

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
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
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>27</b>
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

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>49</b>
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

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>75</b>
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
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>117</b>
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
<b>6 Fazit und Ausblick</b>	<b>147</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>155</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>Danksagung</b>	<b>171</b>
<b>Erklärung</b>	<b>173</b>