

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Parasit <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.2	Epidemiologie	3
1.3	Lebenszyklus und Wirtswechsel	5
1.4	Morphologie	7
1.4.1	Oozysten	7
1.4.2	Tachyzoiten	16
1.4.3	Gewebezysten und Bradyzoiten	17
1.5	Toxoplasmose	19
1.5.1	Pathogenese	19
1.5.2	Diagnose und Therapie	20
1.5.3	Immunreaktionen	21
1.6	Stand der Wissenschaft und Technik	23
1.7	Zielsetzung	24
2	Materialien	27
2.1	Chemikalien	27
2.2	Lösungen und Puffer	31
2.3	Medien	37
2.4	Geräte	38
2.5	Kits	41
2.6	Verbrauchsmaterialien	42
2.7	Antikörper, Konjugate, Enzyme und Fluoreszenzmarker	43
2.8	Parasiten und Zelllinien	45
2.9	Computersoftware	46
2.10	Material für die chemilumineszente Detektion	47

3	Methoden	49
3.1	Biochemische Methoden	49
3.1.1	Präparation von <i>T.-gondii</i> -Oozysten-Vollantigen	49
3.1.2	Acetonfällung von Proteinen	50
3.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
3.1.4	Slot-Blot	52
3.1.5	SDS-PAGE	53
3.1.6	Silberfärbung	54
3.1.7	Immunoblot	55
3.1.8	Bestimmung der Molekulargewichte	57
3.1.9	Isotypisierung	57
3.1.10	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	58
3.1.11	Simultane Immunfluoreszenz-Analyse	60
3.1.12	Nachweis von Kohlenhydrat-Komponenten	62
3.1.13	Lektin-Bindungstest	63
3.2	Parasitologische Methoden	63
3.2.1	Aufreinigung von Oozysten im diskontinuierlichen Caesium- chlorid-Gradienten	63
3.2.2	Bestimmung der Oozysten-Konzentration und des Grades der Sporulation	66
3.2.3	Exzystierung von Sporozoiten	66
3.3	Tiere und Tierhaltung	67
3.3.1	Serumgewinnung	68
3.3.2	Immunisierung der Mäuse	68
3.4	Zellkulturmethoden	69
3.4.1	Kultivierung und Passage von <i>T.-gondii</i> -Tachyzoiten	69
3.4.2	Ernte von <i>T.-gondii</i> -Tachyzoiten	69
3.4.3	Kultivierung von Myelomzellen	70
3.4.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	70
3.4.5	Herstellen von Hybridomzellen - Fusion	71
3.4.6	Screening der Hybridomzellen	73
3.4.7	Subklonieren der Hybridomzellen	74
3.4.8	Produktion monoklonaler Antikörper	74

4	Ergebnisse	75
4.1	Etablierung eines Slot-Blots	75
4.2	Immunisierung der Mäuse	80
4.3	Screening der Hybridomzell-Kulturüberstände	82
4.3.1	Slot-Blot mit nativen <i>T. gondii</i> -Oozysten-Vollantigen	82
4.3.2	Identifizierung von drei <i>T.-gondii</i> -Antigenen im Immunoblot	83
4.3.3	Immunfluoreszenz-Analyse der Kulturüberstände auf <i>T.-gondii</i> - Oozysten, Sporozysten und Sporozoiten	84
4.3.4	Isotypisierung	91
4.4	Charakterisierung der Antigene	91
4.4.1	Bestimmung der relativen Molekulargewichte	91
4.4.2	Lokalisierung der Antigene	95
4.4.3	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit <i>T.-gondii</i> -Tachyzoiten	99
4.5	Nachweis von Kohlenhydrat-Komponenten in den Epitopen	106
4.5.1	Periodat-Oxidation von Glykoproteinen	106
4.5.2	Enzymatische Deglykosylierung von Kohlenhydrat-Komponen- ten der Glykoproteine	108
4.5.3	Nachweis von Oligosaccharid-Strukturen mittels „Fluorescein- linked Lectin Assay“	108
4.6	Kreuzreaktivität der monoklonalen Antikörper mit verwandten Para- sitien	114
4.6.1	Untersuchung der Spezifität im Immunoblot	114
4.6.2	Untersuchung der Spezifität mittels Immunfluoreszenz-Analyse	114
5	Diskussion	117
5.1	Etablierung eines Screening-Verfahrens	122
5.2	Generierung von anti- <i>T.-gondii</i> -Oozysten-Antikörpern	124
5.3	Charakterisierung der <i>T.-gondii</i> -Oozysten-Antigene	126
5.4	AG_1/6-15-2	127
5.5	AG_D3/9	134
5.6	AG_K3/7-13	136
5.7	Kohlenhydrat-Determinanten in AG_1/6-15-2, AG_D3/9 und AG_ K3/7-13	137
5.8	Bindungsstellen von Lektinen	139
5.9	Kreuzreaktivität mit nah verwandten Parasiten	142

5.10 Potenzieller diagnostischer Nutzen	144
6 Fazit und Ausblick	147
Abbildungsverzeichnis	155
Tabellenverzeichnis	157
Literaturverzeichnis	159
Danksagung	171
Erklärung	173