

**Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
(Kommissarische Leitung: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Andreas Stolle)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli

**Relative Quantifizierung immunregulatorischer Gene bei zwei
Regenbogenforellen-Linien, *Oncorhynchus mykiss*, nach der Infektion mit
Myxobolus cerebralis, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Vanessa Isabel Carmen Severin
aus Aachen

München 2007

* Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Projekts „Resistant Trout“ durch die Whirling Disease Foundation und den U.S. Fish and Wildlife Service (USA) gefördert.

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. M. El-Matbouli
Korreferent: Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Whirling Disease - Drehkrankheit der Salmoniden.....	3
2.1.1 Ätiologie.....	3
2.1.2 Pathogenese und klinische Symptome.....	9
2.1.3 Diagnose.....	11
2.1.4 Verbreitung und Vektoren.....	12
2.1.5 Infektion und Krankheitsbild beeinflussende Faktoren.....	14
2.1.6 Prävention und Bekämpfung der Drehkrankheit.....	17
2.1.7 Immunantwort des Fisches auf eine Infektion mit <i>Myxobolus cerebralis</i>	18
2.2 Ausgewählte Faktoren des unspezifischen Immunsystems.....	20
2.2.1 Arginase-2.....	20
2.2.2 Induzierbare NO-Synthase (iNOS).....	22
2.2.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandin E ₂	25
2.2.4 Interleukin-1 β (IL-1 β).....	27
2.2.5 Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β).....	29
2.2.6 Komplementfaktor C3, zentraler Faktor des Komplementsystems.....	31
3 Material und Methoden.....	37
3.1 Material.....	37
3.1.1 Haltung der Tubificiden.....	37
3.1.2 Regenbogenforellenbrütlinge (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	37
3.1.3 Haltung der Versuchsfische.....	38
3.1.4 Tierversuchsantrag.....	38
3.2 Methoden.....	38
3.2.1 Gewinnung der <i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen.....	38
3.2.2 Infektion der Tubificiden (<i>Tubifex tubifex</i>) mit <i>M. cerebralis</i> - Sporen.....	39
3.2.3 Gewinnung der Triactinomyxon- Sporen.....	39
3.2.4 Infektion der Regenbogenforellenbrütlinge (<i>O. mykiss</i>) mit Triactinomyxon-Sporen.....	39

3.2.5 Probengewinnung und –konservierung.....	40
3.2.6 RNA-Extraktion einschließlich DNase-Verdau	40
3.2.7 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	42
3.2.8 Konstruktion der Primer für die real-time RT-PCR.....	42
3.2.9 Qualitative PCR und Agarosegelelektrophorese zur Optimierung der Annealing- Temperaturen und der Primerkonzentrationen.....	44
3.2.10 Klonierung der Amplifikate	47
3.2.11 Schneiden der Plasmide mit Restriktionsenzymen	48
3.2.12 Relative Quantifizierung mittels real-time RT-PCR.....	48
4 Ergebnisse	52
4.1 Standardisierung der Reaktionen für die real-time RT-PCR	52
4.2 Relative Quantifizierung	63
4.2.1 Arginase-2	63
4.2.2 Komplementfaktor C3.....	66
4.2.3 Cyclooxygenase-2	68
4.2.4 Interleukin-1 β 1	70
4.2.5 Interleukin-1 β 2	72
4.2.6 Induzierbare NO-Synthase	74
4.2.7 Transforming-Growth-Factor- β	78
5 Diskussion	79
6 Zusammenfassung.....	88
7 Summary	90
8 Literaturverzeichnis.....	92
9 Anhang	131
9.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der real-time RT-PCR Daten.....	131
9.2 Abkürzungsverzeichnis	141
Danksagung.....	144
Curriculum Vitae.....	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von <i>Myxobolus cerebralis</i> im salmoniden Wirt (Nach: El-Matbouli et al. 1995).	5
Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von <i>Myxobolus cerebralis</i> im oligochäten Wirt (Nach: El-Matbouli & Hoffmann 1998).	7
Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der Triactinomyxon-Spore von <i>Myxobolus cerebralis</i> nach El-Matbouli (1996).	8
Abbildung 2-4 Schematischer Aufbau der Myxospore von <i>Myxobolus cerebralis</i> nach El-Matbouli (1996).	9
Abbildung 2-5 Schematische Darstellung der drei Reaktionswege der Komplementaktivierung bei Säugetieren (Nach Holland & Lambris 2002). Die Funktionen der Faktoren werden im Text dargestellt.	33
Abbildung 4-1 β -Actin: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).	53
Abbildung 4-2 Arginase-2: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).	55
Abbildung 4-3 C3: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).	56
Abbildung 4-4 COX-2: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).	57

Abbildung 4-5 IL-1 β 1: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}$ C)).	58
Abbildung 4-6 IL-1 β 2: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}$ C)).	59
Abbildung 4-7 iNOS: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}$ C)).	61
Abbildung 4-8 TGF- β : A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}$ C)).	62
Abbildung 4-9 Relative Expression von Arginase-2 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.	65
Abbildung 4-10 Relative Expression des Komplementfaktors C3 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.	67
Abbildung 4-11 Relative Expression von COX-2 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression	

(n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.	69
Abbildung 4-12 Relative Expression von IL-1 β 1 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.	71
Abbildung 4-13 Relative Expression von IL-1 β 2 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.	73
Abbildung 4-14 Relative Expression von iNOS in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.	75
Abbildung 4-15 Relative Expression von TGF- β in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Alle in der real-time RT-PCR verwendeten Primerpaare, einschließlich der Länge des jeweiligen Ampliconprodukts in Basenpaaren (bp) und der Accession-Nummer der NCBI-Datenbank (Bezeichnung F: forward, R: reverse).....	43
Tabelle 3-2 Übersicht über die gewählten Programme für alle Primerpaare im Thermocycler bei der qualitativen PCR.	46
Tabelle 3-3 Temperaturprogramm der real-time RT-PCR für β -Actin mit anschließender Schmelzkurvenanalyse	50
Tabelle 3-4 Temperaturprogramm der real-time RT-PCR für Arg-2, C3, COX-2, IL-1 β 1, IL-1 β 2, iNOS und TGF- β mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.....	51
Tabelle 9-1 Daten der PCR-Läufe für Arginase-2	131
Tabelle 9-2 Daten der PCR-Läufe für C3	132
Tabelle 9-3 Daten der PCR-Läufe für COX-2	134
Tabelle 9-4 Daten der PCR-Läufe für IL-1 β 1	135
Tabelle 9-5 Daten der PCR-Läufe für IL-1 β 2.....	136
Tabelle 9-6 Daten der PCR-Läufe für iNOS.....	138
Tabelle 9-7 Daten der PCR-Läufe für TGF- β	139

1 Einleitung

1898 wurde erstmals bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die aus Nordamerika in eine Zucht nach Süddeutschland eingeführt worden waren, die Drehkrankheit der Salmoniden beobachtet (Hofer 1903). Die Krankheit wird durch den Parasiten *Myxobolus cerebralis*, einen Vertreter des Stammes der Myxozoa ausgelöst. Man nimmt an, dass sich *M. cerebralis* ursprünglich als Parasit bei Bachforellen, bei denen die Infektion zumeist symptomlos verläuft, entwickelte (Hoffman 1970). Vermutlich durch den weltweiten Fischhandel konnte sich die Drehkrankheit über Europa bis nach Nordamerika ausbreiten (Hoffman 1970, El-Matbouli et al. 1992). Die Drehkrankheit stellt eine wichtige parasitische Erkrankung von Salmoniden dar, die in den Ländern mit Intensiv-Zuchten von Salmoniden zunehmend zum Problem wird. Nach der ersten Beobachtung in Nordamerika, bei einer Fischzucht in Pennsylvania 1956, hat sie sich in den USA stetig nach Süden und Westen verbreitet (Bergersen & Anderson 1997). Aber sie ist nicht nur ein Problem der Fischzuchten, sondern führt auch zu einem enormen Rückgang der wilden Regenbogenbestände in Nordamerika und ist damit zu einer ernsthaften Bedrohung geworden (Nehring & Walker 1996, Vincent 1996, Hedrick et al. 1998).

Nicht nur zwischen verschiedenen Salmonidenarten, von denen die Regenbogenforelle eine der empfänglichsten zu sein scheint (MacConnell & Vincent 2002), sondern auch zwischen verschiedenen Regenbogenforellen-Linien, besonders einer deutschen Zuchtlinie (H) und einer amerikanischen Linie (T), konnten Unterschiede in der Empfänglichkeit nachgewiesen werden (El-Matbouli et al. 2002, Hedrick et al. 2003).

Ein wichtiger Forschungsbereich auf dem Gebiet der Drehkrankheit ist die Untersuchung der Resistenzmechanismen und die Infektionsprävention, von denen man sich wichtige Erkenntnisse für die Zukunft erhofft. Am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der LMU München werden diese Untersuchungen in Zusammenarbeit vor allem mit Instituten in den USA, aber auch in Spanien durchgeführt.

Bis heute sind die genauen Mechanismen, denen die unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit der Drehkrankheit zugrunde liegt, unbekannt. Da der spezifische Teil des Immunsystems bei Fischen weniger gut entwickelt ist, als bei Säugetieren, kommt dem unspezifischen Teil des Immunsystems bei Fischen eine bedeutende Rolle zu (Ingram 1980). Man vermutet, dass unspezifische Immunmechanismen eine

Möglichkeit für die Ausbildung einer Resistenz gegen die Drehkrankheit sein könnten (Ryce et al. 2005).

Die Identifikation und Charakterisierung zahlreicher Cytokine und anderer immunregulatorischer Gene von Fischen in den letzten Jahren, ermöglichte die Untersuchung dieser Gene während Krankheitsprozessen. Studien, die sich mit dem unspezifischen Immunsystem von Knochenfischen während der Infektion mit verschiedenen Pathogenen beschäftigen, werden in den letzten Jahren in zunehmender Anzahl publiziert. Dennoch befindet sich die Forschung auf diesem Gebiet erst in den Anfängen und weiterführende Untersuchungen hierzu werden künftig erforderlich sein.

In der vorliegenden Arbeit wird die Reaktion des unspezifischen Immunsystems auf die experimentelle Infektion von zwei unterschiedlichen Regenbogenforellen-Linien mit *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, unter kontrollierten Laborbedingungen, anhand von sieben immunregulatorischen Genen beschrieben. Unter Verwendung der relativen Quantifizierung mittels real-time RT-PCR wird die Expression von Arginase-2, dem Komplementfaktor C3, COX-2, zwei Isoformen von IL-1 β (IL-1 β 1 und IL-1 β 2), sowie iNOS und TGF- β über einen Zeitraum von 200 Tagen untersucht. Für die Infektion wurden zwei Regenbogenforellen-Linien mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für *M. cerebralis* ausgewählt: Eine sehr empfängliche nordamerikanische Linie (Linie T) und eine deutsche Zuchtlinie (Linie H) mit einer bekannten, gesteigerten Resistenz gegenüber der Drehkrankheit (Küppers 2003, Hedrick et al. 2003).

2 Literaturübersicht

2.1 Whirling Disease - Drehkrankheit der Salmoniden

2.1.1 Ätiologie

Die Drehkrankheit der Salmoniden wurde, nach der ersten Beobachtung von Prof. Bruno Hofer im Jahre 1898 in Süddeutschland, beschrieben (Hofer 1903). Sie wird durch *Myxobolus cerebralis* ausgelöst.

2.1.1.1 Taxonomische Einteilung

Myxobolus cerebralis, der Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, wird zum Stamm der Myxozoa (Grassé 1970) gezählt, aus dem über 1350 Arten bekannt sind, die bei Fischen parasitieren (Lom & Dyková 1992). Die Myxozoa bilden eine vielfältige Gruppe mehrzelliger Organismen. Früher wurden sie zu den Protozoen gezählt; neue Studien jedoch weisen durch molekularbiologische Methoden und Gensequenzen auf eine Verwandtschaft mit den Bilateria (Smothers et al. 1994; Schlegel et al. 1996) oder auch den Cnidaria (Sidall et al. 1995; Zrzavy 2001; Uspenskaia & Raikova 2001; Raikova 2005) hin. Ferner wurde eine neue Einteilung der Myxozoa zum Phylum Cnidaria vorgeschlagen (Sidall et al. 1995; Raikova 2005).

Myxobolus cerebralis wird weiterhin der Ordnung Bivalvulida, Unterordnung Platysporina, Familie Myxobolidae und schließlich der Gattung *Myxobolus* zugeordnet (Kent et al. 2001). *Myxobolus* ist bislang die größte der 52 Gattungen im Phylum Myxozoa. *M. cerebralis* unterscheidet sich von anderen *Myxobolus* spp. dadurch, dass dieser Parasit eine bei jungen Salmoniden lebensbedrohliche Krankheit auslöst (Lom & Dyková 1992). Phylogenetische Vergleiche von ribosomaler DNA der Myxozoa ziehen Überlegungen einer von anderen *Myxobolus* spp. separaten Entwicklung nach sich (Hedrick & El-Matbouli 2002). Überschlägige genetische Studien der ITS-Region in der ribosomalen DNA von einigen *M. cerebralis*-Isolaten aus verschiedenen Regionen untermauern die Theorie von der Einschleppung des Parasiten nach Nordamerika in jüngster Zeit (Andree et al. 1999).

2.1.1.2 Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis*

Nach der Entdeckung des Erregers blieb der Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* noch lange unbekannt. Erst Wolf und Markiw (1984) klärten die Rolle von Oligochäten als Wirt auf und entdeckten, dass dem Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* zwei Wirte und zwei verschiedene Sporen, von denen man zuvor glaubte, dass sie eigenständige Organismen mit einwirtigen Zyklen seien, zugrunde liegen: Die Myxospore, die im Fischwirt gebildet wird und daraufhin den Oligochäten-Wirt *Tubifex tubifex* infiziert und die Triactinomyxon-Spore die im Oligochäten gebildet und ausgeschieden wird und dann für Salmoniden infektiös ist (Markiw & Wolf 1983, Wolf & Markiw 1984, Wolf et al. 1986). Bis die Versuche von El-Matbouli und Hoffmann (1989) wiederholt und bestätigt wurden und molekularbiologische Studien weitere Beweise dafür lieferten, dass Myxospore und Triactinomyxon-Spore zwei Stadien des selben Parasiten sind (Markiw 1989, Andree et al. 1997), wurden diese Ergebnisse noch angezweifelt.

Die heutige Vorstellung über den Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* basiert auf den Erkenntnissen der Studien von Mandok (1993), El-Matbouli et al. (1995) und El-Matbouli und Hoffmann (1998).

2.1.1.2.1 Entwicklung im salmoniden Wirt

Die von dem oligochäten Wirt *Tubifex tubifex* ausgeschiedenen Triactinomyxon-Sporen stellen das infektiöse Stadium für Salmoniden dar. Da tote und anästhetisierte Fische sowie Teile von ihnen keine Extrusion der Polfilamente hervorriefen, nahm man an, dass die Kontrollmechanismen dafür von chemischen und mechanischen Reizen stimuliert werden (El-Matbouli et al. 1999a). Kallert et al. (2005) konnten erstmals nachweisen, dass die Polfadenreaktion der Triactinomyxon-Sporen durch eine Kombination von chemischen und mechanischen Signalen des Wirtes hervorgerufen wird. Die Reaktion wurde nur dann ausgelöst, wenn dem mechanischen Reiz ein chemischer folgte. Eine Wirtsspezifität konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden. Anheftung und Penetration sind sehr schnell ablaufende Prozesse, die sich in den ersten Sekunden des Kontaktes mit dem Fischwirt ereignen. Nach der Anheftung penetriert der 64-zellige Amöboidkeim den Wirt aktiv als intakte Einheit. Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass die Penetration vor allem durch die sekretorischen Öffnungen von Mucuszellen der Epidermis, außerdem auf dem respiratorischen Epithel und in der Schleimhaut der Mundhöhle, stattfindet (El-Matbouli et al.

1999a). Neben der mechanischen Schädigung, scheinen Serin- und Cystein-Proteasen, die von dem Amöboidkeim abgesondert werden, dies noch zu erleichtern (Hedrick & El-Matbouli 2002). Kelley et al. (2003, 2004a) fanden Serin-, wie auch Cystein-Proteasen, die sowohl bei der Penetration und Invasion, als auch bei der Lysis des Knorpelgewebes eine Rolle zu spielen schienen. Schon 5 Minuten nach der Exposition hat der Amöboidkeim die Schalenzellen der *Triactinomyxon*-Spore verlassen und befindet sich in der Epidermis (El-Matbouli et al. 1995). Im salmoniden Wirt (Zwischenwirt) unterliegen die Keimzellen einer 2-phasigen Entwicklung: einer präsporogonischen Phase und einer Sporogonie (Mandok 1993, El-Matbouli et al. 1995, El-Matbouli 1996). Die Entwicklung im salmoniden Wirt ist in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt.

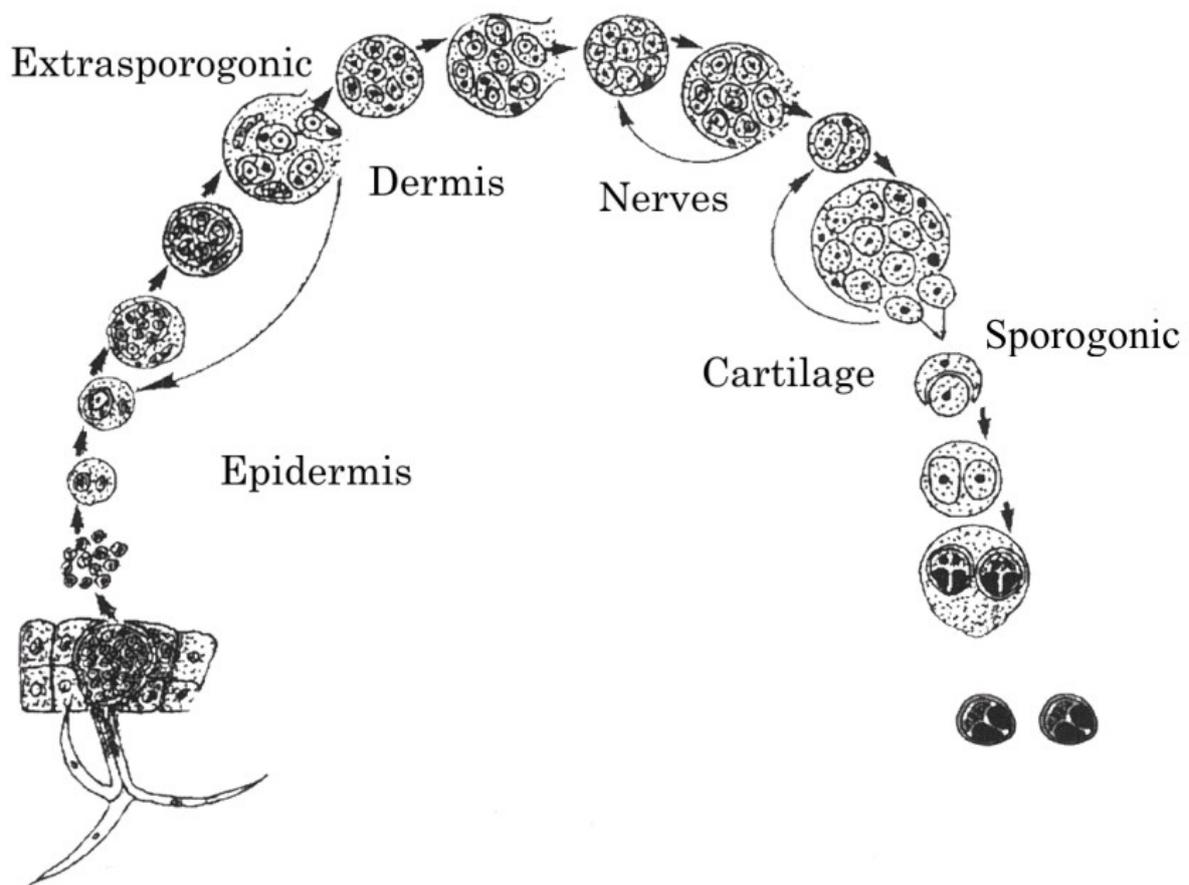


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis* im salmoniden Wirt (Nach: El-Matbouli et al. 1995).

Anders als bei der Entwicklung im *Tubifex tubifex*, treten bei der Entwicklung im salmoniden Wirt inter- und intrazelluläre Stadien auf. Schon nach 24 Stunden sind nur noch wenige Parasitenstadien in der Epidermis aufzufinden; nach 2 Tagen sind sie im interzellulären Gewebe der Subcutis zu finden (El-Matbouli et al. 1995). Vier bis 24 Tage nach der

Exposition werden die Parasitenstadien im Nervengewebe beobachtet, zuerst in den peripheren Nerven, später zwischen den Ganglien und im Zentralnervensystem, wo sie eine endogene Teilung durchführen. Zwischen dem sechsten und vierzehnten Tag nach der Exposition werden sie im Rückenmark, zwischen dem 16. und 24. Tag im Gehirn angetroffen. Von dort aus wandern die Stadien in die Knorpelansammlungen in Wirbelsäule und Kraniaum (El-Matbouli et al. 1995). Ab dem 20. Tag p. exp. beginnt dort die Sporogonie; das entstehende mehrzellige Parasitenstadium wird als Plasmodium bezeichnet und kann ab dem 40. Tag p. exp. nachgewiesen werden. Nach mehrmaliger Wiederholung der Vorgänge kommt es zu einer Verschmelzung, eine somatische Zelle umhüllt eine generative Zelle; das entstehende Stadium wird Pansporoblast genannt. Nach weiteren mitotischen Teilungen bilden sich die Myxosporen von *Myxobolus cerebralis*. Ein histologischer Nachweis dieser für Oligochäten infektiösen Stadien ist ab dem 90. Tag p.exp. möglich (El-Matbouli et al. 1992). Die Freisetzung der infektiösen Myxosporen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: Wenn der infizierte Fisch von einem anderen Tier gefressen wird und die Sporen dann mit dem Kot wieder in das Wasser gelangen (El-Matbouli & Hoffmann 1991a) und nach dem Tod des Fisches, wenn er sich zersetzt. Bei Laborstudien mit lebenden Bachforellen (*Salmo trutta*) ergaben sich Hinweise, dass diese lebensfähige Myxosporen abgeben (Nehring et al. 2002). Die Myxosporen von *Myxobolus cerebralis* können bis zu 12 Jahre lang infektiös bleiben, bevor sie ihren Endwirt infizieren (Schäperclaus 1954).

2.1.1.2.2 Entwicklung im oligochäten Wirt

Für die Fortsetzung des Lebenszykluses von *Myxobolus cerebralis*, müssen die infektiösen Myxosporen von empfänglichen Oligochäten, *Tubifex tubifex*, mit der Nahrung aufgenommen werden (Wolf et al. 1986, El-Matbouli & Hoffmann 1989). Im Lumen des Intestinaltraktes des Oligochäten, schleudern die Sporen ihre Polfilamente aus und heften sich an die Mukosa des Darmes an. Die auslösenden Stimuli sind noch unbekannt, könnten aber denen für die Anheftung der Triactinomyxon-Spore an den Fischwirt ähneln. Die Schalenzellen öffnen sich und der generative, zweikernige Amöboidkeim dringt in den Interzellularraum zwischen den Darmzellen ein, wo er, im Gegensatz zu seiner Wanderung im Fischwirt, alle Entwicklungsstadien im Oligochäten durchlaufen wird (El-Matbouli & Hoffmann 1998; Antonio et al. 1999). Die Entwicklung im oligochäten Wirt ist in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt.

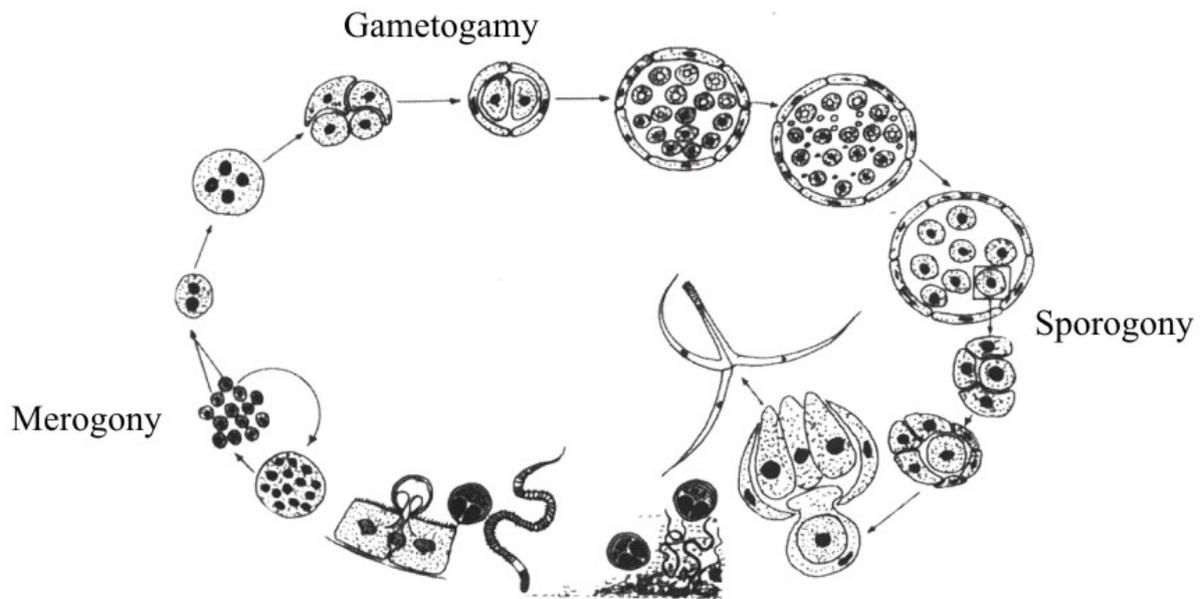


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis* im oligochäten Wirt (Nach: El-Matbouli & Hoffmann 1998).

Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass sich der Parasit in *Tubifex tubifex* asexuell vermehrt, gilt es heute als erwiesen, dass der asexuellen Schizogonie eine Phase geschlechtlicher Vermehrung (Gametogonie) folgt (El-Matbouli & Hoffmann 1998). Die Schizogonie findet 5 bis 25 Tage nach der Infektion statt. Nach etlichen Teilungen entsteht ein Reservoir von nicht differenzierten Zellen für die Gametogonie und die daran anschließende Sporogonie (El-Matbouli & Hoffmann 1998). Zwischen 25 und 46 Tagen nach der Infektion entstehen durch multiple Teilungen Pansporozysten, die aus zwei äußeren somatischen und zwei inneren generativen Zellen bestehen. Aus diesen generativen Zellen bilden sich haploide α - und β -Gametozyten aus (El-Matbouli et al. 1998). Mit dem Nachweis einer sexuellen Vermehrung im Oligochäten wurde die These, dass Salmoniden den Endwirt von *M. cerebralis* darstellen, wiederlegt. Mit der Fusion der α - und β -Gametozyten zu diploiden Zygoten, beginnt die letzte Phase der Entwicklung im Endwirt, die Sporogonie. Jede diploide Zygote wird, nach folgenden Teilungen und Zelldifferenzierung, zu einer einzelnen Triactinomyxon-Spore (TAM) (El-Matbouli & Hoffmann 1998). Nach einer Zeit von 74-120 Tagen seit der Infektion des Oligochäten mit Myxosporen (Markiw 1986, El-Matbouli & Hoffmann 1998, Gilbert & Granath 2001, Stevens et al. 2001) gelangen die Triactinomyxon-Sporen, nach der Ruptur der Wand der Pansporozyste, in das Darmlumen. Von dort werden sie mit dem Kot in das Wasser ausgeschieden (Gilbert & Granath 2001), womit sich der Entwicklungszyklus schließt. Die Triactinomyxon-Sporen werden unter

Laborbedingungen mit wechselnder Intensität über ein Jahr lang, mit einem Maximum bei 130 Tagen, produziert (Markiw 1986). Eine eindeutige Korrelation zwischen von pro Wurm aufgenommenen Myxosporen und der optimalen Produktion von Triactinomyxon-Sporen, gibt es jedoch nicht (Markiw 1986; Stevens et al. 2001).

2.1.1.3 Morphologie

2.1.1.3.1 Morphologie der Triactinomyxon-Spore von *Myxobolus cerebralis*

Die Triactinomyxon-Spore besteht aus einem 145µm ($\pm 10\mu\text{m}$) langen Sporenstiel an den sich die drei charakteristischen 193µm langen Fortsätze ankerförmig anschließen (El-Matbouli & Hoffmann 1998). Nach dem Ausscheiden der Spore in das Wasser entfalten sich diese Fortsätze osmotisch bedingt, so dass diese im Wasser flotieren können. Der Sporenstiel enthält einen generativen Amöboidkeim, der seinerseits aus 64 Amöboidkeimzellen besteht. Die drei Polkapseln, die sich an dem den Fortsätzen gegenüberliegenden Ende befinden, enthalten je ein spiralförmiges Polfilament (El-Matbouli & Hoffmann 1998). Dies dient, wie oben beschrieben, nach dem Ausschleudern dem Anheften an die Epidermis des Fisches (El-Matbouli et al. 1995). Die Triactinomyxon-Spore hat eine relativ geringe Tenazität und aufgrund ihres Aufbaus anfällig für osmotische Veränderungen (Hedrick et al. 1998, El-Matbouli et al. 1999b) In Abbildung 2-3 findet sich eine schematische Darstellung des Aufbaus einer Triactinomyxon-Spore.

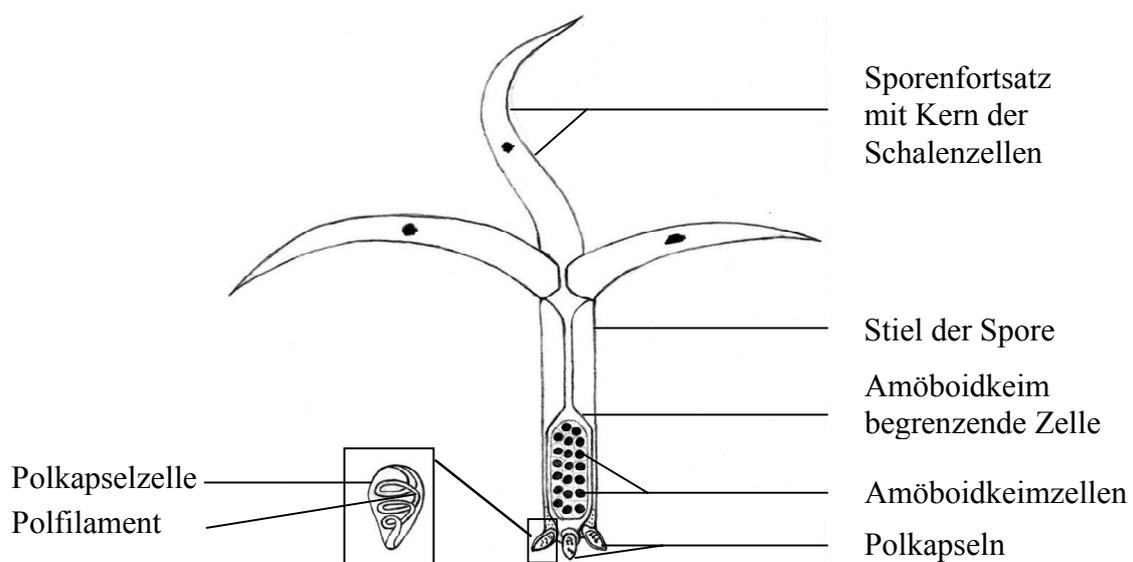


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der Triactinomyxon-Spore von *Myxobolus cerebralis* nach El-Matbouli (1996).

2.1.1.3.2 Morphologie der Myxospore von *Myxobolus cerebralis*

Die Myxosporen von *Myxobolus cerebralis* haben in der Aufsicht eine fast runde bis ovale Gestalt, von der Seite gesehen sind sie linsenförmig abgeflacht. Sie sind 9,7µm lang, 8,5µm breit und weisen eine Dicke zwischen 6,2 und 7µm auf. Die Myxospore besteht aus zwei Schalenzellen, die in der Äquatorialen zusammenhaften und zwei Polkapselzellen (4,2 x 3,1µm) mit Ausstülpungsöffnungen an der Nahtlinie der Schalenzellen. In den Polkapselzellen befindet sich jeweils ein, in 5 bis 6 Windungen spiralg aufgerolltes Polfilament. Außerdem enthält jede Spore einen zweikernigen Amöboidkeim (Lom & Hoffmann 1971).

Die Myxospore hat eine ausgesprochen hohe Tenazität und ist sehr resistent gegenüber extremen Umwelteinflüssen. Zahlreiche Studien untersuchten ihre Widerstandsfähigkeit durch Einfrieren, Trocknen und die Behandlung mit verschiedenen Desinfektionsmitteln (Hoffmann & Putz 1969, 1971, Hoffman & Hoffman 1972, Hoffman & O'Grudnick 1977, Wolf & Markiw 1982, El-Matbouli & Hoffmann 1991a). In Abbildung 2-4 findet sich eine schematische Darstellung des Aufbaus einer Myxospore.

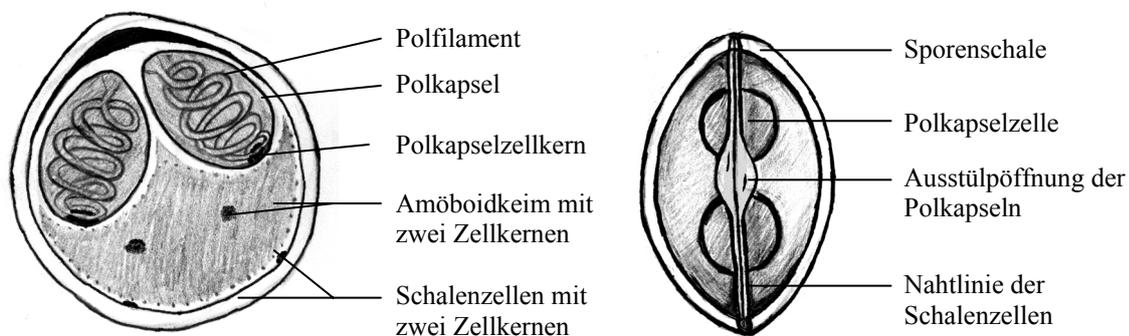


Abbildung 2-4 Schematischer Aufbau der Myxospore von *Myxobolus cerebralis* nach El-Matbouli (1996)

2.1.2 Pathogenese und klinische Symptome

Das Nervengewebe, in dem sich der Parasit im Verlauf der Infektion befindet, erscheint normal und ohne Reaktion des Gewebes. Es wird vermutet, dass sich der Parasit dort der Immunreaktion des Wirtes entziehen kann (MacConnell & Vincent 2002). Erst wenn die Trophoziten während ihrer Vermehrung Knorpelgewebe lysieren (El-Matbouli et al. 1995),

wird die zelluläre Immunantwort des Fischwirtes ausgelöst. Man vermutet, dass die Sporen den Knorpel mit Hilfe von Proteasen lysieren (Kelley et al. 2003, 2004a). Morris et al. (2004) fanden ein Antigen, ursprünglich für *Tetracapsuloides bryosalmonae* entwickelt, das in den Knorpel von den Sporen und sporogonischen Stadien im Fisch in das umliegende Gewebe abgegeben wird. An Stellen mit massiver Lysis des Knorpelgewebes kann eine große Anzahl Makrophagen beobachtet werden (El-Matbouli et al. 1995).

In Regenbogenforellen werden die Trophozoiten anfänglich (weniger als einen Monat nach der Exposition) in kleinen Knorpelläsionen gefunden. Es liegen dann nur ein kleiner Schaden am Gewebe und kaum entzündliche Reaktionen vor. Bei fortschreitender Infektion (2 Monate nach der Exposition) und einer weiteren Vermehrung des Parasiten, treten zunehmend großflächige Knorpeldegeneration und Nekrosen auf. Damit verbunden werden umliegend Makrophagen und mononukleäre Leukozyten beobachtet (El-Matbouli et al. 1995, MacConnell & Vincent 2002).

Diese Zerstörung des juvenilen Knorpels führt im weiteren Verlauf zu Störungen in der Ossifikation (Bechara et al. 2003), was sich in bleibenden Deformationen des Knochens äußert. Es werden Deformationen von Kraniaum, Kiefer, Opercula, Flossen und Wirbelsäule beobachtet (Plehn 1905, Schäperclaus 1931, Hoffman et al. 1962, Christensen 1966).

Bei adulten Tieren wurden Sporen in isolierten Abkapselungen gefunden, die nur sehr selten mit Entzündungen verbunden waren. Die Deformationen des Skelettes werden auch für ein weiteres Symptom verantwortlich gemacht. Wenn der Parasit den Knorpel der Wirbelsäule im kaudalen Bereich befallen hat, wird durch ringförmige Einschnürungen Druck auf die Nerven ausgeübt, die die Pigmentzellen im Bereich des Schwanzes innervieren und es entsteht eine Schwarzfärbung des Schwanzbereiches (Schäperclaus 1954, Hoffman et al. 1962, Hoffman 1966, Halliday 1976).

Das letzte Kardinalsymptom ist das pathologische Schwimmverhalten mit schnellen Drehungen um die Körperachse, das für die Krankheit namensgebend war. Zunächst vermutete man als Ursache eine Beschädigung des Vestibularorgans durch Deformationen im Bereich des Kraniaums (Hoffman & Dunbar 1961, Schäperclaus 1986). Rose et al. (2000) konnten zeigen, dass das Drehverhalten infizierter Fische eine neuropathologische Folge von Einschnürungen der Wirbelsäule und kranial des Hirnstammes ist. Sie fanden in diesem Bereich granulomatöse Entzündungen, assoziiert mit dem Parasiten, die sich in den Perineuralraum erstreckten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Fische mit zerstörtem Vestibularorgan ein von der Drehkrankheit völlig verschiedenes Schwimmverhalten aufwiesen (Rose et al. 2000). Unter Laborbedingungen konnte beobachtet

werden, dass sich das pathologische Schwimmverhalten und die Schwarzfärbung des Schwanzbereiches zurückbilden können, die skelettalen Deformationen aber erhalten bleiben (El-Matbouli et al. 1992).

Das Zusammenspiel der beschriebenen Symptome führt zur Beeinträchtigung sowohl des Schwimmens, was die Flucht vor Fressfeinden einschließt, als auch des Fressverhaltens; so kann die Drehkrankheit bei stark infizierten Fischen mittelbar oder unmittelbar zum Tod führen (Hedrick et al. 1998).

2.1.3 Diagnose

Eine Verdachtsdiagnose lässt sich beim Auftreten der für die Drehkrankheit charakteristischen Symptome bereits stellen, wenn entweder akut das pathologische Schwimmverhalten mit Drehungen um die eigene Körperachse und Schwarzverfärbungen des Schwanzbereiches auftreten, oder aber chronisch Deformationen des Skelettes beobachtet werden (Thoesen 1994). Die Symptome können ab 60 Tagen nach der Infektion auftreten (Wolf & Markiw 1975). Allein aufgrund der Symptome müssen weitere Krankheiten als Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden: Haltungs- und ernährungsbedingte Mängel, Ascorbinsäure- und Tryptophanmangel und eine Infektion mit *Flexibacter psychrophila* können neben genetischen Ursachen zu Skelettdeformationen bei Fischen führen (Halliday 1973b, Wolf et al. 1981, Margolis et al. 1996). Pathologisches Schwimmverhalten wird auch bei der Infektiösen Pankreasnekrose (IPN), der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und bei Enteritiden beschrieben (Plehn 1905, Halliday 1973a).

Eine definitive Diagnose setzt jedoch den Nachweis der Myxosporen von *Myxobolus cerebralis* im Knorpel voraus. Natives Knorpelmaterial (z.B. aus dem Operculum) wird zerkleinert und auf einem Objektträger unter einem Lichtmikroskop begutachtet (Hoffman et al. 1968). Der Nachweis im Nativpräparat kann mit dem Nachweis von Sporenstadien in histologischen Schnitten untermauert werden. Schäperclaus (1931) schlägt eine Färbung mit Methylenblau oder Giemsa vor, Thoesen (1994) eine Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE). Zur Anreicherung der Myxosporen aus dem Fischgewebe entwickelten Markiw & Wolf (1974a, b) eine enzymatische Verdaumethode mittels Pepsin und Trypsin. Eine weitere Möglichkeit zur Konzentration der Sporen ist die Verwendung einer Planktonzentrifuge (O'Grodnick 1975a) oder eine Kombination dieser Methoden (Markiw & Wolf 1980). Für eine sichere Abgrenzung zu anderen *Myxobolus spp.* und um eine Verwechslung

auszuschließen, bedarf es jedoch eines erfahrenen Parasitologen. Der spezifische Nachweis kann mittels direktem und indirektem Fluoreszenz-Antikörpertest (Markiw & Wolf 1978, Griffin & Davis 1978), Immunperoxidase-gekoppelten Antikörpern (Hoffmann et al. 1991) und *in situ* Hybridisation (ISH) (Nuovo 1994, Antonio et al. 1998, 1999) erbracht werden. Für den molekularbiologischen Nachweis mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden verschiedene Protokolle entwickelt: Andree et al. (1998) entwickelten eine nested-PCR, Baldwin & Myklebust (2002) eine single-round PCR, Kelley et al. (2004b) und Cavender et al. (2004) Protokolle für den quantitativen Nachweis mittels real-time PCR. El-Matbouli & Soliman (2005) konnten *Myxobolus cerebralis* anhand eines schnellen Assays unter Verwendung der Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) nachweisen. Skirpstunas et al. (2006) wiesen *M. cerebralis* in frühen Stadien der Infektion mit nicht-lethalen Biopsien aus den Flossen und anschließender PCR nach. Als weitere nicht-lethale Methode zum Nachweis von *M. cerebralis* in infizierten Fischen wurde ein enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) entwickelt (Adkison et al. 2005).

2.1.4 Verbreitung und Vektoren

Myxobolus cerebralis wurde zum ersten Mal von Hofer (1903) beschrieben, nachdem Symptome der Krankheit bei, aus Nordamerika importierten Regenbogenforellen, in Süddeutschland beobachtet worden waren. Es wird angenommen, dass sich *M. cerebralis* ursprünglich als Parasit bei Bachforellen entwickelte (Hoffman 1970), bei denen die Infektion normalerweise ohne Symptome verläuft. Erst die Einfuhr von nicht einheimischen Regenbogenforellen führte zur Entdeckung des Erregers. *M. cerebralis* wurde in Nordamerika das erste Mal 1956 in einer Fischzucht in Pennsylvania verzeichnet, eingeschleppt durch infizierte Forellen aus Europa, und hat sich seitdem stetig nach Süden und Westen verbreitet (Bergersen & Anderson 1997).

Die Drehkrankheit stellt in fast allen salmoniden-produzierenden Ländern mit Forellen-Intensivhaltung ein sehr bedeutendes, wirtschaftliches Problem dar. Neben den USA und Europa konnte der Parasit in der ehemaligen Sowjetunion, Südafrika und Neuseeland nachgewiesen werden (Hoffman 1970, Halliday 1976). Nur Südamerika scheint bislang von der Drehkrankheit nicht betroffen zu sein (Hedrick et al. 1998). In Nordamerika führt diese Krankheit vor allem seit Beginn der 90er Jahre zu einem enormen Rückgang der Regenbogenforellenbestände (*Oncorhynchus mykiss*) (Hedrick et al. 1998, Nehring & Walker 1996, Vincent 1996). Außerdem können dort einige bereits bedrohte Arten (*O. clarki*, *S.*

confluentus, anadrome Stahlkopfforellen *O. mykiss*) von *M. cerebralis* infiziert werden, was ihre Lage weiter verschlechtert (Gilbert & Granath 2003). Bisläng wurde die Drehkrankheit in 22 Staaten der USA und 26 Ländern beobachtet (Vincent 1996, Hoffman 1990, Bartholomew & Reno 2002).

Ein wesentlicher Faktor für die Verbreitung der Drehkrankheit ist die Bewegung von lebenden Fischen in ihrem Lebensraum. In infizierten Fischen kann sich *M. cerebralis* sowohl flussaufwärts als auch -abwärts ausbreiten, während die in das Wasser abgegebenen Triactinomyxon-Sporen sich ausschließlich mit der Strömung fortbewegen können. Yoder (1972) beschrieb, dass sich die Drehkrankheit über einen Zeitraum von 3 Jahren ausgehend von einem ersten Infektionsort bei einer Brutanstalt 9,6km stromabwärts und 500m stromaufwärts verbreitete. In den USA hat sich die Drehkrankheit vermutlich vor allem durch den Transfer von lebenden Fischen und die Bewegungen infizierter Fische in den Flüssen ausgebreitet (Hoffman 1990). Die Drehkrankheit könnte auch durch den Handel mit frischen, gefrorenen oder gepökelten Fischprodukten verbreitet worden sein. Hoffman (1990) vermutete, dass *M. cerebralis* durch infizierte Forellenfilets in die USA eingeschleppt wurde. Bei einer Temperatur von -20°C können die Myxosporen drei Monate lebensfähig bleiben (El-Matbouli & Hoffmann 1991a). Während heißes Räuchern bei einer Temperatur von 66°C die Sporen abtötet, enthält gepökelter Fisch noch lebensfähige Sporen (Wolf & Markiw 1982). Zwar wird *M. cerebralis* weder vertikal übertragen noch werden Eier im Augenpunktstadium nach einer Exposition mit Triactinomyxon-Sporen infiziert (Markiw 1991, O'Grodnick 1975b), dennoch ist eine Ausbreitung durch kontaminierte Transporte von Eiern möglich (Hoffman 1990). Raubtiere, die infizierte Fische gefressen haben, könnten die Sporen auch in neuen Gewässern verbreiten. Es konnte nachgewiesen werden, dass Sporen von *M. cerebralis* Darmpassagen bei Wasservögeln und Raubfischen überleben (Meyers et al. 1970, Taylor & Lott 1978, El-Matbouli & Hoffmann 1991a). Mäuse hingegen, als Model für Säugetiere, können als Vektoren für *M. cerebralis* ausgeschlossen werden, da die Sporen die Darmpassage nicht überleben (El-Matbouli et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit für die Verbreitung der Drehkrankheit ist der Handel mit Oligochäten als Lebendfutter. In verschiedenen Studien wurden Oligochäten aus Tierhandlungen auf Myxozoa untersucht, die aus Ost-Europa stammten (Hallett et al. 2003, 2004, 2005, 2006, Lowers & Bartholomew 2003). Es konnten 19 verschiedene Arten nachgewiesen werden.

2.1.5 Infektion und Krankheitsbild beeinflussende Faktoren

2.1.5.1 Alter und Größe des Fisches

Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass die Ausprägung von Symptomen der Drehkrankheit nach einer Erstinfektion mit *Myxobolus cerebralis* mit steigender Größe (O'Grodnick 1979) oder steigendem Alter (Markiw 1992a) zurückgeht. Forellen mit einem höherem mittleren Gewicht bei der Infektion weisen bessere Überlebensraten auf (Thompson et al. 1999). Es wurde angenommen, dass Fische älter als 4 bis 8 Monate und einer Größe länger als 5 bis 13cm gegenüber der Drehkrankheit resistent seien (Hoffman 1961, 1976, Halliday 1976, Wolf 1986, Lom 1987, Schäperclaus 1991, Garden 1992). Ryce et al. (2004) fanden heraus, dass Regenbogenforellen bei einer Wassertemperatur von 12°C während der Aufzucht ab einem Alter von 9 Wochen nach dem Schlupf oder älter resistent gegen die Ausprägung von Symptomen werden. In weiteren Expositionsversuchen demonstrierten sie, dass neben einem Mindestalter von 9 Wochen nach dem Schlupf auch eine Mindestgröße von 40mm Voraussetzung für einen gesteigerten Schutz ist, jedoch können sie trotzdem Überträger der Krankheit sein (Ryce et al. 2005). Jüngere Fische mit 40mm Länge erwiesen sich nicht als resistenter gegen die Ausprägung von Symptomen. Es wurde vermutet dass die große Menge Knorpel im Skelett von jungen Fischen sie besonders empfindlich für die Auswirkungen der Drehkrankheit machen (Halliday 1973a, Schäperclaus 1991, El-Matbouli et al. 1992, Garden 1992), Ryce et al. (2005) konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Resistenz gegenüber der Ausprägung von Symptomen und dem Grad der skelettalen Ossifikation feststellen.

2.1.5.2 Infektionsdosis

Mortalität, klinische Symptome, mikroskopisch detektierbare Läsionen und die Anzahl an Myxosporen nehmen mit steigendem Alter bei der Infektion und verringerter Infektionsdosis ab (Ryce et al. 2004). Klinische Symptome und Mortalität sind bei frisch geschlüpften Regenbogenforellen auch bei einer Infektion mit geringer Sporendosis wahrscheinlich. Regenbogenforellenbrütlinge, zwei Tage nach dem Schlupf mit einer sehr niedrigen Dosis von 10 Sporen infiziert, bekamen schwere klinische Symptome (Markiw 1991, 1992). Markiw (1992) zeigte eine lineare Beziehung bis 10000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch

zwischen Infektionsdosis und fünf Monate nach der Infektion produzierten Sporen auf. Eine Exposition mit höheren Dosen kann eine bei niedrigen Infektionsdosen festgestellte Resistenz wieder aufheben (Hedrick et al. 1999b). Ryce et al. (2004) stellten ebenfalls fest, dass hohe Infektionsdosen bei jüngeren Forellen schwerere klinische Symptome verursachten, jedoch war dieser Effekt in Gruppen, die mit einem Alter von 9 bis 11 Wochen nach dem Schlupf infiziert wurden, reduziert und fehlte später ganz.

2.1.5.3 Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit

Verschiedene Salmonidenarten unterscheiden sich in ihrer Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit. Experimentelle Studien, wie Beobachtungsstudien, zeigen, dass Regenbogenforellen eine der empfänglichsten Salmonidenarten gegenüber einer Infektion mit *Myxobolus cerebralis* sind (Hofer 1903, Schäperclaus 1931, Hoffman & Putz 1969, Halliday 1976, O'Grodnick 1979, Hoffman 1990, Markiw 1992b, MacConnell & Vincent 2002). Im Gegensatz dazu ist die europäische Bachforelle (*Salmo trutta*) nur bei höheren Infektionsdosen für *Myxobolus cerebralis* empfänglich, jedoch werden kaum klinische Symptome beobachtet (Hoffman et al. 1962, Hedrick et al. 1999a). Die hohe Empfänglichkeit wird auf die voneinander unabhängige Evolution von Parasit und Regenbogenforelle zurückgeführt. Regenbogenforellen kamen erst mit ihrer Einfuhr aus Nordamerika Ende des 19. Jahrhunderts mit *M. cerebralis* in Kontakt (Hofer 1903). Verschiedene Studien haben einen weiten Schwankungsbereich der Empfänglichkeit bei verschiedenen Salmoniden aufgezeigt: bis heute wurden Infektionen mit *M. cerebralis* in 24 Arten und Unterarten der Gattungen *Oncorhynchus*, *Salvelinus*, *Prosopium*, *Thymallus* und *Hucho* festgestellt (Volf 1957, Hoffman & Putz 1969, Taylor & Haber 1974, Halliday 1976, O'Grodnick 1979, El-Matbouli et al. 1992, Hedrick et al. 1998, 1999a, b, Thompson et al. 1999, Baldwin et al. 2000, Densmore et al. 2001, Hedrick et al. 2001a, b). Im Allgemeinen zeigten die amerikanischen Arten eine höhere Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit (Ausnahme: *Oncorhynchus kisutch*) als die europäischen Arten (Ausnahme: *Hucho hucho*) (Halliday 1976, O'Grodnick 1979, El-Matbouli et al. 1992). Frühe Infektionsphasen, einschließlich Anheftung und Penetration der Epidermis, wurden in allen untersuchten Salmoniden nachgewiesen (El-Matbouli et al. 1999a).

Nicht nur zwischen Salmonidenarten, sondern auch zwischen verschiedenen Linien von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte eine unterschiedliche Empfänglichkeit festgestellt werden: Eine deutsche Zuchtlinie, die vor rund 110 Jahren nach Europa importiert

worden war, erwies sich im Gegensatz zu einer amerikanischen Linie, die effektiv höchstens 50 Jahre mit *Myxobolus cerebralis* Kontakt hatte, als relativ resistent gegenüber der Drehkrankheit (Küppers 2003, El-Matbouli et al. 2002, Hedrick et al. 2003). Studien, mit dem Zweck Regenbogenforellenlinien mit besserer Resistenz gegenüber der Drehkrankheit in Nordamerika zu finden, blieben bisher erfolglos (Hedrick et al. 1998, 1999a, b, 2001, Thompson et al. 1999, Densmore et al. 2001).

2.1.5.4 Stress

Vor allem chronischer Stress kann Fische anfälliger für Krankheiten machen. Er kann zum Beispiel durch Stressoren aus der Umwelt, wie verschmutztes Wasser, abnormale Temperaturen und Überbesatz ausgelöst werden (Goede 1986). Daraus resultierende, erhöhte Kortisolwerte im Blut steigern die Anfälligkeit für Krankheiten (Bollard et al. 1993). Wenn die Fische in warmem Wasser gehalten werden, durchläuft der Parasit seine Entwicklung schneller und die klinischen Symptome sind deutlicher ausgeprägt (Halliday 1973b).

2.1.5.5 Empfänglichkeit von Tubificiden gegenüber *Myxobolus cerebralis*

Obwohl drei Familien von Oligochäten bekanntermaßen Wirte für Parasiten aus dem Phylum Myxozoa sind, ist *Tubifex tubifex* die einzige bekannte Art, die einen passenden Wirt für *M. cerebralis* darstellt. Viele andere Arten erwiesen sich als nicht geeignet (Wolf et al. 1986, Markiw & Wolf 1983, El-Matbouli & Hoffmann 1989, El-Matbouli et al. 1995, Gilbert & Granath 2002, Beauchamp et al. 2002). Die Ergebnisse einiger neuerer Studien auf molekularer Ebene deuten auf die Existenz von genetisch verschiedenen Linien von *Tubifex tubifex* hin, die sich in physiologischen Eigenschaften, so auch der Empfänglichkeit gegenüber *M. cerebralis* unterscheiden (Anlauf 1994, 1997, Anlauf & Neumann 1997, Sturmbauer et al. 1999, Beauchamp et al. 2001, 2002). Es wurden an verschiedenen Standorten Linien mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für eine Infektion mit *M. cerebralis* gefunden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass genetische Differenzen von *T. tubifex*-Linien, die unterschiedliche Ausprägung von Symptomen der Drehkrankheit von in diesen Gebieten lebenden Forellen beeinflussen (Beauchamp et al. 2002). Stevens et al. (2001) zeigten, dass verschiedene *T. tubifex*-Populationen sich in der Produktion von Triactinomyxon-Sporen erheblich voneinander unterschieden. Die Ergebnisse von Beauchamp et al. (2006) legen nahe, dass bestimmte Arten von *Tubifex* die Sporen von *M.*

cerebralis aufnehmen und inaktivieren können. Wenn genetische Differenzen zwischen *T. tubifex*-Populationen die Ausprägung der Drehkrankheit bei Forellen beeinflussen, könnten letztendlich die gegebenen Umstände des Lebensraumes für die Ausprägung der Drehkrankheit verantwortlich sein (Gilbert & Granath 2003).

2.1.5.6 Umweltfaktoren

Bis heute sind nicht alle Faktoren aus der Umwelt, die den Lebenszyklus und die Infektion mit *M. cerebralis* beeinflussen, aufgeklärt. Ein wichtiger Faktor ist sicher die Temperatur des Wassers. El-Matbouli et al. (1999b) fanden heraus, dass die höchste TAM-Produktion bei einer Temperatur zwischen 10 und 15°C lag. Bei niedrigeren oder höheren Temperaturen war die Produktion minimal. Dies könnte auch erklären, warum die schwersten Fälle von Drehkrankheit bei Forellen bei Temperaturen zwischen 10 und 15°C gefunden werden. Baldwin et al. (2000) konnten dies mit ihren Studien bestätigen. Es wurde auch eine Saisonalität bei der Produktion von Triactinomyxon-Sporen bei Feldstudien zwischen Juni und September gefunden (Thompson & Nehring 2000, Baldwin et al. 2000). Dafür spricht auch die Tatsache, dass *Tubifex tubifex* ihr ganzes Leben mit *M. cerebralis* infiziert sein können und eine Lebenserwartung von mehreren Jahren haben (Gilbert & Granath 2001). Die Daten von Thompson & Nehring (2000) lassen darauf schließen, dass Temperatur und Flussgeschwindigkeit des Wassers die Dichte von Triactinomyxon-Sporen beeinflussen. Die Verteilung von Tubificiden in einem Gebiet hängt von der Zusammensetzung und Mikroflora des Substrates ab, das von den Tubificiden gewählt wird (McMurty et al. 1983, Lazim & Learner 1987, Lestochova 1994). Vor allem in intensiv genutzten Gewässern mit einer hohen Dichte an für die Infektion empfindlichen Salmoniden konnte sich die Drehkrankheit erfolgreich etablieren (Schisler & Bergersen 1998, Whipps et al. 2004).

2.1.6 Prävention und Bekämpfung der Drehkrankheit

Schon vor der Entdeckung von *T. tubifex* als zweitem Wirt wurden, neben der Keulung der betroffenen Fische, Reinigung und Desinfektion der Anlagen mit Branntkalk, Natronlauge und Chlorkalk empfohlen (Schäperclaus 1931, Hoffman et al. 1962). Diese Maßnahmen bewirken eine Abnahme der Oligochäten und das vorzeitige Ausschleudern der Polfilamente, was zum Verlust der Infektiosität führt (Hoffman & Hoffman 1972). Das zeitweilige

Trockenlegen von Teichen sollte, da *T. tubifex* in Zysten bis zu einem halben Jahr überleben können (Anlauf 1990), stets mit Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen verbunden sein. Mit Becken aus Beton, im Gegensatz zu Naturteichen, wird dies deutlich erleichtert; abgesehen davon wird den Oligochäten bei fehlendem Sediment die Lebensgrundlage entzogen. Hoffman (1990) schlägt eine chemische Behandlung der Teichböden bzw. des Wassers mit Calciumoxid (Branntkalk), Calciumcyanamid (Kalkstickstoff), Chlor oder Calciumhypochlorid vor. Wagner et al. (2003) untersuchten weitere Möglichkeiten der chemischen oder physikalischen Beeinflussung der Sporen. Andere Möglichkeiten der Dekontamination sind Behandlung des Wassers mit Ozon (Williams et al. 1982, Horsch 1987) oder UV-Licht (Hoffman 1974, 1975, Hedrick et al. 2000). Nehring et al. (2003) konnten eine Reduktion der Triactinomyxon-Sporen von über 95% mit Silica-Sand als Filtermedium erreichen.

Die Gabe von Fumagillin erniedrigte die Prävalenz und Schwere der *M. cerebralis*-Infektion bei im Labor infizierten Regenbogenforellen (El-Matbouli & Hoffmann 1991b). Erste therapeutische Versuche mit Fumagillin und TNP-470 weisen auf eine destruktive Beeinflussung der Sporenreifung im Fisch hin (Schott 2002), jedoch ist man von spezifischen Therapieansätzen noch weit entfernt.

Bei einer bekannten Belastung des Wasserzuflusses von Teichanlagen mit *M. cerebralis* sollten, neben den bereits erwähnten Präventionsmaßnahmen, Brütlinge ein Mindestalter von 9 Wochen (nach dem Schlupf) und eine Mindestlänge von 40mm haben und solange in Rinnen oder Behältern mit unbelastetem Wasser aufgezogen werden, bevor sie in Teiche eingesetzt werden (Ryce et al. 2004, 2005).

2.1.7 Immunantwort des Fisches auf eine Infektion mit *Myxobolus cerebralis*

Die Immunantwort des Wirtes auf *M. cerebralis* zeigt bei den bisher untersuchten Salmoniden große Variationen. Der Mechanismus, der für die unterschiedlichen Grade von Resistenz zuständig ist, ist bisher unbekannt und es wird vermutet, dass verschiedene Arten mit unterschiedlichen Mechanismen auf die Drehkrankheit reagieren (Gilbert & Granath 2003).

Die Resistenz gegenüber einem Parasiten könnte auf einer reduzierten Penetration des Wirtes, Induktion von Antikörpern oder Interferon, Inaktivierung des Pathogens durch Serumkomponenten, phagozytierende Zellen, Akute-Phase Proteinen oder Killerzellen basieren (Chevassus & Dorson 1990).

In der Subkutis von Forellen konnten nach fünf Tagen Parasitenstadien ausgemacht werden, die von Rundzellen und Makrophagen umgeben waren (Hoffmann & El-Matbouli 1996). Die Parasitenstadien sind bei Regenbogenforellen vor Immunreaktionen des Wirtes geschützt, während sie sich auf ihrer Wanderung im ZNS befinden (El-Matbouli et al. 1995). Im Gegensatz zu Regenbogenforellen wurden bei Bachforellen (*Salmo trutta*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*), beides Fischarten mit einer Resistenz gegen *M. cerebralis*, erhöhte Zahlen von eosinophilen granulären Leukozyten in Nervenganglien gefunden (Hedrick et al. 1999a, 2001a, MacConnell & Vincent 2002). Man nimmt an, dass diese Zellen eine Rolle in der Zerstörung des Parasiten spielen, oder aber ihn davon abhalten, den Knorpel zu erreichen (Hedrick et al. 1999a, 2001a). Die zelluläre Immunantwort wird während der aktiven Phase der Parasitenstadien im Knorpel, während der Knorpelzerstörung aktiviert (El-Matbouli et al. 1995, Hedrick et al. 1998). Regenbogenforellen entwickeln sowohl eine humorale (Antikörper) als auch eine zelluläre Immunantwort auf *M. cerebralis* (Hedrick et al. 1998). Griffin & Davis (1978) fanden Antikörper bei an der Drehkrankheit erkrankten Regenbogenforellen. Diese sind aber nicht vor der 12. Woche nach der Exposition vorhanden (Ryce 2003). Passive Immunisierung von jungen Forellen mit Serum, das Anti-*M. cerebralis*-Sporen Antikörper enthielt, zeigte jedoch nur eine marginale Wirkung (Hedrick et al. 1998). Eine starke, selbst erworbene Resistenz gegen eine Reinfektion wurde bei Regenbogenforellen jedoch belegt (Hedrick et al. 1998). Shum et al. (2001) fanden im Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I und Klasse-II genetische Unterschiede bei Regenbogenforellen und Bachforellen.

Die Mechanismen die der unterschiedlichen Resistenz von deutschen und nordamerikanischen Regenbogenforellen-Linien zugrunde liegen, sind ebenfalls noch völlig unklar.

Unspezifische Immunmechanismen sind eine nicht außer Acht zulassende Möglichkeit für die Ausbildung einer Resistenz gegen die Entwicklung der Drehkrankheit (Ryce et al. 2005).

2.2 Ausgewählte Faktoren des unspezifischen Immunsystems

2.2.1 Arginase-2

Makrophagen besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Immunantwort gegen Parasiten. Unabhängig davon, wo der Parasit in den Körper des Wirtes eindringt, wird er auf Makrophagen treffen, die pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. Diese Makrophagen mögen nicht nur in der Lage sein, Parasiten zu phagozytieren, sondern sie sind unter anderem auch bei der Komplementaktivierung, Chemotaxis, zytokin-assoziierten interzellulären Kommunikation, der Regulation der Akute-Phase Protein Produktion und der Antigen-Präsentation beteiligt (Wiegertjes & Joerink 2004). Es wird beschrieben, dass Makrophagen in einem ruhenden, angeregten und aktivierten Zustand vorliegen können. Ihre Aktivierung kann in einen klassischen Zustand und einen alternativen Zustand unterteilt werden (Gordon 2003, Mantovani et al. 2004, Mills et al. 2000, Noel et al. 2004, Sandor et al. 2003). Diese beiden Zustände sind die Extreme einer Reaktion mit vielen Abstufungen (Mantovani et al. 2004) und es bedarf einer ausgeglichenen Reaktion zwischen der Typ-I-Immunantwort und der Typ-II-Immunantwort, um eine effektive Immunantwort gegen Pathogene zu erreichen (Vincendeau et al. 2003, Wiegertjes & Joerink 2004).

Auf klassischem Weg aktivierte Makrophagen und ihre Rolle bei der Typ-I-Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und des reaktiven Stickstoffoxids (NO), wurden bereits grundlegend untersucht (Eisenstein et al. 1994, Nathan 1992).

In letzter Zeit ist das Interesse an Rolle und Funktion von auf alternativem Weg aktivierten Makrophagen gestiegen. Makrophagen, die in diesem Zustand der Aktivierung sind, spielen bei der Typ-II-Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene über Arginase, eine bedeutende Rolle. Sie haben eine erhöhte Phagozytoseaktivität und eine erhöhte Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse-II. Abgesehen davon fördern sie Zellproliferation und Wundheilung. Arginase spielt hierbei eine Schlüsselrolle (Gordon 2003, Mantovani et al. 2002, 2004, Mills et al. 2000, Mori & Gotoh 2000, Noel et al. 2004, Sandor et al. 2003). Arginase ist ein binukleäres Mangan-Metalloenzym, das die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff katalysiert. Bei terrestrischen ureotelischen Vertebraten (Säugetiere) werden zwei Isoformen von Arginase von separaten Genen kodiert (Spector et al. 1985, Grody et al. 1989, Jenkinson et al. 1996, Morris et al. 1998). Arginase-1 ist ein zytosolisches Enzym, das im hepatischen Ornithinzyklus verankert ist und vornehmlich in der

Leber gefunden wird (Ikemoto et al. 1990). Arginase-2 kommt mitochondrial vor und wird in den meisten Organen exprimiert (Morris et al. 1997, Miyanaka et al. 1998), wobei die Verteilung nicht bei allen Säugetieren die gleiche ist (Morris et al. 1997, Mori & Gotoh 2000). Arginase hat einige wichtige Funktionen, die mit dem Immunsystem zusammenhängen: Durch Arginaseaktivität kann L-Arginin, das für die Proliferation und das Überleben von Wirtszellen und Pathogen notwendig ist, im extrazellulären Raum dezimiert werden (Currie et al. 1979, da Silva et al. 2002, Vincendeau et al. 2003, Yu et al. 2001). Wenn dies im intrazellulären Raum geschieht, wird der induzierbaren NO-Synthase das Substrat entzogen (Vincendeau et al. 2003). Weiterhin kann Arginase das über den klassischen Weg produzierte reaktive Stickstoffoxid beeinflussen, indem die Produktion desselben gesteigert wird, wenn die Expression von Arginase gehemmt ist (Nathan 1995, Chang et al. 1998, Yu et al. 2001, da Silva et al. 2002). Arginase scheint außerdem in die Produktion von Polyaminen, die für Zellproliferation und -differentiation bedeutsam sind, und Prolin, wichtig für Wundheilung und Kollagenproduktion, eingebunden zu sein (Albina et al. 1990, Jenkinson et al. 1996, Vincendeau et al. 2003).

Arginase ist in Fischgeweben ubiquitär vorhanden, wobei die höchste Aktivität in Leber und Niere gefunden wurde (Cvancara 1969, Portugal & Aksnes 1983, Singh & Singh 1988, Korte et al. 1997, Felskie et al. 1998). Von den Schlüsselenzymen des piscinen Ornithin-Zyklus ist bei Regenbogenforellen und anderen Teleostei im Adultstadium nur noch die Arginaseaktivität vorhanden (Wright et al. 1995, Terjesen et al. 1998, 2001, Chadwick & Wright 1999, Steele et al. 2001, Todgham et al. 2001).

Im Gegensatz zu der Aktivierung von Makrophagen auf klassischem Weg, die inzwischen auch für die Teleostei relativ gut beschrieben wird, ist sehr wenig über die Aktivierung von Makrophagen auf alternativem Weg und die Rolle der Arginase, speziell bei älteren Vertebraten wie den Knochenfischen, bekannt. Inzwischen wurden von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Regenbogenforellen (*O. mykiss*) je ein Gen für Arginase-1 und multiple Gene kodierend für Arginase-2 gefunden (Wright et al. 2004, Joerink et al. 2006a, b). Aufgrund der Identifikation der codierenden Regionen und der Präsenz von mRNA kann man darauf schließen, dass beide Gene funktionsfähig sind. Ein Vorkommen von multiplen Genen ist bei Tetraploidie nicht ungewöhnlich (Murray et al. 2003, David et al. 2003). Es wird die Möglichkeit angedeutet, dass die multiplen Gene für Arginase-2 durch eine unterschiedliche Entwicklung, alternative Promotoren oder aber durch drei verschiedene Typ-2 Gene entstehen (Wright et al. 2004). Da die Unterschiede jedoch so gering sind, nimmt man an, dass sie sich in ihrer enzymatischen Aktivität nicht unterscheiden (Joerink et al. 2006a). Die Ergebnisse

von Wright et al. (2004) weisen darauf hin, dass Arginase-1 und -2 in der Leber von Regenbogenforellen unterschiedliche Aufgaben haben. Im Gegensatz zu Säugetieren sind beide Typen von Arginase in den Mitochondrien angesiedelt. Es sind Ähnlichkeiten der Gensequenzen mit denen von Amphibien und Säugetieren vorhanden, in der Verteilung im Gewebe unterscheiden sie sich aber voneinander (Wright et al. 2004, Joerink et al. 2006a).

Joerink et al. (2006a) wiesen die alternative Aktivierung von Makrophagen mit cAMP nach. Es ist nach wie vor jedoch unklar, ob eine Induktion der alternativ aktivierten Makrophagen für den Wirt oder den Parasiten förderlich ist. Auf der einen Seite wird dadurch die Aktivität von iNOS und damit begleitend die Produktion des reaktiven Stickstoffoxids, herunterreguliert. Dadurch werden die der Entzündung folgenden Schäden minimiert. Auf der anderen Seite kann dies für die Entwicklung des Parasiten, und damit für eine chronische Infektion, vorteilhaft sein (Gobert et al. 2000, Iniesta et al. 2005). Joerink et al. (2006a, b) konnten zeigen, dass die Genexpression von Arginase-1 bzw. Arginase-2 von verschiedenen Stimuli ausgelöst wird. Infektionsversuche mit *Trypanoplasma borreli* und *Trypanosoma carassii* zeigten, dass Makrophagen von Karpfen zu einer differenzierten Polarisation fähig sind; während *T. borreli* eine Aktivierung von Makrophagen auf klassischem Weg bewirkte, induzierte *T. carassii* vor allem eine alternative Antwort. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass *T. carassii* eine weniger schwere Infektion bei Karpfen auslöst.

2.2.2 Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Bei den Mammalia sind drei Isoformen von NO-Synthasen bekannt (Knowles et al. 1994), die aus drei verschiedenen Genen entstehen. Zwei von ihnen, nNOS und eNOS, werden konstitutiv exprimiert. Die neuronale Form (nNOS) wird vornehmlich im Gehirn exprimiert (Bredt et al. 1990, 1991), die zweite Form, eNOS, wurde hauptsächlich in Endothelialzellen gefunden (Janssens et al. 1992, Nishida et al. 1992). Die Stimulation dieser zwei Formen ist von Ca^{2+} /Calmodulin abhängig und kann sehr schnell erfolgen (Bredt & Snyder 1990, Nathan 1992).

Die dritte Form, die induzierbare NO-Synthase (iNOS), ist unabhängig von intrazellulären Ca^{2+} /Calmodulin-Leveln (Gross et al. 1991, Yui et al. 1991); sie wird durch Pathogene, ihre Produkte und Zytokine stimuliert (Stuehr & Marletta 1985, Nussler & Billiar 1993, Kunz et al. 1994). iNOS wird hauptsächlich in Makrophagen exprimiert, kann aber auch in Eosinophilen, Hepatozyten, Chondrozyten, retinalen Epithelialzellen und Osteoblasten gefunden werden (Stuehr et al. 1991, Lyons et al. 1992, Wood et al. 1993, Chartrain et al.

1994, Maier et al. 1994, Clark & Rockett 1996, Delgado et al. 1997). Im Gegensatz zu den beiden anderen Formen, reagiert die induzierbare NO-Synthase langsamer, was dann aber zu einer hohen Konzentration des reaktiven Stickstoffoxids führt (Clark & Rockett 1996). Die drei humanen iNOS-Formen haben die Cofaktoren-bindenden Bereiche, wie für NADPH, FAD und Calmodulin, gemeinsam (Bredt et al. 1991, 1992). NOS-Aktivität wurde vom einzelligen bis zum humanen Organismus beschrieben, was zu dem Schluss führt, dass sich der Reaktionsweg über L-Arginin/NO schon früh in der Evolutionsgeschichte entwickelte und für diese Organismen von großer Bedeutung sein muss (Werner-Felmeyer et al. 1994, Nozaki et al. 1997, Campos-Perez et al. 2000).

Zum ersten Mal konnte das komplette, für iNOS kodierende Gen bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) von Wang et al. (2001) sequenziert werden. Bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) wurde die komplette cDNA des Gens von Saeji et al. (2000) sequenziert. Wie bei der humanen iNOS, besitzt die induzierbare NO-Synthase von Regenbogenforellen 27 Exons, wovon 18 Exons eine identische Größe haben; die Introns sind bei Regenbogenforellen wesentlich kleiner, was zu einer Größe von etwa der Hälfte des humanen Gens führt (Xu et al. 1996, Wang et al. 2001). Die Cofaktoren-bindenden Bereiche befinden sich in den gleichen Exons und in einigen Fällen, wie z.B. bei NADPH, sind die Bereiche komplett konserviert.

Die induzierbare NO-Synthase ist in die Typ-I-Immunantwort von auf klassischem Weg aktivierten Makrophagen involviert (Nathan 1992, Eisenstein et al. 1994).

Die Reaktionen von klassisch aktivierten Makrophagen und ihre Funktion bei der Typ-I-Immunantwort wurden inzwischen auch bei den Teleostern relativ gut untersucht (Neumann et al. 1995, Laing et al. 1996, 1999, Saeji et al. 2000, 2002). Die Produktion von Stickstoffradikalen bei Makrophagen von Säugetieren ist ein gut bekannter Mechanismus bei der Stimulation durch Pathogene und ihre Produkte (Clark & Rockett 1996). Dabei verwendet die induzierbare NO-Synthase L-Arginin, um reaktives Stickstoffoxid und L-Citrullin herzustellen. iNOS oxidiert L-Arginin in zwei Schritten: zuerst wird L-Arginin zu N^w-hydroxy-L-Arginin (NOHA) hydroxyliert, das weiter zu L-Citrullin und NO oxidiert wird. NOHA ist ein kompetitiver Inhibitor der Arginase und auf diesem Weg wird die alternative Aktivierung von Makrophagen supprimiert (Sandor et al. 2003, Wiegertjes & Joerink 2004). In einer aeroben, wässrigen Umgebung wird NO ohne den Einfluss von Enzymen in Nitrit und Nitrat umgewandelt (Marletta et al. 1988).

Die Expression von iNOS erzeugt ein zytotoxisches Umfeld und begünstigt die Vasodilatation, die für die frühe Phase der Wundheilung bedeutend ist (Vincendeau et al.

2003). Es besteht ein enges Zusammenspiel zwischen der Aktivierung auf klassischem und auf alternativem Weg. Bei der Inhibition der Expression von Arginase-2, wird die Produktion des reaktiven Stickstoffoxids gesteigert. (Chang et al. 1998). Wenn Arginase L-Arginin aus dem intrazellulären Raum entfernt, entzieht sie somit das Substrat der induzierbaren NO-Synthase (Vincendeau et al. 2003). Auf diese Weise kann Arginase die Produktion von NO durch klassisch aktivierte Makrophagen regulieren (Nathan 1995, Yu et al. 2001, da Silva et al. 2002). Eine unregulierte klassische Aktivierung von Makrophagen würde infolge hoher Konzentrationen von (pro-)inflammatorischen Mediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β und Interleukin-6, und infolge hoher Konzentrationen von NO, zu immunpathologischen Vorgängen führen (Fiorentino et al. 1989, Mills 2001). Eine Aktivität der induzierbaren NO-Synthase wurde bereits bei verschiedenen Fischarten nachgewiesen (Schoor & Plumb 1994, Neumann et al. 1995, Laing et al. 1999, Saeji et al. 2000, 2002). Eine detektierbare Expression von iNOS wurde in den Kiemen und Kopfnieren von Regenbogenforellen nach Injektion oder Bad mit dem Gram-positiven *Renibacterium salmoninarum* festgestellt (Campos-Perez et al. 2000). Zusätzlich zu der iNOS-Expression wurde nach der Injektion ein Anstieg des Serum-Nitrates im Vergleich zu den Kontrollproben festgestellt, was darauf schließen lässt, dass ein funktionsfähiges iNOS Enzym induziert worden war. Joerink et al. (2006a, b) zeigten *in vitro* und *in vivo*, bei vergleichenden Infektionen mit *Trypanoplasma borrelli* und *Trypanosoma carassii*, die klassische Aktivierung von Makrophagen. Bei Fischen, die mit *Trypanoplasma borrelli* infiziert worden waren, war die Nitrit Produktion erhöht und konnte mit einer nochmaligen Stimulation mit LPS, nicht aber mit cAMP gesteigert werden. Lysate der Parasiten konnten nur die NO-Produktion, nicht aber die Arginase-Aktivität stimulieren. Man vermutet, dass lebende bzw. tote Parasiten unterschiedliche Immunantworten, Typ-I bzw. Typ-II, induzieren (Allen & Loke 2001, Joerink et al. 2006b). Eine Regulierung der iNOS-Expression wurde mit unterschiedlichen Pathogenen *in vivo* gezeigt (Sigh et al. 2004a, Lindenstrøm et al. 2004, Tafalla et al. 2005, Bridle et al. 2006).

2.2.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandin E₂

Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. Nach der Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden durch Phospholipase A₂, werden sie durch Cyclooxygenasen produziert, deren Substrat sie darstellen (Harris et al. 2002). Cyclooxygenasen, auch bekannt unter dem Namen Prostaglandin Endoperoxid G/H Synthasen, katalysieren die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen in zwei Schritten: eine Cyclooxygenase-Reaktion, bei der die Arachidonsäure zu Prostaglandin G₂ umgebaut wird, dann eine Peroxidase-Reaktion, bei der Prostaglandin G₂ unter Reduktion von zwei Elektronen zu Prostaglandin H₂ wird (Smith et al. 1996). Das resultierende Prostaglandin H₂ wird dann durch eine Vielzahl von weiteren Enzymen metabolisiert, um Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxane zu produzieren (Rowley 1996), von denen das Prostaglandin E₂ für Entzündungsreaktionen am meisten von Bedeutung ist (Knight & Rowley 1995). Bei Säugetieren können Prostaglandine mit Histamin und Bradikinin interagieren, um Vasodilatation zu induzieren, die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen und generell die Funktionen von Leukozyten herunterzuregulieren.

Es sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase (COX), COX-1 und COX-2, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden, identifiziert worden (De Witt et al. 1989, Funk et al. 1991). Die erste Form (COX-1) wird in den meisten Geweben und Zellen konstitutiv exprimiert und wird im allgemeinen als sogenanntes „housekeeping“ Enzym betrachtet. Die zweite Form (COX-2) ist induzierbar und wird von Endothelialzellen, Fibroblasten, Mastzellen, Monocyten und Makrophagen exprimiert. In letzteren wird COX-2 als Antwort auf verschiedene inflammatorische Signale, einschließlich Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Lipopolysacchariden exprimiert (O'Banion et al. 1992, O'Sullivan et al. 1992, Salvemini et al. 1993, Herschman 1996). Über die Funktion der COX-Enzyme ist leider bei Vertebraten, die nicht zu den Säugetieren zählen, einschließlich ihrer Rolle bei der osmotischen und ionischen Regulation bei Fischen, sehr wenig bekannt. Die cDNAs von COX-1 und COX-2 wurden bei Regenbogenforellen (*O. mykiss*) (Zou et al. 1999c), Bachforellen (*Salvelinus fontinalis*) (Roberts et al. 2000) und Zebrafischen (*Danio rerio*) (Grosser et al. 2002) geklont; auch bei dem Kugelfisch (*Fugu rubripes*) lassen die Genomsequenzen auf die Anwesenheit von zwei Formen der Cyclooxygenase schließen, womit gezeigt werden konnte, das Teleostier beide Isoformen besitzen (Jarving et al. 2004).

COX-2 reguliert auch die Produktion von Prostaglandin E₂ bei Entzündungsreaktionen. Prostaglandin E₂ ist ein Eicosanoid, das auch von Monozyten und Thrombozyten hergestellt

wird. Mit verschiedenen Ansätzen wurde gezeigt, dass Prostaglandin E₂ an zahlreichen biologischen Prozessen, wie Vasodilatation, Zellproliferation, Aktivierung von Leukozyten, Chemotaxis und Akkumulation von Neutrophilen bei Entzündungen, beteiligt ist (Inokuma et al. 1994, Urioste et al. 1994, Leal-Berumen et al. 1995, Gomi et al. 2000, Martin et al. 2002). Secombes et al. (1996) stellten bei Regenbogenforellen eine Inhibition der Aktivierung von Makrophagen fest. Eine signifikant gesteigerte Produktion von Prostaglandin E₂ wurde bei Goldfisch-Makrophagen, die mit Lipopolysacchariden (LPS) oder Makrophagen-aktivierenden-Faktoren (MAF) inkubiert wurden, gefunden; außerdem wurde gezeigt, dass COX-2 nicht konstitutiv exprimiert wird, jedoch in Leukozyten aus den Kopfnieren von Regenbogenforellen durch Stimulation mit LPS oder einem attenuierten Stamm von *Aeromonas salmonicida* induziert werden kann (Zou et al. 1999c). Lindenstrøm et al. (2004) konnten bei Versuchen *in vivo* nach einer primären, nicht jedoch nach einer sekundären, Infektion von Regenbogenforellen mit *Gyrodactylus derjavini* einen Anstieg der Expression von COX-2 feststellen, bei einer Infektion von Lachsen (*Salmo salar*) mit *Gyrodactylus salaris* konnte in der Haut jedoch keine Änderung der Expression, verglichen mit den Kontrollen, detektiert werden (Lindenstrøm et al. 2006). Bei natürlich mit *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) infizierten Regenbogenforellen konnte ebenfalls ein Anstieg der Expression von COX-2 gezeigt werden (Holland et al. 2003). Fast et al. (2005) untersuchten den Effekt von Prostaglandin E₂, bei SHK-1, einer Makrophagen-ähnlichen Zelllinie aus Lachsen (*S. salar*), und stellten fest, dass Prostaglandin E₂ in physiologischen Konzentrationen in der Lage ist, die Expression von Genen des Immunsystems bei Salmoniden, wie Interleukin-1 β und COX-2, zu hemmen. Es ist bekannt, dass neben weiteren proinflammatorischen Stimuli Interleukin-1 β die Expression von COX-2 nach oben regulieren kann (Endo et al. 1996, Hong et al. 2003). Bei *in vivo*-Studien mit *Lepeophtheirus salmonis* infizierten Atlantischen Lachsen (*S. salar*) konnten Fast et al. (2006) zeigen, dass zum Zeitpunkt der gesteigerten COX-2 Expression in der Kopfniere auch die höchste Prostaglandin E₂ Konzentration im Plasma zu finden war. Da bekannt ist, dass *Lepeophtheirus salmonis* auch Prostaglandin E₂ sezerniert, wahrscheinlich um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen (Fast et al. 2004, 2005), könnte sich ein Teil des Prostaglandin E₂ aber auch von dem Parasiten ableiten.

2.2.4 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Bei den Säugetieren gehört Interleukin-1 β (IL-1 β) zu den wichtigsten proinflammatorischen Cytokinen (Dinarello 1996). Es stellt einen zentralen Faktor bei der Initiation und Regulierung von Entzündungsreaktionen und Immunantworten dar (Dinarello 1997). Außerdem übernimmt IL-1 β Schlüsselrollen wie bei der Aktivierung von T- und B-Zellen (Smith et al. 1980), der respiratory burst-Aktivität (Smith et al. 1998), der Aktivierung von natürlichen Killerzellen (Kullberg & Van der Meer 1995), der Lysozym-Sekretion (Kobsel & Ramadori 1994), dem Anlocken von Leukozyten (Oppenheim et al. 1991, Taub 1996) und der Stimulation von Makrophagen zur Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen und Prostaglandinen (Titus et al. 1991, Komaki et al. 1992, Diaz et al. 1998). Auch hemmende Interaktionen zwischen IL-1 β und dem antiinflammatorischen TGF- β wurden beschrieben. So wird die IL-1 β -induzierte Produktion von Cytokinen, die bei der hämatopoetischen Zellproliferation beteiligt sind, von TGF- β gehemmt (Ruscetti et al. 1992). IL-1 β beeinflusst andererseits die transkriptionale Aktivierung von TGF- β Zielgenen negativ und kann dem inhibitorischen Effekt von TGF- β *in vitro* entgegenwirken (Benus et al. 2005).

Interleukin-1 β gehört zu einer Familie von Cytokinen mit einer β -Kleeblattstruktur, die sich aus 12 β -Faltblättern zusammensetzt (Zou et al. 1999a). Es wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen als ein biologisch inaktives Vorläufermolekül produziert (proIL-1 β). Dieses Molekül wird proteolytisch durch das Interleukin-1-converting-Enzym (ICE), Caspase-1, in die wesentlich kleinere aktive Form gespalten (Cerretti et al. 1992). Da die reife Form des IL-1 β nur extrazellulär gefunden wird, scheint die Spaltung mit der Sekretion gekoppelt zu sein (Rubartelli et al. 1990).

Inzwischen wurden auch die Gene für zwei Isoformen von IL-1 β , IL-1 β 1 und IL-1 β 2, von Regenbogenforellen (*O. mykiss*) (Zou 1999a, b, Pleguezuelos et al. 2000) und Karpfen (*C. carpio*) (Fujiki et al. 2000, Engelsma et al. 2001, 2003), sowie IL-1 β von Goldbrasse (*Sparus aurata*) (Pelegrín et al. 2000), Zackenbarsch (*Dicentrarchus labrax*) (Scapigliati et al. 2001) und zum ersten Mal bei einem Knorpelfisch, dem kleingefleckten Katzenhai (*Scyliorhinus caniculus*) (Bird et al. 2002) sequenziert.

Die Organisation der Gene unterscheidet sich jedoch deutlich voneinander. Während IL-1 β 1 bei Regenbogenforellen 6 Exons enthält (Zou et al. 1999b), besitzt es bei Karpfen und Säugetieren 7 (Engelsma et al. 2001). IL-1 β 2 ist bei Regenbogenforellen in fünf Exons organisiert und mit der anderen Isoform IL-1 β 1 stimmt es zu 82% in den Aminosäuren überein (Pleguezuelos et al. 2000). Eine ähnliche Expression beider Isoformen wurde bei

Regenbogenforellen, die mit *Gyrodactylus derjavini* infiziert worden waren, in der Haut beobachtet, jedoch ist bis jetzt nichts über die Unterschiede in der biologischen Aktivität, wenn es eine gibt, bekannt (Pleguezuelos et al. 2000, Lindenstrøm et al. 2003).

Wie andere Sequenzen von IL-1 β , die nicht von Säugetieren stammen, ist bei Fischen keine klare Schnittstelle für das Interleukin-1-converting-Enzym bekannt (Secombes et al. 1998). Hong et al. (2004) fanden bei einer Makrophagen-Linie aus Regenbogenforellen mutmaßlich reifes IL-1 β nicht nur in Zellysaten, sondern auch in den Überständen der Zellkulturen. Dies stärkt die Annahme, dass das unreife Vorläufermolekül intrazellulär gespalten und reifes IL-1 β während oder nach diesem Prozess aus der Zelle abgegeben wird (Dinarello 1998). Das Interleukin-1-converting-Enzym könnte das unreife IL-1 β bei Regenbogenforellen, da es keine typische Schnittstelle gibt, auch an einer unüblichen Stelle schneiden (Hong et al. 2004). Da man aufgrund fehlender Übereinstimmungen eine Involvierung des ICE nicht voraussetzen darf, könnten eventuell auch andere Caspasen in Betracht kommen (Huisling et al. 2004). Zwar wurde bei früheren Studien festgestellt, dass IL-1 β bei Regenbogenforellen nicht wesentlich exprimiert wird (Secombes et al. 1998), aber in neueren Studien wurde eine konstitutive Expression bei einigen Teleostei gefunden (Ganassin & Bols 1998, Pelegrín et al. 2001, Tafalla et al. 2005).

Pelegrín et al. (2004) fanden in Versuchen mit Goldbrassen heraus, dass IL-1 β in Leukozyten der Kopfniere intrazellulär synthetisiert wird, nachdem die Fische bzw. die Proben mit genomischer DNA von Bakterien, LPS oder MAF stimuliert wurden. Bei einer Fibroblasten-Zelllinie von Goldbrassen, SAF-1, konnte extrazelluläres ATP die Freisetzung von reifen IL-1 β -Molekülen mit einer Größe von 22 kDa, verbunden mit einer Abnahme des intrazellulären Vorläufermoleküls, induzieren (Pelegrín et al. 2004). Die Verfügbarkeit von biologisch aktivem rekombinantem IL-1 β (rIL-1 β) erlaubte erste Beschreibungen der Wirkungen von IL-1 β in verschiedenen Studien bei Regenbogenforellen (Hong et al. 2001, 2003) und bei Karpfen und die Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Karpfen-IL-1 β (Mathew et al. 2002). Es konnten *in vitro* und *in vivo*, sowohl in Abhängigkeit von der Dosis Auswirkungen auf Proliferation, Migration und Phagozytose, wie auch die Induktion der Expression von IL-1 β und COX-2, gesteigerte Lysozym-Expression und gesteigerte Resistenz gegenüber *Aeromonas salmonicida* festgestellt werden (Hong et al. 2001, 2003). Im Allgemeinen wurden dazu wesentlich höhere Konzentrationen von rIL-1 β benötigt, als in vergleichbaren Studien mit humanem rIL-1 β . Mögliche Ursachen dafür könnten in einer fehlerhaften Faltung des rekombinanten Proteins, der falschen Größe oder einer Abweichung in der Affinität zum Rezeptor liegen (Huisling et al. 2004). Auch Peptide, die sich von

Regenbogenforellen-IL-1 β ableiten, konnten Reaktionen wie gesteigerte Leukozytenmigration und gesteigerte antibakterielle Aktivität auslösen (Peddie et al. 2001, 2002). Die bisherigen Daten zusammengenommen sprechen für eine Konservierung einiger pharmakologischer Eigenschaften bei Wirbeltieren (Scapigliati et al. 2006). Inzwischen konnte in einer Reihe von Studien bei der Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen *in vivo* eine gesteigerte Expression von IL-1 β gemessen werden (Lindenstrøm et al. 2003, 2006, Singh et al. 2004b, Tafalla et al. 2005, Fast et al. 2006).

2.2.5 Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β)

Mitglieder der Transforming-Growth-Faktor- β Unterfamilie sind multifunktionale, pleiotrope Proteine. Sie sind an der Regeneration von Gewebe, an Wundheilung, Entwicklung und Hämatopoese beteiligt (Lawrence 1996). Außerdem spielen sie bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems eine wichtige Rolle. Dabei haben sie hauptsächlich antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkungen (Williams et al. 1996), wobei es aber von den beteiligten Zelltypen und den begleitenden Umständen abhängt, ob sie positiven oder negativen Einfluss auf die Proliferation von Lymphozyten, die Empfindlichkeit von Cytokinen oder deren Expression haben (Palladino et al. 1990).

Die ursprünglich als TGF- β charakterisierte Form, inzwischen als TGF- β 1 bezeichnet (Moses et al. 1981, Roberts et al. 1981), gehört zu einer Familie regulatorischer Proteine bestehend aus einer Anzahl entfernt verwandter Faktoren, Activine/Inhibine und Knochenwachstumsfaktoren (bone morphogenetic proteins; BMP), und einer Anzahl näher verwandter Proteine, TGF- β 2 bis TGF- β 5, mit einer Übereinstimmung der Sequenz von 70-80% (Kingsley 1994). Bei den höheren Vertebraten wurden fünf verschiedene Isoformen, TGF- β 1 bis TGF- β 5, beschrieben. Davon wurden drei, TGF- β 1 bis TGF- β 3, bei einer Reihe von Säugetieren gefunden (Derynck et al. 1985, 1988, de Martin et al. 1987). Bei Hühnern wurden die TGF- β 2 bis 4 detektiert (Jakowlew et al. 1990, Burt & Jakowlew 1992, Burt et al. 1995), bei dem Südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) die Formen TGF- β 2 und TGF- β 5 (Rebbert et al. 1990, Kondaiah et al. 1990). Es wird vermutet, dass die TGF- β Familie aus einer Reihe von Genduplikationen entstanden ist, die durch Translokationen von Chromosomen voneinander getrennt wurden (Burt & Paton 1992).

Die immunregulatorischen Eigenschaften von TGF- β sind vornehmlich immunsuppressiv: TGF- β hemmt die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen, die MHC Expression, die IgG- und IgM-Produktion, es antagonisiert proinflammatorische Cytokine wie

IL-1 β , TNF- α und IFN- γ und blockiert die Expression von IL-1 β und IL-2 Rezeptoren. Es werden auch inhibitorische Wirkungen auf Neutrophile, sowie deren Adhäsion an das Epithel, auf Generation und Funktion von zytotoxischen T-Zellen und auf die Aktivierung und Funktion von LAK- und NK-Zellen festgestellt. Ebenso werden die Aktivierung und die respiratory burst-Aktivität von Makrophagen gehemmt (Ruscetti & Palladino 1991, Lotz & Seth 1993, Bogdan & Nathan 1993, Bermudez 1993).

Aber auch einige proinflammatorische Wirkungen von TGF- β , wie die Promotion von Makrophagen und die Chemotaxis von Neutrophilen, die Produktion von IgA und einiger Cytokine, werden beschrieben (McCartney-Francis & Wahl 1994). Außerdem fördert TGF- β für die Wundheilung bedeutende Faktoren (Jyung & Mustoe 1993). Ob die Wirkung von TGF- β pro- oder antiinflammatorisch ist, hängt von seiner Konzentration, der Differenzierung der Zielzellen und der Konzentration anderer proinflammatorischer Bestandteile ab (McCartney-Francis & Wahl 1994). Eine bedeutende Aufgabe von TGF- β besteht außerdem darin, den Gewebeschaden nach dem Rückgang einer physiologischen Immunantwort zu begrenzen (McCartney-Francis & Wahl 1994).

Bis jetzt ist jedoch noch unbekannt, ob alle diese Eigenschaften auch auf das TGF- β von Fischen zutreffen. Das erste piscine TGF- β Gen wurde 1998 bei Regenbogenforellen (*O. mykiss*) beschrieben (Hardie et al. 1998). Es hat eine Länge von ungefähr 3,4 Kb und besteht aus 7 kodierenden Exons, ohne Introns in der 5' UTR Region. Im Gegensatz zu der Organisation des Gens bei Mensch, Huhn und Krallenfrosch fehlt bei dem TGF- β Gen von Regenbogenforellen das Intron 2, es hat jedoch am 3'-Ende ein zusätzliches Intron, von dem das Exon 7 der anderen Vertebraten bei Regenbogenforellen in die Exone 6 und 7 unterteilt wird (Daniels & Secombes 1999). Das TGF- β der Regenbogenforelle zeigt, wie das TGF- β 4 von Hühnern und das TGF- β 5 von *Xenopus*, in den Exonen die größten Übereinstimmungen zu TGF- β 1 (Daniels & Secombes 1999) und scheint mit TGF- β 1 homolog zu sein (Herpin et al. 2004). Eine zweite Form von TGF- β , dem TGF- β 2 ähnlich, wurde in Karpfen (*Cyprinus carpio*) gefunden (Sumathy et al. 1997). Außerdem wurden bei Schollen (*Pleuronectes platessa*) drei Isoformen von TGF- β , homolog zu den Isoformen bei anderen Vertebraten gefunden (Laing et al. 2000).

Für den hohen Konservierungsgrad spricht die vorhandene Kreuzreaktivität. Bovines TGF- β 1 in niedrigen Dosen konnte die respiratory burst-Aktivität von ruhenden Makrophagen aus der Kopfniere von Regenbogenforellen (*O. mykiss*) fördern. Die respiratory burst-Aktivität von aktivierten Makrophagen, die mit TGF- β 1 inkubiert wurden, nahm jedoch mit steigender Dosis ab; Signalen zur Aktivierung von Makrophagen wurde entgegen gewirkt (Jang et al.

1994). Bei Infektionsstudien mit unterschiedlichen Pathogenen konnte eine, im Vergleich zu anderen untersuchten immunregulatorischen Genen, relativ geringgradige Expressionssteigerung festgestellt werden (Grayson et al. 2002, Holland et al. 2003, Purcell et al. 2004, Lindenstrøm et al. 2004, Tafalla et al. 2005, Fast et al. 2006). Tafalla et al. (2005) vermuten, dass TGF- β bei Regenbogenforellen keinen starken Effekt auf die Expression von iNOS hat, da an den untersuchten Zeitpunkten die Transkription beider Gene erhöht war. Harms et al. (2003) stellten bei gestreifeten Seebarschen (*Morone saxatilis*), nach Infektion mit *Mycobacterium marinum*, eine übermäßige, granulomatöse Entzündung, verbunden mit verringerter TGF- β Expression, fest, während infizierte Tilapia (*Oreochromis* spp.) eine geringere Entzündungsreaktion, verbunden mit nicht signifikanten Änderungen der TGF- β Expression, aufwiesen.

2.2.6 Komplementfaktor C3, zentraler Faktor des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist ein sehr alter Verteidigungsmechanismus. Die Anwesenheit von Komplementaktivität oder einzelner Komponenten wurde bei zahlreichen Tierarten von deuterostomen invertebraten Arten, wie den *Echinodermata* (Al-Sharif et al. 1998, Smith et al. 1998, 2001) und *Tunicata* (Nonaka 2001, Smith et al. 1999), bis zu den Säugetieren nachgewiesen. Bei den *Agnatha* wurden Faktoren des alternativen Weges und des Lektin-Weges gefunden (Nonaka et al. 1984, Nonaka & Takahashi 1992, Sunyer & Lambris 1998). Bei Knorpelfischen, zu den primitivsten Immunglobuline besitzenden Arten gehörend, wurden Komponenten aus allen drei Signalwegen der Komplementaktivierung gefunden (Jensen et al. 1981, Smith 1998), wobei die involvierten Faktoren und die Mechanismen der Aktivierung noch untersucht werden müssen. Das Komplementsystem der Knochenfische ist dem der Säugetiere vergleichbar und kann auf allen drei möglichen Wegen aktiviert werden (Holland & Lambris 2002, Sunyer et al. 2003, Boshra et al. 2006).

Das Komplementsystem wurde erstmals als hitzeempfindlicher Teil des Plasmas entdeckt. Es besteht aus über 35 Plasmaproteinen und Rezeptoren, die sowohl bei der angeborenen, unspezifischen Immunität, als auch bei der adaptiven Immunität, eine bedeutende Rolle spielen. Die Plasmaproteine werden meist als inaktive Vorstufe hergestellt und können über eine *triggered-enzyme*-Kaskade mit drei Reaktionswegen aktiviert werden. Es gibt den klassischen Weg, den Weg über Mannan-bindendes-Lektin und den alternativen Weg (Whaley & Schwaeble 1997, Sunyer & Lambris 1999). Die drei Reaktionswege des Komplementsystems sind in Abbildung 2-5 schematisch dargestellt.

Der klassische Weg wird über einen Antigen-Antikörperkomplex initiiert (Gasque 2004). Dabei bindet ein Teil des zellgebundenen IgG oder IgM an C1q, einen Teil des Ca^{2+} -abhängigen C1-Komplexes (Kishore & Reid 2000). Dies führt zu der Spaltung und damit der Aktivierung der C1r und C1s Moleküle. C1s ist nun seinerseits in der Lage C4 in die aktiven Komponenten C4a und C4b zu spalten. C4b bindet dann kovalent an die Zelloberfläche, wo sich C2 anlagert, das wiederum von C1s in C2a und C2b gespalten wird. C2a bleibt an das C4b auf der Oberfläche gebunden und bildet mit diesem die C3-Konvertase (C4b2a), die C3 in C3a und C3b spaltet. C3 ist der zentrale Faktor, an dem die drei Wege der Komplementaktivierung zusammenlaufen. C3b lagert sich an die C3-Konvertase an und bildet mit dieser die C5-Konvertase (C4b2a3b), die aus C5 C5a und C5b generiert (Pangburn & Raval 2002). C5b leitet dann den Bau des membranangreifenden Komplexes (MAC) aus C6, C7, C8 und C9 ein. Die Ausbildung des membranangreifenden Komplexes verursacht die Bildung eines Kanals in der Zellmembran und führt zur Zellysis und damit zum Zelltod (Muller-Eberhard 1986).

Der Lektin-Weg wird durch das mannanbindende Lektin, ein Protein, das dem C1-Komplex des klassischen Weges sehr ähnlich ist, eingeleitet. Es bindet spezifisch an Mannosereste und andere, in einem bestimmten Muster angeordnete Zuckermoleküle von Pathogenen (Turner 2003, Fujita et al. 2004). Dadurch werden MASP-1 und MASP-2, zwei assoziierte Zymogene, die homolog zu C1s und C1r sind, aktiviert und können C4 in C4a und C4b spalten. Der weitere Weg stimmt mit dem klassischen Weg überein.

Der alternative Weg ist unabhängig von Antikörpern und kann direkt durch Pathogene (Virus, Bakterien, Pilze oder Parasiten) aktiviert werden. Durch spontane Hydrolyse von C3 kann sich durch die veränderte Konformation, $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})$, der Faktor B anlagern, der von Faktor D in Ba und Bb gespalten wird; Bb bleibt an $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})$ angelagert und bildet den $\text{BbC3}(\text{H}_2\text{O})$ -Komplex, eine C3-Konvertase in der flüssigen Phase. Dieser Komplex spaltet C3 wieder in C3a und C3b; C3b bindet kovalent über die reaktive Thioesterbindung an die Zelloberfläche des Pathogens und wirkt so opsonierend. An dieses C3b kann sich wieder B anlagern und durch D gespalten werden; durch die Verbindung von C3b und Bb entsteht die alternative C3-Konvertase (C3bBb) die ihrerseits weiteres C3 spalten kann oder durch ein zusätzlich angelagertes C3b zur C5-Konvertase (C3bBb3b) wird (Xu et al. 2001). Der weitere Verlauf gleicht dem des klassischen Weges.

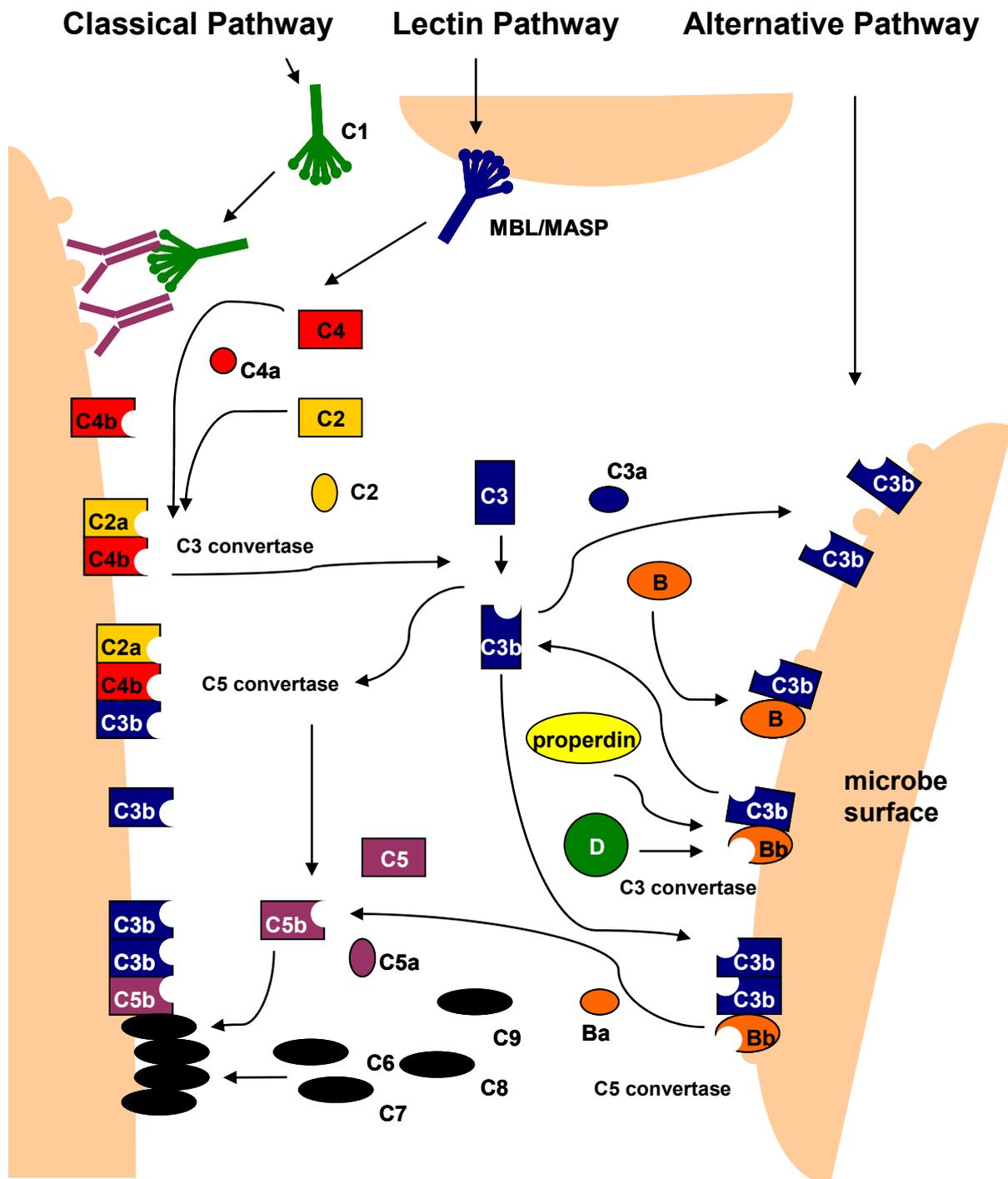


Abbildung 2-5 Schematische Darstellung der drei Reaktionswege der Komplementaktivierung bei Säugetieren (Nach Holland & Lambris 2002). Die Funktionen der Faktoren werden im Text dargestellt.

Im Gegensatz zu dem Komplement von Säugetieren, ist das der Teleostei auch noch bei sehr niedrigen Temperaturen zwischen 0 und 4°C aktiv. Das Temperaturoptimum liegt bei den Teleostei zwischen 15 und 25°C, während es bei Säugetieren bei 37°C liegt. Außerdem liegt der Anteil des alternativen Weges bei den Teleostei um mehrere Größenordnungen höher, als bei Säugetieren (Sakai 1981, Sunyer & Tort 1995, Sunyer & Lambris 1998). Das niedrigere und breiter angelegte Temperaturoptimum des Komplements bei Fischen spiegelt wahrscheinlich Wassertemperaturen wider, auf die der Fisch trifft und zeigt, dass bei niedrigen Temperaturen, wenn die adaptive Immunantwort nachlässt, immer noch ein funktionierendes Komplementsystem vorhanden ist (Holland & Lambris 2002). Einzigartig bei dem Komplementsystem von diploiden und tetraploiden Knochenfischen ist, dass Faktor B und der zentrale Faktor C3 in multiplen biologisch aktiven Isoformen vorliegen, die Produkte verschiedener Gene darstellen, jedoch hohe Ähnlichkeit in der Sequenz aufweisen. Bei Regenbogenforellen wurden drei Isoformen, C3-1, C3-3 und C3-4, geklont (Zarkadis et al. 2001) Es existiert noch eine vierte Isoform, C3-2, die jedoch keine hämolytische Aktivität aufweist (Nonaka et al. 1985). Auch bei anderen Knochenfischen, wie Karpfen, Goldbrassen und Japankärpfingen wurden multiple Isoformen gefunden (Sunyer et al. 1996, 1997, Kuroda et al. 2000, Nakao et al. 2000). C3 besteht, wie auch bei den Säugetieren, aus zwei Polypeptidketten, einer α -Kette und einer β -Kette, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. An der α -Kette ist zusätzlich die charakteristische Thioesterbindungsstelle vorhanden. Die Sequenz unterscheidet sich nur in einigen Aminosäuren von denen von Säugetieren (Nonaka. 1985). Es ist bemerkenswert, dass sich die verschiedenen Isoformen von Forellen und Karpfen in ihrer Affinität an unterschiedliche aktivierende Oberflächen zu binden, unterscheiden (Sunyer et al. 1996, Nakao et al. 2000). Man nimmt an, dass diese Vielfalt in Struktur und Funktion von C3 dazu dient eine größere Anzahl von Pathogenen zu erkennen und damit die Möglichkeiten des angeborenen Immunsystems weiter gefächert werden (Sunyer et al. 1998). Im Gegensatz zu den Säugetieren, ist über die extrahepatische Synthese von Komplement bei Fischen wenig bekannt (Magnadottir et al. 2005); man weiß jedoch, dass die Transkription verschiedener Komponenten schon früh in der Entwicklung stattfindet (Løvoll et al. 2006).

Die in der Komplementkaskade entstandenen Produkte haben entscheidende Funktionen bei der Initiation von Entzündungsreaktionen, der Opsonierung, Phagozytose und Zellysis von Pathogenen, wie auch dem Löslichmachen von Immunkomplexen (Sunyer & Lambris 1999, Gasque 2004). Als Teil der adaptiven Immunantwort sind vor allem C3-, aber auch C4-Fragmente, die an ein Antigen oder Immunkomplexe gebunden sind, an der Steigerung der

Aufnahme und der Verarbeitung von Antigenen durch Antigen-repräsentierende Zellen, beteiligt. Dies führt zu einer effektiveren Antikörperantwort, wie auch zu einer Herabsetzung des Schwellenwertes zur Aktivierung von B-Zellen (Jacquier-Sarlin et al. 1995, Villiers et al. 1996, Boackle et al. 1998, Dempsey et al. 1996).

Der alternative Komplementweg einer Anzahl von Fischen kann, im Gegensatz zu dem des Menschen, fremde Erythrozyten mit einer hohen Effizienz lysieren (Sunyer & Tort 1995).

Komplement-medierte Opsonisation beinhaltet die kovalente Bindung von aktiviertem C3, und auch C4, an die Oberfläche von Pathogenen, woraufhin diese von Phagozyten mit Komplementrezeptoren (bei Säugetieren besonders CR1 und CR3) auf der Oberfläche erkannt werden können (Aderem & Underhill 1999). CR3 kann Opsonierung und Phagozytose von Mikroorganismen ohne zusätzlich stimulierende Signale vermitteln und natürliche Killer-Zellen anregen (Ross 2000). Beide Rezeptoren wurden auf der Oberfläche von allen Phagozyten, einschließlich Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten, gefunden. Opsonierung mittels Komplement wurde bei zahlreichen Knochenfisch-Arten nachgewiesen (Sakai 1984, Morimoto et al. 1988, Matsuyama et al. 1992, Jenkins & Ourth 1993, Lammens et al. 2000). Des Weiteren können Komplement von Fischen und Immunoglobuline synergistische Effekte bei der Opsonierung haben (Olivier et al. 1986, Jenkins & Ourth 1993). Eine wichtige Aufgabe des Komplementsystems ist die Beteiligung an Entzündungsreaktionen. Während der Aktivierung und Spaltung von C3, C4 und C5 entstehen die hochgradig strukturell und funktionell homologen Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a, von denen C5a die größte Potenz zur Auslösung von Immunantworten hat (Ember & Hugli 1997, Kohl 2001). Bei Säugetieren sind C3a und C5a unter anderem an der Migration von Leukozyten, an der Stimulierung des respiratory burst, der Produktion von Prostaglandinen in verschiedenen Leukozyten und der Induktion der IL-1 β Expression in Monozyten beteiligt (Johnson et al. 1975, Haeffner-Cavaillon et al. 1987, Takabayashi et al. 1996, Stahl et al. 1997). Bei Knochenfischen wurden C3a und C5a Anaphylatoxine und deren Rezeptoren nachgewiesen (Kato et al. 2004, Rotllant et al. 2004, Sunyer et al. 2005). Rotllant et al. (2004) wiesen drei biologisch aktive Formen von C3a in Regenbogenforellen und deren Stimulation des respiratory burst nach. Jedoch konnte keines dieser Moleküle Chemotaxis bei Leukozyten aus der Kopfniere auslösen. Mit rekombinant produziertem C5a konnte jedoch Chemotaxis bei peripheren Blut- und Kopfnierenleukozyten, wie auch Induzierung der respiratory burst-Aktivität nachgewiesen werden (Boshra et al. 2004, Holland & Lambris 2004). Li et al. (2004) konnten eine aus C3a, C4a und C5a Molekülen zusammengesetzte Proteinfraction (Particle-Uptake Enhancing Fraction, PUEF-8) aus aktiviertem Forellen-

Serum isolieren, die die Partikelaufnahme in Kopfnieren- und peripheren Blutleukozyten in einer gravierenden, bei Säugetieren unbekanntem, Weise steigert und die Anzahl von phagozytierenden Zellen ansteigen lässt.

Die bakteriziden Eigenschaften von Fisch-Komplement wurden in verschiedenen Studien gezeigt (Ellis 1999, 2001, Holland & Lambris 2002). Es wurde nachgewiesen, dass Pathogene mit hohem Sialinsäureanteil, wie *Aeromonas salmonicida* und *Flexibacter columnaris*, das Komplementsystem in geringerem Maße aktivieren als nicht-pathogene Gram-negative Bakterien mit einem geringen Sialinsäureanteil (Ourth & Bachinski 1987). Ebenso konnte LPS als virulenz-determinierende Struktur für die vermehrte Resistenz von Bakterien gegenüber dem komplement-medierten Abtöten aufgezeigt werden (Munn et al. 1982, Amaro et al. 1997). Die Fähigkeit der neutralisierenden Wirkung von Regenbogenforellen-Antikörpern erwies sich bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHN) als abhängig von Komplement (LaPatra 1996, Lorenzen & LaPatra 1999, Lorenzen et al. 1999). Auch erwiesen sich Brütlinge von Forellen und Masu-Lachs (*Oncorhynchus masu*), deren Serum keine Komplement-Aktivität besaß, als empfänglicher für IHN und IPN als Brütlinge von Keta-Lachsen (*O. keta*), deren Serum Komplement-Aktivität zeigte (Yano 1996). Auch die Beteiligung von Komplement aus Haut oder Serum beim Abtöten von Parasiten konnte schon mehrfach demonstriert werden (Buchmann & Lindenstrøm 2002, Woo 2003). Es wurde gezeigt, dass sowohl *Gyrodactylus derjavini* als auch *G. salaris* durch den Alternativen Komplementweg schnell getötet werden konnten; weiterhin wird die Beteiligung des Lektin-Weges in Betracht gezogen, da C3 sich speziell an Carbohydrat-reichen Stellen an die Parasitenoberfläche band (Buchmann 1998, Harris et al. 1998). Bei einer Infektion von Regenbogenforellen mit *Ichthyophthirius multifiliis* wurde ein Anstieg der Expression von C3 und anderen immunrelevanten Genen nachgewiesen (Sigh et al. 2004a). Eine Involvierung des klassischen Komplementweges wird bei der Immunreaktion von resistenten Karpfen bei Infektion mit *Trypanoplasma borreli* angenommen (Scharsack et al. 2004).

Stress, wie zu hohe Besatzdichte, wirkt sich immunsuppressiv auf die Komplementaktivität aus, während sich eine mit Vitamin E und C und anderen Immunstimulantien angereicherte Fütterung positiv auf die Komplementaktivität auswirken kann (Boshra et al. 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Haltung der Tubificiden

Laborkulturen des Oligochäten *Tubifex tubifex*, die bei einer Temperatur von 14 °C im Brutschrank (Typ KB53, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) gehalten wurden, wurden mit *Myxobolus cerebralis*-Sporen infiziert, die aus Gewebe von im Laborzyklus infizierten Regenbogenforellen isoliert und aufgereinigt worden waren. Die infizierten Oligochäten wurden in 10l Plastikaquarien gehalten, deren Boden mit einer ca. 3 cm dicken Schicht aus abgerundetem, hellem Sand und einer ca. 1 cm dicken Schicht aus Schlamm bestand. Sand und Schlamm waren vor dem Einsatz in den Becken keimfrei gemacht worden. Die Tubificiden wurden zweimal wöchentlich mit zermahlenden Pelletts aus Spirulina-Algen gefüttert.

3.1.2 Regenbogenforellenbrütlinge (*Oncorhynchus mykiss*)

Für die Infektionsversuche wurden zwei verschiedene Linien von SPF-Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) verwendet: ein deutscher Stamm, der eine sehr geringe Empfänglichkeit für die Infektion mit *M. cerebralis* aufweist, und ein amerikanischer Stamm, der sehr empfänglich für die Infektion mit dem Parasiten ist (Hedrick et al. 2003). Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Zuchtanlagen, aus denen das Fischmaterial bezogen wurde, anonymisiert. Die deutsche Linie wird im Folgenden als Linie „H“, die amerikanische Linie als Linie „T“ bezeichnet.

Die Fische wurden als Eier im Augenpunktstadium in das Institut geliefert. Sie schlüpften dort im institutseigenen SPF-Raum (SPF = Spezifisch Pathogen Frei) und wurden dort in Rinnen und Glasaquarien bei 12°C bis zum Beginn der Versuche gehältert. Die Rinnen und Aquarien wurden durch Kieselgurausströmer permanent mit Sauerstoff versorgt. Die Frischwasserzufuhr hatte eine Rate von ca. 1l pro Minute; das Leitungswasser durchlief zuvor eine Entchlorungsanlage und hatte eine Härte von 16,8 °dH. Als Futter wurde handelsübliches Forellenfutter verwendet.

3.1.3 Haltung der Versuchsfische

Die Regenbogenforellen beider Linien wurden nach der Infektion in Aquarien mit je 60l Fassungsvermögen bei etwa 12°C gehalten. Die Aquarien besaßen separate Wasserzu- und abläufe, mit einem Frischwasserzufluss aus entchlortem Leitungswasser von ca. 1l pro Minute bei einer Härte von 16,8 °dH. Die Sauerstoffzufuhr erfolgte permanent mittels Kieselgurausströmern. Einmal täglich wurden die Forellen mit handelsüblichem Forellenfutter gefüttert. Die nicht infizierten Kontrollgruppen beider Linien wurden unter gleichen Bedingungen gehalten.

3.1.4 Tierversuchsantrag

Die durchgeführten Versuche der vorliegenden Arbeit wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Antragsnummer 55.2-1-54-2531-37-01 nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen

Zur Gewinnung der *M. cerebralis*- Sporen wurden im Laborzyklus infizierte, drehkranke Regenbogenforellen mittels einer Überdosierung des Anästhetikums MS 222 (Tricaine-Methan-Sulphonat; Thomson & Joseph Ltd., T&J House, Norwich) getötet. Nach dem folgenden Genickschnitt wurde der Kopf vollständig vom Körper getrennt. Die Wirbelsäule wurde präpariert und das Muskelfleisch entfernt; Augen, Kiemen und dem Kopf anhaftendes Muskelfleisch wurden ebenfalls entfernt. Anschließend wurden Kopf und Wirbelsäule unter Zugabe von etwas Wasser in einem handelsüblichen Mixer 10 Minuten lang homogenisiert. Noch grobe Bestandteile wurden anschließend mittels einer Gaze abgefiltert. Zur Konzentration wurden die Sporen wie von O'Grödnick (1975) beschrieben mit einer Planktonzentrifuge konzentriert. Die erhaltenen Sporen wurden wieder mit etwas Wasser aufgeschwemmt und mit einem Lichtmikroskop in 50µl unter 100-facher Vergrößerung ausgezählt und auf das Gesamtvolumen hochgerechnet.

3.2.2 Infektion der Tubificiden (*Tubifex tubifex*) mit *M. cerebralis*- Sporen

Für die Infektion eines Beckens wurden ca. 28-30g *Tubifex tubifex* mittels eines Siebes vom Schlamm separiert, gesäubert und abgewogen. Die Oligochäten wurden dann in ein vorbereitetes 10l-Plastikaquarium verbracht. Dessen Boden war mit einer ca. 3 cm dicken Schicht aus abgerundetem, hellem Sand und einer ca. 1 cm dicken Schicht aus Schlamm bedeckt. Sand und Schlamm waren vor dem Einsatz in den Becken keimfrei gemacht worden. Zum Zeitpunkt der Infektion war das Aquarium mit nur einer geringen Menge Wasser befüllt. Um eine möglichst hohe Sporenkonzentration im Wasser zu haben, wurde es erst innerhalb einer Woche langsam auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Fütterung mit zermahlenden Pellets aus Spirulina-Algen wurde nach zwei Wochen wieder begonnen. Bis dahin sollten die *M. cerebralis*-Sporen die einzige Nahrungsquelle darstellen und oral aufgenommen worden sein.

3.2.3 Gewinnung der Triactinomyxon- Sporen

Nach 90 Tagen konnten die Becken mit den infizierten Oligochäten zur Gewinnung von Triactinomyxon-Sporen herangezogen werden. Die Sporen wurden mit Hilfe eines Nitex[®] Filtergewebes mit einer Maschenweite von 20µm (Monodur Nr. 20, Josef Hepfinger, München, Deutschland) aus dem Wasser abgefiltert und konzentriert. Die gewonnenen Triactinomyxon-Sporen wurden dann unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung in 50µl Wasser ausgezählt und auf das Ausgangsfiltrat hochgerechnet.

3.2.4 Infektion der Regenbogenforellenbrütlinge (*O. mykiss*) mit Triactinomyxon-Sporen

Mit einem Alter von 6 Wochen nach dem Schlupf, bei einem durchschnittlichen Gewicht von 0,4g, wurden die Regenbogenforellenbrütlinge mit Triactinomyxon-Sporen infiziert. Hierzu wurden in je einem Plastikbehälter $5,1 \times 10^5$ Triactinomyxon-Sporen (TAMs) auf eine Gesamtwassermenge von 450 ml aufgefüllt. Im Folgenden wurden in je einen Behälter 34 Forellen beider Linien zur gleichen Zeit mit einem Kescher eingesetzt. Das entsprach einer Konzentration von 15000 TAMs/Fisch. Die Temperatur des Wassers zu Beginn der Infektion betrug 12°C. Die Expositionszeit in den Behältern betrug 1 Stunde, wobei eine

Sauerstoffzufuhr mit Kieselgurausströmern erst nach einer dreiviertel Stunde erfolgte, um die Infektion in den ersten Minuten nicht zu beeinträchtigen. Nach der Expositionszeit wurden die Forellen der beiden Linien zusammen mit dem Inhalt der Behälter in die vorbereiteten 60l-Aquarien gegeben. Die Wassertemperatur betrug 12°C.

3.2.5 Probengewinnung und –konservierung

Die Probennahme zum Zweck der RNA-Gewinnung wurde nach im Vorfeld festgelegten Zeitpunkten nach der Exposition mit TAMs durchgeführt. Diese Zeitpunkte waren: 5min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, 48h, 4d, 6d, 8d, 20d, 40d, 60d, 120d und 200d nach der Exposition. Es wurden aus jeder Gruppe zwei Forellen entnommen und mit dem Anästhetikum MS 222 (Tricaine-Methan-Sulphonat; Thomson & Joseph Ltd., T&J House, Norwich) in einer Dosis von 0,1g/l Wasser getötet. Anschließend wurde noch ein Genickschnitt durchgeführt.

Die Bauchhöhle wurde aufgeschnitten, die inneren Organe entfernt und die Fische wurden einzeln in verschließbare Gefäße mit entsprechenden Volumina RNAlater[®] (Sigma-Aldrich, Germany), einer RNase-inaktivierenden Salzlösung, verbracht. Dabei war darauf zu achten, dass das Volumen des RNAlater[®] mindestens das Zehnfache des Probenvolumens ausmachte. Um den Proben möglichst wenig Zeit für RNA-Degradation und Enzyminduktion zu geben, was eine Veränderung der eigentlichen Genexpression zur Folge haben könnte, wurden alle Arbeitsschritte von der Tötung bis zum Verbringen in den RNAlater[®] möglichst schnell durchgeführt. Die eingelegten Proben wurden dann über Nacht im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C verwahrt, bevor sie für die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung in den Gefrierschrank bei –20°C verbracht wurden. Bei einer solchen Lagerung kann man, nach den Angaben des Herstellers, von intakter, nicht degradiertes RNA ausgehen. Dies ist die Voraussetzung für die Genexpressionsanalyse.

3.2.6 RNA-Extraktion einschließlich DNase-Verdau

Als erstes wurden alle benutzten Arbeitsoberflächen mit RNaseZAP[®] (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), einer RNase-inaktivierenden Lösung, behandelt. Die in RNAlater[®] fixierten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und das für die RNA-Extraktion benötigte Gewebestück entnommen. Es bestand aus dem kaudalen, distalen Drittel des

Körpers, der Hälfte der Rückenflosse, sowie einem Teil des Schädels. Um eine gegenseitige Kontamination auszuschließen, wurde für jede Probe separates Werkzeug benutzt.

Die Extraktion der Gesamt-RNA jedes einzelnen Fisches wurde dann mit dem RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) durchgeführt. Nicht in dem Kit enthaltene Tubes wurden über Nacht in mit DEPC (Diethylpyrocarbonat, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) versetztem Aqua dest. (1µl DEPC/1ml Aqua dest.) unter einem Abzug eingeweicht, anschließend getrocknet und autoklaviert. Zur Disruption wurden die Gewebeproben mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem sterilen Mörser zermahlen. Von der zermahlene Probe wurden 30mg in einem stickstoffgekühlten 2ml-Tube abgewogen, um die maximale Extraktions-Kapazität der gewählten Methode nicht zu überschreiten. Bevor die Probe auftauen konnte, wurden 600µl Lysis Buffer hinzu gegeben und vermischt. Der Lysis Buffer wurde zuvor aus dem im Kit enthaltenen RLT Buffer und β-Mercaptoethanol (β-ME, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) unter dem Abzug hergestellt (1ml Buffer RLT, 10µl β-ME) und vermischt. Die Flüssigkeit wurde nun zur Homogenisation unverzüglich in einen QIAshredder spin column (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) pipettiert und 3min lang bei 14000 rpm zentrifugiert. In einem neuen 2ml-Tube wurde das gleiche Volumen (600µl) 70%iges Ethanol (Roth, Karlsruhe, Germany) zu der erhaltenen Flüssigkeit hinzugefügt. Die Extraktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers zur Isolation der Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe (RNeasy[®] Mini Handbook, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) fertiggestellt. Da sich bei den ersten Extraktionen Kontaminationen mit DNA zeigten, wurde der optional vorgesehene DNase-Verdau auf der Säule mit dem RNase-Free DNase Set (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), wie vom Hersteller beschrieben (RNeasy[®] Mini Handbook, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), eingefügt. Die Elution der RNA von der Silica-Gel-Membran wurde mit 40µl (70°C) des im Kit enthaltenen, sterilen, RNase-freien Wassers durchgeführt.

Die Quantität und Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe der Spektrophotometrie bestimmt (Biophotometer, Eppendorf, Germany). Von der gewonnenen RNA wurde 1µl in 59µl RNase-freiem Wasser verdünnt und in der passenden Küvette (UVette, Eppendorf, Germany) gemessen. Zur Qualitätsbestimmung wurde der Quotient A_{260}/A_{280} herangezogen. Alle extrahierten RNA-Proben hatten einen Wert von 1.7-2.0. Nach der Spektrophotometrie wurden zu dem RNA-Eluat 1,5µl RNase Inhibitor (Eppendorf, Germany) hinzugegeben und vorsichtig vermischt, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Die RNA-Eluate wurden in 1µg-Portionen aliquotiert und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

3.2.7 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zum Umschreiben der zellulären RNA in cDNA, eine komplementäre Einzelstrang-DNA, wurde das iScript™cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Germany) verwendet. Es wurde zum einen wegen der guten Ergebnisse die damit erreicht wurden, im Vergleich zu einem anderen System, das vorher getestet worden war, ausgewählt, zum anderen wegen der unkomplizierten Handhabung, die Pipettierfehler verringert. In die Reaktion wurde je 1 µg RNA eingesetzt; das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis nach den Herstellerangaben (Bio-Rad, Germany) als Stammlösung vorbereitet, um eine Umschreibung unter möglichst gleichen Bedingungen zu gewährleisten, anschließend auf die 0,2ml-PCR-Tubes mit der RNA verteilt, gemischt und vorsichtig herunter zentrifugiert. Die RNA in den PCR-Tubes war zuvor bei allen Proben mit RNase-freiem, sterilem Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt worden, um das gleiche Endvolumen zu erlangen. Das Reaktionsprotokoll des Herstellers wurde befolgt: Die Reaktionslösungen wurden in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Germany) zuerst 5min bei 25°C gehalten, für 30min auf die, für die iScript™ Reverse Transcriptase, optimale Temperatur von 42°C erwärmt, anschließend in einem Denaturierungsschritt für die Transcriptase 5min auf 85°C erhitzt. Nachdem die Proben vom Thermocycler auf 4°C abgekühlt worden waren, wurden sie entnommen, wie unter 3.2.6 (RNA-Extraktion einschließlich DNase-Verdau) beschrieben, Quantität und Qualität mit der Spektrophotometrie (Biophotometer, Eppendorf, Germany) gemessen und in Aliquots von 2,5 µg cDNA in 0,2ml-PCR-Tubes bis zu ihrer Verwendung in der real-time RT-PCR bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2.8 Konstruktion der Primer für die real-time RT-PCR

Bis auf die Primerpaare für β -actin und iNOS, die von Sigh et al. (2004a) designed wurden, sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonucleotidpaare selbst entworfen worden. Eine Übersicht der Primerpaare ist in Tabelle 3-1 zu finden.

Die Nucleotidsequenzen der jeweiligen Zielgene sind der NCBI-Datenbank entnommen worden. Anhand dieser Sequenzen wurden die Primerpaare mit Hilfe des Computerprogrammes „Oligo“ entworfen. Bei der Konstruktion von Primerpaaren für die real-time RT-PCR waren für den optimalen Einsatz von SYBR-Green einige Punkte zu beachten: Die Amplifikate sollten idealerweise eine Größe zwischen 80 und 250 Basenpaaren haben. Der GC-Gehalt sollte sich zwischen 50 und 60% bewegen, wobei man darauf achtet,

dass am 3'-Ende ein G oder C oder eine Kombination dieser Basen steht, die aber nicht mit dem 5'-Ende kompatibel sein darf. Die letzten fünf Basen nach dem 3'-Ende sollten wiederum aber höchstens zwei G oder C enthalten. Die Länge der Oligonucleotide sollte zwischen 19 und 24 Basen betragen, wobei längere nach Möglichkeit zu bevorzugen sind.

Tabelle 3-1 Alle in der real-time RT-PCR verwendeten Primerpaare, einschließlich der Länge des jeweiligen Ampliconprodukts in Basenpaaren (bp) und der Accession-Nummer der NCBI-Datenbank (Bezeichnung F: forward, R: reverse)

Bezeichnung	Größe des Amplicons (bp)	Primer Sequenz (5'-3')	Accession-Nr.
Bact-F	260	ATG GAA GGT GAA ATC GCC	AF 157514
Bact-R		TGC CAG ATC TTC TTC ATG	
Arginase II F	231	TCA CTT TCC ACC ACC TCT TG	AY 056477
Arginase II R		TCT CCA CCG CCT CAC GAC TC	
COX-2_F	87	ACA AAG GGT TGT GGA ACG TC	AJ 238307
COX-2_R		CCA AAT GTG AGC GGG GTG TC	
C3_F	172	GCT CCC TCA TCA TCT ATC TTG	AF 271080
C3_R		TCC TTC TTC AAT GGG TGG TAG	
IL1 β 1 F	144	TAT CCC ATC ACC CCA TCA CC	AJ 223954
IL1 β 1 R		CTT CCA CAG CAC TCT CCA GC	
IL-1 β 2_F	216	AGA GGC TAA ATG GTG GCA AG	AJ 245925
IL-1 β 2_R		ATA CCC CGT TCT GTT TGT GC	
iNOS-F5	234	CGA ATG GAG CTA TCG TCA GAC	AJ 295230
iNOS-R1		CGG GAA CGT TGT GGT CAT AAT ACC	
TGF_F	184	AGT TGC CTT GTG ATT GTG GG	X 99303
TGF_R		GTG GTT TGT CGT TTC TTC CG	

Die Sequenzen wurden so gewählt, dass die Primerpaare nicht komplementär waren. Dies sollte die Amplifikation von unerwünschten Nebenprodukten, sogenannten Primer-Dimeren, bei der PCR auf ein Minimum reduzieren. Solche Nebenreaktionen verringern die Effizienz einer PCR. Bei der Verwendung von SYBR-Green in der real-time PCR ist besonders darauf zu achten, da dieses Fluorophor keine Unterscheidung von gewünschtem Produkt und unerwünschtem Nebenprodukt zulässt.

Die Synthese aller Primerpaare wurde bei MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) in Auftrag gegeben. Sie wurden dann mit sterilem Wasser (Roth, Karlsruhe, Germany) auf ein Lösungsvolumen von 100 pmol/μl gebracht und als Stammlösung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.9 Qualitative PCR und Agarosegelelektrophorese zur Optimierung der Annealing-Temperaturen und der Primerkonzentrationen

Qualitative PCR-Reaktionen mit anschließender Agarosegelelektrophorese wurden aus verschiedenen Gründen durchgeführt. Zum einen wurde die Spezifität der entworfenen Primerpaare für die entsprechenden Zielgene überprüft. Weiterhin wurden Annealing-Temperatur und Primerkonzentration für jedes Primerpaar einzeln optimiert. Die angegebenen Annealing-Temperaturen, sowohl der „Oligo“-Software als auch des Herstellers, können noch erhöht werden, was die Spezifität der PCR-Reaktionen nochmals erhöht. Zu diesem Zweck wurden für jedes Primerpaar PCR-Reaktionen mit Temperaturgradienten, angefangen knapp unter der angegebenen Schmelztemperatur bis einige Grad darüber, durchgeführt. Die Reaktionsansätze setzten sich aus 17μl 1.1x Reddy-MixTM PCR Master Mix (ABgene, Hamburg, Germany), je 1μl (20pmol) forward- und reverse-Primer und 1μl cDNA zusammen. Für gleiche Reaktionsansätze wurde jeweils ein Mastermix, den 1.1x Reddy-MixTM PCR Master Mix und die Primer enthaltend angesetzt, der homogenisiert und auf die cDNA-Proben verteilt wurde. Die Proben wurden dann zusammen mit dem Mastermix homogenisiert, auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert und in einen Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Germany) verbracht.

Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert: Initiale Denaturierung 94°C für 3min, 35 Reaktionszyklen mit jeweils Denaturierung 94°C für 45sec, Annealing für 45sec, Elongation 72°C für 45sec, eine finale Extension bei 72°C für 7min, anschließend Herunterkühlen des PCR-Produktes auf 4°C. Bei dem Annealing-Schritt wurde die Gradienten-Funktion des Thermocyclers verwendet. Die Einstellung wurde für jedes Primerpaar separat gewählt. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikationsprodukte wurde ein 1,5%iges Agarosegel, das mit Ethidiumbromid gefärbt worden war, verwendet. Unter den Banden wurde diejenige ausgewählt, die noch ein gutes Amplifikat mit höchst möglicher Temperatur ergab; diese Temperatur wurde dann als Annealing-Temperatur für diese Reaktion gewählt.

Um mögliche Primer-Dimere und ungewünschte Nebenreaktionen weiter zu minimieren, wurden mit der ermittelten Annealing-Temperatur weitere PCR-Reaktionen mit Primerkonzentrationen zwischen 20pmol und 5pmol durchgeführt. Die Reaktionsansätze

setzten sich aus 17µl 1.1x Reddy-Mix™ PCR Master Mix (ABgene, Hamburg, Germany), je 1µl forward- und reverse-Primer (in verschiedenen Konzentrationen) und 1µl cDNA zusammen. Die Proben wurden dann zusammen mit dem 1.1x Reddy-Mix™ PCR Master Mix und den Primern homogenisiert, auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert und in einen Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Germany) verbracht. Eine Übersicht über die Programme ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Die optimale Primerkonzentration wurde so gewählt, dass genügend Primer für die Amplifikationen vorhanden waren, aber möglichst wenige überschüssig: immer diejenige Bande wurde ausgewählt, die gerade noch kein schwächeres Amplifikat zeigte.

Die ermittelten optimalen Primerkonzentrationen sind: Für β -Actin, C3, IL-1 β 1, iNOS und TGF- β jeweils 10pmol F/R-Primer, für Arginase-2 und COX-2 jeweils 15pmol F/R-Primer und für IL-1 β 2 20pmol F/R-Primer.

Tabelle 3-2 Übersicht über die gewählten Programme für alle Primerpaare im Thermocycler bei der qualitativen PCR.

Zielgen	Denaturierung	Annealing	Elongation	Anzahl der Zyklen
β-Actin	95 °C/ 3 min	-	-	1
	94 °C/ 45sec	58,0 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
Arginase-2	95 °C/ 3 min	-	-	1
	95 °C/ 45sec	64,6 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
C3	95 °C/ 3 min	-	-	1
	95 °C/ 45sec	60,5 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
COX-2	95 °C/ 3 min	-	-	1
	95 °C/ 45 sec	64,7 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
IL-1β1	95 °C / 3 min	-	-	1
	95 °C / 45 sec	63,1 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
IL-1β2	95 °C/ 3 min	-	-	1
	95 °C/ 45 sec	62,4 °C/ 45sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
iNOS	95 °C/ 3 min	-	-	1
	95 °C/ 45sec	65,0 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1
TGF-β	95 °C/ 3 min	-	-	1
	95 °C/ 45 sec	65,0 °C/ 45 sec	72 °C/ 45 sec	35
	-	-	72 °C/ 7 min	1

3.2.10 Klonierung der Amplifikate

Die Mengen exprimierter RNA waren bis auf β -Actin, das ja als Referenzgen bei der real-time RT-PCR agieren sollte, zu gering, um für die Standardkurve eine 10-fache Verdünnungsreihe über 5-7 logarithmische Stufen herzustellen. Aus diesem Grund wurden die Amplifikate von Arginase-2, COX-2, C3, IL-1 β 1, IL-1 β 2, iNOS und TGF- β kloniert.

Das Amplifikat wurde nach der Elektrophorese jeweils vorsichtig mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit dem MinEluteTM Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) exakt nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend unverzüglich auf Eis gestellt.

Die Klonierungsreaktionen wurden mit dem TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen Corporation, Groningen, The Netherlands) durchgeführt. Dazu wurden, nach den Anweisungen des Herstellers, 4 μ l jedes Amplicons in den TA cloning vector pCR[®] 4 ligiert und in chemisch kompetente *Escherichia coli* (im Kit enthalten) transformiert. Die Bakterien wurden auf LB-Kanamycin-Agar Platten (LB-Agar-Pulver, Applichem GmbH, Darmstadt, Germany; Kanamycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), die mit X-Gal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) und DMF (N,N-Dimethylformamid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) behandelt waren, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die weißen Kolonien (blue/white-screening), die den Vektor enthalten sollten, gepickt und in LB-Medium (LB-Pulvermedium, Applichem GmbH, Darmstadt, Germany), das Kanamycin enthielt, über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach einer Inkubation von ca. 18-24 Stunden wurde mittels Spektrophotometrie (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany) der OD₆₀₀-Wert bestimmt.

Aus Kulturen, die einen OD₆₀₀ zwischen 2.0 und 4.0 aufwiesen, wurde die Plasmid-DNA mit dem FastPlasmid Mini Kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Plasmide wurden mittels qualitativer PCR mit den Primern für die real-time RT-PCR (siehe 3.2.8 und 3.2.9) und der Gelelektrophorese überprüft, ob sie das gewünschte Amplifikat enthielten. Die Plasmide wurden dann bei -20°C im Gefrierfach separat aufbewahrt.

3.2.11 Schneiden der Plasmide mit Restriktionsenzymen

Um „supercoiled“-Formen der Plasmid-DNA zu verhindern, die insbesondere bei der real-time RT-PCR negativen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz hätten, wurden die Plasmide mit einem jeweils passenden Restriktionsenzym, das den TA cloning vector pCR[®] 4 nur einmal schneidet, inkubiert.

Für die Plasmide, die Amplifikate von Arginase-2, C3, COX-2, IL-1 β 2, iNOS oder TGF- β enthielten, war es das Restriktionsenzym Nco I (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Der 10 μ l-Reaktionsansatz bestand aus: 1 μ l 1xNE Buffer 4, 0,15 μ l Restriktionsenzym Nco I, 1 μ g Plasmid-DNA und sterilem Wasser, mit dem der Ansatz auf 10 μ l aufgefüllt wurde. Der Ansatz wurde dann 1 Stunde bei 37°C, anschließend 20min bei 60°C inkubiert. Das Plasmid mit dem Amplifikat von IL-1 β 1 konnte mit dem Restriktionsenzym Sca I (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) geschnitten werden. Der 10 μ l-Reaktionsansatz bestand aus: 1 μ l 1xNE Buffer 3, 0,15 μ l Restriktionsenzym Sca I, 1 μ g Plasmid-DNA und sterilem Wasser, mit dem der Ansatz auf 10 μ l aufgefüllt wurde. Der Ansatz wurde dann 1,5 Stunden bei 37°C, anschließend 20min bei 80°C inkubiert.

Der Ansatz wurde, nach abgeschlossenem Restriktionsenzym-Verdau, mit dem MinElute[™] Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) nach den Angaben des Herstellers für Aufreinigung direkt aus dem PCR-Produkt aufgereinigt und anschließend unverzüglich auf Eis gestellt. Die aufgereinigten, geschnittenen Plasmide wurden dann unverzüglich zur Herstellung der Verdünnungsreihen verwendet, das übrige Material bei -20°C separiert von anderen Proben aufbewahrt.

3.2.12 Relative Quantifizierung mittels real-time RT-PCR

Die relative Quantifizierung der Genexpression verschiedener Zielgene wurde mittels real-time RT-PCR unter Verwendung des MyiQ[™] Single-Color Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, Germany) durchgeführt.

Um die Effizienz der PCR-Reaktionen zu erfassen, ist die Erstellung einer Standardkurve für jedes Gen eine gängige Methode. Für die Standardkurve jedes Gens wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe angesetzt. Zum Verdünnen der cDNA wurde EB-Buffer (QIAGEN, Hilden, Germany) verwendet. Die Standardreihe wurde in Triplikaten analysiert, um so die Amplifikationsrate bei unterschiedlichen Konzentrationen zu vergleichen. Die Effizienz E der Reaktion lässt sich dann aus der Steigung der Standardkurve („slope“) nach der Formel

$E=10^{-1/\text{slope}}$ berechnen. Die Effizienz ist optimal, wenn sich die Anzahl der Amplifikate bei jedem Zyklus verdoppelt; sie sollte sich auf jeden Fall zwischen 85 und 100% bewegen.

Der Pipettieransatz für die Standardreihe wurde in Reaktionsvolumina von 25µl angesetzt und enthielt 12,5µl iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Germany), 1,25µl forward/ reverse-Primer (in den unter 3.2.9 ermittelten Konzentrationen) und 10µl der cDNA in verschiedenen Konzentrationen aus der Verdünnungsreihe. Für die Verdünnungsreihe des Referenzgenes β -Actin wurde als Anfangskonzentration 1µg cDNA eingesetzt. Für die anderen Verdünnungsreihen wurden die jeweiligen Plasmide eingesetzt, da diese Gene für eine 10-fache Verdünnungsreihe über mehrere logarithmische Stufen nicht genügend exprimiert wurden. Bei den Plasmiden lag die Anfangskonzentration deutlich niedriger. Da im Verlauf des Pipettierens Volumen v.a. durch Adsorption der Reaktionslösung an den Einmalspitzen der Pipetten verloren ging, war es notwendig die 3,5-fache Menge des Pipettieransatzes für die Triplikate zu erstellen. Zuerst wurde eine Stammlösung aus iQTM SYBR[®] Green Supermix und den forward/ reverse-Primern hergestellt, dies wurde dann zu der 3,5-fachen Menge cDNA/ Plasmid gegeben, homogenisiert und auf den Boden des Tubes zentrifugiert. Aus dem jeweiligen Tube wurden die Triplikate in die 96-well-Lochplatte (iQ 96-Well PCR Plates, Bio-Rad, Germany) pipettiert, um in jedem well exakt die gleiche Menge der Komponenten zu haben. Die 96-well-Lochplatten, wurden anschließend mit einer transparenten Klebefolie verschlossen (Microseal[®] 'B'Film, Bio-Rad, Germany) und unverzüglich die real-time RT-PCR im MyiQTM Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Germany) durchgeführt.

Bei den ersten Läufen konnte festgestellt werden, dass zum Teil eine Zeit von 20 sec bei Denaturierung, Annealing und Elongation in den Zyklen ausreichend war. Die Zahl der Zyklen wurde auf 40 erhöht; eine Elongation nach Abschluss der Zyklen war nicht nötig. Zur Verifizierung der spezifischen Amplifikation diente jeweils eine Schmelzkurve im Anschluss an die PCR. Zur Überprüfung der Reaktionen waren bei jedem Lauf Negativkontrollen ohne cDNA vorhanden.

Die endgültigen Standardkurven sind im Ergebnisteil unter 4.1 zu finden. Die ermittelten Effizienzen lagen bei 96,1% für β -Actin, 94,4% für Arginase II, 93,4% für C3, 97,7% für COX-2, 89,4% für IL-1 β 1, 96,2% für IL-1 β 2, 92,8% für iNOS and 98,2% für TGF- β .

Die real-time RT-PCR-Reaktionen der Proben wurden als Duplikate angesetzt. Da auch hier Verluste beim Pipettieren entstanden, wurde jeweils die 2,5-fache Menge verwendet. Beim Pipettieren wurde in gleicher Weise wie bei den Standardreihen verfahren. Die PCR-Reaktionen wurden in 25µl-Volumina/well ausgeführt, darin enthalten: 1µg Proben-cDNA

auf 10µl mit EB-Buffer (QIAGEN, Hilden, Germany) aufgefüllt, 1,25µl forward/reverse-Primer (β -Actin, C3, IL-1 β 1, iNOS und TGF- β jeweils 10pmol F/R-Primer; Arg-2 und COX-2 jeweils 15pmol F/R-Primer und IL-1 β 2 20pmol F/R-Primer) und 12,5µl iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Germany). Zur Überprüfung der Reaktionen waren bei jedem Lauf Negativkontrollen vorhanden.

Die Protokolle für die real-time RT-PCR sind in Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4 aufgeführt.

β -Actin diente zur Normalisierung der verschiedenen Gene. Die Werte der threshold cycles wurden den Annealing-Schritten entnommen. Die relative Expression der Proben wurden mit dem Gene Expression Analysis for iCycler iQ[®] Real-Time PCR Detection System (v1.10-©2004, Bio-Rad, Germany) berechnet, das auf den Algorithmen von Vandesompele et al. (2002) basiert.

Tabelle 3-3 Temperaturprogramm der real-time RT-PCR für β -Actin mit anschließender Schmelzkurvenanalyse

Ab-schnitt	Wieder-holungen	Schritt	Dauer (min:sec)	Temperatur-endpunkt (°C)	Halten	Schmelz-kurve	Temperatur-steigerung (°C)
1	1	1	03:00	95			
2	35	1	00:45	94			
		2	00:45	58			
		3	00:45	72			
3	1	1	01:00	95			
4	1	1	01:00	55			
5	90	1	00:10	55		✓	0,5
6	1	1		20	✓		

Tabelle 3-4 Temperaturprogramm der real-time RT-PCR für Arg-2, C3, COX-2, IL-1 β 1, IL-1 β 2, iNOS und TGF- β mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

Ab-schnitt	Wieder-holungen	Schritt	Dauer (min:sec)	Temperatur-endpunkt (°C)	Halten	Schmelz-kurve	Temperatur-steigerung (°C)
1	1	1	03:00	95			
2	40	1	00:20	95			
		2	00:20	*			
		3	00:20	72			
3	1	1	01:00	95			
4	1	1	01:00	55			
5	90	1	00:10	55		✓	0,5
6	1	1		20	✓		
<p>* spezifische Annealing-Temperatur (Abschnitt 2, Schritt 2) für die Zielgene: Arg-2: 64,6°C; C3: 60,5°C; COX-2: 64,7°C; IL-1β1: 63,1°C; IL-1β2: 62,4°C iNOS: 65,0°C; TGF-β: 65,0°C</p>							

4 Ergebnisse

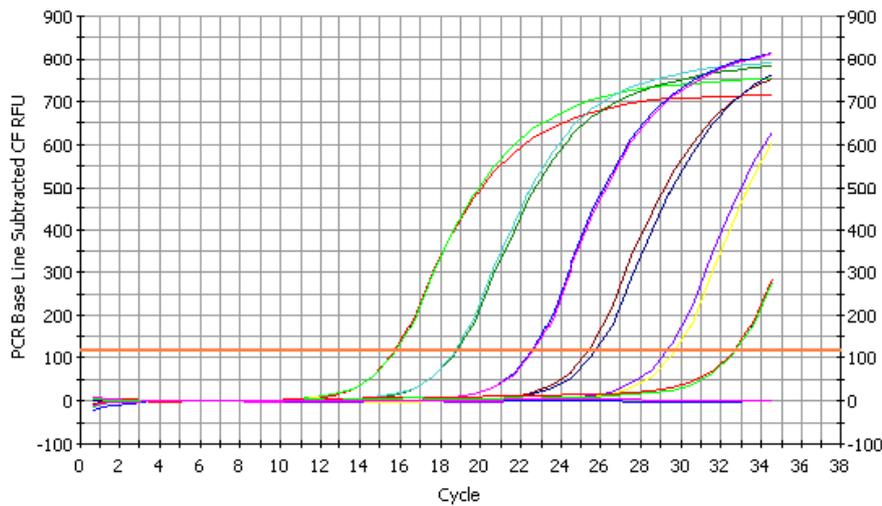
4.1 Standardisierung der Reaktionen für die real-time RT-PCR

Bis auf die Primer für iNOS und β -Actin (Sigh et al. 2004a), die übernommen werden konnten, wurden alle Primer mit, für die real-time PCR geeigneten Eigenschaften konstruiert. Die Sequenzen aller verwendeten Primerpaare finden sich in Tabelle 3-1. Vor dem ersten Einsatz in der real time-PCR wurden die Protokolle, mit ihnen die benötigten Zeiten für die einzelnen Schritte und die verwendeten Temperaturen, sowie die eingesetzte Primermenge für jedes Primerpaar einzeln unter Verwendung der qualitativen PCR optimiert. Zur Optimierung der Annealing-Temperaturen wurden verschiedene Temperaturgradienten getestet; anschließend wurde die benötigte Menge von in die Reaktion einzusetzendem Primer mittels Verdünnungsreihen ermittelt. Die optimalen Primerkonzentrationen für die durchgeführten Reaktionen sind für β -Actin, C3, IL-1 β 1, iNOS und TGF- β jeweils 10pmol F/R-Primer, für Arginase-2 und COX-2 jeweils 15pmol F/R-Primer und für IL-1 β 2 20pmol F/R-Primer. Die Protokolle finden sich in Kapitel 3.2.12.

Die endgültigen Programme mit anschließender Schmelzkurvenanalyse für den Einsatz im MyiQTM Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Germany) sind in Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4 aufgeführt.

Die Standardisierung der PCR-Reaktionen spielt in der real-time RT-PCR eine wichtige Rolle. Eine gängige Methode ist die Erstellung einer Standardkurve für jedes zu untersuchende Gen. Mit der Standardkurve kann die Effizienz der PCR-Reaktionen ermittelt werden, die zwischen 85 und 100% liegen sollte. Für die Erstellung dieser Kurve wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe der cDNA einer Probe angesetzt.

Von β -Actin, das als Referenzgen zur Normalisierung der Proben herangezogen wurde, war in 1 μ g cDNA genügend Material für eine 10-fache Verdünnungsreihe über mindestens 5 logarithmische Stufen vorhanden. Die Ergebnisse der Standardisierung für β -Actin sind in Abbildung 4-1 dargestellt. Es wurden Amplifikationsreaktionen über 6 logarithmische Stufen erstellt. Der von der Software des MyiQTM Single-Color Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, Germany) berechnete Schwellenwert in den Amplifikationsreaktionen lag bei 116,2. Die Steigung der Standardkurve („slope“) betrug -3,42 und der Korrelationskoeffizient 0,999. Für β -Actin ergab sich eine Effizienz der PCR-Reaktionen von 96,1%.

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,420 Intercept: 15,610 $Y = -3,420 X + 15,610$
 PCR Efficiency: 96,1 %

□ Unknowns
 ● Standards

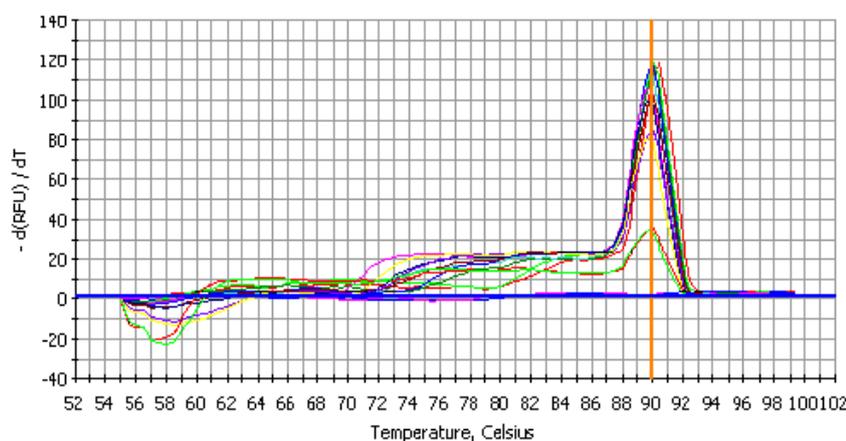
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-1 β -Actin: A. Zweifach linear basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).

Zur Ermittlung der Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde direkt im Anschluss ein Thermoprotokoll zur Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Der Peak für β -Actin liegt bei 90,0°C.

Für die Verdünnungsreihen der anderen Gene musste ein in der qualitativen PCR erhaltenes Amplifikat kloniert werden, da, wie sich herausstellte, in 1 μ g cDNA nicht genügend Abschriften dieser Gene vorhanden waren. In qualitativen PCR-Reaktionen und unter Verwendung von Gelelektrophorese wurde überprüft, ob die aufgereinigten Plasmide das erwartete Insert enthielten. Um „supercoiled“-Formen zu vermeiden, die die Amplifikationsreaktionen bei der real-time RT-PCR behindern würden, wurden die einzelnen Plasmide mit einem passenden Restriktionsenzym einmal ausserhalb des Inserts geschnitten und damit linearisiert. Die in den Verdünnungsreihen eingesetzte Menge an Plasmid war deutlich geringer als bei der cDNA der Verdünnungsreihe für β -Actin.

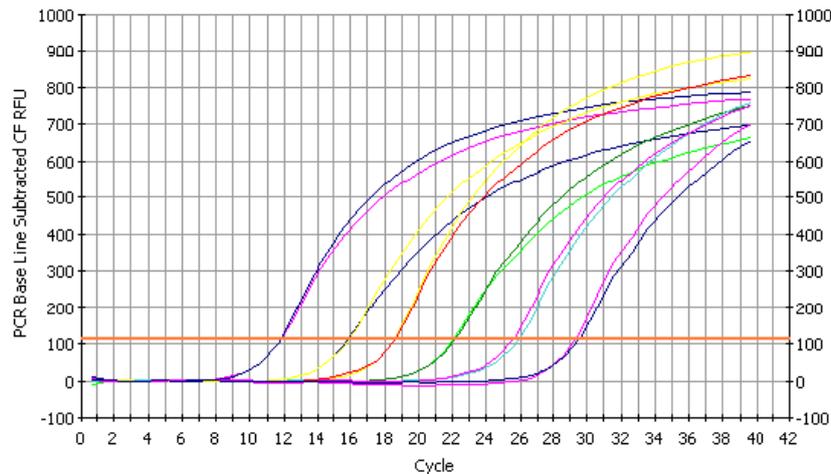
Für Arginase-2 (siehe Abbildung 4-2) wurden Amplifikationsreaktionen über 6 logarithmische Stufen hergestellt; der Schwellenwert wurde bei 114,6 festgelegt. Die Standardkurve hatte eine Steigung von -3,465 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,999. Die Effizienz der PCR-Reaktionen liegt bei 94,4%. In der anschließenden Schmelzkurvenanalyse lag der Peak bei 87,5°C.

Ebenfalls über 6 logarithmische Stufen ging die Amplifikation von C3 (siehe Abbildung 4-3), mit einem berechneten Schwellenwert von 119,3. Eine Effizienz von 93,4% wurde für C3 unter Verwendung der Standardkurve, mit einer Steigung von -3,490 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,998, festgestellt. Der Peak der Schmelzkurve lag bei 83°C.

Die gleiche Anzahl an Verdünnungsstufen wurde bei den Amplifikationsreaktionen für COX-2 (siehe Abbildung 4-4) verwendet; der Schwellenwert lag bei 167,4. Die Standardkurve weist eine Steigung von -3,359 und einen Korrelationskoeffizienten von 1,0 auf; es ergibt sich eine Effizienz von 98,5%. Der Peak der Schmelzkurve liegt bei 82°C.

Bei IL-1 β 1 (siehe Abbildung 4-5) erfolgte die Amplifikation ebenfalls über 6 logarithmische Stufen, mit einem berechneten Schwellenwert von 16,9. Die Standardkurve ergab eine Effizienz von 91,6%, mit einer Steigung von -3,542 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,997. Der Schmelzpunkt lag bei 86,0°C.

Mit 7 logarithmischen Stufen in der Amplifikation und einem ermittelten Schwellenwert von 224,3, wurde die Standardkurve von IL-1 β 2 erstellt (siehe Abbildung 4-6). Die Effizienz betrug 96,2%, die Steigung -3,416 und der Korrelationskoeffizient 0,999; der Peak für die Schmelztemperatur lag bei 86,0°C.

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,465 Intercept: 1,563 $Y = -3,465 X + 1,563$
 PCR Efficiency: 94,4 %

□ Unknowns
 ● Standards

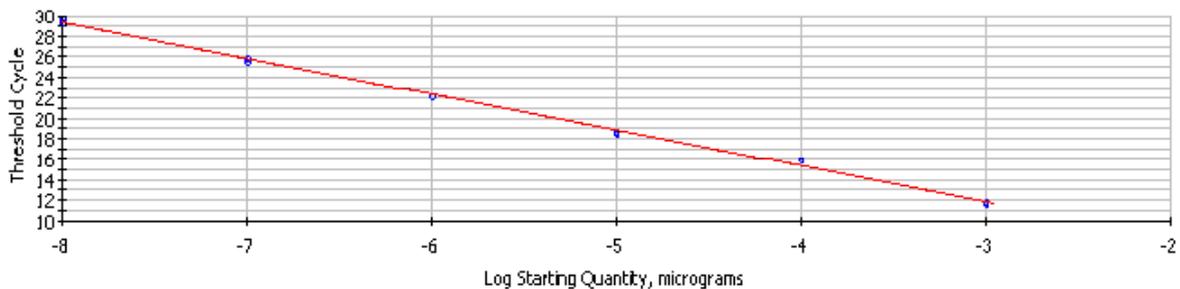
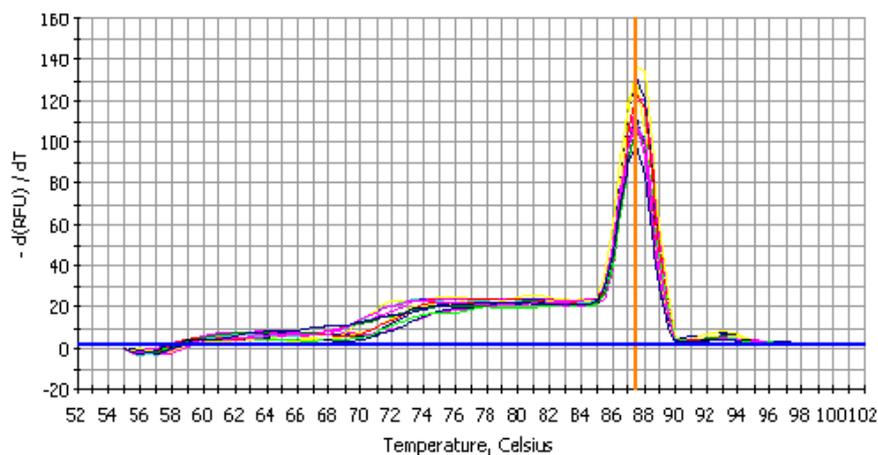
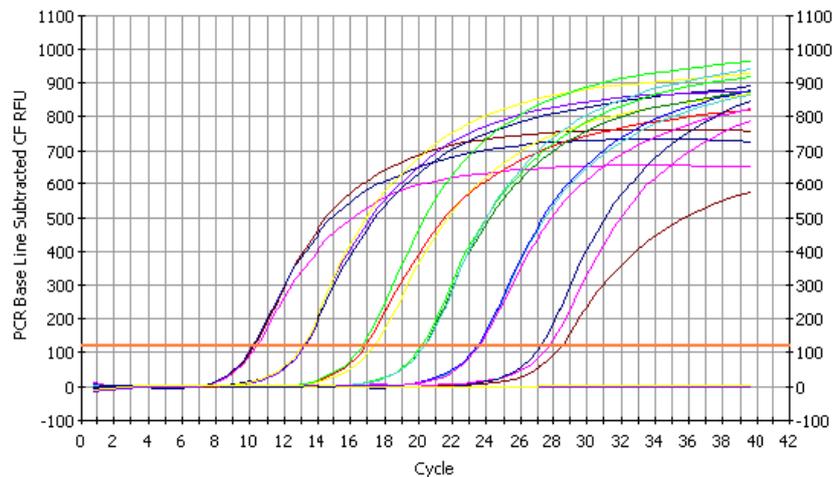
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-2 Arginase-2: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,998 Slope: -3,490 Intercept: 2,974 $Y = -3,490 X + 2,974$
 PCR Efficiency: 93,4 %

□ Unknowns
 ● Standards

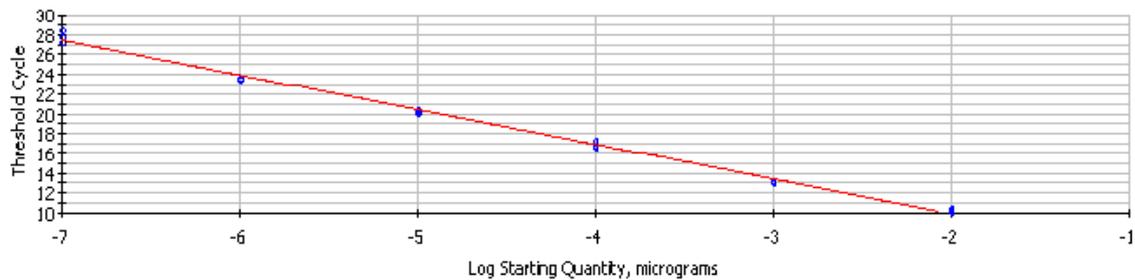
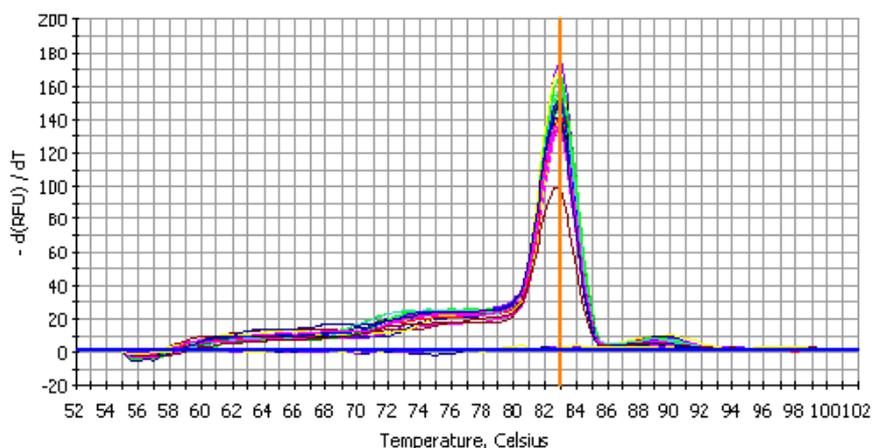
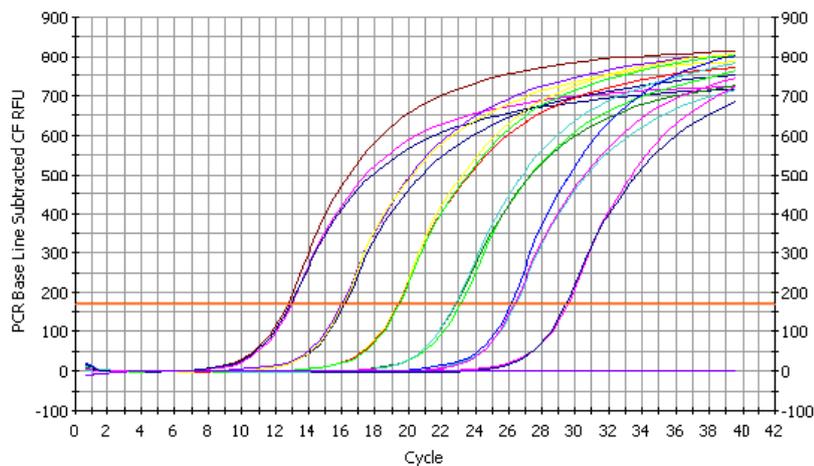
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-3 C3: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(RFU)/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 1,000 Slope: -3,359 Intercept: 2,682 $Y = -3,359 X + 2,682$
 PCR Efficiency: 98,5 %

□ Unknowns
 ● Standards

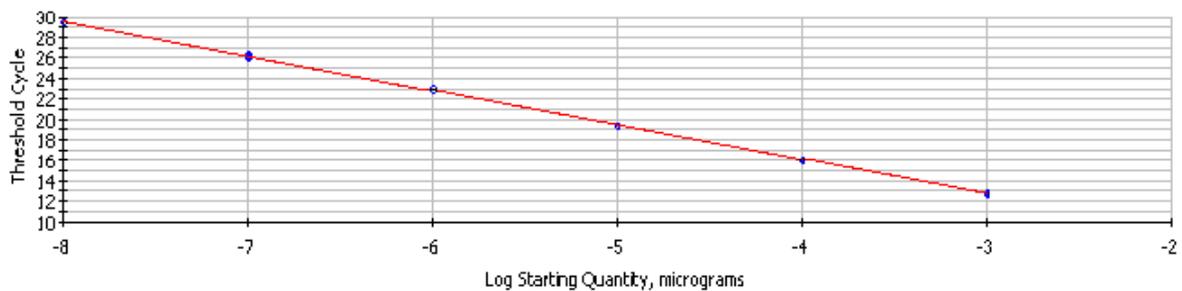
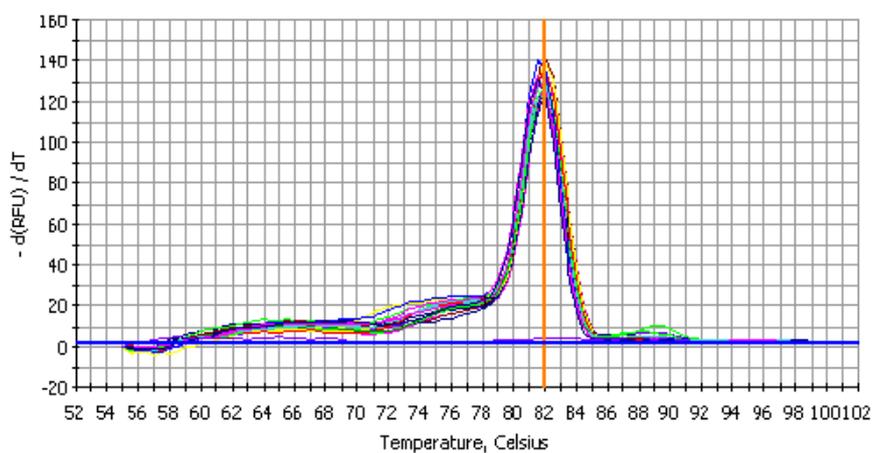
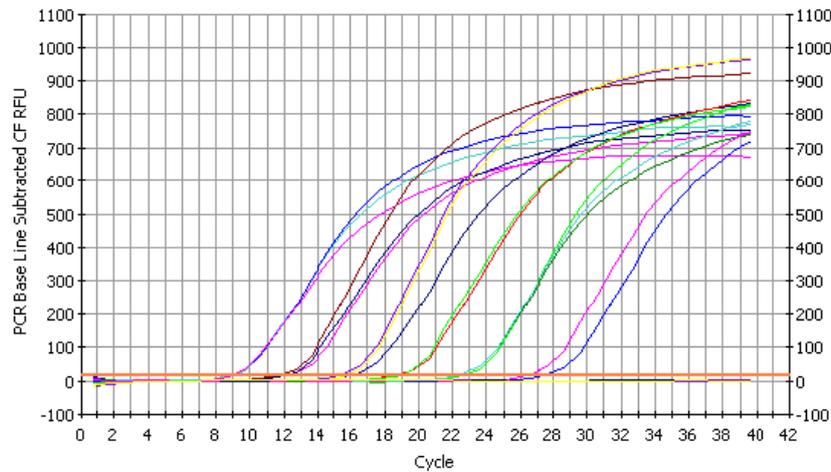
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-4 COX-2: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(RFU)/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,997 Slope: -3,542 Intercept: 1,471 $Y = -3,542 X + 1,471$
 PCR Efficiency: 91,6 %

□ Unknowns
 ● Standards

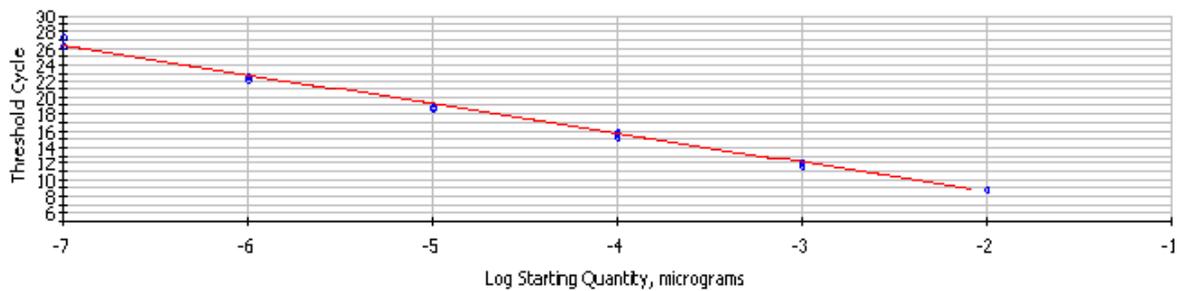
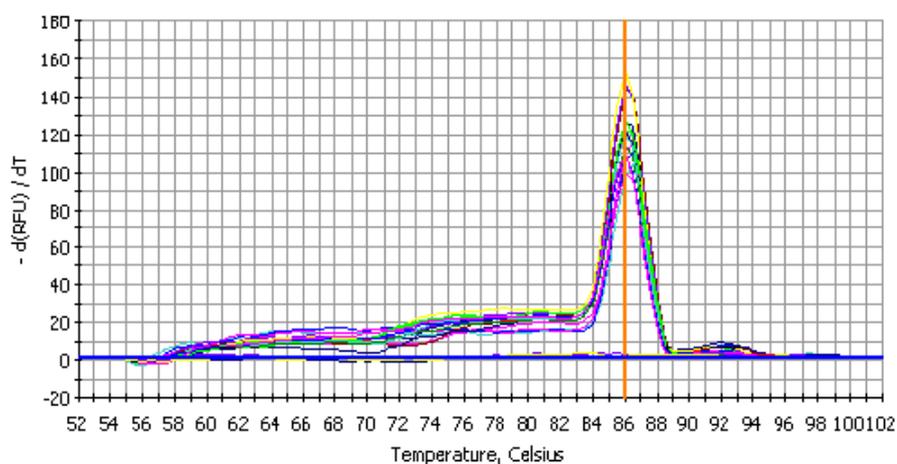
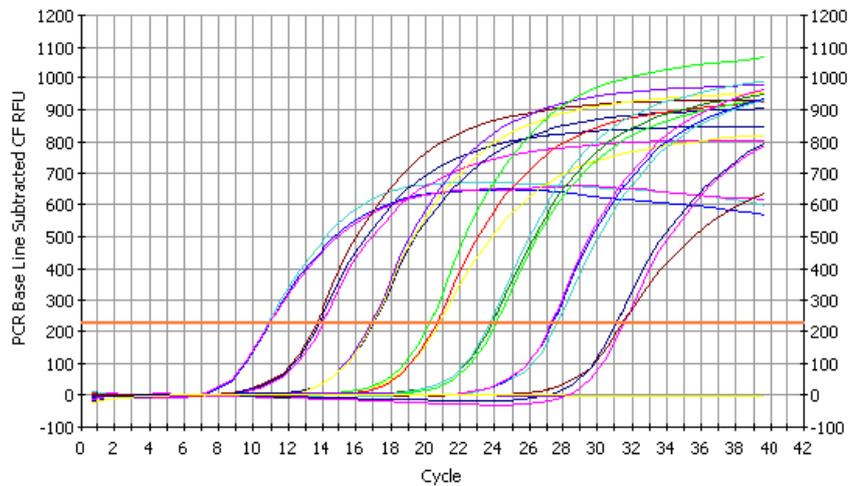
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-5 IL-1 β : A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}$ C)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,416 Intercept: 3,640 $Y = -3,416 X + 3,640$
 PCR Efficiency: 96,2 %

□ Unknowns
 ● Standards

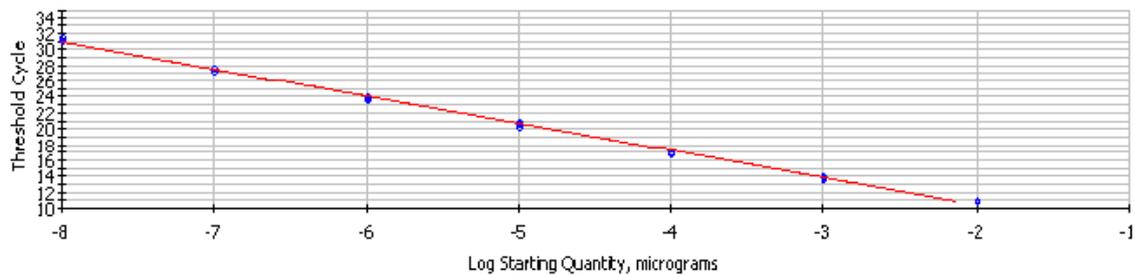
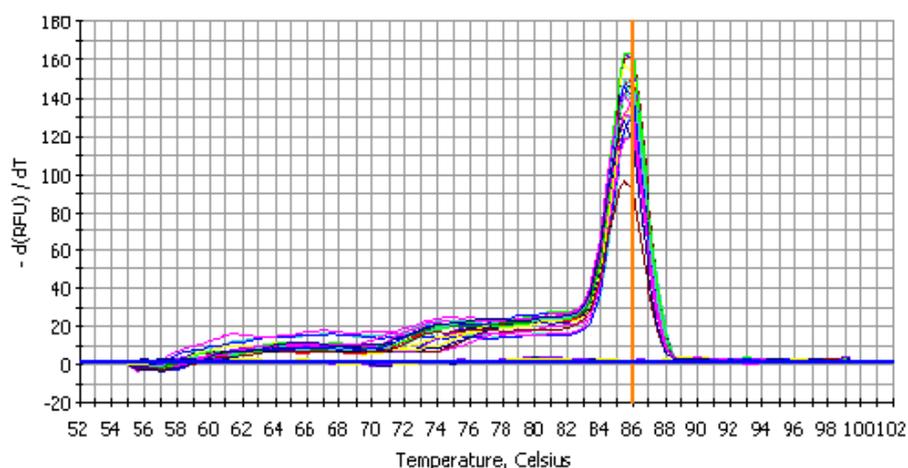
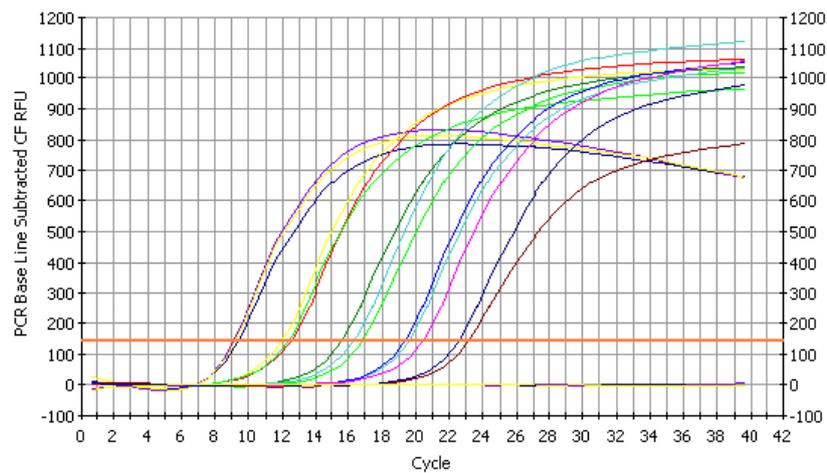
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-6 IL-1 β 2: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μ g)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}$ C)).

In Abbildung 4-7 ist die Standardisierung von iNOS dargestellt. Mit nur 5 logarithmischen Stufen in den Amplifikationsreaktionen und einem Schwellenwert von 142,9, liegt die Effizienz bei 92,8%. Die Standardkurve verzeichnet eine Steigung von $-3,507$ und einen Korrelationskoeffizienten von 0,996. Der Schmelzpunkt von iNOS war in dem Peak bei $84,5^{\circ}\text{C}$ feststellbar.

Die Effizienz der PCR-Reaktionen liegt bei TGF- β (siehe Abbildung 4-8) bei 98,2% mit einer Steigung der Standardkurve von $-3,367$ und einem Korrelationskoeffizienten von 0,999. Die Amplifikationsreaktionen wurden über 6 logarithmische Stufen erstellt, der Schwellenwert wurde zu 218,9 bestimmt. Die Schmelzkurvenanalyse ergab einen Peak bei $84,5^{\circ}\text{C}$.

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,996 Slope: -3,507 Intercept: -1,432 $Y = -3,507 X + -1,432$
 PCR Efficiency: 92,8 %

□ Unknowns
 ● Standards

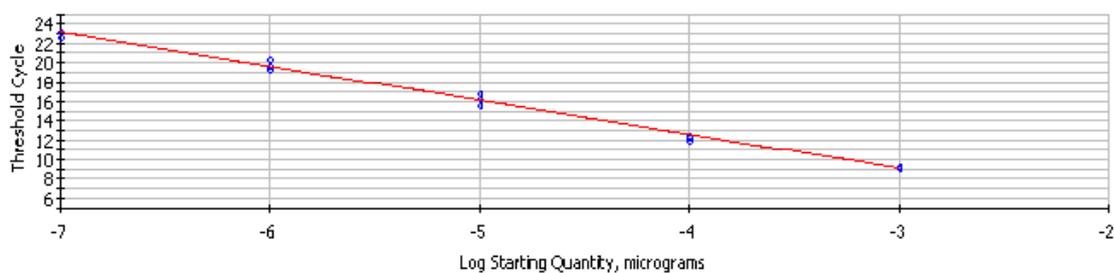
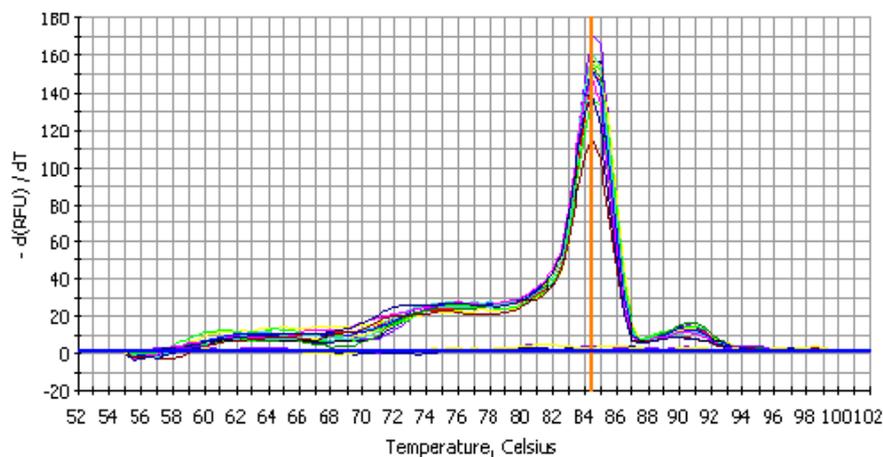
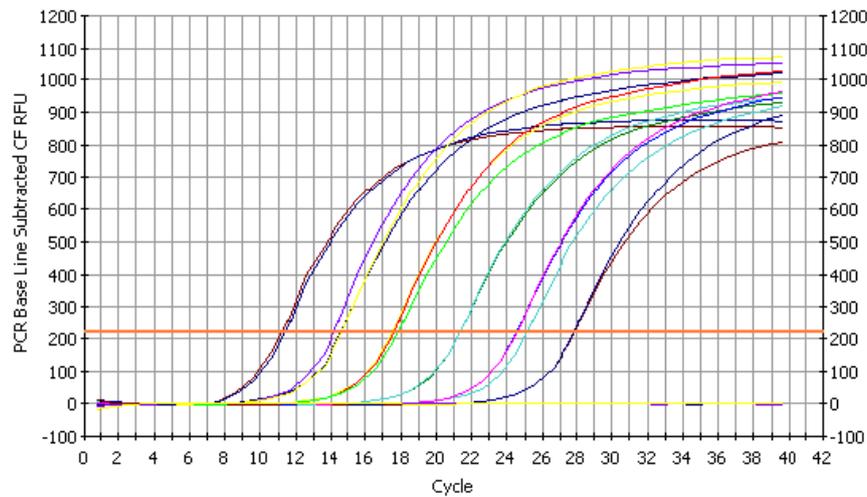
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-7 iNOS: A. Zweifach linear basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3**B. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3**

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,367 Intercept: 1,049 $Y = -3,367 X + 1,049$
 PCR Efficiency: 98,2 %

□ Unknowns
 ● Standards

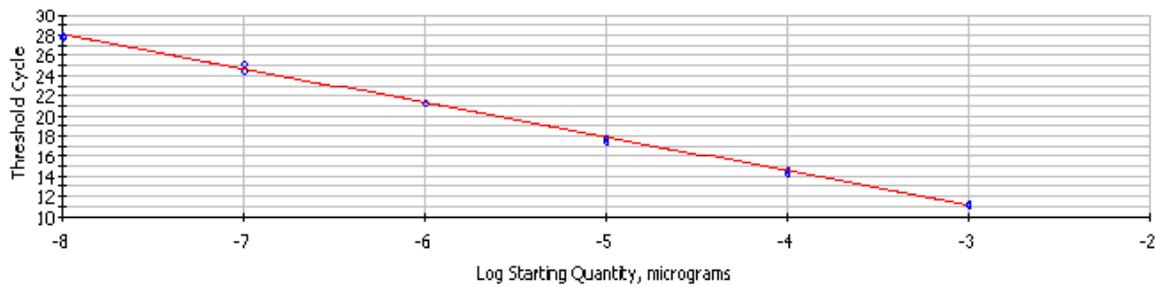
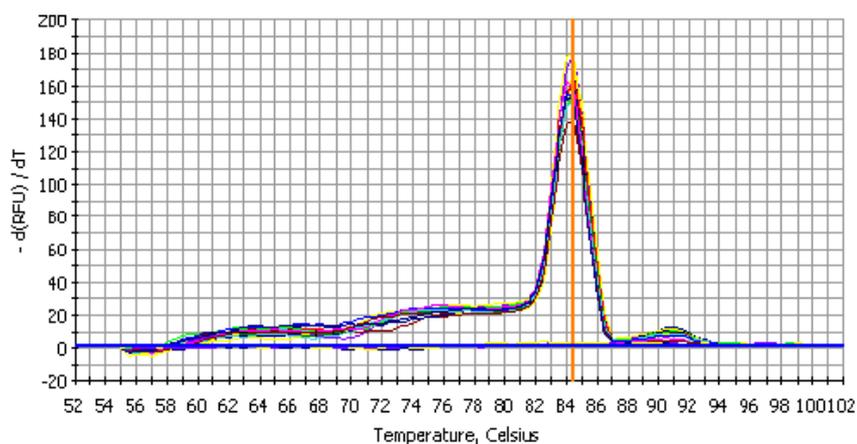
**C. Melt Curve Graph for SYBR-490**

Abbildung 4-8 TGF- β : A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: Log der Startmenge (μg)). C. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(\text{RFU})/dT$; x-Achse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)).

4.2 Relative Quantifizierung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei zwei unterschiedlich empfänglichen Regenbogenforellen-Linien (H und T) der Verlauf der Expression von sieben immunregulatorischen Genen, nämlich von Arginase-2, dem Komplementfaktor C3, Cyclooxygenase-2 (COX-2), zwei Isoformen von Interleukin-1 β (IL-1 β 1 und IL-1 β 2), der induzierbaren NO-Synthase und dem Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β), nach der Infektion mit *Myxobolus cerebralis* über einen Zeitraum von 200 Tagen mittels real-time RT-PCR zur relativen Quantifizierung, untersucht. Es wurden zu vorher bestimmten Entnahmezeitpunkten, nach 5 und 30 Minuten (min), 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden (h), 4, 6, 8, 20, 40, 60, 120 und 200 Tagen (d) nach der Exposition (p.exp.) mit *M. cerebralis*, Gewebeproben entnommen.

Von jeder Forelle wurde eine Poolprobe aus Haut, Muskel und Knorpelgewebe untersucht. β -Actin diente jeweils als Referenzgen zur Normalisierung der Expression der untersuchten Gene.

In allen Gruppen, den infizierten Regenbogenforellen beider Linien und den jeweiligen Kontrollgruppen, konnte eine Expression aller untersuchten Gene festgestellt werden.

Die Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

4.2.1 Arginase-2

Zum Zeitpunkt 5min p.exp. bewegt sich die relative Expression von Arginase-2 (siehe Abbildung 4-9) von allen vier untersuchten Gruppen auf einem niedrigen Level und es kann kein Unterschied in der Regulation der Genexpression zwischen ihnen festgestellt werden, außer dass die Expression beider T-Gruppen geringgradig über der der Gruppen H zu liegen scheint. Aber bereits 25min später zum Entnahmepunkt 30min p.exp. kann ein Anstieg der Expression der infizierten Fische der empfänglichen Linie T festgestellt werden, während sich die Expression der anderen Gruppen nicht verändert; die infizierten Fische der Linie H zeigen keine Reaktion. Das gleiche Muster wird zu allen Zeitpunkten bis 48h p.exp. beobachtet: Die infizierten T-Forellen zeigen im Vergleich zu ihren nicht infizierten Kontrollen und zu der infizierten H-Gruppe eine deutliche Hochregulierung mit einem Expressionsmaximum bei 24h p.exp.. Die infizierten Fische der Linie H zeigen in diesem Abschnitt keine Veränderung der Expression von Arginase-2. Nach 4d p.exp. bis 20d p.exp. ist die Expression von allen Gruppen auf ähnlich niedrigem Niveau; es können keine deutlichen Unterschiede, weder

zwischen den Kontrollen und den infizierten Fischen, noch zwischen beiden Linien gefunden werden, nur scheint die mittlere Expression der infizierten Gruppen in der Tendenz etwas niedriger als die, ihrer nicht infizierten Kontrollgruppen, zu liegen. Nach 40d p.exp. zeigt jedoch wiederum die Gruppe der infizierten T-Forellen einen deutlichen Anstieg der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur infizierten H-Gruppe, die wieder tendenziell eine herunterregulierte Expression im Vergleich zu der ihrer Kontrollgruppe aufweist. Die Expressionen 60d p.exp. und 120d p.exp. sind wieder vergleichbar: Die infizierte T-Gruppe ist wieder auf das Level ihrer Kontrollgruppe zurückgekehrt, so dass in der Linie T kein Unterschied detektierbar ist, jedoch zeigt die Kontrollgruppe der Linie H einen deutlichen Anstieg der Expression von Arginase-2. Nach 200d p.exp. befinden sich alle vier Gruppen wieder auf einem niedrigen Expressionslevel; Arginase-2 der infizierten Gruppen ist tendenziell niedriger exprimiert.

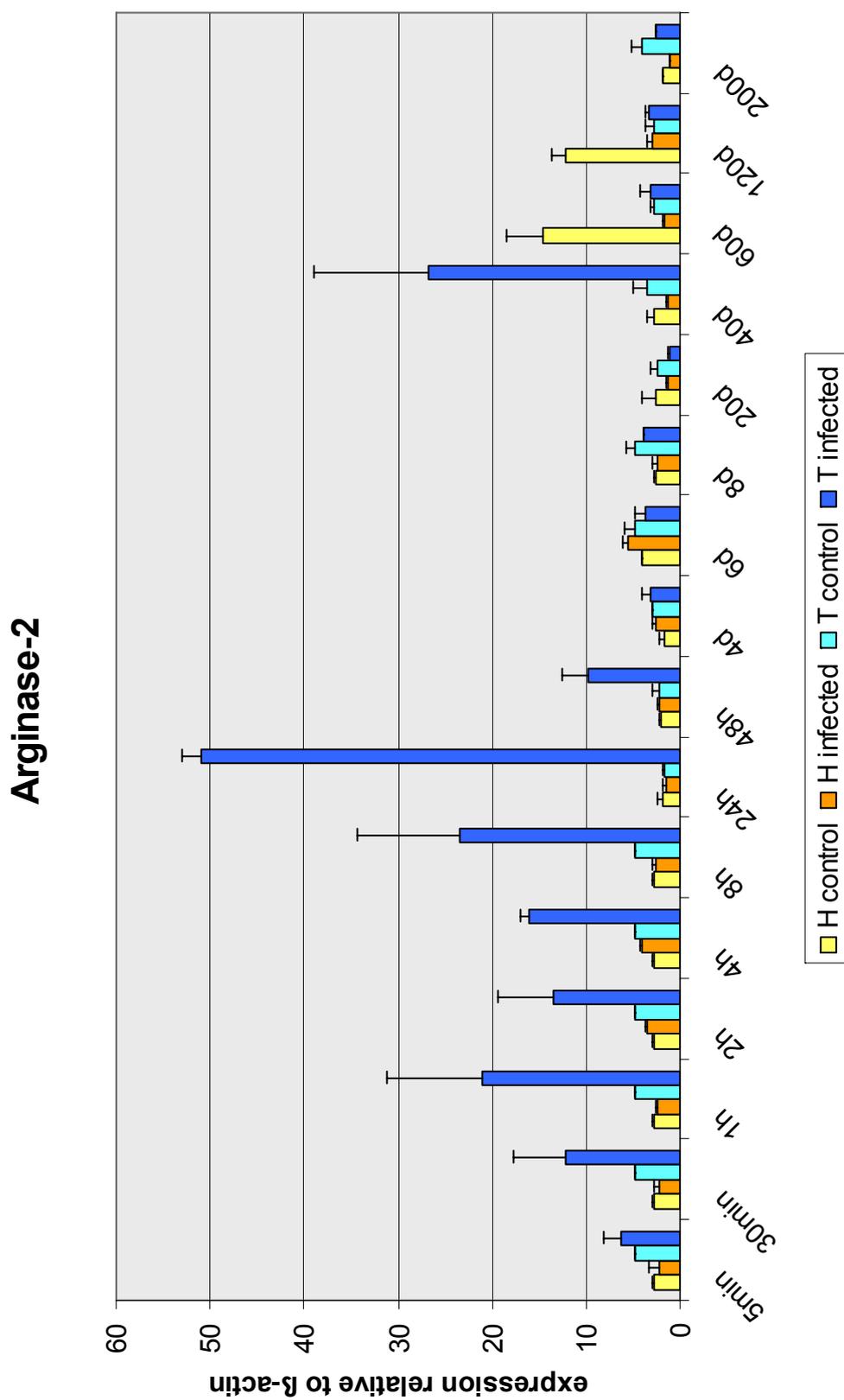


Abbildung 4-9 Relative Expression von Arginase-2 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.

4.2.2 Komplementfaktor C3

Bei der Expression des Komplementfaktors C3 (siehe Abbildung 4-10) zeigen die einzelnen Fische einer Gruppe oft große Unterschiede in der Expression in beiden Gruppen mit infizierten Regenbogenforellen. Bis 2h nach der Exposition der Forellen mit *M.cerebralis* ist kein deutlicher Unterschied zwischen den infizierten Fischen beider Linien und ihren Kontrollgruppen, sowie zwischen beiden Linien erkennbar; lediglich die Expression der infizierten T-Fische ist verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell herunterreguliert. Der einzige Unterschied 4h p.exp. zu den vorherigen Zeitpunkten liegt in einer tendenziell leichten Steigerung der Expression von C3 bei den infizierten Fischen der Gruppe H verglichen mit der Kontrollgruppe. Nach 8h p.exp. zeichnet sich im Mittel ein deutlicher Anstieg der Expression bei der Gruppe der infizierten H-Forellen ab; die Expression der anderen drei Gruppen bleibt im Vergleich zu den vorangegangenen Zeitpunkten unverändert. Nach 24h und 48h p.exp. liegt die Expression der infizierten H-Gruppe wieder auf dem niedrigen Niveau der Kontrollgruppen, während nun die Expression der infizierten Gruppe T im Mittel deutlich ansteigt. Beide Gruppen mit infizierten Fischen (H und T) zeigen 4d p.exp. einen deutlichen Anstieg der Expression von C3 im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Zu dem Entnahmezeitpunkt 6d p.exp. kann keine klare Aussage getroffen werden, lediglich die Expression der infizierten Gruppe H liegt im Mittel über der Expression der infizierten Gruppe T. Nach 8d p.exp. sind keine Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Nach 20d p.exp. lässt sich bei den Gruppen der Linie H keine unterschiedliche Expression feststellen, die Expression der infizierten Gruppe T verglichen mit der Kontrollgruppe ist herunterreguliert. Nach 40d p.exp. ist die mittlere Expression der infizierten Gruppe H im Vergleich mit der Kontrollgruppe etwas nach oben reguliert und liegt damit auch höher als die Expression von C3 bei der infizierten Gruppe T; die infizierte Gruppe T ist im Vergleich mit ihrer Kontrollgruppe immer noch herunter reguliert. Zwischen den Gruppen ist 60d p.exp. kein Unterschied in der Expression sichtbar; alle liegen auf dem gleichen niedrigen Level. Nach 120d p.exp. wird bei der Expression von C3 in der infizierten Gruppe H ein Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt; bei den zwei Gruppen der Linie T kann kein Unterschied beobachtet werden. Nach 200d p.exp. scheint lediglich die Expression der infizierten Gruppe H tendenziell ein wenig höher als die Expression der infizierten Gruppe T zu liegen.

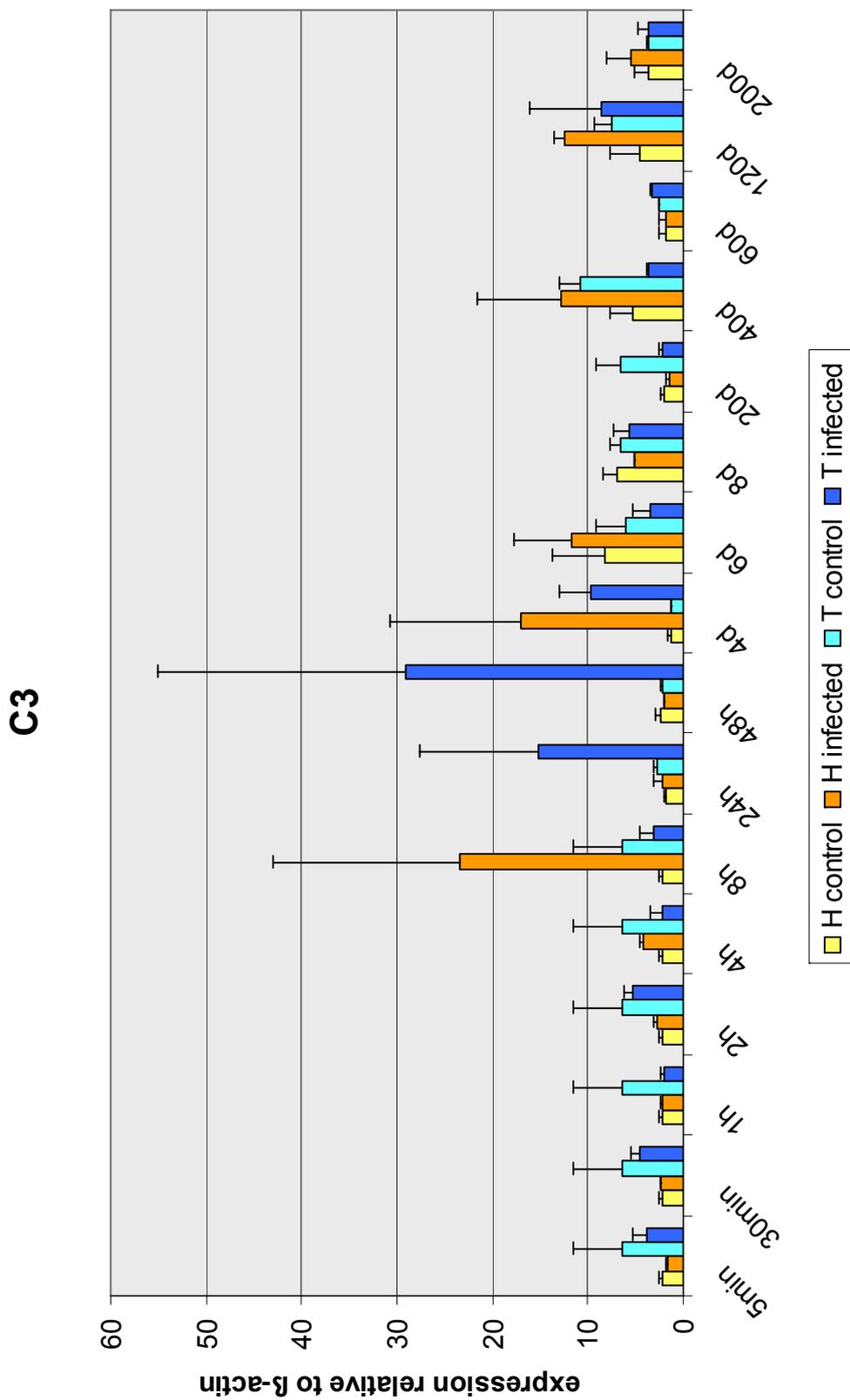


Abbildung 4-10 Relative Expression des Komplementfaktors C3 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.

4.2.3 Cyclooxygenase-2

Die relative Expression von COX-2 (siehe Abbildung 4-11) ist bei den infizierten Regenbogenforellen der Linie H, verglichen mit den Kontrolltieren dieser Linie, 30min, 1h und 2h nach der Exposition mit dem Parasiten erhöht. Das Maximum liegt bei 1h p.exp. Eine deutlich höhere Expression als bei den infizierten Fischen der Linie H und den Linie T Kontrollfischen, kann bei den infizierten Forellen der Linie T von 5min p.exp. bis 8h p.exp. gefunden werden. Die höchste Expression liegt bei 5min p.exp., mit abfallender Tendenz bis 24h p.exp. Die COX-2 Gene aller vier Gruppen werden 24h p.exp. auf einem niedrigen Level exprimiert, wobei die Werte der infizierten Fische beider Linien geringgradig höher liegen. Die infizierten H-Forellen zeigen nach 48h keine Reaktion im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe, während die Expression der infizierten Fische der Linie T im Vergleich zu der nicht infizierten Kontrollgruppe leicht nach unten reguliert ist. Die Expression von COX-2 der infizierten Fische der Linie T ist 4d p.exp. im Vergleich zu der Kontrollgruppe nach oben reguliert, es ist jedoch kein Unterschied zu den Forellen der H-Linie beider Gruppen zu erkennen. Zum Entnahmezeitpunkt 6d p.exp. ist bei den Gruppen der Linie H kein Unterschied im Vergleich zu 4d p.exp. feststellbar, die Expression beider T-Gruppen ist etwas nach oben reguliert; zwischen infizierten T-Forellen und den nicht infizierten Kontrolltieren kann jedoch keine unterschiedliche Regulation beobachtet werden. Die Expression der infizierten Forellen der Linie H ist 8d p.exp. deutlich hochreguliert im Vergleich zu allen anderen Gruppen, die sich auf einem sehr niedrigen Level bewegen. Ein ähnliches Bild zeigt sich 20d p.exp., nur ist die relative Expression der infizierten Gruppe H etwas niedriger. Zu den Entnahmezeitpunkten 40d und 60d p.exp. zeigen beide infizierten Gruppen keine Regulationsunterschiede zu ihren Kontrollen; die relative Expression der Linie H liegt etwas höher als die der Linie T. Bei der infizierten H-Gruppe wird 120d p.exp. eine deutliche Hochregulierung der Expression im Vergleich zu allen anderen Gruppen gefunden, die sich auf dem gleichen Level wie bei den beiden vorherigen Zeitpunkten bewegen. Nach 200d nach der Exposition kehrt dieser Wert auf das Niveau der Kontrollgruppe zurück; die infizierten Fische der Linie T haben eine leicht höhere Expression als die Kontrollgruppe.

COX-2

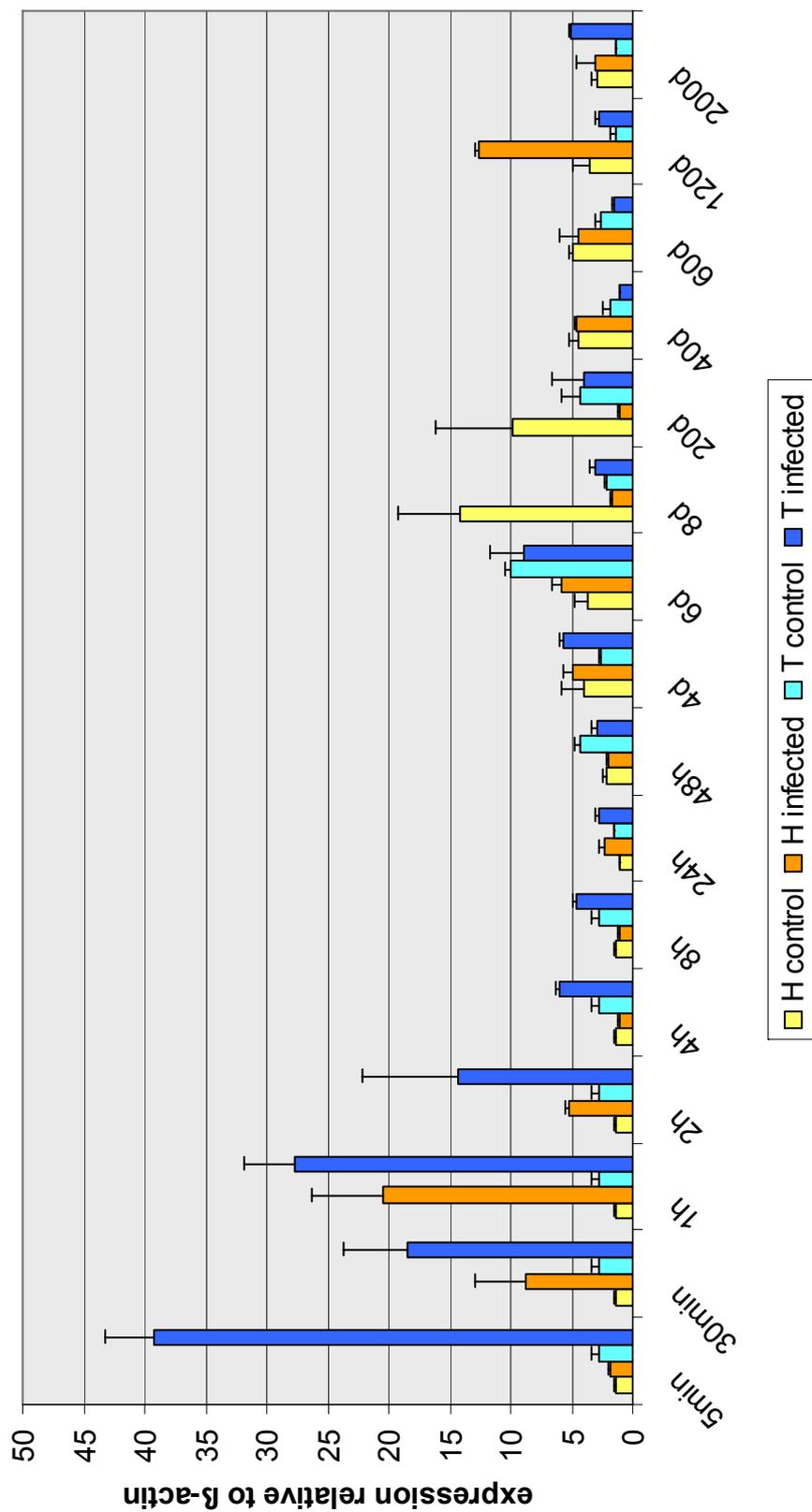


Abbildung 4-11 Relative Expression von COX-2 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.

4.2.4 Interleukin-1 β

Der Verlauf der Expression von IL-1 β ist in Abbildung 4-12 dargestellt. Schon 5min p.exp. ist ein deutlicher Anstieg der Expression von IL-1 β der infizierten Gruppe T gegenüber der Kontrollgruppe und der infizierten Gruppe der Linie H zu beobachten. Bei der infizierten Gruppe H kann jedoch kein deutlicher Anstieg der Expression, verglichen mit der Kontrollgruppe, beobachtet werden. Eine deutliche Hochregulierung der Expression in der infizierten Gruppe T, gegenüber der Kontrollgruppe und der infizierten Gruppe H, zeigt sich zu allen Entnahmezeitpunkten bis 4d p.exp. mit Ausnahme bei 24h p.exp., wo der Anstieg eher moderat erscheint. Die Expressionsmaxima liegen zwischen 1h und 8h p.exp. und bei 4d p.exp. Bei der Gruppe mit den infizierten Fischen der Linie H kann ein Anstieg der Expression gegenüber der Kontrollgruppe von 30min p.exp. bis 4h p.exp. festgestellt werden. Das Expressionsmaximum liegt bei 1h p.exp., jedoch liegen alle Werte unter den Expressionswerten der infizierten Gruppe T. Nach 8h p.exp. ist kein Unterschied zu der Kontrollgruppe zu erkennen. Nach 24h und 48h p.exp. steigt die Expression in der infizierten Gruppe H zum 48h-Entnahmezeitpunkt wieder leicht an. Nach 4d p.exp. ist kein Unterschied der Expression von IL-1 β zur Kontrollgruppe H feststellbar. Die Expression beider Gruppen mit infizierten Fischen (H und T) scheint 6d p.exp. im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe herunterreguliert zu sein, wobei die Expression von Linie T höher liegt als die der Linie H. Nach 8d p.exp. ist die Expression der infizierten Gruppe H im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sich auf einem höheren Niveau als bei den vorangegangenen Zeitpunkten befindet, nach unten reguliert. Nach 20d p.exp. scheint die Expression der infizierten Gruppe H gegenüber der Kontrollgruppe immer noch etwas herunter reguliert zu sein, während bei den Gruppen der Linie T keine Tendenz erkennbar ist. Die Expression der infizierten Gruppe H liegt bei 40d p.exp. etwas höher als bei der Kontrollgruppe und bei der infizierten Gruppe T, die eine niedrigere Expression als ihre Kontrollgruppe aufweist. Nach 60d p.exp. ist die Expression von IL-1 β bei der Kontrollgruppe der Linie H deutlich nach oben reguliert. Bei der Linie T ist die Expression der infizierten Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe, nach unten reguliert. Nach 120d p.exp. ist kein Unterschied in der Expression zwischen den Gruppen feststellbar; nach 200d p.exp. ist lediglich die Expression der infizierten Gruppe T tendenziell herunter reguliert.

IL-1 β 1

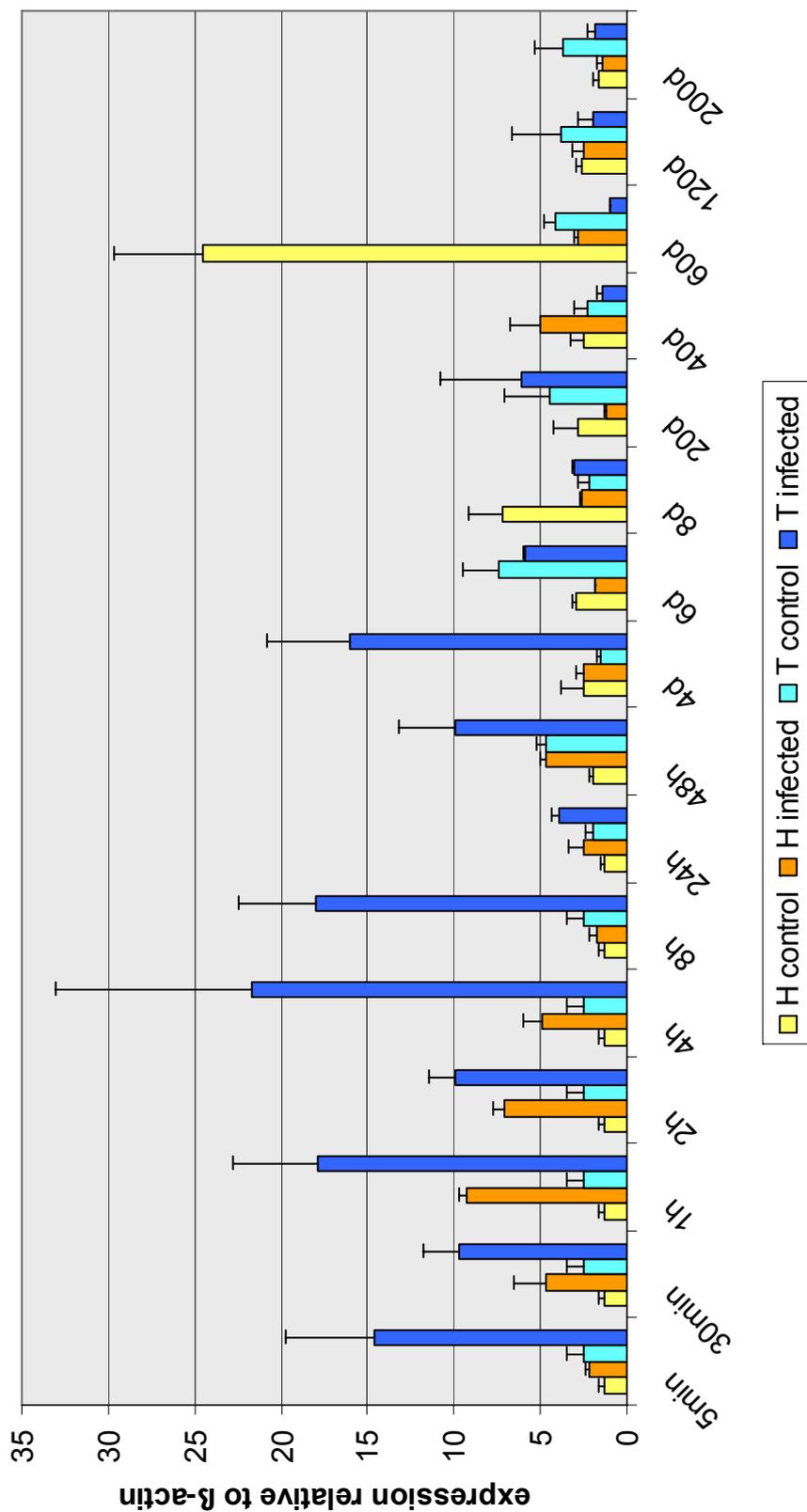


Abbildung 4-12 Relative Expression von IL-1 β 1 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.

4.2.5 Interleukin-1 β 2

Der Verlauf der Expression von IL-1 β 2 (siehe Abbildung 4-13) verhält sich insgesamt ähnlich zum Verlauf der Expression von IL-1 β 1. Bereits nach 5min p.exp. ist ein deutlicher Anstieg der Expression von IL-1 β 2 in der infizierten Gruppe T zu erkennen, während der Anstieg der Expression bei der infizierten Gruppe H im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas niedriger ist. Von 5min p.exp. bis 4d p.exp. kann eine deutliche Expressionssteigerung bei der infizierten Gruppe T gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Werte liegen auch immer über denen der infizierten Gruppe H (Ausnahme: 1h p.exp.). Die Expression von IL-1 β 2 in der infizierten Gruppe H ist von 5min bis 4h p.exp. im Vergleich zu der Kontrollgruppe gesteigert, mit einem Maximum zwischen 30min und 2h p.exp.. Nach 8h p.exp. scheint die Expression der infizierten Gruppe der Linie H niedriger zu sein, als bei der Kontrollgruppe. Von 24h p.exp. bis 6d p.exp. ist die Expression der infizierten Gruppe H gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert mit einem Maximum zwischen 48h und 4d p.exp.; die Werte liegen bis 4d p.exp. jedoch niedriger als bei den infizierten Fischen der Gruppe T. Nach 6d p.exp. kann keine Veränderung der Genexpression bei der Linie T festgestellt werden. Die infizierten Gruppen beider Linien zeigen 8d p.exp. keine Abweichung im Vergleich mit ihrer Kontrollgruppe, jedoch hat die Linie H eine höhere Expression als die Linie T. Nach 20d p.exp. sind keine deutlichen Unterschiede erkennbar. Nach 40d p.exp. ist die Expression der infizierten Gruppe H verglichen mit der Kontrollgruppe herunterreguliert, aber höher als die Expression beider Gruppen der Linie T, bei denen keine Unterschiede beobachtet werden können. Die Expression nach 60d p.exp. verhält sich ähnlich: die infizierte Gruppe H ist herunterreguliert, aber auf einem Level mit beiden Gruppen der Linie T. Nach 120d p.exp. zeigt die Expression in der infizierten Gruppe H eine leicht steigende Tendenz, nach 200d p.exp. die der infizierten Gruppe T; bei der jeweils anderen Linie ist keine Regulation zu beobachten.

IL-1 β 2

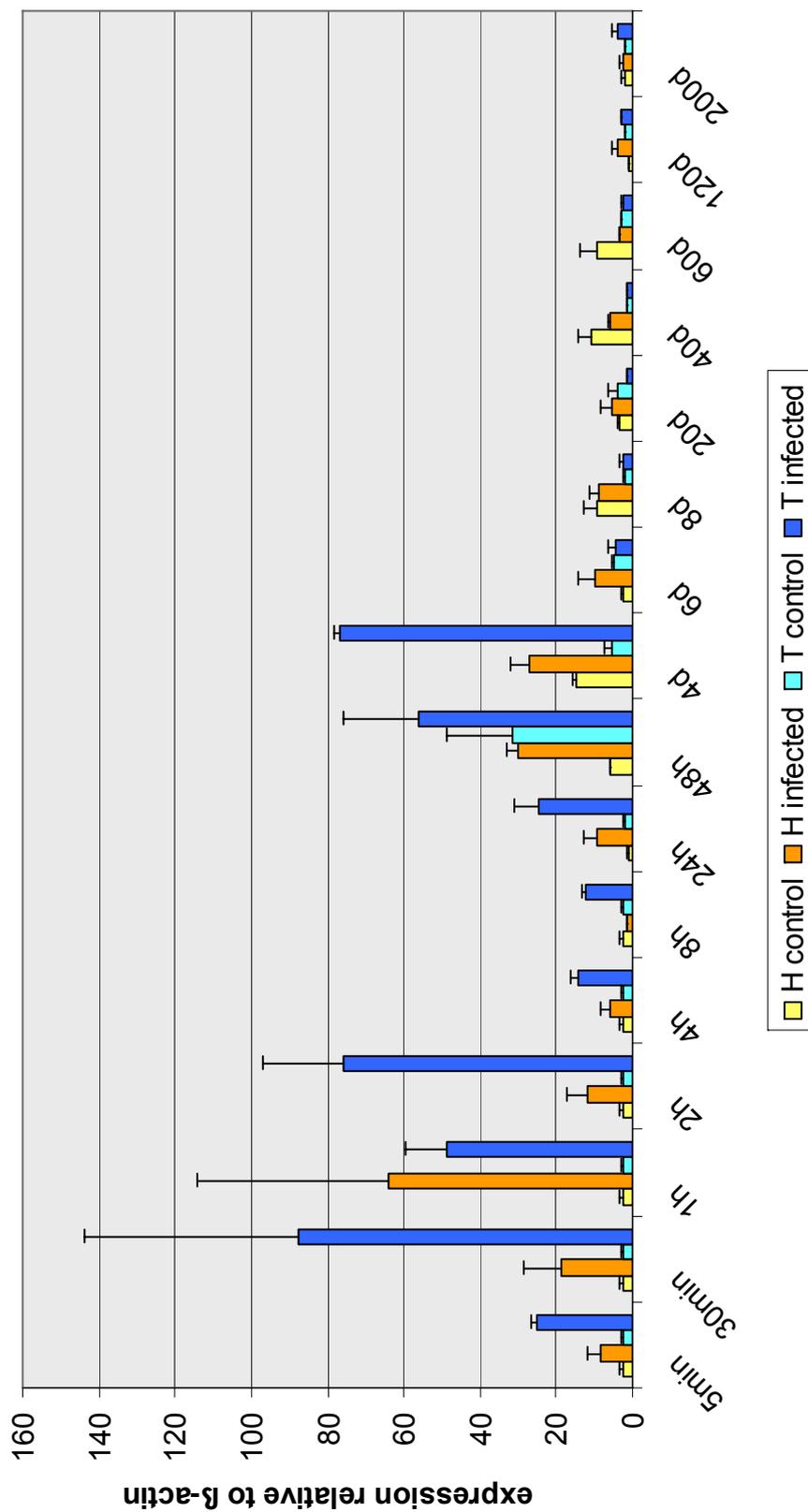


Abbildung 4-13 Relative Expression von IL-1 β 2 in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.

4.2.6 Induzierbare NO-Synthase

Die bei weitem auffälligsten Unterschiede der untersuchten Gene in der Expression sind bei der induzierbaren NO-Synthase zu beobachten (siehe Abbildung 4-14). Nach 5min p.exp. kann keine Veränderung der Expression bei den zwei infizierten Gruppen (H und T) gefunden werden. Die Expression der infizierten Gruppe H scheint von 30min p.exp. bis 4h p.exp. gegenüber der Kontrollgruppe angestiegen zu sein. Zugleich ist bei der infizierten Gruppe T nach 30min p.exp. und nach 4h p.exp. kein Unterschied zu der Kontrollgruppe feststellbar; 1h und 2h p.exp. erscheint sie im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas herunterreguliert. Nach 8h p.exp. ist die Expression der infizierten Gruppe der Linie H gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt, während bei der Linie T keine Veränderung beobachtet wird. Die Expression von iNOS ist nach 24h p.exp. bei der Linie H unverändert; bei der Linie T kann aufgrund der Standardabweichung keine genaue Aussage getroffen werden, jedoch scheint die infizierte Gruppe verglichen mit der Kontrolle im Mittel eine geringere Expression zu haben. Nach 48h p.exp. ist die Expression bei der infizierten Gruppe H gegenüber der Kontrollgruppe deutlich gesteigert; die Expression bei der Linie T verhält sich ähnlich wie nach 24h p.exp., nur dass die relative Expression insgesamt höher ist. Die markantesten Regulierungen der Expression von iNOS bei der Linie T sind 4d und 6d p.exp. zu beobachten. Während die Expression bei der infizierten Gruppe H keine Änderung der Expression, verglichen mit der Kontrollgruppe, zeigt, wird bei der infizierten Gruppe T zu beiden Zeitpunkten ein Anstieg der Expression um ein vielfaches der Expression der Kontrollgruppe beobachtet. Nach 8d p.exp. wird bei beiden infizierten Gruppen (H und T) im Vergleich mit ihren Kontrollen eine Hochregulation beobachtet. Dabei scheint die Expression der infizierten Gruppe T jedoch höher auszufallen. Die Expression der infizierten Gruppe H liegt 20d p.exp. im Mittel höher als die ihrer Kontrollgruppe, während bei der Linie T keine klare Veränderung der Expression erkennbar ist. Ein klarer Anstieg der Expression der infizierten Gruppe H zeigt sich 40d p.exp.; die Expression der infizierten Gruppe T ist im Gegensatz dazu, auch im Vergleich mit ihrer Kontrollgruppe, deutlich erniedrigt. Obwohl die Expression der infizierten Gruppe H ähnlich ist, wie nach 40d p.exp., erscheint sie 60d p.exp. im Vergleich mit der Kontrollgruppe auffallend erniedrigt, was jedoch an dem extremen Anstieg der Expression der Kontrollgruppe liegt. Bei der Linie T ist 60d p.exp. keine Veränderung der Expression festzustellen. Nach 120d p.exp. bewegt sich die Expression wieder auf einem niedrigen Level; bei der Expression der Linie H ist keine Veränderung der Regulation feststellbar.

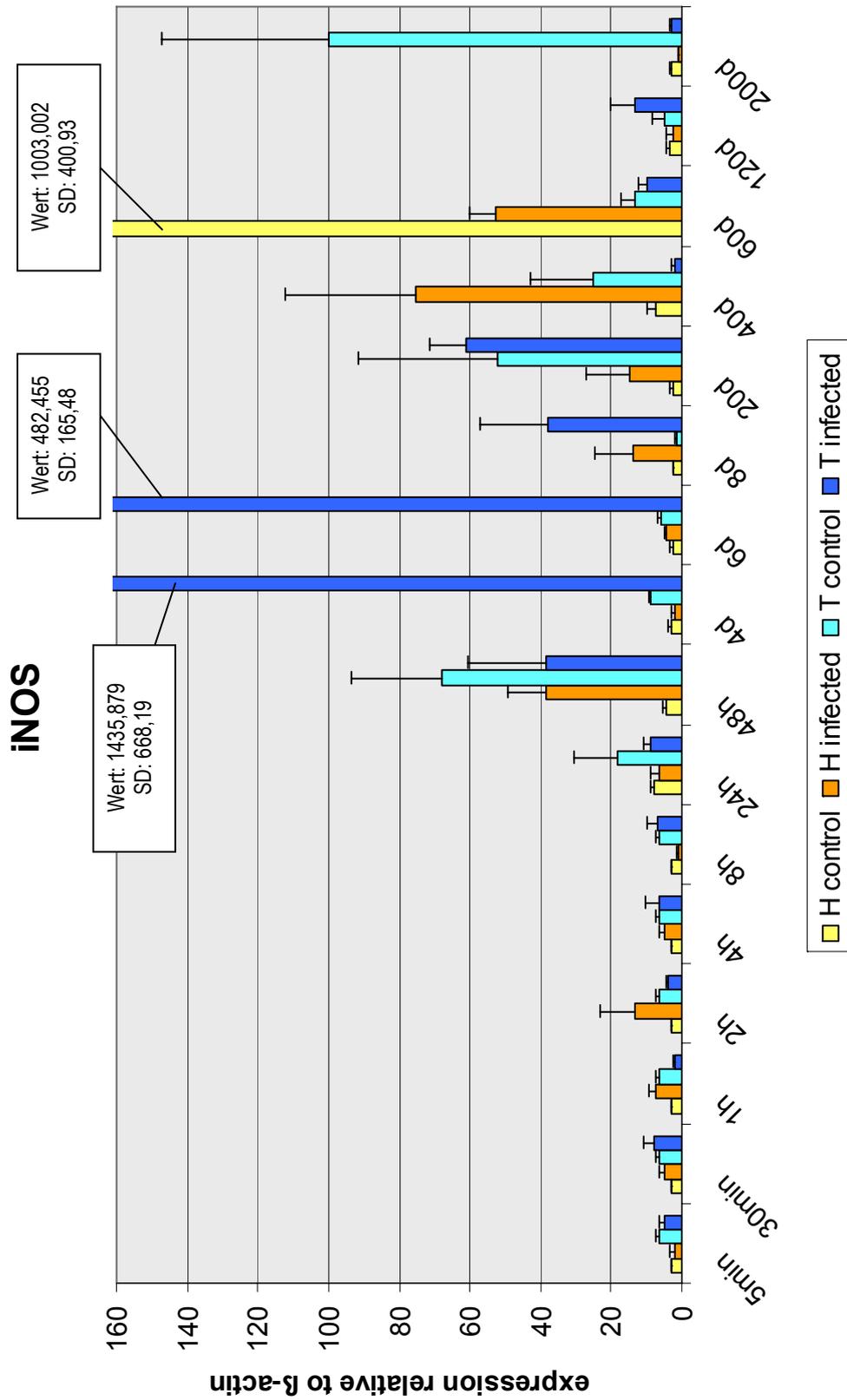


Abbildung 4-14 Relative Expression von iNOS in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β -Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition.

Die Expression der infizierten Linie T scheint tendenziell höher zu liegen als die der Kontrollgruppe. Nach 200d p.exp. fällt die hohe relative Expression der Kontrollgruppe T im Vergleich zu den anderen Gruppen auf; die Expression der Linie H ist zu 120d p.exp. unverändert.

TGF-β

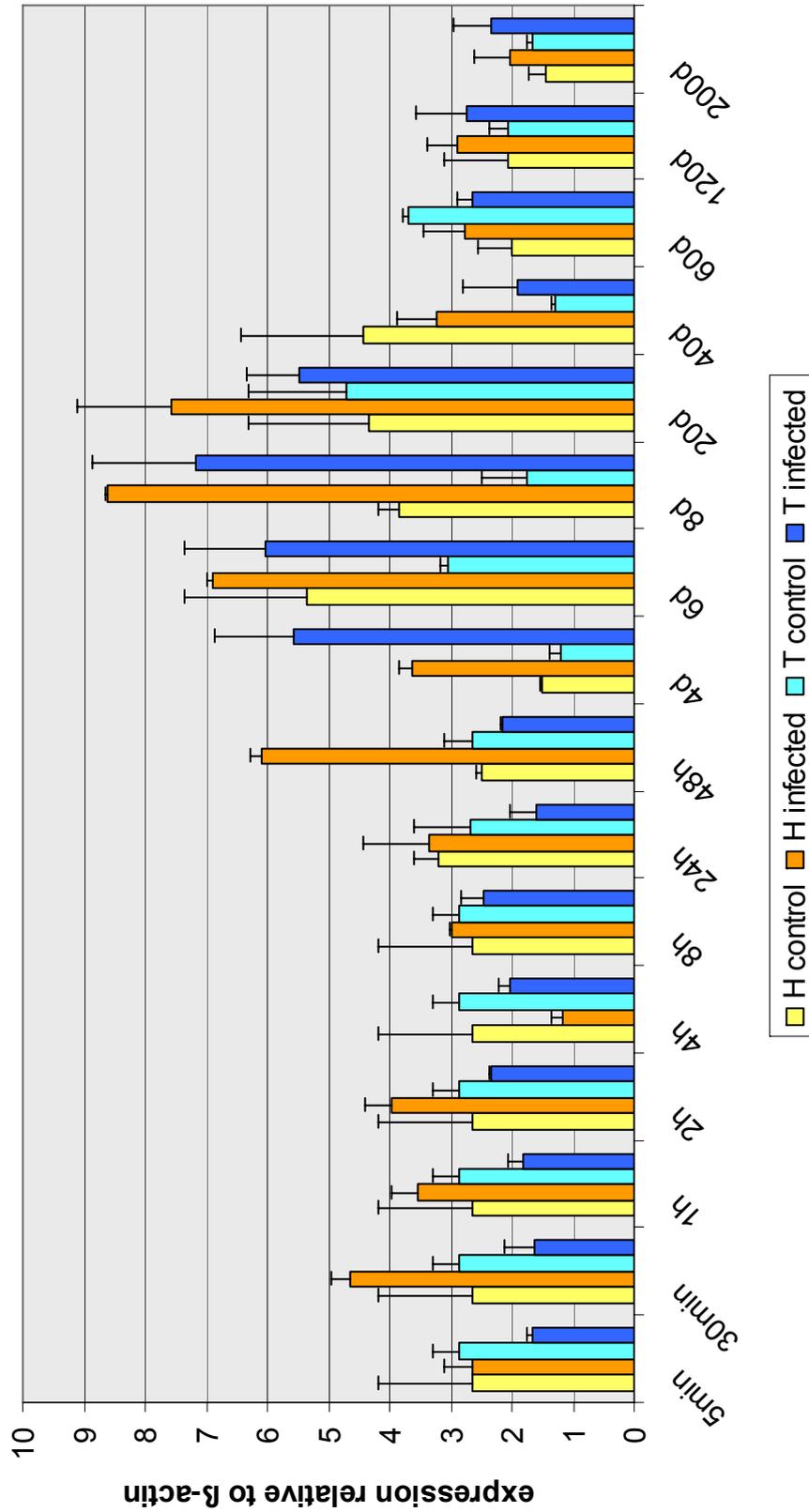


Abbildung 4-15 Relative Expression von TGF-β in der real-time RT-PCR von infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen der Linien H und T (zum Zeitpunkt der Exposition waren alle Fische 42 Tage alt). Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (n=2; +SD). y-Achse: Expression relativ zu β-Actin; x-Achse: Zeit nach der Exposition

4.2.7 Transforming-Growth-Factor- β

Die Veränderungen der relativen Expression des Transforming-Growth-Factor- β bewegen sich in einem relativ geringen Rahmen (siehe Abbildung 4-15). Nach 5min p.exp. zeigt sich bei der Expression von TGF- β der infizierten Gruppe der Linie H keine Veränderung verglichen mit der nicht infizierten Kontrollgruppe; die Expression der infizierten Gruppe T ist jedoch niedriger als die der Kontrollgruppe. Von 30min p.exp. bis 2h p.exp. exprimiert die infizierte Gruppe H TGF- β tendenziell höher als ihre Kontrollgruppe und als die infizierte Gruppe T. Die infizierte Gruppe der Linie T exprimiert TGF- β jedoch in geringerem Maße als die zugehörige Kontrollgruppe. Nach 4h p.exp. ist die Expression bei beiden Gruppen mit infizierten Fischen (H und T) gegenüber den Kontrollgruppen erniedrigt. Nach 8h p.exp. kann bei beiden Linien keine Regulierung von TGF- β gefunden werden. Die Expression von TGF- β erscheint 24h p.exp. bei der infizierten Gruppe T verglichen mit der Kontrolle wiederum herunterreguliert; bei der Linie H kann kein Unterschied in der Expression beobachtet werden. Von 48h p.exp. bis 20d p.exp. ist die Expression bei der infizierten Gruppe der Linie H verglichen mit der Kontrollgruppe zumindest tendenziell (6d p.exp.) erhöht, mit einem Maximum bei 8d p.exp.. Nach 48h p.exp. ist die Expression von TGF- β der infizierten Gruppe T verglichen mit der Kontrollgruppe noch herunterreguliert, nach 4d p.exp. ist sie gegenüber sowohl der Kontrollgruppe, als auch der infizierten Gruppe H deutlich erhöht. Eine gesteigerte Expression ist bei der infizierten Gruppe T auch noch 6d und 8d p.exp. (Maximum) sichtbar, sie liegt jedoch im Mittel niedriger als die Expression der infizierten Gruppe H. 20d p.exp. kann kein klarer Unterschied in der Expression der Linie T festgestellt werden. Die Expressionen der infizierten Gruppen H und T weisen, verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe, 40d p.exp. keinen klaren Unterschied auf. In der Tendenz wird die Expression der infizierten Gruppe H jedoch herunterreguliert und die der infizierten Gruppe T erhöht. Nach 60d p.exp. zeigt sich eine Erniedrigung der Expression bei der infizierten Gruppe T im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Nach 120d p.exp. gleicht die Expression der Linie H den Werten von 60d p.exp.; es ist eine tendenzielle Erhöhung der Expression der infizierten Gruppe H gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar. Bei der Linie T kann ebenfalls im Mittel eine Erhöhung der Expression von TGF- β bei der infizierten Gruppe beobachtet werden. An dem Entnahmezeitpunkt 200d p.exp. stimmt die Expression aller Gruppen mit den Werten von 120d p.exp. überein.

5 Diskussion

Bis heute sind Versuche fehlgeschlagen, die zum Ziel hatten, eine amerikanische Regenbogenforellen-Linie mit bemerkenswerter Resistenz gegenüber der Drehkrankheit zu finden (O'Grodnick 1979, Markiw 1992b, Hedrick et al. 1998, 1999a, b, 2001a, b, Thompson et al. 1999, Densmore et al. 2001, MacConnell & Vincent 2002). Ein möglicher Grund könnte die kürzere Co-Evolution von nordamerikanischen Regenbogenforellen-Linien und Parasiten sein, die nur über einen Zeitraum von etwa 50 Jahren Kontakt hatten, während die früher nach Europa eingeführten Regenbogenforellen *M. cerebralis* etwa 110 Jahre ausgesetzt waren (Hedrick et al. 2003).

In der vorliegenden Studie wurden eine sehr empfängliche amerikanische Linie und eine deutsche Zuchtlinie mit bekannter, gesteigerter Resistenz gegenüber der Infektion mit *M. cerebralis* (Küppers 2003, Hedrick et al. 2003) verwendet. Es wird angenommen, dass nicht eine veränderte Virulenz des Parasiten, sondern Veränderungen in der Resistenz des Wirtes für die geringere Empfänglichkeit in der deutschen Linie verantwortlich sind (Hedrick et al. 2003).

Mit den hier untersuchten immunregulatorischen Genen, ist die vorliegende Arbeit die erste, die beginnt die Immunantwort nach einer Infektion mit *M. cerebralis* auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass eine Expression einer Reihe immunrelevanter Gene im Gewebe von Regenbogenforellen stattfindet. Bereits nach 30min p.exp. konnte ein Anstieg der Expression von Arginase-2 in der Gruppe der infizierten Regenbogenforellen der empfänglichen Linie T beobachtet werden, der, mit einem Maximum bei 24h p.exp., bis 48h p.exp. anhielt. Während dieser Zeit konnte keine Veränderung der Expression in der infizierten Gruppe der nicht empfänglichen Linie H gegenüber der Kontrolle gefunden werden. Nach 20d p.exp. schien die Expression beider infizierter Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell herunterreguliert zu sein. Zum Entnahmezeitpunkt 40d p.exp. wurde wieder eine Expressionssteigerung der infizierten Gruppe T gefunden, während die Expression der infizierten Gruppe H anscheinend noch herabgesetzt war (siehe Abbildung 4-9).

Arginase-2 spielt eine wichtige Rolle in der alternativen Aktivierung von Makrophagen, die in die Typ II-Immunantwort involviert sind (Wiegertjes & Joerink 2004). Alternativ aktivierte Makrophagen besitzen eine erhöhte Phagozytoseaktivität und Expression von MHC Klasse-II, fördern die Zellproliferation, den Wechsel zwischen den Antikörperklassen, und spielen eine

Rolle bei allergischen Reaktionen und Wundheilungsprozessen (Mills et al. 2000, Mori & Gotoh 2000, Gordon 2003, Sandor et al. 2003, Mantovani et al. 2002, 2004, Noel et al. 2004). Im Gegensatz zur Aktivierung von Makrophagen auf klassischem Weg, ist über alternativ aktivierte Makrophagen und die Rolle der Arginase bei Knochenfischen sehr wenig bekannt. Bis jetzt konnten von Regenbogenforellen (Wright et al. 2004) und Karpfen (Joerink et al. 2006a, b) multiple Gene für Arginase-2 und ein Gen für Arginase-1 gefunden werden. Da die Unterschiede dieser Arginase-2 Proteine jedoch sehr gering sind, wird angenommen, dass sie sich in ihrer enzymatischen Aktivität nicht unterscheiden (Joerink et al. 2006a). Arginase-2 katalysiert die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. L-Arginin kann aus dem extrazellulären Raum, wo es sowohl für Proliferation und Überleben von Wirtszellen, als auch von dem Pathogen benötigt wird, bezogen werden (Yu et al. 2001, da Silva et al. 2002, Vincendeau et al. 2003). Wenn die Arginase jedoch das intrazelluläre L-Arginin umsetzt, entzieht es zugleich der induzierbaren NO-Synthase, Schlüsselenzym bei der klassischen Aktivierung von Makrophagen, das Substrat (Vincendeau et al. 2003). Joerink et al. (2006a) zeigten außerdem, dass in kultivierten Karpfen-Makrophagen eine induzierte Arginase-Aktivität von NOHA (N^w-hydroxy-L-Arginin) gehemmt werden konnte. NOHA ist ein Zwischenprodukt bei der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO durch iNOS. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit für Arginase-2 und iNOS. Während der ersten 48h p.exp. scheint die Expression von iNOS der infizierten Gruppe T gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe tendenziell erniedrigt zu sein. Zu den Entnahmezeitpunkten 4d und 6d p.exp. ist die Expression von iNOS in der infizierten Gruppe T gegenüber den anderen Gruppen um ein vielfaches erhöht. Nach 8d p.exp. ist bei beiden infizierten Gruppen ein Anstieg der Expression zu beobachten. Bei dem Wert 40d p.exp. ist die Expression von iNOS bei der infizierten Gruppe H erhöht, während die der infizierten Gruppe T im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt ist (siehe Abbildung 4-14).

Bei der infizierten Gruppe der empfänglichen Linie T fällt auf, dass bei den Werten mit erhöhter Expression von Arginase-2 kein Anstieg von iNOS gefunden werden konnte, während bei erhöhter Expression von iNOS kein Anstieg von Arginase-2 eintrat. Bei der Linie H konnte nach der Infektion mit *M. cerebralis* kein Anstieg von Arginase-2 und nur an wenigen Zeitpunkten eine moderater Anstieg von iNOS gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass bei der empfänglichen Linie T zuerst eine Typ II-Immunantwort mit alternativ aktivierten Makrophagen induziert wird, später jedoch die Typ I-Immunantwort mit klassisch aktivierten Makrophagen eine Rolle spielt. Bei der Linie H konnte kein Hinweis auf eine Beteiligung von Arginase-2 und damit auf eine Beteiligung alternativ aktivierter

Makrophagen erhalten werden. Es ist noch unklar, ob die Induktion von alternativ aktivierten Makrophagen für den Wirt oder den Parasiten von größerem Vorteil ist. Zum einen wird dadurch die Produktion von iNOS und damit die von NO herunterreguliert und so Gewebeschäden begrenzt. Zum anderen kann dies die Entwicklung des Parasiten und damit eine chronische Infektion begünstigen (Gobert et al. 2000, Iniesta et al. 2005). Joerink et al. (2006a) konnten in kultivierten Karpfen-Makrophagen mit exogenem cAMP deutlich eine Arginase-2-Aktivität induzieren, jedoch keine NO-Produktion. Dagegen konnte mit LPS die Genexpression von iNOS (bis zu 670-fach), nicht jedoch die von Arginase-2, stimuliert werden. Obwohl dieser klare Anstieg der iNOS-Expression deutlich gefunden wurde, war der Anstieg aufgrund der hohen Variation der einzelnen Fische nicht signifikant (Joerink et al. 2006a). Diese Reaktion ist bei Karpfen bekannt und wurde sowohl bei der Genexpression, als auch auf funktionalem Level schon beobachtet (Saeij et al. 2002). In Infektionsversuchen mit Karpfen zeigten sich nach Infektion mit *Trypanosoma borreli* bzw. *T. carassii* unterschiedliche Reaktionen, die darauf schließen lassen, dass Makrophagen von Karpfen zu einer differenzierten Polarisation fähig sind (Joerink et al. 2006b). iNOS ist an der Typ I-Immunantwort, die durch klassisch aktivierte Makrophagen gekennzeichnet ist, beteiligt (Nathan 1992, Eisenstein et al. 1994). Klassisch aktivierte Makrophagen besitzen, aufgrund ihrer Möglichkeit, reaktives Stickstoffoxid und reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren, zytotoxische, antibakterielle und antiproliferative Eigenschaften (Wiegertjes & Joerink 2004). Um zu einer effektiven Immunantwort gegen Parasiten zu gelangen, bedarf es einer ausgeglichenen Immunantwort zwischen einer Typ I-Immunantwort (klassisch aktivierte Makrophagen) und einer Typ II-Immunantwort (alternativ aktivierte Makrophagen) (Vincendeau et al. 2003, Wiegertjes & Joerink 2004). Wang et al. (2001) konnten das komplette, für iNOS kodierende Gen bei Regenbogenforellen sequenzieren. In weiteren Versuchen wurden erhöhte Expressionslevel nach 7d p.exp. nach einer Infektion mit VHS (Tafalla et al. 2005) und AGD (Bridle et al. 2006), und bereits nach 4d, signifikant nicht jedoch vor 8d p.exp. nach Infektion mit *Gyrodactylus derjavini* (Lindenstrøm et al. 2004), gefunden.

Klare Unterschiede sind bei der Expression von C3 (siehe Abbildung 4-10), aufgrund der zum Teil großen Variation der Expression in den einzelnen Fischen, kaum zu erkennen. Bis 8h p.exp. scheint die Expression von C3 in den infizierten Regenbogenforellen der Linie T tendenziell erniedrigt zu sein, während die Expression von C3 in der infizierten H-Gruppe 4h und 8h p.exp. ansteigt. Nach 24h und 48h p.exp. reagiert nur die T-Linie im Mittel mit einer höheren Expression; nach 4d p.exp. ist offenbar die Expression beider Linien erhöht. Danach

ist die Expression in der empfänglichen Linie T anscheinend, verglichen mit der Kontrollgruppe, wieder tendenziell herunterreguliert.

Es wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass die Aktivierung der Komplementkaskade auf klassischem, wie auf alternativem Weg eine bedeutende Immunreaktion gegen Infektionen mit Parasiten darstellt (Sharp et al. 1991, Buchmann & Bresciani 1999, Saeij et al. 2003). Singh et al. (2004a) fanden nach der Infektion von Regenbogenforellen mit *Ichthyophthirius multifiliis* einen frühen Anstieg der Expression von C3 nach 4d und 6d in der Haut und einen späteren Anstieg nach 6d und 26d in der Milz. Nach 24h zeigte sich in der Kopfniere jedoch eine signifikante Depression. Eine ähnliche Depression der Expression von C3 konnte 24h nach einer Infektion von Regenbogenforellen mit *Flavobacterium psychrophilum* in der Niere gefunden werden (Overturf & LaPatra 2006), nach der Infektion mit IHN konnte aber eine Expressionssteigerung in Leber (1d) und Niere (1d und 5d) nachgewiesen werden. Saeij et al. (2003) fanden in Karpfen nach einer Infektion mit *T. borreli* den frühesten Anstieg von C3 nach 6h. Eine Involvierung des alternativen Komplementweges bei dem Abtöten von *G. dejavini* konnte bei *in vitro*-Versuchen gezeigt werden (Buchmann 1998). Da sich C3 besonders an Carbohydrat-reiche Stellen auf der Parasitenoberfläche band, wird auch eine Beteiligung des Lektin-Weges in Betracht gezogen (Buchmann 1998, Harris et al. 1998). Es stellte sich außerdem heraus, dass Epithel und Mukus von Fischen reichlich Komplement enthalten (Buchmann & Bresciani 1998).

Die in der Komplementkaskade entstehenden Produkte haben bei der Initiation von Entzündungsreaktionen, der Opsonierung, Phagozytose und Zellysis von Pathogenen entscheidende Funktionen inne (Sunyer & Lambris 1999, Gasque 2004). Des Weiteren ist das Komplementsystem auch an Funktionen in der adaptiven Immunantwort beteiligt. C3 ist der zentrale Faktor, bei dem die drei Reaktionswege des Komplementsystems zusammenlaufen (Boshra et al. 2006). Bei Entzündungsreaktionen in Mäusen wurde beobachtet, dass die Synthese von C3 von Cytokinen, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , gesteigert werden konnte (Fischer et al. 1998).

In der vorgelegten Arbeit konnte in den infizierten Fischen der nicht empfänglichen Linie H eine erhöhte Expression von COX-2 von 30min p.exp. bis 2h p.exp. mit einem Maximum bei 1h p.exp. beobachtet werden. Zu allen Entnahmezeitpunkten bis 8h p.exp. zeigte sich eine deutlich höhere Expression bei den infizierten Fischen der Linie T als sie bei den nicht infizierten Kontrollfischen und den infizierten Regenbogenforellen der nicht empfänglichen Linie H gefunden werden konnte; der höchste Wert wurde bei 5min p.exp. gemessen, anschließend fielen die Werte bis 8h p.exp. ab. Die bis 2h p.exp. sichtbar erhöhte relative

Expression von COX-2 würde für eine schnelle inflammatorische Immunantwort als Reaktion auf die Invasion des Parasiten sprechen (siehe Abbildung 4-11). Die Veränderungen in der Expression zum Entnahmezeitpunkt 120d und 200d p.exp. könnten mit inflammatorischen Reaktionen bei der Sporogenese und der Bildung der reifen Sporen von *Myxobolus cerebralis* zusammenhängen.

Zou et al. (1999c) konnten zum ersten Mal zeigen, dass COX-2 bei Regenbogenforellen nicht konstitutiv exprimiert wird, jedoch nach einer Stimulation mit LPS oder einem attenuierten Stamm von *Aeromonas salmonicida in vivo* eine Expression in den Leukozyten der Kopfniere induziert werden kann. In Makrophagen von Regenbogenforellen, die mit *Renibacterium salmoninarum* infiziert wurden, konnte nach 2h eine gesteigerte Expression von IL-1 β , dem Haupthistokompatibilitätskomplex II, sowie iNOS und COX-2, und an Tag 1 von IL-1 β , COX-2 und TGF- β , nachgewiesen werden (Grayson et al. 2002). Regenbogenforellen exprimieren nach einer primären, nicht jedoch nach einer sekundären Infektion mit *G. derjavini* COX-2 (Lindenstrøm et al. 2004), während bei Lachsen nach einer Infektion mit *G. salaris* kein Anstieg von COX-2 in der Haut gefunden wurde (Lindenstrøm et al. 2006). Des Weiteren wurde bei natürlich mit *Tetracapsuloides bryosalmonae*, einem Vertreter der Myxozoa, infizierten Regenbogenforellen eine induzierte Expression von IL-1 β , COX-2 und TGF- β 1 gefunden (Holland et al. 2003). Die Expression von COX-2 kann, neben weiteren Stimuli, von rIL-1 β (Hong et al. 2001) beziehungsweise von IL-1 β induziert werden (Hong et al. 2003). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie und den Ergebnissen von Lindenstrøm et al. (2003, 2004), die einen Zusammenhang zwischen den hohen Expressionsleveln beider Isoformen von IL-1 β und COX-2 in den frühen Stadien der Infektion sehen. COX-2 katalysiert die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂, aus dem eine Reihe weiterer Prostaglandine hergestellt werden (Harris et al. 2002). Prostaglandine haben wichtige immunmodulierende Eigenschaften und können stimulierend oder inhibitorisch wirken (Harris et al. 2002). Von diesen Prostaglandinen hat das Prostaglandin E₂ für inflammatorische Reaktionen die größte Bedeutung (Knight & Rowley 1995). In Zelllinien von *S. salar* (SHK-1) ist Prostaglandin E₂ in physiologischen Konzentrationen in der Lage, die Expression von IL-1 β und COX-2 zu hemmen (Fast et al. 2005). Es wird angenommen, dass Prostaglandin E₂ auch von Parasiten produziert werden kann, um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen (Fast et al. 2004, 2005).

Wie von wichtigen, proinflammatorischen Cytokinen erwartet, wurden in beiden Isoformen von IL-1 β die auffälligsten Veränderungen in der Expression zwischen 5min p.exp. und 8h p.exp. gefunden. Der beobachtete Anstieg der Expression beider Isoformen bei den infizierten

Forellen der nicht empfänglichen Linie H scheint in einer Kurve mit einem Maximum bei 1h p.exp. zu verlaufen. Die infizierten Regenbogenforellen der empfänglichen Linie T zeigten eine deutlich höhere relative Expression, vor allem von IL-1 β 1, als die infizierten Fische der Linie H. Das Expressionsmaximum von IL-1 β 1 liegt zwischen 1h p.exp. und 8h p.exp., das von IL-1 β 2 zwischen 30min p.exp. und 2h p.exp. Es konnte außerdem ein zweiter Anstieg der Expression beider Isoformen beginnend bei 24h p.exp. bis zu einem zweiten Maximum bei 4d p.exp. in der empfänglichen Linie T beobachtet werden. In der Linie H fällt dieser Anstieg wesentlich moderater aus und ist bei IL-1 β 1 nur an dem Entnahmezeitpunkt 48h p.exp. zu sehen, bei IL-1 β 2 zwischen 24h und 4d p.exp. mit einem Maximum bei 48h p.exp. (siehe Abbildung 4-12 und Abbildung 4-13).

In Infektionsversuchen mit *Gyrodactylus salaris* wurde die Expression von IL-1 β in der Haut bei 4 Monate alten Lachsen einer empfänglichen Population und einer weniger empfänglichen Population untersucht (Lindenstrøm et al. 2006). In dieser Studie wurde, in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit, ein signifikanter Anstieg von IL-1 β bei den Lachsen der empfänglichen Population gefunden, während die Lachse der weniger empfänglichen Population zu keinem Zeitpunkt signifikante Anstiege verzeichneten (Lindenstrøm et al. 2006). Eine gesteigerte Expression von IL-1 β wurde auch in Embryos und adulten Zebrafischen in den ersten Stunden nach der Infektion mit *Edwardsiella tarda* gefunden (Pressley et al. 2005). Während die Adulten eine langsamere und dafür robustere Induktion von IL-1 β und TNF- α zeigten, wurde die Cytokin-Antwort bei den Embryos schneller induziert. Für die schnelle Antwort mit niedrigeren Cytokin-Leveln könnten embryonale Makrophagen verantwortlich sein, die ohne Assistenz von Lymphozyten agieren (Pressley et al. 2005). Embryonale Makrophagen von Zebrafischen sind in der Lage, ohne Kontakt mit Bakterien in einen aktivierten Status zu gelangen (Herbomel et al. 1999); zudem können sie aktiv zum Ort einer Infektion wandern (Davis et al. 2002). Bei Regenbogenforellen mit einem Körpergewicht von 10g wurde nach der Infektion mit dem Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ein erster Anstieg von IL-1 β 1 nach 24h in Milz und Kopfnieren gefunden; nach 4 und 6 Tagen war die Expression beider Isoformen signifikant gesteigert (Sigh et al. 2004b). Zusätzlich zu der Expression in der Haut, wurde ein Anstieg von IL-1 β und einiger anderer Gene in Milz und vorderer Niere 26d nach der Infektion gefunden; als mögliche Erklärung für die systemische Immunantwort in diesem späten Stadium der Infektion wird der moribunde Zustand der infizierten Forellen betrachtet (Sigh et al. 2004b). Drei Tage nach der Infektion von Forellen mit dem IHN Virus wurde ein enormer Anstieg einiger Gene der Immunantwort, einschließlich TNF- α , IL-1 β und IL-8 beobachtet; die Expression von TGF- β war jedoch nur

schwach erhöht (Purcell et al. 2004). Es wird angenommen, dass IL-1 β eine Schlüsselrolle in der Immunantwort gegen *G. derjavini* spielt, da ein bemerkenswerter, ähnlicher Anstieg der Expression beider Isoformen nach primären Infektionen stattfindet (Lindenstrøm et al. 2003). Außerdem konnten bei Infektionen mit VHS und der Amöbenkrankheit der Kiemen (AGD) gesteigerte Expressionslevel gefunden werden (Tafalla et al. 2005, Bridle et al. 2006). Die Expression eines für IL-1 β kodierenden Genes in Regenbogenforellen konnte *in vitro* mit LPS induziert werden und war nach einer Stunde messbar mit einem Maximum zwischen 4 und 8h p.exp. (Zou et al. 2000). Mit Hilfe von biologisch aktivem rIL-1 β wurden erste Wirkungen von IL-1 β in Regenbogenforellen beschrieben: *In vitro* und *in vivo* konnten in Abhängigkeit von der Dosis Auswirkungen auf Migration, Proliferation, Phagozytose, wie auch gesteigerte Lysozym-Expression, eine Induktion von IL-1 β und COX-2 und erhöhte Resistenz gegenüber *A. salmonicida* festgestellt werden (Hong et al. 2001, 2003). Von einer negativen Beeinflussung der Transkription von IL-1 β durch Kortisol wird berichtet (Zou et al. 2000). Außerdem werden die Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, sowie die Stimulation von T-Zellen beschrieben (Titus et al. 1991). IL-1 β ist auch in der Lage, Transkriptionsfaktoren wie NK- κ B, der für die Transkription von iNOS in Fischen von Bedeutung ist, zu aktivieren (Saeij et al. 2000). Bis jetzt ist der zelluläre Ursprung von IL-1 β noch nicht bekannt, aber man vermutet Epithelialzellen, Makrophagen und Fibroblasten als mögliche Quellen in Knochenfischen (Zou et al. 1999c, Pelegrín et al. 2004). Über die Unterschiede in der biologischen Aktivität der beiden Isoformen IL-1 β 1 und IL-1 β 2, bzw. ob es überhaupt Unterschiede gibt, ist noch nichts bekannt (Pleguezuelos et al. 2000, Lindenstrøm et al. 2003).

Die Veränderungen der Transkriptionslevel von TGF- β waren, verglichen mit den anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene, sehr schwach. Zu fast allen Zeitpunkten (Ausnahmen: 4h p.exp. und 40d p.exp.) schien die Expression von TGF- β bei den infizierten Regenbogenforellen der nicht empfänglichen Linie H verglichen mit der Kontrollgruppe im Mittel tendenziell erhöht zu sein, mit einem Maximum bei 8d p.exp. Dagegen war das Transkriptionslevel der infizierten Forellen der empfänglichen Linie T zu allen Entnahmezeitpunkten bis 48h p.exp. verglichen mit der nicht infizierten Kontrollgruppe anscheinend erniedrigt; erst zwischen 4d p.exp. und 20d p.exp., mit einem Maximum bei 8d p.exp., wurde eine höhere Expression als in der Kontrollgruppe gefunden. Die Werte lagen jedoch stets unter denen der infizierten Fische der Gruppe H (siehe Abbildung 4-15).

Holland et al. (2003) berichten von gesteigerter Expression von COX-2, IL-1 β und, jedoch in einem geringeren Maße, von TGF- β 1 im Gewebe des hinteren Nierenabschnittes bei natürlich

mit *T. bryosalmonae* infizierten Regenbogenforellen. Weiter wird beschrieben, dass die Expression von TGF- β 1 in der Haut von Regenbogenforellen nach sekundärer Infektion mit dem Ektoparasiten *G. derjavini* am achten Tag erhöht ist (Lindenstrøm et al. 2004). In Hybriden des gestreiften Seebarsches (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) wurden höhere Level von TGF- β mRNA in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes, als von Milz und vorderer Niere gefunden (Harms et al. 2000). Bei Regenbogenforellen wurde nach einer Infektion mit dem VHS Virus in der Milz ein signifikanter Anstieg von IL-1 β nach 1d und 2d p.exp. beschrieben, während ein Anstieg der TGF- β Expression nach 1d und 7d p.exp. in der Milz und 7d p.exp. in der Leber gefunden wurde (Tafalla et al. 2005). Die Reaktionswege von IL-1 β und TGF- β sind zwei pleiotrope Wege, die in der Lage sind, eine Vielzahl von Immunantworten zu regulieren. Die Inhibition des Reaktionsweges von TGF- β durch IL-1 β wurde von Benus et al. (2005) beschrieben. Harms et al. (2003) stellten bei gestreiften Seebarschen, nach der Infektion mit *Mycobacterium marinum*, eine extreme granulomatöse Entzündung fest, die mit einer herunterregulierten TGF- β Expression einherging, während infizierte Tilapia eine geringere Entzündung aufwies, die jedoch nicht mit signifikanten Veränderungen der TGF- β Expression verbunden war. Bei Fischen, die auf eine Infektion mit Mycobakterien, empfindlich reagieren, wird vermutet, dass eine Herunterregulierung von TGF- β eine Rolle in der Dysregulation von Entzündungsreaktionen spielt, die dann zu einer ausgedehnten Schädigung von Organen führt (Harms et al. 2003).

Es ist bemerkenswert, dass TGF- β der in dieser Arbeit untersuchten Gene, das einzige zu sein scheint, das, wenn auch in sehr geringem Maße, bei den infizierten Regenbogenforellen der nicht empfänglichen Linie H, verglichen mit den infizierten Fischen der Linie T, tendenziell höher exprimiert wird. Da Veränderungen in der Expression nicht unbedingt in direkter Verbindung zur Translation oder der Konzentration von exprimierten Proteinen stehen, werden bei den Cytokinen IL-1 β und TGF- β keine großen Änderungen in der Proteinkonzentration gebraucht, um ein weites Spektrum an Immunreaktionen zu erzeugen; viele Cytokine initialisieren Reaktionen schon in sehr geringen Konzentrationen (Fast et al. 2005).

TGF- β gehört zu einer Familie von Cytokinen mit pleiotropen Effekten auf das Immunsystem. Die immunregulatorischen Eigenschaften sind vornehmlich suppressiv, einschließlich der Antagonisierung von proinflammatorischen Cytokinen, wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , der Hemmung der Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen, und Hemmung der respiratory burst-Aktivität (Ruscetti & Palladino 1991). Es werden aber auch einige proinflammatorische Wirkungen von TGF- β beschrieben. Zu ihnen gehören die Promotion

von Makrophagen, die Chemotaxis von Neutrophilen, die Produktion von IgA und einiger Cytokine (McCartney-Francis & Wahl 1994), sowie die Förderung von Faktoren, die für die Wundheilung bedeutsam sind (Jyung & Mustoe 1993). Es hängt jedoch von seiner Konzentration, der Differenzierung der Zielzellen und der Konzentration anderer proinflammatorischer Bestandteile ab, ob TGF- β pro- oder antiinflammatorisch wirkt (McCartney-Francis & Wahl 1994).

Ob alle diese Eigenschaften auf das TGF- β von Knochenfischen zutreffen, ist noch unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass niedrig dosiertes, bovines TGF- β die respiratory burst-Aktivität von inaktiven Makrophagen aus der Kopfniere von Regenbogenforellen steigern kann; bei aktivierten Makrophagen, die mit TGF- β inkubiert wurden, nahm die respiratory burst-Aktivität mit steigender Dosis ab (Jang et al. 1994).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beiden Isoformen von IL-1 β , iNOS und COX-2 einem ähnlichen Schema folgten; es wurde eine gesteigerte Expression in beiden Regenbogenforellen-Linien gefunden, wobei die Expression in der empfänglichen amerikanischen Linie T höher ausfiel. Bei Arginase-2 zeigte nur die Linie T eine Veränderung in der Expression. Bei dem Komplementfaktor C3 schienen in beiden Linien sowohl Depressionen, wie auch Steigerungen der Expression vorzukommen. TGF- β ist das einzige untersuchte Gen, bei dem die Expression in der nicht empfänglichen Linie H höher zu sein schien, als bei der infizierten Linie T.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Regenbogenforellen der nicht empfänglichen Linie H in der Lage sind, der Infektion mit *M. cerebralis* mit nur einem geringen Anstieg der hier untersuchten Gene begegnen zu können. Steigerungen in der Expression von proinflammatorischen Cytokinen könnten Folge des Unvermögens des Wirtes sein, die Infektion erfolgreich zu bekämpfen und zu einer unregulierten, systemischen Entzündung führen (Fast et al. 2006).

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit darauf lag, einen breiteren Überblick über die Wirkung verschiedener immunregulatorischer Gene über einen langen Zeitraum zu erhalten, mussten trotz der hohen Anzahl von 130 untersuchten Individuen, hinsichtlich der statistischen Aussagekraft, zunächst noch Einschränkungen hingenommen werden.

Es bedarf weiterer Untersuchungen auf molekularer Ebene, um die genauen Ursachen der unterschiedlichen Immunantwort bei beiden Linien zu identifizieren, die Zellen zu finden, die diese Gene exprimieren und die Expressionslevel auf Proteinebene zu erforschen.

6 Zusammenfassung

Relative Quantifizierung immunregulatorischer Gene bei zwei Regenbogenforellen-Linien, *Oncorhynchus mykiss*, nach der Infektion mit *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden

Die Resistenzmechanismen, denen eine unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit der Drehkrankheit zugrunde liegt, sind bis heute unbekannt. Unspezifische Immunreaktionen sind eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Resistenz.

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen einer Verlaufsstudie, eine molekularbiologische Beschreibung des Transkriptionsprofils verschiedener immunregulatorischer Gene (Arginase-2, iNOS, COX-2, Komplementfaktor C3, TGF- β und zwei Isoformen von IL-1 β , IL-1 β 1 und IL-1 β 2) in zwei verschiedenen Regenbogenforellen-Linien, *Oncorhynchus mykiss*, nach der Infektion mit *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, zu geben. Es wurden eine, für die Drehkrankheit sehr empfängliche, amerikanische Linie (T) und eine deutsche Zuchtlinie (H) mit bekannter erhöhter Resistenz gegen die Entwicklung der Drehkrankheit, ausgewählt.

Unter kontrollierten Laborbedingungen wurden Regenbogenforellen beider Linien, 6 Wochen nach dem Schlupf, einer definierten Anzahl Triactinomyxon-Sporen exponiert. Im Verlauf von 200 Tagen nach der Exposition wurden Proben entnommen und für die relative Quantifizierung mittels der real-time RT-PCR aufbereitet.

Im Vorfeld wurden deshalb spezifische Primerpaare konstruiert, die für die real-time RT-PCR mit dem Fluorophor SYBR-Green geeignet sind. Die PCR-Amplifikationen wurden standardisiert. Als gängige Methode dafür fand die Erstellung einer Standardkurve für jedes Gen Anwendung.

Die mit der oben benannten Methode gewonnenen Daten ermöglichten eine relative, also das Transkriptionslevel verschiedener Proben vergleichende, Quantifizierung. So konnte die Transkriptionsaktivität, und damit annäherungsweise die Genexpression der untersuchten immunregulatorischen Gene, im zeitlichen Verlauf nach der Exposition beschrieben werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Expression bei den zwei Regenbogenforellen-Linien vorhanden sind. In der infizierten Gruppe der Linie T konnte bereits 30min p.exp. ein Anstieg der Expression von Arginase-2, der bis 48h p.exp. anhielt, gefunden werden; in der infizierten Gruppe H wurde jedoch keine Änderung des

Transkriptionslevels sichtbar. Nach 4d bis 8d p.exp. war die Expression von iNOS in der Linie T zum Teil extrem erhöht, während sich in der Linie H 48h p.exp. und 8d bis 40d p.exp. ein Anstieg zeigte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Immunantwort nach einer Infektion mit *M. cerebralis* in der empfänglichen Linie T ein Umschalten von einer Typ II-Immunantwort mit alternativ aktivierten Makrophagen, in die Arginase-2 involviert ist, zu einer Typ I-Antwort mit klassisch aktivierten Makrophagen und iNOS stattfindet. Die Regenbogenforellen der Linie H hingegen scheinen nur mit einer Typ I-Immunantwort zu reagieren. In der relativen Expression des Komplementfaktors C3 ist keine klare Tendenz zu erkennen. Nach einer Herunterregulierung in den ersten 8h p.exp., ist die Expression in der Linie T von 24h bis 4d p.exp. erhöht, nur um danach wieder herunterreguliert zu werden. In der Linie H ist nach 4h und 8h, sowie 4d p.exp. eine gesteigerte Expression von C3 zu finden. Der Grund für den Abfall der Expression ist jedoch unbekannt. Die Expression von COX-2 und die beiden proinflammatorischen Cytokine IL-1 β 1 und IL-1 β 2 zeigen eine ähnliche Reaktion, bei der die Expression in beiden Linien bereits 5min p.exp. ansteigt, wobei die Expression in der empfänglichen Linie T stets höher ausfällt, als die der nicht empfänglichen Linie H. Bei COX-2 fiel die Expression der Linie T bis 8h p.exp., die der Linie H bis 2h p.exp., wieder auf das Level der Kontrollgruppen ab. Die Expression der beiden IL-1 β Isoformen erfolgte jeweils in zwei Wellen bis 4d p.exp. In der Linie H war der zweite Anstieg bei IL-1 β 2 auch deutlich zu erkennen. Das Transkriptionslevel von TGF- β bewegte sich in einem engen Rahmen, wobei die Expression in der nicht empfänglichen Linie H zu fast allen Zeitpunkten (exclusiv: 4h und 4d p.exp.) erhöht zu sein schien. In der Linie T zeigte sich bis zu einem Expressionsanstieg zwischen 4d und 20d p.exp., eine Abnahme der Expression. Es fällt auf, dass das pleiotrope Cytokin TGF- β das einzige untersuchte Gen war, bei dem die Expression der Linie H höher ausfiel, als in der Linie T.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass Regenbogenforellen der nicht empfänglichen Linie H in der Lage sind, der Infektion mit *M. cerebralis* nur mit einer geringen Regulierung der Transkription der hier untersuchten Gene, zu begegnen. Die zum Teil sehr großen Anstiege in der Transkription der Gene in der empfänglichen Linie T lassen ein Unvermögen vermuten, die Infektion effektiv zu bekämpfen.

7 Summary

Relative quantification of immune-regulatory genes in two rainbow trout-strains, *Oncorhynchus mykiss*, after exposure to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease

Until today the mechanisms of resistance, which are responsible for a different susceptibility of infection with whirling disease, are unknown. Unspecific immune reactions may be a possible reason for the different susceptibility.

The aim of the present work was, to give a molecular biological description of the transcription profile during a given period of time of several immune-regulatory genes (arginase-2, iNOS, COX-2, complement factor C3, TGF- β and two isoforms of IL-1 β , IL-1 β 1 and IL-1 β 2) in two different rainbow trout-strains, *Oncorhynchus mykiss*, after infection with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. A susceptible American breeding strain (T) and a German breeding strain (H) with known resistance to development of whirling disease were chosen.

Under laboratory conditions, rainbow trout of both strains, at the age of 6 weeks post hatch, were exposed to a certain number of triactinomyxon-spores. In the course of 200 days p.exp., samples were taken and processed for relative quantification with real-time RT-PCR.

Beforehand, specific primer pairs were constructed which are suitable for real-time RT-PCR with SYBR-Green. The PCR amplification-reactions were standardised. A current method for this is the generation of a standard curve for each gene.

By this, a comparison of the transcriptional levels in the samples was achieved and enables relative quantification. So the transcriptional activity and the gene expression in progress of time of the investigated immune-regulatory genes could be determined approximately.

It was shown, that there are differences in the expression of genes in both rainbow trout-strains. An increase in the expression of arginase-2 could be detected in the infected group of strain T from 30min until 48h p.exp., while in the infected group H no change could be found in the transcriptional level. From 4d until 8d p.exp. in strain T the expression of iNOS was in part enormously increased, while an up-regulation was seen in strain H 48h p.exp. and 8d until 40d p.exp.. These results suggest, that in the immune reaction in strain T after infection with *M. cerebralis* there is a switch from type II response with alternatively activated macrophages and arginase-2 involved, to type I response with classically activated

macrophages and iNOS. The rainbow trout of strain H seem to react with a type I response only. There was no distinct tendency in the relative expression of complement factor C3. The expression of C3 in strain T is increased from 24h until 4d p.exp., after a down-regulation in the first 8h p.exp., just to be down-regulated again subsequently. The reason for down-regulation is unknown. An up-regulated expression of C3 was found in the strain H after 4h, 8h and 4d p.exp.. The expression of COX-2 and the two pro-inflammatory cytokines IL-1 β 1 and IL-1 β 2 showed similar reactions, in which the expression started to increase 5min p.exp., but the expression in strain T was always more elevated than in strain H. In COX-2, the expression returned to control level in strain T until 8h p.exp. and in strain H until 2h p.exp.. The expression of both isoforms of IL-1 β took place in two elevated waves until 4d p.exp. In strain H the second increase was clearly seen, too. The transcriptional level of TGF- β ranged in a narrow scope, where the expression of the non-susceptible strain H seemed to be elevated in nearly all sampling points (exclusive 4h and 4d p.exp.). In strain T, until the up-regulation between 4d and 20d p.exp., the expression was decreased. It is remarkable, that the pleiotropic cytokine TGF- β was the only gene examined, where the expression of strain H was more elevated than in strain T.

The results of this study suggest, that the rainbow trout of the non-susceptible strain H are able to counteract the infection with *M. cerebralis* with only a minor transcriptional regulation of genes investigated in this study. The in part widely increased transcriptions of genes in the susceptible strain T, may be the result of an inability to antagonise the infection.

8 Literaturverzeichnis

Aderem A & Underhill DM (1999)

Mechanisms of phagocytosis in macrophages.
Annu Rev Immunol. 17: 593-623

Adkison MA, Kelley GO, Hedrick RP (2005)

Non-lethal testing for *Myxobolus cerebralis* infection by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Proceedings, 11th Annual Whirling Disease Symposium: 44-45

Albina JE, Mills CD, Henry WL Jr, Caldwell MD (1990)

Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds.
J Immunol. 144: 3877-3880

Allen JE & Loke P (2001)

Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis.
Parasite Immunol. 23: 345-352

Al-Sharif WZ, Sunyer JU, Lambris JD, Smith LC (1998)

Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3.
J Immunol. 160: 2983-2997

Amaro C, Fouz B, Biosca EG, Marco-Noales E, Collado R (1997)

The lipopolysaccharide O side chain of *Vibrio vulnificus* serogroup E is a virulence determinant for eels.
Infection and immunity 65: 2475-2479

Andree KB, Gresoviac SJ, Hedrick RP (1997)

Small subunit RNA sequences unite alternate actinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis* the causative agent of whirling disease in salmonid fish.
Journal of Eukaryotic Microbiology 44(3): 208-215

Andree KB, MacConnell E, Hedrick RP (1998)

A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.
Dis Aquat Organ. 34: 145-154

Andree KB, El-Matbouli M, Hoffmann RW, Hedrick RP (1999)

Comparison of 18S and ITS-1 rDNA sequences of selected geographic isolates of *Myxobolus cerebralis*.
Int J Parasitol. 29: 771-775

Anlauf A (1990)

Cyst formation in *Tubifex tubifex* (Müller) – An adaption to survive food deficiency and drought.
Hydrobiologia 190: 79-82

Anlauf A (1994)

Some characteristics of genetic variants of *Tubifex tubifex* (Müller 1774) (Oligochaeta: Tubificidae) in laboratory cultures.

Hydrobiologia 278: 1-6

Anlauf A (1997)

Enzyme variability of *Tubifex tubifex* (Müller) (Oligochaeta: Tubificidae) and seven other tubificid species.

Archiv für Hydrobiologie 139: 83-100

Anlauf A & Neumann D (1997)

The genetic variability of *Tubifex tubifex* (Müller) in 20 populations and its relation to habitat type.

Archiv für Hydrobiologie 139: 145-162

Antonio DB, Andree KB, McDowell TS, Hedrick RP (1998)

Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout and oligochaete tissue by using a non-radioactive In Situ Hybridisation (ISH) protocol.

J Aquat Anim Health 10: 338-347

Antonio DB, El-Matbouli M, Hedrick RP (1999)

Detection of early developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in fish and oligochaete hosts by In Situ Hybridization (ISH).

Parasitol Res. 85: 942-944

Baldwin TJ, Vincent ER, Siflow RM, Stanek D (2000)

Myxobolus cerebralis infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) exposed under natural stream conditions.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigations 12: 312-321

Baldwin TJ & Myklebust KA (2002)

Validation of a single round polymerase chain reaction assay for identification of *Myxobolus cerebralis* myxospores.

Dis Aquat Organ. 49: 185-190

Bartholomew JL & Reno P (2002)

The history and dissemination of whirling disease.

In: Whirling disease: Reviews and current topics, J.L. Bartholomew and J.C. Wilson (eds.)

American Fisheries Society Symposium 29, Bethesda, Maryland: 3-24

Beauchamp KA, Kathman RD, McDowell TS, Hedrick RP (2001)

Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae).

Molecular Phylogenetics and Evolution 19: 216-224

Beauchamp KA, Gay M, Kelley GO, El-Matbouli M, Kathman RD, Nehring RB, Hedrick RP (2002)

Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis* and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex* from the windy gab reservoir and the upper Colorado river: whirling disease enzootic areas.

Dis Aquat Organ. 51: 113-121

Beauchamp KA, El-Matbouli M, Gay M, Georgiadis MP, Nehring RB, Hedrick RP (2006)

The effect of cohabitation of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) populations on infections to *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxobolidae).

Journal of Invertebrate Pathology 91(1): 1-8

Bechara IJ, Youssef NN, Roberts DW (2003)

Histologic study of head cartilage degeneration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the parasite *Myxobolus cerebralis*.

J Submicrosc Cytol Pathol. 35 (2): 111-116

Benus GFJD, Wierenga ATJ, DE Gorter DJJ, Schuringa JJ, Van Bennekum AM, Drenth-Diephuis L, Vellenga E, Eggen BJL (2005)

Inhibition of the transforming growth factor β (TGF β) pathway by interleukin-1 β is mediated through TGF β -activated kinase 1 phosphorylation of SMAD3.

Mol Biol Cell. 16: 3501-3510

Bergersen EP & Anderson DE (1997)

The distribution and spread of *Myxobolus cerebralis* in the United States.

Fisheries 22 (8): 6-7

Bermudez LE (1993)

Production of transforming growth factor β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ .

J Immunol. 150: 1838-1845

Bird S, Wang T, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2002)

The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1beta in the small spotted catshark (*Scyliorhinus caniculus*).

J Immunol. 168(7): 3329-3340

Boackle SA, Morris MA, Holers VM, Karp DR (1998)

Complement opsonization is required for presentation of immune complexes by resting peripheral blood B cells.

J Immunol. 161: 6537-6543

Bogdan C & Nathan C (1993)

Modulation of macrophage function by transforming growth factor- β , interleukin-4, and interleukin-10.

Ann NY Acad Sci. 685: 713-739

Bollard BA, Pankhurst NW, Wells RMG (1993)

Effects of artificially elevated plasma cortisol levels on blood parameters in the teleost fish *Pagrus auratus* (Sparidae).

Comparative Biochemistry and Physiology A 106: 157-162

Boshra H, Peters R, Li J, Sunyer JO (2004)

Production of recombinant C5a from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst.

Fish Shellfish Immunol. 17(3): 293-303

Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006)

Recent advances on the complement system of teleost fish.
Fish Shellfish Immunol. 20: 239-262

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990)

Localisation of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.
Nature 347: 768-770

Bredt DS & Snyder SH (1990)

Isolation of nitric oxide synthase, a cadmodulin-requiring enzyme.
In: Proceedings of Natl Acad Sci. USA, Vol. 87: 682-685

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991)

Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.
Nature 351: 714-718

Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992)

Nitric oxide synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase C, and calcium/cadmodulin protein kinase; identification of flavin and cadmodulin binding sites.
J Biol Chem. 267: 10976 -10981

Bridle AR, Morrison RN, Nowak BF (2006)

The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD).
Fish Shellfish Immunol. 20: 346-364

Buchmann K (1998)

Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea).
Dis Aquat Organ. 32: 195-200

Buchmann K & Bresciani J (1998)

Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucus cell density in skin and site selection.
Parasitol Res. 84: 17-24

Buchmann K & Bresciani J (1999)

Rainbow trout leucocyte activity: influence on the ectoparasitic monogenean *Gyrodactylus derjavini*.
Dis Aquat Organ. 35: 13-22

Buchmann K & Lindenstrøm T (2002)

Interactions between monogenean parasites and their fish hosts.
Int J Parasitol. 32: 309-319

Burt DW & Jakowlew SB (1992)

Correction: a new interpretation of a chicken transforming growth factor- β 4 complementary DNA.
Molec Endocrinol. 6: 989-992

Burt DW & Paton IR (1992)

Evolutionary origins of the TGF- β gene family.
DNA Cell Biol. 11: 497-510

Burt DW, Dey BR, Paton IR, Morrice DR, Law AS (1995)

The chicken transforming growth factor- β 3 gene: genomic structure, transcriptional analysis and chromosomal location.
DNA Cell Biol. 14: 111-123

Campos-Perez JJ, Ward M, Grabowski PS, Ellis AE, Secombes CJ (2000)

The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the Gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*.
Immunology 99: 153-161

Cavender WP, Wood JS, Powell MS, Overturf K, Cain KD (2004)

Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) to identify *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.
Dis Aquat Organ. 60 (3): 205-213

Ceretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. (1992)

Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme.
Science 256: 97-100

Chadwick TD & Wright PA (1999)

Nitrogen excretion and expression of urea cycle enzymes in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): a comparison of early life stages with adults.
J Exp Biol. 202: 2653-2662

Chang CI, Liao JC, Kuo L (1998)

Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages.
Am J Physiol. 274: H342-H348

Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS (1994)

Molecular cloning, structure, and chromosomal localisation of the human inducible nitric oxide synthase gene.
J Biol Chem 269: 6765-6772

Chevassus B & Dorson M (1990)

Genetics of resistance to disease in fishes.
Aquaculture 85: 83-107

Christensen NO (1966)

Fiskessygdomme
Copenhagen 69pp. (Franz. Ausg. Maladies des Poissons. Syndicat pisciculteurs, Paris 1968)

Clark IA & Rockett KA (1996)

Nitric oxide and parasitic disease.
Adv Parasitol. 37: 1-56

Currie GA, Gyure L, Cifuentes L (1979)

Microenvironmental arginine depletion by macrophages in vivo.
Br J Cancer 39: 613-620

Cvancara VA (1969)

Studies on tissue arginase and urogenesis in fresh-water teleosts.
Comp Biochem Physiol. 30: 489-496

Daniels GD & Secombes CJ (1999)

Genomic organisation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* TGF- β .
Dev Comp Immunol. 23: 139-147

Da Silva ER, Castilho TM, Pioker FC, Tomich de LA Paula Silva Ch, Floeter-Winter LM (2002)

Genomic organisation and transcription characterisation of gene encoding *Leishmania* (*Leishmania*) *amazoniensis* arginase and its protein structure prediction.
Int J Parasitol. 32: 727-737

David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, Hillel J (2003)

Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci.
Mol Biol Evol. 20: 1425-1434

Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghori N, Herbomel P, Ramakrishnan L (2002)

Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos.
Immunity 17:693-702

del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andres B, Cardaba B, Lopez-Farre A, Gallardo S, Cortegano I, Vidarte L, Jurado A, Sastre J, Palomino P, Lahoz C (1997)

Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase.
J Immunol. 158: 859-864

DeMartin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E (1987)

Complementary DNA for human glioblastoma-derived T-cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor- β gene family.
EMBO J. 6: 3673-3677

Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT (1996)

C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity.
Science 271: 348-350

Densmore CL, Blazer VS, Cartwright DD, Schill WB, and 6 others (2001)

A comparison of susceptibility to *Myxobolus cerebralis* among strains of rainbow trout and steelhead in field and laboratory trials.
Journal of Aquatic Animal Health 13(3): 220-227

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB; Sporn MB, Goeddel DV (1985)

Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells.

Nature 316: 701-705

Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, Moses HL, Chen EY (1988)

A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3.

EMBO J. 7: 3737-3743

DeWitt DL, El-Harith EA, Smith WL (1989)

Molecular cloning of prostaglandin G/H synthase.

Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 19: 454-457

Diaz A, Chepenik KP, Korn JH, Reginato AM, Jimenez SA (1998)

Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β 1 in human lung fibroblasts.

Exp Cell Res. 241: 222-229

Dinarello CA (1996)

Biologic basics for interleukin-1 in disease.

Blood 87: 2095-2147

Dinarello CA (1997)

Interleukin-1.

Cytokine Growth Factor Rev. 8: 253-265

Dinarello CA (1998)

Interleukin-1 β , interleukin-18, and the interleukin-1 β converting enzyme.

Ann NY Acad Sci. 856: 1-11

Eisenstein TK, Huang D, Meissler JJ Jr, Al-Ramadi B (1994)

Macrophage nitric oxide mediates immunosuppression in infectious inflammation.

Immunobiology 191: 493-502

Ellis AE (1999)

Immunity to bacteria in fish.

Fish Shellfish Immunol. 9(4): 291-308

Ellis AE (2001)

Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.

Dev Comp Immunol. 25(8-9): 827-839

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1989)

Experimental transmission of two *Myxobolus spp.* developing bisporogony via Tubificid worms.

Parasitology Research 75: 461-464

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1991a)

Effect of freezing, aging and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores.

Journal of Aquatic Animal Health 3: 260-262

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1991b)

Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Fumagillin.

Dis Aquat Organ. 10: 109-113

El-Matbouli M, Fischer-Scherl T, Hoffmann RW (1992)

Present knowledge on life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some Myxosporea spp. important for freshwater fish – a review.

Annual Review of Fish Diseases Vol 2: 367-402

El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C (1995)

Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage.

Journal of Fish Biology 46 (6): 919-935

El-Matbouli M (1996)

Biologie und Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 (Myxozoa).

Habilitationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1998)

Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage triactinomyxon in *Tubifex tubifex*.

International Journal of Parasitology 28: 195-217

El-Matbouli M, Holstein T, Hoffmann RW (1998)

Determination of the nuclear DNA-concentration in the cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon-spores, the causative agent of whirling disease.

Parasitology Research 84: 694-699

El-Matbouli M, Hoffmann RW, Schoel H, McDowell TS, Hedrick RP (1999a)

Whirling Disease: Host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Dis Aquat Organ. 35: 1-12

El-Matbouli M, McDowell TS, Antonio DB, Andree KB, Hedrick RP (1999b)

Effect of water temperature on the development, release and survival of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease, in its oligochaete host.

International Journal of Parasitology 29: 627-641

El-Matbouli M, Küppers MP, McDowell TS, Hedrick RP (2002)

Comparative susceptibility of different rainbow trout strains to infection with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease.

Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, Louisiana, USA, September 1-5

El-Matbouli M, Meixner M, Mattes M (2003)

Susceptibility of Hofer strain of rainbow trout to *Myxobolus cerebralis*, *Yersinia ruckeri*, *Tetracapsula bryosalmonae* and VHS virus. Field and laboratory studies. 9th Annual Whirling Disease Symposium, Proceedings 2003: 39-40

El-Matbouli M, Soliman H (2005)

Development of a rapid assay for diagnosis of *Myxobolus cerebralis* in fish and oligochaetes using Loop-mediated isothermal amplification. Journal of Fish Diseases 28 (9): 549-557

El-Matbouli M, Sobottka I, Schumacher U, Schottelius J (2005)

Effect of passage through the gastrointestinal tract of mice on the viability of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa) spores.

Bull Eur Ass Fish Pathol. 25(6): 276-279

Ember JA & Hugli TE (1997)

Complement factors and their receptors. Immunopharmacology 38: 3-15

Endo T, Ogushi F, Stone S (1996)

LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN- γ .

J Immunol. 156: 2240-2246

Engelsma MY, Stet RJM, Schipper H, Verburg-Van Kemenade BM (2001)

Regulation of interleukin-1 β RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. Dev Comp Immunol. 25(3): 195-203

Engelsma MY, Stet RJM, Saeji JP, Verburg-Van Kemenade BM (2003)

Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1beta genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Cytokine 22(1-2): 21-32

Fast MD, Ross NW, Craft CA, Locke SJ, MacKinnon SL, Johnson SC (2004)

Lepeophtheirus salmonis: characterisation of prostaglandin E₂ in secretory products of the salmon louse by RP-HPLC and Mass Spectrometry.

Experimental Parasitology 107: 5-13

Fast MD, Ross NW, Johnson SC (2005)

Prostaglandin E₂ modulation of gene expression in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage-like cell-line (SHK-1).

Dev Comp Immunol. 29: 951-963

Fast MD, Muise DM, Easy RE, Ross NW, Johnson SC (2006)

The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*).

Fish Shellfish Immunol. 21: 228-241

Felskie AK, Anderson PM, Wright PA (1998)

Expression and activity of carbamoyl phosphate synthetase III and ornithine urea cycle enzymes in various tissues of four fish species.

Comp Biochem Physiol B. 119: 355-364

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989)

Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.

J Exp Med 170(6): 2081-2095

Fischer MB, Ma M, Hsu NC, Carroll MC (1998)

Local synthesis of C3 within the splenic lymphoid compartment can reconstitute the impaired immune response in C3-deficient mice.

J Immunol. 160(6): 2619-2625

Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T (2000)

Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A.

Fish Shellfish Immunol. 10: 229-42

Fujita T, Matsushita M, Endo Y (2004)

The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution.

Immunol Rev. 198: 185-202

Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA (1991)

Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression and gene chromosomal assignment.

FASEB J. 5(9): 2304-2312

Ganassin RC & Bols NC (1998)

Development of a monocyte/macrophage-like cell line RTS-11, from rainbow trout spleen.

Fish Shellfish Immunol. 8: 457-76

Garden O (1992)

The myxosporea of fish: a review.

Br Vet J. 148: 223-239

Gasque P (2004)

Complement: A unique innate immune sensor for danger signals.

Mol Immunol. 41: 1089-1098

Gilbert MA & Granath WO Jr (2001)

Persistent infection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease, in *Tubifex tubifex*.

Journal of Parasitology 87: 101-107

Gilbert MA & Granath WO Jr (2002)

The role of *Tubifex tubifex* (Annelida: Oligochaeta: Tubificidae) in the transmission of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae).

In: Whirling Disease: Reviews and current topics, JL Bartholomew and JC Wilson (eds.) American Fisheries Society Symposium 29; Bethesda, Maryland: 79-85

Gilbert MA & Granath WO Jr (2003)

Whirling disease of salmonid fish: life cycle, biology, and disease.

Journal of Parasitology 89(4): 658-667

Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, et al. (2000)

L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis.

Infect Immun. 68: 4653-4657

Goede RW (1986)

Management considerations in stocking of diseased or carrier fish.

In: R II stoud. Ed. Fish Culture in Fisheries Management. American Fisheries Society: 349-355

Gomi K, Zhu FG, Marshall JS (2000)

Prostaglandin E₂ selectively enhances IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism.

J Immunol. 165(1): 6545-6552

Gordon S (2003)

Alternative activation of macrophages.

Nat Rev Immunol. 3: 23-35

Grayson TH, Cooper LF, Wrathmell AB, Roper J, Evenden AJ, Gilpin ML (2002)

Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation.

Immunology 106: 273-283

Griffin B & Davis E (1978)

Myxosoma cerebralis: detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

Journal of the Fisheries Research Board of Canada 35: 1186-1190

Grody WW, Argyle C, Kern RM, Dizikes GJ, Spector EB, Strickland AD, Klein D, Cederbaum SD (1989)

Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia. Enzymatic, pathologic and molecular analysis.

J Clin Invest. 83: 602-609

Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG (1991)

Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages.

Biochem Biophys Res Comm. 178: 823-829

Grosser T, Yusuff S, Cheskis E, Pack Ma, Fitzgerald GA (2002)

Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish.
Proc Natl Acad Sci. USA 99: 8418-8423

Haeffner-Cavaillon N, Cavaillon JM, Laude M, Kazatchkine MD (1987)

C3a (C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes.
J Immunol. 139(3): 794-799

Hallett SL, Atkinson SD, Schoel H, El-Matbouli M (2003)

Characterisation of two novel types of hexactinomyxon spores (Myxozoa) with subsidiary protrusions on their caudal processes.

Dis Aquat Organ. 55: 45-57

Hallett SL, Atkinson SD, Erséus C, El-Matbouli M (2004)

Molecular methods clarify morphometric variation in triactinomyxon spores (Myxozoa) released from different oligochaete hosts.

Systematic Parasitology 57: 1-14

Hallett SL, Atkinson SD, Erséus C, El-Matbouli M (2005)

Dissemination of triactinomyxons (Myxozoa) via oligochaetes used as live food for aquarium fish.

Dis Aquat Organ. 65: 137-152

Hallett SL, Atkinson SD, Erséus C, El-Matbouli M (2006)

Myxozoan parasites disseminated via oligochaetes as live food for aquarium fishes: descriptions of aurantiactinomyxon & raabeia types.

Dis Aquat Organ. 69: 213-225

Halliday MM (1973a)

Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. I. The diagnosis of infection.

Nord Vet Med. 25: 345-348

Halliday MM (1973b)

Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. II. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures.

Nord Vet Med. 25(7): 349-358

Halliday MM (1976)

The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids.

Journal of Fish Biology 9: 339-357

Hardie LJ, Laing KJ, Daniels GD, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1998)

Isolation of the first piscine transforming growth factor- β gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Cytokine 10(8): 555-563

Harms CA, Kennedy-Stoskopf S, Horne WA, Fuller FJ, Tompkins WAF (2000)

Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) transforming growth factor- β (TGF- β), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF- β mRNA of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 10: 61-85

Harms CA, Howard KE, Wolf JC, Smith SA, Kennedy-Stoskopf S (2003)

Transforming growth factor- β response to mycobacterial infection in striped bass *Morone saxatilis* and hybrid tilapia *Oreochromis* spp. Vet Immunol Immunopathol. 95: 155-163

Harris PD, Soleng A, Bakke TA (1998)

Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. Parasitology 117: 137-143

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP (2002)

Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 23: 144-150

Hedrick RP, El-Matbouli M, Adkison M, MacConnell E (1998)

Whirling Disease: Re-emergence among wild trout. Immunological Reviews 166: 365-376

Hedrick RP, McDowell TS, Gay M, Marty GD, Georgiadis MP, MacConnell E (1999a)

Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. Dis Aquat Organ. 37: 173-183

Hedrick RP, McDowell TS, Mukkatira K, Georgiadis MP, MacConnell E (1999b)

Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Journal of Aquatic Animal Health 11: 330-339

Hedrick RP, McDowell TS, Marty GD, Mukkatira K, Antonio DB, Andree KB, Bukhari Z, Clancy T (2000)

Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies. Dis Aquat Organ. 42: 53-59

Hedrick RP, McDowell TS, Mukkatira K, Georgiadis MP, MacConnell E (2001a)

Susceptibility of three species of anadromous salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Journal of Aquatic Animal Health 13: 43-50

Hedrick RP, McDowell TS, Mukkatira K, Georgiadis MP, MacConnell E (2001b)

Salmonids resistant to *Ceratomyxa shasta* are susceptible to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*. Journal of Aquatic Animal Health 13: 35-42

Hedrick RP & El-Matbouli M (2002)

Recent advances with taxonomy, life cycle and development of *Myxobolus cerebralis* in the fish and oligochaete hosts.

American Fisheries Symposium 29: 45-53

Hedrick RP, McDowell TS, Marty GD, Fosgate GT, Mukkatira K, Myklebustk K, El-Matbouli M (2003)

Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling disease) to *Myxobolus cerebralis* infection.

Dis Aquat Organ. 55: 37-44

Herbomel P, Thisse B, Thisse C (1999)

Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo.

Development 126: 3735-3745

Herpin A, Lelong C, Favrel P (2004)

Transforming growth factor- β -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans.

Dev Comp Immunol. 28: 461-485

Herschman HR (1996)

Prostaglandin synthase 2.

Biochim Biophys Acta 1299: 125-140

Hofer B (1903)

Ueber die Drehkrankheit der Regenbogenforelle.

Allg. Fischerei Ztg 28: 7-8

Hoffman GL (1961)

Whirling disease (Myxosporidia: *Myxosoma*) of trout.

US Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Fishery leaflet 508, Washington, DC.

Hoffman GL (1966)

Effects of whirling disease.

The Progressive Fish-Culturist 28: 151

Hoffman GL (1970)

Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with emphasis on whirling disease (*Myxobolus cerebralis*) and its effects on fish.

S.F. Snieszko (ed.). Special publication. Symposium on diseases of Fisheries and Shellfish. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 69-81

Hoffman GL (1974)

Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish.

Trans Am Fish Soc. 103: 541-550

Hoffman GL (1975)

Whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) control with ultraviolet irradiation and effect on fish.

Journal of Wildlife Diseases 11: 505-507

Hoffman GL (1976)

Whirling disease of trout.

US Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Fishery leaflet 47, Washington, DC.

Hoffman GL (1990)

Myxobolus cerebralis, a worldwide cause of salmonid whirling disease.

Journal of Aquatic Animal Health 2: 30-37

Hoffman GL & Dunbar CE (1961)

Studies on *Myxosoma cerebralis* (Hofer) Plehn (Protozoa: Myxosporidia), the cause of whirling disease of trout.

Journal of Parasitology 47: 29

Hoffman GL, Dunbar CE, Bradford A (1962)

Whirling disease of trout caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States.

U.S. Department of Interior Special Scientific Report, Fisheries. No. 427: 15pp

Hoffman GL, Sniesko SF, Wolf K (1968)

Approved procedure for determining absence of viral hemorrhagic septicaemia and whirling disease in certain fish and fish products.

U.S. Department of Interior, Fish Disease Leaflet 9: 7 pp

Hoffman GL & Putz RE (1969)

Host susceptibility and the effect of ageing, freezing, heat, and chemicals on the spores of *Myxosoma cerebralis*.

The Progressive Fish-Culturist 31: 35-37

Hoffman GL & Putz RE (1971)

Effect of freezing and aging on the spores of *Myxosoma cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease.

The Progressive Fish-Culturist 33: 95-98

Hoffman GL & Hoffman GL Jr (1972)

Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): The effects of chemicals on spores *in vitro*, and of calcium-oxide as a disinfectant in simulated ponds.

Journal of Wildlife Diseases 8: 49-53

Hoffman GL & O'Grodnick JJ (1977)

Control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) effects of drying and disinfection with hydrated lime or chlorine.

Journal of Fish Biology 10: 175-179

Hoffmann RW, El-Matbouli M, Hoffmann-Fezer G (1991)

Nachweis von Antikörpern gegen *Myxobolus cerebralis* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*).

Verhandlungsband der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft/Fachgruppe Fischkrankheiten (DVG und EAFP): 135-139

Hoffmann RW & El-Matbouli M (1986)

Interaction between hosts and parasite in whirling disease.

In: Whirling Disease Workshop proceeding: Where do we go from here? Bergersen EP and BA Knopf (ed) Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit: 105-113

Holland JW, Gould CRW, Jones CS, Noble LR, Secombes CJ (2003)

The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD).

Parasitology 126: 95-102

Holland MCH & Lambris JD (2002)

The complement system in teleosts.

Fish Shellfish Immunol. 12: 399-420

Holland MCH & Lambris JD (2004)

A functional C5a anaphylatoxin receptor in a teleost species.

J Immunol. 172(1): 349-355

Hong S, Zou J, Crampe M, Peddie S, Scapigliati G, Secombes CJ (2001)

The production and bioactivity testing of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β .

Vet Immunol Immunopathol. 81: 1-14

Hong S, Peddie S, Campos-Pérez JJ, Zou J, Secombes CJ (2003)

The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 β on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Dev Comp Immunol. 27(9): 801-812

Hong S, Zou J, Collet B, Bols N, Secombes CJ (2004)

Analysis and characterisation of IL-1 β processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Fish Shellfish Immunol. 16: 453-459

Horsch CM (1987)

A case history of whirling disease in a drainage system: Battle Creek drainage of the upper Sacramento River basin, California, USA.

Journal of Fish Diseases 10: 453-460

Huising MO, Stet RJM, Savelkoul HFJ, Verburg-Van Kemenade BML (2004)

The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish.

Dev Comp Immunol. 28: 395-413

Ikemoto M, Tabata M, Miyake T, Kono T, Mori M, Totani M, Murachi T (1990)

Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*. Purification and properties of the product.

Biochem J. 270: 697-703

Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P et al. (2005)

Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease.

Infect Immun. 73: 6085-6090

Inokuma H, Kemp DH, Willadsen P (1994)

Prostaglandin E₂ production by cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen.

Vet Parasitol. 53: 293-299

Jacquier-Sarlin MR, Gabert FM, Villiers MB, Colomb MB (1995)

Modulation of antigen processing and presentation by covalently linked complement C3b fragment.

Immunology 84: 164-170

Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB (1990)

Complementary desoxyribonucleic acid cloning of an mRNA encoding transforming growth factor- β 2 from chicken embryo chondrocytes.

Growth Factors 2: 123-133

Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ (1994)

Effects of transforming growth factor- β ₁ on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity.

Dev Comp Immunol. 18(4): 315-323

Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD (1992)

Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase.

J Biol Chem. 267: 14519-14522

Jarving R, Jarving I, Kurg R, Brash AR, Samel N (2004)

On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterisation of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages.

J Biol Chem. 279: 13624-13633

Jenkins JA & Ourth DD (1993)

Opsonic effect of the alternative complement pathway on channel catfish peripheral blood phagocytes.

Vet Immunol Immunopathol. 39: 447-459

Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD (1996)

Comparative properties of arginases.

Comp Biochem Physiol B. 114: 107-132

Jensen JA, Festa E, Smith DS, Cayer M (1981)

The complement system of the nurse shark: Hemolytic and comparative characteristics.

Science 214: 566-569

Joerink M, Savelkoul HFJ, Wiegertjes GF (2006a)

Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: Structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.).

Molecular Immunology 43: 1116-1128

Joerink M, Forlenza M, Ribeiro CMS; DE Vries BJ, Savelkoul HFJ, Wiegertjes GF (2006b)

Differential macrophage polarisation during parasitic infections in common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Fish Shellfish Immunol. 21(5): 561-571

Johnson AR, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ (1975)

Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a.

Immunology 28: 1067

Jyung RW & Mustoe TA (1993)

Role of cytokines in wound repair.

In: Oppenheim JJ, Rossio JL, Gearing AJH (Eds.), Clinical Applications of Cytokines: Role in Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. Oxford University Press: 307-311

Kallert DM, El-Matbouli M, Haas W (2005)

Polar filament discharge of *Myxobolus cerebralis* actinospores is triggered by combined non-specific mechanical and chemical cues.

Parasitology 131: 609-616

Kato Y, Nakao M, Shimizu M, Wariishi H, Yano T (2004)

Purification and functional assessment of C3a, C4a and C5a of the common carp (*Cyprinus carpio*) complement.

Dev Comp Immunol. 28(9): 901-910

Kelley GO, Adkison MA; Leutenegger CM, Hedrick RP (2003)

Myxobolus cerebralis: identification of a cathepsin Z-like protease gene (*MyxCP-1*) expressed during parasite development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Experimental Parasitology 105(3-4): 201-210

Kelley GO, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Adkison MA, Baxa DV, Hedrick RP (2004a)

Identification of a serine protease gene expressed by *Myxobolus cerebralis* during development in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.

Diseases of Aquatic Organisms 59: 235-248

Kelley GO, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Myklebust KA, Adkison MA, McDowell TS, Marty GD, Kahler AL, Bush AL, Gardner IA, Hedrick RP (2004b)

Evaluation of five diagnostic methods for the detection and quantification of *Myxobolus cerebralis*.

J Vet Diagn Invest. 16: 202-211

Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJ, Longshaw M, Palenzuela O, Siddall ME, Xiao C (2001)

Recent advances in our knowledge of the Myxozoa.

Journal of Eukariotic Microbiology 48: 395-413

Kingsley DM (1994)

The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.

Genes Dev. 8: 133-146

Kishore U, Reid KB (2000)

C1q: Structure, function, and receptors.

Immunopharmacology 49(1-2): 159-170

Knight J & Rowley AF (1995)

Immunoregulatory activities of eicosanoids in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Immunology 85: 389-393

Knowles RG & Moncada S (1994)

Nitric oxide synthases in mammals.

Biochem J. 298: 249-258

Kobsel N & Ramadori G (1994)

Human hepatoma cells synthesize and secrete lysozyme-modulation by cytokines.

Hepatology 19: 1182-1188

Kohl J (2001)

Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases.

Mol Immunol. 38(2-3): 175-187

Komaki G, Arimura A, Koves K (1992)

Effects of intravenous injection of IL-1 β on PGE2 levels in several brain areas as determined by microdialysis.

Am J Physiol. 262: E246-E251

Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB, Melton DA (1990)

Identification of a novel transforming growth factor- β (TGF- β 5) mRNA in *Xenopus laevis*.

J Biol Chem. 265: 1089-1093

Korte JJ, Salo WL, Cabrera VM, Wright PA, Felskie AK, Anderson PM (1997)

Expression of carbamoyl-phosphate synthetase III mRNA during the early stages of development and in muscle of adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

J Biol Chem. 272: 6270-6277

Kullberg BJ & Van der Meer JWM (1995)

Cytokines in the treatment of infectious diseases: Options for the Modulation of host defense.

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Kunz D, Muhl H, Walker G, Pfeilschifter J (1994)

Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells.

In: Proceedings of Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91: 5387-5391

Küppers M (2003)

Untersuchungen verschiedener Regenbogenforellenstämme auf ihre Empfänglichkeit für *Myxobolus cerebralis*, den Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden.
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München

Kuroda N, Naruse K, Shima A, Nonaka M, Sasaki M (2000)

Molecular cloning and linkage analysis of complement C3 and C4 genes of the Japanese medaka fish.
Immunogenetics 51 (2): 117-128

Laing KJ, Grabowski PS, Belosevic M, Secombes CJ (1996)

A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line.
Immunol Cell Biol. 74: 374-379

Laing KJ, Hardie LJ, Aartsen W, Grabowski PS, Secombes CJ (1999)

Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.
Dev Comp Immunol. 23: 71-85

Laing KJ, Cunningham C, Secombes CJ (2000)

Genes for three different isoforms of transforming growth factor-beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA.
Fish Shellfish Immunol. 10(3): 261-271

Lammens M, Decostere A, Haesebrouck F (2000)

Effects of *Flavobacterium psychrophilum* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes.
Dis Aquat Organ. 41: 173-179

LaPatra SE (1996)

The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish.
Annu Rev Fish Dis 6: 15-28

Lawrence DA (1996)

Transforming-growth-factor- β : a general review.
Eur. Cytokine Network 7: 363-374

Lazim MN & Learner MA (1987)

The influence of sediment composition and leaf litter on the distribution on tubificid worms (Oligochaeta).
Oecologia 72: 131-136

Leal-Berumen I, O'Byrne P, Gupta A, Richards CD, Marshall JS (1995)

Prostanoid enhancement of interleukin-6 production by rat peritoneal mast cells.
J Immunol. 154(9): 4759-4767

Lestochova EI (1994)

Influence of small river conditions on the abundance of tubificidae.
Hydrobiologia 278: 129-131

Li J, Peters R, LaPatra S, Vazzana M, Sunyer JO (2004)

Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout phagocytes.

Dev Comp Immunol. 28: 1005-1021

Lindenstrøm T, Buchmann K, Secombes CJ (2003)

Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin.

Fish Shellfish Immunol. 15: 107-115

Lindenstrøm T, Secombes CJ, Buchmann K (2004)

Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections.

Vet. Immunol. Immunopathol. 97: 137-148

Lindenstrøm T, Sigh J, Dalgaard MB, Buchmann K (2006)

Skin-expression of IL-1 β in East Atlantic salmon, *Salmo salar* L., highly susceptible to *Gyrodactylus salaris* infection is enhanced compared to a low susceptibility Baltic stock.

Journal of Fish Diseases 29: 123-128

Lom J (1987)

Myxosporea: a new look at long-known parasites of fish.

Parasitology today 3: 327-332

Lom J & Dykova I (1992)

Protozoan parasites of fishes.

In: Developments in Aquaculture and fisheries science. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, vol. 26: 159-179

Lom J & Hoffman GL (1971)

Morphology of the spores of *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903) and *M. cartilaginis* (Hoffmann, Putz and Dunbar, 1965).

Journal of Parasitology 57(6): 1302-1308

Lorenzen N & LaPatra SE (1999)

Immunity of rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response.

Fish Shellfish Immunol. 9(4): 345-360

Lorenzen N, Olesen NJ, Koch C (1999)

Immunity to VHS virus in rainbow trout.

Aquaculture 172: 41-61

Lotz M & Seth P (1993)

TGF beta and HIV infection.

Ann NY Acad Sci. 685: 501-511

Løvoll M, Kilvik D, Boshra H, Bøgwald J, Sunyer JO, Dalmo RA (2006)

Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Immunogenetics 58(2-3): 168-179

Lowers JM & Bartholomew JL (2003)

Detection of myxozoan parasites in oligochaetes imported as food for ornamental fish.
Journal of Parasitology 89: 84-91

Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM (1992)

Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line.
J Biol Chem. 267: 6370-6374

MacConnell E & Vincent ER (2002)

The Effects of *Myxobolus cerebralis* on the Salmonid Host.
In: Bartholomew J, Wilson C (eds.) Whirling disease: review and current topics. American Fisheries Symposium 29: 95-107

Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bøgwald J, Dalmo DA (2005)

Ontogeny of humoral immune parameters in fish.
Fish Shellfish Immunol. 19: 429-439

Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M (1994)

Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression.
Biochim Biophys Acta 1208: 145-150

Mandok C (1993)

Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporidia) in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*).
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002)

Macrophage polarisation: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.
Trends Immunol. 23: 549-555

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004)

The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarisation.
Trends Immunol. 25: 677-686

Margolis ML, Kent ML, Bustos P (1996)

Diseases of salmonids resembling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America.
Dis Aquat Organ. 25: 33-37

Markiw ME (1986)

Salmonid whirling disease: Dynamics of experimental production of the infective stage – the triactinomyxon spore.
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 43: 521-526

Markiw ME (1989)

Salmonid whirling disease: Myxosporean and actinosporean stages cross-react in direct fluorescent antibody test.
Journal of Fish Diseases 12: 137-141

Markiw ME (1991)

Whirling disease: earliest susceptible age of rainbow trout to the triactinomyxid of *Myxobolus cerebralis*.

Aquaculture 92: 1-6

Markiw ME (1992a)

Experimentally induced whirling disease. I. Dose response of fry and adults of rainbow trout exposed to the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis*.

Journal of Aquatic Animal Health 4: 40-43

Markiw ME (1992b)

Salmonid whirling disease.

US Fish Wildl Serv Fish Will Leaflet. 17: 1-11

Markiw ME & Wolf K (1974a)

Myxosoma cerebralis: isolation and concentration from fish skeletal elements – sequential enzymatic digestion and purification by differential centrifugation.

Journal of the Fisheries Research Board of Canada 31: 15-20

Markiw ME & Wolf K (1974b)

Comparative sensitivity of spore detection methods.

Journal of the Fisheries Research Board of Canada 31: 1597-1600

Markiw ME & Wolf K (1978)

Myxosoma cerebralis: fluorescent antibody techniques for antigen recognition.

Journal of the Fisheries Research Board of Canada 35: 828-832

Markiw ME & Wolf K (1980)

Myxosoma cerebralis: trypsinization of plankton centrifuge harvests increases optical clarity and spore concentration.

Can J Fish Aquat Sci. 37: 2225-2227

Markiw ME & Wolf K (1983)

Myxosoma cerebralis (Myxozoa, Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle.

J Protozool. 30: 561-564

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS (1988)

Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.

Biochemistry 27: 8706-8711

Martin JG, Suzuki M, Maghni K, Pantano R, Ramos-Barbon D, Ihaku D et al. (2002)

The immunomodulatory actions of prostaglandin E₂ on allergic airway responses in the rat.

J Immunol. 169: 3963-3969

Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg-Van Kemenade BML, Kwang J (2002)

Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA.

Fish Shellfish Immunol. 13: 85-95

Matsuyama H, Yano T, Yamakawa T, Nakao M (1992)

Oposonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils.

Fish Shellfish Immunol. 2: 69-78

McCartney-Francis NL & Wahl SM (1994)

Transforming growth factor- β : a matter of life and death.

J Leukocyte Biol. 55: 401-409

McMurty MJ, Rapport DJ, Chua KE (1983)

Substrate selection by tubificid oligochaetes.

Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 40: 1639-1646

Meyers TU, Scala J, Simmons E (1970)

Modes of transmission of whirling disease of trout.

Nature 227: 622-623

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000)

M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm.

Journal of Immunology 164: 6166-6173

Mills CD (2001)

Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue.

Crit Reviews in Imm. 21(5): 399-426

Miyataka K, Gotoh T, Nagasaki A, Takeya M, Ozaki M, Iwase K, Takiguchi M, Iyama KI, Tomita K, Mori M (1998)

Immunohistochemical localization of arginase II and other enzymes of arginine metabolism in rat kidney and liver.

Histochem J. 30: 741-751

Mori M & Gotoh T (2000)

Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes.

Biochem Biophys Res Commun. 275: 715-719

Morimoto T, Iida T, Wakabayashi W (1988)

Chemiluminescence of neutrophils isolated from peripheral blood of eel.

Fish Pathol. 23: 49-53

Morris SM Jr, Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D (1997)

Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression.

Gene 193: 157-161

Morris SM Jr, Kepka-Lenhart D, Chen LC (1998)

Differential regulation of arginases and inducible nitric oxid synthase in murine macrophage cells.

Am J Physiol. 275: E740-E747

Morris DJ, El-Matbouli M, Adam A (2004)

Extensive release of an antigen associated with the sporogonic stages of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa, Myxosporidia) is detected by a heterologous antibody raised to *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa, Malacosporea).
Folia Parasitologica (Praha) 51: 215-220

Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA (1981)

Transforming growth factor production by chemically transformed cells.
Cancer Res. 41: 2842-2848

Muller-Eberhard HJ (1986)

The membrane attack complex of complement.
Annu Rev Immunol. 4: 503-528

Munn CB, Ishiguro EE, Kay WW, Trust TJ (1982)

Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*.
Infection and Immunity 36: 1069-1075

Murray BW, Busby ER, Mommsen TP, Wright PA (2003)

Evolution of glutamine synthetase in vertebrates: multiple glutamine synthetase genes expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
J Exp. Biol. 206: 1511-1521

Nakao M, Mutsuro J, Obo R, Fujiki K, Nonaka M, Yano T (2000)

Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement components C3 from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): Presence of variants lacking the catalytic histidine.
Eur J Immunol. 30 (3): 858-866

Nathan C (1992)

Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
FASEB Journal 6: 3051-3064

Nathan C (1995)

Natural resistance and nitric oxide.
Cell 82: 873-876

Nehring RB & Walker PG (1996)

Whirling disease in the wild: the new reality in the intermountain west.
Fisheries (Bethesda) 21: 28-32

Nehring RB, Thompson KG, Taurman KA, Shuler DL (2002)

Laboratory studies indicating that living brown trout (*Salmo trutta*) expel viable *Myxobolus cerebralis* Myxospores.
American Fisheries Society Symposium 29: 125-134

Nehring RB, Thompson KG, Taurman KA, Adkinson W (2003)

Efficacy of passive sand filtration in reducing exposure of salmonids to the actinospore of *Myxobolus cerebralis*.
Dis Aquat Organ. 57: 77-83

Neumann NF, Fagan D, Belosevic M (1995)

Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages.

Dev Comp Immunol. 19: 473-482

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992)

Molecular cloning and characterisation of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase.

J Clin Invest. 90: 2092-2096

Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A (2004)

Alternatively activated macrophages during parasite infections.

Trends Parasitol. 20: 126-133

Nonaka M, Fujii T, Kaidoh T, Natsuume-Sakai S, Yamaguchi N, Takahashi M (1984)

Purification of lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system.

J Immunol. 133: 3242-3249

Nonaka M (1985)

Evolution of complement system.

Dev Comp Immunol. 9: 377

Nonaka M, Nonaka M, Irie M, Tanabe K, Kaidoh T, Natsuume-Sakai S, Takahashi M (1985)

Identification and characterization of a variant of the third component of complement (C3) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) serum.

J Biol Chem. 260: 809-815

Nonaka M, Takahashi M (1992)

Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins.

J Immunol. 148(10): 3290-3295

Nonaka M (2001)

Evolution of the complement system.

Curr Opin Immunol. 13: 69-73

Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K (1997)

Mechanism of nitric oxide-dependent killing of Mycobacterium bovis BCG in human alveolar macrophages.

Infect Immun. 65(9): 3644-3647

Nuovo GJ (1994)

PCR in situ hybridisation.

Methods Mol Biol. 33: 223-241

Nussler AK & Billiar TR (1993)

Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase.
J Leukocyte Biol. 54: 171-178

O'Banion M, Winn V, Young D (1992)

cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase.
Proc Natl Acad Sci. USA 89: 4888-4892

O'Grodnick J (1975a)

Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge.
Journal of Wildlife Diseases 11 (1): 54-57

O'Grodnick J (1975b)

Egg transmission of whirling disease.
The Progressive Fish-Culturist 37: 153-154

O'Grodnick JJ (1979)

Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*).
Trans Am Fish Soc. 108: 187-190

Olivier G, Eaton CA, Campbell N (1986)

Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*).
Vet Immunol Immunopathol. 12: 223-234

Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K (1991)

Properties of the novel proinflammatory supergene 'intercrine' cytokine family.
Ann Rev Immunol. 9: 617-648

O'Sullivan MG, Chilton FH, Huggins EM Jr, McCall CE (1992)

Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase.
J Biol Chem. 267(21): 14547-14550

Ourth DD & Bachinski LM (1987)

Bacterial sialic acid modulates activation of the alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*).
Dev Comp Immunol. 11: 551-564

Overturf K & LaPatra S (2006)

Quantitative expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus.
J Fish Dis. 29: 215-224

Palladino MA, Morris ME, Starnes HF, Levinson AD (1990)

The transforming growth factor betas. A new family of immunoregulatory molecules.
Ann NY Acad Sci. 593: 181-187

Pangburn MK & Rawal N (2002)

Structure and function of complement C5 convertase and enzymes.
Biochem Soc Trans. 30: 1006-1010

Peddie S, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2001)

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β and derived peptides induce migration of head kidney leukocytes in vitro.
Fish Shellfish Immunol. 11: 697-709

Peddie S, Zou J, Secombes CJ (2002)

A biologically active IL-1 β derived peptide stimulates phagocytosis and bacterial activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) head kidney leucocytes *in vitro*.
J Fish Dis. 25: 351-360

Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J (2000)

Identification and preliminary characterisation of a gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) Interleukin-1 β cDNA.
Dev Comp Immunol. 24 Suppl 1: 64

Pelegrín P, García-Castillo J, Mulero V, Meseguer J (2001)

Interleukin-1 β isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines.
Cytokine 16(2): 67-72

Pelegrín P, Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J (2004)

Production and mechanism of secretion of interleukin-1 β from the marine fish gilthead seabream.
Dev Comp Immunol. 28(3): 229-237

Pleguezuelos O, Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (2000)

Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1 β gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
Immunogenetics 51: 1002-1011

Plehn M (1905)

Über die Drehkrankheit der Salmoniden *Lentospora cerebralis* (Hofer)
Arch Protistenkd. 5: 145-66

Portugal TR & Aksnes A (1983)

Arginase activity in different fish species and tissues.
Comp Biochem Physiol B. 76: 15-16

Pressley ME, Phelan PE III, Witten PE, Mellon MT, Kim CH (2005)

Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish.
Dev Comp Immunol. 29(6): 501-513

Purcell MK, Kurath G, Garver KA, Herwig RP, Winton JR (2004)

Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or vaccination.
Fish Shellfish Immunol. 17: 447-462

Raikova EV (2005)

Cytomorphological characteristics of *Polypodium hydriforme* and problems of myxozoan and cnidarian phylogeny.

Tsitologija 47(10): 933-939

Rebbert ML, Bhatia-Dey N, Dawid IB (1990)

The sequence of TGF- β 2 from *Xenopus laevis*.

Nucleic Acids Res. 18(8): 2185

Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB (1981)

New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor - isolation from non-neoplastic tissues.

Proc Natl Acad Sci. USA 78: 5339-5343

Roberts SB, Langenau DM, Goetz FW (2000)

Cloning and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary.

Mol Cell Endocrinol. 160: 89-97

Rose JD, Marrs GS, Lewis C, Schisler G (2000)

Whirling disease behaviour and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout.

Journal of Aquatic Animal Health 12: 107-118

Ross GD (2000)

Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein.

Crit Rev Immunol. 20(3): 197-222

Rotllant J, Parra D, Peters R, Boshra H, Sunyer JO (2004)

Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: Role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst.

Dev Comp Immunol. 28: 815-828

Rowley AF (1996)

The role of eicosanoids in immune regulation in fish.

In: Stolen JS, Fletcher TC, Bayne CJ, Secombes CJ, Zelikoff JT, Twerdock LE, Anderson DP, editors. Modulators of immune responses: the evolutionary trail. Fair Haven, New Jersey: SOS Publications: 107-118

Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990)

A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence.

EMBO J 9: 1503-1510

Ruscetti FW & Palladino MA (1991)

Transforming growth factor-beta and the immune system.

Prog Growth Factor Res. 3:159-175

Ruscetti FW, Dubois CM, Jacobsen SE, Keller JR (1992)

Transforming growth factor β and interleukin-1, a paradigm for opposing regulation of haemopoiesis.

Baillieres Clin Haematol. 5: 703-721

Ryce EKN (2003)

Factors affecting the resistance of juvenile rainbow trout to whirling disease.

PhD thesis, Montana State University, Bozeman, MT

Ryce EKN, Zale AV, MacConnell E (2004)

Effects of fish age and parasite dose on the development of whirling disease in rainbow trout.

Dis Aquat Organ. 59: 225-233

Ryce EKN, Zale AV, MacConnell E, Nelson M (2005)

Effects of fish age versus size on the development of whirling disease of rainbow trout.

Diseases of Aquatic Organisms 63: 69-76

Saeij JPJ, Stet RJM, Groeneveld A, Verburg-Van Kemenade LBM, van Muiswinkel WB, Wiegertjes GF (2000)

Molecular and functional characterisation of a fish inducible-type nitric oxide synthase.

Immunogenetics 51: 339-346

Saeij JPJ, Van Muiswinkel WB, Groeneveld A, Wiegertjes GF (2002)

Immune modulation by fish kinetoplastid parasites: a role for nitric oxide.

Parasitology 124: 77-86

Saeij JPJ, de Vries BJ, Wiegertjes GF (2003)

The immune response of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation.

Dev Comp Immunol. 27: 859-874

Sakai DK (1981)

Heat inactivation of complements and immune hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia.

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 47: 565-571

Sakai DK (1984)

Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes.

J Fish Biol. 7: 29-38

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P (1993)

Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes.

Proc Natl Acad Sci. USA 90: 7240-7244

Sandor M, Weinstock JV, Wynn TA (2003)

Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses.

Trends Immunol. 24: 44-52

Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, Zou J, Pelegrin P, Falasca C, Prugnloi D, Secombes CJ (2001)

Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 β .

Fish Shellfish Immunol. 11(8): 711-726

Scapigliati G, Buonocore F, Mazzini M (2006)

Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective.

Curr Pharm Des. 12(24): 3071-3081

Schäperclaus W (1931)

Die Drehkrankheit der Forellenzucht und ihre Bekämpfung.

Zeitschrift für Fischerei 29: 521-567

Schäperclaus W (1954)

Fischkrankheiten.

Akademie-Verlag, Berlin

Schäperclaus W (1986)

Fish Diseases volume 2.

Akademie-Verlag, Berlin: 665-666

Schäperclaus W (1991)

Fish diseases, Vol. 2.

Akademie-Verlag, Berlin (translated from German)

Scharsack JP, Steinhagen D, Korting W, Wagner B, Leibold W, Schuberth HJ (2004)

Some immune parameters in carp *Cyprinus carpio* susceptible and resistant to the haemoflagellate *Trypanoplasma borreli*.

Dis Aquat Organ. 60(1): 41-48

Schisler GJ, Bergersen EP (1998)

The effect of electrofishing injury and *Myxobolus cerebralis* infection on fingerling rainbow trout.

Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit. In: Whirling Disease Symposium: Research in Progress 1998: 975-979

Schlegel M, Lom J, Stechmann A, Bernhard D, Leipe D, Dyková I, Sogin ML (1996)

Phylogenetic analysis of complete small unit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa related to the bilateria.

Arch Protistenkd. 147: 1-9

Schoor WP & Plumb JA (1994)

Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*.

Dis Aquat Organ. 19: 153-155

Schott A (2002)

Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fumagillin und TNP-470 im Rahmen der Bekämpfung der Drehkrankheit bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*).

Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU-München

Secombes CJ, Sharp MGJE, Jang SI, Ashton I, Novoa B, Daniels GD, Hardie LJ (1996)
Down-regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage activity by host-derived molecules.

In: Stolen JS, Fletcher TC, Bayne CJ, Secombes CJ, Zelikoff JT, Twerdock LE, Anderson DP, editors. Modulators of immune responses: the evolutionary trail. Fair Haven, New Jersey: SOS Publications: 93-106

Secombes CJ, Zou J, Daniel G, Cunningham C, Koussounadis A, Kemp G (1998)

Rainbow trout cytokines and cytokine receptor genes.

Immunological Reviews 166: 333-340

Sharp GJE, Pike AW, Secombes CJ (1991)

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) leucocyte interactions with metacestode stages of *Diphyllobothrium dentriticum* (Nitzsch, 1824), (Cestoda, Pseudophyllidea).

Fish Shellfish Immunol. 1: 195-211

Shum BP, Guethlein L, Flodin LR, Adkison MA, Hedrick RP, Nehring RB, Stet RJM, Secombes CJ, Parham P (2001)

Models of salmonid MHC class I and II evolution differ from the primate paradigm.

Journal of Immunology 166: 3297-3308

Sidall ME, Martin DS, Bridge D, Desser SS, Cone DK (1995)

The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria.

Journal of Parasitology 81(6): 961-967

Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K (2004a)

The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).

J Fish Dis. 27(7): 409-417

Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K (2004b)

Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*.

Fish Shellfish Immunol. 17: 75-86

Singh RA & Singh SN (1988)

Tissue distribution, effect of starvation and seasonal variation of arginase in the freshwater teleost, *Clarias batrachus* (L.).

Biochem Arch. 4: 329-334

Skirpstunas RT, Hergert JM, Baldwin TJ (2006)

Detection of early stages of *Myxobolus cerebralis* in fin clips from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

J Vet Diagn Invest. 18 (3): 274-277

Smith KA, Lachman LB, Oppenheim JJ, Favata MM (1980)

The functional relationship of the interleukins.

J Exp Med. 151: 1551-1556

Smith LC, Shih CS, Dachenhausen SG (1998)

Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system.

J Immunol. 161: 6784-6793

Smith LC, Azumi K, Nonaka M (1999)

Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways.

Immunopharmacology 42: 107-120

Smith LC, Clow LA, Terwilliger DP (2001)

The ancestral complement system in sea urchins.

Immunol Rev. 180: 16-34

Smith ME, Van der Maesen K, Somera FP (1998)

Macrophages and microglia responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production.

J Neurosci Res. 54: 68-78

Smith SL (1998)

Shark complement: An assessment.

Immunol Rev. 166: 67-78

Smith WL, Garavito MR, DeWitt DL (1996)

Prostaglandin endoperoxidase H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2.

Journal of Biological Chemistry 271(52): 33157-33160

Smothers JF, Von Dohlen CD, Smith LH Jr, Spall RD (1994)

Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans.

Science 265(5179): 1719-1721

Spector EB, Kern RM, Haggerty DF, Cederbaum SD (1985)

Differential expression of multiple forms of arginase in cultured cells.

Mol Cell Biochem. 66: 45-53

Stahl GL, Morse DS, Martin SL (1997)

Eicosanoid production from porcine neutrophils and platelets: differential production with various agonists.

Am J Physiol. 272(6Pt1): C 1821-1828

Steele SL, Chadwick TD, Wright PA (2001)

Ammonia detoxification and localization of urea cycle enzyme activity in embryos of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to early tolerance to high environmental ammonia levels.

J Exp Biol. 204: 2145-2154

Stuehr D & Marletta MA (1985)

Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide.

Proc Natl Acad Sci. USA, Vol. 82: 7738-7742

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon SS, Weise MF, Nathan CF (1991)

Purification and characterisation of cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.

Proc Natl Acad Sci. USA, Vol. 88: 7773-7777

Stevens R, Kerans BL, Lemmon JC, Rasmussen C (2001)

The effects of *Myxobolus cerebralis* myxospore dose on triactinomyxon production, and biology of *Tubifex tubifex* from two geographic regions.

Journal of Parasitology 87(2): 315-321

Sturmbauer C, Opadiya G, Niederstätter H, Riedmann A, Dallinger R (1999)

Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance.

Molecular Biology and Evolution 16: 967-974

Sumathy K, Desai KV, Kondaiah P (1997)

Isolation of transforming growth factor-beta2 cDNA from a fish, *Cyprinus carpio* by RT-PCR.

Gene 191(1): 103-107

Sunyer JO & Tort L (1995)

Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) are affected by the alternative complement pathway.

Vet Immunol Immunopathol. 45: 333-345

Sunyer JO, Zarkadis IK, Sahu A, Lambris JD (1996)

Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators.

Proc Natl Acad Sci. USA 93 (16): 8546-8551

Sunyer JO, Tort L, Lambris JD (1997)

Structural C3 diversity in fish: Characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*.

J Immunol. 158 (6): 2813-2821

Sunyer JO & Lambris JD (1998)

Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates.

Immunol Rev. 166: 39-57

Sunyer JO, Zarkadis IK, Lambris JD (1998)

Complement diversity: A mechanism for generating immune diversity?

Immunol Today 19 (11): 519-523

Sunyer JO & Lambris JD (1999)

Complement. Encyclopedia of life sciences.

New York: MacMillan References Limited 1999

Sunyer JO, Boshra H, Lorenzo G, Parra D, Freedman B, Bosch N (2003)

Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity.

Immunol Res. 27: 549-564

Sunyer JO, Boshra H, Li J (2005)

Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: Insights from the study of fish complement.

Vet Immunol Immunopathol. 108: 77-89

Tafalla C, Coll J, Secombes CJ (2005)

Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection.

Dev Comp Immunol. 29(7): 615-626

Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello CA, Burke JF, Gelfand JA (1996)

A new biologic role for C3a and C3ades Arg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis.

J Immunol. 156(9): 3455-3460

Taub DD (1996)

Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well.

Cytokine Growth Fac Rev. 7: 355-376

Taylor RE & Haber MH (1974)

Opercular cyst formation in trout infected with *Myxosoma cerebralis*.

Journal of Wildlife Diseases 10: 347-351

Taylor RL & Lott M (1978)

Transmission of salmonid whirling disease by birds fed trout infected with *Myxosoma cerebralis*.

Journal of Protozoology 25(1): 105-106

Terjesen BF, Mangor-Jenson A, Fyhn HJ (1998)

Ammonia dynamics in relation to hatching in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)

Fish Physiol Biochem. 18: 189-201

Terjesen BF, Chadwick TD, Verreth JAJ, Rønnestad I, Wright PA (2001)

Pathways for urea production during early life of an air-breathing teleost, the African catfish *Clarias gariepinus* Burchell.

J Exp Biol. 204: 2155-2165

Thoesen JC (1994)

Suggested procedures for the detection and identification of certain fin fish and shell fish pathogens.

American Fisheries Society, Fish Health section, 4th edition, Bethesda, Maryland

Thompson KG, Nehring RB, Bowden DC, Wygant T (1999)

Field exposures of seven species or subspecies of salmonids to *Myxobolus cerebralis* in the Colorado River, Middle Park, Colorado.

Journal of Aquatic Animal Health 11: 312-329

Thompson KG & Nehring RB (2000)

A simple technique used to filter, and quantify the actinospore of *Myxobolus cerebralis* and determine its seasonal abundance in the Colorado River.

Journal of Aquatic Animal Health 12: 316-323

Titus RG, Sherry B, Cerami A (1991)

The involvement of TNF, IL-1, and IL-6 in the immune response to protozoan parasites.

Immunol Today 12: A13-16

Todgham AE, Anderson PM, Wright PA (2001)

Effects of exercise on nitrogen excretion, carbamoyl phosphate synthetase III activity and related urea cycle enzymes in muscle and liver tissues of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 129: 527-539

Turner MW (2003)

The role of mannose-binding lectin in health and disease.

Mol Immunol. 40(7): 423-429

Urioste S, Hall LR, Telford SR III, Titus RG (1994)

Saliva of the lime disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E₂-dependant mechanism.

J Exp Med. 180(3): 1077-1085

Uspenskaia AV & Raikova EV (2001)

Cytological aspects of similarity and difference of Myxozoa and Cnidaria.

Tsitologiya; 43(3): 284-309

VanDesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002)

Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.

Genome Biol 3: research 0034.1-0034.11

Villiers MB, Villiers CL, Jacquier-Sarlin MR, Gabert FM, Journet AM, Colomb MG (1996)

Covalent binding of C3b to tetanus toxin: influence on up-take/internalization of antigen by antigen-specific and non-specific B cells.

Immunology 89(3): 348-355

Vincent ER (1996)

Whirling disease and wild trout: the Montana experience.

Fisheries (Bethesda) 21: 32-34

Vincendeau P, Gobert Ap, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD (2003)

Arginases in parasitic diseases.

Trends Parasitol. 19(1): 9-12

Volf F (1957)

The first cases of whirling disease among our salmonid fish in our hatcheries.

Shornick CSAV, Zivocisna Vyroba 30: 425-428

Wagner EJ, Smith M, Arndt R, Roberts DW (2003)

Physical and chemical effects on viability of the *Myxobolus cerebralis* triactinomyxon.
Dis Aquat Organ. 53(2): 133-42

Wang T, Ward M, Grabowski PS, Secombes CJ (2001)

Molecular cloning, gene organisation and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene.
Biochem J. 358: 747-755

Werner-Felmeyer G, Golderer G, Werner ER, Grobner P, Wachter H (1994)

Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarium polycephalum*.
Biochem J. 304: 105-111

Whaley K & Schwaeble W (1997)

Complement and complement deficiencies.
Semin Liver Dis. 17(4): 297-310

Whipps C, El-Matbouli M, Hedrick RP, Blazer V, Kent M (2004)

Myxobolus cerebralis internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences supported recent spread of the parasite to North America and within Europe.
Dis Aquat Organ. 60: 105-108

Wiegertjes GF & Joerink M (2004)

Macrophage polarization in the immune response to parasites.
Bulletin of European Fish Pathologists 24 (1): 5-10

Williams DM, Grubbs BG, Park-Snyder S, Rank RG, Bonewald LF (1996)

Activation of latent transforming growth factor beta during *Chlamydia trachomatis*-induced murine pneumonia.
Res Microbiol. 147(4): 251-262

Williams RC, Hughes SG, Rumsey GZ (1982)

Use of Ozone in water re-use system for salmonids.
The Progressive Fish-Culturist 44: 102-105

Wolf K (1986)

Salmonid whirling disease: status in the United States, 1985.
Journal of Wildlife Diseases 22: 295-299

Wolf K & Markiw ME (1975)

Serological identification by indirect fluorescent antibody test.
Fish Health 4: 8

Wolf K & Markiw ME (1982)

Myxosoma cerebralis: Inactivation of spores by hot smoking of infected trout.
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39: 926-928

Wolf K & Markiw ME (1984)

Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts.

Science 255: 1449-1452

Wolf K, Markiw ME, Cruz JM, Galhano MH, Eiras J, Herman RL (1981)

Non-myxosporidian blacktail of salmonids.

Journal of Fish Diseases 4: 355-357

Wolf K, Markiw ME, Hiltunen JK (1986)

Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle.

Journal of Fish Diseases 9: 83-85

Woo PT (2003)

Cryptobia (Trypanoplasma) salmositica and salmonis cryptobiosis.

J Fish Dis. 26: 627-646

Wood ER, Berger H Jr, Sherman PA, Lapetine EG (1993)

Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene.

Biochem Biophys Res Commun. 191: 767-774

Wright PA, Felskie A, Anderson PM (1995)

Induction of ornithine-urea cycle enzymes and nitrogen metabolism and excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during early life stages.

J Exp Biol. 198: 127-135

Wright PA, Campbell A, Morgan RL, Rosenberger AG, Murray BW (2004)

Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: Expression of arginase Type I and II genes in rainbow trout: influence of fasting on liver enzyme activity and mRNA levels in juveniles.

J Exp Biol. 207: 2033-2042

Xu W, Charles IG, Liu L, Moncada S, Emson P (1996)

Molecular cloning and structural organisation of the human inducible nitric oxide synthase gene (NOS2).

Biochem Biophys Res Comm. 219: 784-788

Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE (2001)

Structural biology of the alternative pathways convertase.

Immunol Rev. 180: 123-135

Yano T (1996)

The non-specific immune system: humoral defense.

In: Iwama G, Nakanishi T, editors. The fish immune system: organism, pathogen, and environments: 105

Yoder WD (1972)

The spread of *Myxosoma cerebralis* into native trout populations in Michigan.

The Progressive Fish-Culturist 34: 103-106

Yu H, Iyer RK, Kern RM, Rodriguez WI, Grody WW, Cederbaum SD (2001)

Expression of arginase isozymes in mouse brain.
J Neurosci Res. 66: 406-422

Yui Y, Hatori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C (1991)

Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages.
J Biol Chem. 266: 12544-12547

Zarkadis IK, Sarrias MR, Sfyroera G, Sunyer JO, Lambris JD (2001)

Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: A plausible explanation for their functional diversity.
Dev Comp Immunol. 25: 11-24

Zou J, Grabowski Ps, Cunningham C, Secombes CJ (1999a)

Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site.
Cytokine 11: 552-560

Zou J, Cunningham C, Secombes CJ (1999b)

The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin 1 β gene has a different organisation to mammals and undergoes incomplete splicing.
Eur J Biochem 259: 901-908

Zou J, Neumann NF, Holland JW, Belosevic M, Cunningham C, Secombes CJ, Rowley AF (1999c)

Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation.
Biochem J. 340: 153-159

Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, Cunningham C, Secombes C (2000)

Factors influencing the expression of interleukin-1 β in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes.
Dev Comp Immunol. 24(6-7): 575-582

Zrzavy J (2001)

The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum- and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses.
Folia Parasitol. (Praha) 48(2): 81-103

9 Anhang

9.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der real-time RT-PCR Daten

Im Folgenden sind die Daten der Proben von in der Arbeit durchgeführten real-time RT-PCR-Läufen, aus denen die Abbildung 4-9 bis Abbildung 4-15 generiert wurden, aufgeführt. Durch eine Leerzeile voneinander getrennte Ansätze wurden in separaten PCR-Läufen durchgeführt.

Tabelle 9-1 Daten der PCR-Läufe für Arginase-2

identifizier	relative expression of Arginase-2			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I C0d H	2,97	2,59	2,78	0,19
I C0d T	4,81	4,83	4,82	0,01
I 5min H	1	3,34	2,17	1,17
I 5min T	8,12	4,49	6,31	1,82
I 30min H	1,58	2,74	2,16	0,58
I 30min T	17,68	6,63	12,16	5,53
I 1h H	2,21	2,67	2,44	0,23
I 1h T	31,18	10,81	20,99	10,18
I 2h H	3,35	3,74	3,54	0,19
I 2h T	19,39	7,68	13,54	5,86
I 4h H	4	4,28	4,14	0,14
I 4h T	15,2	16,91	16,06	0,85
I 8h H	2,45	2,88	2,67	0,22
I 8h T	12,41	34,31	23,36	10,95
C 24h H	1,24	2,36	1,8	0,56
I 24h H	1,89	1	1,44	0,44
C 24h T	1,51	1,87	1,69	0,18
I 24h T	52,96	49,06	51,01	1,95
C 48h H	1,74	2,24	1,99	0,25
I 48h H	2,48	1,8	2,14	0,34
C 48h T	3,03	1,4	2,22	0,82
I 48h T	12,6	6,87	9,74	2,86
C 4d H	2,22	1,17	1,7	0,53
I 4d H	2,09	2,95	2,52	0,43
C 4d T	3,02	2,74	2,88	0,14
I 4d T	2,03	4,14	3,09	1,06
C 6d H	4,04	4,01	4,03	0,02
I 6d H	4,95	6,08	5,52	0,57
C 6d T	5,88	3,65	4,77	1,11

identifizier	relative expression of Arginase-2			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I 6d T	2,51	4,71	3,61	1,1
C 8d H	2,75	2,36	2,56	0,2
I 8d H	1,71	3,04	2,37	0,66
C 8d T	3,7	5,81	4,76	1,05
I 8d T	3,94	3,67	3,81	0,13
C 20d H	3,99	1,18	2,58	1,41
I 20d H	1	1,44	1,22	0,22
C 20d T	3,09	1,61	2,35	0,74
I 20d T	1,07	1,23	1,15	0,08
C 40d H	3,55	2,02	2,79	0,77
I 40d H	1,4	1	1,2	0,2
C 40d T	4,93	2,1	3,51	1,42
I 40d T	39,02	14,51	26,76	12,26
C 60d H	18,42	10,9	14,66	3,76
I 60d H	1,89	1,38	1,64	0,25
C 60d T	2,54	3,09	2,81	0,27
I 60d T	4,17	2,04	3,11	1,07
C 120d H	10,59	13,62	12,11	1,51
I 120d H	3,51	2,57	3,04	0,47
C 120d T	3,77	1,63	2,7	1,07
I 120d T	2,9	3,73	3,31	0,41
C 200d H	1,92	1,89	1,91	0,01
I 200d H	1,13	1	1,07	0,07
C 200d T	5,22	2,94	4,08	1,14
I 200d T	2,65	2,46	2,55	0,1

Tabelle 9-2 Daten der PCR-Läufe für C3

identifizier	relative expression of C3			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I C0d H	2,47	1,94	2,21	0,27
I C0d T	11,43	1,51	6,47	4,96
I 5min H	1,41	1,89	1,65	0,24
I 5min T	5,38	2,43	3,91	1,47
I 30min H	2,26	2,32	2,29	0,03
I 30min T	5,47	3,61	4,54	0,93
I 1h H	2,14	2,41	2,28	0,13
I 1h T	2,3	1,6	1,95	0,35
I 2h H	2,39	3,16	2,77	0,38
I 2h T	6,29	4,15	5,22	1,07
I 4h H	4,63	3,77	4,2	0,43
I 4h T	1	3,49	2,24	1,24
I 8h H	42,94	3,72	23,33	19,61
I 8h T	1,7	4,54	3,12	1,42

identifizier	relative expression of C3			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
C 24h H	1,64	1,94	1,79	0,15
I 24h H	3,1	1,17	2,13	0,96
C 24h T	3,15	2,25	2,7	0,45
I 24h T	2,7	27,63	15,16	12,47
C 48h H	2,9	1,81	2,35	0,55
I 48h H	1,92	2,02	1,97	0,05
C 48h T	2,38	1,86	2,12	0,26
I 48h T	55	3,01	29	25,99
C 4d H	1	1,62	1,31	0,31
I 4d H	30,7	3,25	16,98	13,73
C 4d T	1,26	1,16	1,21	0,05
I 4d T	12,9	6,51	9,7	3,2
C 6d H	2,73	13,64	8,19	5,46
I 6d H	17,71	5,79	11,75	5,96
C 6d T	2,87	9,19	6,03	3,16
I 6d T	5,23	1,57	3,4	1,83
C 8d H	8,38	5,61	7	1,38
I 8d H	5,13	5,13	5,13	0
C 8d T	7,74	5,3	6,52	1,22
I 8d T	7,3	4,08	5,69	1,61
C 20d H	2,4	1,62	2,01	0,39
I 20d H	1,83	1	1,42	0,42
C 20d T	9,23	4,06	6,64	2,59
I 20d T	1,84	2,56	2,2	0,36
C 40d H	7,62	2,85	5,24	2,38
I 40d H	21,57	4,08	12,82	8,75
C 40d T	8,55	13,01	10,78	2,23
I 40d T	3,91	3,59	3,75	0,16
C 60d H	1	2,53	1,76	0,76
I 60d H	1,29	2,5	1,9	0,61
C 60d T	2,63	2,41	2,52	0,11
I 60d T	3,19	3,53	3,36	0,17
C 120d H	1,41	7,67	4,54	3,13
I 120d H	13,48	11,48	12,48	1
C 120d T	5,61	9,34	7,48	1,87
I 120d T	16,18	1	8,59	7,59
C 200d H	2,12	5,07	3,6	1,47
I 200d H	2,8	8,1	5,45	2,65
C 200d T	3,81	3,45	3,63	0,18
I 200d T	4,74	2,5	3,62	1,12

Tabelle 9-3 Daten der PCR-Läufe für COX-2

identifizier	relative expression of COX-2			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I C0d H	1,25	1,6	1,43	0,17
I C0d T	3,31	2,26	2,79	0,53
I 5min H	1,98	1,78	1,88	0,1
I 5min T	35,11	43,23	39,17	4,06
I 30min H	4,65	12,95	8,8	4,15
I 30min T	23,67	13,19	18,43	5,24
I 1h H	26,23	14,82	20,53	5,7
I 1h T	23,49	31,92	27,7	4,21
I 2h H	4,97	5,57	5,27	0,3
I 2h T	22,1	6,38	14,24	7,86
I 4h H	1,03	1,18	1,11	0,08
I 4h T	5,67	6,34	6	0,34
I 8h H	1,28	1	1,14	0,14
I 8h T	4,31	4,93	4,62	0,31
C 24h H	1	1,11	1,06	0,06
I 24h H	1,91	2,74	2,33	0,42
C 24h T	1,52	1,48	1,5	0,02
I 24h T	3,04	2,46	2,75	0,29
C 48h H	2,45	1,94	2,2	0,25
I 48h H	2,14	1,88	2,01	0,13
C 48h T	4,8	3,66	4,23	0,57
I 48h T	2,4	3,32	2,86	0,46
C 4d H	5,84	2,3	4,07	1,77
I 4d H	5,72	4,27	5	0,72
C 4d T	2,82	2,51	2,66	0,16
I 4d T	6,02	5,52	5,77	0,25
C 6d H	4,79	2,71	3,75	1,04
I 6d H	5,1	6,55	5,83	0,73
C 6d T	9,45	10,52	9,99	0,53
I 6d T	6,24	11,65	8,94	2,7
C 8d H	19,3	8,9	14,1	5,2
I 8d H	1,52	1,86	1,69	0,17
C 8d T	1,99	2,27	2,13	0,14
I 8d T	3,59	2,59	3,09	0,5
C 20d H	16,22	3,37	9,79	6,43
I 20d H	1,17	1	1,08	0,08
C 20d T	5,92	2,66	4,29	1,63
I 20d T	1,44	6,62	4,03	2,59
C 40d H	5,17	3,75	4,46	0,71
I 40d H	4,82	4,39	4,61	0,22
C 40d T	1,28	2,5	1,89	0,61
I 40d T	1,14	1	1,07	0,07

identifizier	relative expression of COX-2			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
C 60d H	5,25	4,63	4,94	0,31
I 60d H	3	6,03	4,52	1,51
C 60d T	3,12	2,18	2,65	0,47
I 60d T	1,71	1,32	1,51	0,2
C 120d H	4,94	2,24	3,59	1,35
I 120d H	12,95	12,18	12,56	0,38
C 120d T	1,91	1	1,45	0,45
I 120d T	2,56	3,05	2,81	0,25
C 200d H	3,4	2,39	2,89	0,51
I 200d H	1,64	4,6	3,12	1,48
C 200d T	1,24	1,46	1,35	0,11
I 200d T	4,97	5,18	5,08	0,1

Tabelle 9-4 Daten der PCR-Läufe für IL-1 β 1

identifizier	relative expression of IL-1 β 1			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I C0d H	1	1,61	1,31	0,31
I C0d T	3,47	1,61	2,54	0,93
I 5min H	1,88	2,41	2,15	0,27
I 5min T	9,41	19,73	14,57	5,16
I 30min H	2,85	6,52	4,69	1,83
I 30min T	11,78	7,54	9,66	2,12
I 1h H	8,88	9,76	9,32	0,44
I 1h T	22,75	13,1	17,92	4,83
I 2h H	7,73	6,49	7,11	0,62
I 2h T	11,41	8,38	9,89	1,51
I 4h H	5,96	3,76	4,86	1,1
I 4h T	10,35	33,06	21,7	11,35
I 8h H	1,33	2,2	1,76	0,44
I 8h T	22,51	13,45	17,98	4,53
C 24h H	1	1,53	1,26	0,26
I 24h H	3,42	1,52	2,47	0,95
C 24h T	1,46	2,38	1,92	0,46
I 24h T	3,41	4,35	3,88	0,47
C 48h H	1,71	2,16	1,93	0,22
I 48h H	5,04	4,28	4,66	0,38
C 48h T	5,2	4,27	4,74	0,46
I 48h T	6,6	13,23	9,91	3,31
C 4d H	3,82	1,16	2,49	1,33
I 4d H	2,89	2,17	2,53	0,36
C 4d T	1,35	1,7	1,53	0,18
I 4d T	20,84	11,11	15,97	4,86
C 6d H	3,15	2,81	2,98	0,17

identifizier	relative expression of IL-1 β 1			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I 6d H	1,85	1,87	1,86	0,01
C 6d T	5,39	9,51	7,45	2,06
I 6d T	5,99	5,72	5,85	0,14
C 8d H	5,31	9,17	7,24	1,93
I 8d H	2,56	2,69	2,62	0,06
C 8d T	2,81	1,51	2,16	0,65
I 8d T	3,17	2,84	3	0,16
C 20d H	4,31	1,31	2,81	1,5
I 20d H	1	1,34	1,17	0,17
C 20d T	7,08	1,84	4,46	2,62
I 20d T	1,38	10,81	6,09	4,72
C 40d H	1,67	3,29	2,48	0,81
I 40d H	3,16	6,81	4,98	1,82
C 40d T	1,57	3,05	2,31	0,74
I 40d T	1,79	1	1,4	0,4
C 60d H	29,65	19,32	24,49	5,16
I 60d H	2,64	3,03	2,83	0,19
C 60d T	3,5	4,8	4,15	0,65
I 60d T	1,03	1,02	1,02	0
C 120d H	2,99	2,26	2,62	0,36
I 120d H	3,18	1,91	2,55	0,64
C 120d T	6,64	1,08	3,86	2,78
I 120d T	1	2,84	1,92	0,92
C 200d H	1,41	1,95	1,68	0,27
I 200d H	1,73	1,12	1,43	0,3
C 200d T	2,09	5,35	3,72	1,63
I 200d T	1,4	2,34	1,87	0,47

Tabelle 9-5 Daten der PCR-Läufe für IL-1 β 2

identifizier	relative expression of IL-1 β 2			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
IC0d H	1,8	3,44	2,62	0,82
I C0d T	2,21	3,17	2,69	0,48
I 5min H	11,62	5,41	8,52	3,11
I 5min T	23,43	26,72	25,08	1,65
I 30min H	8,44	28,58	18,51	10,07
I 30min T	31,2	143,62	87,41	56,21
I 1h H	114,19	13,39	63,79	50,4
I 1h T	59,77	37,43	48,6	11,17
I 2h H	6,13	17,42	11,77	5,65
I 2h T	96,85	55,15	76	20,85
I 4h H	8,38	3,13	5,76	2,63
I 4h T	16,45	12,43	14,44	2,01
I 8h H	1,52	1	1,26	0,26
I 8h T	11,83	13,22	12,52	0,69

identifier	relative expression of IL-1 β 2			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
C 24h H	1	1,42	1,21	0,21
I 24h H	12,87	5,45	9,16	3,71
C 24h T	1,47	2,43	1,95	0,48
I 24h T	30,8	18,89	24,84	5,95
C 48h H	5,52	6,13	5,83	0,3
I 48h H	33,18	27,29	30,24	2,95
C 48h T	48,71	14,29	31,5	17,21
I 48h T	36,09	75,99	56,04	19,95
C 4d H	13,86	15,76	14,81	0,95
I 4d H	32,18	21,55	26,86	5,32
C 4d T	7,28	3,16	5,22	2,06
I 4d T	78,35	75,74	77,05	1,3
C 6d H	2,23	2,9	2,56	0,34
I 6d H	5,48	14,32	9,9	4,42
C 6d T	5,44	4,3	4,87	0,57
I 6d T	6,21	2,4	4,3	1,9
C 8d H	5,86	12,64	9,25	3,39
I 8d H	11,13	6,76	8,94	2,19
C 8d T	2,5	1,85	2,17	0,33
I 8d T	3,67	1	2,34	1,34
C 20d H	3,24	4,09	3,67	0,42
I 20d H	8,28	2,28	5,28	3
C 20d T	6,29	1,52	3,91	2,39
I 20d T	1,21	1,64	1,43	0,21
C 40d H	14,27	7,25	10,76	3,51
I 40d H	5,26	6,32	5,79	0,53
C 40d T	1	1,71	1,36	0,36
I 40d T	1,4	1,35	1,38	0,02
C 60d H	5,25	13,62	9,43	4,19
I 60d H	3,2	3,24	3,22	0,02
C 60d T	2,66	2,83	2,74	0,09
I 60d T	2,16	2,74	2,45	0,29
C 120d H	1,1	1	1,05	0,05
I 120d H	2,86	5,33	4,1	1,24
C 120d T	2,01	2,11	2,06	0,05
I 120d T	2,74	3,02	2,88	0,14
C 200d H	1,52	2,87	2,2	0,67
I 200d H	1,68	3,38	2,53	0,85
C 200d T	2,08	1,92	2	0,08
I 200d T	5,56	2,64	4,1	1,46

Tabelle 9-6 Daten der PCR-Läufe für iNOS

identifizier	relative expression of iNOS			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I C0d H	2,69	2,75	2,72	0,03
I C0d T	7,33	5,44	6,39	0,95
I 5min H	1,06	3,34	2,2	1,14
I 5min T	2,89	6,59	4,74	1,85
I 30min H	3,79	6,53	5,16	1,37
I 30min T	10,71	5,39	8,05	2,66
I 1h H	9,36	5,68	7,52	1,84
I 1h T	2,61	1,07	1,84	0,77
I 2h H	3,51	22,93	13,22	9,71
I 2h T	3,38	4,65	4,02	0,64
I 4h H	3,04	6,45	4,74	1,71
I 4h T	2,31	10,58	6,45	4,13
I 8h H	1,38	1	1,19	0,19
I 8h T	9,97	3,97	6,97	3
C 24h H	9,06	6,93	8	1,07
I 24h H	9,05	3,8	6,42	2,63
C 24h T	30,31	5,98	18,14	12,16
I 24h T	10,98	7,12	9,05	1,93
C 48h H	4,08	5,24	4,66	0,58
I 48h H	49,4	27,1	38,25	11,15
C 48h T	93,47	42,5	67,99	25,49
I 48h T	16,02	60,6	38,31	22,29
C 4d H	4,03	1,6	2,81	1,22
I 4d H	2,75	1	1,88	0,88
C 4d T	9,27	8,05	8,66	0,61
I 4d T	2104,07	767,69	1.435,88	668,19
C 6d H	3,61	1,53	2,57	1,04
I 6d H	4,96	3,77	4,36	0,6
C 6d T	6,79	4,71	5,75	1,04
I 6d T	316,97	647,94	482,46	165,48
C 8d H	2,46	2,01	2,24	0,23
I 8d H	24,69	2,9	13,8	10,89
C 8d T	2	1,33	1,66	0,33
I 8d T	57,23	18,6	37,91	19,31
C 20d H	3,59	1	2,3	1,3
I 20d H	2,46	26,84	14,65	12,19
C 20d T	91,62	12,54	52,08	39,54
I 20d T	71,53	50,95	61,24	10,29
C 40d H	5,15	9,66	7,4	2,25
I 40d H	112,14	38,31	75,22	36,92
C 40d T	6,9	43	24,95	18,05

identifizier	relative expression of iNOS			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I 40d T	3	1	2	1
C 60d H	1403,94	602,07	1.003,00	400,93
I 60d H	44,93	60,28	52,61	7,68
C 60d T	17,45	9,25	13,35	4,1
I 60d T	7,06	12,34	9,7	2,64
C 120d H	4,31	2,94	3,62	0,68
I 120d H	1,1	4,29	2,69	1,6
C 120d T	8,25	1,66	4,95	3,3
I 120d T	6,18	20,03	13,1	6,93
C 200d H	2,5	3,23	2,87	0,37
I 200d H	1	1	1	0
C 200d T	147,35	52,58	99,96	47,39
I 200d T	2,52	3,52	3,02	0,5

Tabelle 9-7 Daten der PCR-Läufe für TGF- β

identifizier	relative expression of TGF- β			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
I C0d H	1,1	4,18	2,64	1,54
I C0d T	3,3	2,42	2,86	0,44
I 5min H	3,11	2,16	2,63	0,47
I 5min T	1,75	1,54	1,65	0,11
I 30min H	4,35	4,96	4,65	0,31
I 30min T	2,11	1,15	1,63	0,48
I 1h H	3,08	3,97	3,52	0,44
I 1h T	1,59	2,05	1,82	0,23
I 2h H	3,56	4,4	3,98	0,42
I 2h T	2,38	2,27	2,33	0,06
I 4h H	1,35	1	1,17	0,17
I 4h T	1,82	2,23	2,02	0,2
I 8h H	2,98	3,01	2,99	0,01
I 8h T	2,82	2,07	2,45	0,37
C 24h H	2,8	3,61	3,2	0,41
I 24h H	4,42	2,32	3,37	1,05
C 24h T	3,6	1,74	2,67	0,93
I 24h T	1,19	2,02	1,6	0,42
C 48h H	2,6	2,37	2,48	0,11
I 48h H	6,27	5,89	6,08	0,19
C 48h T	3,11	2,19	2,65	0,46
I 48h T	2,19	2,1	2,15	0,04
C 4d H	1,5	1,53	1,51	0,02
I 4d H	3,83	3,41	3,62	0,21
C 4d T	1,39	1	1,2	0,2
I 4d T	4,26	6,85	5,55	1,3

identifier	relative expression of TGF- β			
	fish 1	fish 2	mean value	SD
C 6d H	7,37	3,35	5,36	2,01
I 6d H	6,98	6,82	6,9	0,08
C 6d T	3,18	2,91	3,04	0,13
I 6d T	4,72	7,37	6,05	1,32
C 8d H	3,49	4,18	3,84	0,34
I 8d H	8,61	8,65	8,63	0,02
C 8d T	2,5	1	1,75	0,75
I 8d T	5,47	8,85	7,16	1,69
C 20d H	6,3	2,4	4,35	1,95
I 20d H	9,1	6,03	7,56	1,53
C 20d T	6,31	3,09	4,7	1,61
I 20d T	4,61	6,32	5,47	0,86
C 40d H	2,4	6,44	4,42	2,02
I 40d H	2,56	3,88	3,22	0,66
C 40d T	1,36	1,21	1,29	0,07
I 40d T	1	2,8	1,9	0,9
C 60d H	1,47	2,54	2,01	0,54
I 60d H	2,08	3,44	2,76	0,68
C 60d T	3,79	3,58	3,69	0,11
I 60d T	2,39	2,89	2,64	0,25
C 120d H	3,1	1	2,05	1,05
I 120d H	3,38	2,43	2,91	0,47
C 120d T	2,37	1,74	2,05	0,31
I 120d T	3,55	1,94	2,75	0,81
C 200d H	1,74	1,12	1,43	0,31
I 200d H	2,61	1,46	2,04	0,57
C 200d T	1,77	1,55	1,66	0,11
I 200d T	2,96	1,7	2,33	0,63

9.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AGD	Amoebic Gill Disease
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>A. salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
B	Komplementfaktor B
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Cx	Komplementfaktor x (x = 1..9)
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
<i>C. carpio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cm	Zentimeter
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CR1	Komplementrezeptor 1
CR3	Komplementrezeptor 3
d	Tag/e
D	Komplementfaktor D
°dH	Wasserhärte
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	epitheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
et al.	et alii
g	Gramm
<i>G. derjavini</i>	<i>Gyrodactylus derjavini</i>
<i>G. salaris</i>	<i>Gyrodactylus salaris</i>
h	Stunde/n
H ₂ O	Wasser
HE	Hämatoxilin/Eosin-Färbung
ICE	Interleukin-1-converting-Enzym
IFN-γ	Interferon-gamma
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHN	Infektiöse Hämatopoetische Nekrose
IL-1β	Interleukin-1β
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8

<i>I. multifiliis</i>	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPN	Infektiöse Pankreasnekrose
ISH	<i>In Situ</i> Hybridisation
ITS-Region	Interne transkribierte Spacer-Region
km	Kilometer
kDa	kiloDalton
l	Liter
LAK	Lymphokine Activated Killer (cell)
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
MAC	Membranangreifender Komplex
MAF	Makrophagen-aktivierender Faktor
MASP	MLB-assoziierte Serinprotease
<i>M. cerebralis</i>	<i>Myxobolus cerebralis</i>
<i>M. chrysops</i>	<i>Morone chrysops</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute/n
ml	Milliliter
MLB	Mannan-bindendes Lektin
mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA
µm	Mikrometer
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCBI	National Centre of Biotechnology Information
NK	Natural Killer (cell)
NK-κB	Nuclear Factor kappa B
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	reaktives Stickstoffoxid
NOHA	Nw-hydroxy-L-Arginin
km	Kilometer
<i>O. clarki</i>	<i>Oncorhynchus clarki</i>
<i>O. mykiss</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>O. keta</i>	<i>Oncorhynchus keta</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
p.exp.	post expositionem
pmol	picomol
PUEF-8	Particle-Uptake Enhancing Fraction
RFU	Relative Fluorescence Units
rIL-1β	rekombinantes IL-1β
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
<i>S. confluentus</i>	<i>Salvelinus confluentus</i>
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde/n
SPF	Spezifisch Pathogen Frei

spp.	Spezies (plural)
<i>S. salar</i>	<i>Salmo salar</i>
TAM	Triactinomyxon
<i>T. borreli</i>	<i>Trypanoplasma borreli</i>
<i>T. bryosalmonae</i>	<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>
<i>T. carassii</i>	<i>Trypanosoma carassii</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
<i>T. tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>
UTR	Untranslated Regions
UV	Ultraviolett
VHS	Virale Hämorrhagische Septikämie
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -d-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mansour El-Matbouli für die Anregung zu diesem interessanten Thema, für die fachliche Betreuung und die Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel danke ich für die wertvollen Hinweise und Diskussionen, mit denen er mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt hat.

Herrn PD Dr. Herbert Kaltner danke ich für seine fachliche Hilfe.

Herrn Dr. Hatem Soliman danke ich ganz herzlich für die intensive Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Christine Kühnhauser-Vogt möchte ich mich für die Einarbeitung in die histologischen Arbeitsmethoden bedanken.

Bei den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe - Christoph Dörfler, Ute Rucker, Daniel Grabner, Hamed Coulibaly, Amine Oucible, M'hamed Oumouna, Nina Seel, Simone Keller, Dr. Martin Knaus, Dr. Edit Eszterbauer und Dr. Dennis Kallert - bedanke ich mich für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die immer liebevolle Unterstützung über all die Jahre hinweg.

Stefan Schönauer, der mir in ruhigen Zeiten Antrieb gab und in hektischen Zeiten immer für mich da war, danke ich besonders herzlich. Auch für die Hilfe beim Layout vielen, vielen Dank!

Curriculum Vitae

- 1978 geboren am 10. Juli in Aachen als Tochter des Dr.rer.nat. Dirk J.E. Severin und Frau Carmen Severin, geb. Schrader.
- 1984 im September Einschulung Volksschule Grünwald
ab November 1985 Volksschule Münsing
- 1988 ab September Besuch des Gymnasiums Starnberg,
neusprachlicher Zweig
- 1997 Abitur am Gymnasium Starnberg
- 1997 Wintersemester, Aufnahme des Studiums der
Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München.
- 2001 1. Staatsexamen Veterinärmedizin,
- 2002 2. Staatsexamen Veterinärmedizin,
- 2004 3. Staatsexamen Veterinärmedizin
- 2004 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für
Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München (heute Klinik für Fische und
Reptilien) zur Erlangung des akademischen Grades
Dr.med.vet.
- 2004 im März Erteilung der Approbation
- 2007 seit Januar als wissenschaftliche Mitarbeiterin (DFG)
am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und
Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(heute Klinik für Fische und Reptilien) angestellt.