, dann aber spontan ausheilt. Die häufigsten Symptome sind mittlere bis stark wässrige Diarrhöe, Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, abdominale Krämpfe und leichtes Fieber. Es wurden jedoch auch asymptomatische Verläufe beschrieben. Aufgrund der Ausscheidung von Oozysten mit dem Stuhl besteht eine Ansteckungsgefahr. Auch nach Rückgang der Symptome können die Dauerstadien des Parasiten im Stuhl noch etliche Wochen ausgeschieden werden (Fayer et al., 1997). Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 7 bis 10 Tage. Bei immunkompromittierten Personen ist die Erkrankung sehr viel schwerer und kann chronisch bis lebensbedrohend werden (Farthing, 2000). Hier zeigen sich Symptome wie den Körper schwächende, Cholera-ähnliche Diarrhöe mit massiven Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten, starke abdominale Krämpfe, Unwohlsein, leichtes Fieber, Gewichtsverlust, Malabsorption und Anorexie. Bei Patienten mit chronischen Erkrankungen kann eine extraintestinale Manifestation mit einer Ausbreitung der Erreger zum Beispiel in die Gallenwege und den respiratorischen Trakt beobachtet werden (Griffiths, 1998b).

Die Pathophysiologie der Kryptosporidiose ist noch weitestgehend ungeklärt. Auch wenn *C. parvum* kein besonders invasiver Parasit ist und sich in seiner Entwicklung auf ein membranumgebenes Kompartiment an der apikalen Oberfläche der intestinalen Enterozyten beschränkt, kommt es dennoch zu massiven histologischen Veränderungen. Die betroffenen Areale des Dünndarms sind durch eine Atrophie der Villi, Kryptenhyperplasie und Entzündungserscheinungen in der Submukosa gekennzeichnet (Farthing, 2000). Die schweren Diarrhöen werden wegen der starken Hypersekretion auch als Cholera-ähnlich beschrieben. Ein Toxin wurde bisher jedoch nicht isoliert, auch wenn eine Enterotoxin-ähnliche Aktivität in Fäzesproben gefunden wurde (Guarino et al., 1994; Guarino et al., 1995). Im Allgemeinen entwickeln sich Diarrhöen, wenn die intestinale

Absorption beeinträchtigt oder die Sekretion verstärkt ist. In verschiedenen experimentellen Modellen einer Kryptosporidiose konnte eine Beeinträchtigung der Glukose-stimulierten Na^+ - und Wasseraufnahme und eine Verstärkung der Cl^- -Sekretion beobachtet werden (Clark, 1999).

1.2.2 Diagnostik einer Kryptosporidien-Infektion

Eine Kryptosporidiose ist auf Grund der klinischen Symptome nicht von anderen Durchfallerkrankungen zu unterscheiden und muss daher mit Hilfe mikrobiologischer Methoden diagnostiziert werden (Petry, 2000). Dies erfolgt in erster Linie über den Nachweis von Oozysten in Stuhlproben oder von intrazellulären Stadien in Biopsieschnitten der intestinalen Mukosa. Mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten können die 2-5 μm großen, intrazellulären Stadien als Ausstülpungen der Darmepithelzellen lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Für den Nachweis von Oozysten in Stuhlproben mussten Spezialfärbemethoden entwickelt werden, da sich die Oozysten nicht durch die Standardfärbungen in der Stuhldiagnostik von Parasiten (zum Beispiel durch Trichromfärbung) darstellen lassen. Heute ist die modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung weit verbreitet. Sie zeigt die Oozysten als säurefeste, sphärische Körperchen mit einem Durchmesser von 4-6 μm .

Immer häufiger kommen Antigen-Nachweis-Kits zum Einsatz, wie zum Beispiel direkte oder indirekte Immunfluoreszenztests oder ELISA-Systeme, die ein schnelles 'Screening' vieler Proben erlauben. Auch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird heute wegen ihrer hohen Sensitivität und Spezifität für die Detektion des Parasiten in klinischen Proben, aber auch im Trinkwasser eingesetzt (Clark, 1999). PCR in Verbindung mit Sequenzierung oder Restriktionsfragmentanalyse (Elwin et al., 2001), erlauben zusätzlich eine genetische Charakterisierung. Die dadurch mögliche Zuordnung der Oozysten zu einer bestimmten Spezies kann Hinweise auf die Quelle der Infektion und das Infektionsrisiko geben.

1.2.3 Serologie

Für die Diagnostik sind die Ergebnisse serologischer Untersuchungen nur begrenzt aussagekräftig, da die Seroprävalenz spezifischer Antikörper in der Allgemeinbevölkerung

zum Teil recht hoch ist und im Normalfall keine Vergleichsseren aus dem nahen Zeitraum vor der Infektion vorliegen. Die Serologie findet daher hauptsächlich ihren Einsatz in der Generierung epidemiologischer Daten, in Studien zur Seroprävalenz und in der retrospektiven Beurteilung von Kryptosporidiose-Ausbrüchen. Zum Nachweis *C. parvum*-spezifischer Antikörper werden Immunfluoreszenztests, Immunoblots und ELISA eingesetzt, die Oozystenlysate als Antigen verwenden. Es gehen Bestrebungen dahin, einen ELISA zu entwickeln, bei dem das Parasitenlysate als Antigen durch einzelne oder ein Gemisch aus rekombinanten Parasitenproteinen ersetzt werden kann. In den Seren von Personen, die bereits mit dem Parasiten konfrontiert wurden, findet man vor allem Antikörper, die spezifisch gegen zwei Hauptgruppen von Antigenen im Bereich von 15-17 kDa und 23-27 kDa reagieren. Innerhalb dieser Gruppen wurden CP15, CP17 und P23 als immundominante Sporoziten-Oberflächenproteine identifiziert (Reperant et al., 1994; Moss et al., 1998). Priest et al. (1999) entwickelten zwei ELISA-Systeme, die jeweils ein spezifisches *C. parvum*-Protein als Antigen verwenden. Eines dieser Antigene ist die rekombinante Form eines 27 kDa-Proteins (P23), das zweite ein teilweise gereinigtes, natives 17 kDa-Antigen (CP17). Diese ELISA-Verfahren wurden als spezifischer als ein Westernblot mit Parasitenlysate und im Falle des 27 kDa-Antigen-ELISA sensitiver als ein Parasitenlysate-ELISA angesehen.

1.2.4 Therapieansätze

Bisher konnte keine effektive, spezifische Therapie gefunden werden, die zur vollständigen Eliminierung von *C. parvum* führt. Einzig ein intaktes Immunsystem kann zur Bewältigung einer Kryptosporidiose beitragen. Da die Erkrankung bei immunkompetenten Individuen selbstlimitierend ist, reicht in schweren Verläufen eine unterstützende, symptomatische Behandlung durch Rehydratation und Elektrolytgabe. Bei immunsupprimierten Patienten liegt neben der symptomatischen Behandlung das Hauptaugenmerk derzeit noch auf der Stärkung der Immunabwehr. Im Falle der AIDS-Patienten mit Kryptosporidiose hat sich die klinische Situation durch den Einsatz der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) verbessert (Carr et al., 1998; Foudraine et al., 1998; Maggi et al., 2000; Miao et al., 2000). Die Anzahl lebensbedrohlicher Kryptosporidiosen ist bei AIDS-Patienten mit Zugang zur HAART gesunken (Riggs, 2002). Besonders die Gabe von Proteaseinhibitoren führte sekundär zu einer Verbesserung

der durch *C. parvum* verursachten Symptome. Dies wird dahingehend interpretiert, dass es durch die Verringerung der Viruslast zu einer Stärkung der zellulären Abwehr kommt und somit die Protozoeninfektion besser beherrschbar ist. In *in vitro* Kulturen von *C. parvum* mit HCT-8-Zellen konnten wir zeigen, dass einige in der HAART eingesetzte Proteaseinhibitoren auch eine direkte Wirkung auf die Parasitenentwicklung besitzen (Hommer et al., 2003). Mele et al. (2003) wiesen die direkte Wirkung von Indinavir auch *in vivo* nach.

Bei der Entwicklung eines Medikamentes zur Behandlung einer Kryptosporidiose wurden weit über hundert Chemotherapeutika getestet (Blagburn & Soave, 1997; Woods et al., 1996; Woods & Upton, 1998). Nur für eine geringe Anzahl konnte ein Effekt in Tiermodellen und in klinischen Studien am Menschen demonstriert werden (Thompson et al., 2005). Die meisten dieser Substanzen führten aber nicht zur vollständigen Eliminierung des Parasiten, sondern nur zur Reduktion der Parasitenausscheidung und der klinischen Symptome. Nitazoxanid besitzt ein breites Wirkspektrum gegen eine Vielzahl intestinaler Protozoen, Helminthen und anaerober Bakterien. *In vitro* inhibiert es die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* in HCT-8-Zellen (Gargala et al., 2000) und auch im Tiermodell zeigt es eine Effektivität (Theodos et al., 1998). In klinischen Studien am Menschen konnte eine Reduktion der Oozystenausscheidung und ein Rückgang der Diarrhöe erreicht werden (Dumbo et al., 1997; Rossignol et al., 1998; Rossignol et al., 2001). Nitazoxanid erhielt 2002 als erstes Medikament (Alinia[®]) eine Zulassung gegen Kryptosporidiose durch die FDA (Food and Drug Administration) in den USA. Seit kurzem ist es nicht mehr nur für die Therapie bei Kindern im Alter von 1 bis 11 Jahren, sondern auch bei Erwachsenen zugelassen. In einer Studie an afrikanischen Kindern mit Kryptosporidiose zeigte sich ein Effekt allerdings nur bei HIV-negativen, nicht jedoch bei HIV-infizierten Kindern (Amadi et al., 2002). Eine der ersten Substanzen, für die eine Aktivität gegen Kryptosporidien gezeigt wurde, ist das Aminoglykosid Paromomycin. Es zeigte eine Effektivität in der Reduktion von klinischen Symptomen und der Parasitenausscheidung in Kälbern, Lämmern und jungen Ziegen (Fayer & Ellis, 1993; Viu et al., 2000; Mancassola et al., 1995). Klinische Studien am Menschen erzielten bezüglich der Wirksamkeit von Paromomycin unterschiedliche Resultate (White Jr. et al., 1994; Smith et al., 1998a; Hewitt et al., 2000; White, Jr. et al., 2001). Zum Teil werden eine günstige Auswirkung und eine Eliminierung des Parasiten beschrieben, wohingegen andere die Wirkung gegen Kryptosporidien in Frage stellen. Einige Patienten schieden trotz Behandlung weiterhin Oozysten aus, andere entwickelten nach Abschluss der Therapie

Rezidive (Blagburn & Soave, 1997). In Kombinationstherapien wurde Paromomycin häufig erfolgreich eingesetzt (Smith et al., 1998a; Griffiths, 1998a; Maggi et al., 2001; Meamar et al., 2006). *In vitro*-Studien mit HCT-8-Zellen zeigten einen inhibitorischen Effekt von Paromomycin auf die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum*, der sich in der Kombination mit verschiedenen *in vitro* wirksamen Proteaseinhibitoren der HAART noch verstärkte (Hommer et al., 2003). Jedoch konnte hier ebenso wie in einer Studie von Giacometti et al. (1999) keine vollständige Inhibition der Parasitenentwicklung erreicht werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine auf spezifischen Antikörpern basierende Therapie unter bestimmten Umständen zur Reduktion oder Eliminierung des Parasiten führt (Crabb, 1998). Viele Gruppen haben bei mit *C. parvum*-Oozysten infizierten neonatalen Mäusen zeigen können, dass durch Gabe von monoklonalen Antikörpern, hyperimmunem Serum oder hyperimmunem Kolostrum die Oozystenausscheidung reduziert werden kann (Arrowood et al., 1989; Perryman et al., 1990; Hunt et al., 2002; Martin-Gomez et al., 2005b). Bei wenigen AIDS-Patienten mit einer Kryptosporidiose konnten durch Behandlung mit hyperimmunem Rinder-Kolostrum die klinischen Symptome verbessert oder eliminiert werden (Doyle et al., 1993; Kelly, 2003). Hierbei ist anzumerken, dass nur Antikörper gegen bestimmte Epitope, so genannte Neutralisations-sensitive Epitope, eine negative Wirkung auf die Parasitenentwicklung haben.

Auch eine aktive Immunisierung mit Proteinen oder DNA-Konstrukten wurde in den letzten Jahren verstärkt in Betracht gezogen (siehe 1.2.5). Durch Gaben von nativen bzw. rekombinanten Proteinen oder durch direkte DNA-Injektionen konnten Antigen-spezifische Immunantworten hervorgerufen werden. Von besonderem Interesse sind hier die Oberflächenproteine der Sporozoiten und Merozoiten.

Es ist anzunehmen, dass durch die wachsenden Kenntnisse auf molekulargenetischer Ebene und über die Infektionsmechanismen, die Biochemie und die Immunologie des Parasiten die Entwicklung einer effektiven Therapie in den nächsten Jahren große Fortschritte machen wird.

1.2.5 Immunisierungsstrategien gegen Kryptosporidiose

Seit die Sporozoiten-Oberflächenproteine P23, CP15 und CP15/60 als immundominante Antigene erkannt wurden (siehe 1.4), werden immer mehr Arbeiten veröffentlicht, die sich

mit der passiven Immunisierung mit spezifischen Antikörpern (siehe 1.2.4) oder der aktiven Immunisierung mit rekombinanten Proteinen oder DNA-Konstrukten beschäftigen. Jenkins et al. (1995) immunisierten Schafe durch 'jet injection' mit einer rekombinanten Plasmid-DNA (pCMV-CP15/60), die für das CP15/60-Sporozoitenoberflächen-Antigen kodierte, und wiesen Antikörper im Serum und Kolostrum der Tiere nach. Sie konnten auch zeigen, dass die Gabe von hyperimmunem Rinder-Kolostrum von mit CP15/60-DNA immunisierten Kühen immunsupprimierten Mäusen einen partiellen Schutz gegen die intestinale Entwicklung von *C. parvum* verleiht (Jenkins et al., 1999). Sagodira et al. (1999b) führten eine nasale DNA-Vakzinierung mit CP15-DNA, kodierend für ein 15 kDa Oberflächenprotein, in Mäusen durch und stellten eine spezifische und lang anhaltende systemische und mukosale Antikörperproduktion und T-Zell-Proliferation fest. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte weiterhin einen Schutz vor einer *C. parvum*-Infektion bei jungen Ziegen erreichen, deren Muttertiere mit CP15-DNA immunisiert wurden (Sagodira et al., 1999a). Perryman et al. (1999) immunisierten Kühe mit rekombinantem P23. Das immune Kolostrum konnte Kälbern einen erheblichen Schutz vor einer Infektion mit *C. parvum*-Oozysten verleihen. Der Schutz manifestierte sich durch das Ausbleiben einer Diarrhöe und durch eine signifikante Reduktion an ausgeschiedenen Oozysten. Auch eine Immunisierung von Mutterschafen mit löslichem Parasitenantigen intramuskulär und in die Brustdrüsen führte zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Situation von gesäugten Lämmern nach einer experimentellen Infektion mit einer Reduktion der Parasitenausscheidung um 77 % (Martin-Gomez et al., 2005a).

1.3 Immunologie der Kryptosporidiose

Cryptosporidium parvum ist durch seine intrazelluläre Entwicklung weitestgehend vor der Immunantwort des Wirtes und dem Darmmilieu geschützt. Außerhalb der Wirtszelle ist *C. parvum* jedoch zugänglich für das Immunsystem. Viele der Oberflächenproteine von Sporoziten und Merozoiten sind stark immunogen und zeigen zum Teil eine antigenetische Kreuzreaktivität. Der Vorteil des Parasiten liegt in seiner Fähigkeit, sich schnell zu entwickeln, sich im Wirt mit einer großen Menge an invasiven Stadien (Zoiten) auszubreiten und die Umwelt mit einer großen Menge an Oozysten zu kontaminieren. Ein intaktes Immunsystem ist in der Regel in der Lage, den Parasiten innerhalb von eins bis zwei Wochen vollständig aus dem Körper zu eliminieren. Wird der Parasit nicht effizient beseitigt, führt die Infektion in kurzer Zeit durch Dehydration und Elektrolytverlust zum Tod des Wirtes.

In den letzten Jahren wurde sehr viel über die spezifische Immunreaktion im Rahmen einer Kryptosporidiose geforscht. Vieles was über die Immunantwort gegen *C. parvum* bekannt ist, stammt aus Beobachtungen und Untersuchungen vor allem an AIDS-Patienten und experimentellen Mausmodellen. Lange Zeit war jedoch kein geeignetes Mausmodell verfügbar, da immunkompetente Mäuse nur in der Neonatalphase suszeptibel für eine Infektion sind. Sie entwickeln ab der dritten Lebenswoche eine natürliche Resistenz und sind als Adulttiere nicht mehr infizierbar (Enriquez & Sterling, 1991; Sherwood et al., 1982). Der Mensch kann dagegen in jedem Lebensalter an einer Kryptosporidiose erkranken. Heute werden immunsupprimierte Mäuse und immundefiziente Mausstämme (zum Beispiel Nackt- und SCID-Mäuse) verwendet. Auch kommen Mäuse zum Einsatz, bei denen durch Antikörperbehandlung oder genetische Veränderung einzelne Komponenten des Immunsystems ausgeschaltet wurden. Als Symptome zeigen immunkompetente Mäuse bestenfalls eine weiche Stuhlkonsistenz. Bei immunkompromitierten Mäusen kommen bei starkem Parasitenbefall weitere Symptome wie ruppiges Fell, verminderte Aktivität und Nahrungsaufnahme sowie Gewichtsverlust hinzu. Das Leitsymptom der Kryptosporidiose beim Menschen, die Diarrhöe, fehlt jedoch.

Die Infektion von intestinalen Epithelzellen mit *C. parvum* induziert eine mukosale Inflammation mit Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten in der Lamina propria und intraepithelialen Neutrophilen und T-Lymphozyten (Theodos, 1998; Laurent et al.,

1999). Die Epithelzellen selbst produzieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie IL-8, GRO- α , TNF- α und RANTES (Laurent et al., 1997; Seydel et al., 1998; Maillot et al., 2000) und tragen damit zur Initiierung der mukosalen Immunantwort bei. In der frühen Phase der Auseinandersetzung mit dem Parasiten sind zunächst Mediatoren der natürlichen Immunität (IFN- γ , IL-12, TNF- α) wirksam. Im weiteren Verlauf kommt es, bedingt durch diese Zytokine, zur Ausbildung einer adaptiven, T_H1-dominierten zellulären Antwort, die dann durch eine T_H2-Antwort ergänzt und komplettiert wird. Welchen Anteil die einzelnen Säulen der Infektabwehr an der Resistenzentwicklung tragen, ist bisher nicht bekannt.

1.3.1 Zelluläre Immunantwort

Bei der Überwindung einer Kryptosporidien-Infektion spielt die Zell-vermittelte Immunität, und hierbei vor allem die CD4⁺-T-Zellen, eine sehr entscheidende Rolle (Chen et al., 1993; Theodos, 1998; Riggs, 2002). Neonatale, athymische und daher T-Zell-defiziente Nacktmäuse, SCID-Mäuse und CD4⁺-depletierte Mäuse entwickeln eine persistierende und letztendlich letale Infektion (Heine et al., 1984; Mead et al., 1991; Ungar et al., 1990). Durch Rekonstitution mit CD4⁺-T-Zellen aus naiven oder immunen Mäusen konnte eine bereits etablierte Infektion von SCID- oder Nacktmäusen positiv beeinflusst werden (McDonald et al., 1992). CD8⁺-T-Zellen spielen nur eine untergeordnete Rolle. Dies wird untermauert durch Untersuchungen von Aguirre et al. (1994). Mäuse mit einer genetischen Defizienz der MHC-Klasse II-Proteine, die keine reifen CD4⁺-T-Zellen bilden können, zeigten eine stärkere und länger anhaltende Infektion sowohl als neonatale wie auch als adulte Tiere im Vergleich zu MHC-Klasse I-defizienten Kontrolltieren. Weiterhin sind Mäuse mit genetischen Defekten der co-stimulatorischen T-Zellmoleküle CD40 und CD40-Ligand nicht in der Lage eine Infektion zu beherrschen (Cosyns et al., 1998). Auch die Tatsache, dass AIDS-Patienten mit sehr niedrigen CD4⁺-Zahlen für die Entwicklung einer chronischen Kryptosporidiose prädestiniert sind, weist auf die entscheidende Rolle der T-Helferzellen bei der Immunantwort hin (Blanshard et al., 1992; Flanigan et al., 1992).

1.3.2 T_H1-Zytokine

Neben den CD4⁺-T-Zellen spielen auch die T_H1-Zytokine Interferon- γ und Interleukin-12 eine zentrale Rolle in der Bewältigung einer Kryptosporidien-Infektion.

Das proinflammatorische Zytokin **Interferon- γ** ist mit einer partiell protektiven, angeborenen Immunität gegen den Parasiten und der adaptiven, zellvermittelten Immunantwort, die zur Überwindung einer Infektion führt, assoziiert (Ungar et al., 1991; Theodos, 1998; Laurent et al., 1999; Hayward et al., 2000; McDonald, 2000; Riggs, 2002). Zusätzlich inhibiert es auch direkt die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* in Epithelzelllinien und induziert eine Resistenz der Enterozyten gegen eine Parasiteninvasion (Pollok et al., 2001). In der intestinalen Mukosa von Menschen und Kälbern konnte im Rahmen einer Infektion eine erhöhte IFN- γ -Expression beobachtet werden (White et al., 2000; Wyatt et al., 2001). Obwohl SCID-Mäuse letztendlich eine chronische Infektion entwickeln, zeigen diese Mäuse eine Resistenz gegenüber *C. parvum* während der ersten 3 bis 5 Wochen nach Konfrontation mit dem Parasiten. Da diese Mäuse auf Grund des Fehlens von T- und B-Zellen keine erworbene Immunantwort aufbauen können, ist diese anfängliche Resistenz eine Folge der natürlichen Immunität, mit IFN- γ als dem wahrscheinlich wirksamsten Faktor, der durch Natürliche Killerzellen (NK) in SCID-Mäusen produziert wird (Theodos, 1998; McDonald et al., 2000). Die Gabe von IFN- γ -neutralisierenden Antikörpern führte in adulten BALB/c-Nacktmäusen zu einer signifikant erhöhten Oozystenausscheidung (Ungar et al., 1991). Infektionen von IFN- γ -Knockout-Mäusen (GKO) bestätigen die Wichtigkeit von IFN- γ in der Resistenz gegen diesen Parasiten. C57BL/6-GKO-Mäuse können mit relativ wenigen Oozysten infiziert werden und entwickeln eine rasche, akute Infektion mit einer hohen Parasitenausscheidung, intestinalen Funktionsstörungen und Gewichtsverlust (Theodos et al., 1997; Griffiths et al., 1998).

Interleukin-12 induziert neben dem Tumornekrose-Faktor TNF- α die Produktion von IFN- γ durch Natürliche Killerzellen und T-Zellen und spielt in der Abwehr einer Kryptosporidiose auch eine wichtige Rolle. Eine prophylaktische IL-12-Gabe verhinderte die Infektion bzw. verminderte signifikant deren Ausprägung bei neonatalen BALB/c- und SCID-Mäusen. Eine Verabreichung des Interleukins nach bereits etablierter Infektion hatte allerdings keinen Einfluss auf den Verlauf (Urban Jr. et al., 1996). Mäuse mit beeinträchtigter IL-12-Funktion sind suszeptibel für eine Infektion. C57BL/6-IL-12-

Knockout-Mäuse zeigen nach Konfrontation mit dem Parasiten hohe Ausscheidungsraten, überwinden jedoch die Infektion (Campbell et al., 2002).

1.3.3 T_H2-Zytokine

Die Antikörper-vermittelte T_H2-Antwort ist durch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 charakterisiert. Eine T_H2-Aktivität kann in manchen Fällen eine intrazelluläre Infektion (z.B. mit *Leishmania major*) verschlimmern (Chatelain et al., 1992). Bei einer Kryptosporidiose ist die Beteiligung einer T_H2-spezifischen Immunantwort bei der Überwindung einer Kryptosporidiose zwar weniger gut untersucht, es gibt jedoch Hinweise, dass ihr hier neben der T_H1-Antwort auch eine protektive Rolle zukommt.

Für die Ausprägung einer Infektion in den für eine *C. parvum*-Infektion suszeptiblen IFN- γ - und IL-12-Knockout-Mäusen ist der genetische Hintergrund der Mäuse entscheidend. Entgegen den Verhältnissen im Leishmanien-Modell sind C57BL/6-Knockout-Mäuse erheblich stärker empfänglich als BALB/c-Mäuse mit identischen Defekten (Mead & You, 1998; Campbell et al., 2002). Dies weist auf die Beteiligung einer T_H2-Antwort hin, die bei BALB/c-Mäusen stärker ausgeprägt ist als bei C57BL/6-Mäusen. Immunkompetente BALB/c- aber auch C57BL/6-Mäuse erholen sich nach Behandlung mit einem anti-IFN- γ -Antikörper von einer Infektion, was impliziert, dass die Überwindung einer Infektion nicht von IFN- γ abhängig ist (Ungar et al., 1991; Aguirre et al., 1998).

Bei einer Infektion von Mäusen sind neben den T_H1-Zytokinen auch die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10 in der intestinalen Mukosa hoch reguliert (Lacroix et al., 2001). Tiere mit Defekten der T_H2-determinierenden Zytokine IL-4 und IL-10 zeigen im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyp-Mäusen zwar keine erhöhte Parasitenausscheidung (Campbell et al., 2002), IL-4-Knockout-Mäuse bzw. mit anti-IL-4-Antikörpern behandelte C57BL/6-Mäuse zeichnen sich aber durch eine verlängerte Oozystenausscheidung und intestinale, epitheliale Infektion aus (Aguirre et al., 1998; Lacroix et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass einer T_H2-Antwort initial zwar keine Rolle zukommt, aber einer Persistenz der Infektion entgegenwirkt. Die Daten von McDonald et al. (2004) weisen zusätzlich auch auf eine IL-4-Aktivität in der frühen Phase einer Infektion von BALB/c-Mäusen hin, die die Induktion der IFN- γ - und IL-12-Expression beinhaltet.

1.3.4 Parasiten-spezifische Antikörper

Wohingegen die essentielle Rolle der zellvermittelten Immunabwehr bei der Überwindung einer *C. parvum*-Infektion gut untersucht ist, ist der Beitrag der humoralen Antwort noch unklar. Humorale Faktoren wie spezifische, *C. parvum*-reaktive Immunglobuline treten bei jeder Infektion auf und gelten als Marker für eine Kryptosporidien-Infektion. Es werden Antikörper aller Hauptklassen induziert und im Serum und der Mukosa konnten hohe Titer gemessen werden (Ungar et al., 1986; Peeters et al., 1992; Hill et al., 1990; Williams & Burden, 1987). Eine Antikörperantwort scheint mit der Parasitenelimination und dem Rückgang der Symptome assoziiert zu sein. Sie trägt möglicherweise zur Resistenz oder verminderten Schwere bei einer Reinfektion bei (Crabb, 1998; Moss et al., 1998; Chappell et al., 1999). In den Seren von Personen, die bereits mit dem Parasiten konfrontiert wurden, findet man vor allem Antikörper, die gegen einige definierte Parasitenproteine reagieren. Es wurde eine Reihe von immunogenen Antigenen von *C. parvum* identifiziert und jene, die assoziiert sind mit der Motilität, Bindung, Invasion und Entwicklung des Parasiten, gelten als Vakzinkandidaten. Hauptantigene stellen vor allem Oberflächenproteine der invasiven Stadien wie P23, CP17 und CP15 dar (Moss et al., 1998). Für monoklonale Antikörper, hyperimmunes Serum oder hyperimmunes Kolostrum konnte gezeigt werden, dass sie die Oozystenausscheidung und klinische Symptome in Experimentalansätzen oder natürlichen Infektionen reduzieren können (Crabb, 1998; Riggs, 2002). Andererseits spielen Antikörper eventuell doch eher eine unterstützende Rolle bei der Bewältigung einer Infektion. Auch bei AIDS-Patienten mit chronischer Kryptosporidiose sind hohe IgM-, IgG- und IgA-Titer nachweisbar (Ungar et al., 1986; Cozon et al., 1994; Reperant et al., 1994) und im Mausmodell war die Kontrolle der Parasitenreproduktion unabhängig von der Anwesenheit einer intakten B-Zellpopulation (Taghi Kilani et al., 1990; McDonald & Bancroft, 1998).

1.4 Sporozoitenproteine

Sporozoiten und Merozoiten stellen neben den Mikrogameten die invasiven Stadien des Parasiten *Cryptosporidium parvum* dar. Den Mikronemen des Apikalkomplexes wird in Analogie zu anderen Parasiten der Apikomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*) eine entscheidende Rolle bei der Erkennung der Wirtszelle, der Bindung und bei der Fortbewegung der Zoiten zugesprochen (Dubremetz et al., 1998). Erste Daten über die Beteiligung von Mikronemenproteinen bei der Wirtszellinvasion stammen aus der Entdeckung einer Gruppe von Adhäsionsproteinen bei *Plasmodium* spp. (Camus & Hadley, 1985), die später als Mikronemenproteine identifiziert werden konnten (Adams et al., 1990).

In den letzten Jahren wurde bei *C. parvum* eine Reihe von Mikronemen- und Oberflächenproteinen der Zoitenstadien charakterisiert. Viele der Oberflächenproteine tragen Neutralisations-sensitive Epitope. Antikörper gegen ganze *C. parvum*-Organismen oder gegen isolierte Proteine können die infektiösen Sporozoiten und Merozoiten *in vitro* neutralisieren und *in vivo* zu einer Reduktion der Infektionsrate führen (Perryman et al., 1990; Doyle et al., 1993). Für manche Proteine, wie CSL und GP900, wurde auch eine direkte Beteiligung an der Parasit-Wirt-Interaktion nachgewiesen (Smith et al., 2005).

Einige Sporozoiten-Oberflächenproteine (z.B. GP900, P23, CP15 und CP17) können mit spezifischen Antikörpern in Kriechspuren von *C. parvum*-Sporozoiten nachgewiesen werden, die diese durch gleitende Bewegung auf Objektträgern hinterlassen. Dies wird als Hinweis auf die Beteiligung der Parasitenkomponenten bei der Fortbewegung der invasiven Stadien gedeutet. Die Kriechspuren sind jedoch nicht mit der Präzipitationsreaktion zu vergleichen, die Antikörper gegen CSP (circumsporozoite protein) von *Plasmodium falciparum* hervorrufen (Cochrane et al., 1976). Hierbei wird das durch Immunglobuline gebundene CSP von der Sporozoitenoberfläche abgeworfen.

Viele der Sporozoitenproteine von *C. parvum* wurden bisher vollständig kloniert, sequenziert und charakterisiert: Auf der Sporozoitenoberfläche wurden P23 (Perryman et al., 1996), CP15/60 (Jenkins et al., 1993), CP15 (Jenkins & Fayer, 1995), gp40 (Cevallos et al., 2000b) und CP17 (Priest et al., 2000) lokalisiert, in den Mikronemen GP900 (Barnes et al., 1998) und TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1; Spano et al., 1998).

CSL (circumsporozoite-like protein), ein stark glykosiliertes 1300 kDa Glykoprotein, ist in den Mikronemen und Dichte Granula des Apikalkomplexes, aber auch auf der Oberfläche von Sporozoiten und Merozoiten lokalisiert. Der monoklonale Antikörper 3E2 löst eine Präzipitationsreaktion ähnlich des CSP von *Plasmodium falciparum* aus und neutralisiert Infektionen *in vitro* und *in vivo* (Riggs et al., 1997; Riggs, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass CSL an einen 85 kDa-Rezeptor auf intestinalen Epithelzellen bindet (Langer & Riggs, 1999; Langer et al., 2001). CSL stellt vermutlich einen der Liganden dar, der die Bindung und die Invasion vermittelt.

GP900, ebenfalls ein Sporozoitenantigen, ist ein immunogenes Mucin-ähnliches stark glykosiliertes Glykoprotein von >900 kDa. Es konnte vor allem in den Mikronemen von Sporozoiten und Merozoiten (Bonnin et al., 2001), aber auch auf der Oberfläche intrazellulärer Merozoiten (Petersen et al., 1992) und auf der Oberfläche freier Sporozoiten und deren Kriechspuren detektiert werden (Barnes et al., 1998). Affinitätsgereinigtes, natives Protein kann die Invasion von MDCK-Wirtszellen durch Sporozoiten in Konzentrationen von wenigen Picomol um 50 % hemmen (Barnes et al., 1998). Dies legt nahe, dass GP900 eine direkte Rolle bei der Wirtszellbindung und -invasion spielt. Des Weiteren induziert es die Proliferation von Zellen der mesenterialen Lymphknoten infizierter C57BL/6J-Mäuse (Singh et al., 2005).

TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium-1*) wurde in den Mikronemen der *C. parvum*-Sporozoiten nachgewiesen und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit den Mikronemenproteinen MIC2 von *Toxoplasma* und Etp100 von *Eimeria*, welche bei der Bindung an die Wirtszelle und/oder der Invasion beteiligt sind (Spano et al., 1998). Diese gehören zu einer Familie stark konservierter Mikronemenproteine, die zunächst in *Plasmodium* spp. (Robson et al., 1988), danach auch in *Eimeria* (Tomley et al., 1991) und *Toxoplasma gondii* (Wan et al., 1997) charakterisiert wurden. Die Proteine besitzen konservierte Domänen, einschließlich eines Thrombospondin-ähnlichen Motivs und zählen daher zur Thrombospondin (TSP)-Familie. Bisher gibt es jedoch keine experimentellen Hinweise auf eine Beteiligung von TRAP-C1 bei der Bindung und Invasion.

CP15/60 ist ein Oberflächenantigen und konnte mit einem monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche von Sporozoiten und Merozoiten lokalisiert werden (Tilley et al., 1991; Tilley & Upton, 1991). Jenkins et al. (1993) isolierten die CP15/60-cDNA aus einer Sporozoiten-cDNA-Bibliothek mit Hilfe von Ratten-Antiserum. Sie kodiert für gemeinsame Epitope auf einem 15 kDa und einem 60 kDa Protein. Die

Aminosäuresequenz dieses Klons besitzt zwei N-Glykosilierungsmotive, eine Signalsequenz und eine Transmembranregion.

CP15 stellt ein immundominantes Antigen auf der Oberfläche von Sporozoiten dar. Serumantikörper von verschiedenen Säugetierspezies und von Menschen erkennen nach einer Infektion neben P23 vor allem auch CP15 (Reperant et al., 1994). Das Protein wurde mit einem monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche von Sporozoiten und Oozysten identifiziert (Jenkins & Fayer, 1995) und kann in den Kriechspuren gleitender Sporozoiten nachgewiesen werden (Tilley & Upton, 1994). Die Sequenz von CP15 zeigt keine N-Glykosilierungsstelle, jedoch mehrere potentielle O-Glykosilierungsstellen (Jenkins & Fayer, 1995).

gp40 ist ein weiteres Mucin-ähnliches O-glykosiliertes Glykoprotein. gp40-spezifische Antiseren neutralisieren Infektionen *in vitro* und natives gp40 bindet spezifisch an Wirtszellen, was suggeriert, dass das Protein bei der Adhäsion und/oder der Invasion beteiligt ist (Cevallos et al., 2000b). Das für gp40 kodierende Gen CPgp40/15 wurde von Cevallos et al. (2000b) kloniert und sequenziert. Es kodiert C-terminal zusätzlich für ein 15/17 kDa Glykoprotein (gp15). Die Klonierung wurde parallel auch von Priest et al. (2000; Cp17), Strong et al. (2000; gp15/45/60) und Winter et al. (2000; S60/S16/S45) beschrieben. Die Proteine gp15 und gp40 sind Produkte der proteolytischen Spaltung eines 49 kDa Präkursorproteins, welches nur in intrazellulären Stadien von *C. parvum* exprimiert wird (Cevallos et al., 2000b; Strong et al., 2000). Auch wenn die beiden Proteine durch dasselbe Gen kodiert werden, sind sie antigenetisch von einander verschieden und auch unterschiedlich lokalisiert. Anti-gp40-Antiserum reagiert hauptsächlich mit der Oberfläche im vorderen Bereich der Sporozoiten, was auf eine Lokalisation im Apikalkomplex hinweisen könnte. Dagegen war gp15 auf der gesamten Oberfläche von Sporozoiten und Merozoiten nachzuweisen (Cevallos et al., 2000b; Cevallos et al., 2000a; Gut & Nelson, 1994; Strong et al., 2000). Mit Hilfe eines gegen rCP17 (gp15) hergestellten polyklonalen Kaninchen-Antiserums konnten wir dieses Protein auch als Bestandteil der Mikronemenfraktion der Sporozoiten identifizieren (nicht publizierte Daten). Beide Proteine können zusätzlich in den Kriechspuren der invasiven Stadien detektiert werden. Das im Folgenden **CP17** genannte gp15 wird durch Antikörper in Seren von Kryptosporidiose-Patienten erkannt und zählt zu den immundominanten Oberflächenproteinen von *C. parvum* (Priest et al., 1999). Spezifische monoklonale Antikörper (CrA1, CrA2) konnten einen partiellen Schutz in SCID-Mäusen nach oraler Verabreichung von Oozysten verleihen (Strong et al., 2000). CP17 weist die Eigenschaften

eines typischen Membranproteins auf und besitzt eine hydrophobe Region am C-Terminus, deren Sequenz ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Kopplungsmotiv aufweist. Priest et al. (2001) konnten eine GPI-Verankerung nachweisen.

P23 stellt ein weiteres Hauptantigen von *C. parvum* dar. Das Protein führt im Menschen und Tieren nach erfolgter Infektion zu einer spezifischen Antikörperantwort (Mead et al., 1988). P23-reaktive Antikörper gelten als ein Marker für eine Infektion mit dem Parasiten (Ungar & Nash, 1986). Für rekombinantes P23 konnte gezeigt werden, dass es eine spezifische proliferative Antwort von Lymphozyten nach erfolgter Infektion stimuliert (Bonafonte et al., 2000; Smith et al., 2001b; Wyatt et al., 2005). Immunfluoreszenzanalysen lokalisierten P23 auf der Oberfläche von Sporozoen und Merozoiten (Mead et al., 1988; Arrowood et al., 1989; Perryman et al., 1996). Die Aminosäuresequenz weist jedoch keine offensichtlichen Signalsequenzen oder hydrophoben Sequenzen, die normalerweise für ein Membranprotein charakteristisch sind, auf (Perryman et al., 1996). Es ist bisher noch unbekannt, ob und wie P23 in der Sporozoenmembran verankert ist. Des Weiteren konnte P23 in den Kriechspuren gleitender Sporozoen nachgewiesen werden, die diese auf festen Substraten hinterlassen (Arrowood et al., 1991). P23 spielt vermutlich auch eine wichtige Rolle bei der Wirtszellerkennung und -bindung. Die Applikation von Antikörpern gegen Neutralisations-sensitive Epitope von P23 bewirkt eine Reduktion der Infektionsrate im neonatalen BALB/c-Mausmodell (Perryman et al., 1996; Enriquez & Riggs, 1998). Die Antikörper scheinen die Beweglichkeit und das Invasionsvermögen der Sporozoen von *C. parvum* herabzusetzen oder vollkommen zu inhibieren. Die Nukleotidsequenz von P23 wurde unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen kloniert, charakterisiert und in der EMBL/GenBank veröffentlicht. Perryman et al. (1996) gelang die Klonierung von P23 mit monoklonalen Antikörpern, die ein Neutralisations-sensitives Epitop von P23 erkennen und *in vitro* zur Minderung der Infektionsrate von *C. parvum* führten. Petry (1998b) isolierte den Klon mit anti-*C. parvum*-Antiserum aus einer λ gt11-Phagenbibliothek. Die Nukleotidsequenz kodiert für ein 111 Aminosäuren umfassendes Polypeptid, das reich an Alanin- und Prolinresten ist und ein N-Glykosilierungsmotiv N-X-S enthält. Obwohl das errechnete Molekulargewicht 11,3 kDa beträgt, zeigt sich in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 23 kDa (Perryman et al., 1996). Die Diskrepanz ist jedoch nicht auf eine mögliche N-Glykosilierung zurückzuführen. Rekombinantes P23 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem N-terminalen 6xHistidin-Anhang (circa 3 kDa) in *E. coli* exprimiert und zeigte in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 26 kDa.

P23 wurde auch als 20 kDa- (Mead et al., 1988), 25 kDa- (Tilley & Upton, 1994) und 27 kDa-Protein (Priest et al., 1999) beschrieben. Da das Protein jeweils von denselben monoklonalen Antikörpern erkannt wurde, werden die Größenunterschiede auf unterschiedliche Bedingungen in der SDS-PAGE zurückgeführt.

1.5 *In vitro* Kultivierung von *C. parvum*

Der komplexe Entwicklungszyklus des Darmparasiten *Cryptosporidium parvum* beinhaltet die Ausbildung verschiedener asexueller und sexueller Stadien. Die Invasion und die Entwicklung des Parasiten in Wirtszellen kann *in vitro* über mehrere Tage verfolgt werden. Hierbei werden 'Monolayer' von permanenten Zelllinien mit Oozysten oder gereinigten Sporozoiten infiziert. Die Infektionsrate ist abhängig von der verwendeten Wirtszelllinie, der Anzahl der zugegebenen Oozysten, der Exzystierungsrate, welche die Vitalität der Oozysten und die Anzahl der freigesetzten Sporozoiten widerspiegelt, und der Tatsache, dass nicht alle Sporozoiten an Wirtszellen binden und invadieren. Viele Studien beschäftigten sich in der Vergangenheit mit der Suche nach der am besten geeigneten Wirtszelllinie und der Optimierung der Kulturbedingungen (Upton et al., 1994a; Upton et al., 1994b; Yu et al., 2000; Upton et al., 1995; Upton, 1997). In verschiedenen Kultursystemen, z.B. mit HCT-8- oder VELI-Zellen, kann eine Vollendung des Entwicklungszyklus bis zur Bildung von Oozysten beobachtet werden (Arrowood, 2002; Lacharme et al., 2004). Dennoch ist es nach wie vor nicht möglich, den Parasiten langfristig zu kultivieren, um unter anderem experimentelle Infektionen von Kälbern oder Mäusen zur Gewinnung von großen Mengen an Oozysten ersetzen zu können.

In vitro Kulturen werden zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen verwendet. Sie kommen unter anderem bei der Austestung möglicher therapeutisch wirksamer Substanzen (Woods et al., 1996; Woods & Upton, 1998; Nelson & Rosowsky, 2001; Hommer et al., 2003) oder bei der Überprüfung der Vitalität bzw. Infektiosität von Oozysten zum Beispiel nach Behandlung mit Desinfektionsmitteln oder UV-Bestrahlung zum Einsatz (Joachim et al., 2003; Weir et al., 2002; Rochelle, 2004). Des Weiteren dienen sie zur Aufschlüsselung der intrazellulären Entwicklung und ermöglichen es, die Wirtszellantwort zu studieren (Chen et al., 1998; Chen et al., 1999; Chen & LaRusso, 2000; Ojcius et al., 1999; McCole et al., 2000; Widmer et al., 2000). Die Überprüfung der Entwicklung und der Replikation des Parasiten erfolgt in der Regel mit mikroskopischen Verfahren wie Differenzial-Interferenzkontrast und Immunfluoreszenztests mit parasitenspezifischen Antikörpern, Zell-Enzymimmunoassays (ELISA) oder PCR-Analysen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl das Interesse an der Erkrankung und dem Erreger in den letzten Jahren durch die zunehmende Bedeutung von *Cryptosporidium parvum* in der Veterinärmedizin und als opportunistischer Erreger bei Patienten mit eingeschränkter Immunabwehr, vor allem AIDS-Patienten, wuchs, gibt es nach wie vor keine effektive, spezifische Therapie gegen eine Kryptosporidiose. Daher ist es von Nöten, die Immunantwort des Wirtes gegen den Parasiten und dessen Bindung, Invasion und die intrazelluläre Entwicklung in den Epithelzellen eingehend zu studieren, um neue Ansatzpunkte zu ermitteln.

Ziel dieser Arbeit war es, Infektionsmodelle zu etablieren und Immunisierungsstrategien zu entwickeln, die zum besseren Verständnis der immunologischen Antwort bei einer Infektion mit dem Darmparasiten *C. parvum* beitragen. Des Weiteren sollte die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* in infizierten Wirtszellen *in vitro* verfolgt und unter anderem die differentielle Expression von *C. parvum*-Genen in den infizierten Zellen untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Funktion der entsprechenden Proteine im Entwicklungszyklus ziehen zu können.

Infektionsstudien an IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen

Neben CD4⁺-T-Zellen spielen auch die Zytokine Interferon- γ und Interleukin-12 bei Mäusen eine entscheidende Rolle in der Resistenz vor einer *C. parvum*-Infektion. Für IFN- γ - und IL-12-defiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass sie eine Suszeptibilität gegenüber einer Erstinfektion besitzen. IL-12 p40 (IL12KO)- und IFN- γ (GKO)-Knockout-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus, zwei bereits in der Literatur beschriebene Infektionsmodelle, konnten im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal parallel unter gleichen Bedingungen, mit demselben *C. parvum*-Isolat und derselben Infektionsdosis infiziert und direkt miteinander verglichen werden. Unterschiede in der Ausprägung der Infektion, der Höhe der Parasitenausscheidung und dem Infektionsverlauf sollten Rückschlüsse auf die Funktion und die Bedeutung der beiden T_H1-Zytokine IFN- γ und IL-12 bei der Auseinandersetzung mit dem Parasiten und der Überwindung einer Infektion zulassen. Als Parameter dienten die Parasitenausscheidung mit dem Stuhl und die Nachweisbarkeit von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren im Ileum.

Ein großes Interesse galt zusätzlich auch der humoralen Immunantwort infolge einer Infektion von GKO- und IL12KO-Mäusen. Es sollte untersucht werden, in wie weit sich

eine Antikörperantwort bei den Knockout-Mäuse aufbaut, wie sie sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten *post infectionem* verhält und ob man von der Höhe der Antikörpertiter Rückschlüsse auf die Suszeptibilität der Mäuse und die Schwere einer Infektion ziehen kann. In den serologischen Untersuchungen sollte zunächst Parasitenlysat als Antigen zum Einsatz kommen. Weiterführend war auch das Antigenspektrum zu untersuchen und hier vor allem die Rolle der beiden Hauptantigene P23 und CP17, welche in der Regel von Antikörpern in den Seren von Personen, die bereits mit dem Parasiten konfrontiert wurden, erkannt werden. Dazu war die Expression der beiden immundominanten Sporozoiten-Oberflächenproteine in prokaryontischen Expressionssystemen notwendig, die dann als affinitätsgereinigte rekombinante Proteine in neu zu etablierenden ELISA- und Westernblot-Systemen als Antigene eingesetzt werden sollten.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde deutlich, dass sowohl IL-12 p40- als auch IFN- γ -Knockout-Mäuse eine Infektion mit *C. parvum* innerhalb von zwei Wochen überwand. Den beiden Zytokinen IFN- γ und IL-12 kommt damit zwar eine große Bedeutung bei der Resistenz vor einer ersten Infektion zu, es stellte sich jetzt jedoch die Frage, welche Rolle sie bei der Überwindung einer Infektion, innerhalb der Immunantwort bei einer zweiten Konfrontation mit dem Parasiten bzw. bei einer eventuellen Resistenzentwicklung vor einer erneuten Infektion spielen. In weiterführenden Versuchen sollten die Knockout-Mäuse daher noch einmal infiziert und der Infektionsverlauf auf Basis der Parasitenausscheidung und der Nachweisbarkeit *C. parvum*-spezifischer Nukleinsäuren im Ileum verfolgt werden. Die bereits beschriebenen serologischen Untersuchungen sollten zudem darüber Aufschluss geben, ob sich eine erneute Auseinandersetzung mit dem Parasiten auch in der humoralen Immunantwort, das heißt der Höhe der Antikörpertiter, widerspiegelt.

Immunisierungsstudien an IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen

Bisher existieren weder ein Chemotherapeutikum, welches eine spezifisch Wirkung gegen Kryptosporidien zeigt, noch eine effektive Vakzine. Diese wäre jedoch vor allem in der Veterinärmedizin von großem Vorteil. In den Infektionsstudien konnte gezeigt werden, dass beide Knockout-Mausstämme in der Lage sind, eine Infektion mit *C. parvum* zu überwinden und einen Schutz vor einer Reinfektion aufzubauen. Es sollte daher nach einer Immunisierungsstrategie gesucht werden, die bei diesen Mäusen eine erste Konfrontation

mit dem Parasiten simulieren kann und an ihrer Stelle zur Etablierung einer schützenden Immunantwort führt. Ein erfolgreicher Applikationsweg kann darüber hinaus Hinweise auf die Zusammensetzung einer protektiven Immunantwort bei einer *C. parvum*-Infektion geben. Da die Knockout-Mäuse naiv suszeptibel für eine Infektion sind, konnte ein Immunisierungserfolg direkt anhand der Parasitenausscheidung gemessen werden.

In vitro* Kultivierung von *C. parvum

Die Kenntnisse über die molekulare Bedeutung und Funktion der Sporozoiten-Oberflächenproteine und der Proteine der sekretorischen Organellen des Apikalkomplexes bei der Invasion der Wirtszelle sind noch sehr gering. Im dritten Teil der Arbeit sollte die differentielle Expression von Sporozoiten-Oberflächenproteinen auf Ebene der RNA analysiert werden. Dazu wurden Wirtszellen mit *C. parvum*-Oozysten *in vitro* infiziert und die intrazelluläre Entwicklung über einen Zeitraum von vier Tagen verfolgt. Alle untersuchten Proteine können in den Kriechspuren der invasiven Zoitenstadien nachgewiesen werden, was als Hinweis auf deren Beteiligung bei der Motilität und Invasion gewertet wird. Zum Teil konnte auch eine Reduktion einer Infektion durch das Protein selbst oder spezifische Antikörper erzielt werden. Die Strukturen und Proteine, die tatsächlich bei der Bindung und Invasion von Wirtszellen beteiligt sind, sind bisher jedoch noch unbekannt. Der Nachweis einer differentiellen Expression sollte es ermöglichen, Rückschlüsse auf das Auftreten und die Funktion der Sporozoiten-Oberflächenproteine innerhalb des Entwicklungszyklus ziehen zu können. Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der intrazellulären Entwicklung bzw. dem Auftreten der kodierten Proteine hergestellt werden kann, sollten die intrazellulären Parasitenstadien parallel auch mit Hilfe von Stadien-reaktiven und Antigen-spezifischen Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert werden. Als Antigen-spezifische Antikörper waren Kaninchen-Antiseren gegen rekombinante Formen von Sporozoiten-Oberflächenproteinen zu generieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Parasiten

Das in dieser Arbeit verwendete Isolat von *Cryptosporidium parvum*, Stamm IOWA, wurde von Mrs. Patricia Mason, Pleasant Hill Farm, Troy, Idaho, USA und ab Januar 2004 von Mr. Geoff Pritchard, Bunch Grass Farm, Deary, Idaho, USA bezogen. Dieser tier- und humanpathogene Stamm wird in neonatalen Holstein-Kälbern mit Hilfe experimenteller Infektionen passagiert. Die Oozysten werden durch Zentrifugation in einem Sucrose-Dichte-Gradienten gereinigt und als Suspension in PBS mit 1000 Einheiten Penicillin und 1000 µg Streptomycin pro ml PBS geliefert (Coulliette et al., 2006). In unserem Labor wurden die Oozysten bis zu sechs Monaten bei 4°C gelagert.

2.1.2 Bakterienstämme

Stamm	Organismus	Genotyp	Bezugsquelle
TOP10	<i>E. coli</i>	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Rosetta-gami B (DE3)	<i>E. coli</i>	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> <i>aphC</i> <i>gor522::Tn10</i> (Tc ^R) <i>trxB::kan</i> (DE3) pRARE (Cm ^R)	Merck Biosciences (Schwalbach)

2.1.3 Zelllinien

Für *in vitro* Infektionsstudien mit dem Parasiten *C. parvum* wurde die humane ileocecale Adenokarzinom-Zelllinie HCT-8 (CCL-244, ATCC) eingesetzt.

2.1.4 Tiere

Mausstämme

Verschiedene Mausstämme kamen im Rahmen von Infektionsstudien mit dem Darmparasiten *Cryptosporidium parvum* und Immunisierungen mit Parasitenlysat zum Einsatz. Die verwendeten Mäuse des Inzuchtstammes **C57BL/6** stammten aus der Zucht der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz. **Interleukin-12 p40-Knockout-Mäuse** (Magram et al., 1996) und **Interferon- γ -Knockout-Mäuse** (Dalton et al., 1993), beide mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus, wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Mainz, zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratory (Ann Habor; Interferon- γ -KO, syn. C57BL/6-*Ifng*^{tm1Ts}; kurz: GKO) bzw. Dr. Maurice Gately (ehemals Hoffmann-LaRoche; C57BL/6-IL-12 p40-KO; kurz: IL12KO) bezogen. Die weitere Zucht der Tiere erfolgte in den Räumlichkeiten der ZVTE unter Spezifisch-Pathogen-freien (SPF)-Bedingungen. Dies beinhaltet die Haltung der Mäuse in Filterdeckel-Käfigen, Sterilisation des Futters, Einstreu, Käfige etc., Hantieren der Tiere unter Klasse II Laminar-Flow-Werkbänken, sowie Tragen kompletter Schutzkleidung (Schuhe, Überschuhe, Hosen, Kittel, Mund-Nasenschutz, OP-Haube, Handschuhe). Die Tiere standen unter mikrobiologischem Monitoring durch die ZVTE, bei dem gezielt auf mauspathogene Viren, Bakterien und Ektoparasiten untersucht wurde.

Kaninchen

Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen die rekombinanten Sporozoiten-Oberflächenproteine P23 und CP17 und Lysat aus *C. parvum*-Oozysten wurden 3 Monate alte New Zealand White Kaninchen verwendet, die von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden.

2.1.5 Plasmide zur heterologen Genexpression in *E. coli*

Die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* erfolgte mit den Expressionsvektoren pTrcHis (Invitrogen, Karlsruhe) und pGEX (Pharmacia, Erlangen).

Der **pTrcHis**-Expressionvektor (4,4 kb) verwendet den *trc*-Promoter für eine sehr starke, regulierbare Expression von rekombinanten Proteinen. Der *trc*-Promoter ist ein starker

Hybridpromoter, der sich von den *trp*- und *lac*-Promotoren ableitet und durch den *lacO*-Operator und das Produkt des *lacI^q*-Gens reguliert wird. Zusätzlich verfügt der Vektor über ein Minicistron-Element stromaufwärts des Startkodons, welches eine starke Ribosomenbindungsstelle und ein Translationsterminationskodon beinhaltet und damit eine effiziente Translation von eukaryontischen Proteinen in *E. coli* erlaubt. Die Selektion von Klonen erfolgt über ein Ampicillin-Resistenzgen. Die rekombinanten Proteine werden mit einem N-terminalen 6xHistidin-Anhang exprimiert, welcher eine Detektion des Fusionsproteins erleichtert und eine Reinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie ermöglicht. Des Weiteren besitzt das rekombinante Fusionsprotein eine Enterokinaseerkennungssequenz, so dass der N-terminale Anhang abgespalten werden kann.

Der Expressionsvektor **pGEX** (4,9 kb) erlaubt eine chemisch induzierbare, starke Expression von rekombinanten Proteinen als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. Die Expression steht unter der Kontrolle des *tac*-Promoters. Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion von positiven *E. coli*-Klonen. Die GST-Fusionsproteine können mit Hilfe eines anti-GST-Antikörpers detektiert und aus dem Bakterienlysat durch Affinitätschromatographie über immobilisiertes Glutathion gereinigt werden. Eine Abspaltung des gewünschten Proteins von der GST (26 kDa) erfolgt über sequenzspezifische Proteasen (z.B. Thrombin), deren Erkennungssequenzen direkt stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle liegen.

2.1.6 Primer

Zielsequenzen

Sequenz	Spezies	Zugangsnummer
P23	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Y16243
CP15	<i>Cryptosporidium parvum</i>	L34568
CP17	<i>Cryptosporidium parvum</i>	AF114166
Cp3.4 (GP900)	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Y09042
COWP	<i>Cryptosporidium parvum</i>	AY277701
18S rRNA	<i>Cryptosporidium parvum</i>	L16996
IL-4	<i>Mus musculus</i>	M25892

IL-12 p40	<i>Mus musculus</i>	NM_008352
IFN- γ	<i>Mus musculus</i>	NM_008337
GAPDH	<i>Mus musculus</i>	M32599
GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	BC026907

In den nachfolgenden Tabellen ist in der Spalte 'Lokalisation' der Abschnitt der DNA-Sequenz angegeben, an den der jeweilige Primer spezifisch bindet. Die Angaben der Basenpaare beziehen sich auf die in der EMBL/GenBank unter den oben aufgelisteten Zugangsnummern veröffentlichten Sequenzen.

Klonierung der Sporoziten-Oberflächenproteine P23 und CP17

Name	Sequenz	Lokalisation	Eigenschaften
expr.MZ-2F (P23)	5'-GGAATTCAAAAATGGGTTGTTCTGC-3'	bp 14-31	<i>EcoR</i> I-Schnittstelle; Startkodon ATG
MZ4 Rev (P23)	5'-GGAATTCTTAACAATAATTTAGGC-3'	bp 348-364	<i>EcoR</i> I-Schnittstelle; Stoppkodon TAA
CP17MAT-F	5'-CGCGGATCCGAAACCAGTGAAGCTGCTGC-3'	bp 950-969	<i>BamH</i> I-Schnittstelle; ohne Startkodon
CP17MAT-R	5'-GCGGAATTCTTAATCCTTCAAAAGAACTGTG-3'	bp 1168-1186	<i>EcoR</i> I-Schnittstelle; Stoppkodon TAA

Innerhalb der Primersequenzen ist der Bereich, der spezifisch an die Ziel-DNA-Sequenz bindet, grau unterlegt.

PCR und RT-PCR zum Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren

Name	Sequenz	Lokalisation
P23-F	5'-ATCCAGCTCCAATCAGCAAC-3'	bp 136-155
P23-R	5'-CTTGTTGAGCAGCAGGTTCA-3'	bp 314-333
CP15-F	5'-TGTCCAATGGGAGAGAAACC-3'	bp 133-152

CP15-R	5'-GCCTGGCTTACCATGACGTA-3'	bp 311-330
CP17-F	5'-TGAAGTGGCTGTACCAAACG-3'	bp 1015-1034
CP17-R	5'-GTCCAAAAGCAGAGGAACCA-3'	bp 1189-1208
Cp3.4-F (GP900)	5'-CTGGTTTGCCATATGATCCA-3'	bp 209-228
Cp3.4-R (GP900)	5'-GGAAGTTGTGGGAGTCCTGA-3'	bp 382-401
COWP-F	5'-AGAATCGACATGCCACCTA-3'	bp 281-300
COWP-R	5'-AGGGCAGACAGGTTGAGTTG-3'	bp 472-491
C.p. 18S rRNA-F	5'-CTAGAGATTGGAGGTTGTTCC-3'	bp 996-1016
C.p. 18S rRNA-R	5'-CTCCACCAACTAAGAACGGC-3'	bp 1232-1251

RT-PCR zum Nachweis der Zytokin-Expression

Name	Sequenz	Lokalisation
IL-4v2s	5'-TCAACCCCCAGCTAGTTGTC-3'	bp 95-114
IL4-as	5'-TGTTCTTCGTTGCTGTGAGG-3'	bp 252-271
muP40-5	5'-CCTCAGAAGCTAACCATCTCC-3'	bp 169-189
muP40-3	5'-TTTGGTGCTTCACACTTCAGG-3'	bp 537-557
muIFNg5	5'-CACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGT-3'	bp 181-205
muIFNg3	5'-GCTGTTGCTGAAGAAGGTAGTAATC-3'	bp 403-427

Primer für die Amplifikation von DNA bzw. cDNA der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)

Name	Sequenz	Lokalisation
msGAPDH-F (Maus)	5'-GCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3'	bp 111-130
msGAPDH-R (Maus)	5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'	bp 240-359
huGAPDH-F (human)	5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'	bp 276-295
huGAPDH-R (human)	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'	bp 250-569

Bis auf die Primer für die Klonierungen und die 18S rRNA-Primer wurden alle Primer mit der Primer3 Software (Rozen & Skaletsky, 2000) entwickelt. Um einheitliche Amplifikationsprofile zu erhalten, wurden die Primer so gewählt, dass sie einen GC-Gehalt

von annähernd 50 %, eine T_m von 60°C und eine Produktgröße von ungefähr 200 bp besaßen. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

2.1.7 DNA-Längenstandards

100 bp DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
1 kb DNA Ladder	NEB, Bad Schwalbach
Lambda DNA	NEB, Bad Schwalbach

2.1.8 Protein-Molekulargewichtsmarker

Benchmark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Prestained Protein ladder ~10-180 kDa	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.9 Antikörper

Unmarkierte Antikörper

Antigen	Name		Isotyp	Spezies	Bezugsquelle
P23 (<i>C. parvum</i>)	3E3	mAk	IgG	Maus	Dunn (Asbach)
P23 (<i>C. parvum</i>)	rb104	Antiserum		Kaninchen	diese Arbeit
CP17 (<i>C. parvum</i>)	rb101	Antiserum		Kaninchen	diese Arbeit
intrazelluläre Stadien von <i>C. parvum</i>	2C3	mAk	IgG	Maus	(McDonald et al., 1995)
späte intrazelluläre Stadien und Oozysten von <i>C. parvum</i>	1B5	mAk	IgM	Maus	(McDonald et al., 1995)
Lysat aus <i>C. parvum</i> - Oozysten	rb115	Antiserum		Kaninchen	diese Arbeit
GST	anti-GST	Antiserum	IgG	Kaninchen	Sigma (Deisenhofen)

Markierte Antikörper für ELISA und Westernblot

Antigen	Spezifität	Spezies	Konjugat	Bezugsquelle
Maus IgG	γ -Kette	Ziege	AP	Sigma (Deisenhofen)
Maus IgG	γ -Kette	Ziege	Biotin	Sigma (Deisenhofen)
Maus IgG1	γ 1-Kette	Ziege	Biotin	Biozol (Eching)
Maus IgG2a	γ 2a-Kette	Ziege	Biotin	Biozol (Eching)
Maus IgM	μ -Kette	Ziege	AP	Sigma (Deisenhofen)
Maus IgA	α -Kette	Ziege	AP	Sigma (Deisenhofen)
Maus IgA	α -Kette	Ziege	Biotin	Sigma (Deisenhofen)
Kaninchen IgG		Ziege	AP	Sigma (Deisenhofen)

Markierte Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz

Antigen	Spezifität	Spezies	Konjugat	Hersteller
Maus IgG	H- + L-Kette	Ziege	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Maus IgG	H- + L-Kette	Ziege	Alexa Fluor 594	Molecular Probes
Maus IgM	μ -Kette	Ziege	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Kaninchen IgG	H- + L-Kette	Ziege	Alexa Fluor 488	Molecular Probes

Antikörper von Molecular Probes (USA) wurden über die Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

2.1.10 Enzyme

Restriktionsendonukleasen (<i>Bam</i> H I, <i>Eco</i> R I)	NEB (Bad Schwalbach)
SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase)	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	NEB (Bad Schwalbach)
Taq-DNA-Polymerase	NEB (Bad Schwalbach)
HotStar Taq	Qiagen (Hilden)
Expand™ High-Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim
Lysozym	Sigma (Deisenhofen)
Thrombin	Pharmacia (Erlangen)

2.1.11 Antibiotika und Antimykotika

Ampicillin	ICN (Eschwege)
Chloramphenicol	Sigma (Deisenhofen)
Kanamycin	Fluka (Neu Ulm)
Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml / 10000 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Tetracyclin	Sigma (Deisenhofen)
Fungizone (Amphotericin B)	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.12 Proteaseinhibitoren

Bestatin	4 mg/ml in Methanol (100x)
E64	5 mg/ml in 50 % Ethanol (500x)
Pefabloc	100 mg/ml in H ₂ O (100x)
Pepstatin	1 mg/ml in Ethanol (1500x)
alle Boehringer Mannheim	

2.1.13 Reagenzien und Chemikalien

Acrylamid	Sigma (Deisenhofen)
Agar	BD GmbH (Heidelberg)
Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma (Deisenhofen)
4-Aminobenzoesäure	Sigma (Deisenhofen)
Ascorbinsäure	Sigma (Deisenhofen)
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat)	Sigma (Deisenhofen)
Borsäure	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma (Deisenhofen)
Ca-Pantothenat	Sigma (Deisenhofen)
Coomassie Brilliant Blue	Serva (Heidelberg)

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma (Deisenhofen)
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Invitrogen (Karlsruhe)
Diethanolamin	Sigma (Deisenhofen)
DMF (Dimethylformamid)	Sigma (Deisenhofen)
DMSO (Dimethylsulphoxid)	Sigma (Deisenhofen)
DPBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, endotoxinfrei)	Sigma (Deisenhofen)
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	GERBU (Gaiberg)
Ethanol (für die Arbeit mit DNA)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
FCS (Fötale Kälberserum)	PAA (Cölbe)
Folsäure	Sigma (Deisenhofen)
Formaldehyd (ca. 36 %)	Roth (Karlsruhe)
Formamid	Fluka (Neu Ulm)
Gelatine	Sigma (Deisenhofen)
(D-)Glukose	Merck (Darmstadt)
Glukose (für <i>C. parvum</i> -Wachstumsmedium)	Sigma (Deisenhofen)
Glutathion	Sigma (Deisenhofen)
Glycin	Sigma (Deisenhofen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycerin (für Fluoreszenzmikroskopie)	Merck (Darmstadt)
Hefe-Extrakt	BD GmbH (Heidelberg)
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2 -ethansulfonsäure)	Invitrogen (Karlsruhe)
H ₂ SO ₄	Merck (Darmstadt)
Imidazol	Fluka (Neu Ulm)
Insulin	Sigma (Deisenhofen)
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
2-Methyl-2-butanol	Fluka (Neu Ulm)
Milchpulver	Heirler (Radolfzell)
MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)	Sigma (Deisenhofen)
Natrium-Taurocholat	Sigma (Deisenhofen)
NBT (Nitro Blau Tetrazolium)	Sigma (Deisenhofen)
pNpp (p-Nitrophenyl Phosphat)	Sigma (Deisenhofen)

N,N'-Methylen-bis-Acrylamid	Sigma (Deisenhofen)
OPD (o-Phenylenediamin)	Sigma (Deisenhofen)
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma (Deisenhofen)
Polyethylenglykol (M _r 3350)	Sigma (Deisenhofen)
Poly-L-Lysin	Sigma (Deisenhofen)
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma (Deisenhofen)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma (Deisenhofen)
2,2,2-Tribromoethanol	Fluka (Neu Ulm)
tri-Na-Citrat	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypanblau	Serva (Heidelberg)
Trypton	BD GmbH (Heidelberg)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen)

Alle nicht gesondert aufgeführten Reagenzien und Chemikalien, einschließlich anorganischer Salze, Säuren, Basen und organischer Lösungsmittel wurden von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen oder sind im Text der jeweiligen Methode aufgelistet.

2.1.14 Medien

Medien für die Bakterienkultur

LB (Luria-Bertani)-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % bzw. 1 % (w/v) NaCl pH 7,3 - 7,4
LBG-Medium	LB-Medium + 20-25 mM Glukose

Zur Herstellung von Nährböden wurde dem Flüssigmedium 1,5 % Agar (w/v) zugesetzt.

Medien für die Kultur von Säugetierzellen

HCT-8-Medium	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Glutamin (200 mM) 1 % (v/v) Na-Pyruvat (100 mM) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	90 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
<i>C. parvum</i> -Wachstumsmedium (Upton et al., 1995)	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 15 mM HEPES 50 mM Glukose 1 % (v/v) Glutamin (200 mM) 35 µg/ml Ascorbinsäure 2 µg/ml Ca-Pantothenat 0,1 U/ml Insulin 1 µg/ml Folsäure 4 µg/ml 4-Aminbenzoesäure 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 0,25 µg/ml Amphotericin B

Stammlösungen:

Ascorbinsäure (1000x)	35 mg/ml in H ₂ O, pH 5-6
Folsäure (1000x)	1 mg/ml in 20 mM Tris, pH 8,5
4-Aminbenzoesäure (1000x)	4 mg/ml in H ₂ O
Ca-Pantothenat (1000x)	2 mg/ml in H ₂ O
Glukose (50x)	2,5 M in H ₂ O
Insulin (500x)	50 U/ml in H ₂ O, pH 2,0

Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bis auf Insulin (4°C) bei -20°C gelagert.

FCS wurde vor Gebrauch für 20 min bei 56°C hitzebehandelt.

Medien und Medienzusätze für die Kultur von Säugetierzellen, außer DMSO (Sigma, Deisenhofen), wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bzw. PAA (Cölbe) bezogen.

2.1.15 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich gereinigtes 18 Megaohm-Wasser (Membrapur, Bodenheim) verwendet. Der pH-Wert wurde, wenn nicht gesondert aufgeführt, mit konzentrierter und 1 M HCl bzw. 5 M NaOH bei Raumtemperatur eingestellt (pH-Meter: WTW, Weilheim). Die elektrische Leitfähigkeit, gemessen in Milli-Siemens (mS), wurde mit NaCl an einem Leitfähigkeitsmessgerät der Firma Hillerkurs (Uerdingen) eingestellt.

Nachfolgend sind häufig verwendete Puffer aufgeführt. Spezielle Puffer sind in der Beschreibung der jeweiligen Methode angegeben.

Puffer für Elektrophoresen

TBE (10x)	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8,3
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerin in TE; pH 8,0
MOPS-Puffer (10x)	200 mM MOPS 50 mM NaAcetat (Stammlösung: 3 M, pH 6,0) 10 mM EDTA (Stammlösung: 0,5 M, pH 8,0)

RNA-Probenpuffer	7,2 ml Formamid 1,6 ml MOPS-Puffer (10x) 2,6 ml Formaldehyd (37 %) 1 ml Glycerin (80 %) 0,8 ml Bromphenolblau (gesättigte Lösung) 1,8 ml RNase-freies H ₂ O
Protein-Probenpuffer (5x)	15 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 1,5 % (w/v) Bromphenolblau
Acrylamid/Bis	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N'-Methylen-bis-Acrylamid oder Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	25 mM Tris 200 mM Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,3
Sammelgel-Puffer für SDS-PAGE	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
Trenngel-Puffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8

Puffer für immunochemische Nachweise

Blotpuffer	10 % Tris/Glycin (10x) pH 9,2 20 % (v/v) Methanol 70 % (v/v) H ₂ O
------------	---

Tris/Glycin (10x)	0,48 M Tris 0,39 M Glycin pH 9,2
AP-Substratpuffer (Westernblot)	0,1 M NaCl 500 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 0,1 M Tris pH 9,5
BCIP-Stammlösung	25 mg/ml BCIP in DMF
NBT-Stammlösung	10 mg/ml NBT in H ₂ O
Carbonatpuffer	15 mM Na ₂ CO ₃ 35 mM NaHCO ₃ pH 9,6
AP-Substratpuffer (ELISA)	1 M Diethanolamin 0,5 mM MgCl ₂ pH 9,6
POX-Substratpuffer (ELISA)	0,1 M tri-Na-Citrat 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O pH 5,0

Puffer für die proteinchemische Reinigung

Puffer für die Affinitätschromatographie mit NiNTA

Auftragspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 750 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
----------------	---

Waschpuffer	Auftragspuffer mit 20 mM Imidazol
Elutionspuffer	Auftragspuffer mit 500 mM Imidazol

Puffer für die Affinitätschromatographie mit GSTrap

Auftrags- und Waschpuffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3
Elutionspuffer	50 mM Tris 10 mM Glutathion pH 8,0

Alle Puffer für die proteinchemischen Reinigungen durch FPLC wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast.

Sonstige Puffer und Lösungen

PCR-Puffer (10x)	500 mM KCl 100 mM Tris 15 mM MgCl ₂ 0,1 % (w/v) Gelatine
PBS (Phosphate Buffered Saline)	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl pH 7,5; K=15 mS
PBS-T(ween)	PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20

PBS-K ⁺	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM KH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 15 mM KCl pH 7,4; K=15 mS
TBS (Tris Buffered Saline)	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,5
TBS-T(ween)	TBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
TE (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA
Coomassie-Lösung	0,175 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue in Entfärbelösung
Entfärbelösung für Coomassie	50 % (v/v) Methanol 40 % (v/v) H ₂ O 10 % (v/v) Essigsäure
TSS (transformation and storage solution)	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) NaCl 10 % (w/v) Polyethylenglykol (M _r 3350) 5 % (v/v) DMSO 5 % (v/v) MgCl ₂ (1 M) pH 6,5 sterilfiltrieren; bei 4°C circa 6 Monate haltbar

2.1.16 Geräte, Glas- und Kunststoffartikel

PCR-Maschine OmniGene Temperature Cycler	Hybaid (Heidelberg)
Photometer Ultrospec III	Pharmacia (Freiburg)
Transilluminator (302 nm)	Bachofer (Reutlingen)
Kühlzentrifugen: Minifuge GL	Heraeus (Hanau)
RC5C	Sorvall (Bad Nauheim)
Tischzentrifugen: 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Mikroskope:	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 25	
Axioskop 2 mit HBO 100	
Fluoreszenzeinheit, Axioacam HRc, Axiovision	
Fluoreszenzfiltersätze	
EX BP 510-560, BS FT 580, EM LP 590	
EX BP 450-490, BS FT 510, EM LP 515	
EX BP 365/12, BS FT 395, EM LP 397	
Digitalkamera DC120 Zoom	Kodak
Kodak Digital Science 1D Software	
Zählkammer, Neubauer	Labotec (Wiesbaden)
Brutschränke:	
Heraeus (Hanau), WTB-Binder (Tuttlingen), B. Braun (Certomat® H; Melsungen)	
Glasartikel	Schott (Mainz)
LabTek-Objektträger	Nunc (Wiesbaden)
Corex Zentrifugengläser	Neolab (Heidelberg)
Kunststoffartikel:	
25 cm ² (T25) und 75 cm ² (T75) Zellkulturflaschen	Nunc (Wiesbaden)
Sterilfilter	Millipore (Eschborn)
4, 10, 12, 15 und 50 ml Rörhchen	Greiner (Frickenhäusen)
1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenrörhchen 500 ml	Herolab (Wiesloch)
25 ml	Nalgene (USA)
Kryorörhchen	Nalgene (USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.1.1 Klonierung der Sporozoiten-Oberflächenproteine P23 und CP17

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die cDNAs der Sporozoiten-Oberflächenproteine P23 und CP17 von *C. parvum* für die Subklonierung in die Expressionsvektoren pTrcHisC und pGEX-4T-3 (P23) bzw. pGEX-4T-2 (CP17) aus cDNA von *C. parvum*-Oozysten bzw. -Sporozoiten, die in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Petry hergestellt wurde (Petry, 1998b), oder aus Vektoren, die die entsprechende cDNA bereits enthielten, amplifiziert. Die Primer expr.MZ-2F und MZ4 Rev umfassen die vollständige kodierende Sequenz von P23, die Primer CP17MAT-F und Cp17MAT-R nur ein Genfragment von CP17, welches für den C-Terminus des Proteins kodiert. Neben der spezifischen Sequenz enthielten diese Oligonukleotide Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (siehe 2.1.6).

Der Standard-Ansatz einer PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

cDNA von <i>C. parvum</i>	1-50 ng
bzw. Plasmid-DNA	7 ng
PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
5'- und 3'-Primer (je 20 pmol/µl)	je 1 µl
Taq- bzw. High-Fidelity-Polymerase	2,5 Units
H ₂ O	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

94°C	3 min	
94°C	45 sek	} 30-35 Zyklen
X°C	45 sek	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

Die Hybridisierungstemperatur (X) der Primerkombination für die Subklonierungen der cDNA von P23 (expr.MZ-2F und MZ4 Rev) betrug 57°C, von CP17 (CP17MAT-F und Cp17MAT-R) 65°C.

2.2.1.2 Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren und cDNA verschiedener Maus-Zytokine

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden zum einen genomische DNA und mRNA (cDNA) von *C. parvum* im Ileum infizierter Mäuse und in infizierten HCT-8-Zellen nachgewiesen. Des Weiteren wurde die mRNA (cDNA) verschiedener Zytokine im Ileum infizierter Mäuse amplifiziert.

Der Standard-Ansatz einer PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

cDNA (1 µl = 100 ng RNA)	1-2 µl
bzw. genomische DNA	100-200 ng
PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
5'- und 3'-Primer (je 20 pmol/µl)	je 1 µl
HotStar Taq Polymerase	2,5 Units
H ₂ O	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

95°C	15 min	
94°C	1 min	} 25-35 Zyklen
X°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

Die PCR und RT-PCR mit den spezifischen Primern für CP15, CP17, P23, GP900, COWP (alle *C. parvum*), für humanes und murines GAPDH und für die murinen Zytokine IFN-γ und IL-4 wurden mit einer Hybridisierungstemperatur (X) von 60°C durchgeführt. Für die Amplifikation mit den 18S rRNA-Primern betrug die Hybridisierungstemperatur 55°C, mit den IL-12-Primern 58°C.

2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zum einen zur analytischen Längen- und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten und genomischer DNA eingesetzt, zum anderen zur präparativen Darstellung von DNA-Fragmenten, wobei die DNA nach der Elektrophorese aus der Agarose eluiert wurde. Die Proben wurden jeweils mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der DNA-Fragmente in 0,6-1,5 % Agarose-Gelen in 1xTBE-Puffer. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm Gel. Den Gelen wurde entweder direkt Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt, oder sie wurden nach der Auftrennung in 1xTBE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 30 min gefärbt. Die aufgetrennte DNA wurde mit UV-Licht (Transilluminator, 302 nm) sichtbar gemacht und mit einer digitalen Kamera (Kodak) dokumentiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit DNA-Längenstandards. Zur besseren Darstellung von schwächeren Banden wurden die Schwarzweiß-Aufnahmen invertiert.

2.2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von RNA

Im Anschluss an eine Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben wurde die RNA in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für das Gel wurden 0,5 g Agarose in 45 ml H₂O gelöst, 5 ml MOPS-Puffer (10x) und, nachdem die Lösung auf 55°C abgekühlt war, 2,7 ml Formaldehyd hinzugeben. Es wurden circa 2 µg Gesamt-RNA mit RNA-Probenpuffer auf ein Volumen von 10 µl gebracht, 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Um die RNA sichtbar zu machen, wurde entweder den Gelen oder den RNA-Proben Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml bzw. 1 µg/10 µl zugesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1xTBE-Puffer. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm Gel.

2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.3.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und hydrolysieren, in den vom Hersteller mitgelieferten Pufferlösungen nach Herstellerangaben bei einer Inkubationstemperatur von 37°C für 1-2 h. Anschließend wurde die Restriktion durch Auftrennung der entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung der 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase (Shrimp Alkalische Phosphatase, SAP) verhindert die Selbstligation von mit nur einem Restriktionsenzym linearisierter Vektor-DNA und erleichtert damit die Insertion von Fremd-DNA. Zu einem Restriktionsansatz wurde 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffers (10x) des Herstellers gegeben. Bei 1-2 µg Plasmid-DNA wurde 1 U der SAP zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten eine elektrophoretische Auftrennung der DNA und eine Elution aus dem Agarosegel.

2.2.3.3 Ligation

Die Ligation wurde in 10 µl Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten jeweils 20-50 ng restriktionsverdaute Plasmid-DNA, einen großen Überschuss (circa 500 ng) des zu inserierenden DNA-Fragments, 1/10 Volumen des Ligase-Puffers (10x) und 1 U T4-Ligase. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14-16°C inkubiert und direkt für die anschließende Transformation eingesetzt.

2.2.4 Transformation von Bakterien

E. coli **Top10** Bakterien wurden nach dem Protokoll 'Production of Competent *E. coli*, RF 1/2 Protocol' von Invitrogen (Karlsruhe) für die Aufnahme von DNA-Konstrukten kompetent gemacht und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* Top10 auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl Bakteriensuspension wurden 10 µl Ligationsansatz gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock von 45 sek bei 42°C für 2 min auf Eis abgekühlt. Es wurde 1 ml LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und dieser 1,5 h bei 37°C unter Schütteln (200 Upm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin (100 µg/ml)-haltige LB-Nährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zum Teil wurden Bakterien (z.B. **Rosetta-gami B(DE3)**) frisch kultiviert und direkt vor der Transformation kompetent gemacht. Die Bakterien wurden hierfür aus dem Glycerinstock auf einen LB-Nährboden ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert. 100 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C und 250 Upm so lange inkubiert, bis die OD bei 600 nm 0,4-0,5 betrug. Nach einer Zentrifugation bei 2500 x g für 15 min (4°C) wurden die Bakterien in 1/10 Volumen eiskaltem TSS resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Je Ansatz wurde zu 1 ml der Bakterien die gewünschte Plasmid-DNA gegeben und dieser 45 min auf Eis platziert. Nach einer Inkubation bei 42°C für 2 min wurden 100 µl der Bakteriensuspension direkt zu 900 µl vorgewärmtem LBG-Medium gegeben und für eine Stunde unter Schütteln (250 Upm) bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf Ampicillin (100 µg/ml)-haltige LBG-Nährböden ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

Gewachsene Bakterienkolonien wurden einzeln mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in Ampicillin-haltigem (50 µg/ml) LB- bzw. LBG-Medium über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler kultiviert. Aus den Bakterienkulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert und einer Kontrollrestriktion unterzogen.

2.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten für die Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen erfolgte mit Hilfe des 'QIAquick PCR Purification Kits' der Firma Qiagen GmbH (Hilden) nach Herstellerangaben.

2.2.5.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für Klonierungen verwendete DNA wurde zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Die zu eluierende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des 'QIAquick Gel Extraction Kits' der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben eluiert.

2.2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA für Transformationsexperimente, Restriktionsanalysen, Klonierungs- und Sequenzierverfahren wurde aus Bakterienkulturen mit Hilfe von Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Minipräparationen aus 1,5 ml Bakterienkulturen wurden mit dem 'QIAprep 8 Plasmid Kit' bzw. 'QIAprep Miniprep Kit', Maxipräparationen aus 300 ml Kulturen mit dem 'QIAfilter Plasmid Maxi Kit' durchgeführt. Bei Minipräparationen erfolgte die Elution der DNA von dem Säulenmaterial je nach späterer Anwendung mit dem mitgelieferten Elutionspuffer (EB, 10 mM Tris·Cl, pH 8,5), mit 1:10 verdünntem Puffer EB oder mit H₂O. Die Aufnahme der gefällten DNA aus Maxipräparationen erfolgte in sterilem H₂O. Die Ausbeuten lagen bei Minipräparationen bei 6-8 µg und bei Maxipräparationen bei 400-1000 µg DNA.

2.2.5.4 Präparation von genomischer DNA

Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kultivierte HCT-8-Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung von den Kulturgefäßen abgelöst und nach Bestimmung der Zellzahl in Portionen von 5×10^6 Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben wurden bis zur DNA-Präparation bei -70°C gelagert. Die Präparation von genomischer DNA aus Ileummukosa oder HCT-8-Zellen erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben mit den Protokollen für die Isolierung von Gesamt-DNA aus tierischen Gewebeproben bzw. aus tierischen Zellkulturen. Genomische DNA wurde mit $200 \mu\text{l}$ AE-Puffer vom Säulenmaterial eluiert.

2.2.5.5 Präparation von Gesamt-RNA

Gewebeproben wurden entweder in RNA-Stabilisationsreagenz (RNAlater, Qiagen) überführt und nach Herstellerangaben gelagert oder direkt nach der Gewinnung, wie auch kultivierte HCT-8-Zellen (Portionen von 5×10^6 Zellen), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die Präparation von Gesamt-RNA aus Ileum, HCT-8-Zellen bzw. einem Exzystierungsmix von *C. parvum*-Oozysten erfolgte mit dem RNeasy Protect Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben mit den Protokollen für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Gewebeproben bzw. aus tierischen Zellkulturen. Gewebeproben wurden mit Hilfe des TissueLyser und Edelstahlkugeln (beides Qiagen) in einem Schritt aufgeschlossen und homogenisiert. Zellen wurden durch Zugabe von Lysepuffer aufgeschlossen und anschließend mit QIAshredder Spinsäulen (Qiagen) homogenisiert. Um eine Kontamination der RNA-Präparationen mit DNA zu vermeiden, wurde immer ein DNase-Verdau (RNase-Free DNase Set, Qiagen) auf den RNeasy Mini-Spinsäulen durchgeführt. Die Elution erfolgte mit $50 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser.

2.2.6 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Für einen cDNA-Synthese-Ansatz wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Omniscript RT Kit der Firma Qiagen (Hilden) in einem Volumen von 20 µl. Es wurden Oligo-dT-Primern (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, die spezifisch an den poly-A⁺-Schwanz der mRNA binden. Der hier eingesetzte RNase-Inhibitor wurde von der Firma Promega (Mannheim) bezogen.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde photometrisch in einer Quarzküvette bestimmt. Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Photometer bei 260 und 280 nm gegen Wasser gemessen. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA und 40 µg/ml RNA. Der errechnete Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA- oder RNA-Probe. Die Probe war bei einem Quotienten von 1,8-2,0 weitestgehend frei von Proteinkontaminationen.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise GmbH (Mainz) durchgeführt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

2.3.1.1 Kultur von *E. coli*-Stämmen

Die Kultur von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium bei 37°C unter Schütteln (220-250 Upm). Die Stämme, die durch Transformation ein Ampicillin-Resistenzgen trugen, wurden in Ampicillin-haltigem LB-Medium (50 µg/ml) kultiviert. Rosetta-gami B(DE3)-Bakterien wurden zusätzlich in Anwesenheit von Kanamycin (15 µg/ml), Tetracyclin (12,5 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) in Glukose-haltigem LB-Medium kultiviert. Übernacht-Kulturen wurden mit einer Einzelkolonie von einem Nährboden oder direkt aus einer kryokonservierten Kultur beimpft. Bei größeren Kulturen wurde gewärmtes Medium mit einer Vorkultur beimpft.

Zur Kryokonservierung von Bakterien wurde 10 ml Übernacht-Kulturen für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils in 1 ml LB-Medium mit 15 % Glycerin aufgenommen und in Kryoröhrchen bei -20 bzw. -70°C gelagert.

2.3.1.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Kultivierung

Die zu kultivierenden Säugetierzellen wurden in einem Inkubator mit 6 % CO₂ und Feuchtigkeitssättigung bei 37°C gehalten und alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:8-1:10 gesplittet. Zum Passagieren von **HCT-8**-Zellen wurden diese nach Entfernen des Mediums zweimal mit PBS-K⁺ gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %; Sigma) bei 37°C für 10 min vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Zur Entfernung der Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen in Medium aufgenommen und bei 150 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche überführt.

Bestimmung der Lebendzellzahl

50 µl einer Zellsuspension wurden mit physiologischer Trypanblau-Lösung (0,1 % Trypanblau in PBS) verdünnt und ein Aliquot wurde in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dabei färbten sich tote Zellen blau an, während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht aufnahmen. Nach Auszählung von 25 Gruppenquadraten (mit jeweils 16 Kleinquadraten) konnte die Zellkonzentration nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10^4.$$

Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Säugetierzellen wurden diese wie oben beschrieben vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und zentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und zunächst für 24 h bei -70°C tiefgefroren, bevor sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Rekultivierung von kryokonservierten Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden zunächst unter Schwenken in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und direkt in Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 150 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

2.3.2 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Für die Expression von rekombinanten Proteinen mit den Expressionsvektoren pTrcHis und pGEX wurde Ampicillin-haltiges LB(G)-Medium (50 µg/ml) mit 1/100 Volumen aus einer Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Es folgte die Induktion der Expression mit 1 mM IPTG (Stammlösung 100 mM) für 3 h. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert und das Bakterienpellet für die Herstellung von Lysat für die proteinchemische Reinigung (siehe 2.4.9) eingesetzt.

2.3.3 *In vitro* Kultursystem von *C. parvum*

Zur Untersuchung der Invasion und der Entwicklung des Parasiten *C. parvum* wurde in Anlehnung an Upton et al. (1995) ein Zellkultursystem etabliert (Hommer et al., 2003), bei dem 'Monolayer' von permanenten Zelllinien mit Oozysten oder gereinigten Sporozoiten infiziert werden. Die Ausbildung intrazellulärer Stadien und die Parasitenentwicklung wurden in speziellen Objektträger-Kulturgefäßen (LabTek) durch Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie und indirekte Immunfluoreszenz oder in Kulturflaschen durch anschließenden Nachweis von *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA bzw. RNA über mehrere Tage verfolgt. Auf 8er LabTek-Objektträger wurden $1-2 \times 10^5$ HCT-8-Zellen je Kavität und in Zellkulturflaschen (75 cm^2) $0,5-1 \times 10^7$ Zellen ausgesät und nach 18 h mit 2×10^5 bzw. $1-2 \times 10^7$ Oozysten infiziert, wobei das Kulturmedium gegen *C. parvum*-Wachstumsmedium ausgetauscht wurde. Nach 2 h, in denen die Oozysten exzystierten und die Zellen infiziert wurden, wurden die Zellen mit PBS-K⁺ gewaschen und in *C. parvum*-Wachstumsmedium für weitere 6-96 h kultiviert. Bei länger andauernden Kulturen wurde, um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, von Zeit zu Zeit zusätzlich frisches Medium zugegeben.

2.3.4 *In vitro* Exzystierung von *C. parvum*

Zur Freisetzung von Sporozoiten aus Oozysten erfolgte eine Inkubation von Natriumhypochlorit-behandelten (siehe 2.4.1) und in RPMI resuspendierten Oozysten in Gegenwart von 0,75 % Natrium-Taurocholat (Sigma) bei 37°C für 1-2 h. Die Exzystierung wurde durch Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert. In einer Neubauer Zählkammer wurden intakte Oozysten und leere bzw. geöffnete Oozystenhüllen gezählt. Das Verhältnis der Gesamtzahl zur Anzahl der Hüllen ergibt die Exzystierungsrate. Nach 2 h sollte die Exzystierungsrate zwischen 75 und 85 % liegen.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Antigenpräparation aus *C. parvum*-Oozysten (Parasitenlysat)

Gesamt-Oozysten-Antigen wurde durch fünf Einfrier-Auftauzyklen (flüssiger N₂ - 37°C Wasserbad) hergestellt. Zuvor wurde eine Oberflächendesinfektion mit 1:20 in PBS verdünnter kommerzieller Chlorbleichlauge (3,8 % Natriumhypochlorit) für 5 min auf Eis durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Oozysten gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Zum Teil wurden Proteaseinhibitoren (0,7 µg/ml Pepstatin, 40 µg/ml Bestatin, 10 µg/ml E 64, 1 mg/ml Pefabloc SC, in PBS; alle Boehringer Mannheim) zugegeben. Die Zentrifugationen wurden in einer Tischzentrifuge bei 13000 x g für 5 min bzw. bei 3000 x g für 15 min in einer Kühlzentrifuge durchgeführt. Das Parasitenlysat mit verschiedenen Konzentrationen an Oozystenäquivalenten wurde bei -70°C gelagert.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

BCA-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen erfolgte hauptsächlich mit dem 'Micro BCA Protein Assay Reagent Kit' der Firma Pierce (Rockfort, IL, USA), welcher sich zunutze macht, dass Proteine in stark basischen Lösungen mit Cu²⁺-Ionen komplexieren. Diese Komplexe bilden anschließend mit dem BCA (Bicinchoninic Acid)-Reagenz violettfarbene Komplexe.

In einer 1,5 ml Einmalküvette wurden BSA-Standardverdünnungen (1-50 µg/ml Endkonzentration) sowie Verdünnungen der Proteinlösungen (je nach erwarteter Proteinmenge 2-25 µl) in einem Volumen von 500 µl vorgelegt und mit 500 µl frisch nach Herstellerangaben angesetztem BCA-Reagenz versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C konnten die violetten, wasserlöslichen Reaktionsprodukte der Lösungen als Extinktion bei 562 nm im Photometer Response™ (Gilford, Düsseldorf) gegen die Referenzkontrolle ohne Protein gemessen werden. Über die Regressionsgerade der Standardproben wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

Messung der OD_{280nm}

Die Messung der optischen Dichte bei 280 nm erlaubt ebenfalls die Quantifizierung von Proteinen, wenn der spezifische Extinktionskoeffizient des entsprechenden Proteins bekannt ist. Die zu bestimmenden Proteinlösungen wurden in eine Quarzküvette gegeben und im Photometer gegen eine Pufferkontrolle ohne Protein gemessen. Die Proteinkonzentration in mg/ml erhielt man durch Multiplikation der gemessenen OD bei 280 nm mit dem spezifischen Extinktionskoeffizienten (IgG: 0,74; GST-Fusionsproteine: ~ 0,5).

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Protein-Probenpuffer (5x) versetzt und 5 min bei 98°C inkubiert. Für eine Reduktion wurde den Proben zusätzlich 10 % 2-Mercaptoethanol zugegeben. Anschließend wurden die Proben zur Trennung in die Probentaschen eines 3,5 % Sammelgels (900 µl Acrylamid/Bis; 1,875 ml Sammelgel-Puffer; 4,8 ml H₂O; 100 µl 0,1 % APS; 10 µl TEMED) pipettiert. Die Proben wurden je nach Größe der Proteine in 12,5 bzw. 15 % Trenngelen (3,75 bzw. 4,5 ml Acrylamid/Bis; 2,25 ml Trenngel-Puffer; 2,95 bzw. 3,7 ml H₂O; 100 µl APS; 10 µl TEMED) in einer Minigelapparatur (Keutz, Reiskirchen) bei konstanter Spannung von 150 V (Spannungsgerät: Consort E 431, Keutz, Reiskirchen) in Laufpuffer (1x) für circa 60 min aufgetrennt. Die Größenbestimmung der Proteine erfolgte durch Vergleich mit Protein-Molekulargewichtsmarkern. Die Proteine wurden entweder durch Coomassiefärbung detektiert oder mit dem Westernblot-Verfahren weiter aufgearbeitet.

Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen macht man sich die Eigenschaften des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blue zunutze, der zu der Gruppe der Triphenylmethane gehört und sich an Proteine anlagert. Die Gele wurden für 4-12 h in einer Lösung aus 0,175 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue (Serva Blue R) in Methanol:Eisessig:Wasser (5:1:4 v/v/v) gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Gele in der gleichen Lösung ohne Farbstoff entfärbt.

2.4.4 Westernblot

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (BA 85; Schleicher & Schüll, Dassel) erfolgte im 'semi-dry'-Verfahren in einer Graphit-Block-Kammer (Keutz, Reiskirchen) für 1,5 h bei 0,8 mA/cm². Freie Bindungsstellen der Membran wurden mit 2 % Milchpulver in TBS über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Membran wurde anschließend 2x 5 min mit TBS-T gewaschen und mit in TBS/0,2 % Milchpulver verdünntem Primärantikörper oder Serum 1-2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T (3x 5 min) erfolgte der immunochemische Nachweis der an die Proteinantigene gebundenen Antikörper durch Inkubation der Membran mit in TBS/0,2 % Milchpulver verdünntem, Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltem Sekundärantikörper unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Folie 2x 5 min mit TBS-T und 1x 5 min mit Substratpuffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit 6,6 µl/ml BCIP-Stammlösung und 2,15 µl/ml NBT-Stammlösung in Substratpuffer für 5-30 min. Die Reaktion wurde durch Waschen mit H₂O gestoppt.

2.4.4.1 Nachweis von Parasitenlysat-, P23- und CP17-reaktiven Antikörpern

Für den Nachweis von Parasitenlysat-reaktiven Antikörpern wurde in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel Parasitenlysat aus 2×10^6 Oozysten pro Proben tasche (3 mm, 15er Kamm) bzw. 3×10^7 Oozysten bei einem breiten Kamm (6,8 cm; $4,4 \times 10^5$ /mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Für den Nachweis von P23- und CP17-reaktiven Antikörpern in Seren wurde ein Kombinations-Westernblot entwickelt. Rekombinantes P23_{GST}, rCP17_{GST} und rGST wurden als Proteingemisch mit jeweils 5,7 µg (84 ng/mm) in die Proben tasche eines Sammelgels, die mit Hilfe eines breiten Kammes erzeugt wurde, pipettiert und elektrophoretisch aufgetrennt (12,5 % SDS-Polyacrylamidgel). Die rekombinanten Proteine unterschieden sich deutlich in ihrer Größe, so dass eine Zuordnung der spezifischen Bindungen möglich war (P23_{GST} ~49 kDa, CP17_{GST} ~37 kDa, GST 26 kDa).

Die zu untersuchenden Seren aus den Infektionsversuchen wurden 1:100 verdünnt und für 1 1/2 h mit der Nitrocellulose inkubiert. Als Positivkontrollen kamen Antikörper zum Einsatz, die die eingesetzten Antigene spezifisch erkannten: anti-GST 1:1000, anti-CP17

(rb101) 1:100, anti-P23 (3E3; gereinigtes IgG, 1 mg/ml) 1:500. Die eingesetzten Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper wurden wie folgt verdünnt: Ziege-anti-Maus IgG (γ -Kette) 1:5000, Ziege-anti-Maus IgA (α -Kette) 1:2000, Ziege-anti-Kaninchen IgG 1:5000. Der Westernblot wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.4.5 ELISA

Der immunochemische Nachweis antigenspezifischer Antikörper wurde auch im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) erbracht. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (MaxiSorp™, Nunc-Immuno, Wiesbaden) mit dem gewünschten Antigen beschichtet und dann die Bindung von antigenspezifischen Antikörpern durch einen zweiten, markierten Antikörper detektiert. Als Antigene dienten Antigenpräparationen aus *C. parvum*-Oozysten sowie die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, rekombinanten Sporozoitenoberflächenproteine rP23_{His} und rCP17. Es wurde immer mit einem Volumen von 50 μ l/Kavität beschichtet. Alle Detektionsschritte wurden mit 50 μ l/Kavität, die Absättigung und alle Waschschrte mit 200 μ l/Kavität ausgeführt. Nach der Beschichtung der Platten mit in Carbonatpuffer (pH 9,6) verdünntem Antigen über Nacht bei 4°C folgten die Absättigung von freien Bindungsstellen mit 1 % BSA in PBS für 1 h und ein Waschschrte mit PBS-T. Zwischen den Detektionsschritten wurde jeweils dreimal mit PBS-T gewaschen, vor der Zugabe der Substratlösung erfolgte ein weiterer Waschschrte mit dem entsprechenden Substratpuffer.

2.4.5.1 Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Antikörpern

Generell wurde der Nachweis von spezifischen Antikörpern für *C. parvum* mit Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur durchgeführt. Beschichtet wurden die Mikrotiterplatten mit Lysat aus $1,25 \times 10^5$ Oozysten je Kavität oder mit 250 ng/Kavität rP23_{His} bzw. rCP17. Die Primärantikörper oder Seren wurden in PBS/0,1 % BSA verdünnt und 1 h inkubiert. Um den Antikörpertiter der Seren von immunisierten Kaninchen zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Gebundene Antikörper wurden für 1/2-1 h mit einem 1:2000 in PBS/0,1 % BSA

verdünnten, Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Der Nachweis von gebundenem Sekundärantikörper erfolgte durch Zugabe von 100 µl/Kavität Substratlösung (5 mg p-Nitrophenyl Phosphat (pNpp)/10 ml Substratpuffer). Die Alkalische Phosphatase setzt das Substrat in einen gelben Farbstoff um, der bei 405 nm in einem Photometer gemessen werden kann (Typ 2001, Anthos Labtek).

2.4.5.2 Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Antikörpern in Seren und Vaginalspülungen infizierter bzw. immunisierter Mäuse

Zum Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Antikörpern in Mausseren und Vaginalspülungen von infizierten bzw. immunisierten Mäusen wurde ein ELISA-System entwickelt und standardisiert, das vergleichbare, reproduzierbare Ergebnisse gewährleistet. Alle Schritte bis auf die Inkubation mit der Substratlösung (OPD) wurden bei 30°C durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte mit Lysat aus $1,25 \times 10^5$ Oozysten oder 20 ng rP23_{His} bzw. 50 ng rCP17 je Kavität. Mausseren und Vaginalspülungen wurden in PBS/1 % BSA verdünnt und für 2 h zugegeben. Seren wurden zunächst immer 1:100, Vaginalspülungen 1:3 und dann in Zwischenschritten weiter verdünnt. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit biotinylierten Sekundärantikörpern detektiert (1 h), die 1:5000 (Antikörper gegen IgG, IgG1 und IgG2a) bzw. 1:2000 (Antikörper gegen IgA) in PBS/1 % BSA verdünnt wurden. Anschließend wurde das 1:1000 in PBS/1 % BSA verdünnte Enzym ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma), welches an Biotin bindet, zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe der Substratlösung. Für die Substratlösung wurde 1 Tablette o-Phenylenediamin (OPD, 20 mg/Tablette) in 20 ml Substratpuffer gelöst und mit 1 µl/ml 30 % H₂O₂ versetzt. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl/Kavität 1 M H₂SO₄ gestoppt und mit einem Photometer (Sunrise, Tecan) bei 492 nm ausgewertet. Die Dauer der Entwicklung wurde sehr genau eingehalten, zusätzlich jedoch immer mit einem internen Standard, d.h. einem bekannten Serum abgeglichen. Der Nachweis von spezifischem IgG, IgG1 und IgG2a wurde nach 15 min, von spezifischem IgA nach 30 min gestoppt. Als Antikörpertiter der Probe wird die Verdünnung angegeben, bei der die gemessene optische Dichte der Substratlösung das Niveau der Kontrollseren bzw. -vaginalspülungen von Mäusen ohne Infektion zeigte, was einer OD von kleiner gleich 0,2 bei einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:3 entsprach.

2.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz

2.4.6.1 Nachweis von intrazellulären Parasitenstadien

Zur Visualisierung der *C. parvum*-Entwicklung in der Zellkultur wurden $1-2 \times 10^5$ HCT-8-Zellen je Kavität auf LabTek-Objektträger (8 Kavitäten) ausgesät und mit 2×10^5 Oozysten infiziert. Die *in vitro* Kultur erfolgt wie unter 2.3.3 beschrieben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit kaltem Methanol oder 3 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (200 μ l/Kavität) für 15-20 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Falle der PFA-Fixierung wurde nach einem Waschschrift mit PBS eine Behandlung mit Triton X-100 (0,05 % in PBS, 15 min bei RT) angeschlossen, um intrazelluläre Antigene zugänglich zu machen. Freie Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA in PBS für 1 h abgesättigt (200 μ l/Kavität). Anschließend wurden die intrazellulären Stadien von *C. parvum* mit verschiedenen spezifischen in PBS/1 % BSA verdünnten Antikörpern detektiert (200 μ l/Kavität). Der monoklonale Antikörper 2C3 (Protein G gereinigte IgG-Fraktion) wurde 1:20, der mAk 3E3 (anti-P23; Protein G-gereinigtes IgG) 1:50 verdünnt, der monoklonale IgM-Antikörper 1B5 unverdünnt (Überstand der Hybridomakultur), die Kaninchen-Antiseren gegen P23 (rb104) und CP17 (rb101) und die dazugehörigen Präimmunsereen 1:100 verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden gebundene Antikörper mit 150 μ l/Kavität AlexaFluor-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:150 in PBS/1 % BSA) für 1 h im Dunkeln detektiert. Kerne der Wirtszellen wurden anschließend mit Höchst 33258 (1 μ g/ml in PBS, Sigma) für 10 min angefärbt. Das Einbetten der Objektträger erfolgte nach gründlichem Waschen mit PBS in Glycerin für die Fluoreszenzmikroskopie. Die Deckgläschen wurden mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2-Mikroskop von Zeiss, welches mit einer Fluoreszenzeinheit und der Digitalkamera AxioCam HRc (Zeiss) ausgestattet war.

2.4.6.2 Quantitative Bestimmung der Oozystenausscheidung in Stühlen infizierter Mäuse

Für die quantitative Bestimmung der Oozystenausscheidung wurden die wie unter 2.5.3.2 beschrieben aufbereiteten und fixierten Stuhlproben infizierter Mäuse nochmals 1:5 mit PBS verdünnt und auf mit Poly-L-Lysin (50 µg/ml) beschichtete Adcell-Diagnostika-Objektträger (Roth, Karlsruhe) ausgestrichen. Dazu wurden pro Stuhlprobe auf 3 Kammern je 5 µl verdünnter Stuhl aufgetragen, luftgetrocknet und mit Methanol fixiert. Zur Detektion der Oozysten wurden die Stuhlausstriche mit einem von unserer Arbeitsgruppe im Kaninchen hergestellten Antiserum gegen *C. parvum*-Oozysten (rb115; 1:500 in PBS/1 % BSA verdünnt) für 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Gebundene Antikörper wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG-AlexaFluor 488), welcher 1:250 in PBS/1 % BSA verdünnt wurde, für 1 h im Dunklen detektiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS erfolgte die Einbettung in Glycerin. Die gesamte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit jeweils 20 µl/Kammer in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Die quantitative Bestimmung der Oozystenausscheidung erfolgte anschließend an einem Fluoreszenzmikroskop in einer 1000fachen Vergrößerung mit Ölimmersion. In den drei verschiedenen Ausstrichen pro Maus und Stuhlprobe wurden jeweils 50 Gesichtsfelder ausgezählt, die gezählten Parasiten gemittelt und auf die Anzahl an Oozysten in 100 mikroskopischen Gesichtsfeldern hochgerechnet. Die Ausscheidungsrate wird im Folgenden als Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder angegeben.

2.4.6.3 Nachweis von Oozysten- bzw. Sporozoiten-Antigenen von *C. parvum*

Adcell-Diagnostika-Objektträger (Roth, Karlsruhe) wurden mit 20 µl Exzystierungsmix aus 4×10^5 Oozysten pro Kammer beschichtet und luftgetrocknet. Anschließend wurde mit Methanol oder 3 % PFA in PBS (200 µl/Kavität) für 15-20 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Falle der PFA-Fixierung wurde nach einem Waschschriff mit PBS eine Behandlung mit Triton X-100 (0,05 % in PBS, 15 min bei RT) angeschlossen, um intrazelluläre Antigene zugänglich zu machen. Die Durchführung erfolgte ansonsten nach

den bereits beschriebenen Protokollen zur indirekten Immunfluoreszenz. Die gesamte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit jeweils 20 µl/Kammer in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

2.4.7 Modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung

Für die Darstellung von *C. parvum*-Oozysten mit der modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung wurden die wie unter 2.5.3.2 beschriebenen aufbereiteten und fixierten Stuhlproben infizierter Mäuse auf Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und mit Methanol fixiert. Es folgte eine Behandlung mit Karbolfuchsin (Roth) für 10-15 min. Die Objektträger wurden nun zweimal mit 3 % HCl in 95 % Ethanol und anschließend mit Wasser gespült. Eine Gegenfärbung erfolgte mit 0,25 % Malachitgrün (Merck) für 30 sek. Nach gründlichem Spülen mit Wasser wurden die Präparate luftgetrocknet und mikroskopiert.

2.4.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für histologische Untersuchungen des Ileums infizierter Knockout-Mäuse wurden, wie unter 2.5.3.5 beschrieben, Paraffinschnitte (4 µm) hergestellt und einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen. Zunächst wurden die Schnitte in Xylol (3x) und einer absteigenden Alkoholreihe (100 % Ethanol, 96 % Ethanol und 70 % Ethanol) für jeweils 5 min entparaffiniert, anschließend zweimal für 3 min in Wasser gewaschen und bis zur Färbung in Wasser aufbewahrt. Für die Färbung wurden die Präparate 10 min in saurem Mayers Hämalaun (Roth) inkubiert, 10 min mit fließendem Leitungswasser gespült und 5 min mit 1 % wässrigem Eosin (Merck) behandelt. Die Objektträger wurden anschließend mit Wasser, 70 % Isopropylalkohol, 96 % Isopropylalkohol, 100 % Isopropylalkohol und 100 % Ethanol gespült und 3x für 3 min in Xylol inkubiert. Das Einbetten der Objektträger erfolgte in Entellan (Merck).

2.4.9 Proteinchemische Reinigungen von rekombinanten *C. parvum*-Proteinen

2.4.9.1 Herstellung von *E. coli*-Zelllysat

Für die proteinchemische Reinigung von rekombinanten Proteinen musste zunächst ein Zelllysate aus den die entsprechenden Proteine exprimierenden Bakterienkulturen (siehe 2.3.2) hergestellt werden. Die Kulturen wurden bei 4000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/50 Volumen (Reinigung über NiNTA) bzw. 1/20 Volumen (Reinigung über Glutathion Sepharose) mit dem entsprechenden, kalten Auftragspuffer aufgenommen und zunächst bei -70°C gelagert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis wieder aufgetaut, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Ein Aufschluss der Zellen wurde durch Ultraschall (Sonifier von Heinemann, Schwäbisch Gmünd; Duty Cycle 65 %, Output control 2-3) erzielt, wobei auf eine ausreichende Kühlung durch Eis geachtet wurde. Die Behandlung mit Ultraschall erfolgte in Intervallen von 15 sek mit 15 sek Pause über 4 min. Anschließend wurde 1 % Triton X-100 zugegeben und das Lysat bei 6-8°C für 30 min über Kopf rotiert. Nach einer Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 15 min wurde der Überstand erst mit Hilfe eines 5 µm-, dann eines 0,2 µm-Filters filtriert. Das Bakterienlysate konnte nun für die Reinigung durch FPLC eingesetzt werden.

2.4.9.2 Proteinchemische Reinigung durch FPLC

Für die proteinchemische Reinigung rekombinanter Proteine wurde ein FPLC-System der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Rekombinantes **P23_{His}**, welches mit einem N-terminalen 6xHistidin-Anhang exprimiert wurde, wurde über NiNTA (Qiagen, Hilden), die an Superflow™ Resin gekoppelt ist und eine Bindekapazität von 5-10 mg Protein pro ml besitzt, gereinigt. Die rekombinanten Proteine **CP17_{GST}** und **P23_{GST}**, welche als GST-Fusionsprotein exprimiert wurden, wurden wie auch reines **GST** über GSTrap-Säulen (1 ml) von Pharmacia (Freiburg) mit Glutathion Sepharose 4 Fast Flow als Matrix und einer Bindekapazität von 10 mg/ml gereinigt. Die Handhabung der Säulen und die Herstellung der Puffer erfolgten nach Herstellerangaben. Die Reinigungen wurden bei 4°C durchgeführt. Nach dem die jeweilige Säule (NiNTA bzw. GSTrap) mit Auftragspuffer equilibriert wurde (50faches Volumen, 1 ml/min), wurde das Bakterienlysate mit einer

Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf die Säule appliziert. Im Anschluss wurde die Säule mit dem Auftragspuffer mit 0,5 ml/min mit dem 50fachen Säulenvolumen gespült. Danach wurde die Säule mit 0,5 ml/min Waschpuffer (20 mM Imidazol bzw. Auftragspuffer) solange gewaschen, bis die OD₂₈₀ bei Null lag und somit alle nicht bindenden Proteine die Säule passiert hatten. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (500 mM Imidazol bzw. 10 mM Glutathion) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und in der SDS-PAGE auf die Anwesenheit und die Reinheit der rekombinanten Proteine überprüft. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt, über Nacht bei 4°C gegen PBS bzw. den Auftragspuffer dialysiert und bei -20°C gelagert. Der Proteingehalt wurde photometrisch bei 280 nm oder mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt.

Die im Rahmen dieser Arbeit exprimierten rekombinanten Proteine konnten in relativ reiner Form aus Bakterienlysat gewonnen werden. Die Ausbeuten lagen im Durchschnitt bei 0,5-2 mg Protein pro Liter Bakterienkultur. Das rekombinante P23 wurde, wie das native P23, durch den monoklonalen Antikörper 3E3 erkannt. Die rekombinanten *C. parvum*-Protein wurden alle durch Antikörper in Seren von Kryptosporidiose-Patienten und infizierten Mäusen erkannt.

Rekombinantes P23_{His} (~26 kDa) diente als Antigen für serologische Untersuchungen im ELISA. Rekombinantes **CP17** (~11 kDa) wurde für den Einsatz im ELISA von seinem Fusionspartner GST getrennt. Dazu wurde eine Thrombinspaltung mit 10 Units Thrombin (37 kD; Stammlösung 1 Unit/µl in Auftragspuffer) pro mg Fusionsprotein über Nacht bei 22-25°C und eine Abtrennung des Fusionspartners mit Hilfe der GSTrap-Säule durchgeführt. Die rekombinanten GST-Fusionsproteine P23_{GST} (~49 kDa) und CP17_{GST} (~37 kDa) und reines GST (26 kDa) kamen bei serologischen Untersuchungen mit Hilfe des Westernblots zum Einsatz. P23_{His} und CP17 wurden des Weiteren zur Herstellung von Antiseren in Kaninchen verwendet.

Im Anhang ist die Reinheit der gereinigten rekombinanten Proteine im Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel und deren Reaktivität mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern im Westernblot dargestellt (Abb. A 1, A 2).

2.5 Tierexperimente

2.5.1 Infektion von Mäusen mit *C. parvum*

Für die Infektion von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen bzw. C57BL/6-Wildtyp-Mäusen mit dem Darmparasiten *C. parvum* wurden die Oozysten nach einer Oberflächendesinfektion mit Natriumhypochlorit mehrmals mit PBS gewaschen (siehe 2.4.1) und so eingestellt, dass die entsprechende Infektionsdosis (meistens 1×10^6 Oozysten) in 100 μ l PBS vorlag. Eine Infektion erfolgte durch eine einmalige Verabreichung von Oozysten mit einer Magensonde.

2.5.2 Immunisierungen

2.5.2.1 Protein-Immunisierung von Mäusen

In Immunisierungsstudien wurden IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse und C57BL/6-Wildtyp-Mäuse mit Parasitenlysat aus 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten (in endotoxinfreiem DPBS, Sigma) dreimal im Abstand von zwei Wochen (Tag 0, 14, 28) über verschiedene Immunisierungswege (intranasal, intraperitoneal und subkutan) ohne und mit Adjuvans immunisiert. In regelmäßigen Abständen wurden Serumproben entnommen und auf spezifischen Antikörper im ELISA hin untersucht. Für die intranasalen und subkutanen Applikationen wurden die Mäuse zuvor mit Avertin sediert. Die Stammlösung von Avertin setzte sich aus 2,544 g 2,2,2-Tribromoethanol und 2,5 ml 2-Methyl-2-butanol zusammen. Für die Gebrauchslösung wurden 250 μ l der Stammlösung mit 10 ml PBS gut gemischt. Pro Maus wurden 250 μ l der Gebrauchslösung intraperitoneal gespritzt. Bei der intranasalen Immunisierung wurde das Antigen auf die Nasenlöcher getropft, so dass es durch das Einatmen der Mäuse ohne Verluste in die Nasenhöhle gelangte. Das Volumen wurde möglichst gering gewählt, um ein Verschlucken oder Herauslaufen zu verhindern. Die subkutane Injektion erfolgte in die Nackenfalte.

In einem ersten Ansatz wurden GKO- und IL12KO-Mäuse jeweils intranasal bzw. intraperitoneal mit Parasitenlysat ohne Adjuvans immunisiert. Intranasal wurde ein Volumen von 25 μ l, intraperitoneal von 100 μ l appliziert. In einem zweiten Ansatz erfolgte

die Immunisierung mit AbISCO (Isconova, Uppsala, Schweden) als Adjuvans. Hier wurde neben einer intranasalen auch eine subkutane Immunisierung durchgeführt. Das Adjuvans ist für eine intraperitoneale Gabe ungeeignet. Für die intranasale Immunisierung wurde das Parasitenlysat mit 20 µg AbISCI-300 (3 mg/ml) mit einem Endvolumen von 12 µl, für die subkutane Immunisierung mit 12 µg AbISCO-100 (0,48 mg/ml) mit einem Endvolumen von 100 µl gemischt.

2.5.2.2 Herstellung von polyklonalem Antiserum in Kaninchen

Zur Herstellung polyklonaler Antiseren wurden 3 Monate alte New Zealand White Kaninchen mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Sporozoiten-Oberflächenproteinen CP17 und P23_{His} und mit Lysat aus *C. parvum*-Oozysten immunisiert. Den Kaninchen wurde vor der ersten Immunisierung, vor dem 2. Booster und anschließend in regelmäßigen Abständen Blut entnommen. Das Serum wurde im ELISA und im Westernblot auf seine Reaktivität mit dem Antigen und seinen Antikörpertiter hin untersucht.

Für die Herstellung von Antiserum gegen P23 (**rb104**) und CP17 (**rb101**) wurden je Immunisierung 100 µg rekombinantes Protein mit 500 µl Ribi-Adjuvans (Universal Biologicals), welches nach Herstellerangaben vorbereitet wurde, gemischt und mit PBS auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Immunisiert wurde 3-mal jeweils subkutan und intramuskulär im Abstand von 4 Wochen. Im Falle von rCP17 wurde das Kaninchen so lange immunisiert (8-mal), bis das Serum nicht nur im ELISA, sondern auch im Westernblot eine Reaktivität zeigte. Die Antiseren fanden ihren Einsatz in der indirekten Immunfluoreszenz zur Detektion von intrazellulären Stadien nach der Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum* und in den Kombinations-Westernblots zum Nachweis von rCP17_{GST} und rP23_{GST}.

Antiserum gegen Parasitenlysat (**rb115**) wurde mit Lysat aus 1×10^7 Oozysten in PBS als Antigen hergestellt und zum Nachweis von Oozysten in Stuhlausstrichen infizierter Mäuse mittels indirekter Immunfluoreszenz verwendet. Bei der Erstinjektion wurde das Antigen in komplettem Freund's Adjuvans 1:1 gemischt und daraus eine stabile Ölemulsion hergestellt. Das Volumen von 1 ml wurde subkutan an verschiedenen Stellen injiziert. Nach einem Zeitraum von 4 Wochen wurde eine 'Booster'-Immunisierung mit Antigen und inkomplettem Freund's Adjuvans durchgeführt. Diese Immunisierung wurde nach weiteren

8 Wochen noch einmal wiederholt.

Im Anhang sind die Reaktivität und die Spezifität der generierten Antiseren rb101, rb104 und rb115 im Westernblot mit Parasitenlysat bzw. den entsprechenden rekombinanten Proteinen dargestellt (Abb. A 2).

2.5.3 Probengewinnung und -aufbereitung

2.5.3.1 Serum von Kaninchen und Mäusen

Die Blutentnahme beim Kaninchen erfolgte an der Ohrvene. Mäusen wurde zunächst Blut an der Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die Tiere vor der Blutentnahme für 10-20 min mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung zu fördern. Später wurde dazu übergegangen, den Mäusen unter möglichst sauberen Bedingungen Blut mit einer Pasteurpipette aus dem Retroorbitalen Plexus zu entnehmen. Nach der vollständigen Gerinnung der gewonnenen Blutproben wurde das Serum dekantiert und bei 12000 x g für 1 min in einer Tischzentrifuge bzw. bei 3000 x g für 15 min in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, um die restlichen Blutzellen zu entfernen. Das Serum wurde bei -20°C gelagert.

2.5.3.2 Stuhlproben von Mäusen

Für den Nachweis von ausgeschiedenen Oozysten nach einer erfolgten Infektion mit *C. parvum* wurden von den Mäusen in der Regel ab Tag 3 *post infectionem* bis Tag 10 zunächst täglich und dann noch an den Tagen 12, 15 und 22 Stuhlproben gesammelt. Von jeder Maus wurden mindestens drei abgesetzte Stuhlpellets in ein Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden in kaltem PBS bzw. Roti-Histofix (4,5 % Formaldehydlösung, Roth) bei 4°C eingeweicht. Anschließend wurden sie mit Hilfe von Pipettenspitzen und durch Vortexen homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C für 10 min in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand abgenommen. Das Volumen der festen Bestandteile wurde abgeschätzt und mit demselben Volumen an PBS mit 20 % Formaldehyd bzw. PBS gemischt (Verdünnung von 1:2). Bis zur weiteren Verwendung der Proben wurden sie bei 4-8°C gelagert.

2.5.3.3 Vaginalspülungen bei Mäusen

Für den Nachweis von sekretorischem IgA wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach einer Infektion Vaginalspülungen bei den weiblichen Mäusen durchgeführt. Dazu wurden dreimal nacheinander 50 µl DPBS mit einer Pipette in die Vaginalöffnung eingeführt, zehnmal auf- und abpipetiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Spülungen wurden zunächst bei -20°C tiefgefroren. Um eine größere Probenmenge zu erhalten, wurde die Vaginalspülung bei jeder Maus am darauf folgenden Tag wiederholt. Vor dem ersten Gebrauch im ELISA wurden sie aufgetaut und bei 16000 x g und 4°C in einer Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand von den aufeinander folgenden Tagen wurde je Maus vereinigt. Die Vaginalspülungen wurden bei -20°C gelagert.

2.5.3.4 Präparation von Ileum und Ileummukosa von Mäusen

Für den Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren im Ileum infizierter Knockout-Mäuse wurden die Mäuse zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem Setzen der Infektion geopfert. Das terminale Ende des Dünndarms wurde freigelegt, von seinem Inhalt durch Ausstreichen mit der Pinzette gesäubert und von Bindegewebe befreit. Ein circa 1,5 cm langes Stück wurde für die Präparation von RNA in RNA-Stabilisierungsreagenz (RNAlater, Qiagen) oder in einem Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff überführt. Ein weiteres Stück wurde für histologische Untersuchungen in Roti-Histofix (Roth) fixiert. Für die Gewinnung von genomischer DNA wurde ein circa 4 cm langes Stück mit PBS gespült und mit einer Schere geöffnet. Die Mukosa wurde vorsichtig mit einem Objektträger von dem restlichen Gewebe getrennt, in ein Reaktionsgefäß überführt und direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.5.3.5 Herstellung von Paraffinschnitten von Mäuse-Ileum

Zum histologischen Nachweis einer Infektion im Ileum von mit *C. parvum* infizierten Mäusen wurden die Mäuse 5 Tage *post infectionem* geopfert, das terminale Ende des Dünndarms präpariert und in Roti-Histofix (4,5 % Formaldehydlösung, Roth) fixiert. Die fixierten Gewebeproben wurden vorsichtig mit Wasser gespült, in Einbettkassetten (mit

Netz) verbracht und für 15 min in Wasser gelegt. Im Einbettautomaten (Sakura Tissue-Tek VIP) wurden die fixierten, wasserhaltigen Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50-100 % Isopropanol, 100 % Ethanol) entwässert und in Intermedium (Xylol, Roth) überführt. Es folgte die Penetration des Gewebes mit geschmolzenem Paraffin (TerHell). Die Gewebestücke wurden danach mit warmem (60°C und 120°C), flüssigem Paraffin in Einbettkassetten gegeben, hier orientiert und fixiert. Anschließend wurde das Paraffin im Sakura Tissue-Tek TEC Einbettssystem zum Erkalten (-4°C) gebracht. Nach dem vollständigen Aushärten wurden die Paraffinblöcke getrimmt und an einem Mikrotom (Leica) Schnitte von 4 µm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) überführt und bei 37-40°C im Brutschrank über Nacht getrocknet.

Die Herstellung der Paraffinblöcke erfolgte in den Räumlichkeiten der MTA-Schule des Mainzer Universitätsklinikums. Die Paraffinschnitte wurden zum einen in der MTA-Schule zum anderen von Frau U. Pfeffer der Frauenklinik des Mainzer Universitätsklinikums angefertigt.

2.6 Statistik

Für die Beurteilung der bei den Infektionsversuchen der Knockout-Mäuse erhaltenen Mittelwerte bei der Auswertung der Parasitenausscheidungen und den serologischen Untersuchungen wurden die Stichproben eines bestimmten Untersuchungszeitpunktes von beiden Knockout-Mausstämmen und von verschiedenen Versuchstagen eines Mausstamms mit Hilfe des Student t-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Die Signifikanzen wurden mit der entsprechenden Funktion des Microsoft Office Programms Excel 2003 berechnet. Es wurde ein zweiseitiger Test für zwei Stichproben mit der gleichen Varianz durchgeführt (TTEST(Matrix1;Matrix2;2;2)). Mittelwertsvergleiche mit einem p von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Infektion von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit *Cryptosporidium parvum*

Für die Immunabwehr im Verlauf einer *Cryptosporidium parvum*-Infektion konnte gezeigt werden, dass neben den CD4⁺-T-Zellen auch den Zytokinen Interferon- γ und Interleukin-12 eine entscheidende Bedeutung bei der Überwindung der Infektion zukommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei bereits in der Literatur beschriebene Infektionsmodelle für *C. parvum* in der Arbeitsgruppe etabliert. Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus, deren Gene für IFN- γ bzw. IL-12 durch gezielte Mutagenese ausgeschaltet wurden, wurden mit dem Parasiten infiziert. Als Infektionsmodell für eine Kryptosporidiose wurde die IL-12 p40-Knockout (IL12KO)-Maus von Campbell et al. (2002) und die IFN- γ -Knockout (GKO)-Maus von Theodos et al. (1997) beschrieben. Beide scheiden nach einer Infektion Oozysten mit dem Stuhl aus. Erstmals konnten beide Infektionssysteme unter identischen Bedingungen im direkten Vergleich analysiert und bewertet werden. Zusätzlich wurden weiterführende Studien zur Analyse der Immunantwort und zur Resistenzentwicklung durchgeführt.

Infektionen bei IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit *C. parvum*-Oozysten wurden durch den Nachweis und die Quantifizierung der Parasitenausscheidung mit dem Stuhl, durch histologischen Nachweis der Infektion im Ileum und durch serologische Untersuchungen charakterisiert. Des Weiteren wurde der Parasit durch die Amplifikation von *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA und mRNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion im Ileum detektiert. Die Abbildung 3.1.1 zeigt den zeitlichen Ablauf der Infektionsstudien bei GKO- und IL12KO-Mäusen, die in diesem Kapitel beschrieben werden.

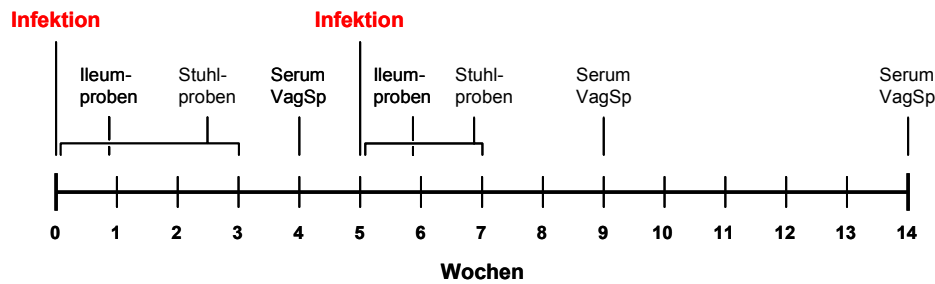


Abb. 3.1.1: Zeitlicher Ablauf der Infektionsstudien bei IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen

IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse wurden mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten infiziert. Die Bestimmung der Parasitenausscheidung *post infectionem* erfolgte in Stuhlproben. Zur Charakterisierung der Antikörperantwort nach der Infektion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Serumproben und Vaginalspülungen (VagSp), für histologische Untersuchungen und für den Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren jeweils fünf Tage p.i. Ileumproben gewonnen.

3.1.1 Infektion und Quantifizierung der Parasitenausscheidung

Zur Etablierung der Infektionsmodelle für eine Kryptosporidiose in IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen wurde in Vorversuchen zunächst die optimale Infektionsdosis bestimmt, mit der reproduzierbar hohe Parasitenausscheidungen über einen Zeitraum von mehreren Tagen erzielt werden konnten. Eine Dosis von 1×10^6 Oozysten, welche mit einer Magensonde verabreicht wurden, stellte sich als optimales Inokulum heraus. In der Regel wurden ab Tag 3 *post infectionem* von allen Tieren bis Tag 10 zunächst täglich dann noch an den Tagen 12, 15 und 22 Stühle gesammelt und die Menge der ausgeschiedenen Oozysten bestimmt. Dazu wurden die gesammelten Stuhlproben wie unter 2.5.3.2 beschrieben aufgearbeitet, auf Adcell-Diagnostika-Objektträger ausgestrichen und mit Methanol fixiert. Der Nachweis und die quantitative Bestimmung der Parasitenausscheidung in den Stühlen infizierter Mäuse erfolgten zunächst mit einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung (siehe 2.4.7; Abb. 3.1.2 A, B). Dies stellte sich jedoch als nicht optimal für die Bearbeitung und Auswertung großer Probenmengen heraus. Um eine schnellere Auszählung zu ermöglichen, wurde ein Immunfluoreszenztest etabliert, wodurch sich Oozysten besser darstellen ließen (siehe 2.4.6.2; Abb. 3.1.2 C, D). Hierbei wurden die Oozysten mit einem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antiserum von einem mit Parasitenlysat immunisierten Kaninchen (rb115) detektiert. Der Nachweis von spezifisch an die Oozysten gebundenem Antikörper erfolgte mit einem Alexa Fluor 488-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Ausscheidungsrate wird

im Folgenden als Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder in einer 1000fachen Vergrößerung angegeben. Es wurden jeweils Gruppen von vier Mäusen infiziert und die Anzahl der ausgeschiedenen Oozysten über die Gruppe gemittelt.

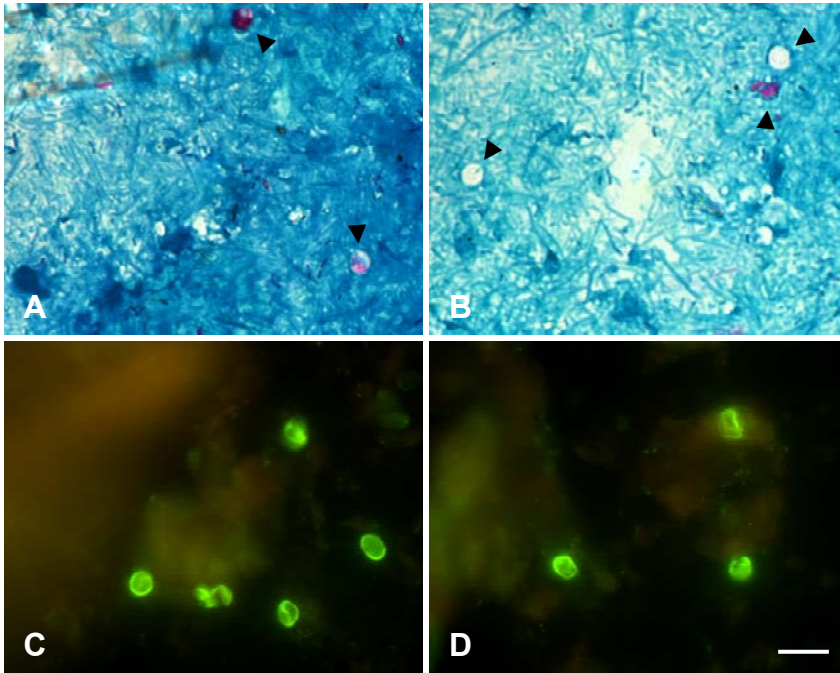


Abb. 3.1.2: Darstellung von *C. parvum*-Oozysten im Stuhl nach Infektion von Knockout-Mäusen

Darstellung von *C. parvum*-Oozysten in Stuhlausstrichen von mit 1×10^6 Oozysten infizierten Knockout-Mäusen mit Hilfe der modifizierten Ziehl-Neelsen Färbung [A, B] bzw. einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum gegen Parasitenlysat (rb115) [C, D]. Die Aufnahmen wurden mit einer 1000fachen Vergrößerung mit Ölimmersion erstellt. Der Maßstabsbalken in [D] entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.1.1.1 Parasitenausscheidung nach Infektion

IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse wurden jeweils parallel mit 1×10^6 Oozysten infiziert. Die Infektion wurde anschließend über die Ausscheidung von Parasiten mit dem Stuhl charakterisiert und verglichen. Die hier diskutierten Ergebnisse stammen aus 14 unabhängig voneinander durchgeführten Infektionen bei GKO- und 12 Versuchsreihen bei IL12KO-Mäusen. In Abbildung 3.1.3 ist der zeitliche Verlauf der Parasitenausscheidung bei den beiden Mausstämmen aufgezeigt.

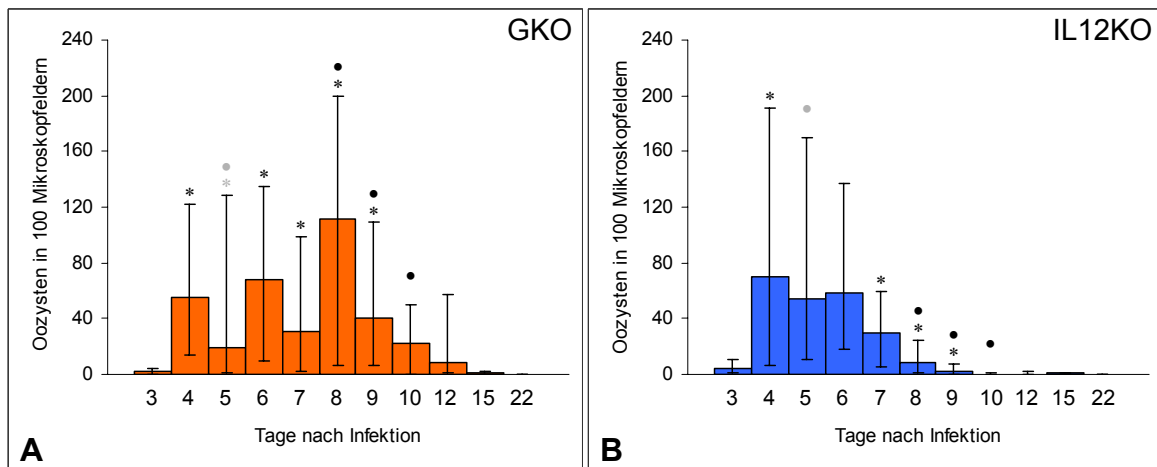
Beide Knockout-Mausstämme waren suszeptibel für eine Infektion mit *C. parvum*. Circa drei Tage nach dem Setzen einer Infektion gelang bei beiden Stämmen der Nachweis von

wenigen Oozysten in den Stuhlausstrichen (durchschnittlich 3-5 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern). An Tag 4 stieg die Ausscheidungsrate deutlich auf jetzt durchschnittlich 56-70 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern an. An den Tagen 4 bis 7 zeigten beide Mausstämme vergleichbar hohe Ausscheidungsraten, mit Ausnahme von Tag 5, an dem die GKO deutlich weniger ausschieden als die IL12KO ($p = 0,075$). Dies liegt in dem den GKO-Mäusen eigenen Verlauf der Parasitenausscheidung begründet, auf den später genauer eingegangen wird. Beiden Mausstämmen war auch gemeinsam, dass sie zu keiner Zeit neben der Ausscheidung von Oozysten mit dem Stuhl weitere Krankheitssymptome aufwiesen. Keine Maus verstarb aufgrund einer Infektion mit *C. parvum*. Alle Mäuse überwandten die Infektion scheinbar vollständig. Nach drei Wochen waren bei keinem der Mausstämme Oozysten mehr im Stuhl nachweisbar.

Bei den Infektionen von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen zeigten sich jedoch auch deutliche Unterschiede bezüglich der Höhe, dem Verlauf und der Dauer der Parasitenausscheidung. Die Anzahl der ausgeschiedenen Oozysten sank bei den IL12KO ab Tag 8 deutlich ab; ab Tag 10 konnten nur noch sehr vereinzelt Oozysten nachgewiesen werden. Bei den GKO dauerte die Ausscheidung von Parasiten mit dem Stuhl dagegen deutlich länger an. Sie stieg hier an Tag 8 mit durchschnittlich 112 Oozysten auf Maximalwerte (signifikanter Unterschied zu den IL12KO, $p = 0,03$). Auch an den beiden folgenden Tagen schieden die GKO signifikant höhere Mengen an Oozysten aus als die IL12KO (Tag 9, $p = 0,002$; Tag 10, $p = 0,02$). Die Parasitenanzahl im Stuhl sank anschließend wieder, bis ab Tag 15 nur noch vereinzelt Oozysten detektiert werden konnten. Die GKO schieden damit signifikant über einen längeren Zeitraum Oozysten aus als die IL12KO. Des Weiteren war die Summe der insgesamt ausgeschiedenen Oozysten bei den GKO über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg durchschnittlich doppelt so hoch als bei den IL12KO.

Auch der Verlauf der Infektion wies deutlich Unterschiede zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen auf. IL12KO zeigten an den Tagen 4 bis 6 vergleichbar hohe Ausscheidungsraten, die ab Tag 7 statistisch signifikant gleichmäßig absanken und ab Tag 10 unter der Nachweisgrenze lagen. Bei den IFN- γ -Knockout-Mäusen stieg und fiel die Ausscheidungsrate dagegen signifikant von Tag zu Tag über den beobachteten Zeitraum hinweg. Der Verlauf glich einer Zickzacklinie. Eine Spitze zeigte sich an Tag 4, eine an Tag 6, der Höchstwert fiel auf Tag 8 mit durchschnittlich 112 Oozysten in 100 mikroskopischen Feldern. Der Rückgang der Oozysten an den Tagen 5, 7 und 9 erwies sich als statistisch signifikant. Ab Tag 8 sank die Ausscheidung kontinuierlich ab und lag ab

Tag 15 unterhalb der Nachweisgrenze.



Tage p.i.		3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	22
GKO	MW	3	4	19	68	30	112	40	22	9	1	0
	Max Min	4 1	122 14	129 1	135 9	98 2	200 7	110 6	56 0	57 1	2 0	0 0
IL12KO	MW	5	11	54	58	30	8	2	0	1	1	0
	Max Min	11 1	192 7	170 11	137 18	59 5	24 1	8 0	1 0	2 0	1 0	0 0

Abb. 3.1.3: Parasitenausscheidung nach Infektion von Knockout-Mäusen mit *C. parvum*-Oozysten

Die Parasitenausscheidung nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A] und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [B] mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Über einen Zeitraum von drei Wochen hinweg wurde die Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder in einer 1000fachen Vergrößerung pro Maus und Tag bestimmt und über die Gruppe (4 Mäuse) gemittelt. Die hier angegebenen Oozystenanzahlen (MW) entsprechen dem Mittel aus 14 (GKO) bzw. 12 (IL12KO) unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken markieren jeweils den niedrigsten bzw. höchsten in die Auswertung eingegangenen Mittelwert der einzelnen Gruppen. Mit * gekennzeichnete Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied zum vorangehenden Tag innerhalb eines Mausstamms, mit • gekennzeichnete Säulen einen signifikanten Unterschied zwischen GKO und IL12KO zum selben Zeitpunkt (schwarz $p \leq 0,03$ bzw. grau $p < 0,08$). In der Tabelle sind noch einmal die jeweiligen Mittelwerte (MW), Minima (Min) und Maxima (Max) der Untersuchungstage *post infectionem* (p.i.) zusammengefasst.

3.1.1.2 Parasitenausscheidung nach Reinfektion

In den Infektionsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl IFN- γ - als auch IL-12 p40-Knockout-Mäuse suszeptibel für eine Infektion mit dem Darmparasiten *C. parvum* sind, diese jedoch trotz der Unterschiede im Verlauf innerhalb von zwei Wochen überwandten. Daher war es möglich, Folgeuntersuchungen zur Persistenz und Resistenzentwicklung an den infizierten Mäusen durchzuführen. Im Folgenden wurde untersucht, wie die beiden Knockout-Mausstämme auf eine erneute Konfrontation mit dem Parasiten reagieren, und

ob sich Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokin-Ausstattung zeigen.

Reinfektion mit 1×10^6 Oozysten

Die Knockout-Mäuse wurden fünf Wochen nach einer ersten Infektion noch einmal mit 1×10^6 Oozysten infiziert. Jetzt konnten in den Stühlen nur noch sehr vereinzelt Oozysten (1-2 Oozysten in 100 mikroskopischen Feldern) nachgewiesen werden (Abb. 3.1.4 B). Mäuse vergleichbaren Alters, die zum selben Zeitpunkt erstmalig infiziert wurden, zeigten jeweils die gewohnt hohen Parasitenausscheidungen. Der Versuchsansatz wurde insgesamt sechs Mal jeweils mit einer Gruppengröße von vier Mäusen durchgeführt. Abbildung 3.1.4 A zeigt zum Vergleich erneut die in Abschnitt 3.1.1.1 gewonnenen Daten zur Parasitenausscheidung nach einer ersten Infektion mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten (siehe auch Abb. 3.1.3).

Nach der Reinfektion von GKO-Mäusen zeigte sich an Tag 15 im Mittel ein leichter Anstieg der Oozystenausscheidung auf durchschnittlich 6 Oozysten in 100 mikroskopischen Gesichtsfeldern (Abb. 3.1.4 B). Dieser liegt begründet im Anstieg der Parasitenausscheidung von zwei Mäusen während eines Experiments von 0 (Tag 12) auf 19 bzw. 39 Oozysten in 100 Gesichtsfeldern (Tag 15). Auch wenn dieses Phänomen ansonsten nicht beobachtet werden konnte, bleibt zu überprüfen, ob die Ausscheidung von Oozysten bei GKO generell zu einem späteren Zeitpunkt wieder ansteigt.

Im Rahmen dieses Versuchsansatzes wurden des Weiteren zum Vergleich adulte C57BL/6-Wildtypmäuse mit 1×10^6 Oozysten oral infiziert. Wie erwartet konnten hier nur sehr wenige Oozysten nachgewiesen werden (Abb. 3.1.4 A). Die Ausscheidung der erneut mit *C. parvum* infizierten Knockout-Mäuse entsprach damit der von Wildtypmäusen bei einer ersten Konfrontation.

IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse sind damit im Rahmen einer ersten Infektion nicht nur in der Lage, die Infektion zu überwinden, sondern bauen zusätzlich einen Schutz vor einer Folgeinfektion mit gleicher Infektionsdosis auf.

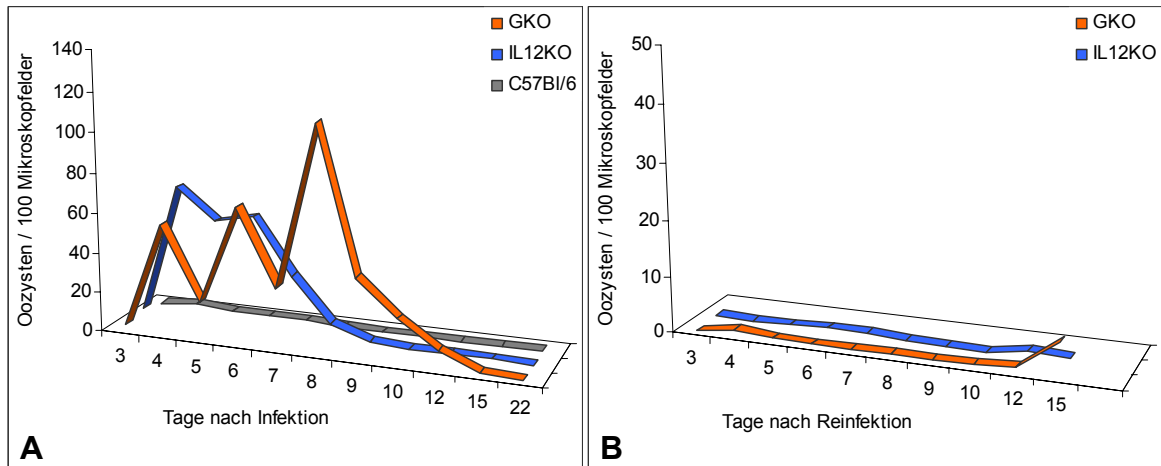


Abb. 3.1.4: Parasitenausscheidung nach Reinfektion von Knockout-Mäuse mit *C. parvum*-Oozysten

Die Parasitenausscheidung nach Infektion [A] und Reinfektion [B] von IFN- γ -Knockout- (GKO), IL-12 p40-Knockout- (IL12KO) und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Über einen Zeitraum von drei bzw. zwei Wochen hinweg wurde die Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder in einer 1000fachen Vergrößerung pro Maus und Tag bestimmt und über die Gruppe (4 Mäuse) gemittelt. Die hier angegebenen Oozystenanzahlen entsprechen dem Mittel aus 14 (GKO), 12 (IL12KO) bzw. 1 (C57BL/6) unabhängigen Experimenten bei Infektion [A] und jeweils 6 unabhängigen Experimenten bei Reinfektion [B]. Die in [A] gezeigten Parasitenausscheidungen für GKO und IL12KO entsprechen denen in Abb. 3.1.3.

Reinfektion mit 1×10^7 Oozysten

Es war nun von Interesse, ob die von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen im Rahmen einer ersten Konfrontation mit dem Parasiten, das heißt einer Infektion mit 1×10^6 Oozysten aufgebauten Resistenz, auch bei einer Infektion mit 1×10^7 Oozysten schützend wirkt, oder ob sie mit einer 10fach stärkeren Infektionsdosis durchbrochen werden kann.

Zwei Gruppen von Mäusen beider Knockout-Mausstämme wurden zunächst mit 1×10^6 Oozysten infiziert. Sie wiesen im Anschluss die gewohnt hohe Parasitenausscheidung auf, die nach circa zwei Wochen wieder unter die Nachweisgrenze sank. Fünf Wochen nach dieser Konfrontation wurden jeweils eine Gruppe mit 1×10^6 und die zweite Gruppe mit 1×10^7 Oozysten erneut infiziert. Parallel wurden Kontrollgruppen mit der entsprechenden Infektionsdosis zum ersten Mal infiziert. In Abbildung 3.1.5 sind die Mittelwerte der Oozystenausscheidung der verschiedenen Gruppen von jeweils vier Mäusen aufgezeigt.

Nach einer zweiten Infektion mit 1×10^7 *C. parvum*-Oozysten konnten genauso wie bei den mit 1×10^6 Oozysten reinfizierten Mäusen beider Knockout-Mausstämme nur noch sehr vereinzelt Oozysten im Stuhl nachgewiesen werden (1-2 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern). Eine über die Ausscheidung von Oozysten messbare

Parasitenvermehrung konnte damit auch mit einer 10fach höheren Infektionsdosis bei keiner der beiden Mausstämmen induziert werden.

Die Kontrollgruppe der GKO, die zum gleichen Zeitpunkt zum ersten Mal mit 1×10^7 Oozysten infiziert wurde, wies eine mit der mit 1×10^6 Oozysten infizierten Gruppe vergleichbar hohe Parasitenausscheidung auf. Der zu erwartende Unterschied in der Parasitenausscheidung bei unterschiedlich hoher Infektionsdosis blieb damit hier aus. Mit 1×10^7 Oozysten infizierte GKO zeigten ebenfalls den bereits von den mit 1×10^6 Oozysten infizierten Mäusen bekannten alternierenden Verlauf der Ausscheidung in den ersten neun Tagen. Bei den IL12KO-Kontrollgruppen konnten Unterschiede im Infektionsverlauf je nach Infektionsdosis beobachtet werden. Mit 1×10^7 Oozysten infizierte IL12KO schieden an Tag 4 signifikant mehr Oozysten aus als die mit der niedrigeren Dosis infizierten Mäuse. Die Ausscheidung sank am darauf folgenden Tag jedoch wieder auf das Niveau der Vergleichsgruppe und nahm einen nahezu identischen Verlauf an.

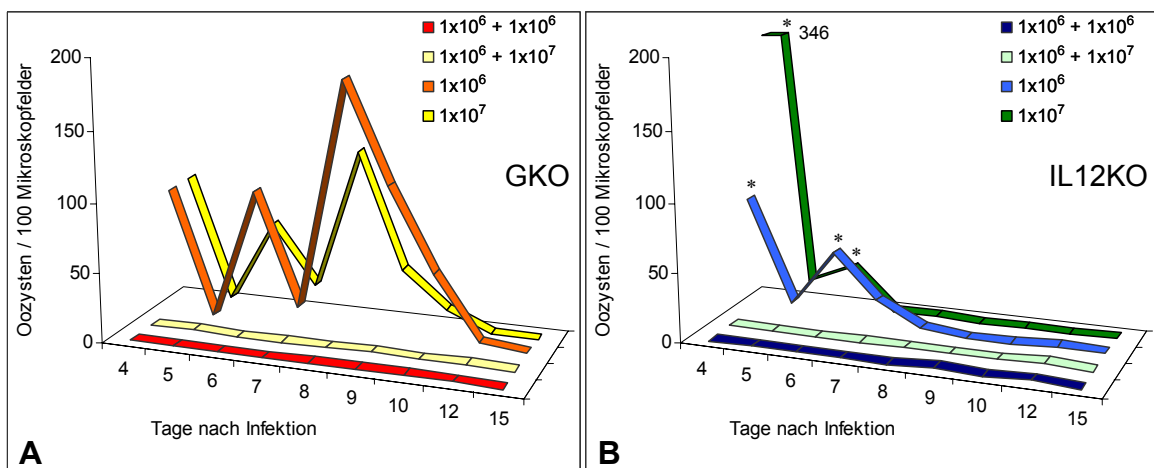


Abb. 3.1.5: Parasitenausscheidung nach Infektion und Reinfektion mit 1×10^6 bzw. 1×10^7 Oozysten

Die Parasitenausscheidung nach Infektion und Reinfektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A] und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [B] mit 1×10^6 bzw. 1×10^7 *C. parvum*-Oozysten wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg wurde die Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder in einer 1000fachen Vergrößerung pro Maus und Tag bestimmt und über die Gruppe (4 Mäuse) gemittelt. Von beiden Mausstämmen wurden eine Gruppe zweimal mit 1×10^6 , eine mit 1×10^6 und nach fünf Wochen mit 1×10^7 und jeweils eine Gruppe nur einmal mit 1×10^6 bzw. 1×10^7 Oozysten infiziert. Mit * sind signifikante Unterschiede zwischen den Ausscheidungen von IL12KO angegeben, die mit 1×10^6 bzw. 1×10^7 Oozysten infiziert wurden ($p \leq 0,04$).

3.1.2 Histologischer Nachweis einer Infektion im Ileum

Zur Untermauerung der Ergebnisse, die mit dem Nachweis von Parasiten im Stuhl *post infectionem* gewonnen wurden, wurde bei einigen Mäusen auch ein histologischer Nachweis der Infektion im Ileum geführt. Dazu wurde fünf Tage nach einer Infektion bzw. Reinfektion von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit 1×10^6 Oozysten der terminale Abschnitt des Dünndarms direkt oberhalb des Caecums präpariert, fixiert und für die Herstellung von Paraffinschnitten aufgearbeitet und eingebettet (siehe 2.5.3.5). Nach einer ersten Konfrontation mit dem Parasiten konnte zu diesem Zeitpunkt bei beiden Knockout-Mausstämmen aufgrund der Analyse der Parasitenausscheidung von einer Etablierung der Infektion im Ileum ausgegangen werden. Paraffinschnitte von 4 μm Dicke wurden einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen (siehe 2.4.8). Mit Hilfe der HE-Färbung lassen sich die intrazellulären Stadien von *C. parvum* als kleine, sphärische Partikel (2-5 μm) mit basophiler Färbeseigenschaft entlang der Epitheloberfläche des Ileums darstellen. Ileum-Präparationen von nicht infizierten Knockout-Mäusen gleichen Alters dienten als Negativkontrollen. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop in einer 1000fachen Vergrößerung mit Ölimmersion. Die Abbildung 3.1.6 zeigt exemplarisch repräsentative Aufnahmen von Paraffinschnitten, die von dem Ileum einer infizierten, einer reinfizierten und zum Vergleich einer nicht infizierten IFN- γ - bzw. IL-12 p40-Knockout-Maus hergestellt wurden.

In den Paraffinschnitten vom terminalen Dünndarm infizierter Knockout-Mäuse konnte mit Hilfe der HE-Färbung die Infektion in Form von intrazellulären Stadien von *C. parvum* deutlich dargestellt werden. Bei den GKO zeigte sich eine sehr viel stärkerer Befall der Epithelzellen nach einer ersten Konfrontation mit dem Parasiten als bei den IL12KO (Abb. 3.1.6 A, D). Es wurden hier insgesamt mehr intrazelluläre Stadien identifiziert. Bei den Knockout-Mäusen, die fünf Wochen nach einer Infektion erneut infiziert wurden, konnten in den Paraffinschnitte des Ileums keine intrazellulären Stadien aufgefunden werden (Abb. 3.1.6 B, E). Das Bild glich dem von Ileumschnitten nicht infizierter Mäuse (Abb. 3.1.6 C, F).

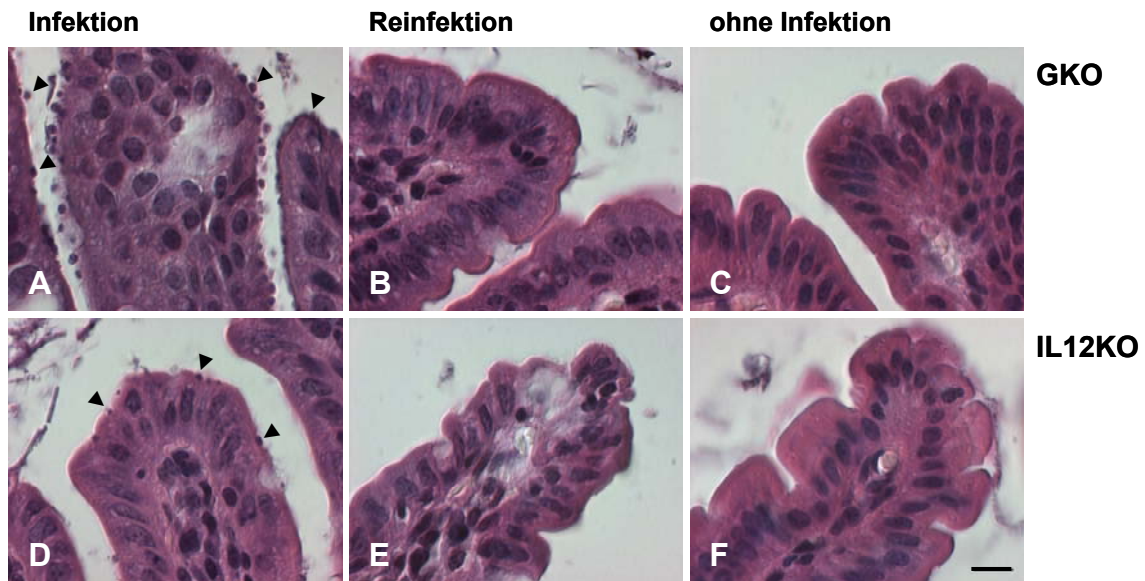


Abb. 3.1.6: Histologischer Nachweis von Parasitenstadien im Ileum infizierter Knockout-Mäuse

Fünf Tage nach einer Infektion [A, D] bzw. Reinfektion [B, E] von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A-C] und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [D-F] mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde von den infizierten Mäusen das terminale Ende des Dünndarms präpariert. Es wurden Paraffinschnitte (4 μ m) angefertigt, die zur Darstellung der intrazellulären Stadien von *C. parvum* einer HE-Färbung unterzogen wurden. Als Negativkontrolle diente das Ileum nicht infizierter Mäuse [C, F]. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer 1000fachen Vergrößerung mit Ölimmersion erstellt. Die Pfeilspitzen deuten auf intrazelluläre Stadien des Darmparasiten. Der Maßstabsbalken in [F] entspricht 10 μ m.

3.1.3 Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren im Ileum

Neben dem Nachweis einer Infektion über die Quantifizierung von ausgeschiedenen Oozysten mit dem Stuhl und dem histologischen Nachweis intrazellulärer Stadien im Ileum wurde der Parasit auch mit Hilfe einer *C. parvum*-spezifischen PCR bzw. RT-PCR im Ileum detektiert. Mit dem sensitiven Nachweis von Parasiten-Nukleinsäuren durch die Polymerase-Kettenreaktion können auch subklinische Infektionen bestimmt werden. Ziel war es zu überprüfen, ob nach einer Reinfektion der Knockout-Mäuse trotz des Absinkens der Oozystenausscheidung unter die Nachweisgrenze und dem negativen histologischen Befund dennoch eine Infektion der Epithelzellen des Ileums stattfindet. Fünf Tage nach einer Infektion bzw. Reinfektion mit 1×10^6 Oozysten wurden daher Präparationen von RNA und genomischer DNA aus dem Ileum bzw. der Ileummukosa von Mäusen beider Knockout-Mausstämme durchgeführt. Für die Amplifikation des CP17-Gens von *C. parvum* mit Hilfe der PCR wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokolle

angewandt. Als Kontrolle wurde jeweils das GAPDH-Gen der Maus amplifiziert, um sicherzustellen, dass die eingesetzten Mengen an genomischer DNA und cDNA in einem PCR-Ansatz vergleichbar waren.

3.1.3.1 Nachweis von *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA

Zum Nachweis von *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA im Ileum wurde fünf Tage nach Infektion bzw. Reinfektion von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten die Mukosa aus dem terminalen Ende des Dünndarms präpariert. Anschließend wurde die genomische DNA extrahiert und in eine PCR mit CP17-spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR wurde nach dem unter 2.2.1.2 beschriebenen Protokoll und einer Zyklenanzahl von 35 durchgeführt.

Eine Infektion ließ sich bei beiden Knockout-Mausstämmen auch sehr gut auf Ebene der genomischen DNA darstellen (Abb. 3.1.7). Die Mäuse waren alle deutlich positiv für *C. parvum*-spezifische DNA, wobei die PCR mit 100 ng DNA als Matrize nach 35 Zyklen bei jeder einmal infizierten Maus bereits deutlich die stationäre Phase der Amplifikation erreicht hatte, so dass keine Aussage mehr über eventuelle Unterschiede in der Infektionsrate getroffen werden konnte. Zweimal infizierte Mäuse zeigten auch mit einer eingesetzten DNA-Menge von 200 ng nur zum Teil ein Produkt, welches dann jedoch wesentlich geringer ausfiel als bei den einmal infizierten Mäusen. Bei den GKO konnte bei sechs von acht Mäusen eine dünne Bande detektiert werden, bei den IL12KO nur bei drei von acht Mäusen. Die Amplifikation des murine GAPDH-Gen führte bei allen Proben zu vergleichbaren Produktmengen. Die PCR mit genomischer DNA von nicht infizierten Mäusen zeigte kein Amplifikationsprodukt (nicht gezeigt).

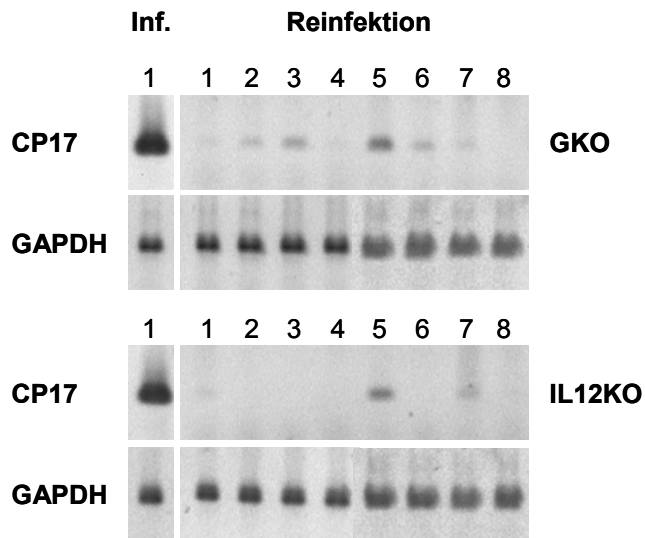


Abb. 3.1.7: Nachweis von *C. parvum* im Ileum durch Amplifikation des CP17-Gens mittels PCR

Fünf Tage nach einer Infektion bzw. Reinfektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde die genomische DNA aus der Mukosa des Ileums präpariert. Zur Amplifikation des CP17-Gens wurden bei Infektion (Inf.) 100 ng DNA, bei Reinfektion 200 ng DNA als Matrize in die PCR eingesetzt. Als Kontrolle wurde parallel das murine GAPDH-Gen amplifiziert (100 ng DNA als Matrize). Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Das PCR-Produkt nach Infektion steht stellvertretend für acht getestete Mäuse.

3.1.3.2 Nachweis von *C. parvum*-spezifischer RNA

Der Nachweis von genomischer DNA gibt generell einen Hinweis auf die Anwesenheit eines Parasiten. Um jedoch eine nähere Auskunft über die Infektionsrate und die Vitalität eines intrazellulären Parasiten zu erlangen, ist es empfehlenswert, die transkriptionelle Aktivität eines über den gesamten Zyklus hinweg exprimierten Gens zu bestimmen. Für die Messung der transkriptionellen Aktivität der intrazellulären Stadien von *C. parvum* im Ileum der infizierten Mäuse wurde die Amplifikation der CP17-mRNA gewählt. In der in Kapitel 3.3 vorgestellten Studie zur differentiellen Expression von *C. parvum*-Genen in infizierten HCT-8-Zellen konnten wir beobachten, dass CP17-mRNA ab 8 h *post infectionem* über den gesamten Entwicklungszyklus hinweg stark exprimiert wird (Abb. 3.3.7; Jakobi & Petry, 2006). Es ist daher davon auszugehen, dass bei einer transkriptionellen Aktivität des Parasiten CP17-mRNA in jedem Fall gut nachzuweisen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CP17 nur in geringen Kopienzahlen in der mRNA von frisch exzystierten Sporozoiten vorliegt (Abb. 3.3.8). Daher kann eine Verfälschung der PCR-Ergebnisse durch Amplifikation der CP17-mRNA aus eventuell verschleppten, bereits *de novo* im Ileum gebildeten Oozysten hier weitestgehend

ausgeschlossen werden.

Die Gesamt-RNA wurde fünf Tage nach einer Infektion bzw. Reinfektion von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit 1×10^6 Oozysten aus dem terminalen Ende des Dünndarms der Mäuse gewonnen. Die cDNA-Synthese wurde so angesetzt, dass 1 μ l cDNA 100 ng Gesamt-RNA entsprach. Die Durchführung der PCR mit CP17-spezifischen Primern erfolgte nach dem unter 2.2.1.2 beschriebenen Protokoll und einer Zyklusanzahl von 35.

In Folge einer ersten Infektion der IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse mit dem Parasiten erhielt man bei einer PCR mit 1 μ l cDNA als Matrize bei allen Mäusen beider Stämme ein sehr starkes Produkt (Abb. 3.1.8), wobei die PCR unter den gegebenen Bedingungen deutlich ihr Sättigungsplateau erreichte. Eine semiquantitative Bestimmung der Kopienzahlen der CP17-mRNA, um Unterschiede im Infektionsgrad zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen zu bestimmen, wurde nicht durchgeführt. Nach einer Reinfektion ergab die Amplifikation des CP17-Genproduktes auch bei einem Einsatz von 2 μ l cDNA als Matrize nur bei der Hälfte der untersuchten GKO-Mäuse ein Produkt. Dieses fiel zudem sehr viel geringer aus als nach einer ersten Infektion. Bei den IL12KO blieb die RT-PCR wie auch die PCR mit cDNA von nicht infizierten Mäusen negativ. Die Amplifikation des murinen GAPDH-Genproduktes führte bei allen Proben zu vergleichbaren Produktmengen.

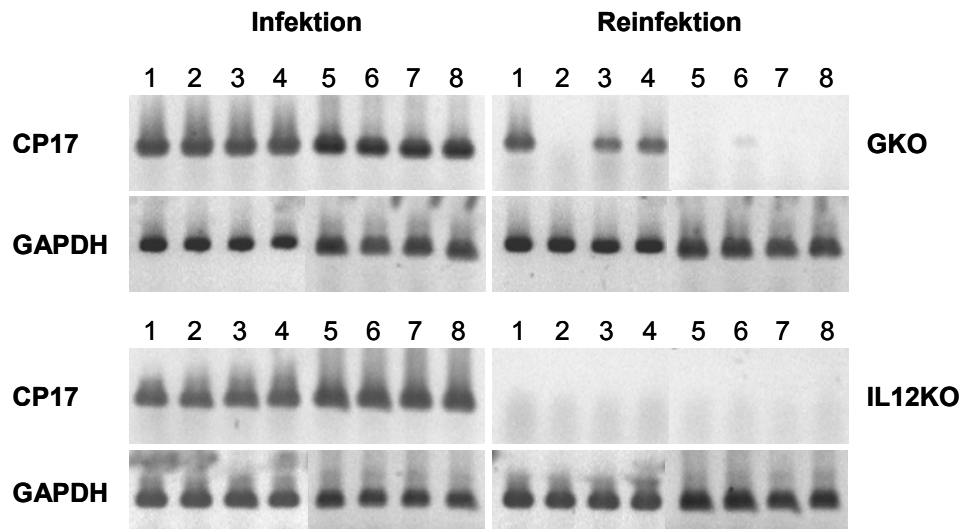


Abb. 3.1.8: Nachweis von *C. parvum* im Ileum durch Amplifikation der CP17-mRNA durch RT-PCR

Fünf Tage nach einer Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde die Gesamt-RNA aus dem Ileum präpariert und die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation des CP17-Genproduktes wurden bei Infektion 1 μ l cDNA, bei Reinfektion 2 μ l cDNA als Matrize in die PCR eingesetzt (1 μ l = 100 ng RNA). Als Kontrolle wurde parallel das murine GAPDH-Genprodukt amplifiziert (1 μ l cDNA als Matrize). Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

3.1.4 Charakterisierung der Antikörperantwort

Neben dem Parasitennachweis wurden erstmalig serologische Untersuchungen bei IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen im Anschluss an eine Infektion mit *Cryptosporidium parvum* durchgeführt. Die Infektionsstudien zeigten, dass beide Knockout-Mausstämme in der Lage sind, eine Infektion unabhängig der Zytokine IFN- γ und IL-12 zu überwinden. Zwei Wochen *post infectionem* konnten nur noch vereinzelt Oozysten im Stuhl nachgewiesen werden. Es sollte im Folgenden überprüft werden, wie die Antikörperantwort nach einer Infektion zusammengesetzt ist, wie sie sich über einen längeren Zeitraum nach der Infektion verhält, ob sie Aufschluss über den Verlauf einer Infektion geben kann und ob ihr eine Bedeutung bei der Überwindung einer Infektion zukommt.

Vor und vier, neun und vierzehn Wochen nach einer Infektion wurden von den infizierten Knockout-Mäusen sowohl Serumproben als auch Vaginalspülungen gewonnen. Zur Detektion spezifischer IgG- und IgA-Antikörper wurden reproduzierbare ELISA-Systeme und Immunoblots etabliert. Als Antigene kamen Parasitenlysate und die im Rahmen dieser Arbeit exprimierten und gereinigten rekombinanten Sporozitenoberflächenproteine P23

und CP17 zum Einsatz, die zu den Hauptantigenen während einer *C. parvum*-Infektion zählen.

3.1.4.1 Nachweis von Parasitenlysate-reaktiven Serum-Antikörpern im ELISA

Für den Nachweis von Parasitenlysate-spezifischem IgG und IgA im ELISA (siehe 2.4.5.2) wurden die Seren jeweils 1:100 verdünnt, dann in Zwischenschritten weiter verdünnt und für zwei Stunden mit dem Antigen (Parasitenlysate aus $2,5 \times 10^6$ Oozysten/ml) inkubiert. Der Nachweis von spezifisch gebundenen Antikörpern erfolgte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Anschließend folgten eine Inkubation mit ExtrAvidin-Peroxidase und die Entwicklung mit dem Substrat o-Phenylenediamin (OPD). Als interner Standard wurde bei jedem ELISA ein Serum mit bekanntem Antikörpertiter mitgeführt. Zur Bewertung und zum Vergleich der Proben wird im Folgenden als Antikörpertiter die Verdünnung angegeben, bei der die gemessene optische Dichte der Substratlösung das Niveau der Kontrollseren von Mäusen ohne Infektion zeigte, was einer OD von kleiner gleich 0,2 entsprach.

Parasitenlysate-reaktive Antikörper nach Infektion

Seren von insgesamt 47 IFN- γ -Knockout-Mäusen aus 12 unabhängigen Experimenten bzw. Seren von insgesamt 40 IL-12 p40-Knockout-Mäusen aus 10 unabhängigen Experimenten, die vier Wochen nach einer Infektion mit 1×10^6 Oozysten gewonnen wurden, wurden auf *C. parvum*-reaktive Antikörper im Parasitenlysate-ELISA untersucht. Sowohl IL12KO- als auch GKO-Mäuse entwickelten im Rahmen einer ersten Begegnung mit dem Darmparasiten eine starke Immunantwort mit spezifischen Antikörpern im Serum. Es zeigte sich eine große Bandbreite an Antikörpertitern für spezifisches IgG und auch IgA bei den untersuchten Mäusen (Abb. 3.1.9 A, C), jedoch konnte augenscheinlich keine Korrelation zwischen der Höhe des Antikörpertiters und der Ausscheidungsrate an Oozysten mit dem Stuhl gefunden werden. GKO-Mäuse bauten insgesamt eine signifikant stärkere Antikörperantwort auf als IL12KO-Mäuse. Um die Antikörperantwort über einen längeren Zeitraum *post infectionem* beschreiben zu können, wurden des Weiteren auch Seren neun und vierzehn Wochen nach Infektion gewonnen. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Verhalten der Antikörpertiter zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen im zeitlichen Verlauf (Abb. 3.1.9 B, D).

Bei allen infizierten Knockout-Mäusen konnte in einem ELISA mit Oozystenlysat als Antigen vier Wochen p.i. spezifisches **IgG** im Serum nachgewiesen werden (Abb. 3.1.9 A), wobei IFN- γ -Knockout-Mäuse im Durchschnitt einen signifikant höheren Antikörpertiter aufwiesen (1:6400; $p = 0,006$) als IL-12 p40-Knockout-Mäuse (1:1600-3200). 70 % der GKO-, jedoch nur 48 % der IL12KO-Mäuse zeigten einen Antikörpertiter von $\geq 1:3200$. Bis vierzehn Wochen p.i. blieb bei den GKO der mittlere IgG-Titer im Serum relativ gleich hoch (Abb. 3.1.9 B). Bei den IL12KO sanken die Mengen an spezifischem IgG hingegen bis neun Wochen p.i. ($p = 0,025$) und noch weiter bis vierzehn Wochen p.i. ($p = 0,004$) kontinuierlich signifikant ab.

Vier Wochen nach einer Infektion entwickelten alle IFN- γ - und 93 % der IL-12 p40-Knockout-Mäuse neben spezifischem IgG auch spezifisches **IgA** im Serum (Abb. 3.1.9 C). Auch hier zeigten die GKO im Durchschnitt signifikant höhere Antikörpertiter (1:1600; $p = 0,001$) als die IL12KO (1:400-800). 48 % der IFN- γ -, jedoch nur 23 % der IL-12 p40-Knockout-Mäuse wiesen einen Antikörpertiter von $\geq 1:1600$ auf. Neun Wochen nach einer Infektion schien sich der mittlere IgA-Titer bei den GKO nicht verändert zu haben (Abb. 3.1.9 D). Betrachtet man jedoch die IgA-Titer von den 20 Mäusen, von denen Seren zu beiden Zeitpunkten vorlagen, war ein signifikanter Anstieg von einem mittleren Antikörpertiter von 1:800 auf 1:1600 zu verzeichnen ($p = 0,031$). Vierzehn Wochen p.i. konnte keine signifikante Veränderung mehr beobachtet werden. Die IL12KO wiesen wie auch schon beim IgG ein kontinuierliches Absinken des IgA-Titers über die Zeit auf (9 Wochen p.i. $p = 0,102$).

Mit dem Absinken der durchschnittlichen Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf nach einer Infektion sank bei den IL12KO auch der Anteil an positiven Seren über die Zeit deutlich ab (IgG: 100, 94, 50 %; IgA: 93, 75, 50 %). Bei den GKO-Mäusen waren dagegen zu jedem Zeitpunkt alle Seren positiv für spezifisches IgG und IgA.

Die Signifikanzen wurden jeweils nur für die Seren bestimmt, die von den entsprechenden Mäusen zu beiden verglichenen Zeitpunkten vorlagen.

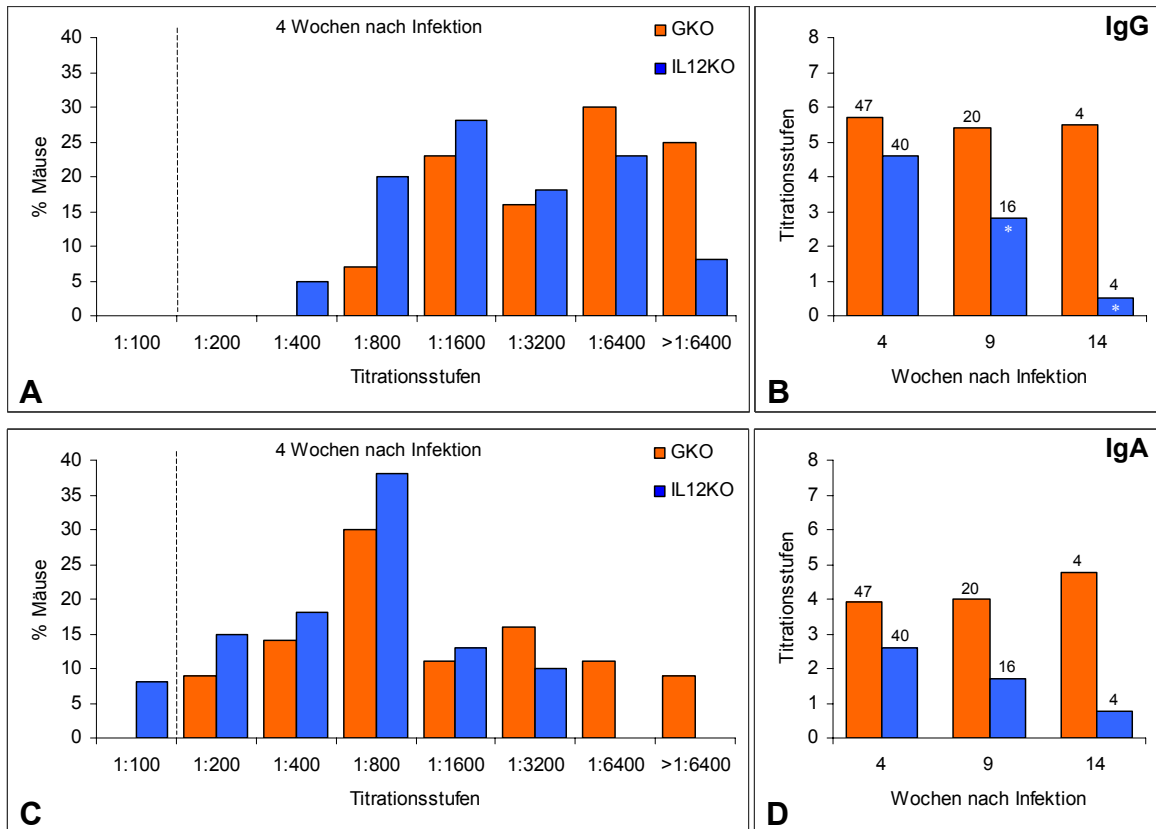


Abb. 3.1.9: Nachweis von Parasitenlysat-reaktivem IgG und IgA im Serum nach Infektion

Nachweis von spezifischem IgG [A, B] und IgA [C, D] im Serum in einem ELISA mit Parasitenlysat als Antigen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Die Seren wurden ab 1:100 in Zwischenschritten verdünnt. In [A] und [C] ist der Prozentsatz an Mäusen angegeben, die vier Wochen p.i. eine bestimmte Titrationsstufe aufwiesen. Die angegebenen Werte ergaben sich aus der Untersuchung von Seren von 47 GKO und 40 IL12KO aus 12 (GKO) bzw. 10 (IL12KO) unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie gibt die Titrationsstufe an, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden. In [B] und [D] ist die mittlere Titrationsstufe von n (= Zahl über den Balken) untersuchten Mäusen 4, 9 und 14 Wochen nach Infektion angegeben. Die Titrationsstufe 1 entspricht einer Verdünnung von 1:200. Mit einem weißen * sind statistisch signifikante Unterschiede zum vorangehenden Zeitpunkt innerhalb eines Mausstamms gekennzeichnet ($p \leq 0,03$).

In einem weiteren ELISA-System mit Parasitenlysat als Antigen wurde bei einem Teil der Seren auch das Verhältnis der IgG-Subklassen **IgG1** und **IgG2a** mit spezifischen Sekundärantikörpern im Serum vier Wochen p.i. bestimmt. Bei allen getesteten Mäusen war hauptsächlich IgG1 nachweisbar. Erst bei hohen Serum-Titern gelang auch die Detektion von IgG2a. Auf den ersten Blick konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen ausgemacht werden.

Parasitenlysat-reaktive Antikörper nach Reinfektion

Es war nun von Interesse, wie sich die Immunantwort auf serologischer Ebene im Zuge einer zweiten Auseinandersetzung mit dem Parasiten verhielt. Fünf Wochen nach einer ersten Infektion wurden die Mäuse noch einmal mit 1×10^6 Oozysten infiziert. Vier Wochen nach der ersten Infektion und vier und neun Wochen nach der Reinfektion wurden Seren gewonnen und auf spezifische Antikörper hin untersucht.

Die Antikörpertiter bei den IFN- γ -Knockout-Mäusen stiegen im Serum bis vier Wochen nach einer zweiten Infektion sowohl beim IgG ($p = 0,145$) als auch beim IgA ($p = 0,201$) deutlich an und behielten bis zum nächsten Zeitpunkt dasselbe Niveau bei (Abb. 3.1.10 A). Die IL-12 p40-Knockout-Mäuse zeigten im Gegensatz zum zeitlichen Verlauf nach nur einer Infektion anstelle von sinkenden jetzt eher gleich bleibende IgG- und IgA-Titer (Abb. 3.1.10 B). Damit hatte eine zweite Konfrontation mit dem Parasiten bei beiden Knockout-Mausstämmen ein Booster-Effekt auf die Antikörperantwort.

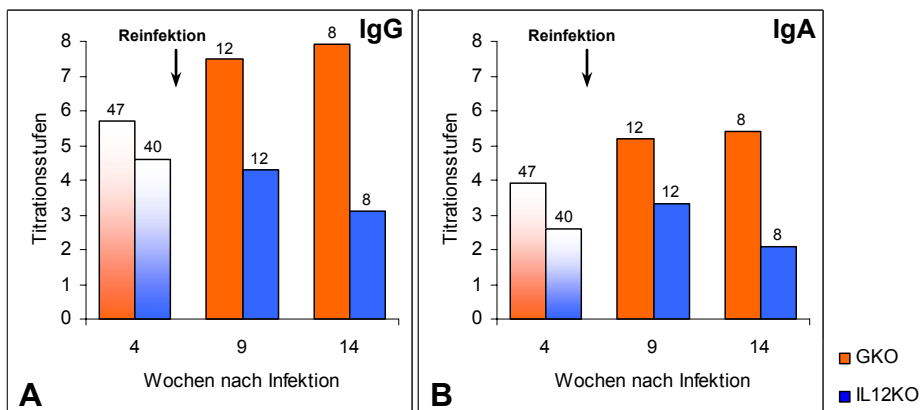


Abb. 3.1.10: Nachweis von Parasitenlysat-reaktivem IgG und IgA im Serum nach Reinfektion

Nachweis von spezifischem IgG [A] und IgA [B] im Serum in einem ELISA mit Parasitenlysat als Antigen 4, 9 und 14 Wochen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten, wobei 5 Wochen p.i. eine Reinfektion erfolgte. Angegeben ist die mittlere Titrationsstufe von n (= Zahl über den Balken) untersuchten Mäusen zu dem entsprechenden Zeitpunkt. Die Seren wurden ab 1:100 in Zweierschritten verdünnt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200. Die Werte vier Wochen p.i. sind mit denen in Abb. 3.1.9 identisch.

3.1.4.2 Nachweis von P23- und CP17-reaktiven Serum-Antikörpern im ELISA

Die Sporoziten-Oberflächenproteine P23 und CP17 des Darmparasiten *C. parvum* führen als immundominante Antigene in Tieren und Menschen mit spontaner oder induzierter Kryptosporidiose zu einer spezifischen Antikörperantwort. Um genauere Auskunft darüber zu erlangen, ob diese beiden Hauptantigene auch bei Infektionen von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen eine Rolle spielen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ELISA-Systeme entwickelt, welche es erlauben, gezielt spezifische Antikörper gegen P23 und CP17 nachzuweisen (siehe 2.4.5.2). Für die heterologe Expression beider Proteine wurden prokaryontische Expressionssysteme gewählt. Rekombinantes CP17 wurde als GST-Fusionsprotein in Rosetta-gami-Bakterien (*E. coli*) exprimiert, über eine Glutathion-Sepharose-Säule affinitätsgereinigt und anschließend mit Hilfe einer Thrombinspaltung von seinem Fusionspartner getrennt. Rekombinantes P23_{His} wurde in *E. coli* TOP10 exprimiert und über seinen N-terminalen Histidin-Anhang über eine Nickel-Matrix gereinigt (siehe 2.4.9). Nach einer Reihe von Test-ELISA, bei denen unserer Arbeitsgruppe vorliegende, *C. parvum*-reaktive Seren zum Einsatz kamen, wurde die einzusetzende Antigenmenge der rekombinanten Proteine auf 1 $\mu\text{g/ml}$ rCP17 und 0,4 $\mu\text{g/ml}$ rP23_{His} festgelegt. Für die hier durchgeführten serologischen Untersuchungen wurde das Antigen jeweils aus derselben Reinigung verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Des Weiteren wurde als interner Standard immer ein Serum mit einem bekannten Antikörpertiter mitgeführt. Zur Bewertung und zum Vergleich der Proben wird auch hier als Antikörpertiter die Verdünnung angegeben, bei der die gemessene optische Dichte der Substratlösung dem Niveau der Kontrollseren von Mäusen ohne Infektion entsprach.

CP17-reaktive Antikörper nach Infektion

Der ELISA mit rCP17 als alleiniges Antigen entsprach in der Höhe der ermittelten Antikörpertiter und der Nachweisbarkeit dem ELISA mit Parasitenlysat. Vier Wochen nach einer Infektion konnte bei allen untersuchten Knockout-Mäusen (32 GKO und 28 IL12KO) spezifisches IgG detektiert werden. Bis auf eine IL12KO-Maus waren alle Mäuse auch positiv für CP17-reaktives IgA (Abb. 3.1.11 A, C). Wieder zeigte sich ein sehr breites Spektrum an verschiedenen Antikörpertitern, welches mit dem Parasitenlysat-ELISA vergleichbar war (Abb. 3.1.9). Ein deutlicher Unterschied zwischen GKO und IL12KO in der Höhe der Antikörpertiter konnte hier nur beim Nachweis von spezifischem IgA

gefunden werden.

Die GKO-Mäuse zeigten einen durchschnittlichen **IgG**-Titer von 1:3200 (56 % \geq 1:3200), was in etwa dem Ergebnis des Parasitenlysate-ELISA dieser Seren (durchschnittlicher Antikörpertiter 1:3200-6400, 63 % \geq 1:3200) entsprach. Die IL12KO besaßen einen mit den GKO vergleichbar hohen durchschnittlichen Antikörpertiter von 1:1600-3200 (50 % \geq 1:3200). Damit war die Reaktivität der IL12KO-Seren insgesamt besser, wenn ausschließlich Cp17 als Antigen angeboten wurde. Bei der Detektion von Parasitenlysate-reaktivem IgG zeigten nur 29 % dieser Seren einen Titer von \geq 1:3200 (durchschnittlicher Antikörpertiter 1:1600). Beim Nachweis von CP17-reaktivem **IgA** wiesen die GKO mit durchschnittlich 1:800 (38 % \geq 1:1600) wieder einen signifikant ($p = 0,03$) höheren Antikörpertiter auf als die IL12KO (1:400-800; 14 % \geq 1:1600). Die ermittelten Titer waren vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem Parasitenlysate-ELISA für die GKO-Mäuse. Mit dem CP17-ELISA wurden zwei zusätzliche IL12KO-Mäuse positiv für spezifischen IgA bewertet als mit dem Parasitenlysate-ELISA.

Im zeitlichen Verlauf nach einer Infektion konnten auch mit dem CP17-ELISA die beim Parasitenlysate-ELISA beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen gefunden werden (Abb. 3.1.11 B, D). Die IL12KO zeigten wieder eine deutliches, signifikantes ($p \leq 0,05$) Absinken der Antikörpertiter neun und vierzehn Wochen nach einer Infektion. Bei den GKO gab es keine signifikanten Veränderungen in der Höhe des IgA-Titers über den gesamten Zeitraum.

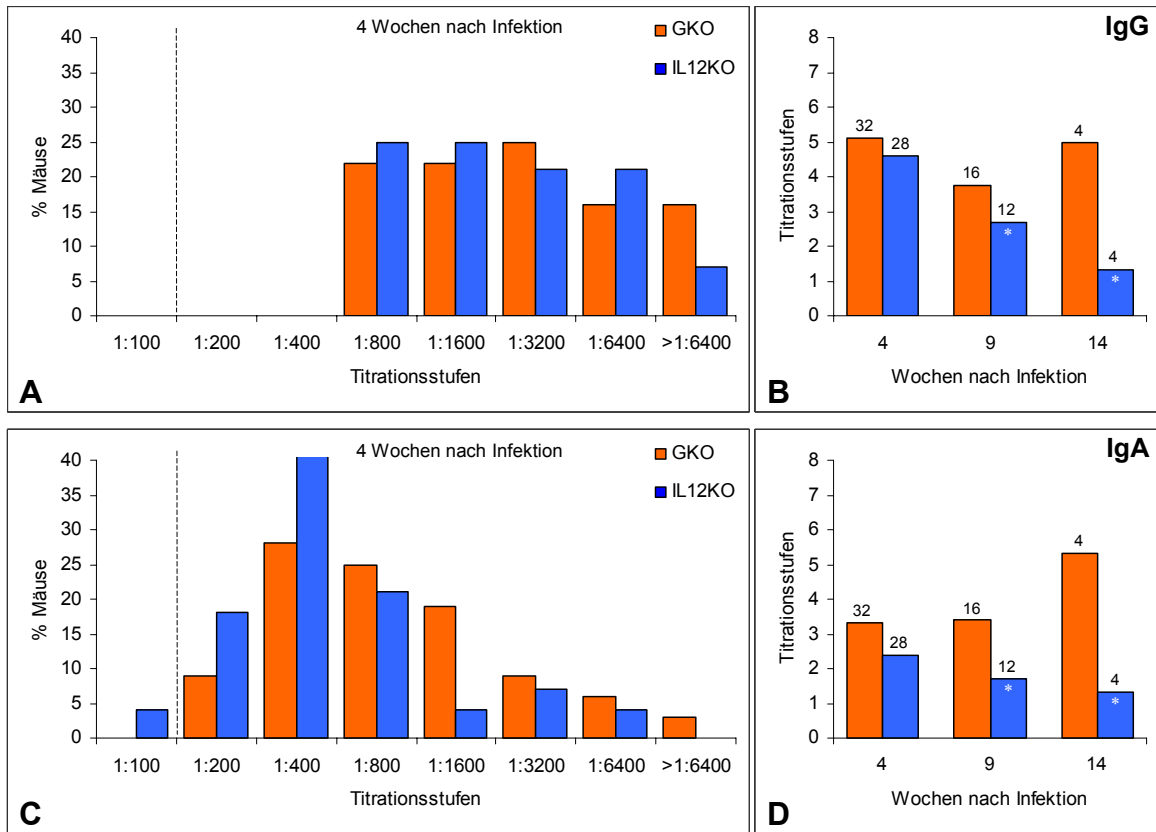


Abb. 3.1.11: Nachweis von CP17-reaktivem IgG und IgA im Serum nach Infektion

Nachweis von spezifischem IgG [A, B] und IgA [C, D] im Serum in einem ELISA mit rekombinantem CP17 als Antigen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Die Seren wurden ab 1:100 in Zweierschritten verdünnt. In [A] und [C] ist der Prozentsatz an Mäusen angegeben, die vier Wochen p.i. eine bestimmte Titrationstufe aufwiesen. Die angegebenen Werte ergaben sich aus der Untersuchung von Seren von 32 GKO und 28 IL12KO aus 8 (GKO) bzw. 7 (IL12KO) unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie gibt die Titrationstufe an, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden. In [B] und [D] ist die mittlere Titrationstufe von n (= Zahl über den Balken) untersuchten Mäusen 4, 9 und 14 Wochen nach Infektion angegeben. Die Titrationstufe 1 entspricht einer Verdünnung von 1:200. Mit einem weißen * sind statistisch signifikante Unterschiede zum vorangehenden Zeitpunkt innerhalb eines Mausstamms gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

CP17-reaktive Antikörper nach Reinfektion

Die Immunantwort nach einer Reinfektion wurde auch auf das Verhalten der CP17-reaktiven Antikörper hin untersucht (Abb. 3.1.12). Bei den GKO-Mäusen konnten hier keine Veränderungen in der Höhe des IgG-Titers vier und auch neun Wochen nach einer erneuten Infektion beobachtet werden. Der IgA-Titer dagegen zeigt den schon mit dem Parasitenlysat-ELISA nachgewiesenen leichten Anstieg ($p = 0,213$) vier Wochen nach der Reinfektion. Im Serum der IL12KO sank die Menge an CP17-spezifischem IgG nach der Reinfektion sogar ab ($p = 0,169$) und besaß auch im weiteren Verlauf die Tendenz zu

sinken. Der ohnehin schon niedrige IgA-Titer veränderte seine Höhe nicht.

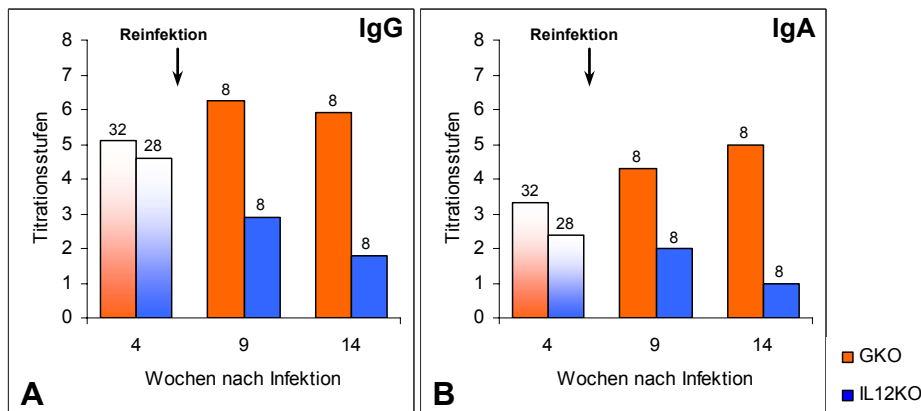


Abb. 3.1.12: Nachweis von CP17-reaktivem IgG und IgA im Serum nach Reinfektion

Nachweis von spezifischem IgG [A] und IgA [B] im Serum in einem ELISA mit rekombinantem CP17 als Antigen 4, 9 und 14 Wochen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten, wobei 5 Wochen p.i. eine Reinfektion erfolgte. Angegeben ist die mittlere Titrationsstufe von n (= Zahl über den Balken) untersuchten Mäusen zu dem entsprechenden Zeitpunkt. Die Seren wurden ab 1:100 in Zweierschritten verdünnt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200. Die Werte vier Wochen p.i. sind mit denen in Abb. 3.1.11 identisch.

P23-reaktive Antikörper nach Infektion

Mit dem P23-ELISA lag die Nachweisbarkeit von spezifischem IgG im Durchschnitt deutlich unter der des Parasitenlysat-ELISA. Die Aufteilung der Mäuse nach ihren Antikörpertitern vier Wochen p.i. zeigt eine Verschiebung hin zu den niedrigeren Titrationsstufen (Abb. 3.1.13 A). Deutlich mehr Mäuse wurden als negativ eingestuft, die in den beiden anderen ELISA-Systemen (Parasitenlysat und rCP17) positiv beurteilt wurden. Der Nachweis, die Höhe und die Verteilung der Titer von P23-reaktivem IgA waren dagegen wieder mit denen des Parasitenlysat-ELISA vergleichbar (Abb. 3.1.13 C). Wie beim CP17-ELISA waren die Unterschiede zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen hier nicht so deutlich als beim Parasitenlysat-ELISA. Lediglich beim Nachweis von spezifischem IgG ließ sich ein leicht höherer IgG-Titer bei den GKO-Mäusen detektieren ($p = 0,147$).

Nur 92 % der untersuchten GKO (22 von 24 Mäusen) zeigten vier Wochen p.i. mit einem durchschnittlichen Antikörpertiter von 1:800 P23-reaktives **IgG** (21 % $\geq 1:3200$). Dieselben Seren wurden im Parasitenlysat-ELISA alle mit einem durchschnittlichen

Antikörpertiter von 1:3200 (58 % \geq 1:3200) als positiv eingestuft. Bei den IL12KO-Mäusen konnte nur bei 80 % der untersuchten Mäuse (16 von 20) spezifisches IgG gegen P23 mit einem durchschnittlichen Antikörpertiter von 1:400 (5 % \geq 1:3200) nachgewiesen werden. Auch hier zeigten dieselben Seren im Parasitenlysate-ELISA einen um zwei Titrationsstufen höheren durchschnittlichen Antikörpertiter (1:1600; 20 % \geq 1:3200, 100 % positiv). Der durchschnittliche **IgA**-Serumtiter der untersuchten GKO-Mäuse von 1:400-800 (21 % \geq 1:1600, 92 % positiv) deckte sich wiederum ziemlich genau mit den Ergebnissen des Parasitenlysate-ELISA derselben Seren (durchschnittlicher Antikörpertiter 1:800, 25 % \geq 1:1600, 100 % positiv). 90 % der IL12KO zeigten P23-reaktives IgA mit einem durchschnittlichen Antikörpertiter von 1:400-800 (20 % \geq 1:1600). Auch dieses Ergebnis glich dem des Parasitenlysate-ELISA dieser Seren (durchschnittlicher Antikörpertiter 1:400, 10 % \geq 1:1600, 85 % positiv).

Im zeitlichen Verlauf nach einer Infektion sanken die Serumtiter von IgG und IgA bei den IL12KO bis neun Wochen p.i., wie auch schon bei dem Parasitenlysate- und dem CP17-ELISA gesehen, signifikant ab ($p \leq 0,01$; Abb. 3.1.13 B, D). Der IgG-Titer der GKO-Mäuse schien bis neun Wochen p.i auch leicht zu sinken ($p = 0,117$). Die Menge an P23-spezifischem IgA blieb über den beobachteten Zeitraum vergleichbar hoch.

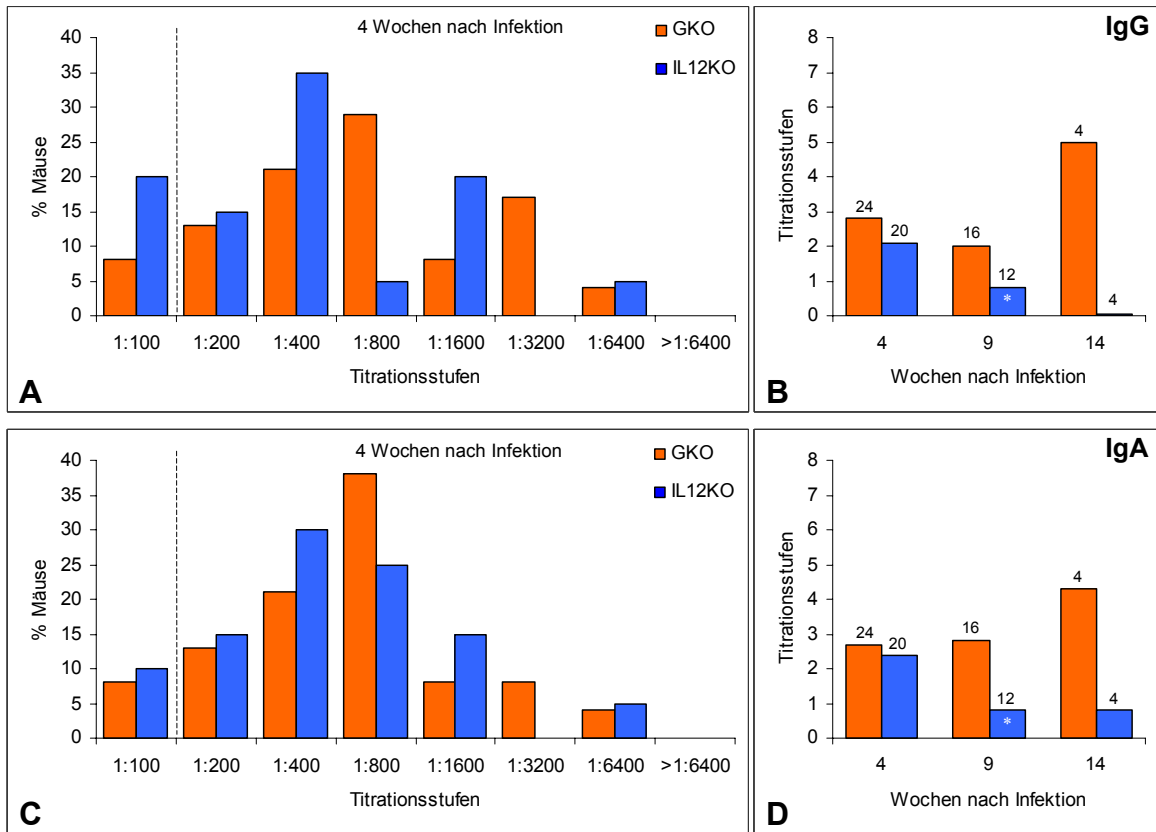


Abb. 3.1.13: Nachweis von P23-reaktivem IgG und IgA im Serum nach Infektion

Nachweis von spezifischem IgG [A, B] und IgA [C, D] im Serum in einem ELISA mit rekombinantem P23 als Antigen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Die Seren wurden ab 1:100 in Zweierschritten verdünnt. In [A] und [C] ist der Prozentsatz an Mäusen angegeben, die vier Wochen p.i. eine bestimmte Titrationsstufe aufwiesen. Die angegebenen Werte ergaben sich aus der Untersuchung von Seren von 24 GKO und 20 IL12KO aus 6 (GKO) bzw. 5 (IL12KO) unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie gibt die Titrationsstufe an, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden. In [B] und [D] ist die mittlere Titrationsstufe von n (= Zahl über den Balken) untersuchten Mäusen 4, 9 und 14 Wochen nach Infektion angegeben. Die Titrationsstufe 1 entspricht einer Verdünnung von 1:200. Mit einem weißen * sind statistisch signifikante Unterschiede zum vorangehenden Zeitpunkt innerhalb eines Mausstamms angegeben ($p \leq 0,01$).

P23-reaktive Antikörper nach Reinfektion

Vier und auch neun Wochen nach einer Reinfektion blieben die Serumtitrer für P23-spezifisches IgG und IgA bei den GKO-Mäusen auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 3.1.14). Bei den IL12KO konnte kein signifikantes Sinken der Antikörpertiter über die Zeit beobachtet werden.

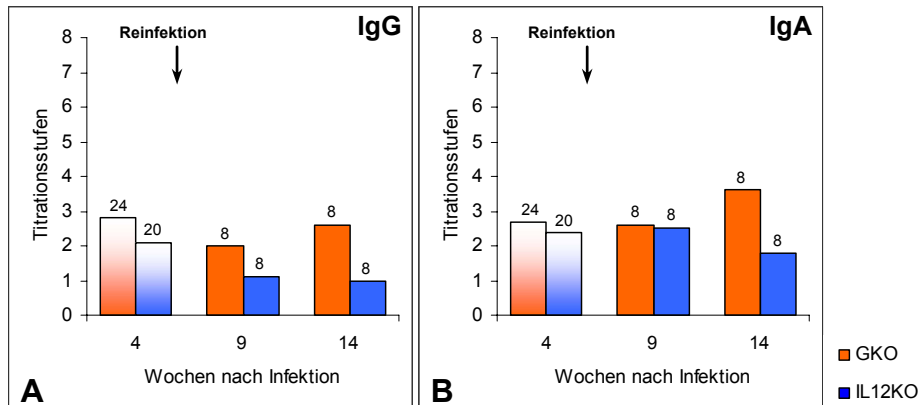


Abb. 3.1.14: Nachweis von P23-reaktivem IgG und IgA im Serum nach Reinfektion

Nachweis von spezifischem IgG [A] und IgA [B] im Serum in einem ELISA mit rekombinantem P23 als Antigen 4, 9 und 14 Wochen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten, wobei 5 Wochen p.i. eine Reinfektion erfolgte. Angegeben ist die mittlere Titrationsstufe von n (= Zahl über den Balken) untersuchten Mäusen zu dem entsprechenden Zeitpunkt. Die Seren wurden ab 1:100 in Zweiserschritten verdünnt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200. Die Werte vier Wochen p.i. sind mit denen in Abb. 3.1.13 identisch.

3.1.4.3 Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Serum-Antikörpern im Westernblot

Die Sporoziten-Oberflächenproteine P23 und CP17 zählen zu den Hauptantigenen bei einer *C. parvum*-Infektion. In einem ELISA mit den rekombinanten Proteinen konnte die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen diese beiden Proteine im Rahmen einer Infektion bereits gezeigt werden (siehe 3.1.4.2), auch wenn deutlich wurde, dass die Reaktivität beim Nachweis von spezifischem IgG vier Wochen *post infectionem* mit rP23 wesentlich schwächer ausfiel als mit rCP17 als alleiniges Antigen. Im Westernblot sollte dieser Befund noch einmal visualisiert werden (siehe 2.4.4).

In einer SDS-PAGE wurde zunächst Lysat aus *C. parvum*-Oozysten elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens auf eine Nitrozellulose

transferiert. Diese wurde in circa 2 mm breite Streifen geschnitten, die anschließend mit den zu untersuchenden, 1:100 verdünnten Seren inkubiert wurden. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper und p-Nitrophenyl Phosphat (pNpp) als Substrat. Ein monoklonaler Antikörper gegen P23 (3E3) und das Serum eines von uns mit rekombinatem CP17 immunisierten Kaninchens (rb101) dienten als Positivkontrollen.

Im Westernblot mit Parasitenlysat als Antigen liegt im Bereich von 15-17 kDa eine Proteinfamilie mit mehreren immunrelevanten Antigenen, zu denen auch CP17 gehört. Aus diesem Grund war keine eindeutige Beurteilung möglich, ob eine Reaktivität der untersuchten Seren in diesem Bereich tatsächlich auch auf Antikörper gegen CP17 zurückzuführen ist. Mit dem Kaninchen-Antiserum rb101 konnte das Sporoziten-Oberflächenprotein in dieser Proteingruppe detektiert werden. Es war ein Nachweisverfahren von Nöten, bei dem gezielt Antikörper gegen definierte Antigene detektiert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zusätzlich ein Kombinations-Westernblot entwickelt, mit dessen Hilfe spezifische Antikörper gegen die beiden Sporoziten-Oberflächenproteine CP17 und P23 gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. CP17 und P23 wurden als GST-Fusionsproteine in Rosetta-gami-Bakterien (*E. coli*) exprimiert und über Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt (siehe 2.4.9). Der Fusionspartner GST wurde für die Anwendung im Westernblot nicht abgespalten. Ein Proteingemisch aus gleichen Anteilen rCP17_{GST}, rP23_{GST} und rekombinatem GST, welches zur Kontrolle unspezifischer Reaktionen gegen den Fusionspartner mitgeführt wurde, wurde elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose transferiert. Die drei Proteine konnten im Westernblot auf Grund ihres Molekulargewichts unterschieden werden. Zusätzlich zu dem monoklonalen Antikörper gegen P23 (3E3) und dem Kaninchen-Antiserum gegen CP17 (rb101) diente hier auch ein Antikörper gegen GST als Kontrolle.

Mit den Nitrozellulosestreifen (2 mm) wurden als Antigen jeweils 168 ng der rekombinanten Proteine bzw. Lysat aus $8,8 \times 10^5$ Oozysten angeboten.

In Abb. 3.1.15 ist exemplarisch der Nachweis von *C. parvum*-spezifischem IgG und IgA im Serum von jeweils acht GKO- und IL12KO-Mäusen vier Wochen nach einer Infektion mit 1×10^6 Oozysten dargestellt. Der Westernblot mit Parasitenlysat als Antigen zeigte deutlich, dass vorrangig gegen Proteine mit einer Größe von 15-17 kDa Antikörper gebildet wurden. Bei allen getesteten Seren war sowohl bei der Detektion von

spezifischem IgG als auch von IgA in diesem Bereich eine Reaktion zu erkennen. Ein Nachweis von spezifischem IgG gegen P23 war bei der im Westernblot eingesetzten Verdünnung von 1:100 bei keinem Serum möglich. Einige Seren wiesen jedoch P23-reaktives IgA auf. Wie auch im ELISA, bei dem alle gezeigten Seren positiv für IgG und IgA gegen rP23_{His} getestet wurden, konnte ein verhältnismäßig besserer Nachweis von P23-reaktivem IgA geführt werden. Mit dem Kombinations-Westernblot, bei dem die rekombinanten Proteine CP17_{GST} und P23_{GST} als Antigene zum Einsatz kamen, waren bei allen untersuchten Seren vier Wochen *post infectionem* spezifische Antikörper gegen CP17 und jetzt auch gegen P23 nachweisbar. Zur Detektion der im Rahmen einer Infektion von GKO und IL12KO gebildeten P23-reaktiven Antikörper bedarf es demnach einer sehr viel höheren Antigenmenge als der durch das Parasitenlysate angebotenen. Die Reaktion im Bereich von 15/17 kDa im Parasitenlysate-Westernblot war nun definitiv auch auf die Anwesenheit von Cp17-spezifischen Antikörpern zurückzuführen. Die Nachweisbarkeit und die Bandenstärke im Kombinations-Westernblot entsprachen weitestgehend derer im Parasitenlysate-Westernblot. Cp17 spielt in dieser Proteinfamilie damit als immundominantes Antigen wahrscheinlich eine nicht unerhebliche Rolle. Eine Kreuzreaktivität der Seren mit rekombinantem GST wurde nicht beobachtet, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle Reaktionen spezifisch gegen den CP17- bzw. P23-Anteil der Fusionsproteine gerichtet waren. Bei beiden hier durchgeführten Westernblots mit Parasitenlysate oder den rekombinanten Proteinen spiegelte sich generell der im ELISA ermittelte Antikörpertiter im Serum (Abb. 3.1.16) in der Nachweisbarkeit der Antigene und der Intensität der Reaktionen gegen P23, den 15-17 kDa-Bereich, CP17_{GST} und P23_{GST} wider.

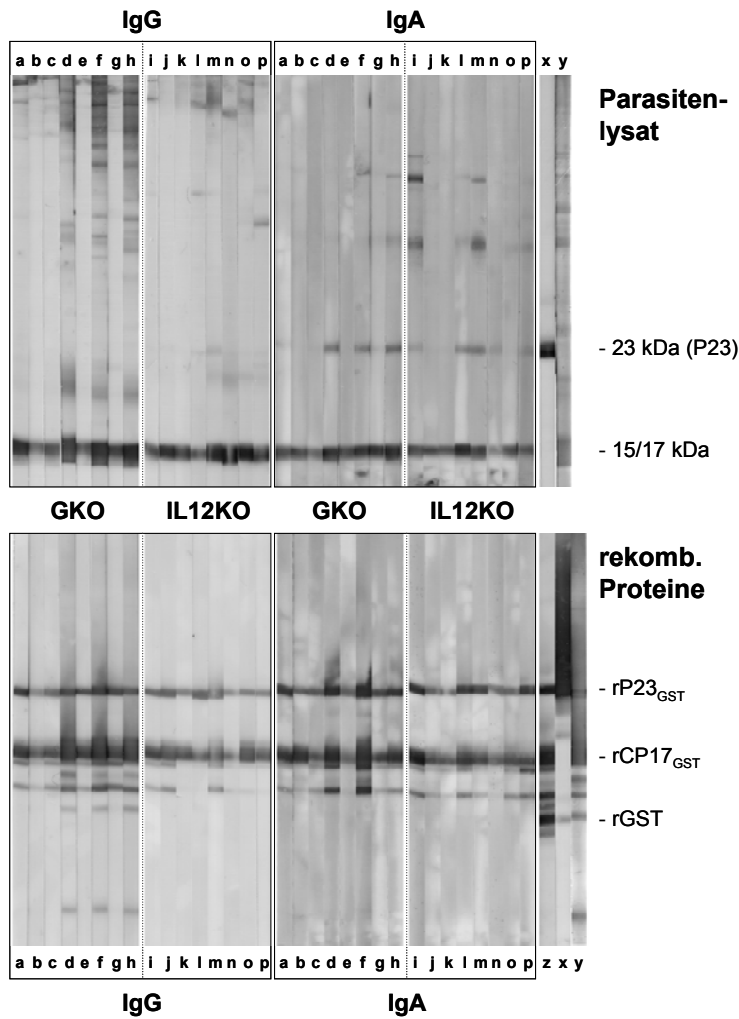


Abb. 3.1.15: Westernblot zum Nachweis spezifischer Serum-Antikörper vier Wochen nach Infektion

Nachweis von spezifischem Serum-IgG und -IgA im Westernblot vier Wochen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, a-h) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, i-p) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Exemplarisch werden die Reaktivitäten von jeweils 8 Seren beider Mausstämme gezeigt. Als Antigen wurde zum einen Parasitenlysate und zum anderen ein Gemisch der rekombinanten Proteine P23_{GST} (~49 kDa), CP17_{GST} (~37 kDa) und als Kontrolle GST (26 kDa) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Seren wurden 1:100 verdünnt. Als Positivkontrollen kamen der mAk 3E3 (anti-P23; x), das Kaninchen-Antiserum rb101 (anti-CP17; y) und ein anti-GST-Antikörper (z) zum Einsatz.

		GKO								IL12KO								
Maus		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	
ELISA	Antigen																	
Antikörper-Titer	IgG	Parasitenlysate	5	3	3	6	4	10	5	9	3	3	3	3	4	3	5	3
		rP23	5	2	3	5	3	4	3	2	2	3	1	2	4	1	2	4
		rCP17	5	4	3	8	6	10	5	11	5	5	5	3	6	3	6	5
	IgA	Parasitenlysate	3	2	1	3	2	6	2	5	5	2	0	2	3	1	3	1
		rP23	3	1	2	5	2	6	3	4	4	1	1	3	3	1	4	6
		rCP17	4	4	2	5	3	6	3	5	5	3	2	3	3	2	2	2

Abb. 3.1.16: Antikörpertiter der im Westernblot getesteten Seren

In der Tabelle sind die Antikörpertiter der im Westernblot (Abb. 3.1.15) getesteten Seren aus den ELISA mit Parasitenlysate, rCP17 und rP23_{His} als Antigen vier Wochen nach einer Infektion mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten aufgelistet. Die Seren wurden für den Einsatz im ELISA ab 1:100 in Zwischenschritten verdünnt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200. Es ist eine Korrelation der Höhe der Antikörpertiter mit der Reaktivität im Westernblot zu erkennen.

Mit Hilfe der beiden Westernblots konnten auch die Ergebnisse aus den serologischen Untersuchungen im ELISA zum zeitlichen Verlauf nach einer Infektion bzw. einer Reinfektion bestätigt werden (siehe 3.1.4.1, 3.1.4.2). Seren, die vier, neun und vierzehn Wochen nach der ersten Infektion gewonnen wurden, wurden parallel im Westernblot auf ihre Reaktivität getestet (Abb. 3.1.17). Eine Reinfektion erfolgte fünf Wochen *post infectionem*.

Generell wird auch hier deutlich, dass GKO-Mäuse eine sehr viel stärkere Antikörperantwort infolge einer Infektion aufbauen als IL12KO-Mäuse. Bei den meisten einmal infizierten GKO sah man mit Parasitenlysate als Antigen mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Infektion eine intensiver werdende Reaktivität im Westernblot (# a, d). Mit steigendem Antikörpertiter konnte nicht nur beim IgA-, sondern jetzt auch beim IgG-Nachweis eine Bande auf Höhe des P23-Proteins detektiert werden. Der signifikante Anstieg sowohl der IgG- als auch der IgA-Titer nach einer erneuten Infektion ließ sich im Westernblot gut darstellen (# f, h). Die IL12KO-Mäuse zeigten im Gegensatz zu den GKO fast immer eine Abnahme der Intensität der Banden im zeitlichen Verlauf nach einer Infektion, wobei sie beim Nachweis von spezifischem IgG deutlich stärker zum Tragen kam als beim IgA (# i, l). Neun Wochen p.i. war kaum spezifisches IgG mehr detektierbar. Im Parasitenlysate-Westernblot konnten bei diesem Mausstamm fast ausschließlich IgG gegen den 15/17 kDa-Bereich nachgewiesen werden. Beim Nachweis von spezifischen IgA zeigte sich zum Teil auch eine Reaktion mit P23. Nach einer Reinfektion blieb die Reaktivität anstelle zu sinken zunächst vergleichbar stark (# o, p).

Der Kombinations-Westernblot derselben Seren beider Knockout-Mausstämme bestätigte weitestgehend den mit Parasitenlysat als Antigen beobachteten zeitlichen Verlauf, auch wenn hier wiederum sehr viel früher P23-spezifische Antikörper detektiert wurden. Da die Reaktivität auch bei niedrigen Antikörpertitern schon sehr stark war, war deren Anstieg bei den GKO-Mäusen jedoch nicht so deutlich erkennbar.

Auch bei den Seren neun und vierzehn Wochen nach einer Infektion korrelierte der im ELISA ermittelte Antikörpertiter (Abb. 3.1.18) sehr gut mit der Nachweisbarkeit der Antigene und der Intensität der Reaktionen gegen P23, den 15-17 kDa-Bereich, CP17_{GST} und P23_{GST}.

Die Westernblot-Untersuchungen bestätigten die mit den ELISA erhaltenen Ergebnisse zur Zusammensetzung der Antikörperantwort nach einer *C. parvum*-Infektion und zum Verhalten der Antikörpertiter nach einer Infektion bzw. Reinfektion. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass P23 und vor allem CP17 auch bei Infektionen von GKO- und IL12KO-Mäusen zu den Hauptantigenen bei einer Auseinandersetzung mit *C. parvum* zählen. Antikörper gegen den Bereich 15-17 kDa wurden bereits sehr früh ausgebildet, noch bevor Antikörper gegen andere Proteine detektiert werden konnten. Als nächstes kam eine Reaktion im Bereich von 23/27 kDa (P23) hinzu. Bei steigendem Antikörpertiter zeigten sich dann weitere spezifische Banden. Generell schien der Nachweis von P23-reaktiven Antikörpern abhängig von der Höhe des Serumtiters zu sein. Dennoch lässt sich festhalten, dass gegen P23 scheinbar bevorzugt Antikörper der IgA-Klasse gebildet wurden.

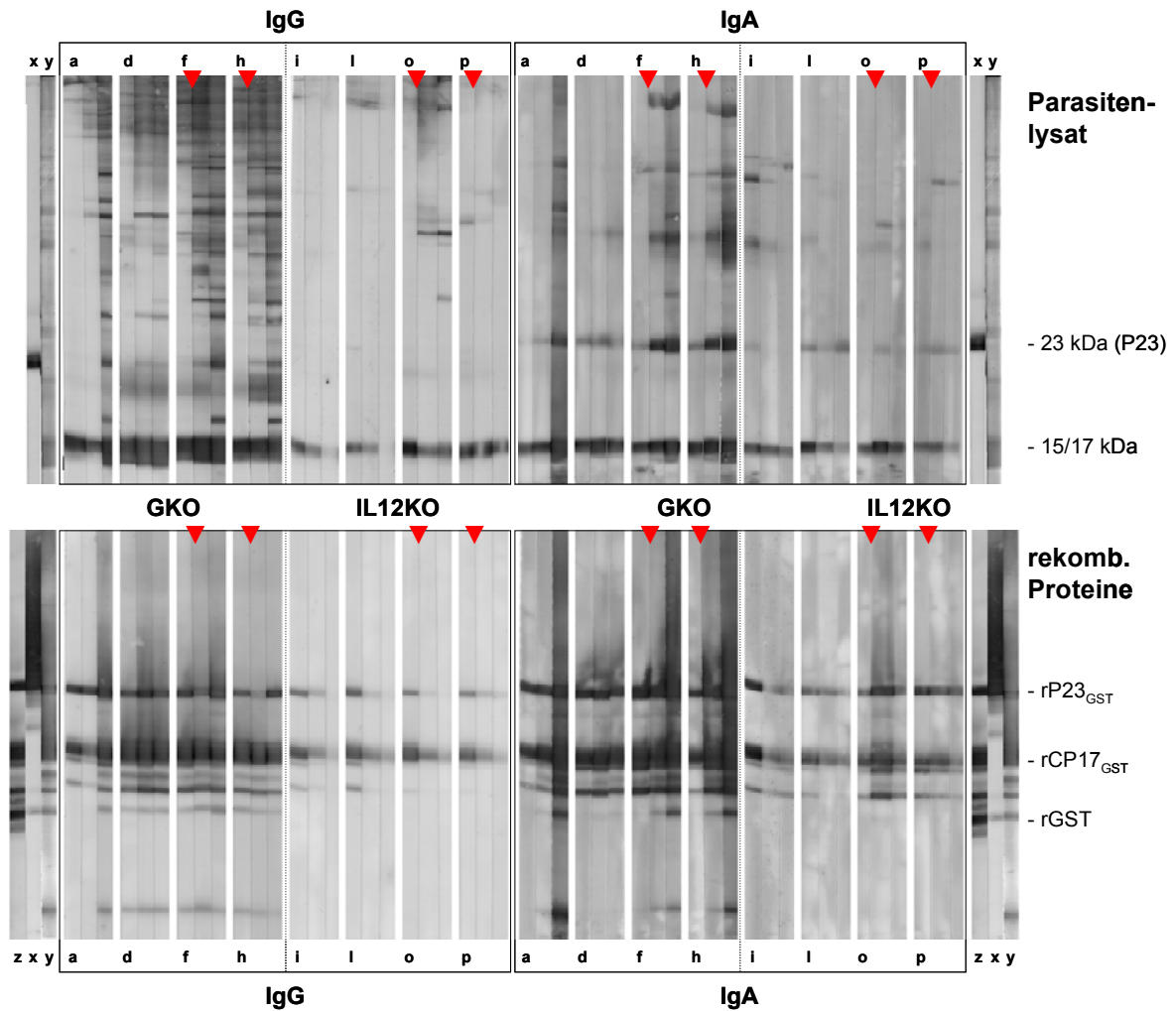


Abb. 3.1.17: Westernblot zum Nachweis spezifischer Antikörper im zeitlichen Verlauf nach Infektion

Nachweis von spezifischem Serum-IgG und -IgA im Westernblot nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Exemplarisch werden die Reaktivitäten von jeweils 2 einmal (a, d, i, l) und 2 zweimal (f, h, o, p) infizierten Mäusen beider Mausstämme gezeigt. Pro Maus ist jeweils das Serum vier, neun und vierzehn Wochen *post infectionem* nebeneinander dargestellt. Eine Reinfektion fünf Wochen *p.i.* ist durch eine rote Pfeilspitze gekennzeichnet. Als Antigen wurde zum einen Parasitenlysat und zum anderen ein Gemisch der rekombinanten Proteine P23_{GST} (~49 kDa), CP17_{GST} (~37 kDa) und als Kontrolle GST (26 kDa) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Seren wurden 1:100 verdünnt. Als Positivkontrollen kamen der mAk 3E3 (anti-P23; x), das Kaninchen-Antiserum rb101 (anti-CP17; y) und ein anti-GST-Antikörper (z) zum Einsatz. Die Benennung der Mäuse entspricht der in Abb. 3.1.15.

		GKO												
Maus		a			d			f			h			
Wochen p.i.		4	9	14	4	9	14	4	9	14	4	9	14	
ELISA	Antigen													
Antikörper-Titer	IgG	Parasitenlysate	5	6	10	6	8	8	10	12	14	9	11	13
		rP23	5	4	12	5	7	4	4	4	7	2	2	7
		rCP17	5	4	10	8	8	7	10	11	10	11	11	11
	IgA	Parasitenlysate	3	3	11	3	5	5	6	7	11	5	8	12
		rP23	3	3	10	5	6	5	6	6	10	4	7	11
		rCP17	4	5	11	5	6	6	6	7	9	5	7	11
		IL12KO												
Maus		i			l			o			p			
Wochen p.i.		4	9	14	4	9	14	4	9	14	4	9	14	
ELISA	Antigen													
Antikörper-Titer	IgG	Parasitenlysate	3	2	1	3	3	1	5	6	5	3	4	3
		rP23	2	1	0	2	1	0	2	0	0	4	2	1
		rCP17	5	3	1	3	2	1	6	3	2	5	3	2
	IgA	Parasitenlysate	5	3	2	2	1	1	3	5	3	1	3	1
		rP23	4	1	1	3	2	2	4	7	4	6	5	4
		rCP17	5	3	1	3	2	2	2	4	2	2	2	0

Abb. 3.1.18: Antikörpertiter der im Westernblot getesteten Seren

In der Tabelle sind die Antikörpertiter der im Westernblot (Abb. 3.1.17) getesteten Seren aus den ELISA mit Parasitenlysate, rCP17 und rP23_{His} als Antigen vier, neun und vierzehn Wochen nach einer Infektion mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten aufgelistet. Eine Reinfektion fünf Wochen p.i. ist durch eine rote Linie gekennzeichnet. Die Seren wurden für den Einsatz im ELISA ab 1:100 in Zweierschritten verdünnt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Seren als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200. Es ist eine Korrelation der Höhe der Antikörpertiter mit der Reaktivität im Westernblot zu erkennen.

3.1.4.4 Nachweis von Parasitenlysate-reaktivem IgA in Vaginalspülungen im ELISA

Da es sich bei *Cryptosporidium parvum* um einen intestinalen Parasiten handelt, ist sekretorisches IgA essentiell zur Überwindung einer Infektion. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl IFN- γ - als auch IL-12 p40-Knockout-Mäuse im Rahmen einer *C. parvum*-Infektion spezifisches IgA im Serum ausbildeten, sollte nun überprüft werden, ob IgA auch sekretiert wurde. Dazu wurden vier Wochen nach einer Infektion zusätzlich Vaginalspülungen gewonnen und in einem ELISA mit Parasitenlysate als Antigen (siehe 2.4.5.2) auf *C. parvum*-spezifische IgA-Antikörper untersucht. Die Vaginalspülungen wurden zunächst 1:3 und dann in Zweierschritten weiter verdünnt und für zwei Stunden mit dem Antigen inkubiert. Der Nachweis von spezifisch gebundenen Antikörpern und die Entwicklung des ELISA erfolgten mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, dem Enzym ExtrAvidin-Peroxidase und o-Phenylenediamin (OPD) als Substrat. Als interner Standard wurde auch hier bei jeder Mikrotiterplatte ein Serum mit bekanntem

Antikörpertiter mitgeführt. Zur Bewertung und zum Vergleich der Proben wird im Folgenden als Antikörpertiter die Verdünnung angegeben, bei der die gemessene optische Dichte der Substratlösung das Niveau der Kontrollvaginalspülungen von Mäusen ohne Infektion zeigte, was einer OD von kleiner gleich 0,2 entsprach.

Vier Wochen nach einer Infektion wurden Vaginalspülungen von insgesamt 32 GKO- und 29 IL12KO-Mäusen aus 9 bzw. 8 Versuchsansätzen auf spezifisches IgA hin untersucht. Bei 63 % der GKO, jedoch nur bei 34 % der IL12KO-Mäuse ließ sich Parasitenlysat-reaktives IgA nicht nur im Serum sondern auch in den Vaginalspülungen detektieren. Die in den Vaginalspülungen nachweisbare Antikörperantwort folgte dem schon bei den Seren beobachteten Trend, dass der durchschnittliche Antikörpertiter bei GKO-Mäusen im Rahmen einer Infektion signifikant höher ausfällt als bei IL12KO-Mäusen ($p = 0,006$). 31 % der Vaginalspülungen von IFN- γ -Knockout-Mäusen zeigten einen Titer von $\geq 1:24$, bei den IL-12 p40-Knockout-Mäusen nur 7 %. In Abbildung 3.1.19 ist die Anzahl der Mäuse in Prozent dargestellt, die eine bestimmte Titrationsstufe an spezifischem IgA in den Vaginalspülungen aufwiesen.

Das Verhältnis positiver zu negativer Vaginalspülungen war bei den beiden Knockout-Mausstämmen umgekehrt (GKO 63 % positiv, IL12KO 66 % negativ), was auch in den Unterschieden in der Höhe der Antikörpertiter im Serum begründet schien (Serum-IgA $\geq 1:1600$: 48 % GKO, 23 % IL12KO). Es gab eine Korrelation zwischen den IgA-Titern im Serum und der Nachweisbarkeit von vaginalem IgA, wobei bei einem Serumtiter von 1:800 die Grenze lag. Die Knockout-Mäuse wiesen bei 90 % der positiv getesteten Vaginalspülungen einen Serum-IgA-Titer von $\geq 1:800$ auf. Bei den negativ getesteten Vaginalspülungen zeigten 75 % (GKO) bzw. 95 % (IL12KO) der Seren einen IgA-Titer von $\leq 1:800$. Mit einem Serumtiter von $\geq 1:1600$ waren 81 %, von 1:800 50 % und bei einem Serumtiter von $< 1:800$ nur noch 33 % der Vaginalspülungen bei den GKO-Mäusen positiv. Die IL12KO zeigten ein ähnliches Bild. Mit einem Serumtiter von $\geq 1:1600$ waren 83 %, von 1:800 33 % und von $< 1:800$ nur noch 9 % der Vaginalspülungen positiv. Alle Mäuse, bei denen spezifisches IgA in den Vaginalspülungen nachgewiesen werden konnte, waren auch im Serum positiv für IgA.

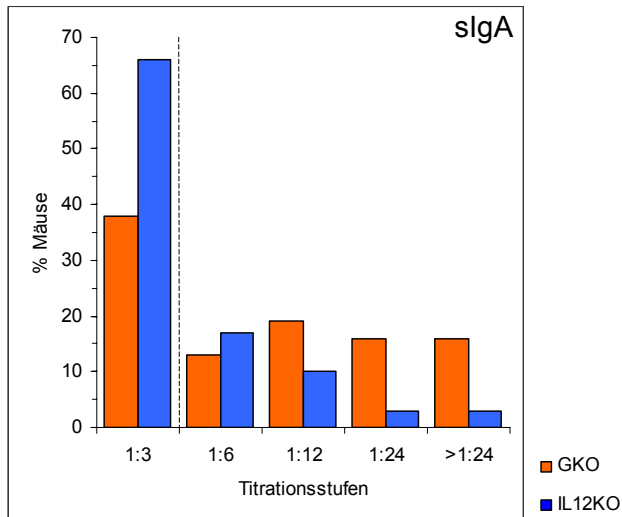


Abb. 3.1.19: Nachweis von Parasitenlysat-reaktivem IgA in Vaginalspülungen nach Infektion

Nachweis von spezifischem sekretorischem IgA (sIgA) in Vaginalspülungen in einem ELISA mit Parasitenlysat als Antigen vier Wochen nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO, orange Balken) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO, blaue Balken) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Angegeben ist die Prozentzahl der Mäuse, die eine bestimmte Titrationsstufe aufwiesen. Die Vaginalspülungen wurden ab 1:3 in Zweierschritten verdünnt. Die angegebenen Werte ergaben sich aus der Untersuchung von Vaginalspülungen von 32 GKO und 29 IL12KO aus 9 (GKO) bzw. 8 (IL12KO) unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie gibt die Titrationsstufe an, ab der die Vaginalspülungen als positiv bezeichnet wurden.

3.1.5 Nachweis der mRNA verschiedener Maus-Zytokine im Ileum nach einer Infektion

Neben der Antikörperantwort soll die Immunantwort der mit *C. parvum* infizierten IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse in Zukunft auch auf Ebene der Zytokine im Ileum charakterisiert werden. Nach einer ersten Konfrontation mit dem Parasiten konnte fünf Tage *post infectionem* eine starke Infektion im Ileum auf Ebene der mRNA-Expression des *C. parvum*-spezifischen CP17-Gens nachgewiesen werden. Die RT-PCR von CP17-mRNA fünf Tage nach einer Reinfektion führte dagegen bei keiner der untersuchten IL12KO- und nur bei einem Teil der GKO-Mäuse zu einem Produkt, wobei die Produktmengen hier wesentlich geringer ausfielen (Abb. 3.1.8, 3.1.20). Es wäre von Interesse, welche T_H1- und T_H2-Zytokine im Rahmen einer Infektion bei diesen immundefizienten Mäusen verstärkt exprimiert werden, ob sich die unterschiedliche Ausprägung einer Infektion bzw. Reinfektion auch auf Ebene der Zytokine widerspiegelt und ob sich das Zytokin-Muster nur in der Abwesenheit von IFN- γ bzw. IL-12 oder grundlegend von Wildtyp-Mäusen

unterscheidet. In diesem Kapitel werden erste Vorversuche vorgestellt, die unter anderem als Grundlage für weiterführende Arbeiten zur Zytokin-Expression bei Infektion und Reinfektion mit dem Darmparasiten *C. parvum* bei IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen dienen werden.

Zunächst wurde die mRNA-Expression der Zytokine IL-4 (T_H2) und IFN- γ bzw. IL-12 (T_H1) fünf Tage nach einer Infektion bzw. Reinfektion der Knockout-Mäuse mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten überprüft (Abb. 3.1.20). Dazu wurde die Gesamt-RNA aus dem terminalen Ileum infizierter Mäuse gewonnen. Die PCR wurde nach dem unter 2.2.1.2 beschriebenen Protokoll mit 2 μ l cDNA als Matrize (1 μ l cDNA entsprach 100 ng Gesamt-RNA) und einer Zyklenanzahl von 35 durchgeführt. Um eine Amplifikation möglicher DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurden neben einer DNase-Behandlung der RNA Intron-überspannende Primer eingesetzt (siehe 2.1.6). Die in dieser Untersuchung verwendeten RNA-Präparationen entsprachen denen, die bereits in Abschnitt 3.1.3.2 zur Amplifikation der CP17-mRNA zum Einsatz kamen. Aus allen cDNA-Proben konnte das murine GAPDH-Gen in vergleichbaren Mengen amplifiziert werden.

Generell wäre ein unterschiedliches Expressionsmuster von Zytokinen zwischen ein- und zweimal infizierten Mäusen zu erwarten, da eine zweite Konfrontation mit dem Parasiten zu einer wesentlich niedrigeren Invasion des Ileumepithels führte. Zwar konnten mit der hier durchgeführten qualitativen Nachweismethode fünf Tage p.i keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und reinfizierten Mäusen gefunden werden, dennoch lassen sich erste Hinweise auf ein mögliches Geschehen ableiten. Im Anschluss an eine Infektion konnte bei allen untersuchten GKO- und IL12KO-Mäusen mRNA für IL-4 nachgewiesen werden. Nach einer Reinfektion wiesen unter den GKO-Mäusen nur noch die Mäuse ein Produkt auf, bei denen auch *C. parvum*-spezifische mRNA im Ileum amplifiziert wurde. Trotz des fehlenden Nachweises von Parasiten-mRNA nach Reinfektion war eine Amplifikation von IL-4-mRNA auch bei einigen der untersuchten IL12KO möglich, jedoch in deutlich geringeren Mengen als bei den GKO. Beim Nachweis von IFN- γ -mRNA bei den IL12KO-Mäusen konnten, abgesehen von einer Ausnahme (# 7) bei den reinfizierten Mäusen, keine Unterschiede zwischen ein- und zweimal infizierten Mäusen ausgemacht werden. IL-12-mRNA wurde bei einmal infizierten GKO bis auf eine Ausnahme (# 6) bei allen Mäusen in vergleichbaren Mengen amplifiziert. Der Nachweis bei den reinfizierten GKO zeigte dagegen Unterschiede in der Produktmenge zwischen den einzelnen Mäusen, wobei man am meisten Produkt bei denen erhielt, bei denen auch

CP17-mRNA nachgewiesen werden konnte. Dort wo schwächere bis keine Banden zu finden waren, konnte parallel dazu auch keine IL-4-mRNA amplifiziert werden. Bei IFN- γ -Knockout-Mäusen konnte wie erwartet keine mRNA-Expression von IFN- γ und bei den IL-12 p40-Knockout-Mäusen keine mRNA-Expression des p40-Gens gefunden werden (nicht gezeigt). Für die erwähnten Ausnahmen gibt es bisher keine Erklärung, zumal die Amplifikation von muriner GAPDH-mRNA in jedem Fall zu einem deutlichen Produkt führte. Die Wiederholungen der PCR ergaben die gleichen Ergebnisse.

Die erhaltenen ersten Hinweise deuten auf eine Abhängigkeit der IL-4- und IL-12-Expression vom Infektionsgrad hin. Um eine bessere Aussage treffen zu können, soll daher in Zukunft die Infektionsrate bei einer ersten und einer zweiten Infektion auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Des Weiteren scheint der Zeitpunkt der Probenentnahme zu spät gewählt. Zu einem früheren Zeitpunkt nach der Infektion können mit Sicherheit deutlichere Unterschiede erwartet werden. Auch die Nachweismethode ist für diese Anwendung vermutlich nicht sensitiv genug. In Zukunft soll dieser Teil der Immunantwort mit Hilfe der Real-Time PCR untersucht werden.

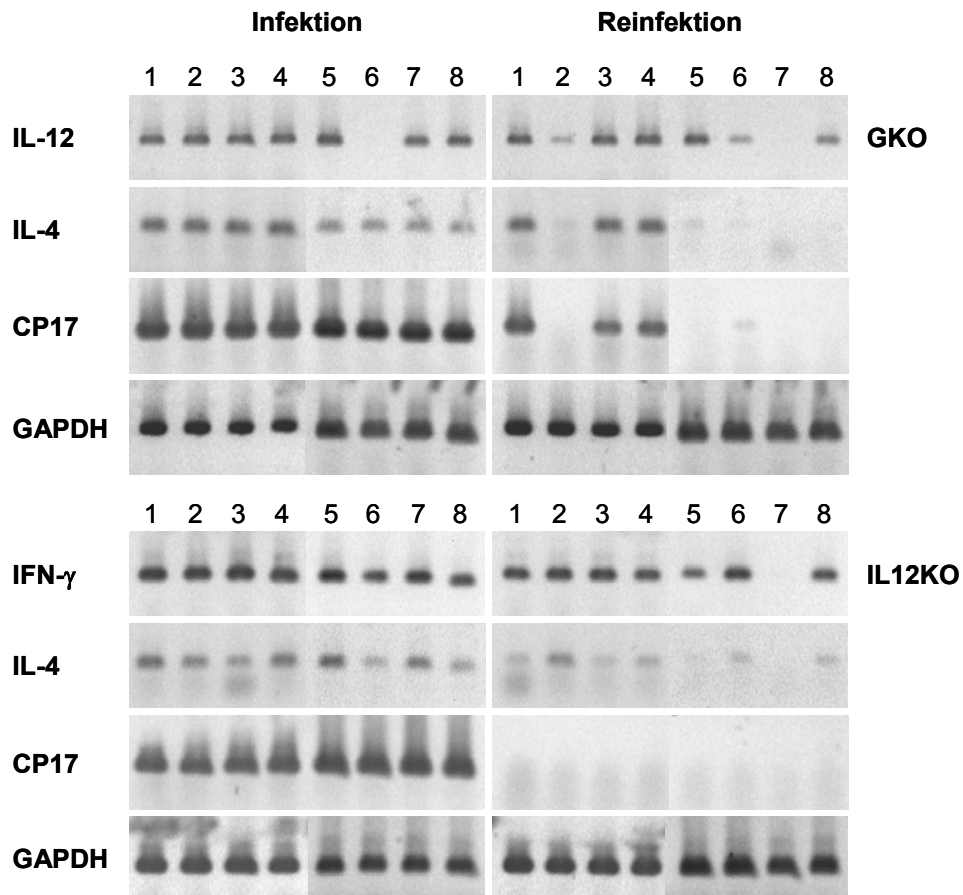


Abb. 3.1.20: RT-PCR zum Nachweis von IL12-, IL-4- bzw. IFN- γ -mRNA im Ileum nach Infektion

Fünf Tage nach einer Infektion bzw. Reinfektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde die Gesamt-RNA aus dem Ileum präpariert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation des IL-12-, IL-4- bzw. IFN- γ -Genproduktes wurden 2 μ l cDNA (1 μ l = 100 ng RNA) als Matrize in die PCR eingesetzt. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Zum Vergleich ist noch einmal die RT-PCR der mRNA von CP17 (*C. parvum*) und murinem GAPDH aus Abb. 3.1.8 gezeigt.

3.2 Immunisierung von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen

Bisher existiert keine effektive Immunisierung gegen eine Kryptosporidiose, welche jedoch besonders in der Veterinärmedizin von großem Interesse wäre. In den in Kapitel 3.1 beschriebenen Infektionsversuchen mit IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass beide Knockout-Mausstämme naiv suszeptibel für eine Infektion mit dem Darmparasiten *Cryptosporidium parvum* sind. Unabhängig der Zytokine IFN- γ und IL-12 sind sie jedoch in der Lage, eine Infektion zu überwinden und eine schützende Immunität im Verlauf einer Infektion aufzubauen, die ihnen eine Resistenz vor einer Reinfektion verleiht. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Infektionsmodelle bieten damit ein potentielles System, um verschiedene Immunisierungsstrategien zu testen und auf ihre Effizienz hin zu überprüfen. Der Erfolg kann direkt durch eine Infektion der immunisierten Knockout-Mäuse gemessen werden. Umwege über adoptiven T-Zelltransfer oder Übertragung schützender Antikörper mit der Muttermilch von immunisierten Muttertieren auf ihre für eine Infektion suszeptibel Nachkommen oder ähnliche Ansätze können damit zunächst umgangen werden.

Nach den bisherigen Kenntnissen des immunologischen Geschehens bei einer *C. parvum*-Infektion bei Mäusen müsste eine Erfolg versprechende Immunisierungsstrategie eine zelluläre, T_H1-dominierte Immunantwort induzieren, bevorzugt das darmassoziierte Lymphgewebe stimulieren und zu einer effizienten mukosalen Immunität mit IgA-Sekretion führen. Auch wenn den hier eingesetzten Knockout-Mäusen auf Grund ihrer Immundefizienz das T_H1-Zytokin IFN- γ bzw. IL-12 fehlt, konnten sie eine *C. parvum*-Infektion überwinden und eine Resistenz aufbauen. Es sollte daher nach einer Immunisierungsstrategie gesucht werden, die in diesen Mäusen eine erste Konfrontation mit dem Parasiten simulieren und an ihrer Stelle eine Resistenz induzieren kann. Bei erfolgreicher Immunisierung wäre ein Ausbleiben oder zumindest eine Reduktion der Parasitenausscheidung zu erwarten.

Für die intranasale Immunisierung wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass sie generell lokal aber auch distal eine spezifische Immunantwort mit IgA-Sekretion induzieren kann. Sie stellte damit den hier favorisierten Applikationsweg dar. Sowohl IFN- γ - als auch IL-12 p40-Knockout-Mäuse wurden im Folgenden intranasal zunächst ohne und später mit AbISCO als Adjuvans immunisiert. Als Antigen diente Parasitenlysat, da dieses alle wichtigen Hauptantigene des Parasiten beinhaltet. Parallel wurde jeweils eine

Immunisierung über einen anderen Applikationsweg (intraperitoneal bzw. subkutan) durchgeführt. Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges wurden die immunisierten Mäuse mit *C. parvum*-Oozysten infiziert und die Parasitenausscheidung ermittelt. Die hier durchgeführten Immunisierungsstudien, die die Induktion einer Immunität zum Ziel hatten, führten zu unterschiedlichen humoralen Antworten und Parasitenausscheidungen.

3.2.1 Intranasale und intraperitoneale Immunisierung mit Parasitenlysat ohne Adjuvans

Da neben dem Antigen selbst auch die Wahl des Adjuvans die Qualität der induzierten Immunantwort beeinflusst und zudem bei diesen Knockout-Mäusen eine abweichende immunologische Situation im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vorliegt, wurden die IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse in einem ersten Ansatz zunächst ohne Adjuvans intranasal bzw. intraperitoneal mit Parasitenlysat aus 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten immunisiert. Die Induktion einer Immunantwort wurde durch die Detektion von Parasitenlysat-reaktiven Antikörpern im Serum und in Vaginalspülungen nachgewiesen. Zwei Wochen nach der letzten Boosterimmunisierung wurden die Mäuse zur Überprüfung des Immunisierungserfolges infiziert und die Parasitenausscheidung in Stuhlproben ermittelt. Zur Charakterisierung der Antikörperantwort nach der Infektion wurden vier und neun Wochen *post infectionem* erneut Serumproben und Vaginalspülungen gewonnen.

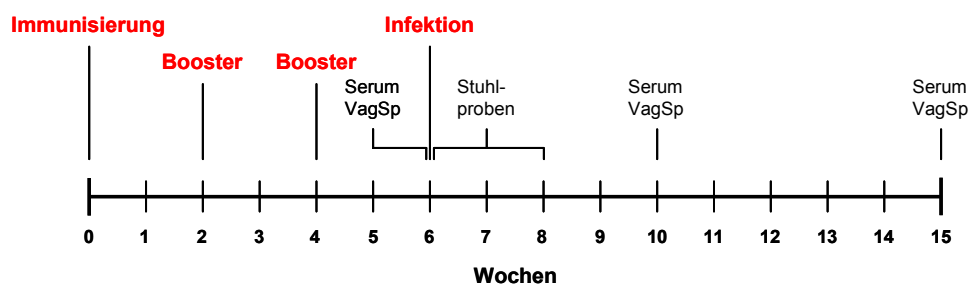


Abb. 3.2.1: Zeitlicher Ablauf der intranasalen bzw. intraperitonealen Immunisierung

IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse wurden drei Mal im Abstand von zwei Wochen intranasal bzw. intraperitoneal mit Parasitenlysat aus 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten ohne Adjuvans immunisiert und anschließend zur Überprüfung des Immunisierungserfolges mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten infiziert. Die Bestimmung der Parasitenausscheidung *post infectionem* erfolgte in Stuhlproben. Für die Charakterisierung der Antikörperantwort nach der Immunisierung bzw. der Infektion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Serumproben und Vaginalspülungen (VagSp) gewonnen.

3.2.1.1 Immunisierung

Die intranasale bzw. intraperitoneale Immunisierung von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen erfolgte drei Mal im Abstand von zwei Wochen in Versuchsgruppen von jeweils vier weiblichen Mäusen (siehe 2.5.2.1). Das Parasitenlysate wurde wie unter 2.4.1 beschrieben hergestellt und auf eine Konzentration von 1×10^6 Oozysten in 25 μ l endotoxinfreiem DPBS eingestellt. Vor der intranasalen Applikation des Antigens wurden die Mäuse mit Avertin sediert. Das Antigen konnte dadurch auf die Nasenlöcher getropft werden, so dass es durch das Einatmen der Mäuse in die Nasenhöhle gelangte. Das Volumen wurde mit 25 μ l möglichst gering gewählt, um ein Verlust des Antigens durch Verschlucken oder Herauslaufen zu verhindern. Als Kontrolle für die Immunogenität des Antigens wurden parallel Mäuse intraperitoneal mit Parasitenlysate aus 1×10^6 Oozysten in einem Volumen von 100 μ l immunisiert. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Immunisierung mit Parasitenlysate ohne Adjuvans bei C57BL/6-Wildtypmäusen eine T_H2-gerichtete Immunantwort induziert (Daten nicht gezeigt).

Antikörperantwort nach Immunisierung

Zwei Wochen nach der zweiten Boosterimmunisierung wurde die Induktion einer spezifischen Immunantwort in serologischen Untersuchungen überprüft. In einem ELISA mit Parasitenlysate als Antigen wurde spezifisches IgG und IgA im Serum und IgA in Vaginalspülungen detektiert (siehe 2.4.5.2; Abb. 3.2.2). Um die Qualität der IgG-Antwort weiter spezifizieren zu können, wurde auch ein ELISA zum Nachweis der IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a durchgeführt, wobei hier anstelle der Einzelseren ein Pool der Seren einer Gruppe getestet wurde. Zur Visualisierung der Reaktivität der Seren kamen auch ein Westernblot mit Parasitenlysate bzw. den rekombinanten Proteinen P23_{GST} und Cp17_{GST} (Kombinations-Westernblot) als Antigen zum Einsatz (siehe 2.4.4.1; Abb. 3.2.5).

Die **intranasale** Immunisierung führte bei keiner der beiden Knockout-Mausstämme zu einer adäquaten, über spezifische Antikörper messbaren Immunantwort. Bei den GKO-Mäusen konnte weder im Serum noch in den Vaginalspülungen spezifisches IgA und nur bei einer Maus geringe Mengen an spezifischem IgG (1:200) im Serum nachgewiesen werden. Der Serumpool war schwach positiv für spezifisches IgG1 (1:200) und negativ für IgG2a. Die IL12KO-Mäuse zeigten ein ähnliches Bild. Nur bei jeweils einer Maus konnten geringe Mengen an spezifischem IgG (1:400) bzw. IgA (1:400) im Serum detektiert werden. Die Mäuse waren negativ für spezifisches IgA in den Vaginalspülungen. Der

Serumpool wies einen IgG1-Titer von 1:800 auf. IgG2a konnte nicht nachgewiesen werden. Auch der Westernblot bestätigte die ungenügende Induktion einer Antikörperantwort nach intranasaler Immunisierung ohne Adjuvans bei beiden Knockout-Mausstämmen. Nur bei der auch im ELISA schwach positiven IL12KO-Maus zeigte sich beim IgG-Nachweis eine Reaktion im Bereich 15-17 kDa im Parasitenlysat-Westernblot bzw. rCP17 im Kombinations-Westernblot (Abb. 3.2.5, Maus g).

Mit der **intraperitonealen** Immunisierung wurde bei beiden Knockout-Mausstämmen eine starke spezifische IgG-Antwort im Serum mit einem durchschnittlichen Titer von 1:12800-25600 induziert. Bei den GKO konnte im Serumpool ausschließlich IgG1 (1:204800), bei den IL12KO neben IgG1 (1:204800) auch IgG2a (1:800) nachgewiesen werden. Eine Induktion von spezifischem IgA war nur vereinzelt und wenn nur in geringen Mengen zu detektieren. Die spezifische Reaktivität des durch die Immunisierung induzierten IgG im Serum konnte sowohl im Parasitenlysat- als auch im Kombinations-Westernblot bestätigt werden (Abb. 3.2.5).

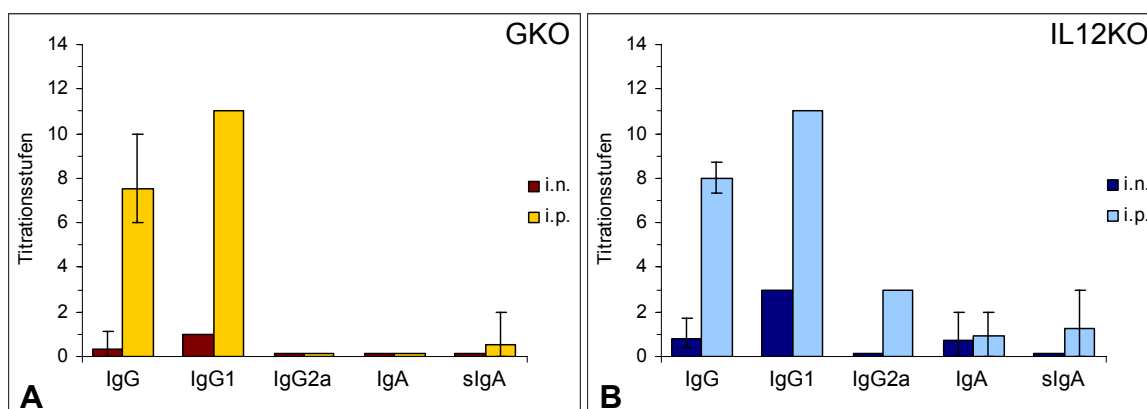


Abb. 3.2.2: Antikörperantwort nach intranasaler und intraperitonealer Immunisierung

Nachweis von spezifischem Serum-IgG, -IgG1, -IgG2a und -IgA und sekretorischem IgA (sIgA) in Vaginalspülungen im ELISA mit Parasitenlysat als Antigen zwei Wochen nach der dritten intranasalen (i.n.) bzw. intraperitonealen (i.p.) Immunisierung von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A] und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [B]. Angegeben sind die mittleren Antikörpertiter von jeweils vier Mäusen, wobei die Seren ab 1:100, die Vaginalspülungen ab 1:3 in Zweierschritten verdünnt wurden. Für den Nachweis von IgG1 und IgG2a wurde ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt. Die Titrationstufe 1, ab der die Proben als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200 bei Seren bzw. 1:6 bei Vaginalspülungen. Die Fehlerbalken geben jeweils den niedrigsten bzw. höchsten gemessenen Antikörpertiter innerhalb einer Gruppe an.

3.2.1.2 Infektion der immunisierten Knockout-Mäuse mit *C. parvum*-Oozysten

Zwei Wochen nach der zweiten Boosterimmunisierung wurden die intraperitoneal immunisierten Mäuse und jeweils eine Kontrollgruppe nicht immunisierter IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten infiziert. Die Möglichkeit in Betracht ziehend, dass durch die intranasale Immunisierung trotz der ausgebliebenen Induktion einer im Serum messbaren Antikörperantwort zumindest eine lokale Immunantwort induziert wurde, die den Knockout-Mäusen bei der Bewältigung einer Infektion helfen könnte, wurden auch diese Mäuse mit dem Parasiten konfrontiert. Zur Überprüfung der Parasitenausscheidung wurden bei diesen Infektionsversuchen ab Tag 4 *post infectionem* Stuhlproben bis Tag 8 zunächst täglich, dann noch an den Tagen 11, 13 und 15 gesammelt und die Ausscheidungsrate an Oozysten mit Hilfe des bereits beschriebenen indirekten Immunfluoreszenztests bestimmt (siehe 2.4.6.2).

Parasitenausscheidung nach Infektion

Bei den **GKO**-Mäusen konnte in Bezug auf die Parasitenausscheidung kein signifikanter Unterschied zwischen intranasal, intraperitoneal und nicht immunisierten Mäusen gefunden werden (Abb. 3.2.3 A). Alle Mäuse schieden die gewohnt hohen Parasitenmengen im bereits bekannten Verlaufsmuster aus. Die höchste Anzahl an ausgeschiedenen Oozysten konnte bei allen drei Gruppen an Tag 8 detektiert werden (durchschnittlich 100-148 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern). Bei den **IL12KO**-Mäusen zeigte sich dagegen eine Beeinflussung der Parasitenausscheidung durch eine vorangegangene Immunisierung (Abb. 3.2.3 B). Intranasal immunisierte Mäuse schieden über den beobachteten Zeitraum hinweg durchschnittlich doppelt soviel, intraperitoneal immunisierte Mäuse sogar signifikant fünfmal soviel Oozysten aus wie die nicht immunisierte Vergleichsgruppe ($p \leq 0,02$). Nicht und intranasal immunisierte Mäuse zeigten wie gewohnt an den Tagen 5 bis 7 eine vergleichbar starke Parasitenausscheidung, die an Tag 8 wieder deutlich zurückging und ab Tag 11 unter die Nachweisgrenze sank. An den Tagen 5 bis 7 wurden bei den intranasal immunisierten Mäusen jedoch doppelt bis dreimal soviel Oozysten detektiert ($p \leq 0,031$). Die intraperitoneal immunisierten Mäuse schieden an Tag 4 (3,7-mal) und an den Tagen 6 bis 8 signifikant mehr Oozysten aus als die Kontrollgruppe ($p \leq 0,034$). Die Parasitenausscheidung stieg an Tag 6 und 7 mit durchschnittlich 321 bzw. 347 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern auf das 7- bzw. 11fache

an, sank an Tag 8 jedoch wieder wie gewohnt ab, wobei sie immer noch 6-mal höher lag. Ab Tag 11 konnten nur noch vereinzelt Oozysten detektiert werden. Bei allen Gruppen beider Knockout-Mausstämme war die Parasitenausscheidung nach circa zwei Wochen wieder unter der Nachweisgrenze. Neben der Ausscheidung von Oozysten traten bei keiner Maus weitere Krankheitssymptome auf. Die immunisierten Mäuse konnten damit, auch wenn in Folge der Immunisierung zum Teil die Parasitenlast zeitweise stark erhöht war, eine Infektion überwinden. Eine Reduktion der Parasitenausscheidung durch eine der hier angewandten Immunisierungsstrategien konnte jedoch in keinem Fall erreicht werden.

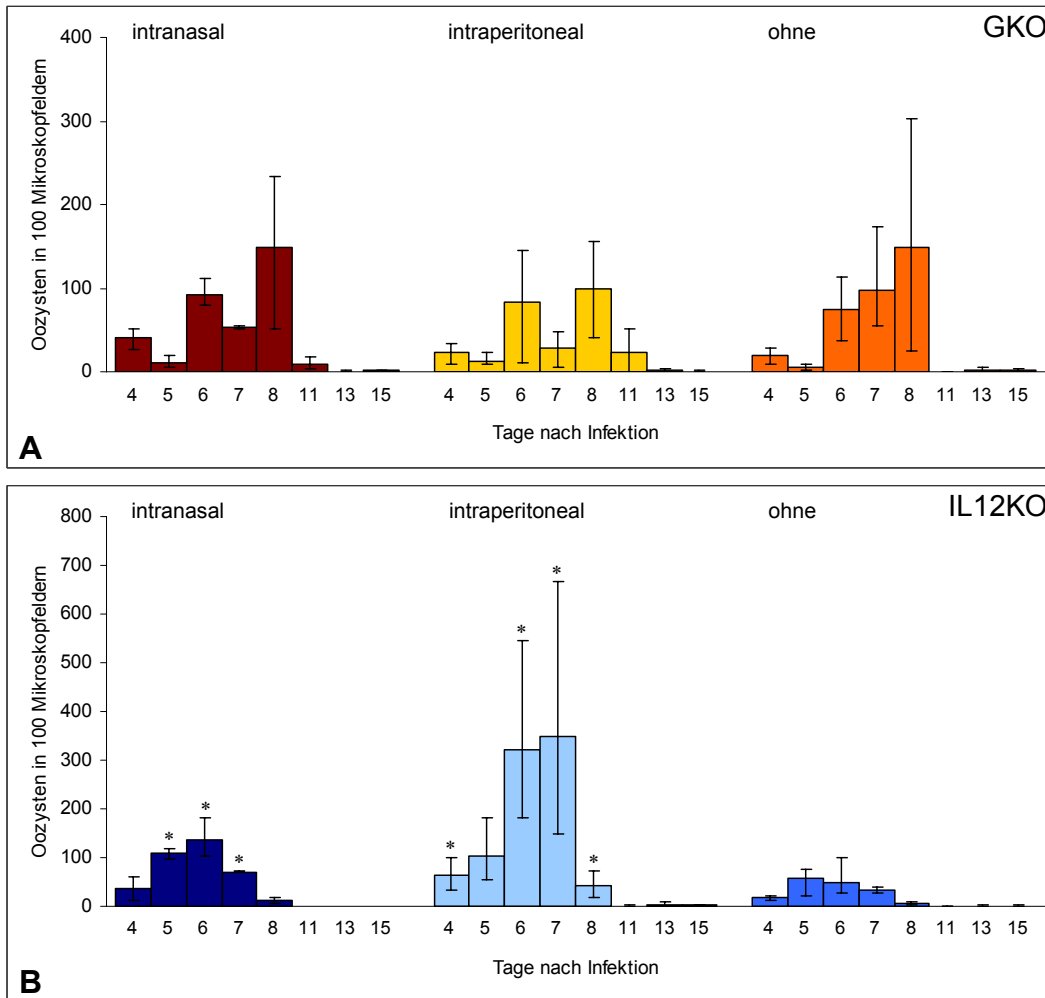


Abb. 3.2.3: Parasitenausscheidung nach Infektion von immunisierten Knockout-Mäusen

Die Parasitenausscheidung nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A] und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [B] mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg wurde die Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder in einer 1000fachen Vergrößerung pro Maus und Tag bestimmt und über die Gruppe (4 Mäuse) gemittelt. Die Mäuse wurden zuvor intranasal oder intraperitoneal mit Parasitenlysate aus 1×10^6 Oozysten ohne Adjuvans immunisiert. Von beiden Mausstämmen wurde eine Kontrollgruppe ausschließlich infiziert (ohne). Die Fehlerbalken markieren jeweils die niedrigste bzw. höchste Oozystenausscheidung innerhalb einer Gruppe. Mit * sind signifikante Unterschiede zur nicht immunisierten Kontrollgruppe gekennzeichnet ($p < 0,04$).

Antikörperantwort nach Infektion

Vier und neun Wochen nach der Infektion wurden Serumproben und Vaginalspülungen gewonnen und in einem ELISA mit Parasitenlysate als Antigen (siehe 2.4.5.2) serologisch ausgewertet. Für den Nachweis der IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a wurde ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt. Abbildung 3.2.4 zeigt die Detektion spezifischer Antikörper im ELISA vier Wochen nach Infektion. Bei allen infizierten Mäusen beider Knockout-Mausstämme waren wie gewohnt im Rahmen einer Infektion induziertes Parasitenlysate-spezifisches IgG und IgA im Serum und zum größten Teil auch IgA in den Vaginalspülungen nachzuweisen. Die in den Parasitenlysate-ELISA erhaltenen Ergebnisse zur Höhe der Antikörpertiter und dem zeitlichen Verlauf konnten im Westernblot noch einmal bestätigt werden (siehe 2.4.4.1). In Abbildung 3.2.5 ist exemplarisch die Reaktivität der Seren von einer nicht immunisierten Maus und jeweils zwei intranasal bzw. intraperitoneal immunisierten Mäusen beider Knockout-Mausstämme zwei Wochen nach der zweiten Boosterimmunisierung und vier und neun Wochen nach der Infektion in einem Kombinations-Westernblot mit den rekombinanten Parasitenproteinen P23_{GST} und CP17_{GST} parallel dargestellt.

Nicht immunisierte Mäuse beider Knockout-Mausstämme wiesen vier Wochen nach der Infektion einen durchschnittlichen IgG-Titer von 1:6400 und einen IgA-Titer von 1:1600 auf. Bei den GKO konnten bis neun Wochen p.i. keine Veränderungen im Serumtiter gemessen werden. Bei den IL12KO sank der IgG-Titer dagegen signifikant auf 1:1600 ab und auch der IgA-Titer wies eine sinkende Tendenz auf. Die Antikörperantwort entsprach damit in ihrer Höhe und dem Verlauf der bei den Infektionsversuchen in Kapitel 3.1.4.1 beobachteten. Der IgG1-Titer des Serumpools lag bei den GKO nach der Infektion durchschnittlich bei 1:3200, bei den IL12KO bei nur 1:800. IgG2a war vier Wochen p.i. nicht nachweisbar.

Intranasal immunisierte Mäuse zeigten nach einer Infektion eine mit naiv infizierten Mäusen vergleichbar hohe Antikörperantwort mit Parasitenlysate-reaktivem IgG und IgA im Serum. Des Weiteren konnte bei allen Mäusen IgA auch in den Vaginalspülungen detektiert werden. Vier Wochen p.i. wiesen die GKO einen durchschnittlichen IgG-Titer von 1:6400 und einen IgA-Titer von 1:1600 auf, die beide mit zunehmendem Abstand zur Infektion signifikant um jeweils zwei Titrationsstufen anstiegen. Die IL12KO zeigten vier Wochen p.i. einen durchschnittlichen IgG-Titer von 1:3200, der wie gewohnt bis neun Wochen p.i. bei allen Mäusen wieder absank (1:1600). Der IgA-Titer von 1:3200 vier Wochen p.i. hingegen erhöhte sich bei allen Mäusen noch einmal (1:6400). Nach der

intranasalen Immunisierung waren bei beiden Knockout-Mausstämmen im Serumpool der jeweiligen Gruppe bereits geringe Mengen an IgG1 nachweisbar. Vier Wochen nach der Infektion war der IgG1-Titer dann sehr deutlich auf durchschnittlich 1:12800 (GKO) bzw. 1:25600 (IL12KO) angestiegen. IgG2a war auch hier nicht zu detektieren.

Intraperitoneal immunisierte Knockout-Mäuse zeigten nach einer Infektion zusätzlich zu der durch die Immunisierung induzierten starken IgG-Antwort nun auch eine starke IgA-Antwort im Serum. Des Weiteren waren alle Mäuse beider Knockout-Mausstämme jetzt auch positiv für spezifisches IgA in den Vaginalspülungen. Die GKO wiesen nach der Infektion zwar keine signifikanten Unterschiede zum IgG-Titer nach der Immunisierung auf, jedoch eine steigende Tendenz (1:25600), die sich auch bis neun Wochen p.i. fortsetzte (1:102400). Der durchschnittliche IgA-Titer von 1:3200 stieg bis neun Wochen p.i. noch einmal auf 1:6400-12800 an. Bei den IL12KO-Mäusen erhöhte sich der IgG-Titer nach der Infektion signifikant von 1:25600 um 1-2 Titrationsstufen. Der IgA-Titer lag vier Wochen nach der Infektion bei 1:6400. Nach dem Boostereffekt durch die Infektion sanken die Serumtiter von spezifischem IgG und IgA jedoch bis neun Wochen p.i. wieder tendenziell ab. Der IgG1-Titer blieb bei GKO und IL12KO nach der Infektion vergleichbar hoch (1:204800-409600). Auch das IgG2a-Niveau änderte sich bei den IL12KO nicht (1:800). Die GKO-Mäuse zeigten nach wie vor kein IgG2a.

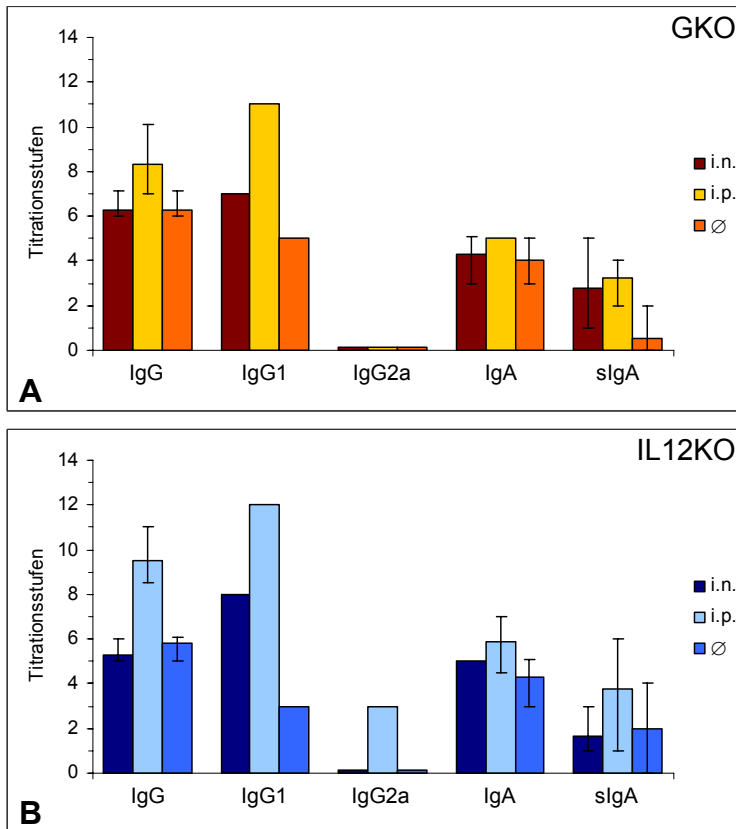


Abb. 3.2.4: Antikörperantwort vier Wochen nach Infektion immunisierter Knockout-Mäuse

Nachweis von spezifischem Serum-IgG, -IgG1, -IgG2a und -IgA und sekretorischem IgA (sIgA) in Vaginalspülungen im ELISA mit Parasitenlysate als Antigen vier Wochen nach der Infektion von immunisierten IFN- γ -Knockout- (GKO) [A] und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [B] mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Die Mäuse wurden zuvor dreimal im Abstand von 2 Wochen intranasal (i.n.) bzw. intraperitoneal (i.p.) mit Parasitenlysate immunisiert. Von beiden Mausstämmen wurde eine Kontrollgruppe ausschließlich infiziert (\emptyset). Angegeben sind die mittleren Antikörpertiter von jeweils vier Mäusen, wobei die Seren ab 1:100, die Vaginalspülungen ab 1:3 in Zweierschritten verdünnt wurden. Für den Nachweis von IgG1 und IgG2a wurde ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Proben als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200 bei Seren bzw. 1:6 bei Vaginalspülungen. Die Fehlerbalken geben jeweils den niedrigsten bzw. höchsten gemessenen Antikörpertiter innerhalb einer Gruppe an.

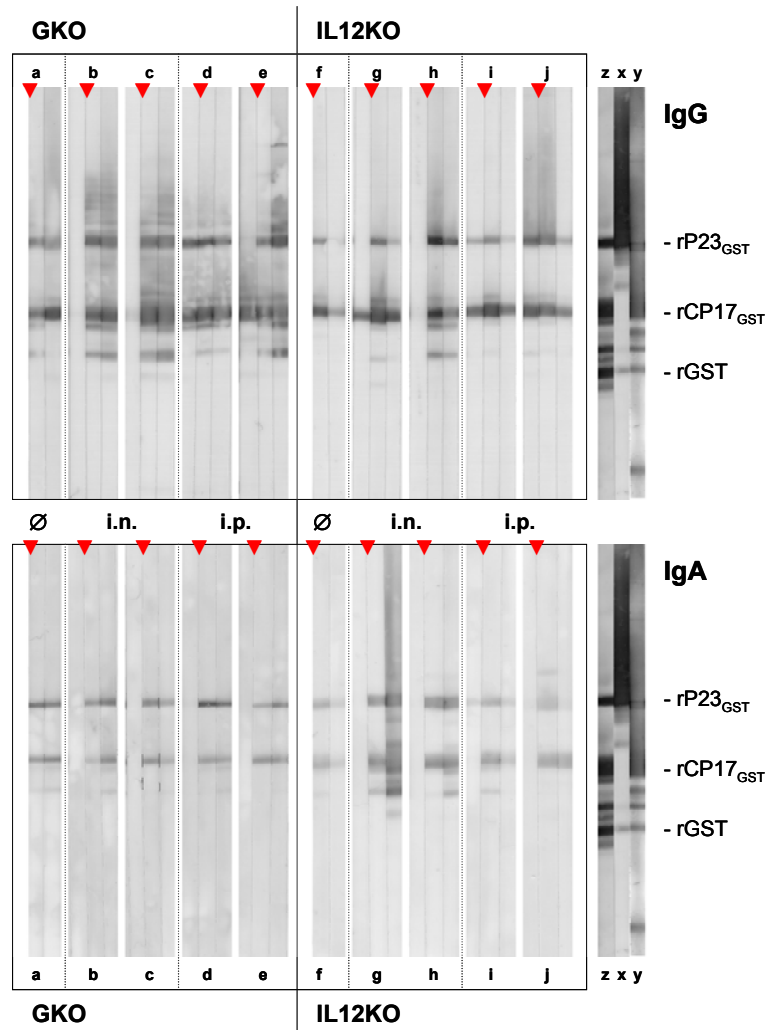


Abb. 3.2.5: Westernblot zum Nachweis P23- und CP17-reaktiver Antikörper im Serum nach Immunisierung und Infektion von Knockout-Mäusen

Nachweis von spezifischem Serum-IgG und -IgA bei IFN- γ -Knockout- (GKO) und IL-12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) im Westernblot zwei Wochen nach der dritten intranasalen (i.n.) bzw. intraperitonealen (i.p.) Immunisierung und vier und neun Wochen nach der sich anschließenden Infektion mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten (rote Pfeilspitze). Von beiden Mausstämmen wurde eine Kontrollgruppe ausschließlich infiziert (\emptyset). Als Antigen wurde ein Gemisch der rekombinanten Proteine P23_{GST} (~49 kDa), CP17_{GST} (~37 kDa) und als Kontrolle GST (26 kDa) parallel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Seren wurden 1:100 verdünnt. Als Positivkontrollen kamen der mAk 3E3 (anti-P23, x), das Kaninchen-Antiserum rb101 (anti-CP17, y) und ein anti-GST-Antikörper (z) zum Einsatz. Exemplarisch werden die Reaktivitäten von jeweils zwei Seren der Gruppen immunisierter Mäuse und jeweils einer nicht immunisierten Maus beider Mausstämmen gezeigt. Pro Maus sind jeweils die Seren der verschiedenen Zeitpunkte nebeneinander dargestellt.

3.2.2 Intranasale und subkutane Immunisierung mit Parasitenlysat und AbISCO als Adjuvans

Mit der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen intranasalen Immunisierung mit Parasitenlysat ohne Adjuvans konnte keine über Antikörper messbare Immunantwort induziert werden. Dennoch blieb dieser Immunisierungsweg zu favorisieren, da er zu den wenigen Wegen zählt, die zur Bildung von mukosalem IgA führen. Es wurde daher nach einem Adjuvans gesucht, welches bereits erfolgreich in intranasalen Immunisierungen eingesetzt wurde.

In einem weiteren Ansatz wurden Immunisierungen mit dem Adjuvans AbISCO durchgeführt. Immunisiert wurde intranasal und als Kontrolle subkutan nach demselben Schema wie schon bei der zuvor beschriebenen Immunisierungsstudie (Abb. 3.2.6). Als Antigen wurde wiederum Parasitenlysat gewählt. Zwei Wochen nach der zweiten Boosterimmunisierung wurden Serumproben und Vaginalspülungen gewonnen und auf die Induktion von *C. parvum*-spezifischen Antikörpern hin untersucht. Um den Immunisierungserfolg zu überprüfen, wurden die Mäuse zwei Wochen nach der dritten Immunisierung mit *C. parvum*-Oozysten infiziert und die Parasitenausscheidung gemessen. An die Infektion schloss sich erneut eine serologische Untersuchung an. Fünf Wochen *post infectionem* wurden die Mäuse ein weiteres Mal infiziert und die Parasitenausscheidung nach Reinfektion immunisierter Knockout-Mäuse bestimmt.

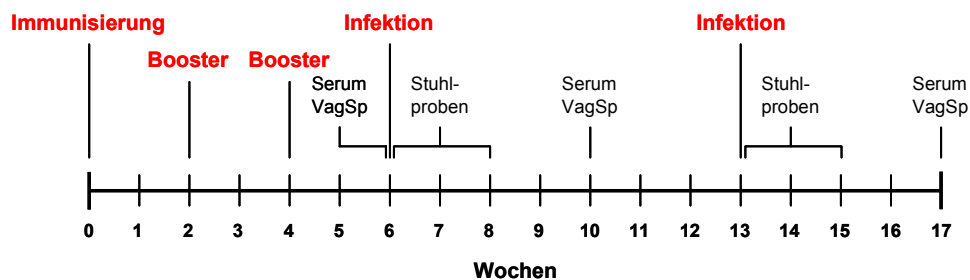


Abb. 3.2.6: Zeitlicher Ablauf der intranasalen bzw. subkutanen Immunisierung mit Adjuvans

IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse wurden drei Mal im Abstand von zwei Wochen intranasal bzw. subkutan mit Parasitenlysat aus 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten mit AbISCO als Adjuvans immunisiert und anschließend zur Überprüfung des Immunisierungserfolges mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten infiziert. Die Bestimmung der Parasitenausscheidung *post infectionem* erfolgte in Stuhlproben. Für die Charakterisierung der Antikörperantwort nach der Immunisierung bzw. der Infektion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Serumproben und Vaginalspülungen (VagSp) gewonnen.

3.2.2.1 Immunisierung

IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäuse wurden mit Lysat aus 1×10^6 Oozysten (Konzentration 1×10^6 Oozystenäquivalente in 5 μ l endotoxinfreiem DPBS) intranasal und als Kontrolle subkutan immunisiert (siehe 2.5.2.1). Das Adjuvans AbISCO ist für eine intraperitoneale Immunisierung nicht geeignet. Da für das Adjuvans beschrieben wurde, dass der Immunisierungserfolg IL-12-abhängig aber IL-4- und IFN- γ -unabhängig ist (Hu et al., 2005; Smith et al., 1999; Smith et al., 1998), wurden, um ein besseres Bild von einer möglichen induzierbaren Immunantwort zu bekommen, parallel auch C57BL/6-Wildtypmäuse intranasal bzw. subkutan immunisiert. Die jeweiligen Gruppen setzten sich aus vier weiblichen Mäusen zusammen. Die Immunisierungen erfolgten drei Mal im Abstand von zwei Wochen. Die Mäuse wurden jeweils vor der Applikation des Antigens mit Avertin sediert. Für die intranasale Immunisierung wurde das Parasitenlysate mit 20 μ g (6,67 μ l) des Adjuvans AbISCO-300 gemischt. AbISCO-300 (3 mg/ml) wird im Gegensatz zu AbISCO-100 (0,48 mg/ml), welches eigentlich für den Einsatz in Mäusen entwickelt wurde, normalerweise für die Immunisierung größerer Tiere wie Ziegen, Schafe oder Kühe verwendet. Es wurde jedoch vom Hersteller für die intranasale Immunisierung von Mäusen empfohlen, da durch die höhere Konzentration das Volumen möglichst gering gehalten werden kann. Mit einem Endvolumen von nur 12 μ l wurde das Antigen, welches auf die Nasenlöcher getropft wurde, ohne Verlust von den Mäusen in die Nasenhöhle eingeatmet. Für die subkutane Immunisierung wurde das Parasitenlysate mit AbISCO-100 (12 μ g) gemischt, mit DPBS auf ein Volumen von 100 μ l gebracht und in die Nackenfalte appliziert.

Antikörperantwort nach Immunisierung

Zwei Wochen nach der zweiten Boosterimmunisierung wurde in serologischen Untersuchungen die Induktion einer spezifischen Immunantwort überprüft (Abb. 3.2.7). Die Detektion von spezifischem IgG und IgA im Serum und sekretorischem IgA in den Vaginalspülungen erfolgte in einem ELISA mit Parasitenlysate als Antigen (siehe 2.4.5.2). Für den Nachweis der IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a wurde jeweils ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt.

Auch mit AbISCO als Adjuvans wurde mit einer **intranasalen** Immunisierung keine adäquate, gut über spezifische Antikörper messbare Immunantwort induziert. Bei allen Mausstämmen konnten wenn überhaupt nur geringe Mengen an *C. parvum*-reaktiven

Antikörpern im Serum und in den Vaginalspülungen nachgewiesen werden. Die GKO-Mäuse zeigten vergleichsweise noch die stärkste Antikörperantwort.

Durch die **subkutane** Immunisierung wurde wie erwartet eine sehr starke IgG-Antwort hervorgerufen. Der mittlere IgG-Titer der GKO lag bei 1:204800, der C57BL/6 bei 1:102400-204800 und der IL12KO sogar bei 1:409600-819200. Bei einigen Mäusen (vor allem bei den IL12KO) konnten auch geringe Mengen an spezifischem IgA (1:200-400) im Serum gemessen werden, jedoch in keinem Fall in den Vaginalspülungen. Alle drei Stämme zeigten eine starke IgG1-Antwort. Bei IL12KO- und C57BL/6-Mäusen konnte auch eine relativ gute IgG2a-Antwort nachgewiesen werden (1:12800 bzw. 1:6400). GKO-Mäuse hingegen entwickelten kein spezifisches IgG2a.

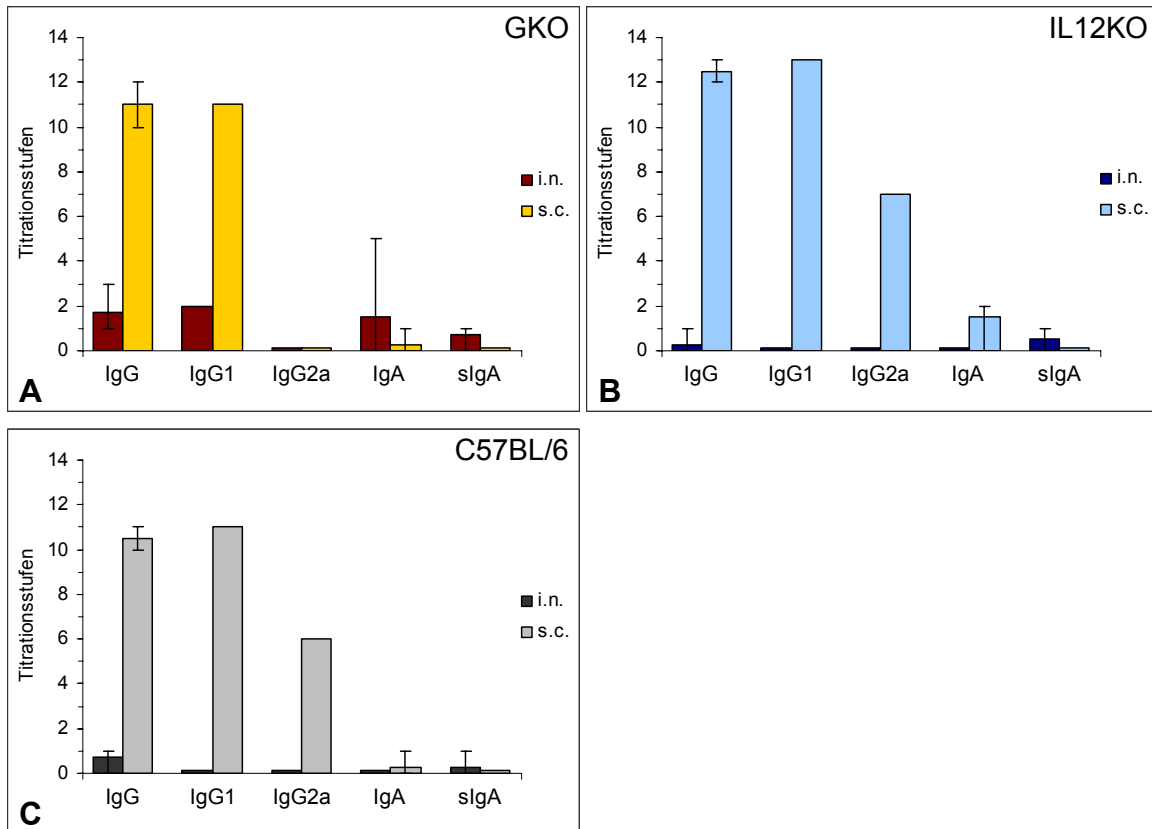


Abb. 3.2.7: Antikörperantwort nach intranasaler bzw. subkutaner Immunisierung

Nachweis von spezifischem Serum-IgG, -IgG1, -IgG2a und -IgA und sekretorischem IgA (sIgA) in Vaginalspülungen im ELISA mit Parasitenlysat als Antigen zwei Wochen nach der dritten intranasalen (i.n.) bzw. subkutanen (s.c.) Immunisierung von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A], IL-12 p40-Knockout- (IL12KO) [B] und C57BL/6-Mäusen [C]. Angegeben sind die mittleren Antikörpertiter von jeweils vier Mäusen, wobei die Seren ab 1:100, die Vaginalspülungen ab 1:3 in Zweierschritten verdünnt wurden. Für den Nachweis von IgG1 und IgG2a wurde ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt. Die Titrationsstufe 1, ab der die Proben als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200 bei Seren bzw. 1:6 bei Vaginalspülungen. Die Fehlerbalken geben jeweils den niedrigsten bzw. höchsten gemessenen Antikörpertiter innerhalb einer Gruppe an.

3.2.2.2 Infektion der immunisierten Mäuse mit *C. parvum*-Oozysten

Alle immunisierten Mäuse, das heißt intranasal bzw. subkutan immunisierte IFN- γ -Knockout-, IL-12 p40-Knockout- und C57BL/6-Mäuse, und eine nicht immunisierte Kontrollgruppe des jeweiligen Mausstamms gleichen Alters wurden zwei Wochen nach der zweiten Boosterimmunisierung mit 1×10^6 Oozysten infiziert. Beginnend an Tag 4 *post infectionem* wurden bis Tag 10 zunächst täglich und zusätzlich an den Tagen 12 und 15 Stühle gesammelt. Die Parasitenausscheidung wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt (siehe 2.4.6.2).

Parasitenausscheidung nach Infektion

Der Verlauf und die Höhe der Parasitenausscheidung von intranasal immunisierten **GKO**-Mäusen (Abb. 3.2.8 A) waren ziemlich identisch mit denen nicht immunisierter Mäuse. Wie gewohnt zeigte sich eine alternierende Ausscheidung mit Spitzen an den Tagen 4, 6 und 8 p.i.. Die Oozystenanzahl sank an Tag 12 wieder unter durchschnittlich 10 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern, an Tag 15 waren nur noch vereinzelt Oozysten nachweisbar. Die subkutane Immunisierung der GKO hatte dagegen eine deutliche Auswirkung auf die Höhe der Parasitenausscheidung. Über den gesamten Beobachtungszeitraum schieden die Mäuse signifikant 3,5-mal mehr Oozysten aus als die Mäuse der Kontrollgruppe ($p = 0,0004$). Der Ausscheidungshöhepunkt wurde an Tag 8 erreicht, an dem im Mittel 599 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern gezählt wurden. Signifikante Unterschiede zeigten sich an den Tagen 5, 7 und 8, an denen durchschnittlich 3,6-, 7,2- bzw. 5,6-mal mehr Oozysten detektiert wurden ($p \leq 0,018$). Insgesamt dauerte die Parasitenausscheidung auch länger an. An Tag 10 schieden die Mäuse mit durchschnittlich 257 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern immer noch 7,3-mal mehr aus als die Kontrollgruppe, bei der zu diesem Zeitpunkt nur noch 35 Oozysten gezählt wurden. An Tag 12 konnten bei den immunisierten Mäusen noch 56, bei den nicht immunisierten Mäusen 3 Oozysten nachgewiesen werden. Trotz der sehr viel stärkeren Infektion sank die Ausscheidung an Tag 12 wieder deutlich ab, ab Tag 15 konnten wie bei den anderen beiden Gruppen nur noch vereinzelt Oozysten detektiert werden. Die Mäuse erholten sich also dennoch von der Infektion und wiesen zu keiner Zeit weitere Krankheitssymptome auf.

Weder die intranasale noch die subkutane Immunisierung von **IL12KO**-Mäusen zeigte einen Einfluss auf den Infektionsverlauf oder die Höhe der Ausscheidung nach einer Infektion mit *C. parvum* (Abb. 3.2.8 B). Alle Mäuse schieden von Tag 4 bis 8 p.i. Oozysten aus, ab Tag 9 konnten nur noch vereinzelt Oozysten gezählt werden. Der Ausscheidungshöhepunkt schien sich bei den immunisierten Mäusen jedoch um ein bis zwei Tage nach hinten verschoben zu haben. Die nicht immunisierte Gruppe zeigte wie gewohnt eine hohe Parasitenausscheidung an den Tagen 4 bis 6 mit durchschnittlich 144 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern, die an Tag 7 deutlich auf 27 Oozysten sank. An Tag 8 waren nur noch sehr wenige Parasiten in den Stuhlpräparaten zu finden (3 Oozysten). Subkutan immunisierte IL12KO-Mäuse schieden dagegen an den Tagen 4 und 5 signifikant circa zwei Drittel weniger ($p \leq 0,003$), an den Tagen 7 (149 Oozysten) und 8 (26 Oozysten) dafür signifikant durchschnittlich 7-mal mehr ($p \leq 0,035$) aus als die nicht

immunisierten Mäuse. Auch bei der intranasal immunisierten Gruppe konnten an Tag 4 ($p = 0,028$) und 5 durchschnittlich nur die Hälfte, an den Tagen 7 (95 Oozysten; $p = 0,012$) und 8 dagegen deutlich mehr Oozysten detektiert werden.

Bei **C57BL/6**-Wildtypmäusen waren nach der Infektion mit *C. parvum* wie erwartet nur vereinzelt Oozysten im Stuhl nachweisbar (nicht gezeigt). Ab Tag 8 nach der Infektion konnten keine Oozysten mehr detektiert werden. Dies änderte sich auch durch vorangegangene Immunisierungen nicht. Die Parasitenausscheidung blieb nahe der Nachweisgrenze und wurde durch die Immunisierungen auch nicht negativ beeinflusst.

Mit den hier durchgeführten Immunisierungen wurde erneut keine Reduktion der Parasitenausscheidung erzielt.

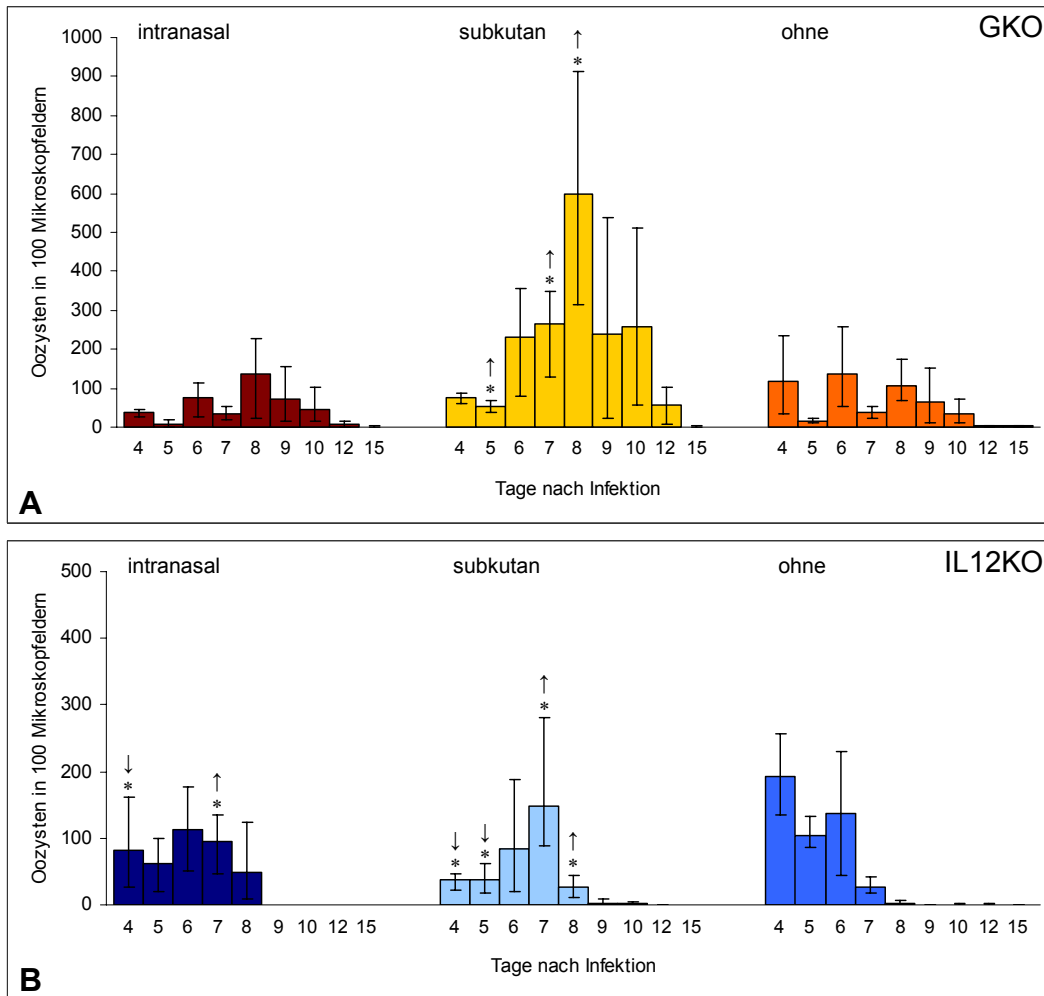


Abb. 3.2.8: Parasitenausscheidung nach Infektion von intranasal bzw. intraperitoneal immunisierten Knockout-Mäusen

Die Parasitenausscheidung nach Infektion von IFN- γ -Knockout- (GKO) [A] und IL12 p40-Knockout-Mäusen (IL12KO) [B] mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg wurde die Anzahl der Oozysten bezogen auf 100 Mikroskopfelder in einer 1000fachen Vergrößerung pro Maus und Tag bestimmt und über die Gruppe (4 Mäuse) gemittelt. Die Mäuse wurden zuvor intranasal oder subkutan mit Parasitenlysate aus 1×10^6 Oozysten und dem Adjuvans AbISCO immunisiert. Von beiden Mausstämmen wurde eine Kontrollgruppe ausschließlich infiziert (ohne). Die Fehlerbalken markieren jeweils die niedrigste bzw. höchste Oozystenausscheidung innerhalb einer Gruppe. Mit * \downarrow bzw. * \uparrow sind signifikant verminderte bzw. erhöhte Ausscheidungsraten gegenüber der nicht immunisierten Kontrollgruppe gekennzeichnet ($p \leq 0,035$).

Antikörperantwort nach Infektion von immunisierten Knockout-Mäusen

Vier Wochen nach der Infektion wurden Serumproben und Vaginalspülungen gewonnen, um im Rahmen der Infektion gebildete Antikörper nachzuweisen (Abb. 3.2.9 A, B). Dabei kam ein ELISA mit Parasitenlysate als Antigen zum Einsatz (siehe 2.4.5.2). Für den Nachweis der IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a wurde ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt.

Die Antikörperantwort nach Infektion **nicht immunisierter** Mäuse fiel wie gewohnt aus. Bei allen Knockout-Mäusen konnte spezifisches IgG und IgA im Serum und bis auf eine IL12KO auch IgA in den Vaginalspülungen nachgewiesen werden. GKO und IL12KO bildeten vergleichbar hohe IgG-Titer (durchschnittlich 1:6400-12800) aus. Die IgA-Titer lagen bei 1:6400 bei den GKO und 1:800-1600 bei den IL12KO. Der jeweilige Pool der Seren zeigte einen IgG1-Titer von 1:6400 bzw. 1:3200. In keinem Fall konnte IgG2a detektiert werden.

Die **intranasal** immunisierten Mäuse wiesen nach der Infektion nun auch eine starke spezifische Antikörperantwort mit einem durchschnittlichen IgG-Titer von 1:12800 (GKO) bzw. 1:25800 (IL12KO) und einem IgA-Titer von 1:6400 auf. Bei allen Knockout-Mäusen konnte IgA auch in den Vaginalspülungen detektiert werden. Der IgG1-Titer des Serumpools der GKO lag bei 1:25600, der der IL12KO bei 1:204800. IgG2a war ausschließlich bei den IL12KO und hier nur in geringen Mengen nachzuweisen (1:400).

In Folge der **subkutanen** Immunisierung kam bei beiden Knockout-Mausstämmen zu den auch nach der Infektion eher gleich gebliebenen hohen Mengen an spezifischem IgG (1:204800-409600) eine starke IgA-Antwort mit einem durchschnittlichen Titer von 1:25600-51200 hinzu. Diese fiel vor allem bei den IL12KO deutlich höher aus als bei der Kontrollgruppe. IgA konnte bei allen Mäusen auch in den Vaginalspülungen nachgewiesen werden, bei den GKO sogar mit einem durchschnittlichen Titer von 1:192. Im Serumpool stieg der IgG1-Titer nach der Infektion bei den GKO noch einmal um zwei Titrationsstufen an (1:819200), wohingegen der Titer bei den IL12KO eine eher gleich bleibende bis sinkende Tendenz aufwies (1:409600). Nach wie vor konnte bei den GKO kein IgG2a nachgewiesen werden. Die IL12KO zeigten einen IgG2a-Titer von 1:6400.

Antikörperantwort nach Infektion von immunisierten C57BL/6-Mäusen

Die Antikörperantwort der infizierten C57BL/6-Mäuse wurde vier und neun Wochen nach Infektion wie bereits oben beschrieben untersucht. Nach einer Konfrontation mit 1×10^6 Oozysten konnten zwar nur vereinzelt Oozysten in den Stühlen nachgewiesen werden, eine

Auseinandersetzung mit dem Parasiten erfolgte dennoch, was sich in der Ausbildung spezifischer Antikörper im Serum widerspiegelte. Bei allen infizierten C57BL/6-Mäusen konnte spezifisches IgG und IgA im Serum nachgewiesen werden, auch wenn die Antikörperantwort deutlich schwächer ausfiel als bei den Knockout-Mäusen (Abb. 3.2.9 C).

Nicht immunisierte C57BL/6-Mäuse zeigten *post infectionem* einen durchschnittlichen IgG-Titer von 1:1600 und einen IgA-Titer von 1:400. Der IgG-Titer fiel bis neun Wochen p.i. wieder signifikant auf 1:200 ($p < 0,001$) ab und auch das IgA zeigte eine sinkende Tendenz. Vier Wochen p.i. waren drei der vier Mäuse auch schwach positiv für IgA in den Vaginalspülungen (1:6). Der Serumpool zeigte lediglich einen IgG1-Titer von 1:400. IgG2a war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar.

Die **intranasal** immunisierten Mäuse bauten verglichen mit den nicht immunisierten Mäusen eine stärkere Immunantwort auf. Der durchschnittliche IgG-Titer lag hier bei 1:6400, der IgA-Titer bei 1:3200. Beide sanken bis neun Wochen p.i. wieder auf durchschnittlich 1:1600. Nur zwei Mäuse waren positiv für IgA in der Vaginalspülung. Spezifisches IgG1 stieg nach der Infektion deutlich höher als bei den ausschließlich infizierten Mäusen (1:12800). IgG2a war auch hier zu keinem Zeitpunkt zu detektieren.

Vier Wochen nach der Infektion kam bei den **subkutan** immunisierten C57BL/6-Mäusen zu der gleich gebliebenen starken IgG-Antwort (1:102400-204800) eine starke IgA-Antwort im Serum hinzu (1:6400), die sich beide bis neun Wochen p.i. nicht veränderten. Alle Mäuse waren jetzt auch deutlich positiv für IgA in den Vaginalspülungen (1:24-48). Der IgG1- und auch der IgG2a-Titer blieben p.i. auf demselben Niveau wie nach der Immunisierung (1:204800 bzw. 1:3200).

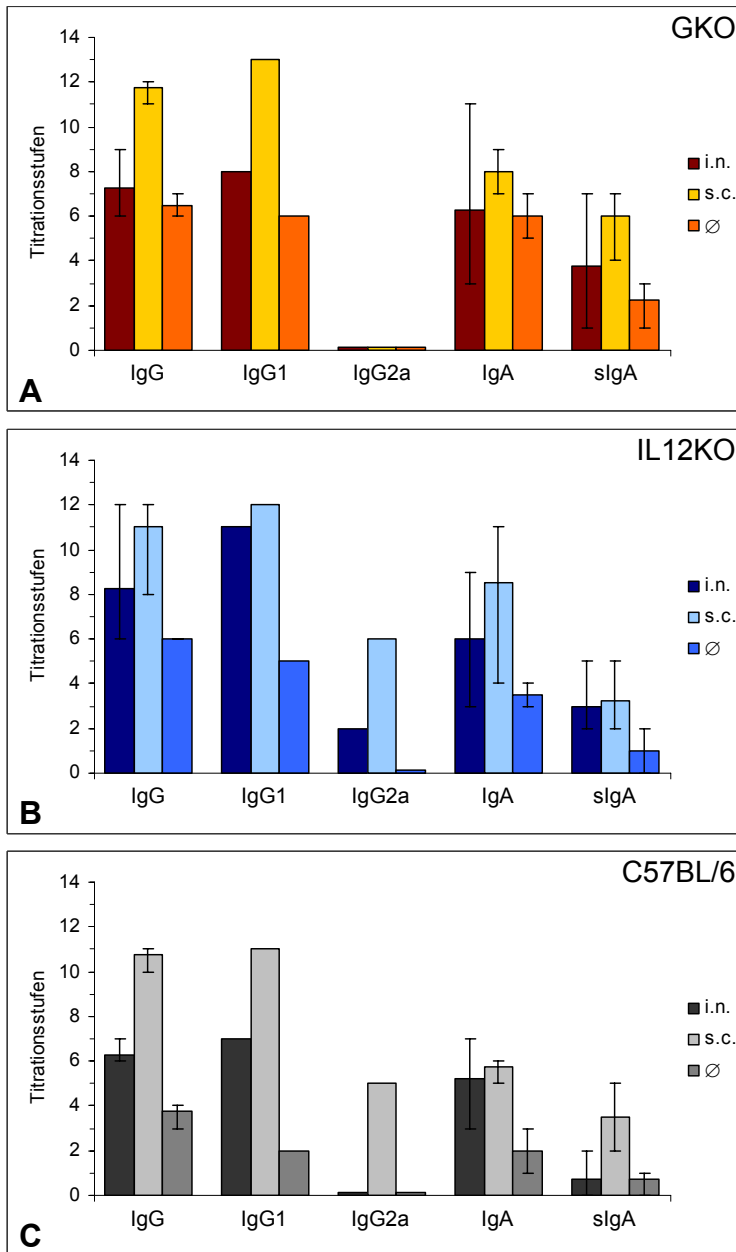


Abb. 3.2.9: Antikörperantwort vier Wochen nach Infektion immunisierter Mäuse

Nachweis von spezifischem Serum-IgG, -IgG1, -IgG2a und -IgA und sekretorischem IgA (sIgA) in Vaginalspülungen im ELISA mit Parasitenlysate als Antigen vier Wochen nach der Infektion von immunisierten IFN- γ -Knockout- (GKO) [A], IL-12 p40-Knockout- (IL12KO) [B] und C57BL/6-Mäusen [C] mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Die Mäuse wurden zuvor dreimal im Abstand von 2 Wochen intranasal (i.n.) bzw. subkutan (s.c.) mit Parasitenlysate immunisiert. Von beiden Mausstämmen wurde eine Kontrollgruppe ausschließlich infiziert (\emptyset). Angegeben sind die mittleren Antikörpertiter von jeweils vier Mäusen, wobei die Seren ab 1:100, die Vaginalspülungen ab 1:3 in Zwischenschritten verdünnt wurden. Für den Nachweis von IgG1 und IgG2a wurde ein Pool der Seren einer Gruppe eingesetzt. Die Titrationstufe 1, ab der die Proben als positiv eingestuft wurden, entspricht einer Verdünnung von 1:200 bei Seren bzw. 1:6 bei Vaginalspülungen. Die Fehlerbalken geben jeweils den niedrigsten bzw. höchsten gemessenen Antikörpertiter innerhalb einer Gruppe an.

3.2.2.3 Reinfektion der immunisierten Knockout-Mäuse mit *C. parvum*-Oozysten

Auch wenn durch die Immunisierung von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen zum Teil eine negative Beeinflussung der Infektion in Form eines Anstiegs der Parasitenausscheidung induziert wurde, erholten sich alle immunisierten Mäuse vergleichbar mit naiven Mäusen nach circa zwei Wochen von einer Infektion mit 1×10^6 *C. parvum*-Oozysten. Bestimmte Immunisierungswege besaßen damit zwar einen Einfluss auf die Höhe der Parasitenausscheidung nicht jedoch auf den zeitlichen Verlauf. Für naive Mäuse konnte gezeigt werden, dass eine erste Konfrontation mit dem Parasiten eine Resistenz vor einer erneuten Infektion verleiht. Es war nun von Interesse, ob die Immunisierungen möglicherweise auch einen Einfluss auf die Ausbildung einer Resistenz besaßen. Die intranasal bzw. subkutan immunisierten, infizierten sowie die ausschließlich infizierten Mäuse beider Knockout-Mausstämme wurden daher sieben Wochen nach der ersten Infektion noch einmal mit 1×10^6 Oozysten infiziert.

Parasitenausscheidung nach Reinfektion

Nach einer Reinfektion konnten bei allen Versuchsgruppen in den Stuhlausstrichen nur sehr vereinzelt Oozysten nachgewiesen werden. Es zeigte sich eindeutig, dass die hier durchgeführten Immunisierungen die Resistenzentwicklung in keiner Weise störten.

Antikörperantwort nach Reinfektion

Bei allen GKO-Mäusen, die ein zweites Mal mit dem Parasiten konfrontiert wurden, wirkte die Reinfektion wie ein Booster auf die Antikörperantwort, auch wenn keine über die Parasitenausscheidung messbare Infektion mehr beobachtet werden konnte (siehe 3.1.4.1, Abb. 3.1.10). Dasselbe konnte für die immunisierten GKO gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl bei den intranasal als auch bei den subkutan immunisierten GKO stiegen das Serum-IgG und -IgA wie gewohnt nach der Reinfektion noch einmal deutlich an. IL12KO-Mäuse zeigten nach einer Reinfektion generell anstelle sinkender eher gleich bleibende IgG- und IgA-Titer. Auch die immunisierten IL12KO folgten diesem Trend.

3.3 *In vitro* Kultivierung von *C. parvum* in HCT-8-Zellen

Der komplexe Entwicklungszyklus des Darmparasiten *Cryptosporidium parvum* beinhaltet die Ausbildung verschiedener asexueller und sexueller Stadien. Nach wie vor existiert kein permanentes Kultivierungsverfahren für *C. parvum*. Kurzzeitig kann die Invasion und die Entwicklung des Parasiten jedoch in Wirtszellen *in vitro* untersucht werden. Hierbei werden 'Monolayer' von permanenten Zelllinien mit Oozysten oder gereinigten Sporozoiten infiziert. Die intrazelluläre Parasitenentwicklung kann dann über mehrere Tage verfolgt werden, wobei zur Überprüfung der Entwicklung und der Replikation des Parasiten in der Regel mikroskopische Verfahren, wie zum Beispiel Differenzial-Interferenzkontrast und Immunfluoreszenztests mit parasitenspezifischen Antikörpern, oder Zell-Enzymimmunoassays (ELISA) eingesetzt werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurden in den letzten Jahren mehrere *in vitro* Kultivierungssysteme etabliert (Caco-2, AGS, HCT-8), wobei die ileocecalen Adenokarzinom-Zelllinie HCT-8 gegenüber den anderen Wirtszellen bezüglich der Parasitenvermehrung überlegen war. Dieses Modell kam bereits erfolgreich in einer Studie zum Einsatz, in der der Effekt von Proteaseinhibitoren der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) alleine und in Kombination mit Paromomycin auf die Exzystierung, die Zellinvasion und die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* untersucht wurde (Hommer et al., 2003). Die Parasitenentwicklung wurde hier mit Hilfe eines von uns entwickelten ELISA nachgewiesen. Des Weiteren wurde das *in vitro* Infektionsmodell auch zur Überprüfung der Infektiosität von Oozysten nach der Behandlung mit einem Desinfektionsmittel eingesetzt (Joachim et al., 2003).

Im diesem Teil der Arbeit wurde die intrazelluläre Entwicklung des Parasiten unter anderem mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz über einen Zeitraum von vier Tagen verfolgt. Hierbei kamen Stadien-reaktive, aber auch Antigen-spezifische Antikörper wie die von uns in Kaninchen generierten Antiseren gegen die rekombinanten Sporozoiten-Oberflächenproteine P23 und CP17 zum Einsatz. Über denselben Zeitraum wurde die Infektionsrate auch über den Nachweis Parasiten-spezifischer DNA bestimmt, wobei das *C. parvum*-spezifische CP17-Gen mittels PCR aus chromosomaler DNA, die aus infizierten Wirtszellen gewonnen wurde, amplifiziert wurde. Des Weiteren wurde die differentielle Expression von vier *C. parvum*-Genen, die für die Sporozoiten-Oberflächenproteine CP15, CP17, P23 und GP900 kodieren, parallel in unserem *in vitro*

Kultursystem über 98 Stunden untersucht. Mit Hilfe der RT-PCR konnten deutliche Unterschiede in Ausmaß und im zeitlichen Verlauf der Transkription innerhalb der untersuchten Gene beobachtet werden (Jakobi & Petry, 2006).

3.3.1 Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten

Für die *in vitro* Kultivierung von *Cryptosporidium parvum* wurden für den Nachweis von intrazellulären Stadien mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz $1-2 \times 10^5$ HCT-8-Zellen pro Kavität in 8er LabTek-Objektträger und für den Nachweis von *C. parvum*-spezifischen Nukleinsäuren $5 \times 10^6-1 \times 10^7$ Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm^2) ausgesät und nach 18 Stunden mit 2×10^5 bzw. $1-2 \times 10^7$ Oozysten in *C. parvum*-Wachstumsmedium infiziert (siehe 2.3.3). Die Oozysten wurden vor der Applikation mit Chlorbleichlauge oberflächendesinfiziert, was nach unseren Erfahrungen zusätzlich zu einer erhöhten *in vitro* Exzystierung führt (siehe 2.4.1). Nach zwei Stunden, in denen die Sporoziten exzystierten und die Zellen infizierten, wurden die Zellen mit PBS-K⁺ gewaschen und in *C. parvum*-Wachstumsmedium für weitere 6-96 Stunden kultiviert. Um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten wurde jeden Tag frisches Medium zu den Kulturen hinzu gegeben. Parallel zu den Infektionsexperimenten wurde jeweils die Vitalität und damit die Infektiosität der Oozysten überprüft. Dazu wurde eine Aliquot der Oozysten in einem 37°C warmen Wasserbad für zwei Stunden inkubiert und anschließend die Exzystierungsrate mikroskopisch bestimmt (siehe 2.3.4). Diese betrug in den hier durchgeführten Experimenten 40-50 %, was einer normalen Exzystierungsrate ohne den Zusatz von Natrium-Taurocholat entspricht. Um eine Wirkung auf die Zellen ausschließen zu können, wurde hier gänzlich auf den Einsatz von Natrium-Taurocholat in der Kultur verzichtet, auch wenn gezeigt wurde, dass eine reduzierte Konzentration *in vitro* die Infektionsrate erhöhen kann (Gold et al., 2001; Feng et al., 2006).

Die Infektion von HCT-8-Zellen wurde zwei Mal für die Präparation von Nukleinsäuren aus infizierten Zellen und dreimal für die indirekte Immunfluoreszenz wiederholt.

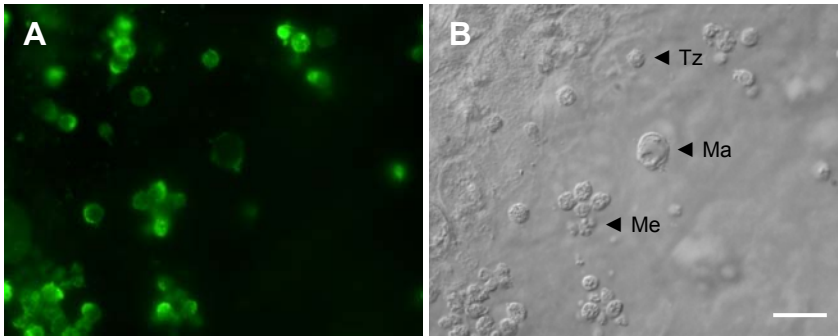


Abb. 3.3.1: *In vitro* Kultivierung von *C. parvum* in HCT-8-Zellen

50 Stunden nach der Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten wurden die intrazellulären Stadien in einer indirekten Immunfluoreszenz mit dem mAk 2C3 detektiert [A]. Die Bindung der spezifischen Antikörper wurde mit einem AlexaFluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Pfeilspitzen im dazugehörigen Phasenkontrast [B] markieren unterschiedliche intrazelluläre Parasitenstadien (Tz, Trophozoit; Me, Meront; Ma, Makrogametozyt). Der Ausschnitt wurde mit einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken in [B] entspricht 10 μ m.

3.3.2 Nachweis von intrazellulären Stadien durch indirekte Immunfluoreszenz

Für den Nachweis von intrazellulären Stadien und definierten Parasiten-Antigenen mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden zum einen die Stadien-reaktiven monoklonalen Antikörper 2C3 (IgG; Abb. 3.3.1) und 1B5 (IgM) und zum anderen Antigen-spezifische Antikörper wie der mAk 3E3 (IgG; anti-P23) und die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kaninchen-Antiseren rb101 (anti-CP17) und rb104 (anti-P23) eingesetzt (siehe 2.4.6.1). Im Falle der P23-reaktiven Antikörper musste auf eine Fixierung mit Paraformaldehyd übergegangen werden, da Methanol die Reaktivität herabsetzte und hier zu einem starken Hintergrund führte. Der Nachweis gebundener *C. parvum*-reaktiver Antikörper erfolgte mit AlexaFluor-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern. Abbildung 3.3.3 zeigt einen Überblick der Immunfluoreszenztests mit den Antikörpern 2C3, 1B5, rb101 und rb104 über den gesamten beobachteten Zeitraum von vier Tagen. Bei den Aufnahmen wurde für die entsprechenden Antikörper für jeden Zeitpunkt dieselbe Belichtungszeit gewählt. Die Abbildungen für den Nachweis mit den mAk 2C3 und 1B5 entsprechen jeweils einem identischen Ausschnitt aus einer Doppelfärbung, so dass die detektierten Stadien in ihrer Reaktivität direkt miteinander verglichen werden können. Für alle Zeitpunkte wurde zusätzlich das Verhältnis von intrazellulären Stadien zu Wirtszellkernen in einer 400fachen Vergrößerung analysiert (Abb. 3.3.2). Dazu wurden die intrazellulären Stadien mit den mAk 2C3 und die Wirtszellkerne mit dem Farbstoff Höchst

33258 in einer Doppelfärbung visualisiert. Es wurden jeweils drei Ausschnitte ausgezählt, in denen sich im Mittel 139 Wirtszellen befanden.

Der mAk **2C3** bindet an Sporozoitien und alle intrazellulären Stadien des Parasiten. Zwei Stunden *post infectionem* reagierten bereits junge Trophozoiten mit dem Antikörper (Abb. 3.3.3). Bis 8 Stunden p.i. nahmen diese Stadien zwar an Größe, nicht aber in ihrer Anzahl zu. Mit zunehmender Kultivierungszeit kamen weitere Stadien, wie z.B. Meronten, hinzu. Die mittlere Anzahl an Parasitenstadien betrug 2 Stunden p.i. 28 pro 100 Wirtszellkerne (Standardabweichung $\sigma = 7,5$), 8 Stunden p.i. lag sie bei 29 ($\sigma = 8,6$). Damit war die Infektionsrate zu diesen beiden sehr frühen Zeitpunkten ohne einen statistisch signifikanten Unterschied absolut vergleichbar ($p = 0,887$). Bis 14 Stunden p.i. zeigte sich ein starker, statistisch signifikanter Anstieg auf durchschnittlich 61 % ($p = 0,004$; $\sigma = 3,1$). In Abbildung 3.3.4 sind diese frühen Zeitpunkte noch einmal in einer 1000fachen Vergrößerung dargestellt. Im weiteren Verlauf der Kultur nahm die Anzahl an größeren Stadien und die Gesamtfluoreszenz zu, wobei 26 Stunden p.i. mit 63 % keine Zunahme an Stadien im Verhältnis zu Wirtszellkernen mehr zu verzeichnen war ($\sigma = 2,6$; $p = 0,374$). Die Gesamtfluoreszenz des mAk 2C3 war zu den Zeitpunkten 50 und 74 Stunden p.i. am stärksten. Dennoch sank das Verhältnis intrazellulärer Stadien zu Wirtszellkernen bis 50 Stunden p.i. signifikant auf 46 % ($\sigma = 6,1$, $p = 0,011$) und bis 74 Stunden p.i. weiter auf 31 % ($\sigma = 8,1$, $p = 0,058$) ab.

Der mAk **1B5** erkennt neben der Oozystenwand beide sexuellen Stadien, Mikro- und Makrogametozyten, jedoch keine Trophozoiten und Meronten. Das entsprechende Antigen wird während der intrazellulären Entwicklung erst nach Einleitung der sexuellen Vermehrungsphase exprimiert. Parasitenstadien, die eine Reaktivität mit dem Antikörper aufwiesen, erschienen vereinzelt ab 14 Stunden p.i.. Erst 50 Stunden p.i. war ein sehr starker Anstieg in der Anzahl 1B5-reaktiver Stadien zu verzeichnen. Wie auch schon mit dem mAk 2C3 gesehen, zeigte sich die stärkste Reaktivität zwischen 50 und 74 Stunden p.i.. Doppelfärbungen mit den mAk 2C3 und 1B5 ließen einen direkten Vergleich der reaktiven intrazellulären Stadien zu (Abb. 3.3.3, 3.3.5). Ab 50 Stunden p.i. zeigten die meisten Stadien eine doppelte Färbung. Vereinzelt konnten jedoch auch noch ausschließlich 2C3-reaktive Stadien zu diesen späten Zeitpunkten gefunden werden.

Das CP17-reaktive Kaninchenserum **rb101** wies dasselbe Reaktionsmuster wie der mAk 2C3 auf. Ab 2 Stunden p.i. konnten alle intrazellulären Stadien einschließlich der kleinen Trophozoiten-Stadien detektiert werden (Abb. 3.3.3, 3.3.4). Doppelfärbungen mit dem

mAk 2C3 und dem Serum rb101 erlaubten einen direkten Vergleich der Reaktivitäten gegen bestimmte Stadien innerhalb eines mikroskopischen Feldes (nicht gezeigt).

Mit dem Kaninchenserum **rb104** (Abb. 3.3.3, 3.3.4) und dem mAk 3E3 (nicht gezeigt), welche beide das Oberflächenprotein P23 erkennen, konnten auch alle Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Der zeitliche Verlauf folgte dem des mAk 2C3 und des Kaninchenserums rb101.

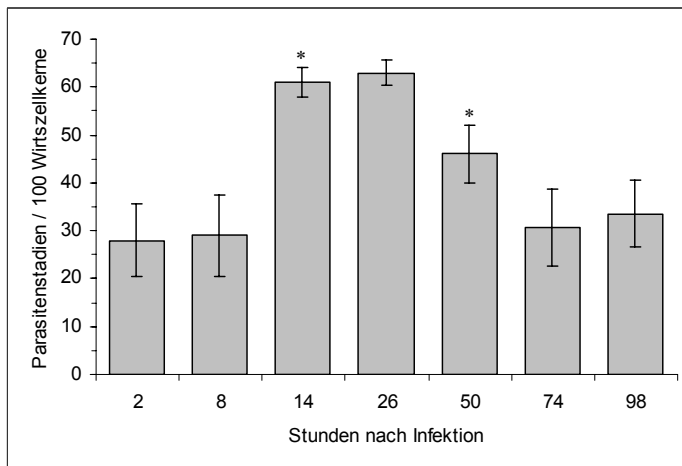


Abb. 3.3.2: Verhältnis intrazellulärer Parasitenstadien zu Wirtszellkernen

2, 8, 14, 26, 50, 74 und 98 Stunden nach der Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten wurden die intrazellulären Stadien in einem indirekten Immunfluoreszenztest mit den mAk 2C3 detektiert und die Wirtszellkerne mit dem Farbstoff Höchst 33258 visualisiert. In jeweils drei Mikroskopfeldern (400fache Vergrößerung) wurden die intrazellulären Stadien und die Wirtszellkerne ausgezählt. Für jeden Zeitpunkt ist die mittlere Anzahl der Parasitenstadien pro 100 Wirtszellkerne angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Mit * sind statistisch signifikante Unterschiede zum vorangehenden Zeitpunkt angegeben ($p < 0,05$).

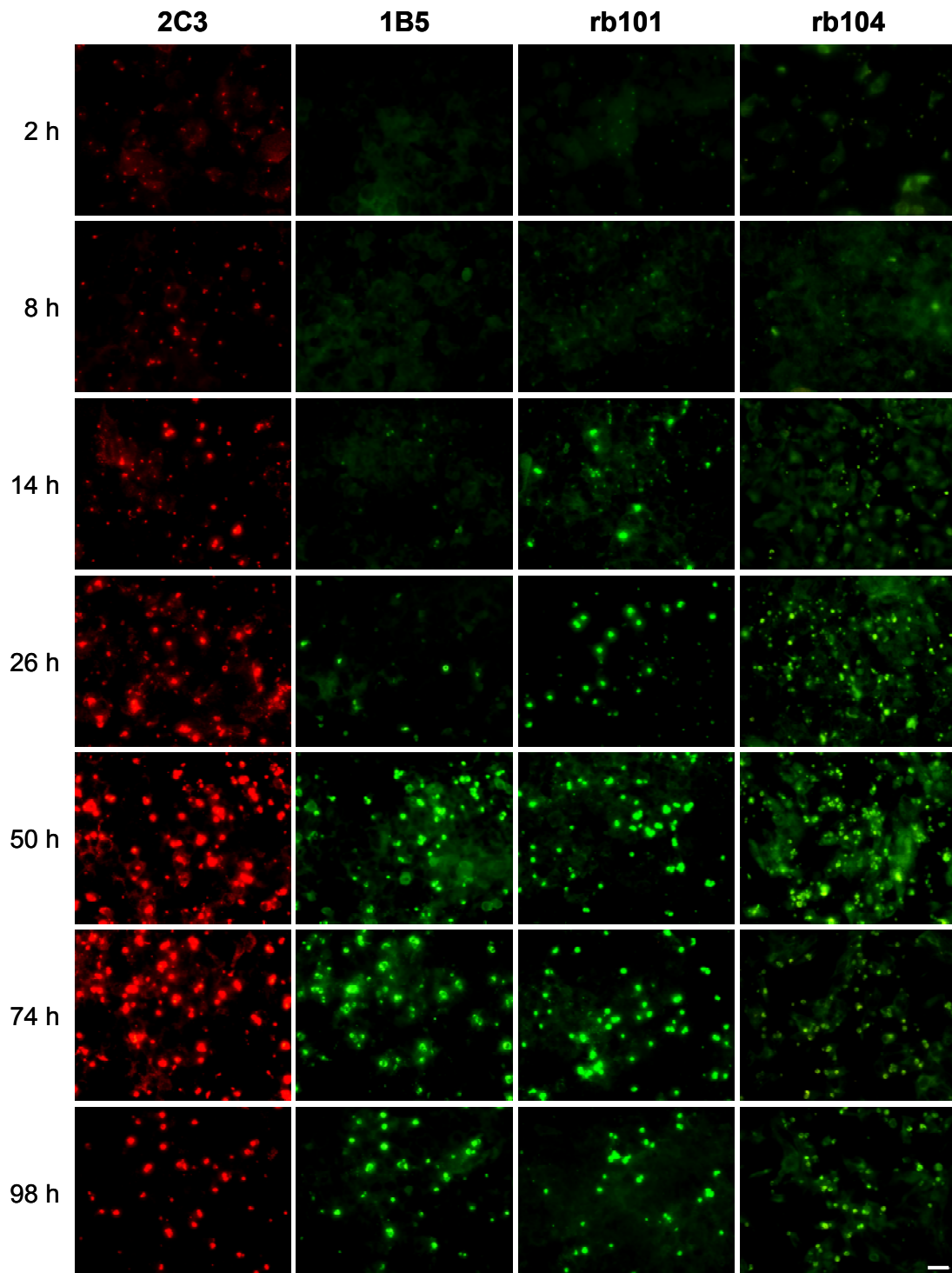


Abb. 3.3.3: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis intrazellulärer *C. parvum*-Stadien in infizierten HCT-8-Zellen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten (2, 8, 14, 26, 50, 74, 98 h p.i.) wurden die intrazellulären Stadien mit den mAk 2C3, 1B5 und den Kaninchenseren rb101 (anti-CP17) bzw. rb104 (anti-P23) detektiert. Die Bindung der spezifischen Antikörper wurde mit AlexaFluor-Farbstoff-gekoppelten Sekundäantikörpern nachgewiesen. Für jeden Zeitpunkt sind repräsentative Ausschnitte der Zellkulturen in einer 400fachen Vergrößerung gezeigt. Die Abbildungen für den Nachweis mit 2C3 und 1B5 zeigen jeweils einem identischen Ausschnitt aus einer Doppelfärbung. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

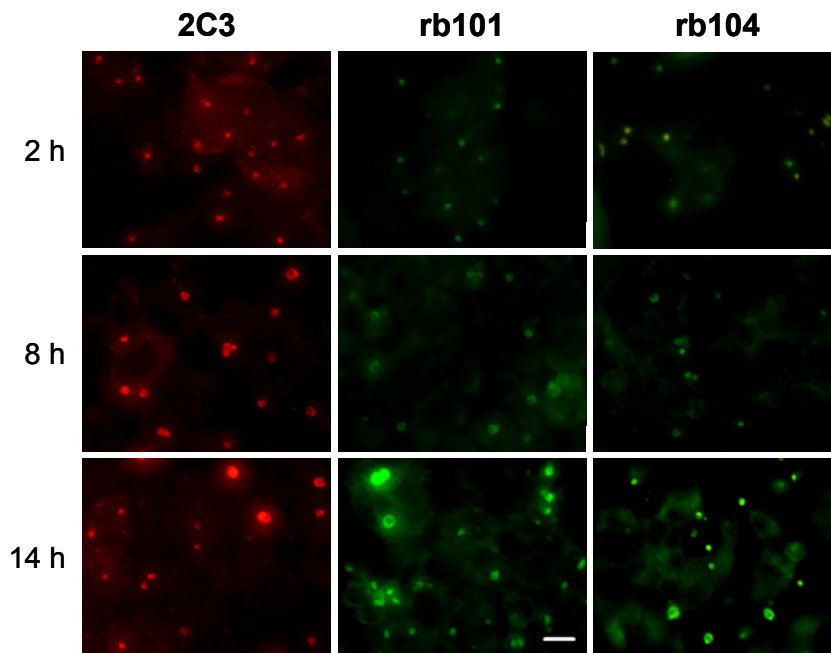


Abb. 3.3.4: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis intrazellulärer *C. parvum*-Stadien in infizierten HCT-8-Zellen zu frühen Zeitpunkten der Kultur

Für die frühen Zeitpunkte der Kultur von mit *C. parvum*-Oozysten infizierten HCT-8-Zellen (2, 8 und 14 h p.i.) sind repräsentative Ausschnitte in einer 1000fachen Vergrößerung gezeigt. Die intrazellulären Stadien wurden mit dem mAk 2C3 und den Kaninchenseren rb101 (anti-CP17) und rb104 (anti-P23) detektiert. Die Bindung der spezifischen Antikörper wurde mit AlexaFluor-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Bereits 2 h p.i. konnten mit allen drei Antikörpern kleine intrazelluläre Trophoziten detektiert werden, die bis 8 h p.i. zwar an Größe, nicht aber in der Anzahl zunahmten. 14 h p.i. kommen weitere, größere intrazelluläre Stadien hinzu. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

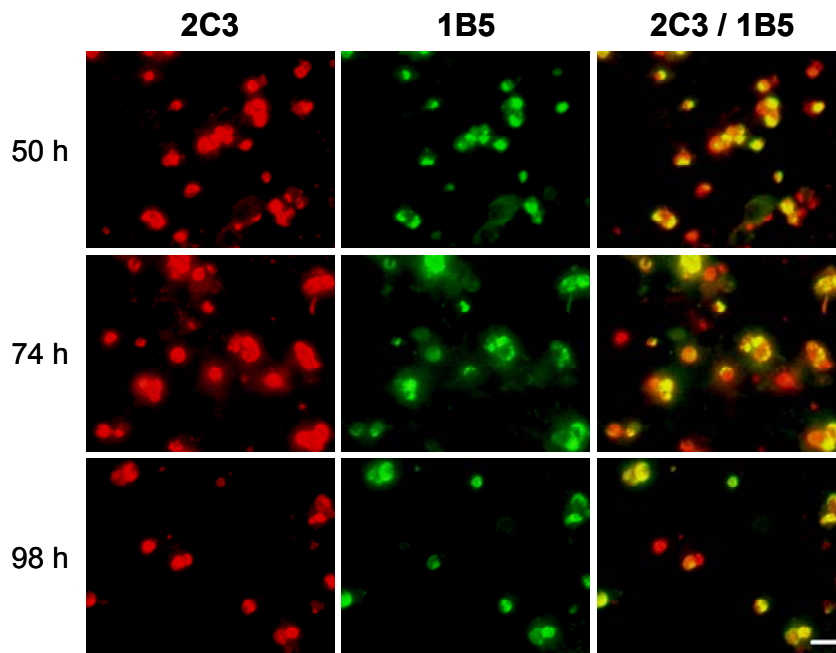


Abb. 3.3.5: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis intrazellulärer *C. parvum*-Stadien in infizierten HCT-8-Zellen zu späten Zeitpunkten der Kultur

Für die späten Zeitpunkte der Kultur von mit *C. parvum*-Oozysten infizierten HCT-8-Zellen (50, 74 und 98 h p.i.) sind repräsentative Ausschnitte in einer 1000fachen Vergrößerung gezeigt. Die intrazellulären Stadien wurden mit den mAk 2C3 und 1B5 in einer Doppelfärbung detektiert. Die Bindung von 2C3 wurde mit einem AlexaFluor 594 (rot)- und von 1B5 mit einem AlexaFluor 488 (grün)-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Rechts ist die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

3.3.3 Nachweis von *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA

Um den Grad der Infektion in einer Zellkultur mittels PCR nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten (2, 8, 14, 26, 50, 74 und 98 h p.i.) die genomische DNA der infizierten Zellen präpariert und in eine *C. parvum*-spezifische PCR eingesetzt (siehe 2.2.1.2). Aus den PCR-Ansätzen mit jeweils 100 ng DNA als Matrize wurden nach 25 und 30 Zyklen Proben entnommen und analysiert (Abb. 3.3.6).

Für die Amplifikation des CP17-Gens wurden die Primer CP17-F und CP17-R verwendet. Parasiten-DNA konnte bereits zwei Stunden nach Zugabe der Oozysten in den HCT-8-Zellen detektiert werden. In der Intensität der Banden zwischen 2 und 8 Stunden p.i. zeigte sich kein Unterschied. Bis 50 Stunden p.i. nahm der Anteil an *C. parvum*-spezifischer DNA im Verhältnis zur Wirtszell-DNA dann kontinuierlich zu. 74 Stunden p.i. blieb die Menge an *C. parvum*-DNA gleich, fiel jedoch bis zum nächsten Zeitpunkt (98 h p.i.)

wieder leicht ab. Eine weitere PCR zur Amplifikation des 18S rRNA-Gens von *C. parvum* folgte exakt dem gleichen zeitlichen Ablauf. Um sicher zu gehen, dass gleiche Mengen an chromosomaler DNA in die PCR-Analysen eingesetzt wurden, wurden Amplifikationen des Wirtszellgens GAPDH durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten war die Produktmenge gleich und nahm mit steigender Zyklenzahl zu. Als Negativkontrolle diente die genomische DNA nicht infizierter HCT-8 Zellen. Es zeigten sich keine unspezifischen Amplifikate mit den hier eingesetzten *C. parvum*-spezifischen Primern (nicht gezeigt).

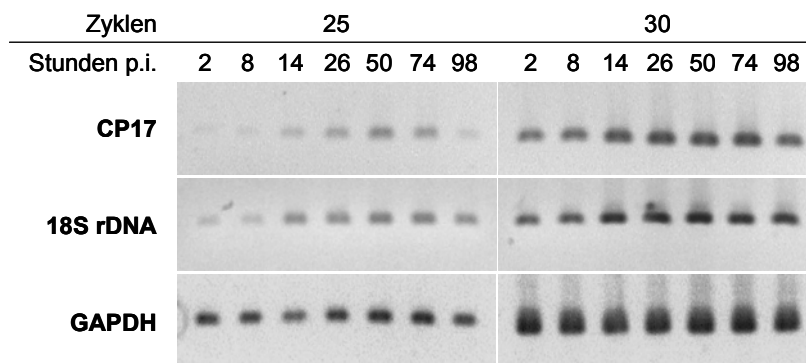


Abb. 3.3.6: Nachweis von *C. parvum*-spezifischer DNA in infizierten HCT-8-Zellen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten (2, 8, 14, 26, 50, 74 und 98 h p.i.) wurde die genomische DNA der infizierten Zellen präpariert. Jeweils 100 ng DNA wurden als Matrize in die PCR zur Amplifikation der *C. parvum*-Gene CP17 und 18S rRNA eingesetzt. Nach 25 und 30 Zyklen wurden Proben entnommen. Die Amplifikation des humanen GAPDH-Gens führte zu allen Zeitpunkten zu vergleichbaren Produktmengen.

3.3.4 Untersuchung zur differentiellen Expression von *C. parvum*-Genen in infizierten HCT-8-Zellen

Mit Hilfe der RT-PCR wurde im Folgenden die differentielle Expression von bereits beschriebenen Parasitengenen, die für die Sporoziten-Oberflächenproteine CP15, CP17, P23 und GP900 und das Oozystenwandprotein COWP (*C. parvum* oocyst wall protein) kodieren, im Verlauf einer viertägigen Kultur von infizierten HCT-8-Zellen charakterisiert. Aus den infizierten Zellen wurde 2, 8, 14, 26, 50, 74 und 98 Stunden *post infectionem* die Gesamt-RNA präpariert und die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation der verschiedenen *C. parvum*-Genprodukte mit den entsprechenden Primern (siehe 2.1.6) wurde als Matrize jeweils 1 µl cDNA, was einer

Menge von 100 ng RNA entsprach, in die PCR eingesetzt (siehe 2.2.1.2). Für einen semiquantitativen Vergleich der PCR-Produkte zwischen den cDNA-Proben verschiedener Zeitpunkte der *in vitro* Kultur wurden aus einem PCR-Ansatz nach 25, 27 und 30 Zyklen Proben entnommen. Die Reaktionen gingen zum Teil bei höheren Zyklenzahlen bereits in die stationäre Phase über. Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde während der RNA-Präparation ein DNase-Verdau durchgeführt. Eine Kontroll-PCR mit 200 ng RNA (ohne reverse Transkription) und den CP15-Primern führte unter denselben PCR-Bedingungen zu keinem Produkt (nicht gezeigt). Jede PCR wurde mindestens zwei Mal mit verschiedenen cDNA-Präparationen für alle Zeitpunkte wiederholt, wobei sich gut reproduzierbare Ergebnisse zeigten. Abbildung 3.3.7 gibt einen Überblick über die Daten zur differentiellen Expression der untersuchten *C. parvum*-Gene.

Unter allen getesteten Genen in dieser Studie zeigte **CP15** die früheste transkriptionelle Aktivität. Geringe Mengen an CP15-cDNA konnten bereits 2 Stunden nach der Zugabe von Parasiten zu den Wirtszellen detektiert werden. Die Intensität der Banden nahm bis 26 Stunden p.i. zu und sank anschließend wieder langsam ab. Bei der Amplifikation der **CP17**-cDNA war erst ab 8 Stunden p.i. ein PCR-Produkt nachweisbar. Im Vergleich zu den anderen Genen konnte hier jedoch zu allen weiteren Zeitpunkten bereits nach 25 Zyklen eine deutlich sichtbare Amplifikation erzielt werden. Es zeigte sich ein Maximum bei 26 und 50 Stunden p.i.. Im weiteren zeitlichen Verlauf konnte eine Abnahme der Bandenstärke bis zum Ende des Experiments beobachtet werden. Die Amplifikation der **P23**-cDNA war zwischen 14 und 50 Stunden nach der Infektion der Zellen am stärksten. Mit zunehmender Anzahl von Zyklen zeigte sich im Gegensatz zu CP17 bereits 2 Stunden p.i. eine geringe Menge an P23-cDNA. Diese stieg zwischen 8 und 14 Stunden p.i. dann sehr rapide an. Die Produktmengen waren zwischen 14 und 50 Stunden p.i. vergleichbar stark und 74 und 98 Stunden p.i. wieder deutlich niedriger. Die Amplifikation der **GP900**-cDNA gelang nur in einem sehr engen Zeitfenster. Auch nach 30 Zyklen konnten 2 und 8 Stunden p.i. keine Produkte nachgewiesen werden. Erst 14 Stunden p.i. zeigte sich eine sehr starke Bande, die anschließend wieder ziemlich rasch abnahm. 74 Stunden p.i. war nach 30 Zyklen nur noch sehr wenig Produkt zu sehen. cDNA des **COWP**-Gens, welches für ein Oozystenwandprotein kodiert, konnte erst zu einem recht späten Zeitpunkt (50 h p.i.) der Kultur amplifiziert werden. Bis 74 Stunden p.i. sank die Produktmenge dann wieder stark ab. 98 h p.i. war keine cDNA mehr nachweisbar. Das COWP-Gen zeigte damit das zeitlich am meisten begrenzte Expressionsmuster von allen untersuchten

Parasitengen.

Als Indikator der gesamten transkriptionellen Aktivität von *C. parvum* im zeitlichen Verlauf der *in vitro* Kultur wurden die cDNA des 18S rRNA-Gens amplifiziert. Es zeigte sich ein Anstieg zwischen 2 und 8 Stunden p.i., eine vergleichbare Produktmenge zwischen 8 und 26 Stunden p.i. und anschließend einen kontinuierlichen Abfall. Die Amplifikation des Wirtszellgen transcripts GAPDH war über den gesamten untersuchten Zeitraum der Kultur konstant, was die exakte Quantifizierung und die Qualität der cDNA-Präparationen zu jedem Zeitpunkt bestätigte.

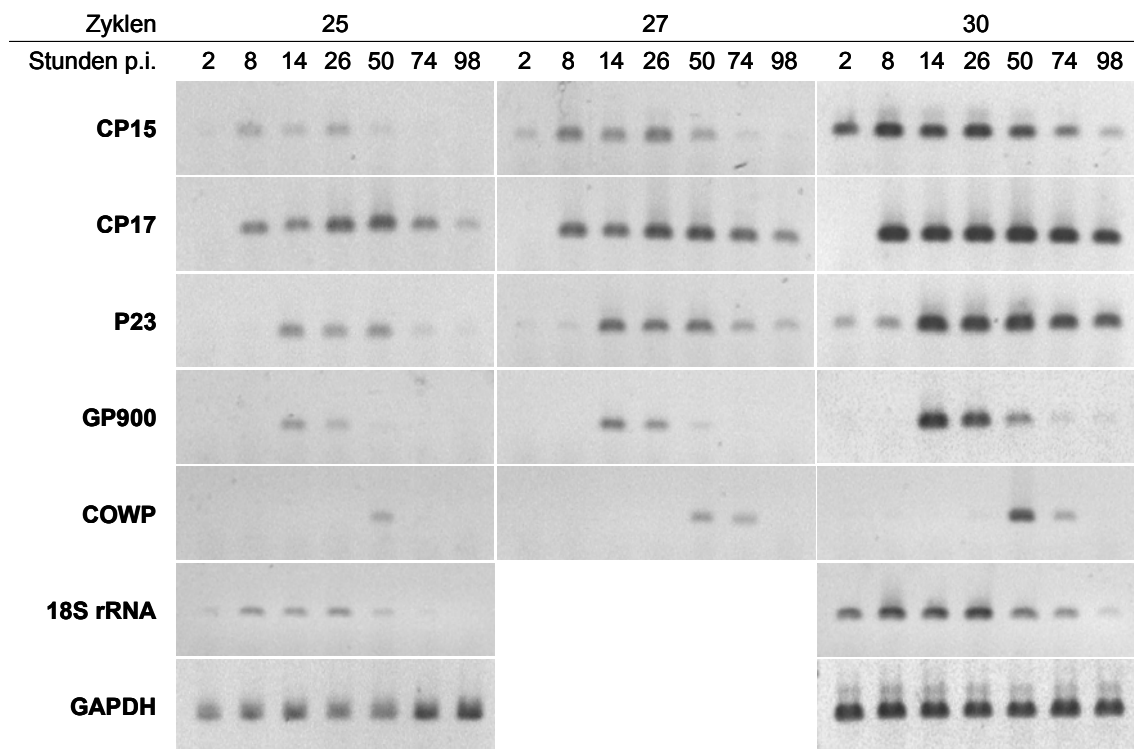


Abb. 3.3.7: Differentielle Expression von *C. parvum*-Genen in infizierten HCT-8-Zellen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum*-Oozysten (2, 8, 14, 26, 50, 74 und 98 h p.i.) wurde die Gesamt-RNA der infizierten Zellen präpariert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1 µl cDNA (= 100 ng RNA) wurden als Matrize in die PCR zur Amplifikation der *C. parvum*-Genprodukte CP15, CP17, P23, GP900, COWP und 18S rRNA eingesetzt. Nach 25, 27 und 30 Zyklen wurden Proben entnommen. Die Amplifikation des humanen GAPDH-Gens führte zu allen Zeitpunkten zu vergleichbaren Produktmengen.

Da sich die Produktmengen nach Amplifikation der verschiedenen Parasiten-mRNAs mit Hilfe der RT-PCR in infizierten Wirtszellen erheblich zwischen den einzelnen untersuchten Genen und auch im zeitlichen Verlauf der intrazellulären Entwicklung unterschieden, wurden die mRNA-Mengen mit denen in RNA-Präparationen von frisch exzystierten Oozysten verglichen (Abb. 3.3.8). Hierfür wurden Oozysten ohne den Zusatz von Natrium-Taurocholat für zwei Stunden exzystiert (siehe 2.3.4) und die Gesamt-RNA aus dem Exzystierungsmix, der sowohl Sporozoiten als auch intakte, nicht exzystierte Oozysten enthielt, präpariert. Da der größte Anteil der von den infizierten Kulturen extrahierten RNA von den Wirtszellen stammte, wurde in der PCR zunächst nur ein Hundertstel der Menge an Sporozoiten-cDNA verwendet. Auch hier zeigte sich nur für P23 und CP15 ein Produkt. Im Unterschied zu den intrazellulären Stadien 2 Stunden p.i. erhielt man bei den Sporozoiten bei der Amplifikation der P23-cDNA jedoch ein wesentlich stärkeres Produkt als bei der CP15-cDNA. Erst wenn eine zehnfach höhere Konzentration Sporozoiten-cDNA eingesetzt wurde, waren zusätzlich zu P23 und CP15 auch Amplifikationsprodukte von CP17 und GP900 nachweisbar. In keinem Fall konnte COWP-cDNA detektiert werden.

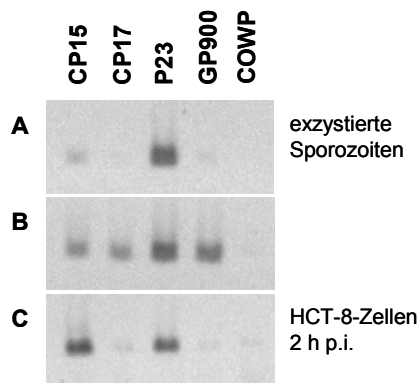


Abb. 3.3.8: Transkriptionelle Aktivität von *C. parvum*-Genen in frisch exzystierten Sporozoiten und frühen intrazellulären Stadien

Aus frisch exzystierten Sporozoiten bzw. aus HCT-8-Zellen 2 Stunden nach einer Infektion mit *C. parvum*-Oozysten wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Von der Sporozoiten-cDNA wurde eine Menge äquivalent zu 1 ng [A] bzw. 10 ng [B] Gesamt-RNA und von der cDNA der infizierten HCT-8-Zellen 1 μ l (= 100 ng RNA) [C] in die PCR zur Amplifikation der *C. parvum*-Gene CP15, CP17, P23, GP900 und COWP eingesetzt. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Infektion von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen mit *Cryptosporidium parvum*

Kryptosporidien lösen eine Immunantwort aus, die die Produktion von Zytokinen, die Aktivierung von T-Helferzellen und die Ausbildung systemischer und mukosaler Antikörper beinhaltet und die im immunkompetenten Wirt eine Infektion innerhalb eines kurzen Zeitraumes klären kann (McDonald et al., 2000). Bei Mäusen sind vor allem CD4⁺-T-Helferzellen sowie die Zytokine Interferon- γ und Interleukin-12 essentiell für eine Resistenz vor einer Infektion mit dem Parasiten. Im Rahmen der Arbeit konnten IL-12 p40 (IL12KO)- und IFN- γ (GKO)-Knockout-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus als Infektionsmodelle etabliert werden. Beide Knockout-Mausstämme sind suszeptibel für eine Infektion mit dem Parasiten und scheiden als Folge Oozysten mit dem Stuhl aus (Campbell et al., 2002; Theodos et al., 1997).

Die Rolle von IFN- γ bzw. IL-12 bei der Überwindung einer Infektion ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Für GKO-Mäuse auf dem C57BL/6-Hintergrund wurden zwar schwere bis letale Verläufe beschrieben (Theodos et al., 1997; Griffiths et al., 1998), infiziert man jedoch Mäuse mit demselben Immundefekt mit dem genetischen Hintergrund der BALB/c-Maus, können diese sich ohne weiteres von einer Infektion erholen (Mead & You, 1998; Smith et al., 2000). Auch IL12KO-Mäuse überwinden eine Infektion, wobei BALB/c-IL12KO eine sehr viel schwächere Infektion zeigen als C57BL/6-IL12KO (Campbell et al., 2002). Dies suggeriert, dass es Mechanismen geben muss, die unabhängig von IFN- γ und IL-12 zu einer schützenden Immunantwort führen und die abhängig vom genetischen Hintergrund in BALB/c-Mäusen scheinbar verstärkt ausgebildet werden können.

In den in der Literatur beschriebenen Infektionsstudien wurden die beiden Infektionsmodelle, C57BL/6-GKO und C57BL/6-IL12KO, bisher nie parallel untersucht. Infektionen wurden darüber hinaus meist mit unterschiedlichen *C. parvum*-Isolaten und Infektionsdosen durchgeführt und auch die Charakterisierung der Verläufe und der Nachweis ausgeschiedener Oozysten wurden häufig unterschiedlich vollzogen. Diese mangelnde Vergleichbarkeit der Studien an denselben aber auch an verschiedenen Knockout-Mausstämmen erschwert die Interpretation der Funktion der Zytokine.

GKO- und IL12KO-Mäuse wurden hier zum ersten Mal unter denselben Bedingungen mit

derselben Infektionsdosis von 1×10^6 Oozysten desselben *C. parvum*-Isolats (Stamm IOWA) infiziert, wodurch die Infektionsverläufe direkt miteinander verglichen werden konnten. Als Parameter dienten die Parasitenausscheidung mit dem Stuhl, die Nachweisbarkeit intrazellulärer Stadien im Ileum und die Ausbildung einer spezifischen humoralen Immunantwort in Form von Parasiten-reaktiven Antikörpern. Es sollte gezeigt werden, ob und inwieweit sich die Infektion bei den beiden Infektionsmodellen von einander unterscheidet, um weitere Rückschlüsse auf die Funktion der beiden T_H1 -Zytokine IFN- γ und IL-12 im zeitlichen Ablauf bei einer Infektion und bei deren Überwindung ziehen zu können.

4.1.1 Infektionsverlauf nach Infektion

Es dauert circa drei Tage bis der Entwicklungszyklus im Dünndarm einmal vollständig durchlaufen ist und es zur Bildung von Oozysten kommt. Dies korrelierte bei beiden hier untersuchten Knockout-Mausstämmen sehr gut mit dem ersten Nachweis von wenigen Oozysten in den Stuhlausstrichen drei Tage nach dem Setzen der Infektion. An Tag 4 stieg die Parasitenausscheidung dann deutlich an und sank nach unterschiedlichem Verlauf bei den beiden Mausstämmen nach circa zwei Wochen wieder unter die Nachweisgrenze (Abb. 3.1.3). Die Mäuse zeigten damit die in der Literatur postulierte Suszeptibilität für eine *C. parvum*-Infektion (Campbell et al., 2002; Theodos et al., 1997). Jedoch konnten die bei C57BL/6-GKO von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen schweren Erkrankungen, die in vielen Fällen zu chronischen Verläufen und letztendlich innerhalb von zwei bis vier Wochen zum Tod führten (Theodos et al., 1997; Griffiths et al., 1998; Mead & You, 1998; Smith et al., 2000), nicht beobachtet werden. In unseren Händen überwand neben den IL12KO auch die GKO ohne weitere Krankheitssymptome wie struppiges Fell oder starken Gewichtsverlust Infektionen sowohl mit 1×10^6 als auch mit 1×10^7 *C. parvum*-Oozysten innerhalb von 14 Tagen.

Unterschiede in der Ausprägung einer Infektion können generell durch mehrere Faktoren bedingt sein. So haben neben dem genetischen Hintergrund der Defektmäuse, dem verwendeten Parasitenisolat und dem Inokulum auch das Alter der Mäuse (Novak & Sterling, 1991), die Haltungsbedingungen, der Hygienestatus und die mikrobielle Darmflora (Harp et al., 1988) einen Einfluss auf ihren Verlauf. In einer Studie von Okhuysen et al. (2002) wurden Unterschiede in der Infektiösität verschiedener *C. parvum*-

Isolate bei GKO-Mäusen gezeigt. Alle GKO, die mit dem GCH-1-Isolat infiziert wurden, überlebten im untersuchten Zeitraum. Im Gegensatz dazu unterlagen 50 % der Mäuse einer Infektion mit dem Moredun-Isolat. Außerdem konnte eine Infektionsdosis-abhängige und Isolat-spezifische Höhe der Parasitenausscheidung und Ausprägung der Infektion beobachtet werden. Die in der Literatur beschriebenen chronischen bis letalen Verläufe wurden jedoch sowohl nach Infektionen mit dem GCH-1- (Theodos et al., 1997; Griffiths et al., 1998), dem CpINRA/PRZ- (Lacroix et al., 2001) als auch mit dem hier verwendeten IOWA-Isolat (Mead & You, 1998; Smith et al., 2000) verzeichnet. Mead et al. (1998) erzielten mit einer Infektionsdosis von 1×10^5 Oozysten, Smith et al. (2000) sogar mit nur 100 Oozysten schwere Infektionen, die innerhalb von sieben bis zehn Tagen p.i. zum Versterben der Mäuse führten. Aber auch die Oozysten-Vitalität und die Exzystierungsrate können bei einem so suszeptiblen Infektionsmodell einen großen Einfluss haben.

Der Infektionsverlauf der IL12KO war mit den in der Literatur beschriebenen vergleichbar. Die Mäuse überwandten wie auch bei Campbell et al. (2002) und Ehigiator et al. (2003) eine *C. parvum*-Infektion in einem Zeitraum von zwei Wochen. Mit Infektionsdosen von 1×10^2 bis 1×10^6 Oozysten des IOWA-Isolats zeigten sich in den beiden erwähnten Studien auch Dosis-abhängige Ausprägungen. Je höher das Inokulum desto früher setzte der Beginn einer Infektion ein und desto früher stieg die Ausscheidung auf ihren Maximalwert. Nach einer Infektion mit 1×10^6 Oozysten war dieser hier ebenfalls an den Tagen 4 bis 6 p.i. erreicht. Die Anzahl der Oozysten im Stuhl sank bei allen IL12KO zum selben Zeitpunkt sehr deutlich wieder ab. Auch mit den von uns durchgeführten Infektionen mit 1×10^7 Oozysten konnte keine verlängerte Ausscheidung gezeigt werden (Abb. 3.1.5). Insgesamt wurde der Rückgang der Parasitenausscheidung jedoch viel früher beobachtet (Abb. 3.1.3). Dies könnte darauf hinweisen, dass ebenso wie bei den GKO auch bei den IL12KO schwächere Infektionen induziert wurden. Ein Vergleich aufgrund der Höhe der Parasitenausscheidung ist letztendlich jedoch sehr schwierig, da hier ein anderes Nachweisverfahren verwendet wurde als in den anderen Infektionsstudien mit C57BL/6-IL12KO-Mäusen. Je nach Methode unterscheidet sich die Nachweisgrenze und auch der Bezug auf eine bestimmte Probenmenge differiert.

In der Literatur wurden die Oozysten in den Stuhlproben der infizierten Knockout-Mäuse zum Teil mit verschiedenen Färbemethoden in Stuhlausstrichen dargestellt (Theodos et al., 1997; Griffiths et al., 1998), wobei hier die Anzahl der Oozysten zum einen bezogen auf mikroskopische Felder und zum anderen auf eine definierte Stuhlmenge angegeben wurde. Meistens jedoch erfolgte die Bestimmung der Parasitenanzahl mit Hilfe der

Durchflusszytometrie und einem Oozysten-spezifischen Fluoreszenzantikörper nach Arrowood et al. (1995), welche postulieren, dass diese Methode 10fach sensitiver beim Nachweis von Oozysten in Stühlen chronisch infizierter Mäuse ist als die Immunfluoreszenz. Hierbei wurde die Anzahl der Oozysten immer bezogen auf 100 µl Stuhl angegeben (Mead & You, 1998; Smith et al., 2000; Campbell et al., 2002; Ehigiator et al., 2003).

In Vorversuchen wurde die Darstellung der Oozysten zunächst mit der modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung in Stuhlausstrichen vollzogen. Um die Auszählung vieler Proben zu vereinfachen, wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest etabliert, bei dem ein in einem Kaninchen generiertes Antiserum gegen Oozysten zum Einsatz kam (Abb. 3.1.2). Dies erleichterte die Auswertung und die Auszählung der Oozysten durch deren schnellere Erkennbarkeit (Petry, 2000; Kehl et al., 1995). Um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Durchflusszytometrie-Daten der Literatur zu bekommen, wird im Folgenden versucht, die mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelten Oozystenanzahlen in 100 mikroskopischen Feldern auf eine Stuhlmenge von 100 µl hochzurechnen. Die festen Bestandteile eingeweicher Stuhlpellets wurden 1:10 verdünnt. Davon wurden 5 µl auf die Felder eines Adcell-Objektträgers ausgestrichen, welche einen Durchmesser von 0,5 cm besitzen (Fläche ~20 mm²). Das Feld einer 1000fachen Vergrößerung umfasst an dem benutzten Mikroskop circa 0,04 mm². Damit müsste man die gezählten Oozysten mit dem Faktor 10³ multiplizieren, um eine ungefähre Vorstellung von der Anzahl der Oozysten in 100 µl Stuhlprobe zu erhalten. GKO-Mäuse schieden damit an Tag 8 hochgerechnet 1,12x10⁵ Oozysten, IL12KO an den Tagen 4 bis 6 durchschnittlich 6,1x10⁴ Oozysten mit 100 µl Fäzes aus. Die gemessene Ausscheidungsrate bei den C57BL/6-IL12KO läge damit deutlich über der von Ehigiator et al. (2003), die nach Infektion desselben Mausstamms mit demselben Parasitenisolat und derselbe Infektionsdosis eine durchschnittliche Ausscheidung von circa 4000 Oozysten an Tag 5 p.i. in 100 µl Stuhlprobe maßen. Solche Hochrechnungen sind generell jedoch recht gewagt. Eine Anzahl von nur einer Oozyste in 100 mikroskopischen Feldern würde demnach 1000 Oozysten in 100 µl Stuhl entsprechen. Campbell et al. (2002) zeigten jedoch eine maximale Ausscheidung von nur 30-40 Oozysten in 100 µl Stuhl bei C57BL/6-Wildtypmäusen an Tag 4 nach Infektion mit 1x10⁶ IOWA-Oozysten und 10000 Oozysten bei C57BL/6-IL12KO an Tag 8 nach Infektion mit nur 100 Oozysten. Bei den beiden eben erwähnten Studien wird noch einmal deutlich, wie unterschiedlich die Ausscheidung *post infectionem* trotz ähnlicher Infektionsparameter ausfallen kann.

Ein weiterer Faktor, der die Interpretation von Infektionsversuchen erschwert, ist die große Schwankungsbreite in der Ausscheidung einzelner Mäuse innerhalb einer Versuchsgruppe (siehe z.B. auch Smith et al., 2001a, und Mead & You, 1998). Trotz desselben genetischen Hintergrunds darf man die individuelle Reaktion der Mäuse auf eine Infektion nicht unterschätzen. Auch wurden Stuhlproben immer nur zu einem Zeitpunkt des Tages gesammelt. Es ist jedoch zu erwarten, dass über den Tag gesehen Varianzen in der Parasitenausscheidung auftreten. Um diesen Schwankungen innerhalb des Systems gerecht zu werden, wurde die Ausscheidung zunächst für jede Maus einzeln bestimmt und anschließend der Mittelwert einer Gruppe von vier Mäusen gebildet. Angegeben wurden zusätzlich jeweils die minimalen und maximalen Werte der Oozystenausscheidung innerhalb einer Gruppe bzw. der Mittelwerte der in die Auswertung einfließenden Gruppen, um im Vergleich zur Standardabweichung einen besseren Eindruck von der tatsächlichen Situation zu vermitteln. Nach 14 unabhängigen Versuchsreihen bei GKO und 12 bei IL12KO, wobei Mäuse beider Knockout-Mausstämme in der Regel zum selben Zeitpunkt mit derselben Präparation an Oozysten infiziert wurden, konnten die im Infektionsverlauf gefundenen Unterschiede als statistisch signifikant beurteilt werden.

Unterschiede im Infektionsverlauf bei GKO- und IL12KO-Mäusen

Mäuse beider Knockout-Mausstämme waren in der Lage, eine Infektion innerhalb von zwei Wochen zu überwinden. Es scheint also möglich, dass nicht nur BALB/c-, sondern auch C57BL/6-Knockout-Mäuse im Zuge einer ersten Infektion eine protektive Immunantwort unabhängig der T_H1 -Zytokine IFN- γ und IL-12 aufbauen können. Die GKO-Mäuse zeigten jedoch in den hier durchgeführten Infektionsversuchen wie erwartet eine sehr viel stärkere Infektion als die IL12KO-Mäuse. Es konnte eine höhere und auch längere Parasitenausscheidung mit dem Stuhl nachgewiesen werden (Abb. 3.1.3). Bei den GKO waren Oozysten vereinzelt noch bis Tag 15 bei den IL12KO hingegen nur bis Tag 10 zu detektieren. Über den beobachteten Zeitraum hinweg schieden die GKO doppelt soviel Oozysten aus. Auch die HE-Färbung von Ileumschnitten fünf Tage p.i. wies auf eine deutlich höhere Anzahl intrazellulärer Stadien in den Epithelzellen hin (Abb. 3.1.6). Des Weiteren spiegelte sich die stärkere und längere Auseinandersetzung der GKO mit dem Parasiten auch auf Ebene der Antikörperantwort wider. Darauf wird jedoch später genauer eingegangen (siehe 4.1.2).

Auch der Infektionsverlauf unterschied sich bei den beiden Knockout-Mausstämmen deutlich. Wohingegen die IL12KO an den Tagen 4 bis 6 p.i. vergleichbar hohe

Parasitenausscheidungen aufwiesen, die anschließend kontinuierlich absanken, zeigten die GKO einen sehr eigenen, alternierenden Verlauf mit Spitzen an den Tagen 4, 6 und 8 p.i.. Dieser konnte beobachtet werden, da hier im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen Infektionsversuchen die Ausscheidungsrate in einem wesentlich engmaschigeren Zeitfenster betrachtet wurde. Wohingegen üblicherweise Stuhlproben nur alle zwei bis drei Tage gewonnen wurden, erfolgte hier die Bestimmung der Oozystenausscheidung bis Tag 10 täglich. Auch bei der Infektion von C57BL/6-GKO mit 100 IOWA-Oozysten von Smith et al. (2001a) zeigte sich an Tag 7 p.i. ein deutlicher Rückgang und an Tag 8 p.i. ein verstärkter Anstieg der Oozystenausscheidung. Es wurden jedoch zwischen Tag 3 und 6 keine Proben gesammelt und auch nicht über Tag 8 hinaus. Mead & You (1998) dagegen zeigten nach Infektion von C57BL/6-GKO mit 1×10^5 Oozysten (IOWA) bei täglicher Bestimmung der Ausscheidung ab Tag 4 einen kontinuierlichen Anstieg der Oozysten auf durchschnittlich 36081 Oozysten in 100 μ l Fäzes. Ob der alternierende Verlauf, das heißt der Einbruch in der Anzahl ausgeschiedener Oozysten an den Tagen 5 und 7, mit dem Fehlen von IFN- γ oder der Parasitenentwicklung im allgemeinen in Zusammenhang steht, bleibt zu untersuchen. Bei den IL12KO konnte bei manchen Gruppen auch ein kurzzeitiger Rückgang in der Parasitenausscheidung beobachtet werden, dann jedoch immer nur an Tag 5 p.i. (z.B. Abb. 3.1.5 B, 3.2.8 B).

Bei einer ersten Konfrontation mit dem Parasiten hatte das Fehlen von IL-12 in den ersten sieben Tagen eine ebenso große Bedeutung wie das Fehlen von IFN- γ . Statistisch zeigten sich keine Unterschiede in der Ausscheidung der beiden Knockout-Mausstämme an den Tagen 3 bis 7 p.i. Wohingegen bei den IL12KO ab diesem Zeitpunkt vermutlich IL-12-unabhängige Mechanismen zur Überwindung der Infektion griffen und die Anzahl der Oozysten in den Stuhlproben rapide zurückging, wirkte sich das Fehlen von IFN- γ jetzt noch einmal verstärkt aus. Bei den GKO stieg die Ausscheidung an Tag 8 sehr deutlich auf Maximalwerte an, um erst dann und vor allem deutlich langsamer zu sinken. Die GKO schieden an den Tagen 8 bis 10 statistisch signifikant mehr Oozysten aus als die IL12KO (Abb. 3.1.3).

Die Fähigkeit der IL12KO eine Infektion vollständig zu überwinden, kann dahingehen interpretiert werden, dass es einen alternativen, IL-12-unabhängigen, jedoch zeitverzögerten Weg gibt, die Expression von IFN- γ zu induzieren. Campbell et al. (2002) maßen nach Stimulation von Splenozyten infizierter C57BL/6-IL12KO signifikante Mengen an IFN- γ . Ehigiator et al. (2005) zeigten nach Infektion mit 1×10^4 Oozysten

(IOWA) eine Erhöhung in der IFN- γ -Expression an Tag 3 und deren Maximum an Tag 7, welches mit dem Ausscheidungshöhepunkt zusammenfiel.

Auch wenn die Suszeptibilität der Mäuse unter anderem auf ein anfänglich zu niedriges Niveau an IFN- γ zurückzuführen ist, könnte der unterschiedliche Verlauf bei den beiden Knockout-Mausstämmen, und hier vor allem die höhere Ausscheidung der IL12KO an Tag 5 p.i. ($p = 0,075$), auch auf eine weitere, über die der IFN- γ -Induktion hinausgehende Funktion von IL-12 hinweisen. IL-12-mRNA war in Milzzellen von infizierten BALB/c-GKO aber nicht von C57BL/6-GKO erhöht, was eine direkte Rolle von IL-12 bei der Überwindung suggeriert (Smith et al., 2001a). In ersten weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von IL12KO-Mäusen mit monoklonalen Antikörper gegen IFN- γ (XMG 1.2.3) zu einer verstärkten Oozystenausscheidung im Vergleich zu GKO-Mäusen führt (unpublizierte Daten). Ein Verlust beider T_H1-Zytokine hatte demnach einen stärkeren Einfluss auf den Verlauf einer Infektion als der von nur einem der Zytokine.

Für das funktionelle IL-12 ist eine Heterodimerisierung zweier Proteine, p35 und p40, notwendig. Mit dem p40-Defekt sind die hier eingesetzten IL12KO-Mäuse auch defizient für IL-23, welches ein Heterodimer aus p40 und p19 darstellt. IL-12 und IL-23 sind beides Schlüsselzytokine für die IFN- γ -Produktion (Oppmann et al., 2000). IL-27, welches auch zur IL-12-Familie gehört, ist aus den Untereinheiten EB13 und p28 zusammengesetzt und verstärkt eine IL-12-induzierte IFN- γ -Produktion (Pflanz et al., 2002). Die drei Zytokine zeigen im Hinblick auf die Induktion einer T_H1-Antwort zwar einige funktionelle Überlappungen, generell ist ihre Wirkung jedoch nicht als redundant sondern als sequentiell und zum Teil synergistisch zu betrachten. Sie zeigen eine einzigartige Funktion zu bestimmten Zeitpunkten während der Entwicklung einer Pathogen-induzierten Immunantwort (Pflanz et al., 2002; Brombacher et al., 2003; Trinchieri et al., 2003; Trinchieri, 2003). Literaturdaten zeigen, dass eine Deletion des p40-Gens im Vergleich zu p35-Mutanten einen stärker ausgeprägten Phänotyp zu Folge hat (Cooper et al., 2002; Kleinschek et al., 2006). IL-23 kann die Resistenz gegen eine Toxoplasmose bei fehlendem IL-12 erhöhen, auch wenn es keine Rolle im Aufbau einer schützenden Immunität spielt (Lieberman et al., 2004). Es konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, dass p35-Knockout-Mäuse mehr IFN- γ produzieren als p40-Knockout-Mäuse. Bei Infektionen mit *Leishmania major* zeigte sich dagegen keine Unterschied zwischen der p40- und der p35-Knockout-Maus (Park et al., 2002). Ehigiator et al. (2005) haben die

Infektion von IL-12 p40- und IL-12 p35-Knockout-Mäuse mit *C. parvum* verglichen. Nach einer Konfrontation mit 1×10^4 Oozysten zeigten beide Knockout-Mausstämme kaum einen Unterschied in der Parasitenausscheidung, was darauf schließen lässt, dass die Suszeptibilität der IL12KO eher auf das Fehlen von IL-12 als von IL-23 zurückzuführen ist. Für IL-27 wurde gezeigt, dass es essentiell bei der Induktion einer adäquaten T_H1 -Antwort im Rahmen einer *Leishmanien*-Infektion ist (Zahn et al., 2005). In weiteren, hier nicht gezeigten Versuchsreihen, wurden erste Infektionen mit *C. parvum* an EB13-Knockout-Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich eine mit den Wildtypmäusen vergleichbare Infektion. IL-27 scheint daher im Rahmen der Immunantwort bei einer *C. parvum*-Infektion, ebenso wie IL-23, eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Bei GKO-Mäusen könnte die Ausbildung der adaptiven Immunabwehr zur Reduktion der Oozystenausscheidung unter die Nachweisgrenze notwendig sein. Vielleicht wird hier von vorneherein auch ein anderer Weg der Immunantwort eingeschlagen. Die Gabe von rekombinantem IL-12 einen Tag vor der Infektion zeigte keinen Einfluss auf die Oozystenausscheidung bei GKO-Mäusen. Wurde rIL-12 weitere sieben Tage täglich verabreicht, verkürzte sich die Überlebenszeit der C57BL/6-GKO und BALB/c-GKO konnten eine Infektion nicht überwinden (Smith et al., 2001a). Die Resistenz vor und die Überwindung einer Infektion setzt möglicherweise eine genaue Balance in der Menge und dem Timing von T_H1 - and T_H2 -Zytokinen voraus. Eine Analyse der Zytokinantwort im direkten Vergleich der beiden Mausstämme könnte Aufschluss geben. Eventuell zeigt sich bei Mäusen mit einem Defekt in der T_H1 -Antwort eine verstärkte Expression von T_H2 -Zytokinen. Fünf Tage nach einer Infektion konnten in ersten Vorversuchen bei GKO und IL12KO eine verstärkte Amplifikation von IL-4-mRNA beobachtet werden (Abb. 3.1.20). Ehigiator et al. (2005) zeigten für C57BL/6-IL12KO eine erhöhte mRNA-Expression von IL-4, IL-15, TGF- β und TNF- α früh nach der Infektion (Tag 3). Smith et al. (2000) konnten bei C57BL/6-GKO zwar keine Hochregulation von IL-4, aber von IL-5 zeigen. Lacroix et al. (2001) hingegen wiesen im Ileum von adulten GKO die Hochregulation einer Vielzahl von Zytokinen nach, einschließlich IL-4 und IL-10, wobei die Expression nicht höher ausfiel als bei neonatalen C57BL/6-Wildtypmäusen. Bei diesen Studien wurden aber wiederum jeweils unterschiedliche Parasitenisolate und Infektionsdosen verwendet.

4.1.2 Antikörperantwort nach Infektion

4.1.2.1 Parasitenlysatspezifische Antikörper

Antikörper können als Indikatoren einer stattgefundenen Infektion angesehen werden, ihr Beitrag bei der Überwindung einer Infektion und der Resistenzentwicklung ist jedoch nach wie vor unklar. Neben dem Parasitennachweis wurden erstmals auch serologische Untersuchungen im Anschluss an eine Infektion von IL12KO und GKO durchgeführt. Die Unterschiede in der Auseinandersetzung der beiden Knockout-Mausstämme mit dem Parasiten spiegelten sich nicht nur in der Parasitenausscheidung, der Nachweisbarkeit im Ileum und dem Infektionsverlauf sondern auch auf Ebene der induzierten Antikörperantwort wider. Sowohl die Höhe der Antikörpertiter als auch deren Verhalten im zeitlichen Verlauf nach einer Infektion waren charakteristisch für den jeweiligen Knockout-Mausstamm. Bei allen infizierten Mäusen konnten vier Wochen *post infectionem* spezifisches IgG und bis auf wenige IL12KO auch spezifisches IgA im Serum nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die GKO-Mäuse jedoch durchschnittlich um 1-2 Titrationsstufen höhere Antikörpertiter (Abb. 3.1.9). Wohingegen die Titer bei den IL12KO bis neun und noch weiter bis vierzehn Wochen nach Infektion statistisch signifikant wieder bis an die Nachweisgrenze sanken, blieben sie bei den GKO durchschnittlich auch noch bis drei Monate p.i. auf dem gleichen hohen Niveau. Dies unterstützt die Theorie, dass IL12KO insgesamt schwächere Infektionen erleiden und in der Lage sind, den Parasiten innerhalb von zwei Wochen vollständig zu eliminieren. GKO müssen sich dagegen sehr viel stärker mit dem Parasiten auseinandersetzen. Es bleibt auch in unseren Infektionsstudien sehr wahrscheinlich eine persistierende, jedoch subklinische Infektion bestehen. Dies soll in Zukunft mit Hilfe der sensitiven Real-Time PCR überprüft werden.

Nicht nur bei der Parasitenausscheidung, sondern auch bei der Antikörperantwort zeigten sich große Schwankungen bezüglich der Antikörpertiter im Serum der einzelnen Mäuse eines Mausstamms. Es konnte keine direkte Korrelation bezüglich der Anzahl der Oozysten im Stuhl und der Höhe der Serumtiter bei den Mäusen ausgemacht werden, auch wenn die Parasitenausscheidung mit dem Stuhl generell als Maß für den Grad einer Infektion genommen wird. Es ist jedoch zu bedenken, dass Serumproben erst zwei Wochen nach dem Absinken der Parasitenausscheidung gewonnen wurden und sich die humorale

Antwort mit Sicherheit in den ersten Wochen unter anderem auch in Abhängigkeit der Intensität der Infektion verändert. In der Vergangenheit wurden bisher kaum serologische Untersuchungen bei Mäusen nach Infektion mit *C. parvum* durchgeführt und keine bei Knockout-Mäusen, so dass Vergleichswerte fehlen. In einer Studie von Martin-Gomez et al. (2006) fiel der Rückgang der Oozystenausscheidung nach Infektion neonataler NMRI-Mäusen mit 5×10^5 Oozysten des VC-1-Isolats mit Höchstwerten an spezifischem IgM und IgA im Serum zusammen. Die IgG-Antwort blieb über den beobachteten Zeitraum von 16 Tagen gleich hoch. In serologischen Studien an experimentell infizierten Lämmern zeigte sich spezifisches IgG im Serum ab Tag 7 p.i., stieg bis Tag 20-25 und blieb bis Tag 90 stabil. Serum-IgA konnte ab Tag 8-9 nachgewiesen werden, sank nach einem Maximum an Tag 15 anschließend zwar wieder, blieb aber bis Tag 20-30 p.i. auf einem nennenswerten Niveau (Hill et al., 1990; Ortega Mora et al., 1993; Ortega Mora & Wright, 1994).

Stellt man die Gesamtheit der Ergebnisse der GKO und IL12KO gegenüber, so gab es einen Bezug zwischen der Höhe der Antikörperantwort und der Schwere einer Infektion. Je mehr sich die Mäuse eines bestimmten Mausstammes mit dem Parasiten auseinandersetzen mussten, desto höher stieg der durchschnittliche Antikörpertiter vier Wochen nach einer Infektion. GKO-Mäuse, die eine stärkere und länger andauernde Infektion aufwiesen, zeigten durchschnittlich auch höhere Serumtitere als IL12KO. Bei C57BL/6-Wildtypmäusen konnten nur vereinzelt Oozysten detektiert werden. Hier fiel die Antikörperantwort wesentlich schwächer aus als bei den Knockout-Mäusen (Abb. 3.2.9). Da diese jedoch überhaupt eine messbare adaptive humorale Antwort ausbildeten, scheint es auch hier zu einer nicht unerheblichen Invasion des Parasiten in die Epithelzellen zu kommen. Mit einem erhöhten Einsatz an cDNA in die RT-PCR konnte auch bei Wildtypmäusen CP17-spezifische mRNA im Ileum nach einer Infektion detektiert werden, wenn auch in sehr viel geringeren Mengen als bei den Knockout-Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Bei einem intestinalen Parasiten wird neben einer systemischen auch eine mukosale Immunantwort induziert. Sekretorisches IgA gilt hierfür als Marker. In den hier durchgeführten Studien wurde der Nachweis in Vaginalspülungen geführt, da diese, auch wenn der Ort der Probenentnahme nicht mit dem der Induktion übereinstimmt, gut zu gewinnen sind und die Mäuse weder sediert noch getötet werden müssen. Es zeigte sich,

dass bei der Mehrheit der infizierte GKO (63 %) und circa einem Drittel der IL12KO IgA nicht nur im Serum, sondern auch in den Vaginalspülungen vier Wochen nach Infektion detektiert werden konnte (Abb. 3.1.19). Ebenso wie beim Nachweis von spezifischen Serum-Antikörpern konnte auch hier ein Bezug zwischen der Stärke der mukosalen Antikörperantwort und der Schwere einer Infektion hergestellt werden. GKO-Mäuse zeigten wesentlich höhere Titer als die IL12KO. Die Vaginalspülungen stellten sich demnach als legitimer Ersatz für intestinale Spülungen zum Nachweis einer lokal in der Dünndarmmukosa induzierten Antikörperantwort heraus. Es gab jedoch eine Korrelation zwischen den IgA-Titern im Serum und der Nachweisbarkeit von vaginalem IgA. Im Durchschnitt konnten erst ab einem IgA-Titer von 1:800 im Serum auch IgA in den Vaginalspülungen detektiert werden. Die Detektionsgrenze des im Rahmen dieser Arbeit etablierten ELISA liegt jedoch mit Sicherheit recht hoch, da die Proben aufgrund der Gewinnung und der limitierten Menge entsprechend verdünnt eingesetzt werden mussten. Wurde kein IgA in den Spülungen nachgewiesen, muss dies daher im Umkehrschluss nicht bedeuten, dass keines gebildet wurde.

Um eine IgG-Antwort im Serum näher spezifizieren zu können wurde auch ein Nachweis der Subklassen IgG1 und IgG2a geführt. Vier Wochen p.i. war bei beiden Knockout-Mausstämmen und auch bei Wildtypmäusen hauptsächlich spezifisches IgG1 im Serum nachweisbar. Erst bei hohen Serum-Titern gelang auch die Detektion von spezifischem IgG2a. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Mausstämmen, auch wenn denkbar gewesen wäre, dass IL12KO und Wildtypmäuse eine deutlich höhere Menge an IgG2a ausbilden, da diese in der Lage sind, IFN- γ zu bilden. IFN- γ gilt als Induktor und IgG2a als Marker einer T_H1-Antwort. Alle untersuchten Mausstämme bildeten demnach infolge einer Infektion eine humorale Antwort vom T_H2-Typ aus. Dies spricht generell dafür, dass im Rahmen einer *C. parvum*-Infektion nach einer anfänglich essentiellen T_H1-Antwort bei Mäusen auch einer T_H2-Antwort eine wichtige Rolle zukommt.

In der Literatur findet man bezüglich der Spezifität der IgG-Antwort keine Vergleichswerte, da nach einer Infektion von Mäusen bisher selten die Antikörperantwort und wenn, nie das Verhältnis der IgG-Subklassen bestimmt wurde. Vergleiche bezüglich der Induktion einer T_H1- versus T_H2-Antwort wurden in der Regel auf Ebene der Zytokine vollzogen. Moss et al. (1994) zeigten, dass in Seren von Menschen nach einer *C. parvum*-Infektion primär IgG-Antikörper der Subklasse IgG1 zu finden sind. IgG2 und IgG3 wurden nur in geringerem Maße beobachtet, in keinem Fall jedoch IgG4. Die Nomenklatur

der IgG-Subklassen unterscheidet sich beim Menschen und der Maus wesentlich. Humanes IgG1 entspricht dem murinen IgG2a (T_H1), humanes IgG4 dem murinen IgG1 (T_H2). Menschen entwickeln im Gegensatz zu Mäusen nach einer Infektion mit Kryptosporidien demnach eine Antikörperantwort vom T_H1-Typ. Ob dieser deutliche Unterschied in der Immunantwort unter anderem eine mögliche Erklärung für die abweichende Suszeptibilität gegenüber einer Erkrankung liefern könnte, bleibt zu überprüfen.

4.1.2.2 Spezifische Antikörper gegen P23 und CP17

Gegen die Sporozoiten-Oberflächenproteine CP17, P23 und CP15 werden in der Regel im Rahmen einer Infektion Antikörper gebildet (Moss et al., 1998; Reperant et al., 1994). Sie zählen damit zu den Hauptantigenen von *C. parvum*. Auch die hier infizierten Knockout-Mäuse zeigten in einem Westernblot mit Parasitenlysate als Antigen hauptsächlich eine Reaktion mit der Proteinfamilie im Bereich von 15-17 kDa und P23.

Um auf Dauer das Parasitenlysate in serologischen Untersuchungen ersetzen zu können, wurden parallel ELISA-Systeme etabliert, bei denen zum einen P23 und zum anderen CP17 als Antigen zum Einsatz kamen. Da eine Reinigung von nativem Protein aus der Sporozoitenmembran in einem größeren Umfang sehr aufwendig und zu kostspielig wäre, wurden die beiden Sporozoiten-Oberflächenproteine in *E. coli*-Kulturen rekombinant hergestellt und affinitätsgereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden alle durch Antikörper in Seren von Kryptosporidiose-Patienten erkannt.

Mit dem CP17-ELISA konnten dieselben Ergebnisse erzielt werden wie mit dem Parasitenlysate-ELISA. Alle Seren, die eine Reaktion gegen das Gesamtparasitenantigen zeigten, wiesen auch spezifische Antikörper gegen CP17 auf (Abb. 3.1.11). Es konnten sogar zwei IL12KO-Mäuse mehr positiv für spezifisches IgA bewertet werden. Auch das ermittelte Verhalten der Antikörper im zeitlichen Verlauf nach einer Infektion und einer Reinfektion deckte sich (Abb. 3.1.11, 3.1.12). Die Reaktivität der Seren der IL12KO-Mäuse erwies sich sogar als besser; der mit Parasitenlysate beobachtete Unterschied in der Höhe der Antikörpertiter zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen konnte nicht mehr gefunden werden. Dies ist jedoch am ehesten auf die im CP17-ELISA höhere angebotene Menge des stärksten Antigens zurückzuführen. Mit dem Parasitenlysate-Westernblot konnte bei allen Mäusen vier Wochen p.i. spezifisches IgG ausschließlich gegen den 15-17 kDa-Bereich und nur vereinzelt IgA auch gegen P23 nachgewiesen werden (Abb. 3.1.15). Der

Kombinations-Westernblot, bei dem sowohl rCP17 als auch rP23 angeboten wurden, bestätigte, dass die Reaktion im Bereich von 15-17 kDa auch auf die Anwesenheit von CP17-spezifischen Antikörpern zurückzuführen war.

Mit dem P23-ELISA konnte nicht zwingend eine Konfrontation mit dem Parasiten *C. parvum* nachgewiesen werden. Nicht alle mit dem Parasitenlysate-ELISA positiv bewerteten Mäuse zeigten auch P23-reaktive IgG-Antikörper (Abb. 3.1.13). Eine Erklärung könnte die niedrigere eingesetzte Antigenmenge von rP23 (20 ng/Kavität) im Vergleich zu rCP17 (50 ng/Kavität) sein, jedoch deckten sich die Ergebnisse beim IgA-Nachweis der ELISA-Systeme. Auch korreliert der Befund des P23-ELISA hervorragend mit dem Reaktionsmuster im Parasitenlysate-Westernblot. Es zeigte sich auch hier, dass im Rahmen einer Infektion der Knockout-Mäuse erst ab hohen Serumtitern eine Reaktivität von spezifischem IgG gegen P23 sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 3.1.17). Der Nachweis von spezifischem IgA ließ sich dagegen früher führen (Abb. 3.1.15). Mit dem Kombinations-Westernblot konnten in jedem untersuchten Serum vier Wochen *post infectionem* neben den CP17-reaktiven auch P23-reaktive IgG- und IgA-Antikörper nachgewiesen werden. Hier wurden jedoch auch wesentlich höhere Proteinmengen angeboten (168 ng jedes GST-Fusionsproteins pro Streifen) als im ELISA und auch im Parasitenlysate-Westernblot.

Der vorgestellte ELISA mit P23 als alleiniges Antigen kann damit einen ELISA mit Parasitenlysate in serologischen Studien bei Mäusen im Gegensatz zu denen beim Menschen (Priest et al., 1999) nicht ersetzen. Auch Reperant et al. (1994) beobachteten, dass Mäuse generell schlechter Antikörper gegen P23 ausbilden. Im Gegensatz dazu kann hier der CP17-ELISA zum Nachweis einer im Rahmen einer *C. parvum*-Infektion induzierten Antikörperantwort eingesetzt werden. Ein Kombinations-ELISA mit den beiden Hauptantigenen P23 und CP17 würde alle Fälle abdecken. Dieser wurde mittlerweile in unserer Arbeitsgruppe etabliert und in anderen Serologiestudien erfolgreich eingesetzt. Sowohl der ELISA mit den rekombinanten Proteinen als auch der Kombinations-Westernblot werden in Zukunft wohl die Nachweisverfahren mit Parasitenlysate als Antigen ablösen.

4.1.3 Infektionsverlauf nach Reinfektion

Da sowohl IL12KO- als auch GKO-Mäuse in diesen Infektionsstudien eine erste Infektion mit dem Darmparasiten *C. parvum* innerhalb von zwei Wochen überwand, waren weiterführende Untersuchungen unter anderem auch zur Resistenzentwicklung bei beiden Knockout-Mausstämmen möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunantwort, die zur Überwindung einer Infektion führte, auch einen Schutz vor einer Reinfektion fünf Wochen p.i. mit 1×10^6 Oozysten verlieh. Jetzt konnten in den Stuhlausstrichen nur noch sehr vereinzelt Oozysten detektiert werden (Abb. 3.1.4) und auch in den Ileumschnitten waren fünf Tage p.i. in keinem Fall mehr intrazelluläre Stadien in den Epithelzellen zu finden (Abb. 3.1.6). Dies entsprach jetzt dem Bild, das nach einer ersten Infektion von Wildtypmäusen beobachtet werden konnte. IL12KO und GKO waren demnach also auch in der Lage unabhängig der Zytokine IFN- γ und IL-12 eine Resistenz aufzubauen.

Im gleichen Zeitraum der hier durchgeführten Studien veröffentlichten Ehigiator et al. (2003) Untersuchungen, die ebenfalls zeigten, dass C57BL/6-IL12KO-Mäuse in der Lage sind, eine Resistenz zu entwickeln. Sogar nach einer Infektion mit nur 100 Oozysten waren die Mäuse vor einer Reinfektion mit 1×10^6 Oozysten 28 Tage p.i. vollständig geschützt. Auch eine Reinfektion mit 1×10^7 Oozysten führte nicht zu einer erneuten Infektion (diese Arbeit; Abb. 3.1.5). Des Weiteren konnte auch keine *C. parvum*-spezifische mRNA fünf Tage p.i. mehr amplifiziert werden (Abb. 3.1.8). Es zeigte sich jedoch, dass die Antikörpertiter nach einer Reinfektion bei den IL12KO nicht wie nach einer ersten Infektion sanken, sondern durchschnittlich zunächst das gleiche Niveau beibehielten (Abb. 3.1.10). Trotz des fehlenden Nachweises einer Infektion schienen sich IL12KO noch einmal mit dem Parasiten auseinandersetzen zu müssen. In den Infektionsstudien von Ehigiator et al. (2003) bauten auch BALB/c-GKO eine Resistenz auf. Nach einer Reinfektion schieden die Mäuse nur noch ein Zehntel an Oozysten über einen wesentlich kürzeren Zeitraum aus. Die hier infizierten C57BL/6-GKO zeigten ebenfalls eine Resistenz, aber keinen vollständigen Schutz. In den Ileumpräparationen konnte fünf Tage p.i., wenn auch in wesentlich geringeren Mengen als nach einer ersten Infektion, bei einem Teil der Mäuse *C. parvum*-spezifische mRNA amplifiziert werden (Abb. 3.1.8). Die durchgeführte CP17-spezifische RT-PCR stellte sich damit als wesentlich sensitiver und aussagekräftiger als die histologischen Untersuchungen heraus. Die Schnitte zeigen jeweils nur einen sehr kleinen Ausschnitt des Organs und bei einer schwachen Infektion können fokale Infektionsherde verfehlt werden. Die RT-PCR gibt einen Einblick in das Geschehen

von circa 0,5 cm Ileum (20-30 µg Gewebe). Die Sensitivität soll in Zukunft durch den Einsatz der Real-Time PCR noch einmal erhöht werden, um ein noch besseres Bild der Parasitenlast nach einer Reinfektion bei den Knockout-Mäusen zu erhalten. Eine solche *in vivo* Quantifizierung wurde erst kürzlich von Godiwala et al. (2006) beschrieben.

Die messbare, jedoch sehr niedriggradige Infektion spiegelt sich bei den GKO auch in der deutlich verstärkten Antikörperantwort wider (Abb. 3.1.10). Die noch bis zwei Monate nach der Reinfektion steigenden IgG- und IgA-Titer im Serum sprechen erneut dafür, dass die IFN- γ -unabhängig aufgebaute Immunantwort die Infektion zwar auf einem sehr niedrigen Niveau halten, den Parasiten jedoch nicht vollständig eliminieren kann.

Bei zwei GKO-Mäusen wurde an Tag 15 nach der Reinfektion ein Anstieg der Oozystenausscheidung auf 19 bzw. 39 Oozysten in 100 Gesichtsfeldern gefunden (Abb. 3.1.4 B). An anderer Stelle konnte beobachtet werden, dass eine GKO-Maus, bei der sich im Verlauf eines Reinfektionsversuches ein nicht weiter spezifizierter solider Tumor auf dem Rücken bildete, eine relativ starke Oozystenausscheidung aufwies (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kann sich die unterschwellige, aber persistierende Infektion unter bestimmten Umständen wieder verstärken. Eine erneute Infektion mit demselben Erreger vermag dies nicht auszulösen, zumal auch die 10fach höhere Infektionsdosis die Resistenz nicht durchbrechen konnte (Abb. 3.1.5). Eine zusätzliche Infektion mit einem anderen Erreger oder eine anderweitige Anforderung an das Immunsystem kann das Gleichgewicht jedoch scheinbar stören. Mit *C. parvum* infizierte Kälber erleiden schwerere Infektionsverläufe bei gleichzeitiger Infektion mit Rotaviren (Petry F, unveröffentlichte Beobachtungen). Bei bereits etablierter Infektion mit dem murinem Retrovirus LP-BM5 kann sich eine Kryptosporidien-Infektion auch bei C57BL/6-Wildtypmäusen mit messbarer Parasitenausscheidung ausbilden (Darban et al., 1991).

Da Mäuse beider Knockout-Mausstämme nach einer Infektion eine relativ starke humorale systemische und mukosale Immunantwort aufbauten und diese durch eine Reinfektion einen Booster erfuhren, stellt sich an dieser Stelle wieder die Frage nach der Bedeutung der Antikörper für die Überwindung einer Infektion und den Schutz vor einer Reinfektion. Zum Teil wird neben der zellvermittelte auch der humorale Immunität bei der Bekämpfung einer manifesten Kryptosporidiose und auch bei der Resistenzentwicklung einer Infektion mit diesem Parasiten eine Rolle zugesprochen (siehe auch 1.3.4). Dagegen spricht jedoch, dass sich hier eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörperantwort und der Intensität der Infektion zeigte und GKO trotz der stärksten humoralen Antwort eine persistierende

Infektion beibehielten. Auch AIDS-Patienten weisen sowohl hohe Serumtiter als auch hohe Titer an mukosalem IgA auf und entwickeln dennoch chronische Verläufe der Erkrankung. Antikörper werden daher zwar zur Bekämpfung des Parasiten beitragen, aber alleine nicht zu einer vollständigen Überwindung einer Infektion führen können.

Im Falle der Knockout-Mäuse erfolgte eine zweite Infektion in dem Zeitraum, in dem beide Stämme recht hohe spezifische Antikörpertiter aufwiesen. Es bleibt zu überprüfen, ob sich eine Resistenz auch noch dem Rückgang der Antikörpertiter zeigt. Bei den IL12KO sank der Titer nach drei Monaten sowohl für IgG als auch für IgA wieder an die Detektionsgrenze. Ehigiator et al. (2003) konnten zeigen, dass eine Infektion von C57BL/6-IL12KO auch einen Langzeitschutz induziert (Reinfektion nach 189 Tagen). Eine mögliche protektive Eigenschaft der Antikörper könnte auch durch Übertragung von hyperimmunem Serum oder B-Zellen von infizierten auf naive Knockout-Mäuse getestet werden. Es bleibt hierbei jedoch zu bedenken, dass eine Resistenz auch mit lokalen, mukosalen Antikörper assoziiert sein könnte.

Auch beim zeitlebens suszeptiblen Menschen zeigt sich nach erster Konfrontation mit dem Parasiten *C. parvum* ein Aufbau einer zumindest teilweise protektiven Immunantwort. Eine Reinfektion ist hier zwar generell möglich, es ist dann jedoch eine höhere Anzahl an Oozysten notwendig, um eine Erkrankung auszulösen (Okhuysen et al., 1998; Chappell et al., 1999). Die Anzahl an Patienten, die Parasiten ausschieden ging zurück und die Verläufe vielen weitaus weniger schwer aus. Es zeigte sich auch hier eine erhöhte Serokonversion nach Reinfektion, wobei die Antikörperantwort nicht mit der An- oder Abwesenheit einer Infektion korrelierte.

4.1.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dem hier durchgeführten direkten Vergleich von IL12KO- und GKO-Mäuse nach Infektion mit derselben Infektionsdosis desselben Parasitenisolats unter gleichen Bedingungen konnte die Theorie untermauert werden, dass dem T_H1-Zytokin IFN- γ eine wesentlich wichtigere Funktion bei der Bekämpfung einer *C. parvum*-Infektion zukommt als IL-12. Die Zytokine waren zwar zunächst gleichermaßen essentiell für die Resistenz von C57BL/6-Mäusen vor einer ersten Infektion, die beiden Knockout-Mausstämme zeigten jedoch deutliche Unterschiede im Infektionsverlauf, bei der Dauer der

Parasitenausscheidung und bei der induzierten humoralen Antwort. Wohingegen IL12KO den Parasiten innerhalb von zwei Wochen scheinbar vollständig eliminierenden konnten, behielten die IFN- γ -defizienten Mäuse eine chronische, niedriggradige Infektion zurück.

Entgegen den Literaturdaten waren hier sowohl IL-12- als auch IFN- γ -defiziente Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus in der Lage eine Infektion zu überwinden und eine Resistenz aufzubauen, auch wenn diese bei den GKO nicht zu einer vollständigen Immunität reichte. Es scheint also in Abhängigkeit der Schwere einer induzierten Infektion auch C57BL/6-Knockout-Mäusen möglich zu sein, die ansonsten für BALB/c-Knockout-Mäuse postulierten alternativen, von IFN- γ - und IL-12-unabhängigen Mechanismen innerhalb der Immunabwehr auszubilden. Auch Ungar et al. (1991) und McDonald et al. (1992) zeigten, dass für die Überwindung einer Kryptosporidiose IFN- γ -unabhängige Effektormechanismen benötigt werden. Diese gilt es in Zukunft aufzufindig zu machen.

Mit der Charakterisierung der beiden Knockout-Mausstämme und der Erkenntnis, dass einer T_H1-Antwort zwar initial eine große Bedeutung zukommt, sie aber nicht zwingend notwendig für die Überwindung einer Infektion ist, können diese Mäuse in Zukunft zur Bearbeitung einer Reihe von Fragestellungen eingesetzt werden.

Da GKO- und IL12KO-Mäuse trotz ihrer Suszeptibilität in der Lage sind, eine protektive Immunantwort aufzubauen, stellen sie ein ideales System dar, um beispielsweise Immunisierungsstrategien zu testen. Dies wird im nächsten Kapitel ausführlich diskutiert. Sie bieten auch die Möglichkeit, die direkte Wirkung von Chemotherapeutika auf den Parasiten relativ schnell zu testen. Dies wird zurzeit meist mit neonatalen Mäusen oder SCID-Mäusen durchgeführt. Neonatale Mäuse sind aber noch sehr klein und anfällig für Nebenwirkungen und SCID-Mäuse zeigen erst nach einem relativ langen Zeitraum eine Parasitenausscheidung.

Des Weiteren kann an diesen Infektionsmodellen die Zusammensetzung der Immunantwort bei einer Kryptosporidien-Infektion näher charakterisiert werden. Wie sich hier zeigt, sind bei einer ersten Infektion andere Mediatoren von Bedeutung als bei einer zweiten Konfrontation mit dem Parasiten. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Infektionsstudien an IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen stellen die Vorarbeiten eines von der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) seit Januar 2006 im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 490 - Invasion und Persistenz bei Infektionen - geförderten Teilprojektes zur Analyse der Resistenzentwicklung gegenüber Infektionen mit dem

Darmparasiten *Cryptosporidium parvum* in immundefizienten Mausstämmen dar. Ziel ist es, unter anderem die T_H1- bzw. T_H2-vermittelte Antwort im Verlauf der Resistenzentwicklung zu charakterisieren.

4.2 Immunisierung von IFN- γ - und IL-12 p40-Knockout-Mäusen

Nach wie vor existiert kein Chemotherapeutikum, welches spezifisch gegen Kryptosporidien wirkt und in allen Fällen zu einer vollständigen Eliminierung des Parasiten führt. Auch fehlt eine protektive Vakzine, die jedoch in der Veterinärmedizin von großem Interesse wäre. In der Literatur beschriebene Verfahren zur aktiven Immunisierung wurden bisher ausschließlich an Tieren unternommen, die selbst keine Suszeptibilität gegenüber einer Infektion aufweisen. Sowohl Mäuse als auch Nutztiere wie Rinder, Schafe oder Ziegen sind nur neonatal für eine Infektion empfänglich und entwickeln als Adulttiere eine Resistenz. Die Induktion einer schützenden Immunantwort konnte daher immer nur indirekt zum Beispiel durch die Übertragung von Antikörpern mit der Muttermilch immunisierter Muttertiere auf ihre für eine Infektion suszeptiblen Nachkommen überprüft werden (Jenkins et al., 1995; Sagodira et al., 1999a; Perryman et al., 1999). Trotz der zum Teil viel versprechenden Antigene und auch Immunisierungsstrategien resultierten alle bisher unternommenen Vakzinierungen jedoch nur in einer wenn auch in einigen Fällen nicht unerheblichen Reduktion der Parasitenausscheidung, nie aber in einer vollständigen Protektion.

In den Infektionsstudien im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl IL-12 p40- als auch IFN- γ -Knockout-Mäuse in der Lage sind, eine Infektion mit dem Darmparasiten *C. parvum* zu überwinden und darüber hinaus auch unabhängig der T_H1-Zytokine IFN- γ und IL-12 eine Resistenz vor einer erneuten Infektion aufzubauen. Mit den beiden charakterisierten Infektionsmodellen stand damit zum ersten Mal ein im Labor gut handhabbares System zur Verfügung, Immunisierungsstrategien gegen eine Kryptosporidiose zu entwickeln, wobei der Immunisierungserfolg direkt anhand der Parasitenausscheidung nach einer Infektion der immunisierten Tiere gemessen werden konnte. In der Vergangenheit wurden noch keine Vakzinierungsstudien an einem murinen Infektionsmodell durchgeführt.

Bei der Verwendung von GKO- bzw. IL12KO-Mäusen müssen Resultate unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass bei ihnen durch gezielte Mutagenese die Möglichkeit zur Ausbildung einer T_H1-Antwort mehr oder weniger schwerwiegend eingeschränkt wurde. Der T_H1-Antwort wird vor allem in der frühen Phase einer Infektion eine große Bedeutung beigemessen. Es scheint jedoch, dass sie im weiteren Verlauf durch eine T_H2-Antwort ergänzt und komplettiert wird und bei der Überwindung einer Infektion eine eher

untergeordnete Rolle spielt. Da bisher noch nicht ausreichend bekannt ist, welchen Anteil die T_{H1} - bzw. T_{H2} -Antwort an der Resistenzentwicklung tragen, kann der Ausgang von Immunisierungsversuchen zusätzlich auch zu einem besseren Verständnis über die Zusammensetzung einer adäquaten Immunantwort im Rahmen einer Kryptosporidien-Infektion beitragen.

Mit den hier angewandten Immunisierungsstrategien konnte jedoch weder ein Schutz vor einer Infektion noch eine positive Beeinflussung der Parasitenausscheidung bzw. des Infektionsverlaufes erzielt werden. Daher werden im Folgenden nur die wichtigsten Aspekte diskutiert.

4.2.1 Intranasale Immunisierungen

Infektionen mit *C. parvum* rufen sowohl eine systemische als auch eine mukosale Immunantwort mit Serumantikörpern aller Subklassen und sekretorischem IgA in der Mukosa hervor. Eine intranasale Immunisierung ist generell in der Lage, sowohl eine systemische als auch eine lokale und distale mukosale Immunantwort mit IgA-Sekretion zu induzieren. Sie stellte damit einen viel versprechenden Ansatz dar, um eine Immunreaktion ähnlich derer bei einer Kryptosporidien-Infektion zu stimulieren. Die zunächst durchgeführten intranasalen Immunisierungen mit Parasitenlysat ohne Adjuvans führten bei Mäusen beider Knockout-Mausstämme wenn überhaupt jedoch nur zu sehr niedrigen Titern spezifischer Serum-Antikörper (Abb. 3.2.2). Um eine eventuell lokal induzierte Immunreaktion zu verstärken, wurden intranasale Immunisierungen mit AbISCO als Adjuvans angeschlossen. AbISCO-Adjuvantien basieren auf der ISCOM-Technologie und stellen eine ISCOM-Matrix dar, die aus *Quillaja*-Saponin, Cholesterol und Phosphatidylcholin hergestellt wird. ISCOMs sind so genannte 'Immunstimulatorische Komplexe' aus Antigenen in einer Lipidmatrix, die als Adjuvans wirkt und durch Fusion mit der Plasmamembran zur Aufnahme des Antigens ins Zytoplasma der Antigen-präsentierenden Zelle führt. Für die intranasale Immunisierung mit ISCOMs wurde bereits beschrieben, dass sie eine starke immunstimulatorische Kapazität besitzt und gleichzeitig eine mukosale und eine systemische Immunantwort mit sekretorischem und Serum-IgA induzieren kann (Hu et al., 2005). Die lokale Stimulation des mukosalen Immunsystems führte dabei auch intestinal und vaginal zu entsprechenden Reaktionen. Im Gegensatz zu anderen Adjuvantien, wie zum Beispiel Cholera-toxin, weist die ISCOM-Matrix nur eine

minimale Toxizität auf, ist leicht zu beziehen und auch für zukünftige Anwendungsmöglichkeiten geeignet. Des Weiteren bietet sie den Vorteil, dass sie mit einem Antigen gemischt in der Lage ist, eine balancierte Immunantwort mit T_H1 - und T_H2 -Charakteristika und Antikörpern aller Subklassen zu generieren. Neben einer bei den Knockout-Mäusen mit Sicherheit verstärkt ausgebildeten T_H2 -Antwort konnte so auch die Induktion einer im Rahmen ihres Vermögens möglichen T_H1 -Antwort erwartet werden. Dennoch wurden auch mit AbISCO als Adjuvans bei IL12KO und C57BL/6-Wildtypmäusen keine, bei GKO teilweise und nur in sehr geringen Mengen *C. parvum*-reaktive Antikörper im Serum und in den Vaginalspülungen induziert (Abb. 3.2.7).

Eine Erklärung für die ausbleibende systemische Antikörperantwort im Rahmen der intranasalen Immunisierungen könnte unter anderem das verwendete Antigen liefern. Es wurde Parasitenlysate gewählt, da dieses alle immunrelevanten Antigene beinhaltet und bereits in früheren intraperitonealen Immunisierungen von Wildtypmäusen zur Generierung von Antiserum erfolgreich eingesetzt wurde. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Vakzinierung von Mutterschafen intramuskulär und in die Brustdrüse mit löslichem Parasitenantigen zu einer Reduktion der Parasitenausscheidung um 77 % bei den gesäugten Lämmern nach Infektion führte (Martin-Gomez et al., 2005a). Bei Immunisierungen über den intranasalen Weg muss die Antigenmenge im Vergleich zu anderen parenteralen Applikationswegen aber scheinbar wesentlich höher gewählt werden. Sjölander et al. (2001) verwendeten die 15fache Dosis für die intranasale im Gegensatz zur subkutanen Immunisierung, um dieselbe protektive Wirkung gegen Influenza-Viren zu erzielen. Durch den Aufschluss von 1×10^6 Oozysten über mehrere aufeinander folgende Einfrier-Auftauzyklen entsteht ein Gemisch aus vielen verschiedenen löslichen und unlöslichen Proteinen. Jedes Protein für sich macht aber nur einen geringen Anteil aus, so dass die Absolutmenge der immunogenen Antigene nicht ausreichend sein könnte, um über diesen Applikationsweg eine systemische, über Serumantikörper messbare Antwort auszulösen. Der Proteingehalt des Parasitenlysats, mit der BCA-Methode bestimmt, beträgt im Mittel circa $3,6 \mu\text{g}$ pro 1×10^6 Oozystenäquivalente. Würde man mit definierten Antigenen immunisieren, käme allein hierfür in der Regel schon eine wesentlich höhere Menge zum Einsatz ($10\text{-}250 \mu\text{g}$). Eine Erhöhung der Antigenmenge ist mit Gesamtparasitenlysate aber nicht möglich, da das Volumen nicht mehr ausreichend gering gehalten werden könnte. Die Verwendung ausschließlich der löslichen Parasitenantigene wäre denkbar, da man sie nach der Extraktion einengen kann, jedoch ist dies dauerhaft eine Kostenfrage, da der Parasit *in vitro* nicht generiert werden kann, und man auf die

Passagierung der Oozysten in Kälbern angewiesen ist. Als Alternative stellen die in unserer Arbeitsgruppe hergestellten rekombinanten Sporozoiten-Oberflächenproteine P23 und CP17 viel versprechende Antigenkandidaten dar. Beide zählen zu den Hauptantigenen bei einer *C. parvum*-Infektion und werden auch bevorzugt von den Seren infizierter GKO- und IL12KO-Mäuse erkannt (Abb. 3.1.15). Perryman et al. (1999) konnten bereits zeigen, dass das Kolostrum von mit rekombinatem P23 immunisierten Kühen den Kälbern einen erheblichen Schutz vor einer Infektion mit *C. parvum* verlieh. CP17 kam noch nie in Immunisierungsstudien zum Einsatz. In Zukunft sollen daher intranasale Immunisierungen mit rP23 und rCP17 durchgeführt werden. Da aktive und auch passive Immunisierungen gegen ein einziges Zielantigen in der Vergangenheit immer nur zu einer Teilprotektion führten, ist es anzustreben, auch Kombinationsvakzine auszutesten. Langfristig wäre auch denkbar, die Proteine durch sie kodierende Plasmide zu ersetzen. Eine intradermale DNA-Vakzinierung mit einem für P23 kodierenden Vektor (pcDNA3-P23) induzierte bei Wildtypmäusen eine starke spezifische IgG-Antwort im Serum (Daten nicht gezeigt).

Trotz der fehlenden Induktion einer systemischen Immunantwort wurden die ohne und mit Adjuvans intranasal immunisierten Mäuse mit *C. parvum*-Oozysten infiziert. Aber auch eine lokale, womöglich schützende Immunantwort wurde nicht induziert. Alle Knockout-Mäuse wiesen *post infectionem* die gewohnt hohen Parasitenausscheidungen im bekannten Verlaufsmuster auf. Die im Vergleich mit der nicht immunisierten Kontrollgruppe erhöhte Ausscheidung der intranasal ohne Adjuvans immunisierten IL12KO (Abb. 3.2.3 B) ist relativ zu betrachten. In Rahmen der Infektionsstudien konnte beobachtet werden, dass sich nach einer Infektion der Knockout-Mäuse bezüglich der detektierten Oozystenanzahlen große Schwankungen innerhalb einer Gruppe und auch zwischen den Gruppen zeigten. Die mittleren Parasitenausscheidungen der intranasal immunisierten Mäuse lagen an jedem Untersuchungstag unterhalb der höchsten bei den Infektionsstudien gemessenen Ausscheidungsrate (Abb. 3.1.3).

Nach Infektion der intranasal immunisierten Mäuse zeigte sich wie gewohnt eine starke Antikörperantwort mit spezifischem IgG und IgA im Serum und IgA in den Vaginalspülungen. Die intranasale Immunisierung mit AbISCO als Adjuvans führte zwar nicht zu einer systemischen Antikörperantwort, dennoch wurde zum Teil zumindest eine lokale Immunantwort hervorgerufen, die durch die Infektion einen Booster erfuhr. Unter Vorbehalt der in den Infektionsstudien auch bei den Antikörpertitern generell beobachteten großen Schwankungen zeigten vor allem die IL12KO- und C57BL/6-Mäusen verglichen

mit den nicht immunisierten Mäusen *post infectionem* eine stärkere Antikörperantwort (Abb. 3.2.9 B, C).

4.2.2 Intraperitoneale und subkutane Immunisierungen

Dass eine Immunisierung der Knockout-Mäuse generell einen Einfluss auf die Parasitenausscheidung haben kann, konnte durch die Infektion von intraperitoneal bzw. subkutan immunisierten Knockout-Mäusen gezeigt werden. Bei intraperitoneal immunisierten IL12KO und subkutan immunisierten GKO wurde anstatt einer Reduktion eine starke Erhöhung der Parasitenausscheidung beobachtet (Abb. 3.2.3 B, 3.2.8 A). Auch wenn in den Infektionsstudien generell große Schwankungen in den Parasitenausscheidungen auftraten, bewegten sich die hier ermittelten mittleren Oozystenanzahlen an den Tagen 6 bis 8 bei den IL12KO und 6 bis 10 bei den GKO deutlich über den bei infizierten naiven Mäusen gemessenen Ausscheidungsraten an dem jeweiligen Untersuchungstag (Abb. 3.1.3). Die höchste mittlere Ausscheidung einer Gruppe lag in den Infektionsstudien bei 192 Oozysten in 100 Mikroskopfeldern an Tag 4 (IL12KO) bzw. 200 an Tag 8 (GKO). Hier wurden durchschnittlich 347 Oozysten an Tag 7 (IL12KO) bzw. 599 Oozysten an Tag 8 (GKO) gezählt. Bei den intraperitoneal immunisierten GKO (Abb. 3.2.3 A) und subkutan immunisierten IL12KO (Abb. 3.2.8 B) bewegten sich die Ausscheidungsraten dagegen innerhalb der Schwankungen, wobei bei letzteren an Tag 7 die Ausscheidung mit durchschnittlich 149 Oozysten auch deutlich erhöht war.

Es scheint, als unterschieden sich die induzierten Immunantworten nach diesen parenteralen Immunisierungen recht wesentlich je nach Applikationsweg und vor allem je nach Immundefizienz, was eine Erklärung für die selektive Einflussnahme eines Immunisierungsweges auf jeweils einen bestimmten Knockout-Mausstamm liefern könnte. Eine bestimmte Prägung infolge einer Immunisierung der Knockout-Mäuse beeinträchtigte eventuell zunächst die Ausbildung einer möglichen adäquaten Immunantwort bei einer Infektion. Auf die Dauer und den Verlauf der Infektionen hatten die Immunisierungen allerdings keinen Einfluss. Alle Mäuse überwandern sie ohne weitere Krankheitssymptome und die Parasitenausscheidung sank wie gewohnt innerhalb von zwei Wochen unter die Nachweisgrenze. Auch die Ausbildung der Resistenz vor einer Reinfektion wurde nicht beeinträchtigt. Generell muss jedoch festgehalten werden, dass eine negative

Beeinflussung der Parasitenausscheidung durch eine Immunisierung wenn überhaupt nur bei Mäusen mit einem genetisch bedingten Immundefekt in der T_H1-Antwort beobachtet werden konnte.

Sowohl mit der intraperitonealen als auch der subkutanen Immunisierung mit Parasitenlysate wurde eine starke systemische Immunantwort induziert, wobei über den subkutanen Weg mit AbISCO als Adjuvans durchschnittlich drei bis vier Titrationsstufen höherer IgG-Titer erzielt wurden (Abb. 3.2.2, 3.2.7). In der Zusammensetzung der IgG-Antwort zeigten die GKO nach beiden Immunisierungen deutliche Unterschiede zu IL12KO- und Wildtyp-Mäusen. Wohingegen bei den beiden letzt genannten Mausstämmen neben einer starken IgG1-Antwort auch IgG2a nachgewiesen werden konnte, bildeten GKO-Mäuse infolge der Immunisierungen kein IgG2a aus. IFN- γ gilt als Induktor und murines IgG2a als Marker einer T_H1-Antwort. GKO zeigten auf Antikörperebene damit in beiden Fällen eine reine T_H2-Antwort. Nach der subkutanen Immunisierung mit AbISCO nahm das IgG2a bei IL12KO- und C57BL/6-Mäusen einen wesentlich höheren Anteil am Gesamt-IgG ein als nach der intraperitonealen Immunisierung. Dies weist darauf hin, dass durch eine intraperitoneale Immunisierung mit Parasitenlysate eine stärker T_H2-gerichtete Antwort induziert wird als durch die subkutane. In früheren Immunisierungen bei Wildtypmäusen konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine intraperitoneale Immunisierung mit Parasitenlysate ohne Adjuvans eine gut messbare T_H2-Antwort mit erhöhter IL-4-Sekretion nach Stimulation von Milzzellen mit Gesamtparasitenantigen hervorruft (Daten nicht gezeigt). Die Immunantwort nach subkutaner Immunisierung unterschied sich bei IL12KO- und C57BL/6-Mäusen auf Antikörperebene nicht wesentlich, auch wenn der Immunisierungserfolg mit ISCOMs IL-12-abhängig sein soll (Hu et al., 2005). Diese Abhängigkeit wurde jedoch in Bezug auf die angeborene Immunantwort beschrieben (Smith et al., 1999). Das Fehlen von IL-12 schien hier zumindest keinen Einfluss auf die Antikörperantwort zu haben.

Die mit den intraperitonealen bzw. subkutanen Immunisierungen induzierten hohen Serumtitern an *C. parvum*-spezifischem IgG waren nicht in der Lage, den Knockout-Mäusen einen gewissen Schutz vor einer Infektion zu verleihen. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die fehlende Induktion von IgA sowohl im Serum als auch an mukosalen Stellen zurückzuführen. Vier Wochen *post infectionem* konnte wie gewohnt spezifisches IgA im Serum und den Vaginalspülungen detektiert werden. Der Befund weist

noch einmal auf eine wesentliche Funktion von IgA bei der Überwindung einer Infektion hin, und bekräftigt die Bestrebungen, Immunisierungen über den mukosalen/intranasalen Applikationsweg durchzuführen.

4.2.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Auch wenn mit den hier angewandten Immunisierungsstrategien weder ein Schutz vor einer Infektion noch eine positive Beeinflussung der Parasitenausscheidung bzw. des Infektionsverlaufes erzielt werden konnte, zeigten sich eindeutige Hinweise, dass Immunisierungen über den intranasalen Weg einen richtigen Ansatz darstellen. Eine vollständige Protektion kann augenscheinlich nur dann induziert werden, wenn eine Immunisierung eine Infektion möglichst gut simuliert. Bisher scheint eine Invasion und in gewissem Rahmen eine intrazelluläre Entwicklung notwendig, um eine schützende Immunantwort zu induzieren. Jenkins et al. (2004) zeigten, dass oral applizierten Oozysten nach Bestrahlung zwar keine über eine Parasitenausscheidung messbare Infektion mehr auslösten, aber dennoch in der Lage waren, eine protektive Antwort in Kälbern vor einer erneuten Infektion mit vitalen Oozysten zu induzieren. Wurde die Bestrahlung jedoch zu hoch gewählt, blieben die Kälber suszeptibel, auch wenn die klinischen Symptome und die Ausscheidung abgeschwächt wurden.

Bei der Auswahl von Applikationswegen und Adjuvantien und der Beurteilung der durch eine Immunisierung erzielten Immunantwort muss bedacht werden, dass induzierte Antikörper alleine nicht in der Lage sind, vor einer Infektion zu schützen. Der humoralen Antwort wird lediglich eine unterstützende Rolle bei der Überwindung einer *C. parvum*-Infektion zugesprochen. Die Induktion einer adäquaten zellvermittelten Immunabwehr durch eine Immunisierung bleibt essentiell. Der Vergleich der Zusammensetzung der Antikörperantwort mit der nach einer Infektion kann jedoch einen Hinweis darauf geben, ob eine möglicherweise schützende Immunantwort hervorgerufen wurde.

Zur Induktion sowohl einer systemischen als auch einer mukosalen Immunantwort mit spezifischem IgA sollen die beiden parenteralen Applikationswege, intranasal und subkutan, in Zukunft kombiniert werden. Guy et al. (1998) beschrieben, dass eine durch subkutane Immunisierung hervorgerufene systemische Prägung die mukosale Antwort nach einer intranasalen Boosterimmunisierung dramatisch verstärkte ('Prime-Boost'-Immunisierung).

4.3 *In vitro* Kultivierung von *C. parvum* in HCT-8-Zellen

4.3.1 Intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* in infizierten HCT-8-Zellen

Die *in vitro* Kultur stellt eine Möglichkeit dar, die Entwicklung und Replikation des intrazellulären Parasiten *Cryptosporidium parvum* ohne Beeinflussung des Immunsystems zu studieren. Des Weiteren erlaubt sie eine besser kontrollierte Analyse bestimmter Zeitpunkte in der Entwicklung, was ein Tiermodell nicht bieten kann. In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* in infizierten HCT-8-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen unter anderem mit Hilfe von Stadien-reaktiven und Antigen-spezifischen Antikörpern und durch den Nachweis *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA verfolgt.

Bereits zwei Stunden nach der Infektion von HCT-8-Zellen mit *C. parvum* konnten kleine intrazelluläre Stadien, einkernige Trophozoiten, detektiert werden (Abb. 3.3.3, 3.3.4). Auch wenn sich 8 Stunden *post infectionem* eine etwas stärkere Fluoreszenz zeigte, wurde zu diesen beiden frühen Zeitpunkten der Kultur jeweils eine vergleichbare Anzahl an Stadien detektiert. Die Trophozoiten nahmen ausschließlich an Größe zu (Abb. 3.3.4). Sowohl Strong et al. (2000) als auch Current & Haynes (1984) zeigten, dass sich 11-12 Stunden p.i. in den meisten Stadien bereits drei komplette Mitoserunden und Kernteilungen ereignet haben und die intrazellulären Stadien nun als reife achtkernige Schizonten mit voll entwickelten Merozoiten (Typ I Meronten) vorliegen. Die hier gezeigten Daten bestätigen diesen Befund. Wohingegen der Anteil an Parasiten-DNA im Verhältnis zur Wirtszell-DNA 2 und 8 Stunden p.i. vergleichbar war, stieg er zwischen 8 und 14 Stunden p.i. ganz entscheidend an (Abb. 3.3.6), was auf die asexuelle Parasitenreplikation hinweist. Auch wenn sich in den ersten acht Stunden keine entscheidenden Veränderungen auf Ebene der genomischen DNA und bezogen auf die Anzahl der intrazellulären Stadien zeigten, ist zu diesen frühen Zeitpunkten dennoch eine unterschiedliche Aktivität von Parasitengenen zu beobachten (Abb. 3.3.7). Darauf wird jedoch im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Bis 14 Stunden p.i. stieg neben der *C. parvum*-spezifischen genomischen DNA auch die Anzahl an intrazellulären Stadien von 29 auf 61 Stadien pro 100 Wirtszellkerne an (Abb. 3.3.2). Die erfolgte Verbreitung des Parasiten in der Kultur konnte durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers 2C3 und auch der Kaninchen-Antiseren rb101 (anti-CP17)

und rb104 (anti-P23) beobachtet werden (Abb. 3.3.3, 3.3.4). Neben den zu diesem Zeitpunkt erwarteten deutlich größeren Meronten-Stadien findet man bereits neue Trophozystenstadien verschiedener Größen. In dem Zeitraum von 8 bis 14 Stunden p.i. scheinen demnach mehrere Ereignisse stattzufinden. Nach der Ausbildung von Typ I Meronten durch asexuelle Replikation erfolgten auch die Freisetzung von Merozoiten und die Invasion benachbarter Wirtszellen. 26 Stunden p.i. war zwar keine Zunahme an intrazellulären Stadien mehr zu verzeichnen, dennoch nahm die genomische DNA erneut in geringem Maße zu, was durch weitere Replikationszyklen durch Schizogonie zu erklären ist. Der Immunfluoreszenztest zeigte jetzt einen erhöhten Anteil an größeren Stadien (Meronten). Parallel dazu nahm auch die Gesamtfluoreszenz des mAk 2C3 zu, welche zu den Zeitpunkten 50 und 74 Stunden nach Infektionsbeginn am stärksten war. Das Verhältnis intrazellulärer Stadien zu Wirtszellkernen sank jedoch von 26 bis 50 Stunden p.i. bereits von 63 auf 46 % und bis 74 Stunden p.i. weiter auf 31 % ab (Abb. 3.3.2). Der optische Eindruck der Infektionsrate in dem hier durchgeführten Immunfluoreszenztest entsprach damit nicht zwingend auch der tatsächlich ermittelten Anzahl von Parasitenstadien. Eine Erklärung hierfür könnte die Zunahme der Antigenmenge in den späteren Stadien sein, welches vom mAk 2C3 spezifisch erkannt wird. Es besteht demnach keine direkte Korrelation zwischen Antikörperreaktivität und Stadienanzahl, betrachtet man unterschiedliche Zeitpunkte in einer *in vitro* Kultur.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 1B5, welcher neben Oozysten die sexuellen Stadien von *C. parvum* (Makro- und Mikrogametozyten) spezifisch erkennt (McDonald et al., 1995), wurden bereits 14 und 26 Stunden p.i. vereinzelt intrazelluläre Stadien detektiert. Eine abrupte Zunahme zeigte sich jedoch erst 50 Stunden p.i.. Jetzt wurde die Mehrheit der Stadien sowohl vom mAk 2C3 als auch vom mAk 1B5 detektiert (Abb. 3.3.3, 3.3.5). Eine Verbreitung des Parasiten in der Kultur über Merozoiten aus Typ I-Meronten schien damit beendet gewesen zu sein.

Wohingegen die Anzahl der Stadien in der *in vitro* Kultur 50 Stunden p.i. bereits wieder deutlich zurückging, nahm die genomische DNA des Parasiten zu diesem Zeitpunkt noch einmal zu (Abb. 3.3.2, 3.3.6). Aufgrund der intrazellulären Parasitenreplikation durch Kernteilung (Schizogonie) befinden sich zum Teil mehrere Kopien des Genoms in einem intrazellulären Stadium. Daher ist es generell schwierig die Menge nachgewiesener *C. parvum*-spezifischer DNA mit der mit Hilfe der Immunfluoreszenz ermittelten Anzahl intrazellulärer Stadien in Bezug zu setzen. Der erneute Anstieg der genomische DNA zu diesem späten Zeitpunkt ließe sich dadurch erklären, dass in dem fortschreitenden

Entwicklungszyklus Merozoiten aus Typ II Meronten nach Invasion von Wirtszellen zu Makro- und Mikrogametozyten differenzieren, wobei sich in letzteren durch eine Reihe von Kernteilungen bis zu sechzehn Mikrogameteten ausbilden.

Neben den Stadien-reaktiven Antikörpern 2C3 und 1B5 kamen auch Antigen-spezifische Antikörper gegen die Zoitens-Oberflächenproteine CP17 und P23 zum Einsatz, die im Rahmen dieser Arbeit in Kaninchen generiert wurden. Beide Antiseren zeigten ein mit dem monoklonalen Antikörper 2C3 vergleichbares Reaktionsmuster. Sowohl CP17 als auch P23 wurden bereits in den einkernigen Trophozoiten 2 Stunden p.i. detektiert (Abb. 3.3.3, 3.3.4), auch wenn P23-mRNA zu diesem Zeitpunkt nur schwach und CP17-mRNA erst ab 8 Stunden p.i. amplifiziert werden konnte (Abb. 3.3.7). Strong et al. (2000) gelang es dagegen auch mit drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern nicht, Cp17 in diesen frühesten intrazellulären Stadien nachzuweisen. Erst 6 Stunden p.i. zeigte sich eine schwache spezifische Fluoreszenz. Alle verwendeten Antikörper erkennen das gleiche Antigen und zeigen in der Immunfluoreszenz ein einheitliches Detektionsmuster. Sie binden an die Oberfläche von Sporozoiten und weisen das Protein in deren Gleitspuren nach. Cp17, auch gp15/45/60 genannt, ist ein O-glykosyliertes Protein (Gut & Nelson, 1999), welches GPI-verankert ist (Priest et al., 2001). Einer der von Strong et al. (2000) benutzten monoklonalen Antikörper (11A5) erkennt ein Kohlenhydratepitop. Dass dieser Antikörper keine Reaktivität zeigte, kann unter Umständen auf eine unvollständige posttranslationelle Modifikation der intrazellulären Form des Proteins zurückgeführt werden. Dies erklärt jedoch nicht, warum die anderen beiden monoklonalen Antikörper, CrA1 und CrA2, welche Proteinepitope erkennen, CP17 nicht in den einkernigen Trophozoiten detektiert haben. Das hier verwendete polyklonale Antiserum wurde mit einer rekombinanten Form des CP17-Antigens, welches in *E. coli* exprimiert und affinitätsgereinigt wurde, hergestellt. Es erkennt möglicherweise ein breiteres Spektrum an Epitopen des Proteins als die monoklonalen Antikörper und ist damit unter Umständen sensitiver. Gut & Nelson (1994) beschrieben jedoch, dass das CP17-Antigen während der Penetration der Wirtszellen (hier MDCK-Zellen) bei der Invasion abgegeben wird.

4.3.2 Differentielle Expression von *C. parvum*-Genen in infizierten HCT-8-Zellen

Die intrazelluläre Entwicklung des Parasiten beinhaltet verschiedene Generationen von asexuellen und sexuellen Stadien. Während der Stadienkonversion führen komplexe Mechanismen zu unterschiedlichen Strukturen und funktionellen Eigenschaften des Parasiten. Voraussetzung dafür ist eine gut aufeinander abgestimmte Regulation der Genaktivitäten. Für verschiedene Proteine der invasiven Stadien wurde eine mögliche Beteiligung bei der Motilität, der Bindung und der Invasion von Wirtszellen beschrieben (Smith et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer *in vitro* Kultur die Expression von vier Genen durch RT-PCR über einen Zeitraum von vier Tagen verglichen, die für die Zoitenproteine CP15, CP17, P23 und GP900 von *C. parvum* kodieren (Abb. 3.3.7). Die Proteine haben sehr viele Eigenschaften gemeinsam. Sie sind unter anderem alle auf der Oberfläche von Sporozoiten und Merozoiten zu finden und können in deren Gleitspuren detektiert werden (Arrowood et al., 1991; Tilley & Upton, 1994; Barnes et al., 1998; Strong et al., 2000). Es wurde erstmals gezeigt, dass die vier Gene während der intrazellulären Entwicklung differentiell exprimiert werden. Jedes Gen folgte einem ihm eigenen Zeitplan, was auf unterschiedliche Funktionen der Proteine innerhalb des Entwicklungszyklus schließen lässt, die zum Teil scheinbar nicht auf die invasiven Stadien beschränkt sind. Das Expressionsmuster der einzelnen Parasitengene war zwischen verschiedenen Ansätzen der *in vitro* Kultur-Experimente sehr reproduzierbar.

Über die Genexpression der Zoitenoberflächenproteine CP15, P23 und GP900 waren bisher noch keine Daten vorhanden. Die Expression des CP17-Gens (*gp15/45/60*) wurde dagegen bereits in zwei verschiedenen Wirtszelllinien untersucht. Strong et al. (2000) detektierten CP17-mRNA bereits 4 Stunden *post infectionem*, wobei sich eine deutliche Bande im Gel erst 6 Stunden p.i. zeigte. Die mRNA-Mengen waren zwischen 9 und 24 Stunden am höchsten und fielen 48 Stunden p.i. wieder ab. O'Connor et al. (2002) konnten mit Hilfe des Northernblots 6 Stunden p.i. noch keine CP17-mRNA nachweisen. Transkripte wurden 12 und 24 Stunden und schwach 48 Stunden p.i. beobachtet. Auch wenn hier in geringem Maße abweichende Zeitpunkte verwendet wurden, ist der beobachtete zeitliche Verlauf der CP17-Genexpression mit den beiden Studien vergleichbar (Abb. 3.3.7). CP17-mRNA wurde unabhängig der Zyklenzahl in keinem Fall 2 Stunden p.i., nach 8 Stunden dagegen sehr stark amplifiziert. Im Unterschied zu Strong et al. (2000), welche MDCK-Zellen als Wirtszellen verwendeten, und O'Connor et al. (2002), die Caco-2A-Zellen infizierten, konnten über einen sehr viel längeren Zeitraum große

Mengen an CP17-spezifischer mRNA nachgewiesen werden. Die Abweichungen könnten auf die verwendete Wirtszelllinie, die Kulturbedingungen, das Parasitenisolat oder die Nachweismethode zurückzuführen sein, die in diesen Untersuchungen verwendet wurden. CP17, auch gp15 genannt, wird durch dasselbe Gen wie ein weiteres Zitenoberflächenprotein, gp40, kodiert (Cevallos et al., 2000b). Die beiden Proteine entstehen nach der Translation durch proteolytische Spaltung eines Präkursorproteins. Die Expression der CP17-mRNA lässt daher auch Rückschlüsse auf die der gp40-mRNA zu. gp40 und gp15 sind antigenetisch verschieden und in den Sporozoiten unterschiedlich lokalisiert (Cevallos et al., 2000b). Damit kann trotz der parallel laufenden Expression von einer unterschiedlichen Funktion ausgegangen werden. Das Präkursorprotein wurde nur in den aktiv replizierenden intrazellulären Stadien des Parasiten und nicht in den metabolisch inaktiven Oozysten- oder Sporozoitenstadien nachgewiesen (Cevallos et al., 2000b; Strong et al., 2000). Die proteolytische Spaltung ebenso wie die Synthese scheinen daher *in vivo* innerhalb der intrazellulären Stadien während der asexuellen Vermehrung des Parasiten abzulaufen (Cevallos et al., 2000b). Die hier gezeigten Daten unterstützen diese Annahme. Wie auch bei Strong et al., 2000 konnte in frisch exzystierten Sporozoiten wesentlich weniger CP17-mRNA nachgewiesen werden als in den intrazellulären Stadien, wo diese erst ab 8 Stunden p.i. zu amplifizieren war (Abb. 3.3.8, 3.3.7).

GP900 ist ein Mikronemenprotein, das auf die Zelloberfläche transloziert wird und dann auch in den Kriechspuren der Zitenstadien nachweisbar ist (Petersen et al., 1992; Barnes et al., 1998; Bonnin et al., 2001). Die mRNA des GP900-Gens konnte erst ab 14 Stunden p.i. detektiert werden. Bis zu diesem Zeitpunkt, an dem die RT-PCR auch ihr Maximum erreichte (Abb. 3.3.7), entwickeln sich durch asexuelle Replikation Merozoiten mit vollständig ausgebildetem Apikalkomplex einschließlich der Mikronemen (Strong et al., 2000; Current & Haynes, 1984). Es kann also darauf geschlossen werden, dass ausreichend GP900-Protein zwischen 8 und 14 Stunden p.i. gebildet werden muss, um die Mikronemen der Merozoiten mit diesem Protein auszustatten. Die zeitlich sehr begrenzte Genaktivität von GP900 in infizierten HCT-8-Zellen lässt vermuten, dass die Bildung der Mikronemen-tragenden Zitenstadien in der Zellkultur limitierter ist als die Expression anderer Oberflächenproteine wie CP15, CP17 und P23. Die Synthese des GP900-Proteins findet möglicherweise ausschließlich bei der Reifung von Merozoiten in den Meronten und der Bildung von Sporozoiten in den aus den Zygoten entstehenden Oozysten statt. Die drei anderen Proteine scheinen darüber hinausgehende Funktionen in den intrazellulären Stadien zu besitzen. Die deutliche Abnahme an GP900-Amplifikaten deckt sich mit der

Tatsache, dass ab 50 Stunden p.i. die Anzahl kleiner Trophozoitenstadien und Meronten signifikant zurückging (Abb. 3.3.5). Ab diesem Zeitpunkt reagierte die Mehrzahl der Stadien mit dem monoklonalem Antikörper 1B5, welcher spezifisch für späte Stadien des Entwicklungszyklus (Mikro- und Makrogametozyten) ist. In frisch exzystierten Sporozoiten waren nur wenige Kopien der GP900-mRNA präsent (Abb. 3.3.8). Die Resultate stimmen mit früheren Daten überein, die zeigten, dass die Menge an mRNA von Cp3.4 (jetzt GP900) in Sporozoiten relativ niedrig ist, diese jedoch in cDNA aus Ileum und Caecum infizierter Mäuse gut nachzuweisen ist (Petry et al., 1998).

Als Kontrolle wurde parallel zu den Sporozoiten-Oberflächenproteinen auch das Oozystenwandprotein COWP (*C. parvum* oocyst wall protein) analysiert. Spano et al. (1997) lokalisierten das Protein mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in großen zytoplasmatischen Einschlüssen und in so genannten 'wall-forming bodies' von frühen und späten Makrogameten. Die Expression des COWP-Gens zeigte sich erst 50 Stunden p.i. und kann daher als später Marker für die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* verwendet werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen aus Studien über die *in vitro* Entwicklung des Parasiten von Lacharme et al. (2004) und Current & Haynes (1984), die Makrogametozyten erst 48 Stunden nach Infektion von HCT-8-Zellen bzw. humanen fötalen Lungenzellen detektierten. COWP ist Mitglied einer Multigenfamilie. Die hier verwendeten COWP-Primer wurden auf der Basis der COWP(1)-Sequenz entwickelt, die von Spano et al. (1997) publiziert wurde. Acht weitere Mitglieder der Familie, COWP2 bis COWP9, sowie das Expressionsmuster der neun Gene in *C. parvum*-infizierten HCT-8-Zellen wurden erst kürzlich von Templeton et al. (2004) beschrieben. Bei allen COWP-Genen waren nennenswerte mRNA-Mengen nicht vor 48 Stunden p.i. nachzuweisen, was noch einmal auf ihre Rolle bei der Ausbildung der Oozystenwand hinweist. Das Expressionsprofil des COWP1-Gens zeigte einen abrupten Anstieg 48 Stunden und ein Maximum 72 Stunden p.i. (letzter Zeitpunkt der Studie). In einer vorherigen Arbeit derselben Gruppe (Abrahamsen & Schroeder, 1999) und den hier vorgestellten Experimenten wurde dagegen das stärkste RT-PCR-Produkt um 48-50 Stunden p.i. beobachtet. Anschließend nahm es wieder deutlich ab.

Der zeitlich Ablauf der COWP-mRNA-Expression lief parallel mit der Detektion eines 41/44 kDa-Antigens, welches mit dem monoklonalen Antikörper 1B5 reagiert (Abb. 3.3.3) und in dem großen elektronendichten Körper der Makrogametozyten lokalisiert ist (McDonald et al., 1995). COWP ist jedoch ein 190 kDa Protein und daher verschieden von

dem mAk 1B5-reaktiven Antigen.

Alle Zoitens-Oberflächenantigene kodierenden Gene, die in diese Studie eingeschlossen waren, wurden nicht nur in den intrazellulären Stadien, sondern auch in den frisch exzystierten Sporozoiten exprimiert, wenn auch zum Teil nur in geringem Maße (Abb. 3.3.8). Im Gegensatz dazu konnte hier kein Genprodukt von COWP amplifiziert werden. Die inverse Intensität der RT-PCR-Produkte von CP15 und P23 in den extrazellulären Sporozoiten und HCT-8-Zellen 2 Stunden nach Infektion zeigt, dass die PCR-Signale von den infizierten Zellkulturen eher von frühen intrazellulären Stadien als von freien Sporozoiten stammten, welche nach den Waschschritten möglicherweise noch an den Zellen adhärirten könnten. Die Ergebnisse wiesen des Weiteren darauf hin, dass die Invasion der Wirtszellen durch die Sporozoiten und die Etablierung des Parasiten innerhalb der Zellen ein Stimulus ist, der selektiv die Genexpression aktiviert. Dieser ist abweichend von dem Stimulus beim Exzystierungs-Prozess. In unseren Experimenten haben wir nicht zwischen der RNA von intakten Oozysten und freien Sporozoiten differenziert, da der eingesetzte Exzystierungsmix beide Stadien beinhaltete. Unterschiede in der Genaktivität zwischen mRNA von Oozysten und mRNA von Sporozoiten wurden jedoch beim Vergleich des „multiprotein bridging factor typ 1“-Gens und des „TATA-binding protein“-Gens gefunden (Millership et al., 2004). Die differentielle Expression der beiden Protein demonstriert, dass während des Exzystierungsprozess ebenfalls Gentranskription selektiv an- und abgeschaltet wird.

Auch wenn die mRNA der Oberflächenproteine CP15, CP17 und P23 im Gegensatz zu GP900 und vor allem COWP über den gesamten Zeitraum der Kultur nachweisbar war, nahm gegen Ende der Kultivierungszeit die Aktivität aller untersuchten Gene kontinuierlich ab. Dies schien in einem direkten Zusammenhang mit der Abnahme der Anzahl intrazellulärer Stadien, der Menge an *C. parvum*-spezifischer genomischer DNA und der generell sinkenden transkriptionellen Aktivität zu stehen. Die relative Genaktivität unterschied sich dennoch wesentlich, wenn man sie mit dem 18S rRNA-Niveau als ein Marker der gesamten transkriptionellen Aktivität vergleicht (Maximum 26 Stunden p.i., Abb. 3.3.7). Es ist zu erwarten, dass eine verlängerte Infektionsdauer in einem immunkompromittierten Wirt eine verlängerte Genaktivität benötigt, um erfolgreich zu replizieren. Wie in der indirekten Immunfluoreszenz gesehen, erfolgte ab 50 Stunden p.i. jedoch keine Verbreitung des Parasiten in der *in vitro* Kultur mehr. Die Anzahl

intrazellulärer Stadien nahm bereits wieder ab und es wurden hauptsächlich nur noch späte Stadien (Mikro- und Makrogametozyten) detektiert. Trophozoiten und Meronten, welche für die Aufrechterhaltung des Zyklus stehen, konnten nur noch sehr vereinzelt beobachtet werden. Diese Befunde machen noch einmal die bereits erwähnte Problematik der *in vitro* Propagation von *C. parvum* deutlich. Vor allem auch der starke Rückgang der mRNA von GP900 und COWP bereits 74 Stunden p.i. weisen darauf hin, dass es in der hier beschriebenen *in vitro* Kultur wahrscheinlich nur in sehr geringem Maße zur Vollendung des Entwicklungszyklus mit der Ausbildung von reifen, vier Sporozoiten tragenden Oozysten kommt. Eine Ursache ist mit Sicherheit im Alter der kultivierten Zellen zu suchen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Infizierbarkeit von HCT-8-Zellen mit zunehmendem Alter abnimmt (Daten nicht gezeigt). Auch ein mit *C. parvum* assoziierter apoptotischer Epithelzelltod nicht infizierter Zellen wurde bei der *in vitro* Infektion intestinaler und biliärer Epithelzellen beschrieben (Chen et al., 1999). Die Apoptose findet hierbei bevorzugt in den nicht infizierten Zellen statt, die benachbart zu infizierten Zellen liegen (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl adäquater Wirtszellen scheint demnach mit zunehmender Kultivierungszeit abzunehmen.

4.3.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In den in diesem Kapitel vorgestellten Studien zur intrazellulären Entwicklung von *C. parvum* in infizierten HCT-8-Zellen konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster verschiedener *C. parvum*-Gene bestimmte Abschnitte innerhalb des Entwicklungszyklus charakterisiert. CP17 wurde hierbei als Marker für die Invasion, GP900 für die Replikation und COWP als Marker für die sexuelle Vermehrung, die zur Ausbildung von Oozysten führt, identifiziert.

Um zu überprüfen, ob die Situation in den *in vitro* Kultursystemen mit der in infizierten Wirtsorganismen vergleichbar ist, sollen die Kenntnisse aus den *in vitro* Untersuchungen zur differentiellen Expression von Parasitengenen in Zukunft auf das Maussystem übertragen werden. Es wäre von Interesse, in wie weit man auch hier während der ersten Tage einer Infektion im Ileum dieses sequentielle Schalten der Gene der verschiedenen Sporozoiten-Oberflächenproteine findet. Zur Zeit wird überprüft, ob es eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Oozysten im Stuhl und der mRNA-Expression der späten Marker im Entwicklungszyklus gibt und ob sich Unterschiede in der Genexpression bei

den beiden in den vorigen Kapiteln beschriebenen Knockout-Maussystemen im Vergleich zu Wildtypmäusen nach erster Infektion bzw. zu reinfizierten Knockout-Mäusen zeigen. Des Weiteren besteht nun die Möglichkeit, den Einfluss verschiedener wirksamer Substanzen auf die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum in vitro* bestimmten Abschnitten innerhalb des Zyklus zuzuordnen und damit deren Wirksamkeit näher zu charakterisieren. In laufenden Experimenten soll die Wirkung der Proteaseinhibitoren der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART), für die bereits in einem Zell-Enzymimmunassay eine hemmende Wirkung auf die intrazelluläre Entwicklung gezeigt wurde (Hommer et al., 2003), auf Ebene der differentiellen Expression von Parasitengenen spezifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Cryptosporidium parvum ist ein intrazellulärer protozoischer Darmparasit (Apikomplexa), der weltweit zu den bedeutendsten Erregern von Diarrhöen beim Menschen und einer Reihe von Nutztieren zählt. Vor allem immunkompromittierte Personen wie zum Beispiel AIDS-Patienten erleiden schwere, chronische bis lebensbedrohende Erkrankungen. Da nach wie vor keine effektive Therapie gegen eine Kryptosporidiose in Form eines spezifisch wirkenden Chemotherapeutikums oder einer Vakzine existiert, ist es notwendig, die Immunantwort des Wirtes gegen den Parasiten und dessen Bindung, Invasion und die intrazelluläre Entwicklung in den Epithelzellen eingehend zu studieren, um neue Ansatzpunkte zu entwickeln. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, Infektionsmodelle zu etablieren und Immunisierungsstrategien zu entwickeln, die zu einem besseren Verständnis der immunologischen Antwort bei einer Infektion mit dem Darmparasiten beitragen. Des Weiteren sollte die intrazelluläre Entwicklung von *C. parvum* in einem *in vitro* Kultursystem verfolgt werden und unter anderem die differentielle Expression von Parasitengenen in den infizierten Wirtszellen untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Funktion der entsprechenden Proteine im Entwicklungszyklus ziehen zu können.

Wohingegen Menschen zeitlebens suszeptibel für eine Infektion mit *C. parvum* sind, entwickeln Mäuse eine natürliche Resistenz und können als adulte Tiere nicht mehr infiziert werden. Daher sind Mausmodelle der Kryptosporidiose auf neonatale oder immunsupprimierte und immundefiziente adulte Mäuse beschränkt. Bei der Überwindung einer *C. parvum*-Infektion sind Effektoren der natürlichen und adaptiven Immunität beteiligt. Die zentrale Rolle spielen $CD4^+$ -T-Zellen, sowie Interferon- γ und Interleukin-12. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Infektionen in IFN- γ (GKO)- und IL-12 p40 (IL12KO)-Knockout-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6-Maus etabliert, für die bereits gezeigt wurde, dass sie eine Suszeptibilität gegenüber einer Erstinfektion besitzen. Zum ersten Mal wurden die beiden Infektionsmodelle parallel unter denselben Bedingungen analysiert, um Rückschlüsse auf die Funktion und die Bedeutung der beiden T_H1 -Zytokine IFN- γ und IL-12 bei der Auseinandersetzung mit dem Parasiten und der Überwindung einer Infektion ziehen zu können. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Infektionsverlauf, bei der Höhe und Dauer der Parasitenausscheidung und der induzierten humoralen Antwort. GKO entwickelten länger andauernde Infektionen mit einer höheren Parasitenausscheidung als IL12KO und auch die Antikörperantwort mit spezifischem IgG

und IgA im Serum und sekretorischem IgA in Vaginalspülungen fiel durchschnittlich wesentlich höher und nachhaltiger aus. Erstmals konnte gezeigt werden, dass neben IL12KO auch GKO in der Lage sind, eine erste Infektion zu überwinden und eine Resistenz gegenüber einer erneuten Konfrontation mit dem Parasiten zu entwickeln. Auch wenn jetzt nur noch vereinzelt Oozysten in den Stuhlproben detektiert werden konnten, zeigte eine *C. parvum*-spezifische RT-PCR bei den GKO-Mäusen zum Teil eine schwache Genexpression im Ileum. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Etablierung einer protektiven Immunität gegen eine Kryptosporidiose generell unabhängig von der Anwesenheit der Zytokine IFN- γ und IL-12 ist, der Verlust von IFN- γ jedoch schwerer wiegt. *C. parvum* schien bei GKO-Mäusen in Form einer niedriggradigen chronischen Infektion zu persistieren, was sich auch in der humoralen Antwort widerspiegelte.

Die beiden Infektionsmodelle stellten sich als ideales System für die Etablierung einer effektiven Immunisierungsstrategie heraus, da die Knockout-Mäuse zwar suszeptibel für eine Infektion mit *C. parvum* sind, im Rahmen einer ersten Konfrontation mit dem Parasiten aber in der Lage sind, eine schützende Immunantwort aufzubauen. Des Weiteren kann ein Immunisierungserfolg direkt durch Infektion der immunisierten Knockout-Mäuse gemessen werden. Mit den hier durchgeführten Immunisierungen konnte jedoch in keinem Fall ein Schutz vor einer Infektion oder eine positive Beeinflussung der Parasitenausscheidung bzw. des Infektionsverlaufes erzielt werden. Dennoch zeigten sich eindeutige Hinweise, dass Immunisierungen über den intranasalen Weg, welche neben einer systemischen auch eine mukosale Immunantwort mit IgA-Sekretion induzieren können, einen richtigen Ansatz darstellen. Eine vollständige Protektion kann augenscheinlich nur dann erreicht werden, wenn eine Immunisierung eine Infektion möglichst gut simuliert. Immunisierungen über den intraperitonealen oder subkutanen Applikationsweg führten zwar zur Ausbildung einer starken spezifischen IgG-Antwort im Serum, diese war jedoch nicht in der Lage, einen Schutz vor einer Infektion zu vermitteln. Im Gegenteil wurde hier sogar vereinzelt eine Erhöhung der Parasitenausscheidung beobachtet, was jedoch darauf hinweist, dass eine Immunisierung dieser Knockout-Mausstämme generell einen Einfluss auf die Parasitenausscheidung nehmen kann.

Die intrazelluläre Replikation von *C. parvum* beinhaltet die Ausbildung verschiedener asexueller und sexueller Formen des Parasiten. Während der Stadienkonversion führen komplexe Mechanismen zu unterschiedlichen Strukturen und funktionellen Eigenschaften des Parasiten. Dies verlangt eine gut aufeinander abgestimmte Transkriptionsmaschinerie. Zum ersten Mal wurde die Genexpression von vier Oberflächenproteinen der invasiven

Zoitenstadien von *C. parvum*, CP15, CP17, P23 und GP900, und des Oozystenwandproteins COWP parallel durch RT-PCR analysiert. Als Wirtszelllinie diente die humane ileocecale Adenokarzinom-Zelllinie HCT-8. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Gene während der intrazellulären Entwicklung differentiell exprimiert werden und die Transkription jeweils einem ihnen eigenen Zeitplan folgte. Dies legt eine unterschiedliche Funktion der Proteine während des Entwicklungszyklus nahe, die zum Teil scheinbar nicht auf die invasiven Stadien begrenzt ist. Unter allen getesteten Genen wies CP15 bereits zwei Stunden nach Infektion die früheste transkriptionelle Aktivität auf. Als nächstes war die Transkription des P23- und CP17-Gens detektierbar, die den gesamten Beobachtungszeitraum anhielt. Die GP900-Genaktivität zeigte einen abrupten Anstieg 14 Stunden *post infectionem* und anschließend wieder einen raschen Abfall. Im Unterschied zu der mRNA der Zoiten-Oberflächenproteine konnte die mRNA des COWP erst 50 Stunden p.i. nachgewiesen werden, als auch sexuelle Stadien erschienen. Das Expressionsmuster der verschiedenen *C. parvum*-Gene charakterisiert bestimmte Abschnitte innerhalb des Entwicklungszyklus. CP17 wurde hierbei als Marker für die Invasion, GP900 für die asexuelle Replikation und COWP als Marker für die sexuelle Vermehrung, die zur Ausbildung von Oozysten führt, identifiziert. Die intrazelluläre Entwicklung wurde parallel auch mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz mit Stadienreaktiven und Antigen-spezifischen Antikörpern verfolgt. Antikörper, die gegen die rekombinanten Proteine CP17 und P23 hergestellt wurden, waren mit allen intrazellulären Stadien einschließlich der frühen Trophozoitenstadien reaktiv.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsen MS & Schroeder AA (1999) Characterization of intracellular *Cryptosporidium parvum* gene expression. Mol. Biochem. Parasitol. 104: 141-146
- Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M & Miller LH (1990) The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. Cell 63: 141-153
- Aguirre SA, Mason PH & Perryman LE (1994) Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. Infect. Immun. 62: 697-699
- Aguirre SA, Perryman LE, Davis WC & McGuire TC (1998) IL-4 protects adult C57BL/6 mice from prolonged *Cryptosporidium parvum* infection: analysis of CD4+alpha beta+IFN-gamma+ and CD4+alpha beta+IL-4+ lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue during resolution of infection. J. Immunol. 161: 1891-1900
- Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A & Kelly P (2002) Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: A randomised controlled trial. Lancet 360: 1375-1380
- Arrowood MJ (2002) In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. Clin. Microbiol. Rev. 15: 390-400
- Arrowood MJ, Mead JR, Mahrt JL & Sterling CR (1989) Effects of immune colostrum and orally administered antiparasite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. Infect. Immun. 57: 2283-2288
- Arrowood MJ, Sterling CR & Healey MC (1991) Immunofluorescent microscopical visualization of trails left by gliding *Cryptosporidium parvum* sporozoites. J. Parasitol. 77: 315-317
- Arrowood MJ, Hurd MR & Mead JR (1995) A new method for evaluating experimental cryptosporidial parasite loads using immunofluorescent flow cytometry. J. Parasitol. 81: 404-409
- Barnes DA, Bonnin A, Huang JX, Gousset L, Wu J, Gut J, Doyle P, Dubremetz JF, Ward H & Petersen C (1998) A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. Mol. Biochem. Parasitol. 96: 93-110
- Blagburn BL & Soave R (1997) Prophylaxis and chemotherapy: Human and animal. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Fayer R (Ed.), CRC Press, Boca Raton: 111-128
- Blanshard C, Jackson AM, Shanson DC, Francis N & Gazzard BG (1992) Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. Q. J. Med. 85: 813-823
- Bommer W (1969) The life cycle of virulent *Toxoplasma* in cell cultures. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47: 505-512

- Bonafonte MT, Smith LM & Mead JR (2000) A 23-kDa recombinant antigen of *Cryptosporidium parvum* induces a cellular immune response on in vitro stimulated spleen and mesenteric lymph node cells from infected mice. *Exp. Parasitol.* 96: 32-41
- Bonnin A, Ojcius DM, Souque P, Barnes DA, Doyle PS, Gut J, Nelson RG, Petersen C & Dubremetz JF (2001) Characterization of a monoclonal antibody reacting with antigen-4 domain of gp900 in *Cryptosporidium parvum* invasive stages. *Parasitol. Res.* 87: 589-592
- Brombacher F, Kastelein RA & Alber G (2003) Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 24: 207-212
- Campbell LD, Stewart JN & Mead JR (2002) Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infections in cytokine- and chemokine-receptor knockout mice. *J. Parasitol.* 88: 1014-1016
- Camus D & Hadley TJ (1985) A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 230: 553-556
- Carr A, Marriott D, Field A, Vasak E & Cooper DA (1998) Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet* 351: 256-261
- Carreno RA, Martin DS & Barta JR (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. *Parasitol. Res.* 85: 899-904
- Cevallos AM, Bhat N, Verdon R, Hamer DH, Stein B, Tzipori S, Pereira ME, Keusch GT & Ward HD (2000a) Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 68: 5167-5175
- Cevallos AM, Zhang X, Waldor MK, Jaison S, Zhou X, Tzipori S, Neutra MR & Ward HD (2000b) Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect. Immun.* 68: 4108-4116
- Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, Wang C, Jakubowski W & DuPont HL (1999) Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 157-164
- Chatelain R, Varkila K & Coffman RL (1992) IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.* 148: 1182-1187
- Chen W, Harp JA & Harmsen AG (1993) Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 61: 3928-3932
- Chen XM & LaRusso NF (2000) Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 118: 368-379

- Chen XM, Levine SA, Tietz P, Krueger E, McNiven MA, Jefferson DM, Mahle M & LaRusso NF (1998) *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. *Hepatology* 28: 906-913
- Chen XM, Gores GJ, Paya CV & LaRusso NF (1999) *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am. J. Physiol* 277: 599-608
- Chen XM, Keithly JS, Paya CV & LaRusso NF (2002) Cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 346: 1723-1731
- Clark DP (1999) New insights into human Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 554-563
- Cochrane AH, Aikawa M, Jeng M & Nussenzweig RS (1976) Antibody-induced ultrastructural changes of malarial sporozoites. *J. Immunol.* 116: 859-867
- Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J & Orme IM (2002) Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J. Immunol.* 168: 1322-1327
- Cosyns M, Tsirkin S, Jones M, Flavell R, Kikutani H & Hayward AR (1998) Requirement of CD40-CD40 ligand interaction for elimination of *Cryptosporidium parvum* from mice. *Infect. Immun.* 66: 603-607
- Coulliette AD, Huffman DE, Slifko TR & Rose JB (2006) *Cryptosporidium parvum*: Treatment effects and the rate of decline in oocyst infectivity. *J. Parasitol.* 92: 58-62
- Cozon G, Biron F, Jeannin M, Cannella D & Revillard JP (1994) Secretory IgA antibodies to *Cryptosporidium parvum* in AIDS patients with chronic cryptosporidiosis. *J. Infect. Dis.* 169: 696-699
- Crabb JH (1998) Antibody-based immunotherapy of cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 40: 121-149
- Current WL & Garcia LS (1991) Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 325-358
- Current WL & Haynes TB (1984) Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 224: 603-605
- Current WL, Reese NC, Ernst JV, Bailey WS, Heyman MB & Weinstein WM (1983) Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.* 308: 1252-1257
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A & Stewart TA (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259: 1739-1742

- Darban H, Enriquez J, Sterling CR, Lopez MC, Chen G, Abbaszadegan M & Watson RR (1991) Cryptosporidiosis facilitated by murine retroviral infection with LP-BM5. *J. Infect. Dis.* 164: 741-745
- Doumbo O, Rossignol JF, Pichard E, Traore HA, Dembele TM, Diakite M, Traore F & Diallo DA (1997) Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 637-639
- Doyle PS, Crabb J & Petersen C (1993) Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 61: 4079-4084
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V & Fourmaux MN (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28: 1007-1013
- Duong TH, Dufillot D, Koko J, Nze Eyo'o R, Thuilliez V, Richard Lenoble D & Kombila M (1995) [Digestive cryptosporidiosis in young children in an urban area in Gabon]. *Santé* 5: 185-188
- DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB & Jakubowski W (1995) The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332: 855-859
- Ehigiator HN, McNair N & Mead JR (2003) IL-12 knockout C57BL/6 mice are protected from re-infection with *Cryptosporidium parvum* after challenge. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: 539-541
- Ehigiator HN, Romagnoli P, Borgelt K, Fernandez M, McNair N, Secor WE & Mead JR (2005) Mucosal cytokine and antigen-specific responses to *Cryptosporidium parvum* in IL-12p40 KO mice. *Parasite Immunol.* 27: 17-28
- Elwin K, Chalmers RM, Roberts R, Guy EC & Casemore DP (2001) Modification of a Rapid Method for the Identification of Gene-Specific Polymorphisms in *Cryptosporidium parvum* and its Application to Clinical and Epidemiological Investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5581-5584
- Enriquez FJ & Riggs MW (1998) Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against p23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 66: 4469-4473
- Enriquez FJ & Sterling CR (1991) *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. *J. Protozool.* 38: 100-102
- Farthing MJ (2000) Clinical aspects of human cryptosporidiosis. In: *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*, Petry F (Ed.), Karger, Basel: 50-74
- Fayer R (2004) *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126: 37-56
- Fayer R & Ellis W (1993) Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *J. Parasitol.* 79: 771-774

- Fayer R & Ungar BL (1986) *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458-483
- Fayer R, Speer CA & Dubey JP (1990) General biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidiosis of man and animals*, Dubey JP, Speer CA, and Fayer R (Ed.), CRC Press, Boca Raton: 1-41
- Fayer R, Speer CA & Dubey JP (1997) The general biology of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Fayer R (Ed.), CRC Press, Boca Raton: 1-41
- Fayer R, Morgan U & Upton SJ (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305-1322
- Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgant UM, Lal AA & Dubey JP (2001) *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422
- Feng H, Nie W, Sheoran A, Zhang Q & Tzipori S (2006) Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. *Infect. Immun.* 74: 3342-3346
- Flanigan TP & Soave R (1993) Cryptosporidiosis. *Prog. Clin. Parasitol.* 3: 1-20
- Flanigan T, Whalen C, Turner J, Soave R, Toerner J, Havlir D & Kotler D (1992) *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Ann. Intern. Med.* 116: 840-842
- Foudraine NA, Weverling GJ, van Gool T, Roos MT, de Wolf F, Koopmans PP, van den Broek PJ, Meenhorst PL, van Leeuwen R, Lange JM & Reiss P (1998) Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy. *AIDS* 12: 35-41
- Gargala G, Delaunay A, Li X, Brasseur P, Favennec L & Ballet JJ (2000) Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 57-60
- Giacometti A, Burzacchini F, Cirioni O, Barchiesi F, Dini M & Scalise G (1999) Efficacy of treatment with paromomycin, azithromycin, and nitazoxanide in a patient with disseminated cryptosporidiosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 885-889
- Godiwala NT, Vandewalle A, Ward HD & Leav BA (2006) Quantification of in vitro and in vivo *Cryptosporidium parvum* infection by using real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4484-4488
- Gold D, Stei B & Tzipori S (2001) The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *J. Parasitol.* 87: 997-1000
- Griffiths JK (1998a) Editorial: Treatment for AIDS-associated cryptosporidiosis. *J. Infect. Dis.* 178: 915-916
- Griffiths JK (1998b) Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv. Parasitol.* 40: 37-85

- Griffiths JK, Theodos C, Paris M & Tzipori S (1998) The gamma interferon gene knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2503-2508
- Guarino A, Canani RB, Pozio E, Terracciano L, Albano F & Mazzeo M (1994) Enterotoxic effect of stool supernatant of *Cryptosporidium*-infected calves on human jejunum. *Gastroenterology* 106: 28-34
- Guarino A, Canani RB, Casola A, Pozio E, Russo R, Bruzzese E, Fontana M & Rubino A (1995) Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 171: 976-983
- Guerrant RL (1997) Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 51-57
- Gut J & Nelson RG (1994) *Cryptosporidium parvum* sporozoites deposit trails of 11A5 antigen during gliding locomotion and shed 11A5 antigen during invasion of MDCK cells in vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 42-43
- Gut J & Nelson RG (1999) *Cryptosporidium parvum*: lectins mediate irreversible inhibition of sporozoite infectivity in vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 56-57
- Guy B, Fourage S, Hessler C, Sanchez V & Quentin Millet MJ (1998) Effects of the nature of adjuvant and site of parenteral immunization on the serum and mucosal immune responses induced by a nasal boost with a vaccine alone. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 732-736
- Harp JA, Wannemuehler MW, Woodmansee DB & Moon HW (1988) Susceptibility of germfree or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 56: 2006-2010
- Hashim A, Clyne M, Mulcahy G, Akiyoshi D, Chalmers R & Bourke B (2004) Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *Cryptosporidium parvum* genotypes. *Infect. Immun.* 72: 6125-6131
- Hashim A, Mulcahy G, Bourke B & Clyne M (2006) Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect. Immun.* 74: 99-107
- Hayward AR, Chmura K & Cosyns M (2000) Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J. Infect. Dis.* 182: 1001-1004
- Heidl M, Hering L & Scholz H (1986) [Cryptosporidiosis in children]. *Infection* 14: 173-176
- Heine J, Moon HW & Woodmansee DB (1984) Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect. Immun.* 43: 856-859

- Hewitt RG, Yiannoutsos CT, Higgs ES, Carey JT, Geiseler PJ, Soave R, Rosenberg R, Vazquez GJ, Wheat LJ, Fass RJ, Antoninievic Z, Walawander AL, Flanigan TP & Bender JF (2000) Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trial Group. Clin. Infect. Dis. 31: 1084-1092
- Hill BD, Blewett DA, Dawson AM & Wright S (1990) Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. Res. Vet. Sci. 48: 76-81
- 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*. J. Antimicrob. Chemother. 52: 359-364
- Hu KF, Lövgren-Bengtsson K & Morein B (2005) Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. Adv. Drug Deliv. Rev. 51: 149-159
- Hunt E, Fu Q, Armstrong MU, Rennix DK, Webster DW, Galanko JA, Chen W, Weaver EM, Argenzio RA & Rhoads JM (2002) Oral bovine serum concentrate improves cryptosporidial enteritis in calves. Pediatr. Res. 51: 370-376
- Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander NQ, Chalmers RM, Morgan K, Nichols G, Beeching N & Osborn K (2004) Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. Emerg. Infect. Dis. 10: 1241-1249
- Jakobi V & Petry F (2006) Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes encoding sporozoite surface antigens in infected HCT-8 host cells. Microbes Infect. 8: 2186-2194
- Jenkins MC & Fayer R (1995) Cloning and expression of cDNA encoding an antigenic *Cryptosporidium parvum* protein. Mol. Biochem. Parasitol. 71: 149-152
- Jenkins MC, Fayer R, Tilley M & Upton SJ (1993) Cloning and expression of a cDNA encoding epitopes shared by 15- and 60-kilodalton proteins of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. Infect. Immun. 61: 2377-2382
- Jenkins M, Kerr D, Fayer R & Wall R (1995) Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. Vaccine 13: 1658-1664
- Jenkins MC, O'Brien C, Trout J, Guidry A & Fayer R (1999) Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. Vaccine 17: 2453-2460
- Jenkins M, Higgins J, Kniel K, Trout J & Fayer R (2004) Protection of calves against cryptosporiosis by oral inoculation with gamma-irradiated *Cryptosporidium parvum* Oocysts. J. Parasitol. 90: 1178-1180
- Joachim A, Eckert E, Petry F, Bialek R & Dauschies A (2003) Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. Vet. Parasitol. 111: 47-57

- Jokipii L, Pohjola S & Jokipii AM (1983) *Cryptosporidium*: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* 2: 358-361
- Juranek DD (1995) Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin. Infect. Dis.* 21: 57-61
- Kehl KS, Cicirello H & Havens PL (1995) Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.* 33: 416-418
- Kelly GS (2003) Bovine Colostrums: A Review of Clinical Uses. *Alternative Medicine Review* 8: 378-394
- Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, Stenzel W, Kohler G, Blumenschein WM, Straubinger RK, McClanahan T, Kastelein RA & Alber G (2006) IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J. Immunol.* 176: 1098-1106
- Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA & Sterling CR (1990) Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1423-1428
- Lacharme L, Villar V, Rojo-Vazquez FA & Suarez S (2004) Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). *Microbes. Infect.* 6: 566-571
- Lacroix S, Mancassola R, Naciri M & Laurent F (2001) *Cryptosporidium parvum*-specific mucosal immune response in C57BL/6 neonatal and gamma interferon-deficient mice: role of tumor necrosis factor alpha in protection. *Infect. Immun.* 69: 1635-1642
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langer RC & Riggs MW (1999) *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 67: 5282-5291
- Langer RC, Schaefer DA & Riggs MW (2001) Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL. *Infect. Immun.* 69: 1661-1670
- Laurent F, Eckmann L, Savidge TC, Morgan G, Theodos C, Naciri M & Kagnoff MF (1997) *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun.* 65: 5067-5073
- Laurent F, McCole D, Eckmann L & Kagnoff MF (1999) Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1: 141-148
- Lieberman LA, Cardillo F, Owyang AM, Rennick DM, Cua DJ, Kastelein RA & Hunter CA (2004) IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J. Immunol.* 173: 1887-1893

- Lumb R, Smith K, O'Donoghue PJ & Lanser JA (1988) Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol. Res.* 74: 531-536
- Ma P & Soave R (1983) Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147: 824-828
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB & Davis JP (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331: 161-167
- Macfarlane DE & Horner Bryce J (1987) Cryptosporidiosis in well-nourished and malnourished children. *Acta Paediatr. Scand.* 76: 474-477
- Maggi P, Larocca AM, Quarto M, Serio G, Brandonisio O, Angarano G & Pastore G (2000) Effect of antiretroviral therapy on cryptosporidiosis and microsporidiosis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 213-217
- Maggi P, Larocca AM, Ladisa N, Carbonara S, Brandonisio O, Angarano G & Pastore G (2001) Opportunistic parasitic infections of the intestinal tract in the era of highly active antiretroviral therapy: is the CD4(+) count so important? *Clin. Infect. Dis.* 33: 1609-1611
- Magram J, Sfarra J, Connaughton S, Faherty D, Warriar R, Carvajal D, Wu CY, Stewart C, Sarmiento U & Gately MK (1996) IL-12-Deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 795: 60-70
- Maillot C, Gargala G, Delaunay A, Ducrotte P, Bresseur P, Ballet JJ & Favennec L (2000) *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF-beta, IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol. Res.* 86: 947-949
- Mancassola R, Reperant JM, Naciri M & Chartier C (1995) Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 75-78
- Martin-Gomez S, Alvarez-Sanchez Ma & Rojo-Vazquez FA (2005a) Immunization protocols against *Cryptosporidium parvum* in ovines: Protection in suckling lambs. *Vet. Parasitol.* 129: 11-20
- Martin-Gomez S, Alvarez-Sanchez Ma & Rojo-Vazquez FA (2005b) Oral administration of hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine colostral whey confers a high level of protection against cryptosporidiosis in newborn NMRI mice. *J. Parasitol.* 91: 674-678
- Martin-Gomez S, Alvarez-Sanchez Ma & Rojo-Vazquez FA (2006) A newborn mouse *Cryptosporidium parvum* infection model: Its application to the study of therapeutic and prophylactic measures for controlling cryptosporidiosis in ruminants. *Parasitol. Res.* 99: 1-6

- McCole DF, Eckmann L, Laurent F & Kagnoff MF (2000) Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 68: 1710-1713
- McDonald SAC, O'Grady JE, Bajaj-Elliott M, Notley CA, Alexander J, Brombacher F & McDonald V (2004) Protection against the early acute phase of *Cryptosporidium parvum* infection conferred by interleukin-4-induced expression of T helper 1 cytokines. *J. Infect. Dis.* 190: 1019-1025
- McDonald V (2000) Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol.* 22: 597-604
- McDonald V & Bancroft GJ (1998) Immunological control of *Cryptosporidium* infection. In: *Immunology of intracellular parasitism*, Liew FY and Cox FEG (Ed.), Karger, Basel: 103-123
- McDonald V, Deer R, Uni S, Iseki M & Bancroft GJ (1992) Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 60: 3325-3331
- McDonald V, McCrossan MV & Petry F (1995) Localization of parasite antigens in *Cryptosporidium parvum*-infected epithelial cells using monoclonal antibodies. *Parasitology* 110: 259-268
- McDonald V, Smith R, Robinson H & Bancroft G (2000) Host immune responses against *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*, Petry F (Ed.), Karger, Basel: 75-91
- Mead JR & You X (1998) Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. *J. Parasitol.* 84: 1045-1048
- Mead JR, Arrowood MJ & Sterling CR (1988) Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *J. Parasitol.* 74: 135-143
- Mead JR, Arrowood MJ, Sidwell RW & Healey MC (1991) Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. *J. Infect. Dis.* 163: 1297-1304
- Meamar AR, Rezaian M, Rezaie S, Mohraz M, Kia EB, Houpt ER & Solaymani-Mohammadi S (2006) *Cryptosporidium parvum* bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: Efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin. *Parasitol. Res.* 98: 593-595
- Meisel JL, Perera DR, Meligro C & Rubin CE (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70: 1156-1160
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F & Pozio E (2003) Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both in vitro and in vivo models. *Int. J. Parasitol.* 33: 757-764

- Miao YM, Awad-El-Kariem FM, Franzen C, Ellis DS, Muller A, Counihan HM, Hayes PJ & Gazzard BG (2000) Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 25: 124-129
- Millership JJ, Waghela P, Cai X, Cockerham A & Zhu G (2004) Differential expression and interaction of transcription co-activator MBF1 with TATA-binding protein (TBP) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology* 150: 1207-1213
- Molbak K, Andersen M, Aaby P, Hojlyng N, Jakobsen M, Sodemann M & da Silva AP (1997) *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, west Africa. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 149-152
- Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RC, Olson M, Lal A & Xiao L (2002) *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433-440
- Moss DM, Bennett SN, Arrowood MJ, Hurd MR, Lammie PJ, Wahlquist SP & Addiss DG (1994) Kinetic and isotypic analysis of specific immunoglobulins from crew members with cryptosporidiosis on a U.S. Coast Guard cutter. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 52-55
- Moss DM, Chappell CL, Okhuysen PC, DuPont HL, Arrowood MJ, Hightower AW & Lammie PJ (1998) The antibody response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. *J. Infect. Dis.* 178: 827-833
- Nelson RG & Rosowsky A (2001) Dicyclic and tricyclic diaminopyrimidine derivatives as potent inhibitors of *Cryptosporidium parvum* dihydrofolate reductase: structure-activity and structure-selectivity correlations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3293-3303
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA & Yardley JH (1976) Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592-598
- Novak SM & Sterling CR (1991) Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Protozool.* 38: 103-104
- O'Connor RM, Thorpe CM, Cevallos AM & Ward HD (2002) Expression of the highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* Cpgp40/15 gene in genotype I and II isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119: 203-215
- Ojcius DM, Perfettini JL, Bonnin A & Laurent F (1999) Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes. Infect.* 1: 1163-1168
- Okhuysen PC, Chappell CL, Sterling CR, Jakubowski W & DuPont HL (1998) Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 66: 441-443
- Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR & DuPont HL (1999) Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180: 1275-1281

- Okhuysen PC, Rich SM, Chappell CL, Grimes KA, Widmer G, Feng X & Tzipori S (2002) Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon-gamma knockout mice. *J. Infect. Dis.* 185: 1320-1325
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu MR, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu YJ, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, De Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan FJ & Kastelein RA (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13: 715-725
- Ortega Mora LM, Troncoso JM, Rojo Vazquez FA & Gomez Bautista M (1993) Serum antibody response in lambs naturally and experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Vet. Parasitol.* 50: 45-54
- Ortega Mora LM & Wright SE (1994) Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infect. Immun.* 62: 5003-5009
- Pancieria RJ, Thomassen RW & Garner FM (1971) Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-484
- Park AY, Hondowicz B, Kopf M & Scott P (2002) The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J. Immunol.* 168: 5771-5777
- Peeters JE, Villacorta I, Vanopdenbosch E, Vandergheynst D, Naciri M, Ares Mazas E & Yvone 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. *Infect. Immun.* 60: 2309-2316
- Pereira SJ, Ramirez NE, Xiao L & Ward LA (2002) Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J. Infect. Dis.* 186: 715-718
- Perryman LE, Riggs MW, Mason PH & Fayer R (1990) Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoite neutralization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum. *Infect. Immun.* 58: 257-259
- Perryman LE, Jasmer DP, Riggs MW, Bohnet SG, McGuire TC & Arrowood MJ (1996) A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80: 137-147
- Perryman LE, Kapil SJ, Jones ML & Hunt EL (1999) Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine* 17: 2142-2149
- Petersen C, Gut J, Doyle PS, Crabb JH, Nelson RG & Leech JH (1992) Characterization of a > 900,000-M(r) *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin. *Infect. Immun.* 60: 5132-5138
- Petry F (1998a) Epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* antibodies in sera of persons from Germany. *Infection* 26: 7-10

- Petry F (1998b) Ultrastrukturelle und molekulare Analyse der extrazellulären Stadien des Darmparasiten *Cryptosporidium parvum* (Apikomplexa). Habilitationsschrift, Fachbereich Medizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Petry F (2000) Laboratory diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection. In: *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*, Petry F (Ed.), Karger, Basel: 33-49
- Petry F (2004) Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microsc. Microanal.* 10: 586-601
- Petry F, Shirley MW, Miles MA & McDonald V (1998) Characterisation of a *Cryptosporidium parvum*-specific cDNA clone and detection of parasite DNA in mucosal scrapings of infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95: 21-31
- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, De Waal Malefyt R, Rennick D & Kastelein RA (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 16: 779-790
- Pollok RC, Farthing MJ, Bajaj-Elliott M, Sanderson IR & McDonald V (2001) Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology* 120: 99-107
- Priest JW, Kwon JP, Moss DM, Roberts JM, Arrowood MJ, Dworkin MS, Juranek DD & Lammie PJ (1999) Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1385-1392
- Priest JW, Kwon JP, Arrowood MJ & Lammie PJ (2000) Cloning of the immunodominant 17-kDa antigen from *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106: 261-271
- Priest JW, Xie LT, Arrowood MJ & Lammie PJ (2001) The immunodominant 17-kDa antigen from *Cryptosporidium parvum* is glycosylphosphatidylinositol-anchored. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113: 117-127
- Ramirez NE, Ward LA & Sreevatsan S (2004) A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect.* 6: 773-785
- Reperant JM, Naciri M, Iochmann S, Tilley M & Bout DT (1994) Major antigens of *Cryptosporidium parvum* recognised by serum antibodies from different infected animal species and man. *Vet. Parasitol.* 55: 1-13
- Riggs MW (1997) Immunology: Host response and development of passive immunotherapy and vaccines. In: *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, Fayer R (Ed.), CRC Press, Boca Raton: 129-162
- Riggs MW (2002) Recent advances in cryptosporidiosis: The immune response. *Microbes Infect.* 4: 1067-1080

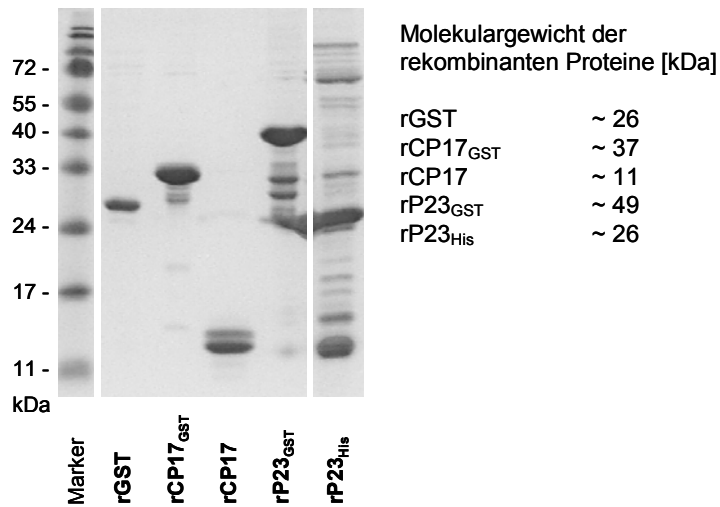
- Riggs MW, Stone AL, Yount PA, Langer RC, Arrowood MJ & Bentley DL (1997) Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J. Immunol.* 158: 1787-1795
- Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, Harris TJ, Marsh K, Newbold CI, Tate VE & Weatherall DJ (1988) A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* 335: 79-82
- Rochelle PA (2004) Applications of in vitro cell culture for measuring infectivity and inactivation of *Cryptosporidium parvum*. *Water Science and Technology: Water Supply* 4: 87-92
- Rossignol JF, Hidalgo H, Feregrino M, Higuera F, Gomez WH, Romero JL, Padierna J, Geyne A & Ayers MS (1998) A double-'blind' placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92: 663-666
- Rossignol JFA, Ayoub A & Ayers MS (2001) Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: A prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184: 103-106
- Rozen S & Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Krawetz S and Misener S (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ: 365-386
- Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson I, Zhou L, Thompson RCA & Xiao L (2004) *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90: 769-773
- Sagodira S, Buzoni-Gatel D, Iochmann S, Naciri M & Bout D (1999a) Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine* 17: 2340-2355
- Sagodira S, Iochmann S, Mévélec MN, Dimier-Poisson I & Bout D (1999b) Nasal immunization of mice with *Cryptosporidium parvum* DNA induces systemic and intestinal immune responses. *Parasite Immunol.* 21: 507-516
- Seydel KB, Zhang T, Champion GA, Fichtenbaum C, Swanson PE, Tzipori S, Griffiths JK & Stanley SL, Jr. (1998) *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal xenografts in SCID mice induces production of human tumor necrosis factor alpha and interleukin-8. *Infect. Immun.* 66: 2379-2382
- Sherwood D, Angus KW, Snodgrass DR & Tzipori S (1982) Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 38: 471-475
- Singh I, Theodos C & Tzipori S (2005) Recombinant proteins of *Cryptosporidium parvum* induce proliferation of mesenteric lymph node cells in infected mice. *Infect. Immun.* 73: 5245-5248

- Sjölander S, Drane D, Davis R, Beezum L, Pearse M & Cox J (2001) Intranasal immunisation with influenza-ISCOM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Vaccine* 19: 4072-4080
- Slavin D (1955) *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262-266
- Smith HV, Nichols RAB & Grimason AM (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21: 133-142
- Smith LM, Bonafonte MT & Mead JR (2000) Cytokine expression and specific lymphocyte proliferation in two strains of *Cryptosporidium parvum*-infected gamma-interferon knockout mice. *J. Parasitol.* 86: 300-307
- Smith LM, Bonafonte MT, Campbell LD & Mead JR (2001a) Exogenous interleukin-12 (IL-12) exacerbates *Cryptosporidium parvum* infection in gamma interferon knockout mice. *Exp. Parasitol.* 98: 123-133
- Smith LM, Priest JW, Lammie PJ & Mead JR (2001b) Human T and B cell immunoreactivity to a recombinant 23-kDa *Cryptosporidium parvum* antigen. *J. Parasitol.* 87: 704-707
- Smith NH, Cron S, Valdez LM, Chappell CL & White-AC J (1998a) Combination drug therapy for cryptosporidiosis in AIDS. *J. Infect. Dis.* 178: 900-903
- Smith RE, Donachie AM, McLaren FH & Mowat AM (1998b) Preservation of mucosal and systemic adjuvant properties of ISCOMS in the absence of functional interleukin-4 or interferon-gamma. *Immunology* 93: 556-562
- Smith RE, Donachie AM, Grdic D, Lycke N & Mowat AM (1999) Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses. *J. Immunol.* 162: 5536-5546
- Spano F, Puri C, Ranucci L, Putignani L & Crisanti A (1997) Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitology* 114: 427-437
- Spano F, Putignani L, Naitza S, Puri C, Wright S & Crisanti A (1998) Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92: 147-162
- Strong WB, Gut J & Nelson RG (2000) Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* 68: 4117-4134
- Taghi Kilani R, Sekla L & Hayglass KT (1990) The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection. Studies with B cell-depleted mice. *J. Immunol.* 145: 1571-1576
- Templeton TJ, Lancto CA, Vigdorovich V, Liu C, London NR, Hadsall KZ & Abrahamsen MS (2004) The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 72: 980-987

- Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Andrew Thompson RC & Conrad PA (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32: 595-616
- Theodos CM (1998) Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40: 87-119
- Theodos CM, Sullivan KL, Griffiths JK & Tzipori S (1997) Profiles of healing and nonhealing *Cryptosporidium parvum* infection in C57BL/6 mice with functional B and T lymphocytes: the extent of gamma interferon modulation determines the outcome of infection. *Infect. Immun.* 65: 4761-4769
- Theodos CM, Griffiths JK, D'Onfro J, Fairfield A & Tzipori S (1998) Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1959-1965
- Thompson RCA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS & Hijjawi NS (2005) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-158
- Tilley M & Upton SJ (1991) Sporozoites and merozoites of *Cryptosporidium parvum* share a common epitope recognized by a monoclonal antibody and two-dimensional electrophoresis. *J. Protozool.* 38: 48-49
- Tilley M & Upton SJ (1994) Both CP15 and CP25 are left as trails behind gliding sporozoites of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 275-278
- Tilley M, Upton SJ, Fayer R, Barta JR, Chrisp CE, Freed PS, Blagburn BL, Anderson BC & Barnard SM (1991) Identification of a 15-kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 59: 1002-1007
- Tomley FM, Clarke LE, Kawazoe U, Dijkema R & Kok JJ (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 277-288
- Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 3: 133-146
- Trinchieri G, Pflanz S & Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19: 641-644
- Tyzzar EE (1907) A sprorozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5: 12-13
- Tyzzar EE (1912) *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-412
- Tzipori S & Ward H (2002) Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* 4: 1047-1058
- Tzipori S, Smith M, Birch C, Barnes G & Bishop R (1983) Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 931-934

- Ungar BL & Nash TE (1986) Quantification of specific antibody response to *Cryptosporidium* antigens by laser densitometry. *Infect. Immun.* 53: 124-128
- Ungar BL, Soave R, Fayer R & Nash TE (1986) Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis.* 153: 570-578
- Ungar BL, Burris JA, Quinn CA & Finkelman FD (1990) New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infect. Immun.* 58: 961-969
- Ungar BL, Kao TC, Burris JA & Finkelman FD (1991) *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147: 1014-1022
- Upton SJ (1997) In vitro cultivation. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Fayer R (Ed.), CRC Press, Boca Raton: 181-207
- Upton SJ, Tilley M & Brillhart DB (1994a) Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 233-236
- Upton SJ, Tilley M, Nesterenko MV & Brillhart DB (1994b) A simple and reliable method of producing in vitro infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 45-49
- Upton SJ, Tilley M & Brillhart DB (1995) Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *J. Clin. Microbiol.* 33: 371-375
- Urban Jr. JF, Fayer R, Chen SJ, Gause WC, Gately MK & Finkelman FD (1996) IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Immunol.* 156: 263-268
- Viu M, Quilez J, Sanchez-Acedo C, del Cacho E & Lopez-Bernad F (2000) Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* 90: 163-170
- Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD & Ajioka JW (1997) Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84: 203-214
- Weir SC, Pokorny NJ, Carreno RA, Trevors JT & Lee H (2002) Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2576-2579
- Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP & Sibley LD (2005) Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect. Immun.* 73: 5379-5387
- White AC, Jr., Chappell CL, Hayat CS, Kimball KT, Flanigan TP & Goodgame RW (1994) Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *J. Infect. Dis.* 170: 419-424

- White AC, Robinson P, Okhuysen PC, Lewis DE, Shahab I, Lahoti S, DuPont HL & Chappell CL (2000) Interferon-gamma expression in jejunal biopsies in experimental human cryptosporidiosis correlates with prior sensitization and control of oocyst excretion. *J. Infect. Dis.* 181: 701-709
- White AC, Jr., Cron SG & Chappell CL (2001) Paromomycin in cryptosporidiosis. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1516-1517
- Widmer G, Corey EA, Stein B, Griffiths JK & Tzipori S (2000) Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development in vitro. *J. Parasitol.* 86: 922-928
- Williams RO & Burden DJ (1987) Measurement of class specific antibody against *Cryptosporidium* in serum and faeces from experimentally infected calves. *Res. Vet. Sci.* 43: 264-265
- Winter G, Gooley AA, Williams KL & Slade MB (2000) Characterization of a major sporozoite surface glycoprotein of *Cryptosporidium parvum*. *Funct. Integr. Genomics* 1: 207-217
- Woods KM & Upton SJ (1998) Efficacy of select antivirals against *Cryptosporidium parvum* in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 59-63
- Woods KM, Nesterenko MV & Upton SJ (1996) Efficacy of 101 antimicrobials and other agents on the development of *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90: 603-615
- Wyatt CR, Brackett EJ & Savidge J (2001) Evidence for the emergence of a type-1-like immune response in intestinal mucosa of calves recovering from cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 87: 90-95
- Wyatt CR, Lindahl S, Austin K, Kapil S & Branch J (2005) Response of T lymphocytes from previously infected calves to recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 vaccine antigen. *J. Parasitol.* 91: 1239-1242
- Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RC & Lal AA (2000) *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol. Today* 16: 287-292
- Xiao L, Fayer R, Ryan U & Upton SJ (2004) *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 72-97
- Yu JR, Choi SD & Kim YW (2000) In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *Korean J. Parasitol.* 38: 59-64
- Zahn S, Wirtz S, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF & von Stebut E. (2005) Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* 35: 1106-1112
- Zu SX, Li JF, Barrett LJ, Fayer R, Shu SY, McAuliffe JF, Roche JK & Guerrant RL (1994) Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 1-10

Anhang**Abb. A 1: SDS-PAGE der rekombinanten Proteine nach Affinitätsreinigung**

Die in *E. coli* exprimierte rekombinante Proteine rGST, rCP17_{GST}, rCP17 (nach Abtrennung des GST-Fusionspartners), rP23_{GST} und rP23_{His} wurden nach der Affinitätsreinigung über NiNTA bzw. Glutathion Sepharose (siehe 2.4.9) in einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (jeweils 1 µg Protein) und anschließend mit Coomassie gefärbt.

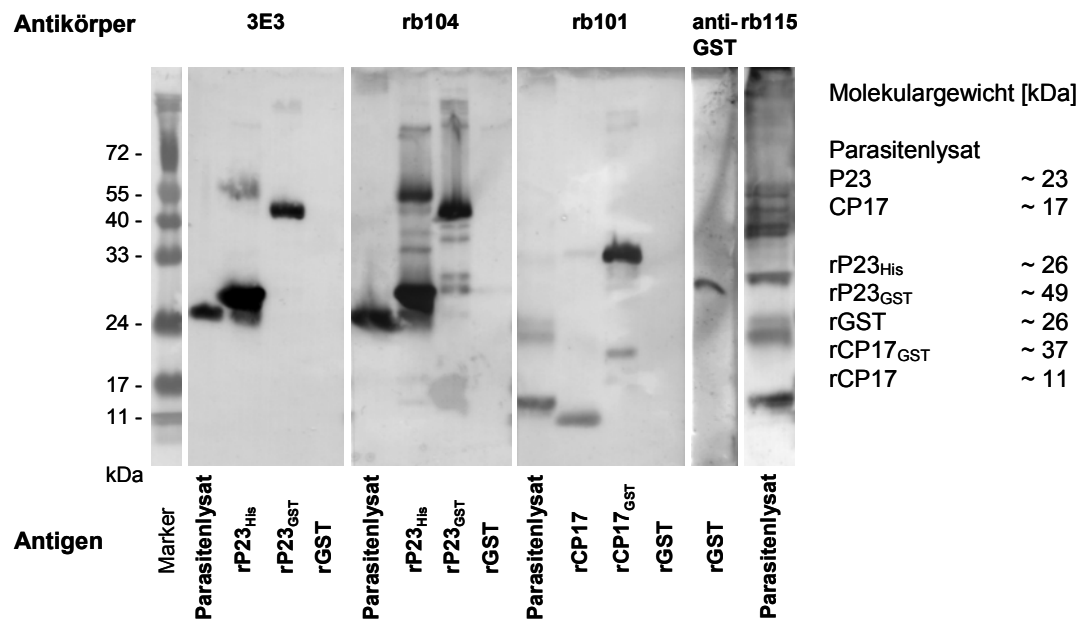


Abb. A 2: Westernblot zur Untersuchung der rekombinanten Proteine und der Reaktivität der in Kaninchen generierten Antiseren

Die verschiedenen Antigene, Parasitenlysat bzw. die in *E. coli* exprimierten und affinitätsgereinigten rekombinanten Proteine rP23_{His}, rP23_{GST}, rCP17 (nach Abtrennung des GST-Fusionspartners), rCP17_{GST} und rGST (siehe 2.4.9), wurden in einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Diese wurde mit dem mAk 3E3 (anti-P23) bzw. den im Rahmen dieser Arbeit generierten Kaninchen-Antiseren (siehe 2.5.2.2) rb104 (anti-P23), rb101 (anti-CP17) und rb115 (anti-Parasitenlysat) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

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*. J. Antimicrob. Chemother. 52: 359-364

Jakobi V & Petry F (2006) Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes encoding sporozoite surface antigens in infected HCT-8 host cells. Microbes Infect. 8: 2186-2194

Brockmann S, Jakobi V, Dreweck C, Wagner-Wiening C, Hagen R, Kimmig P & Petry F (2006) Serological analysis of an outbreak of gastroenteritis among military recruits in Germany identifies *Cryptosporidium parvum* as the causative agent. (in Bearbeitung)

Publizierte Abstracts

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*. Int. J. Med. Microbiol. 293 (S36): 231-232

Hommer V, Eichholz J & Petry F (2004) Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. Int. J. Med. Microbiol. 293 (S38): 81-82

Hübner M, Petry F, Hommer V, Najdrowski M & Zelck U (2004) Differential gene expression in *Cryptosporidium parvum* infected intestinal epithelial cells. Int. J. Med. Microbiol. 293 (S38): 94-95

Jakobi V, Kneib I & Petry F (2004) Protective immunity against *Cryptosporidium parvum* is independent of interferon-gamma and interleukin-12. Int. J. Med. Microbiol. 294 (S1): 122

Brockmann S, Jakobi V, Dreweck C, Wagner-Wiening C, Hagen R, Kimmig P & Petry F (2004) Serological analysis of an outbreak of gastroenteritis among military recruits in Germany identifies *Cryptosporidium parvum* as the causative agent. Int. J. Med. Microbiol. 294 (S1): 104

Jakobi V, Kneib I & Petry F (2005) Evaluation of interferon-gamma and interleukin-12 knockout mice as models for the development of vaccination strategies against cryptosporidiosis. Biospektrum Tagungsband zum 2. Gemeinsamen Kongress der DGHM und VAAM: 154

Jakobi V & Petry F (2006) Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes *in vitro* and *in vivo*. Int. J. Med. Microbiol. 296 (S3): 76

Kongress- und Tagungsteilnahmen (Auswahl)

- Hommer V, Morch T & Petry F (2002) Expression of *Cryptosporidium parvum* genes encoding the major parasite antigens P23, CP17 and CP15 and their use as antigens in serology tests. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaft für Parasitologie, 20.-23.3.2002, Lübeck-Travemünde
- Eichholz J, Hommer V & Petry F (2002) Effect of antiretroviral protease inhibitors on the excystation and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaft für Parasitologie, 20.-23.3.2002, Lübeck-Travemünde
- 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*. 55. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 28.9.-1.10.2003, Dresden
- Hommer V, Eichholz J & Petry F (2004) Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 17.-20.3.2004, Würzburg
- Jakobi V, Kneib I & Petry F (2004) Protective immunity against *Cryptosporidium parvum* is independent of interferon-gamma and interleukin-12. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 26.-29.9.2004, Münster
- Brockmann S, Jakobi V, Dreweck C, Wagner-Wiening C, Hagen R, Kimmig P & Petry F (2004) Serological analysis of an outbreak of gastroenteritis among military recruits in Germany identifies *Cryptosporidium parvum* as the causative agent. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 26.-29.9.2004, Münster
- Jakobi V, Kneib I & Petry F (2005) Evaluation of interferon-gamma and interleukin-12 knockout mice as models for the development of vaccination strategies against cryptosporidiosis. 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 25.-28.9.2005, Göttingen
- Jakobi V, Sisay Tessema T, Kneib I & Petry F (2006) Evaluation of interferon-gamma and interleukin-12 knockout mice as models for the development of vaccination strategies against cryptosporidiosis. 3. Annual Workshop of the COST Action 857, 17.-20.3.2006, Dresden
- Jakobi V & Petry F (2006) Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes encoding sporozoite surface antigens in infected HCT-8 host cells. 3. Annual Workshop of the COST Action 857, 17.-20.3.2006, Dresden
- Jakobi V & Petry F (2006) Differential expression of *Cryptosporidium parvum* genes *in vitro* and *in vivo*. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 1.-4.10.2006, Würzburg