

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie der

Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. A. Hörauf

**Molekulare Phylogenie der Malariaerreger (Haemosporida) unter  
besonderer Berücksichtigung des Vogelmalariaerregers  
*Plasmodium (Haemamoeba) cathemerium*, sowie Untersuchungen  
zum Vorkommen der Vogelmalaria in Deutschland**

**Dissertation**

zur

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

der

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

**Sandra Carolin Wiersch**

aus

Dinslaken

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. W. A. Maier

**2. Gutachter:** Prof. Dr. J.-W. Wägele

Tag der Prüfung: 13.04.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr 2006

## **Meinen Eltern**



**Inhalt**

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Die aktuelle Situation der Malaria des Menschen	1
1.2 Besonderheiten und Evolution von <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.3 Der Befall von Vögeln durch Haemosporina	4
1.4 Phylogenie der Malariaerreger	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit	9
<b>2 Material und Methoden</b>	11
2.1. Haemosporina, die für die molekulare Phylogenie zur Verfügung standen	11
2.2 Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus Vögeln	11
2.2.1 Freilebende, einheimische Vögel	11
2.2.2 Zoovögel	13
2.2.3 Kontrollen	13
2.3 Auswahl der untersuchten Gene	13
2.4 Kontinuierliche <i>P. falciparum</i> -Kultur	14
2.5 DNA-Gewinnung	14
2.5.1 DNA-Extraktion aus parasitiertem Kulturmedium, Patienten- und Mäuseblut	14
2.5.2 DNA-Extraktion aus dem Blut der gefangenen Vögel	15
2.5.3 DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten	15
2.6 DNA-Amplifikation	16
2.6.1 Amplifikation der spezifischen Gensequenzen für die molekulare Phylogenie	16
2.6.2 PCR zur Ermittlung der Infektionsprävalenzen einheimischer Vögel	19
2.6.3 PCR zur Ermittlung des Erregerspektrums einheimischer Vögel mit Malariaparasiten	21

2.6.4 Unspezifische DNA-Präamplifikation	23
2.7 Agarose-Gelelektrophorese und Färbung der Gele	24
2.8 DNA-Elution	24
2.9 DNA-Sequenzierung	25
2.10 Phylogenetische Analyse	26
2.10.1 Sequenz-Alignment	26
2.10.2 Maximum-Parsimonie	29
2.10.3 Maximum Likelihood	30
2.10.4. Baye'ssche Analyse	31
2.10.5 Analyse der Sekundärstruktur der 18 SSU rRNA	32
2.10.6 Graphische Darstellung der phylogenetischen Stammbäume	35
2.11 Lichtmikroskopische Untersuchungen	35
2.11.1 Vogelblut-Ausstriche	35
2.11.2 Anfertigung von Paraffinschnitten	36
2.12 Statistische Auswertungen	37
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1 Infektionsprävalenzen und Erregerspektrum bei den niedersächsischen Vogelpopulationen	38
3.1.1 Infektionsprävalenzen einheimischer Vögel mit Malariaparasiten	38
3.1.2. Erregerspektrum einheimischer Vögel mit Haemosporina	40
3.1.2.1 Erregerspektrum bei den Tannenmeisen	41
3.1.2.2 Erregerspektrum bei den Trauerschnäppern	43
3.1.2.3. Erregerspektrum bei den Kohlmeisen	45
3.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Vögel auf Malariaparasiten	46
3.2 Untersuchungen an Zoovögeln	47

3.2.1 Vorkommen der Vogelmalaria in heimischen Zoos und Tierparks	47
3.2.2 Untersuchung der Organproben des Brillenpinguins	47
3.2.3 Untersuchung der Organproben des Balistars	48
3.3 Sequenzierung einzelner Gene der Malariaerreger <i>P. cathemerium</i> , <i>P. y. yoelii</i> , <i>P. chabaudi</i> und <i>P. ovale</i>	49
3.4 Molekulare Phylogenie	54
3.4.1 Phylogenetischer Stammbaum des ClpC-Gens	54
3.4.2 Phylogenetischer Stammbaum des cyt b-Gens	55
3.4.3 Phylogenetischer Stammbaum des 18 SSU rRNA-Gens	58
<b>4 Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1 Entdeckung der Vogelmalariaerreger	60
4.2 Entwicklung der Vogelmalariaerreger und ihre Auswirkungen auf den Wirt	60
4.3 Nachweis der Vogelmalariaerreger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden	64
4.4 Infektionsprävalenzen heimischer Vögel mit Malariaerregern	67
4.5 Identifizierung der Malariaparasiten	68
4.5.1 Problematik der Speziesdifferenzierung nach morphologischen Gesichtspunkten	68
4.5.2 Unterstützung der Speziesidentifizierung durch DNA-Sequenzanalyse	69
4.5.3 Problematik der Speziesdifferenzierung aufgrund von DNA-Sequenzen	70
4.6 Auswirkungen allochthoner Malariaerreger auf die Avifauna	71
4.7 Erregerspektrum bei den niedersächsischen Vögeln	72
4.7.1 Tannenmeisen	72
4.7.2 Trauerschnäpper	73
4.7.3 Kohlmeisen	74
4.8 Lichtmikroskopische Einordnung des Malariaerregers aus dem Blut der Tannenmeise	74

4.9 Untersuchung der Zoovögel auf Haemosporina	76
4.10 Molekulare Systematik	79
4.10.1 Theorien über die Abstammung von <i>P. falciparum</i>	83
4.10.2 Überblick über vorangegangene phylogenetische Untersuchungen an Malariaerregern	86
4.10.3 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des 18 SSU rRNA-Gens	88
4.10.4 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des 30 SSU rRNA-Gens	91
4.10.5 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des Circumsporoziten-Gens	91
4.10.6 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des cyt b-Gens	92
4.10.7 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des ClpC-Gens	94
4.10.8 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des Adenylsuccinatlyase-Gens	94
4.11 Erstellung phylogenetischer Stammbäume unter Einbeziehung der neu vorgestellten Sequenzen	95
4.11.1 DNA-Sequenzen von <i>P. cathemerium</i> , <i>P. y. yoelii</i> , <i>P. chabaudi</i> und <i>P. ovale</i>	96
4.11.2 Auf der Analyse des ClpC-Gens basierender Stammbaum der Malariaerreger	97
4.11.3 Auf der Analyse des cyt b-Gens basierender Stammbaum der Malariaerreger	98
4.11.4 Auf der Analyse des 18 SSU rRNA-Gens basierender Stammbaum der Malariaerreger	99
4.12 Resümee	100
<b>5 Zusammenfassung</b>	102
<b>6 Literatur</b>	104
<b>7 Publikationen</b>	127
<b>8 Anhang</b>	128

# 1 Einleitung

## 1.1 Die aktuelle Situation der Malaria des Menschen

Die Malaria ist nach wie vor eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten des Menschen. Die vier humanpathogenen Erreger der Gattung *Plasmodium* (Apicomplexa: Plasmodiidae), *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*, sind heutzutage über weite Gebiete der Tropen und Subtropen verbreitet. Ungefähr 40 % der Weltbevölkerung lebt in Malaria-gefährdeten Gebieten, in denen zusammen 300 bis 500 Millionen Krankheitsfälle pro Jahr auftreten. Die Zahl der Todesfälle, die fast ausschließlich durch *P. falciparum*, den Erreger der Malaria tropica, verursacht werden, wird auf über eine Million jährlich geschätzt (WHO 2000). Man geht sogar davon aus, dass die Zahl der jährlichen Neuinfektionen und der Todesfälle in nächster Zeit zunehmen wird, zumal sich die Bevölkerung in einigen Malariagebieten in den letzten zwei Jahrzehnten verdoppelt hat (Greenwood und Mutabingwa 2002).

Zwar existieren verschiedene Medikamente, die zur Malariaprophylaxe und -therapie eingesetzt werden können, doch traten in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend häufig und immer schneller resistente Erregerstämme auf (Mu et al. 2003). Dies war vor allem in Südostasien und in Afrika zu beobachten. Doch auch die Stechmücken, als Überträger der Malariaparasiten, haben in West- und Südafrika zunehmend Resistenzen gegen Insektizide (z.B. Pyrethroide) entwickelt und sind somit schlechter zu bekämpfen (Greenwood und Mutabingwa 2002). Des Weiteren ist es bis heute nicht gelungen, einen Malariainpfstoff zu entwickeln, der es erlauben würde, die exponierte Bevölkerung vollständig durch immunisieren (Wang et al. 2003). In vielen der betroffenen Ländern führen Bürgerkriege dazu, dass die öffentliche Gesundheitsversorgung nicht mehr gewährleistet ist und Malaria-Bekämpfungsprogramme eingestellt werden müssen. Auch die globale Erwärmung (Vektoren dringen in Gebiete vor, in denen sie vorher aus klimatischen Gründen nicht vorkamen (Greenwood und Mutabingwa 2002) und von Menschen herbeigeführte Umweltveränderungen (z.B. Bau von Staudämmen, Bewässerungsmaßnahmen) tragen zur Verbreitung der Vektoren und der Krankheit bei. Ein weiteres Problem ist die ansteigende Zahl an Touristen, Bürgerkriegsflüchtigen, Migranten etc., die die Krankheit aus endemischen Gebieten in Gegenden bringen, in denen es die Erreger vorher nicht gab.

## 1.2 Besonderheiten und Evolution von *Plasmodium falciparum*

Weshalb es im Laufe der Evolution zu der hohen Pathogenität von *P. falciparum* kam, ist bis heute ungeklärt. Im Gegensatz zu den anderen menschlichen Malariaerregern bildet *P. falciparum* so genannte ‚knobs‘ an der Erythrozytenoberfläche aus, die zur Sequestration der Blutkörperchen in den Kapillaren führen kann (Newbold et al. 1999). Falls aus dieser eine Kapillarblockade mit Blutstauung im Gehirn resultiert, fällt der Patient in einen komatösen Zustand, und die Infektion kann einen tödlichen Verlauf nehmen. Doch nicht nur in seiner Pathogenität unterscheidet sich *P. falciparum* von den anderen humanen Plasmodienarten. Es zeichnet sich weiterhin durch das Fehlen einer typischen, mit regelmäßigen Fieberschüben einhergehenden Periodizität der asexuellen Vermehrungszyklen (Waters et al. 1993a) aus, durch die halbmondförmige Gestalt der Gametozyten und die starke Antigenvariabilität (Babiker und Walliker 1997).

Verschiedene Theorien wurden in den letzten Jahren aufgestellt, die sich mit der Abstammung von *P. falciparum* beschäftigen. Laut Brooks und McLennan (1992) lässt die hohe Pathogenität von *P. falciparum* auf eine entwicklungsgeschichtlich junge Wirt-Parasit-Beziehung schließen, da erst kürzlich erworbene Parasiten noch nicht optimal an den Wirt angepasst sind und den Wirt so stark schädigen können, dass sie ihn und damit ihr eigenes Refugium vernichten. Conway und Baum (2002) schätzen, dass *P. falciparum* – im Gegensatz zu den anderen humanpathogenen Spezies – erst vor ca. 10000 Jahren auf den Menschen übergegangen ist, etwa zur selben Zeit als die Sichelzellanämie und die Thalassämie entstanden sind, Krankheiten, die als Nebeneffekt vor Malaria schützende Auswirkungen haben können (Hebbel 2003; Mockenhaupt et al. 2004).

Auch DNA-Sequenzanalysen, bei denen Genregionen der vier humanpathogenen Plasmodienarten miteinander verglichen wurden (McCutchan et al. 1984, Waters et al. 1991, 1993b), legen nahe, dass *P. falciparum* nur entfernt mit den drei anderen Plasmodienarten verwandt ist. Waters und Kollegen warfen 1991 die Frage auf, ob *P. falciparum* von Vogelmalariaerregern abstammen könnte. In ihrer Studie, in der die 18 SSU rDNA verschiedener Plasmodienspezies von Mensch, Affen, Nagern und Vögeln miteinander verglichen wurden, stellte sich heraus, dass *P. falciparum* am engsten mit *P. gallinaceum* und *P. lophurae*, zwei Vogelmalariaerregern, verwandt sein könnte. Nach Waters et al. (1993a) könnte ein Wirtswechsel vom Vogel zum Menschen vor ca. 5000 Jahren mit dem Aufkommen des kontrollierten Pflanzenanbaus und der damit verbundenen zunehmenden Sesshaftigkeit der Bevölkerung stattgefunden haben. Diese würde nämlich eine relativ hohe

Durchseuchung der Bevölkerung und eine enge Adaption des Parasiten an eine Vektorspezies (z.B. *Anopheles gambiae*) erlaubt haben. Dies sind Voraussetzungen für die Aufrechterhaltung des *P. falciparum*-Zyklus?

Andere Autoren (Qari et al. 1996; Escalante et al. 1998; Perkins und Schall 2002), die später weitere Gene und weitere Erregerspezies molekularbiologisch untersucht haben, können die These, dass *P. falciparum* einen Vogelmalariaparasiten zum Vorfahren haben könnte, nicht unterstützen. Nach wie vor sind deshalb die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Malariaerregern weitgehend spekulativ.

Vielleicht würde aber gerade die Kenntnis über den phylogenetischen Ursprung von *P. falciparum* Aufschluss darüber bringen, warum sich dieser Erreger so von den drei anderen humanpathogenen Plasmodienarten unterscheidet. Nicht nur aus Gründen der Grundlagenforschung, sondern auch mit Hinblick auf die angewandte Malariaforschung wäre die Aufklärung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Malariaerregern höchst bedeutsam. Erkenntnisse dazu könnten die Herangehensweisen bei der Entwicklung von neuen Malariamedikamenten und einer effizienten Vakzine entscheidend beeinflussen. Würde sich nämlich herausstellen, dass *P. falciparum* tatsächlich näher mit den Vogelmalariaparasiten verwandt ist als mit den anderen humanpathogenen Arten, wäre das Vogelmodell bei der Impfstoff- und Medikamentenforschung, auf das man schon früher mangels Kultivierungsmöglichkeiten zurückgegriffen hatte, möglicherweise einem Maus-Modell und sogar einem Affen-Modell mit humanpathogenen *Malaria tertiana*-Erregern vorzuziehen. Bevor das Nagermalaria-Modell zum Testen von neuen Medikamenten in den Laboren Standard wurde, hatte man an Vogelmalaria-Modellen immerhin so wichtige Medikamente wie das Plasmochin, Primaquin und Atebrin (Roehl 1926; Walker und Richardson 1948; Fink und Dann 1967) entwickelt. Aber auch heute noch werden Vogel-Modelle verwendet, um die Effizienz von Vakzinen in ihrer natürlichen Umgebung zu testen (McCutchan et al. 2004). Von grundsätzlicher Relevanz für die experimentelle Malariaforschung ist daher die Frage, ob die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Wirten wichtiger sind oder die zwischen den Parasiten.

### 1.3 Der Befall von Vögeln durch Haemosporina

Zu den Erregern der Vogelmalaria werden die Gattungen *Plasmodium*, *Haemoproteus* und *Leucocytozoon* gezählt (Hellgren et al. 2004), die nach der Systematik von Levine et al. (1980) zu der Unterordnung der Haemosporina gehören.

**Phylum:** Apicomplexa

**Klasse 2:** Sporozoa

**Unterklasse 2:** Coccidia

**Ordnung 3:** Eucoccidiida

**Unterordnung 3:** Haemosporina

**Familie 1:** Leucocytozoidae

**Familie 2:** Haemoproteidae

**Familie 3:** Plasmodiidae

Die Vogelmalaria ist nahezu auf der ganzen Welt verbreitet (Smyth 1976; Seed und Manwell 1977; Krone et al. 2001; Schrenzel et al. 2003). Sie tritt in Australien allerdings nur sehr selten auf (Bennett et al. 1993), und in Neuseeland wurden im Rahmen umfassender Studien überhaupt keine Blutparasiten in der Avifauna festgestellt (Bennett et al. 1993).

Wenn Vogelmalariaparasiten durch den Stich der Mücke in den Vogel injiziert werden, befallen sie primär verschiedene Gewebe des retikuloendothelialen Systems (RES) und können erst nach einigen Tagen, wenn sie in die roten Blutkörperchen eingedrungen sind, lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. In Vogelarten, die auf eine Koevolution mit dem Erreger zurückblicken können, steigt die Parasitämie zunächst an, nimmt dann aber wieder ab bevor lebensbedrohliche Werte erreicht werden, und der Parasit verschwindet aus dem Blut. Falls eine Wirtsart zuvor allerdings noch nie mit Malariaparasiten Kontakt hatte oder ein neuer Parasitenstamm in eine Wirtspopulation eindringt, kann die Infektion einen tödlichen Ausgang nehmen (Bensch et al. 2000). Die durch Malaria verursachte Morbidität und Mortalität bei Wildvögeln ist jedoch bisher kaum untersucht und daher nicht genau bekannt (Garnham 1966).

Zur Zeit sind 34 gültige Spezies der Gattung *Plasmodium* mit unterschiedlich ausgeprägten Wirtsspektren beschrieben (Bennett et al. 1993). Neun Erregerarten sind streng wirtsspezifisch und befallen nur eine Vogelart. Von vier Spezies ist bekannt, dass nur zwei

Vogelarten an ihnen erkranken können. Acht Erregerarten befallen mehr als 50 verschiedene Vogelarten, und *P. relictum* wurde weltweit bereits bei 359 Vogelarten aus 70 Familien nachgewiesen. Andere stark verbreitete Arten sind *P. vaughani* und *P. circumflexum*, die beide mehr als 100 verschiedene Wirtspezies befallen können. Die umfangreichste Auflistung über die Erreger der Vogel malaria und deren Wirte wurde von Bishop und Bennett (1992a,b) erstellt.

Über den Grad der Prävalenz der Vogel malaria liegen unterschiedliche Daten vor. Bei Smyth (1976) wird beschrieben, dass die Gattung *Plasmodium* auf der ganzen Welt mit einer Häufigkeit von 5,8 % vorkommt (ca. 7000 Vögeln wurden untersucht), wobei die Infektion in gemäßigten Zonen nicht seltener auftritt als in tropischen. Die weltweite Verbreitung der Vogel malaria kommt nach Manwell (1935) u.A. durch das Wanderverhalten der Vögel zustande. Greiner et al. stellten 1975 eine Arbeit vor, in denen die Ergebnisse von 57026 untersuchten Vögeln aus Nordamerika zusammengefasst war. Hier wurden Prävalenzen von 3,8 % für *Plasmodium*-, 19,5 % für *Haemoproteus*- und 17,7 % für *Leucocytozoon*-Spezies festgestellt. In einer Studie von McClure et al. (1978) waren von 55289 untersuchten Vögeln aus Südostasien 0,8 % mit *Plasmodium*-, 11,3 % mit *Haemoproteus*- und 2,7 % mit *Leucocytozoon*-Arten infiziert. Gabaldon (1974, 1975, 1976, 1978) sammelte über drei Jahre Daten zur Verbreitung der Vogel malaria in Venezuela und stellte bei 0,6 % von insgesamt 21201 untersuchten Vögeln einen Plasmodien-, bei 2,6 % einen *Haemoproteus*- und bei 0,1 % einen *Leucocytozoon*-Befall fest.

Eine Zusammenfassung über den Kenntnisstand zur Verbreitung der Vogel malaria in Europa veröffentlichte Kučera (1981a,b,c). Insgesamt wurden 10194 Vögel erfasst, von denen 11,3 % mit *Plasmodium*-, 11,8 % mit *Haemoproteus*- und 5,9 % mit *Leucocytozoon*-Erregern infiziert waren. Eine weitere Übersichtsarbeit von Scheuerlein und Ricklefs (2004) präsentiert die zusammengefassten Ergebnisse von 120 Studien über die Verbreitung von Blutparasiten insgesamt (inkl. Trypanosomen) in europäischen Vögeln. Sie stellten bei 14812 erfassten Individuen eine Prävalenz von 28,6 % fest.

Für Deutschland beschreiben Krone et al. (2001), dass von 1149 untersuchten Eulen und Greifvögeln nur bei einem Individuum ein Befall mit Plasmodien festgestellt werden konnte. Insgesamt wurde aber bei 11 % der Tiere eine Infektion mit Vogel malariaerregern gefunden. Dieses Ergebnis wurde anhand von Blutausstrichen gewonnen, genauso wie die Daten von Haberkorn (1984), der 893 in Deutschland gefangene Sperlingsvögel (Passeriformes) von 44 Arten aus 14 unterschiedlichen Familien untersuchte. 14 % der untersuchten Vögel waren mit

Vogelmalariaerregern infiziert, davon 1,1 % mit Plasmodien. Kronberger und Schüppel beschrieben 1977 in einer Übersicht über 7126 durchgeführte Sektionen an Vögeln aus Zoohaltungen 14 Fälle von Plasmodienbefall, hauptsächlich bei Pinguinen.

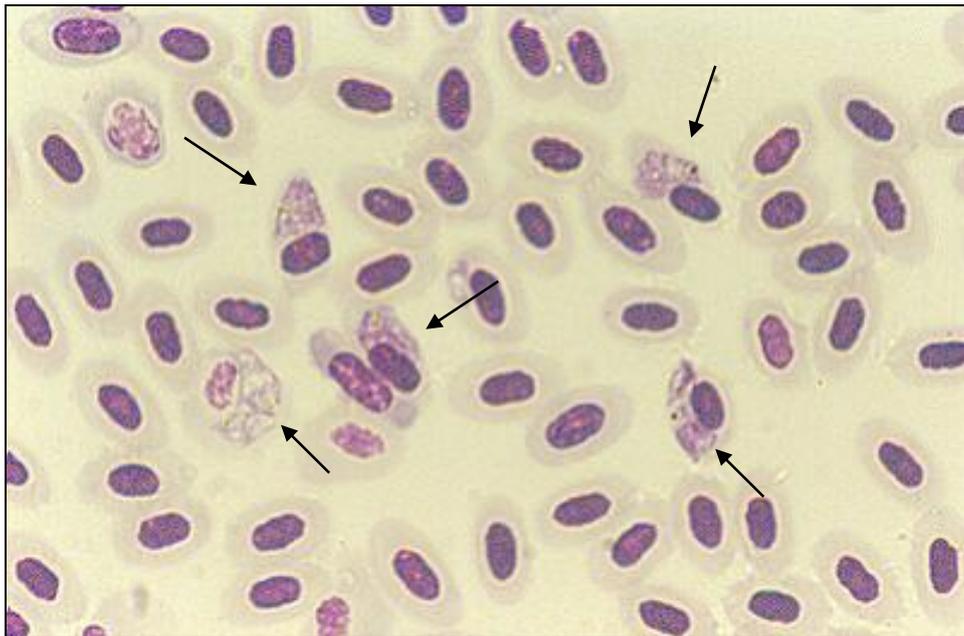
Nähere Kenntnisse zur Verbreitung der Vogel malaria in Deutschland sowie zur Pathogenität ihrer Erreger sind nicht nur von akademischem Interesse. Die Infektion kann auch unter den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren in Zoos (Ippen und Schröder 1972), Wildparks (Valentin et al. 1994) und Privathaltungen enormen wirtschaftlichen Schaden im Bestand anrichten. Das Problem der Vogel malaria ist vor allem aus zoologischen Gärten bekannt, in denen sich insbesondere Pinguine als hochanfällig für Malaria erwiesen haben (Kronberger und Schüppel 1977; Lindt und Hörning 1966).

Um festzustellen, ob ein Vogel mit Malariaerregern infiziert ist, kann ein Blutausschnitt zur mikroskopischen Untersuchung angefertigt werden. Auch zur Artbestimmung wird diese Methode routinemäßig genutzt. Da aber die Parasitämie beim Vogel zeitweise erfahrungsgemäß extrem gering ist, ist der Nachweis der Malariaerreger durch eine mikroskopische Untersuchung meist nur im akuten Stadium möglich, und die Identifizierung erweist sich selbst bei bekannten Parasitenspezies in vielen Fällen als schwierig. Vorzuziehen ist ein Nachweis der Parasiten-DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), da die Sensitivität dieses Verfahrens nicht nur beträchtlich höher ist als der Lichtmikroskopie (Waldenström et al. 2004), sondern die amplifizierten DNA-Regionen auch einer Sequenzierung und vergleichenden Analyse mit Hinblick auf das Erregerspektrum zugänglich macht. Je größer nämlich die Parasitendiversität ist, der ein potentieller Wirt exponiert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung und die Virulenz der Parasitenpopulation einzuschätzen (Bensch et al. 2004).

In den letzten Jahren hat sich das Interesse für die Vogel malaria aus weiteren Gründen verstärkt. Möglicherweise als Folge einer voranschreitenden Klimaerwärmung und zunehmender Verschleppung infizierter Vögel und Mückenvektoren erobert sie seit einiger Zeit Gebiete, in denen sie vorher nicht vorkam. Die Folge ist die drohende Ausrottung nicht-adaptierter Vogelpopulationen (Feldman et al. 1995; Benning et al. 2002).

Ein früher in der Forschung häufig verwendeter Vogel malariaerreger war *P. (Haemamoeba) cathemerium* (Abb. 1), der in der phylogenetischen Fachliteratur aber niemals Erwähnung

findet. *P. cathemerium* wurde 1924 von Ernest Hartmann im Blut eines Hausspatzes (*Passer domesticus*) entdeckt (Garnham 1966). Diese Vogelspezies wird zwar als typischer Wirt beschrieben, aber der Parasit wurde danach auch in anderen Arten der Sperlingsfamilie, insgesamt sogar in bisher 70 Vogelarten aus 29 verschiedenen Vogelfamilien gefunden (Bennett et al. 1993). Er tritt fast weltweit in allen zoogeographischen Regionen (Wallace'sche Zonen) außer Australien auf (Bennett et al. 1993).



**Abb. 1:** *P. cathemerium*-Erreger im Blutausstrich eines infizierten Kanarienvogels (*Serinus canaria*)

Typisch für die Untergattung *Haemamoeba*, ist *P. cathemerium* durch große und runde Schizonten in der erythrozytären Phase, runde Gametozyten und eine exoerythrozytäre Schizogenie im lymphoiden Makrophagensystem gekennzeichnet (Garnham 1966). Es produziert 16 Merozoiten und bewirkt am Ende der Entwicklung, den Ausschluss des Kerns der Wirtszelle aus derselben. Der natürliche Vektor ist unbekannt, aber im Labor erwiesen sich mehrere Moskitospezies als empfänglich, wie z.B. verschiedene *Culex*- und *Aedes*-Arten (Huff 1965; Garnham 1966).

Ein Laborversuch von Gehring (1974) mit *P. cathemerium* weist auf die prinzipielle Möglichkeit eines natürlichen Wirtswechsels von Vogelmalariaerregern auf Säuger hin. Gehring überimpfte Blut mit *P. cathemerium* eines Kanarienvogels auf Labormäuse, von denen einige in der Folge eine tödliche Parasitämie entwickelten. Eine Wiederholung der Infektion mit demselben Parasitenstamm verlief ebenfalls erfolgreich. Anscheinend hatte beim Parasiten des Kanarienvogels eine Mutation vorgelegen, die zu einer Präadaption für einen neuen Wirt führte und es ihm gestattete, auch die kernlosen Säugererythrozyten zu befallen (Gehring 1974). Da der als Spender zweimal verwendete Kanarienvogel im Anschluss an die Experimente verstarb, ging der Parasitenstamm verloren, so dass eine spätere molekularbiologische Untersuchung nicht mehr möglich war. Eine Wiederholung der Versuche mit einigen anderen Vögeln als *P. cathemerium*-Quelle gelang nicht.

#### 1.4 Phylogenie der Malariaerreger

Zurzeit sind ca. 450 verschiedene Malariaspezies beschrieben, die in 12 Gattungen eingeteilt werden (Perkins und Schall 2002). Sie sind über alle warmen und gemäßigten Klimazonen der Erde verteilt und nutzen eine Vielzahl von Wirbeltieren und Wirbellosen als Wirte (Garnham 1966). Bei den Wirbeltieren sind insbesondere die Primaten-, Nager-, Vogel- und Eidechsenarten als Zwischenwirte hervorzuheben.

Die Malariaerreger wurden neben ihrem Vorkommen in bestimmten Wirtsspezies (Garnham 1966) und ihrer geographischen Verbreitung (Rich und Ayala 2003) hauptsächlich nach morphologischen Gesichtspunkten und Eigenheiten ihres Lebenszyklus' im Wirbeltierwirt und im Vektor beschrieben und in das phylogenetische System eingeordnet (Garnham 1966; Perkins und Schall 2002). Als morphologische Unterscheidungskriterien werden die Anzahl der Merozoiten, die Entstehung oder das Fehlen von Malariapigment in der Wirtszelle und der Befall von Leukozyten zusätzlich zu Erythrozyten herangezogen. So wurden zur Speziesidentifizierung und -klassifizierung traditionell nach Giemsa gefärbte Blutausstriche angefertigt und lichtmikroskopisch untersucht (Waldenström et al. 2004). Auch heutzutage wird diese Methode noch zur Diagnose der Malaria bei in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln (Graczyk et al. 1993) sowie zur Ermittlung von Infektionsprävalenzen (Valkiūnas und Iezhova 2001; Krone et al. 2001) und für weiterführende Speziesidentifizierungen herangezogen (Telford und Forrester 1992; Landau et al. 2003).

Die Ergebnisse Kissingers und seiner Mitarbeiter (2002) zur molekularen Systematik von Vogelplasmodien unterstützen allerdings die Ansicht, dass die auf der Basis morphologischer Merkmale erstellten Verwandtschaftsbeziehungen und Stammbäume der Malariaparasiten mit

Skepsis zu betrachten sind. So wiesen Erreger, die aufgrund morphologischer Merkmale in eine gemeinsame Untergattung gestellt wurden, Sequenzanalysen am Cytochrom b-Gen zufolge andere Gruppenzugehörigkeiten auf.

In den letzten Jahren wurde daher verstärkt versucht, die Verwandtschaftsbeziehungen der Malariaerreger mit Hilfe der molekularen Phylogenie zu klären. Diese nutzt die vergleichende Sequenzanalyse, indem sie auf der Basis von Unterschieden zwischen den DNA-Sequenzen verschiedener Erregerspezies einen zeitlichen Ablauf der Evolution simuliert. So wird ein denkbarer entwicklungsgeschichtlicher Ablauf der Auftrennung der Arten und somit eine mögliche Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse in Form eines phylogenetischen Stammbaumes gegeben.

Molekular-phylogenetische Stammbäume sind allerdings jeweils nur so gut, wie es die Länge und Anzahl der vorhandenen Sequenzen der verschiedenen Spezies sowie die zum entsprechenden Zeitpunkt verfügbaren Berechnungsmodelle zulassen. Da die Einbeziehung weiterer Plasmodienspezies jeden phylogenetischen Stammbaum der Malariaerreger komplett verändern kann (Escalante et al. 1998), müssen so viele DNA-Sequenzen wie möglich von so vielen Parasitenspezies wie möglich gesammelt werden (Sidall und Barta 1992; Brooks und McLennan 1992; Waters et al. 1993a; Escalante et al. 1997; Kedzierski et al. 2002). Auch mit Blick auf die unklaren Abstammungsverhältnisse von *P. falciparum* wäre es hilfreich, weitere Daten für Vogelmalariaerreger zu sammeln.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten von vier verschiedenen Malariaerregern unterschiedlicher Wirte (Mensch, Nager, Vogel) Gene amplifiziert und sequenziert werden. Ausgesucht wurden die Gene des mitochondrialen Cytochroms b (cyt b), der 18 SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) und der caseinolytischen Protease C (ClpC), da für sie z.T. deutlich mehr Sequenzdaten als für andere Gene von Malariaerregern bereits existieren und somit die zuverlässigsten Stammbäume erstellt werden können. Unter Verwendung von aktuellen Computerprogrammen und Einbeziehung sämtlicher zur Zeit der Arbeit vorliegenden Gensequenzen sollte versucht werden, die Stellungen von *P. falciparum* und des neu hinzugefügten Erregers *P. cathemerium* im phylogenetischen Stammbaum der Malariaparasiten zu ermitteln, um gleichzeitig neue Erkenntnisse über die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *P. falciparum* und den Vogelmalariaerregern zu erhalten. Diese Auswertungen sollten im Kontext einer kritischen Analyse vorangegangener Studien zur Phylogenie der Malariaerreger gemacht werden.

Des weiteren sollten erstmals Daten zum Vorkommen der Vogel malaria in Deutschland mit Hilfe molekularbiologischer Techniken (PCR) gewonnen werden. Hierzu sollte das Blut von Vögeln aus drei Arten und von zwei Lokalitäten auf DNA von Malariaerregern getestet werden. Die positiven Proben sollten anschließend sequenziert werden, um Daten über das Erregerspektrum zu gewinnen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. *Haemosporina*, die für die molekulare Phylogenie zur Verfügung standen

Der für die phylogenetischen Untersuchungen verwendete Stamm des Vogelmalariaerregers *P. cathemerium* (Manwell-Stamm) war in den 1970er und '80er Jahren von Maier und Piekarski zu Forschungszwecken im Institut für Medizinische Parasitologie, Bonn, in Kanarienvögeln (*Serinus canaria*) gehalten worden. Der Stamm ging auf Prof. Schulemann, Pharmakologisches Institut der Universität Bonn, zurück. In Flüssigstickstoff tiefgefrorene Aliquots des parasitierten Vogelblutes standen für die Untersuchungen zur Verfügung.

*P. chabaudi* und *P. yoelii nigeriensis* stammten aus einer im Institut gehaltenen NMRI-Maus-Zucht. *P. ovale* wurde aus Patientenisolat gewonnen.

### 2.2 Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus Vögeln

#### 2.2.1 Freilebende, einheimische Vögel

Zur Erhebung der Infektionsprävalenzen einheimischer, freilebender Vögel mit Malariaerregern und zur Feststellung des Erregerspektrums wurde das Blut von 94 Tannenmeisen (*Parus ater*), 219 Trauerschnäppern (*Ficedula hypoleuca*) und 56 Kohlmeisen (*Parus major*) aus den niedersächsischen Gemeinden Bahrdorf und Lingen untersucht. Die Proben waren 1993, 1996, 1999 und 2002 von Mitarbeitern des Institutes für Evolutionsbiologie und Zooökologie der Universität Bonn gewonnen worden (Tab. 1).

**Tab. 1:** Anzahl und Herkunft der gefangenen Vögel

	Tannenmeisen ( <i>Parus ater</i> )	Trauerschnäpper ( <i>Ficedula hypoleuca</i> )	Kohlmeisen ( <i>Parus major</i> )
Bahrdorf	1993: 25	1993: 72	1999: 56
Lingen	2002: 69	1996: 147	

Zur Blutabnahme wurde die Flügelvene (Vena ulnaris) der Vögel mit einer sterilen Einmal-Kanüle (Durchmesser 0,4 mm) punktiert. Der heraustretende Blutstropfen (ca. 50 µl) wurde mit einer Hämatokritkapillare (Durchmesser 1,1-1,2 mm) aufgenommen und durch Ausblasen in 250 µl APS-Puffer (0,27 M Na<sub>2</sub>EDTA, 0,24 M NaF, 0,007 M Thymol; Arctander, 1988)

überführt. Hörte die Blutung von allein nicht auf, wurde sie mit Clauden-Watte<sup>®</sup> gestillt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blutproben bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Vogelarten aus zwei Fanggebieten untersucht. Der Trauerschnäpper (*Ficedula hypoleuca*) gehört zur Familie der Säger (Muscicapidae). Diese Art ist von Skandinavien bis Südeuropa weit verbreitet und bewohnt bevorzugt Laubwälder und lichte Nadelwälder, Parks und Obstpflanzungen; sie brütet gerne in künstlichen Nisthöhlen (Heinzel et al. 1992).

Mit der Tannenmeise (*Parus ater*) und der Kohlmeise (*Parus major*) wurden des weiteren zwei Arten aus der Familie der Meisen (Paridae) untersucht. Die Tannenmeise kommt in Mitteleuropa sehr häufig vor. Sie ist transpaläarktisch vom Ostatlantik bis Kamtschatka und Japan verbreitet, wobei sich ihre höchsten Bestandsdichten in der montanen und subalpinen Stufe befinden (Glutz von Blotzheim et al. 1993). Die Tannenmeise brütet fast ausschließlich in Nadelwäldern, bevorzugt in alten Fichtenbeständen, kommt jedoch regional auch in Laub- und Mischwäldern vor.

Die Kohlmeise ist in der Paläarktis weit verbreitet und in fast allen Habitaten, mit Ausnahme von Wüsten und Tundren, beheimatet. Sie kommt in Mitteleuropa im Mittelgebirge und in den Niederungen häufig als Brutvogel vor. Man findet sie bevorzugt in Laubwäldern, aber vor allem in Osteuropa kann man sie auch in Laub-Nadelmischwäldern in hohen Dichten antreffen (Glutz von Blotzheim et al. 1993).

Die Blutproben der Vögel waren in den niedersächsischen Gemeinden Lingen und Bahrndorf gesammelt worden. Das 325 ha große Lingener Gebiet im Staatsforstrevier Elbergen im Emsland ist eine ehemalige Hochmoorregion, die Mitte der 1950er Jahre zum Großteil mit Kiefer (*Pinus sylvestris*) und zur Waldbrandsicherung streifenweise – v.A. an den Bestandsrändern – mit Japanischer Lärche (*Larix leptolepis*) aufgeforstet wurde. Im Rahmen eines Großversuches zur biologischen Bekämpfung der Lärchenminiermotte (*Coleophora laricella*) mit Hilfe angesiedelter insektenfressender Singvögel wurden 1972 sämtliche Lärchenbestände mit künstlichen Nisthöhlen ausgestattet. Heute befinden sich dort 540 Nisthöhlen aus Beton; natürliche Nisthöhlen fehlen fast gänzlich.

Seit 1974 wird die Vogelansiedlung im Staatsforstrevier Elbergen durch die Außenstation Braunschweig des Institutes für Vogelforschung ‚Vogelwarte Helgoland‘ betreut. Diese sorgt unter anderem für eine jährliche Erhebung brutbiologischer Daten, die Beringung sämtlicher Nestlinge sowie die Markierung bzw. Ringkontrolle aller gefangenen Altvögel (Winkel 1975,

1981; Altenkirch und Winkel 1991). Die Tannenmeise tritt im Gebiet als zweithäufigster Brutvogel nach dem Trauerschnäpper auf (Winkel und Winkel 1997).

Das 160 h große Bahrddorfer Untersuchungsgebiet liegt im östlichen Niedersachsen an der Landesgrenze zu Sachsen-Anhalt und ist Teil des ‚Braunschweiger Höhlenbrüterprogrammes‘, in dessen Rahmen dort seit fast 40 Jahren populationsökologische Studien an verschiedenen höhlenbrütenden Singvogelarten durchgeführt werden. Das Gebiet ist ein Nutzwald, der sich in verschieden strukturierte Teilflächen mit unterschiedlichem Baumbestand und Alter gliedert. Neben reinen Kiefern- (*Pinus spec.*) und Buchenbeständen (*Fagus sylvestris*) herrscht Mischwald mit einigen Eichen (*Quercus spec.*) und unterschiedlich hohem Totholzanteil vor. Zur Zeit sind dort 690 Holzbeton-Nistkästen ausgehängt (Gerken 2001).

### 2.2.2 Zoovögel

Insgesamt wurden 47 deutsche Zoos und Tierparks von der Verfasserin dieser Arbeit angeschrieben, um das dortige Vorkommen der Vogelmalaria zu erfassen. Obwohl neun der Einrichtungen über Probleme und Todesfälle insbesondere bei Pinguinen berichteten, konnte nur von einem Zoo Untersuchungsmaterial erhalten werden. Es handelte sich um Paraffinblöcke mit eingebetteten Organen von einem Brillenpinguin (*Spheniscus demersus*) und einem Balistar (*Leucopsar rothschildi*), die 1991 und 1996 im Kölner Zoo an einer Vogelmalaria verstorben waren. Das Material wurde freundlicherweise Prof. Reinacher, Institut für Tierpathologie der Universität Gießen, zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 Kontrollen

Die humanpathogenen Malariaerreger *P. vivax*, *P. malariae* und *P. falciparum* wurden für Kontrollversuche verwendet. *P. vivax* und *P. malariae* wurden aus Patientenisolaten gewonnen, während *P. falciparum* in einer kontinuierlichen Kultur gezüchtet wurde.

## 2.3 Auswahl der untersuchten Gene

Im Rahmen der Arbeit zur molekularen Phylogenie wurden drei Gen-Abschnitte sequenziert und vergleichend analysiert. Bei den untersuchten DNA-Regionen handelte es sich um die Gene für die Plastid-kodierte caseinolytische Protease C (ClpC), für das mitochondriale Cytochrom b (cyt b) und für die Kern-kodierte 18 SSU rRNA. Diese Gene wurden gewählt, da sie bereits bei vielen verschiedenen Plasmodienarten untersucht worden waren und eine

ausreichende Menge an Sequenzdaten von größtenteils bzw. sogar vollständig sequenzierten Genen für die Erstellung eines Stammbaumes vorlag.

Bei *P. cathemerium* wurden alle drei Gene untersucht. Von *P. chabaudi* wurde das 18 SSU rRNA-Gen und das ClpC-Gen analysiert. Bei *P. ovale* und *P. y. nigeriensis* konzentrierte sich die Studie auf das ClpC-Gen.

Für die Ermittlung der Infektionsprävalenzen der einheimischen, freilebenden Vögel wurde ein Teilbereich des cyt b-Gens analysiert, das weltweit für das Screening von Vogelblut auf Plasmodien große Bedeutung erlangt hat (z.B. Bensch et al. 2000; Perkins und Schall 2002; Waldenström et al. 2002; Waldenström et al. 2004) und somit ein großer Datensatz in den Genbanken für vergleichende Analysen vorhanden war.

#### **2.4 Kontinuierliche *P. falciparum*-Kultur**

Zur Gewinnung von *P. falciparum*-DNA für Kontrollversuche wurde eine kontinuierliche Kultur geführt (Wiersch 2000), in der die Parasiten soweit angereichert wurden, bis ausreichend Material zur DNA-Extraktion zur Verfügung stand.

#### **2.5 DNA-Gewinnung**

##### **2.5.1 DNA-Extraktion aus parasitiertem Kulturmedium, Patienten- und Mäuseblut**

Die DNA der Malariaerreger *P. cathemerium*, *P. chabaudi*, *P. y. nigeriensis*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale* wurde mit dem ‚QIAamp DNA Blood Mini Kit‘ (Fa. Qiagen) gemäß des Versuchsprotokolls des Herstellers extrahiert. Hierzu wurden 200 µl des Kulturmediums bzw. des Blutes zusammen mit 200 µl AL-Puffer und 20 µl Protease geschüttelt und 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Danach wurde das Gemisch mit 200 µl absolutem Ethanol versetzt und kurz abzentrifugiert. Die Lösung wurde anschließend auf ein Zentrifugensäulchen gegeben und zwei Minuten bei 13000 RPM zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden im nächsten Schritt 500 µl AW1-Puffer zugegeben, wiederum zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer wurde die Säule drei Minuten zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und die Säule mit geöffnetem Deckel drei Minuten stehen gelassen, damit Restalkohol aus dem Puffer verdampfen konnte. Danach wurden 200 µl steriles Wasser auf die Säule gegeben, die noch drei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde, um der

DNA Zeit zu geben, sich von der Filtermatrix der Säule zu lösen. Nach einem abschließenden zweiminütigen Zentrifugationsschritt lag die DNA-Lösung für die weitere Untersuchung vor.

### **2.5.2 DNA-Extraktion aus dem Blut der gefangenen Vögel**

Für die DNA-Isolation aus dem in APS-Puffer konservierten Vogelblut wurde ein nach Miller et al. (1988) modifiziertes Protokoll verwendet. Das Blut bildet in dem APS-Puffer nach einer Weile eine flüssige und eine viskose Phase aus. Von der viskosen Phase wurden ca. 10 µl entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 150 µl Proteinase K-Puffer (20 mM Tris, 4 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4) gegeben. Der Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde anschließend gut durchmischt. Dabei wurde das Gefäß schnell und unter großem Kraftaufwand für ca. zwei Minuten an dem Gitter einer Reibe entlanggeführt. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß fünf Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und auf das weißliche Sediment wurden weitere 280 µl Proteinase K-Puffer gegeben. Die Lösung wurde mittels der Reibe erneut solange durchmischt bis das Sediment gut gelöst war. Zu dem Gemisch wurden 18 µl 10 %iges SDS und 11 µl Proteinase K (10 mg/ml) gefügt. Die Gefäße wurden mehrmals vorsichtig invertiert und anzentrifugiert. Anschließend folgte eine zweistündige Inkubation im Wasserbad bei 55 °C. Zur DNA-Fällung wurden 100 µl einer gesättigten 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben, und die Lösung wurde wiederum mittels einer Reibe gut durchmischt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation (13000 RPM) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml 100 %igem Ethanol vermischt bis die DNA ausgefallen war. Das Gefäß wurde 20 Minuten bei -80 °C gekühlt und dann 15 Minuten bei 13000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Zu dem Sediment wurde 1 ml 70 %iger Ethanol gefügt und das Gefäß nach zwei- bis dreiminütiger Wartezeit zehn Minuten zentrifugiert (13000 RPM). Der Überstand wurde abgossen und das Sediment für zwei Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Die im getrockneten Sediment enthaltene DNA wurde in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst. Die DNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.5.3 DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten**

Um die genomische DNA des Pinguins und des Balistars zu gewinnen, mussten die eingebetteten Organe vom Paraffin gereinigt werden. Hierzu wurde mit einem Skalpell ein kleines Stück von dem Paraffinblock abgeschnitten und zusammen mit 1 ml Xylol in ein Eppendorfgefäß gegeben, das für zehn Minuten bei 500 RPM in einen Schüttler gestellt

wurde. Nach einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 RPM wurde das Xylol vorsichtig abgenommen und die Prozedur noch zweimal wiederholt. Die gleichen Schritte wurden danach dreimal mit 100 %igem Ethanol durchgeführt. Nach diesem Auswaschen des Xylols wurden die Gefäße bei 50 °C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach Zugabe von 160 µl ATL-Puffer (,QIAamp DNA Blood Mini Kit', Fa. Qiagen) und 40 µl Proteinase K (10 mg/ml, Fa. Merck) wurden die Proben bei 56 °C über Nacht in einem Heizblock geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Proben mit Hilfe des ,QIAamp DNA Blood Mini Kits' (Fa. Qiagen) aufgearbeitet, wobei einige Schritte des Extraktionsprotokolls leicht modifiziert wurden (Empfehlung C. Regenbrecht, Institut für Neuropathologie, Bonn). So wurde eine Inkubationstemperatur von 70 °C gewählt, und die Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde von 13000 auf 8000 RPM reduziert.

## 2.6 DNA-Amplifikation

### 2.6.1 Amplifikation der spezifischen Gensequenzen für die molekulare Phylogenie

Primer zur Amplifikation des ClpC- (Tab. 2) und des cyt b-Gens (Tab. 3) wurden nach Sequenz-Alignment verschiedener Plasmodienspezies, die in der GenBank gefunden worden waren, mit Hilfe des ClustalX-Programms (Thompson et al. 1997) konstruiert. Hierzu wurden neun ClpC-Sequenzen und 15 cyt b-Sequenzen herangezogen. Die Primer zur Amplifikation des 18 SSU rRNA-Gens (AL399 und AL400; Tab. 4) wurden der Literatur entnommen (Qari et al. 1996). Weitere interne Primer für das 18 SSU rRNA- (Tab. 4) wie auch für das cyt b-Gen (Tab. 3) wurden mit Hilfe erster gewonnener Sequenzdaten selbst konstruiert.

**Tab. 2:** Primersequenzen zur PCR-Amplifikation des ClpC-Gens

Primer	Nukleotidsequenz [5' → 3']	Position im Gen [bp]
Clp1	AAAACCTGAATTAGCAAAAATATTA	1-24
Clp2	ATCCTTTAAAGGGAGCTCG	612-641

**Tab. 3:** Primersequenzen zur PCR-Amplifikation des cyt b-Gens

<b>Primer</b>	<b>Nukleotidsequenz [5' → 3']</b>	<b>Position im Gen [bp]</b>
cytbF1	AATTACGGGTTSCTTTTAGG	1-20
cytbR1	AACACATTATGATTAC	1016-1032
cytbF2	AATTATGGAGTGGATGGTGTTTTA	122-145
cytbR2	CTTGTGGTAATTGACATCCAA	917-937
cytbF3	CTAGTTATGTTAGCATCTTTA	765-768
cytbR3	TGGATATCTGGATTACTTATA	244-264

**Tab. 4:** Primersequenzen zur PCR-Amplifikation des 18 SSU rRNA-Gens

<b>Primer</b>	<b>Nukleotidsequenz [5' → 3']</b>	<b>Position im Gen [bp]</b>
AL399	AACCTGGTTGATCTTGCC	1-18
AL400	TAATGATCCTTCCGCAGG	2081-2098
AL399R	ACCCCGTTACCCGACATA	366-383
AL400F	GGATATGTGTTTAATGGCG	691-709
IntF2	GTAATCTTAACCATAAACTAT	1101-1121
IntF6	GTGAATATGATTTGTCTGGT	1424-1443
IntF7	TGTCCTTAGATGAACTAGGCTTG	1706-1727
IntR	CCTTATGAGAAATCAAAGTC	1209-1228
IntR2	AATACAAATGCCCCAAG	962-979
PI2R	GTGTAGGTAATCTTTATCAATA	1832-1853

Bis auf die spezifischen Primer stimmte die Zusammensetzung der PCR-Ansätze für alle zu amplifizierenden Genabschnitte überein. Die Reaktionskomponenten für einen Einzelansatz sind in Tabelle 5 aufgelistet. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 50 µl. Sämtliche PCR-Amplifikationen wurden mit einem Thermocycler T personal (Fa. Biometra) durchgeführt.

**Tab. 5:** Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifikation des ClpC-, des Cytochrom b- und 18 SSU rRNA-Gens

Chemikalien	Konzentration der Stocklösung	Menge [ $\mu$ l]	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O		38,75	
10 x Reaktionspuffer (pH 8,3)	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl	5	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
dNTPs	20 mM	1	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3	3 mM
Primer 1	20 $\mu$ M	0,5	200 nM
Primer 2	20 $\mu$ M	0,5	200 nM
Taq DNA-Polymerase (Invitrogen)	5 U/ $\mu$ l	0,25	0,025 U/ $\mu$ l
DNA		1	
Gesamtvolumen		50	

Für die Amplifikation des cyt b-Gens und des 18 SSU rRNA-Gens wurde ein identisches Temperaturprofil verwendet (Tab. 6).

**Tab. 6:** Temperaturprofil zur PCR-Amplifikation des cyt b- und 18 SSU rRNA-Gens

Arbeitsschritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [s]	
initiale Denaturierung	94	60	35 Zyklen
Denaturierung	94	30	
Annealing	50	30	
Extension	62	90	
finale Elongation	62	180	

Für die Amplifikation des ClpC-Gens musste der Literaturvorgabe (Rathore et al. 2001) zufolge ein anderes Temperaturprofil benutzt werden (Tab. 7).

**Tab. 7:** Temperaturprofil zur PCR-Amplifikation des ClpC-Gens

Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
initiale Denaturierung	94	240	
Denaturierung	94	20	15 Zyklen, pro Zyklus Reduktion der Annealing-Tem- peratur um 1 °C
Annealing	50	20	
Extension	72	60	
Denaturierung	94	20	20 Zyklen
Annealing	50	20	
Extension	72	60	
finale Elongation	72	300	

### 2.6.2 PCR zur Ermittlung der Infektionsprävalenzen einheimischer Vögel

Die Genus-spezifische PCR nach Hulier et al. (1996) diente zum schnellen Screening der DNA-Extrakte auf *Plasmodium spec.* Mit Hilfe dieser PCR wird ein spezifischer, 243 bp langer Abschnitt des 18 SSU rRNA-Gens der Plasmodien amplifiziert. Zur Amplifikation wurden die spezifischen Primer rPLU3 und rPLU4 (Tab. 8) eingesetzt. Vorversuche lieferten das erwartete DNA-Fragment für *P. cathemerium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*.

**Tab. 8:** Primersequenzen der Genus-spezifischen PCR nach Hulier et al. (1996)

Primer	Nukleotidsequenz [5' → 3']	Position im Gen [bp]
rPLU3	TTTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT	132-161
rPLU4	TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC	347-376

Die Zusammensetzung eines einzelnen PCR-Ansatzes mit einem Gesamtvolumen von 50 µl und das verwendete PCR-Temperaturprofil zeigen die Tabellen 9 und 10.

**Tab. 9:** Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes nach Hulier et al. (1996)

Chemikalien	Konzentration der Stocklösung	Menge [ $\mu$ l]	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O		27,7	
10 x Reaktionspuffer (pH 8,3)	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl	5	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
dNTPs	20 mM	0,5	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	6	6 mM
rPLU3	20 $\mu$ M	0,3	120 nM
rPLU4	20 $\mu$ M	0,3	120 nM
Taq DNA-Polymerase (Invitrogen)	5 U/ $\mu$ l	0,2	0,02 U/ $\mu$ l
DNA		10	
Gesamtvolumen		50	

**Tab. 10:** Temperaturprofil der PCR nach Hulier et al. (1996)

Arbeitsschritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]	
initiale Denaturierung	95	5	
Denaturierung	95	2	35 Zyklen
Annealing	64	2	
Extension	72	1	
finale Elongation	72	10	

Um die Rahmenbedingungen zu kontrollieren, wurden bei jeder PCR eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. In den Ansatz der Positivkontrolle wurden 10  $\mu$ l einer DNA-Lösung eingesetzt, die aus einer *P. falciparum*-Kultur gewonnen worden war. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 10  $\mu$ l DNA-Lösung aus dem Blut einer Buntfußsturmschwalbe (*Oceanites oceanicus*). Da die Blutproben der Buntfußsturmschwalbe aus der Antarktis stammen, in der keine Mücken als Überträger von Plasmodien vorkommen, wurde davon ausgegangen, dass eine Infektion mit Malariaerregern nicht möglich wäre.

### 2.6.3 PCR zur Ermittlung des Erregerspektrums einheimischer Vögel mit Malariaparasiten

Zu Beginn der Arbeit war geplant, mittels der selbst konstruierten cyt b-Gen- sowie der Clp1- und Clp2-Primer die verschiedenen Erregerspezies zu ermitteln. In Vorversuchen zeigte sich allerdings, dass diese Primerpaare zu einer verhältnismäßig geringen Sensitivität beitrugen, denn Vögel, die mit den Primern von Hulier et al. (1996) *Plasmodium*-positiv getestet worden waren, erwiesen sich mit den selbst konstruierten Primern häufig als negativ. Nur bei wenigen Tannenmeisen aus der Lingener Population und einigen Bahrdorfer Kohlmeisen konnten sequenzierbare DNA-Fragmente erhalten werden. Daher wurde zum Vergleich die nested PCR nach Waldenström et al. (2004) mit den dazugehörigen Primern erprobt und schließlich auch als Standardverfahren übernommen, nachdem sie sich als deutlich sensitiver erwiesen hatte.

Mit den Proben, in denen mit der PCR nach Hulier et al. (1996) *Plasmodium*-DNA nachgewiesen werden konnte, wurde daher weiterführend die Gattungsspezifische nested PCR nach Waldenström et al. (2004) durchgeführt, bei der ein Abschnitt des cyt b-Gens amplifiziert wurde. Diese anschließende PCR war notwendig, da das Amplifikat der PCR nach Hulier et al. (1996) sehr kurz ist und somit relativ wenig Sequenzinformation liefert. Der cyt b-Genabschnitt ist dagegen viel länger, und es lagen für ihn wesentlich mehr Sequenzdaten in der GenBank vor als für das 18 SSU rRNA-Gen. Über die Sequenzierung der PCR-Produkte und einen nachfolgenden Sequenzvergleich sollten nämlich die verschiedenen Erregerspezies ermittelt werden. Die für die nested PCR nach Waldenström et al. (2004) verwendeten Primer sind in Tab. 11 angegeben.

Auch die DNA des Brillenpinguins und des Balistars aus dem Kölner Zoo wurden mit der nested PCR untersucht.

Mit Ausnahme der Primer und der Zyklenzahl stimmten die Reaktionskomponenten und das Temperaturprofil der 1. und die 2. nested PCR überein.

Nach der 1. nested PCR wurde 1 µl Volumen in die 2. nested PCR überführt. Die 2. nested PCR bestand aus 35 anstatt 20 Zyklen.

**Tab. 11:** Primersequenzen für die nested PCR nach Waldenström et al. (2004)

Primer	Nukleotidsequenz [5' → 3']	Position im Gen [bp]
HAEMNF (1. nested)	CATATATTAAGAGAATTATGGAG	109-131
HAEMNR2 (1. nested)	AGAGGTGTAGCATATCTATCTAC	667-689
HAEMF (2. nested)	ATGGTGCTTTCGATATATGCATG	135-157
HAEMR2 (2. nested)	GCATTATCTGGATGTGATAATGGT	636-659

Die Zusammensetzung eines einzelnen PCR-Ansatzes (Gesamtvolumen: 25 µl) und des PCR-Temperaturprofils sind in den Tabellen 12 und 13 dargestellt.

**Tab. 12:** Zusammensetzung eines nested PCR-Reaktionsansatzes nach Waldenström et al. (2004)

Chemikalien	Konzentration der Stocklösung	Menge [µl]	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O		18,5	
10 x Reaktionspuffer (pH 8,3)	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl	2,5	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
dNTPs	20 mM	0,5	0,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,75	1,5 mM
HAEMNF bzw. HAEMF	20 µM	0,75	0,6 µM
HAEMNR2 bzw. HAEMR2	20 µM	0,75	0,6 µM
Taq DNA-Polymerase (Invitrogen)	5 U/µl	0,25	0,05 U/µl
DNA		1	
Gesamtvolumen		25	

**Tab. 13:** Temperaturprofil der nested PCR nach Waldenström et al. (2004)

Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
initiale Denaturierung	94	180	
Denaturierung	94	30	20 (1. nested) bzw. 35 Zyklen (2. nested)
Annealing	50	30	
Extension	72	45	
finale Elongation	72	600	

Wenn nach der 1. und 2. nested PCR nach dem beschriebenen Protokoll keine spezifische Bande erhalten werden konnte, wurden Modifikationen im Reaktionsansatz vorgenommen. So wurde z.B. die Menge der eingesetzten DNA in der 1. nested PCR sukzessive bis auf 5 µl erhöht. Ebenso wurde in einigen Fällen die Menge des Volumens, das aus der 1. in die 2. nested PCR überführt wurde, bis auf 5 µl gesteigert. Eine weitere Alternative war ein ‚Hot Start‘ der PCR. Bei diesem ist der Thermocycler bereits auf die initiale Denaturierungstemperatur vorgeheizt, wenn die Reaktionsgefäße in das Gerät eingesetzt werden. Dieser Schritt verhindert eine unkontrollierte Aktivität der Taq-Polymerase während des Vorheizens des Thermocyclers. Die Anwendung des ‚Hot Start‘-Protokolls führte zu so guten Ergebnissen, dass sie anschließend in das Routineprotokoll aufgenommen wurde.

#### 2.6.4 Unspezifische DNA-Präamplifikation

Da es in einigen Fällen trotz Variationen der in die nested PCR eingesetzten Menge an DNA nicht gelang, ein Amplifikationsprodukt zu erhalten, wurde der spezifischen PCR eine unspezifische DNA-Präamplifikation mittels des ‚GenomiPhi Kits‘ (Fa. Amersham Biosciences) vorangestellt. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellerprotokolls Folge geleistet mit der Ausnahme, dass von allen im Kit enthaltenen Reaktionskomponenten nur die Hälfte der angegebenen Menge verwendet wurde. Dementsprechend wurden 1 µl der DNA-Ausgangslösung zusammen mit 4,5 µl Probenpuffer in ein Eppendorfgefäß gegeben und vermischt. Danach wurde die Lösung zur DNA-Denaturierung für drei Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Parallel dazu wurden in einem anderen Eppendorfgefäß 4,5 µl Reaktionspuffer mit 0,5 µl Enzymmix, der das Enzym ‚Phi 29 DNA-Polymerase‘ enthielt, vorsichtig auf Eis vermischt. Im nächsten Schritt wurde der Inhalt beider Reagenzgefäße zusammengegeben und das Gemisch für 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch anschließende 10-minütige Erwärmung auf 95 °C

inaktiviert und die Reaktion somit beendet. Die Proben konnten dann bei 4 °C gelagert werden. Aus dem resultierenden Reaktionsansatz wurde 1 µl Volumen in die 1. nested PCR eingesetzt. In allen zuvor negativen Fällen konnte auf diese Weise ein Amplifikat in der erwarteten Fragmentlänge erhalten werden.

### **2.7 Agarose-Gelelektrophorese und Färbung der Gele**

Zur Amplifikationskontrolle wurden 15 µl des PCR-Produktes, vermischt mit 1,5 µl Ladepuffer (mit dem Farbstoffgemisch Bromphenolblau/Xylencyanol), in die Geltaschen eines 1,5 %igen Agarosegels gegeben. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8) aufgekocht. Zusätzlich wurde ein Längenstandard (100 bp DNA-Leiter, Fa. Peqlab) auf das Gel aufgetragen, um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen und diese identifizieren zu können. Hierzu wurden 1,5 µl des Längenstandards, 1,5 µl Ladepuffer und 8 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,4) miteinander vermischt. Die Gelelektrophorese wurde in 0,5 x TBE-Puffer bei 120 Volt und einer Laufzeit von ca. 1 bis 1,5 Stunden durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für ca. 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt, um die DNA-Fragmente unter UV-Licht (312 nm) sichtbar zu machen. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele photographiert.

### **2.8 DNA-Elution**

Um für die anschließende Sequenzierung saubere DNA-Fragmente zu erhalten, wurden die spezifischen Banden mit den PCR-Produkten nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution erfolgte mit Hilfe des ‚QIAquick Gel Extraction Kits‘ (Fa. Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Das Gelstück wurde abgewogen und mit der dreifachen Menge an QG-Puffer versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase, während der alle zwei Minuten das Gemisch geschüttelt wurde, wurde ein Volumenanteil Isopropanol zugegeben. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß mehrmals vorsichtig invertiert, die Lösung in eine Zentrifugationssäule gegeben und diese eine Minute bei 13000 RPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, und es wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säule pipettiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation von einer Minute. Nach Entfernung des Durchflusses wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben, und es wurde eine weitere Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule eine

Minute trocken zentrifugiert, in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, und es wurden 30 µl steriles Aqua dest. hinzugegeben. Nach einer Minute Inkubationszeit wurde ein abschließender einminütiger Zentrifugationsschritt durchgeführt, der ein Eluat mit der DNA darin lieferte.

Zur Überprüfung der Qualität und Quantität der eluierten DNA wurden 5 µl des gewonnenen Eluats auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Längenstandard wurde dieses Mal die ‚SmartLadder SF‘ (Fa. Eurogentec) aufgetragen, eine 100 bp-Leiter, deren Banden eine definierte Menge an DNA enthalten. Durch Vergleich der Banden des Längenstandards mit denen des Eluats konnte die Menge der darin enthaltenen DNA grob abgeschätzt werden. Für die Sequenzierung wurden zwischen 20 und 30 ng pro 100 bp Fragmentlänge auf ein Volumen von 10 µl eingestellt, indem Flüssigkeit mit Aqua dest. ergänzt oder mit der Vakuumzentrifuge entfernt wurde.

## 2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde in der Regel bei der Firma MWG in Auftrag gegeben und dort mittels der Cycle-Sequencing-Reaktion an einem ABI Prism 377 Sequencer (Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurde jeweils einer der PCR-Primer verwendet. Die Amplifikate wurden jeweils an beiden Strängen (d.h. in beide Richtungen) sequenziert.

Zum Teil wurden auch selber Sequenzierungen (im Institut für Evolutionsbiologie und Ökologie, Bonn) durchgeführt. Vor der Sequenzierung wurde eine Cycle-Sequencing-Reaktion angesetzt, die dem Einbau von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Terminationsnukleotiden (ddNTPs) diente; diese werden später von der Detektoreinheit des Sequenzierers (ABI Prism 377 Sequencer) erkannt. Der ‚Big Dye Terminator Kit‘ (Fa. Applied Biosystems), der für die Cycle-Sequencing-Reaktion verwendet wurde, enthielt ddNTPs, AmpliTaq DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub> und Tris-HCl-Puffer (pH 9) in unbekanntem Konzentrationen. Die Zusammensetzung eines einzelnen Cycle-Sequencing-Reaktionsansatzes und das Cycle-Sequencing-Temperaturprofil sind in den Tabellen 14 und 15 dargestellt.

**Tab. 14:** Zusammensetzung eines Cycle-Sequencing-Reaktionsansatzes

Chemikalien	Konzentration der Stocklösung	Menge (µl)	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O		1	
5 x Reaktionspuffer	5 x	1	1 x
Sequenzierprimer	100 mM	1	10 mM
AmpliTaQ DNA-Polymerase		3	
DNA		4	
Gesamtvolumen		10	

**Tab. 15:** Temperaturprofil für das Cycle-Sequencing

Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
initiale Denaturierung	96	120	
Denaturierung	96	10	15 Zyklen
Annealing	50	5	
Extension	60	90	

## 2.10 Phylogenetische Analyse

### 2.10.1 Sequenz-Alignment

Per Sequenz-Alignment mit Hilfe des Programms ClustalX (Thompson et al. 1997) wurden die ermittelten ClpC-Gensequenzen der Malariaerreger mit entsprechenden, in der GenBank abgelegten Sequenzen von neun anderen Plasmodienspezies (Tab. 16) verglichen. Ebenso wurde mit den cyt b-Sequenzen und 50 GenBank-Einträgen (Tab. 17) für zur Familie der Haemosporidae gehörende Spezies verfahren.

Tab. 16: Sequenzdaten für die ClpC-Gen-Analyse

Parasit	GenBank-Zugangsnummer	Autor
<b>Primaten-Plasmodien</b>		
<i>P. falciparum</i>	X95276	Rathore et al. (2001)
<i>P. vivax</i>	AF348344	Rathore et al. (2001)
<i>P. malariae</i>	AF348342	Rathore et al. (2001)
<i>P. cynomolgi</i>	AF348338	Rathore et al. (2001)
<i>P. knowlesi</i>	AF348341	Rathore et al. (2001)
<b>Nager-Plasmodien</b>		
<i>P. berghei</i>	AF348337	Rathore et al. (2001)
<b>Vögel-Plasmodien</b>		
<i>P. relictum</i>	AF348343	Rathore et al. (2001)
<i>P. elongatum</i>	AF348339	Rathore et al. (2001)
<i>P. gallinaceum</i>	AF348340	Rathore et al. (2001)
<b>Außengruppe</b>		
<i>T. gondii</i>	U87145	Rathore et al. (2001)

Tab. 17: Sequenzdaten für die cyt b-Gen-Analyse

Parasit	GenBank-Zugangsnummer	Autor
<b>Primaten-Plasmodien</b>		
<i>P. cynomolgi</i>	AF069616	Escalante et al. (1998)
<i>P. falciparum</i>	AF069605	Escalante et al. (1998)
<i>P. fieldi</i>	AF069615	Escalante et al. (1998)
<i>P. gonderi</i>	AF069622	Escalante et al. (1998)
<i>P. hylobati</i>	AF069618	Escalante et al. (1998)
<i>P. inui</i>	AF069617	Escalante et al. (1998)
<i>P. knowlesi</i>	AF069621	Escalante et al. (1998)
<i>P. malariae</i>	AF069624	Escalante et al. (1998)
<i>P. ovale</i>	AF069625	Escalante et al. (1998)
<i>P. reichenowi</i>	AF069610	Escalante et al. (1998)
<i>P. simiovale</i>	AF069614	Escalante et al. (1998)
<i>P. simium</i>	AF069620	Escalante et al. (1998)
<i>P. vivax</i>	AF069619	Escalante et al. (1998)
<i>Plasmodium spec.</i> (Mandrill)	AF069623	Escalante et al. (1998)
<b>Nager-Plasmodien</b>		
<i>P. atheruri</i>	AY099054	Perkins und Schall (2002)
<i>P. berghei</i>	AY099049	Perkins und Schall (2002)
<i>P. chabaudi</i>	AY099050	Perkins und Schall (2002)
<i>P. vinckei</i>	AY099052	Perkins und Schall (2002)
<i>P. yoelii</i>	AY099051	Perkins und Schall (2002)

Parasit	GenBank-Zugangsnummer	Autor
<b>Vogel-Plasmodien</b>		
<i>P. elongatum</i>	AF069611	Escalante et al. (1998)
<i>P. gallinaceum</i>	AY099029	Perkins und Schall (2002)
<i>P. relictum</i>	AY099032	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec. 1	AY099041	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec. 2	AY099031	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec. 3	AY099033	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec. 4	AY099035	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec. 5	AY099036	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec. 6	AY099044	Perkins und Schall (2002)
<b>Eidechsen-Plasmodien</b>		
<i>P. agamae</i>	AY099048	Perkins und Schall (2002)
<i>P. azurophilum</i> (Erythrozyt)	AY099055	Perkins und Schall (2002)
<i>P. azurophilum</i> (Leukozyt)	AY099058	Perkins und Schall (2002)
<i>P. chiricahuae</i>	AY099061	Perkins und Schall (2002)
<i>P. fairchildi</i>	AY099056	Perkins und Schall (2002)
<i>P. floridense</i>	AY099059	Perkins und Schall (2002)
<i>P. giganteum</i>	AY099053	Perkins und Schall (2002)
<i>P. mexicanum</i>	AY099060	Perkins und Schall (2002)
<i>Plasmodium</i> spec.	AY099047	Perkins und Schall (2002)
<b>Hepatocystis von Säugern</b>		
<i>Hepatocystis</i> spec. (Pavian)	AF069626	Escalante et al. (1998)
<i>Hepatocystis</i> spec. (Fledermaus)	AY099030	Perkins und Schall (2002)
<b>Haemoproteus von Vögeln</b>		
<i>H. majoris</i>	AY099045	Perkins und Schall (2002)
<i>H. sylvae</i>	AY099040	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 1	AY099034	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 2	AY099037	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 3	AY099043	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 4	AY099046	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 5	AY099039	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 6	AY099038	Perkins und Schall (2002)
<i>Haemoproteus</i> spec. 7	AY099042	Perkins und Schall (2002)
<b>Haemoproteus der Eidechsen</b>		
<i>H. ptyodactyli</i>	AY099057	Perkins und Schall (2002)
<i>H. kopki</i>	AY099062	Perkins und Schall (2002)
<b>Außengruppen</b>		
<i>Toxoplasma gondii</i>	U03070	Holmdahl et al. (1994)
<i>Leucocytozoon dubreuli</i>	AY099063	Perkins und Schall (2002)
<i>Leucocytozoon simondi</i>	AY099064	Perkins und Schall (2002)
<i>Theileria annulata</i>	M63015	Megson et al. (1991)

### 2.10.2 Maximum-Parsimonie

Phylogenetische Analysen für das *cyt b*- und das *ClpC*-Gen wurden mit den Programmen PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony) 4.0 beta 10 (Swofford 1999), basierend auf den Ergebnissen des ClustalX-Alignments (Thompson et al. 1997), durchgeführt.

Bei der Maximum-Parsimonie (MP)-Methode wird davon ausgegangen, dass die Topologie eines Stammbaumes die realen Verhältnisse am besten wiedergibt, wenn sie die heute zu beobachtenden Sequenzunterschiede mit den wenigsten Substitutionsereignissen erklärt. Man geht hierbei von den Sequenzen des ClustalX-Alignments aus, ermittelt für jede Nukleotid-Position das Nukleotid der Vorläufersequenzen an den internen Knoten des Baumes, und zählt für jede mögliche Topologie die minimale Anzahl an Substitutionen, die die Evolution der Gruppe erklären kann. Die optimale Topologie von allen ist die, welche die wenigsten Substitutionen aufweist.

Die MP-Methode verwendet nicht alle Positionen eines Alignments. Positionen, die in allen Sequenzen gleich sind, sind uninformativ und werden nicht berücksichtigt. Bei Positionen, an denen nur eine Sequenz eine bestimmte Substitution aufweist, muss diese Substitution an einem terminalen Ast liegen, da diese Positionen unter dem Parsimonie-Kriterium keine Schlüsse auf die verwandtschaftliche Beziehung einer Art zulassen. Parsimonie-informativ hingegen sind all die Positionen, an denen mehr als eine Sequenz eine bestimmte Substitution aufweist. Nachteil der MP-Methode ist, dass Fehlinterpretationen aufgrund von Homoplasien (mehrfaches unabhängiges Entstehen von Merkmalen) auftreten können.

In die Berechnung mit PAUP wurden Außengruppen (Tab. 16 und 17) mit einbezogen, um den Baum zu wurzeln, d.h. einen zeitlichen Ablauf der Evolution zu veranschaulichen. Für das *ClpC*-Gen wurde *T. gondii* als Außengruppe gewählt, ein Parasit, der, wie die Plasmodien, zu der Unterklasse der Coccidia gehört. In die Berechnung des *cyt b*-Gens wurden zusätzlich noch drei andere Parasiten aus der Ordnung der Apicomplexa mit einbezogen: *Leucocytozoon dubreuli* und *L. simondi* aus der Familie der Leucocytozoidae, die zusammen mit den Plasmodien in der Unterordnung Haemosporina stehen, und *Theileria annulata*, ein Parasit der Unterklasse Piroplasmida (Systematik nach Levine et al. 1980). Die Außengruppen wurden so gewählt, dass sie so entfernt verwandt mit den Innengruppen waren, dass sie den Baum wurzeln konnten; andererseits mussten sie so nah mit ihnen verwandt sein, dass sie gemeinsame Vorfahren aufwiesen (Hall 2001).

### 2.10.3 Maximum Likelihood

Zur Berechnung des Maximum Likelihood (ML)-Baumes wurde das Programm Modeltest 3.0 (Posada und Crandall 1998) an das Programm PAUP (Swofford 1999) gehängt. Modeltest ist in der Lage, 56 verschiedene Substitutionsmodelle zu testen. Das Optimierungskriterium bei ML-Methoden ist die ‚Likelihood‘ des Datensatzes unter Vorgabe einer bestimmten Topologie und eines bestimmten Substitutionsmodells. Die Topologie, bei der die ‚Likelihood‘ maximal ist, ist die optimale. Wenn man ML-Methoden verwendet, muss man sich zwischen verschiedenen Substitutionsmodellen entscheiden, wobei im Prinzip jedes Modell falsch ist, da es die wahren Verhältnisse nur grob vereinfacht darstellen kann. Je komplizierter ein Modell ist, desto genauer spiegelt es in der Regel die Wirklichkeit wieder. Bei Verwendung eines komplizierteren Modells besteht allerdings die Gefahr, dass man nicht die wahre Phylogenie beschreibt, weil die Varianz zunimmt. ML bietet die Möglichkeit, sich aufgrund eines statistischen Kriteriums zwischen verschiedenen Methoden zu unterscheiden. Zunächst maximiert man die ‚Likelihood‘-Funktion über alle Parameter eines vorher ausgesuchten Modells. Dann wählt man ein komplizierteres Modell und wiederholt die Berechnung. So sucht man nach einem Substitutionsmodell, für das die ‚Likelihood‘-Funktion maximal ist. Die Modelle können im Prinzip immer weiter verfeinert werden, um die ‚Likelihood‘-Funktion zu verbessern. Oberhalb einer gewissen Grenze sind diese Verbesserungen allerdings nur noch minimal. Wenn das kompliziertere Modell jeweils ein Spezialfall des einfacheren ist, kann man testen, ob die Unterschiede zwischen den Fällen noch signifikant sind. Sind sie es nicht, kann das kompliziertere Modell den Datensatz nicht wesentlich besser erklären als das einfachere Modell. In diesem Fall entscheidet man sich für das einfachere Modell. Das einfachste der 56 Modelle ist das Jukes-Cantor Modell (Jukes und Cantor 1969). Dieses hat zur Grundlage, dass die Substitutionsraten zwischen allen Nukleotiden als gleich angesehen werden. Das Kimura-2-Parameter Modell (Kimura 1980) unterscheidet zwischen Transitions- und Transversionsraten. Das HKY-Modell (Hasegawa et al. 1985) berücksichtigt, dass die Nukleotide in unterschiedlichen Mengen vorkommen, was die Substitutionsraten auch beeinflusst. Im GTR-Modell (General time reversible; Lanavé et al. 1984) geht man von unterschiedlichen Raten für alle Arten von Substitutionen aus. Alle diese Modelle nehmen an, dass die Substitutionsraten für alle Positionen einer Sequenz die gleichen sind. Das trifft aber in der Regel nicht zu. So haben z.B. manche Gene stärker und schwächer konservierte Regionen. Erste, zweite und dritte Codonpositionen von Aminosäure-kodierenden DNA-Sequenzen haben meist auch verschiedene Substitutionsraten, da die dritte Codonposition meist „still“ ist und nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im

Falle einer Punktmutation führen würde. Auch diese Variation kann man in Substitutionsmodellen berücksichtigen, indem man verschiedenen Positionen des Alignments unterschiedliche Substitutionsraten aus einer Häufigkeitsverteilung (Gamma-Verteilung) zuweist.

#### 2.10.4. Baye'ssche Analyse

Die mit dem Programm Modeltest (Posada und Crandall 1998) ermittelte optimale Modellkomplexität wird der Bayes'schen Analyse (Programm MrBayes V3 b4 v2win; Huelsenbeck 2001) vorgegeben, um die ‚a posteriori‘-Wahrscheinlichkeit der freien Modellparameter für die Topologien und die Zweiglängen zu ermitteln. Die ‚Markov-Chain Monte Carlo‘-Methode (MCMC), die in MrBayes V3 b4 v2win (Huelsenbeck 2001) angewandt wird, berechnet die ‚a posteriori‘-Wahrscheinlichkeit aus einer Zufallsstichprobe von Bäumen, in denen die Bäume proportional zu posteriorer Wahrscheinlichkeit vertreten sind. Ausgehend von einem Zufallsbaum verändert das Computerprogramm bei jedem Schritt der Markov-Kette einen Parameter der Phylogenie. Verbessert sich die posteriore Wahrscheinlichkeit, wechselt das Computerprogramm zu einem neuen Baum, verschlechtert sie sich, wird die Veränderung nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit akzeptiert. Auf diese Weise bewegt sich das Programm durch den „Wahrscheinlichkeitsraum“ aller möglicher Phylogenien, wobei es Bäume proportional zu ihrer posteriorer Wahrscheinlichkeit sammelt. Nur eine geringe Anzahl „besuchter“ Bäume wird gespeichert, um so eine Zufallsstichprobe zu erhalten. Innerhalb der Markov-Kette ist allerdings jeder Baum unmittelbar von seinem Vorgänger abhängig, so dass es sich nicht um eine unabhängige Stichprobe handelt. Die Abhängigkeit wird allerdings immer geringer, je mehr Schritte sich zwischen den gesammelten Bäumen befinden. Die ersten Schritte werden verworfen, da die Werte wahrscheinlich weit von Regionen hoher posteriorer Wahrscheinlichkeit entfernt liegen. Parallel laufen vier verschiedene Markov-Ketten, die von verschiedenen Zufallsbäumen ausgehen. Das erhöht die Chance, dass die Analyse im optimalen Bereich der ‚Likelihood‘-Oberfläche konvergiert. Der jeweils beste Wert der vier Ketten wird von einer so genannten „kalten Kette“ beibehalten, die drei anderen „heißen“ Ketten suchen weiter nach den besten posteriorer Wahrscheinlichkeits-Werten. Eine hohe Generationenzahl (= Schritte) erhöht die Chancen, gute posteriore Wahrscheinlichkeits-Werte zu bekommen. Anschließend wird ein Konsensusbaum aus der Summe der Einzelbäume erstellt und die Kanten auf deren Häufigkeit im Set untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl für das *cyt b*-, als auch für das *ClpC*-Gen folgende MrBayes-Befehlszeile in das Computerprogramm eingegeben:

```
lset nst=6 rates=gamma;
mcmc ngen=2000000 printfreq=1000 samplefreq=100 nchains=4 savebrlens=yes
startingtree=random burnin=2000 contype=halfcompat
```

Befehl:

lset nst=6 rates=gamma

mcmc ngen=2000000

printfreq=1000

samplefreq=100

nchains=4

savebrlens=yes

startingtree=random

burnin=2000

contype=halfcompat

Bedeutung:

mit Modeltest berechnetes Substitutionsmodell

Zahl der Generationen (= Schritte)

‚Likelihood‘-Werte jedes 1000. Schrittes der Markov-Ketten werden auf dem Bildschirm angezeigt

jeder 100. Baum wird gesammelt

4 Markov-Ketten laufen (1 ‚kalte‘, 3 ‚heiße‘)

Astlängen werden gespeichert

Test beginnt mit einem Zufallsbaum

die ersten 2000. Schritte werden verworfen

‚Contype‘ beschreibt den Konsensusbaum; in diesem Fall wird die 50 % majority rule angewendet (Konsensusbaum mit allen Ästen, die in mindestens 50 % aller Bäumen vorkommen)

### 2.10.5 Analyse der Sekundärstruktur der 18 SSU rRNA

Die 18 SSU rDNA wurde hinsichtlich der RNA-Sekundärstruktur, beruhend auf dem RNA-Substitutionsmodell, mittels des Programms PHASE 2.0 beta (Jow et al. 2005) analysiert, um einen phylogenetischen Baum zu erstellen. Das 18 SSU rRNA-Datenset stammt aus der ‚European Ribosomal Datenbank‘ (<http://www.psb.ugent.be/rRNA>). Die aus dem Datenset (Tab. 18) entnommenen Sequenzen mit ihren Strukturannotationen wurden als Master-Sequenz genommen und mit Hilfe des Programms Bioedit (Hall 1999) bearbeitet.

Die meisten phylogenetischen Programme gehen von der Annahme aus, dass Substitutionen unabhängig voneinander auftreten; diese Annahme gilt aber nicht für RNA-Gene. PHASE 2.0 beta (Phylogenetics and sequence evolution; Jow et al. 2005) dient dazu, RNA-Sequenzen zu analysieren, die eine konservierte Sekundärstruktur besitzen, wie zum Beispiel die rRNA und die tRNA. Diese Sekundärstruktur spielt eine wichtige Rolle, und eine Störung würde die

Funktion der Gene stark beeinträchtigen. Die Sequenz der Primärstruktur hingegen kann stark variieren, was besonders in den RNA-Schleifen zu beobachten ist (Jow et al. 2002). Die Sekundärstruktur bleibt unverändert, wenn komplementäre Substitutionen auftreten. Im Falle der RNA-Gene können an den gepaarten Nukleotidpositionen (Stämme) kompensatorische Substitutionen auftreten, das heißt, dass Substitutionen, die auf einer Seite des Stammes auftreten, eine Substitution auf der anderen Seite nach sich ziehen können. Diese können in einem Schritt (doppelte Substitution) oder in zwei Schritten (zwei einfache Substitutionen) auftreten. In einem Zwei-Schritte-Prozess existiert als Übergangszustand, meistens ein UG- oder GU-Nukleotidpaar, welches nicht so thermostabil wie ein Watson-Crick-Paar (AT- und GC-Nukleotidpaare, die die spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix ausbilden), aber von allen möglichen Fehlbildungen die wahrscheinlichste ist. Von den 16 möglichen Basenpaarungen gehen nur sechs wirklich stabile Bindungen ein (AU, GU, GC, UA, UG, CG). Die restlichen Paarungen kommen nur in geringer Anzahl vor. Im Programm PHASE 2.0 beta vereinigen sich mehrere Rechenprogramme, um der biologischen Realität ein wenig näher zu kommen: die Bayes'sche Analyse (allerdings nur mit einer Kette) und mehrere ML-Tests. Zusätzlich werden die gepaarten Substitutionen berücksichtigt.

Folgende Berechnungsmodelle wurden mit PHASE 2.0 beta ausgeführt:

Befehl:

Model = Mixed model:

Bedeutung:

zwei Modelle werden berechnet, das erste für die Schleife, das zweite für den Stamm der Sekundärstruktur

REV + dG4 + I & RNA7D + dG4 + I:

REV

Substitutionsmodell nach Yang (1994), berücksichtigt das ‚time reversible model‘, ein symmetrisches Modell, bei dem der Übergang von einem Nukleotid zum anderen gleich wahrscheinlich ist

dG4

diskrete Gamma-Verteilung mit 4 Parametern (Modell, das die kontinuierliche Variabilität der Substitutionsraten der Sequenz noch realistischer als die Invarianz darstellt; Yang 1994)

I	berücksichtigt die Invarianz (Teile der Sequenz evolvieren konstant, andere invariant)
RNA7D	RNA-Modell (Tillier und Collins 1998); betrachtet Nukleotidpaare des Stammes als eine Einheit; berücksichtigt die 6 stabilen Basenpaarungen; alle möglichen Fehlbildungen werden in einem Parameter zusammengefasst
burning iterations = 120000	die ersten 120000 Schritte werden verworfen
sampling iterations = 500000	Zahl der Generationen (= Schritte)
sampling period = 100	jeder 100. Baum wird gesammelt
random start model parameters = yes	Modell wird mit zufälligen Parametern gestartet
random start tree = yes	Test beginnt mit einem Zufallsbaum

**Tab. 18:** Sequenzdaten für die 18 SSU rRNA-Gen-Analyse

Parasit	GenBank-Zugangsnummer	Autor
<b>Primaten-Plasmodien</b>		
<i>P. vivax</i>	X13926	Waters und McCutchan (1989)
	U03079	Qari et al. (1994)
	U07367	Li et al. (1994b)
	U93233	Li et al. (1997)
	U83877	Montoya et al. (1997)
	U93235	Li et al. (1997)
	U93095	Li et al. (1997)
	U93234	Li et al. (1997)
	U07368	Li et al. (1994b)
	U03080	Qari et al. (1994)
<i>P. ovale</i>	L48986	Qari et al. (1996)
	AJ001527	Tahar und Basco (1997)
	X99790	Basco (1996)
	L48987	Quari et al. (1996)
<i>P. malariae</i>	M54897	Goman et al. (1991)
<i>P. falciparum</i>	M19172	McCutchan et al. (1988)
	M19173	McCutchan et al. (1988)
<i>P. reichenowi</i>	Z25819	Thomas et al. (1993)
<i>P. cynomolgi</i>	L07559	Waters et al. (1993b)
	L08241	Corredor und Enea (1994)
	L08242	Corredor und Enea (1994)
<i>P. fragile</i>	M61722	Waters et al. (1991)
<i>P. knowlesi</i>	L07560	Waters et al. (1993b)
	U72542	Montoya et al. (1996)
	U83876	Montoya et al. (1997)
<i>P. simium</i>	U69605	Suarez et al. (1996)
<i>P. inui</i>	U72541	Montoya et al. (1996)

Parasit	GenBank-Zugangsnummer	Autor
<b>Vogel-Plasmodien</b> <i>P. gallinaceum</i> <i>P. lophurae</i>	M61723 X13706	Waters et al. (1991) Waters et al. (1989)
<b>Eidechsen-Plasmodien</b> <i>P. mexicanum</i> <i>P. floridense</i>	L11716 L11717	Dame et al. (1993) Dame et al. (1993)
<b>Nager-Plasmodium</b> <i>P. berghei</i>  <i>P. yoelii</i>	M14599 AJ243513 M19712 AF180727	Gunderson et al. (1986) van Spaendonk et al. (2000) Gunderson et al. (1987) Witney et al. (2001)
<b>Außengruppe</b> <i>Toxoplasma gondii</i>	U03070	Holmdahl et al. (1994)

### 2.10.6 Graphische Darstellung der phylogenetischen Stammbäume

Die Stammbäume für das cyt b-, das ClpC- und das 18 SSU rRNA-Gen wurden mit den Programmen Treeview (Page 1996) und Adobe Illustrator 9.0 visualisiert.

## 2.11 Lichtmikroskopische Untersuchungen

### 2.11.1 Vogelblut-Ausstriche

In Verbindung mit den verschiedenen Aktionen zum Fang der niedersächsischen Vögel waren nur von den Blutproben der 2002 in Lingen gefangenen Tannenmeisen Blutausstriche angefertigt worden. Die mit Methanol fixierten Objektträger wurden zur Anfärbung nach Giemsa mit der Oberseite nach unten für 12 Minuten in eine Färbewanne gelegt. Die Färbelösung bestand zu einem Teil aus einer Giemsa-Stammlösung (Fa. Merck) und zu 9 Teilen aus einem Puffer mit dem pH-Wert 7,2. Die Pufferlösung war aus zwei, in 2000 ml Aqua dest. gelösten Puffertabletten (Fa. Merck) hergestellt worden. Anschließend wurden die Ausstriche mit Leitungswasser abgespült und an der Luft getrocknet. Durch die Giemsa-Färbung erscheinen die Kerne der Malariaerreger rot, das Zytoplasma blau.

Aufgrund der langen Lagerungszeit der Blutausstriche, die nach dem Ausstreichen nicht fixiert worden sind, hatten nur noch 20 eine ausreichende Qualität, um sie lichtmikroskopisch auszuwerten. Bei den restlichen waren nach der Anfärbung kaum klare Strukturen, sondern fast ausschließlich zerstörte Zellen und Zellkerne unter dem Mikroskop erkennbar.

Der Versuch einer Herstellung von Blutaussstrichen aus tiefgefrorenen Blutproben der Trauerschnäpper und Kohlmeisen aus den anderen Jahrgängen erwies sich als nicht erfolgreich. Unter dem Mikroskop waren nach Giemsa-Anfärbung der ausgestrichenen viskosen Phase der einzelnen Proben nur Blutzellfragmente sichtbar.

### 2.11.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Um lichtmikroskopische Aufnahmen von den in Paraffin eingebetteten Organen des Pinguins und des Balistars machen zu können, mussten zunächst Paraffinschnitte angefertigt werden (Romeis 1968). Diese wurden nach Giemsa und mit Hämatoxylin nach Delafield gefärbt, um die Parasiten im Gewebe photographieren zu können. Um die Präparate anfärben zu können, musste allerdings erst das Paraffin entfernt werden. Hierzu wurden die Objektträger jeweils zweimal für fünf Minuten in eine Küvette mit Xylol gegeben. Danach wurde das Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe wieder entfernt. Hierbei wurden die Objektträger erst jeweils zweimal für fünf Minuten in ein Gefäß mit 100 %igem Ethanol gegeben, dann für fünf Minuten in ein Gefäß mit 90 %igem Ethanol und anschließend ebenso lange in ein Gefäß mit 70 %igem Ethanol. Abschließend wurde der Objektträger kurz in Aqua dest. gewaschen. Zur Färbung des Schnittes nach Giemsa wurde dieser zwei Stunden in eine Färbelösung aus folgenden Komponenten gegeben:

12 ml Aqua dest.

2,5 ml Aceton

0,2 M Essigsäure

0,2 M Na-Acetat

1,25 ml Giemsa-Stammlösung

Zur Anfärbung des Schnittes mit Hämatoxylin nach Delafield wurde dieser 90 Minuten lang in eine Färbelösung mit folgender Zusammensetzung gegeben:

5 mM Hämatoxylin

0,25 ml Ethanol abs.

2,2 mM Ammoniumalaun

1 ml Glyzerin

1 ml Methanol

100 ml Aqua dest.

Zur anschließenden Entwässerung der Schnitte wurden diese für jeweils drei bis fünf Sekunden in Aceton, dann kurz in ein Aceton/Xylol-Gemisch (Verhältnis 1:1) und schließlich kurz in Carboxyxytol getaucht. Im letzten Schritt wurden die Schnitte dreimal kurz mit Xylol gewaschen und dann mit DePeX (Fa. Serva) eingedeckt. Im Gegensatz zu den nach Giemsa gefärbten Blutaussstrichen erscheinen bei den Organen im Paraffinschnitt die Kerne der Malariaerreger blau und ihr Cytoplasma rot.

### **2.12 Statistische Auswertungen**

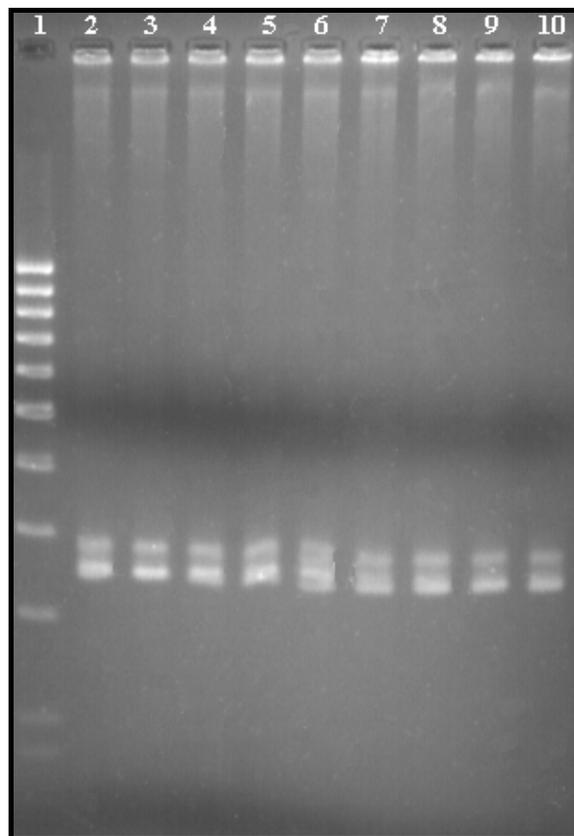
Die statistische Auswertung der ermittelten Daten für die niedersächsischen Vögel wurde mit dem Programm SPSS 10.0 durchgeführt. Für alle Fragestellungen konnte der Gaußtest (G-Test) verwendet werden, wobei Wahrscheinlichkeitswerte von  $p \leq 0,05$  als signifikant angesehen wurden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Infektionsprävalenzen und Erregerspektrum bei den niedersächsischen Vogelpopulationen

#### 3.1.1 Infektionsprävalenzen einheimischer Vögel mit Malariaparasiten

Unter den 369 getesteten niedersächsischen Vögeln wurden bei 76 Individuen (20,6 %) mittels Genus-spezifischer PCR (Hulier et al. 1996) Malariaerreger nachgewiesen (Abb. 2).



**Abb. 2:** Beispiel für ein Agarosegel mit den nach Hulier et al. (1996) amplifizierten 18 SSU rRNA-Genabschnitten

(Spur 1: 100 bp DNA-Leiter; Spuren 2-10: verschiedene Kohlmeisen aus Bahrdorf)

Die prozentuale Verteilung der positiven Vögel auf Arten und Herkunft ist in Tabelle 19 dargestellt.

**Tab. 19:** Prozentuale Anteile infizierter Vögel

	Bahrdorf	Lingen	gesamt
Tannenmeisen ( <i>Parus ater</i> )	36 % (9/25)	13 % (9/69)	19,1 % (18/94)
Trauerschnäpper ( <i>Ficedula hypoleuca</i> )	6,9 % (5/72)	6,8 % (10/147)	6,8 % (15/219)
Kohlmeisen ( <i>Parus major</i> )	76,8 % (43/56)	-----	76,8 % (43/56)
gesamt	37,3 % (57/153)	8,8 % (19/216)	20,6 % (76/369)

Insgesamt waren 20,6 % aller untersuchten Tiere mit Malariaerregern infiziert. Von den Vögeln aus Bahrdorf waren 37,3 %, von denen aus Lingen 8,8 % positiv.

Mit mehr als dreiviertel aller infizierten Individuen (76,8 %) wiesen die **Kohlmeisen** die insgesamt höchste Infektionsprävalenz auf. Diese war signifikant höher als die der Tannenmeisen (G-Test;  $G=50,185$ ,  $p<0,001$ ,  $df=1$ ) und die der Trauerschnäpper (G-Test;  $G=113,271$ ,  $p<0,000$ ,  $df=1$ ). Die Tannenmeisen wiesen mit 19,1 % eine fast dreimal höhere und signifikant andere (G-Test;  $G=9,678$ ,  $p=0,002$ ,  $df=1$ ) Infektionsprävalenz als die Trauerschnäpper (6,8 %) auf.

In der Bahrdorfer Population der **Tannenmeisen** war etwa jedes dritte Tier infiziert, während die Lingener Tannenmeisen nur zu 13 % befallen waren. Dieser Unterschied zwischen den beiden Tannenmeisen-Populationen war ebenfalls signifikant (G-Test;  $G=5,708$ ,  $p=0,028$ ,  $df=1$ ).

Die Infektionsprävalenzen der beiden **Trauerschnäpper**-Populationen waren in beiden Orten nahezu gleich hoch (6,9 % in Bahrdorf und 6,8 % in Lingen) und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (G-Test;  $G=0,002$ ,  $p=0,969$ ,  $df=1$ ).

Da aus Lingen keine Blutproben der Kohlmeisen vorlagen, konnte für dieses Fanggebiet kein Vergleich der Infektionsprävalenzen gezogen werden.

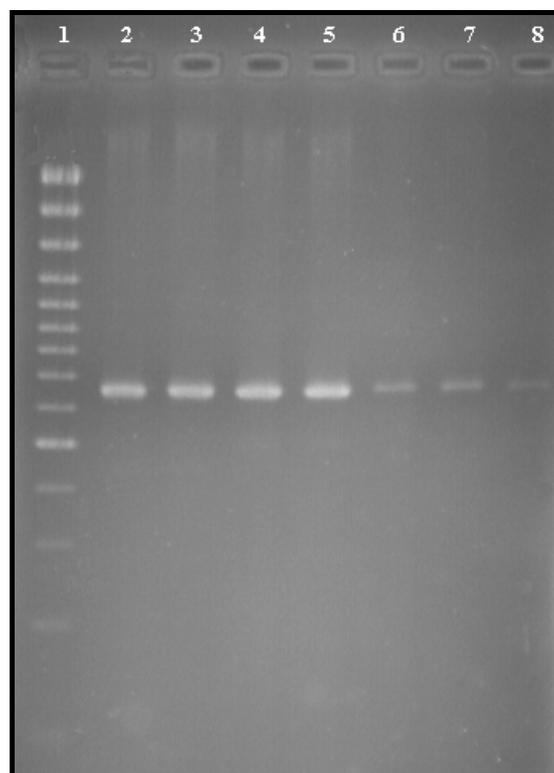
Die Infektionsprävalenzen der verschiedenen Vogelarten unterschieden sich im Fanggebiet Bahrdorf signifikant voneinander, wobei die Trauerschnäpper am wenigsten befallen waren

und die Kohlmeisen am stärksten (G-Test; Tannenmeisen/Trauerschnäpper:  $G=11,085$ ,  $p=0,001$ ,  $df=1$ ; Tannenmeisen/Kohlmeisen:  $G=12,310$ ,  $p<0,001$ ,  $df=1$ ; Trauerschnäpper/Kohlmeisen:  $G=72,356$ ,  $p<0,001$ ,  $df=1$ ). In Lingen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektionsprävalenzen der Tannenmeisen und der Trauerschnäpper festgestellt werden (G-Test;  $G=2,153$ ,  $p=0,142$ ,  $df=1$ ).

Von den infizierten Vögeln waren insgesamt 43,4 % weiblichen und 56,6 % männlichen Geschlechts. Bei der Auftrennung nach den verschiedenen Arten zeigte sich, dass von den mit Malariaparasiten befallenen Tannenmeisen 72,2 % Männchen und 27,8 % Weibchen waren. Bei den infizierten Trauerschnäppern waren 60 % männlich und 40 % weiblich, bei den Kohlmeisen 48,8 % männlich und 51,2 % weiblich.

### 3.1.2. Erregerspektrum einheimischer Vögel mit Haemosporina

Die PCR-Amplifikation des parasitären cyt b-Genabschnitts der 76 von Malariaerregern befallenen Vögel nach Waldenström et al. (2004) erbrachte DNA-Fragmente in einer Länge zwischen 522 bis 528 Basenpaaren (Abb. 3).



**Abb. 3:** Beispiel für ein Agarosegel mit den nach Waldenström et al. (2004) amplifizierten cyt b-Genabschnitten

(Spur 1: 100 bp DNA-Leiter; Spuren 2-8: verschiedene Tannenmeisen aus Lingen)

Die Sequenzierung der amplifizierten cyt b-Genabschnitte lieferte 13 unterschiedliche DNA-Sequenzen (s. Alignment im Anhang Abb. 17-29), die sich in 2,9 bis 8,5 % (13 bis 45 Nukleotide) voneinander unterschieden. Eine der Sequenzen konnte 30mal gefunden werden, und zwar bei allen drei Vogelarten. Am zweithäufigsten (17mal) wurde eine Sequenz ermittelt, die nur bei einer Vogelspezies (Kohlmeisen) auftrat, und am dritthäufigsten eine Sequenz, die zusammen elfmal bei zwei Vogelarten (Kohl- und Tannenmeisen) vorkam. Eine weitere Sequenz trat insgesamt fünfmal bei zwei Vogelarten (Tannenmeisen und Trauerschnäpper) auf. Die restlichen neun Sequenzen, die jeweils einmal bei je drei Tieren, zweimal bei je zwei sowie sechsmal bei je einem Tier gefunden wurden, traten immer nur bei einer Vogelspezies auf.

Zur Ermittlung des Erregerspektrums wurden die DNA-Sequenzen mit Hilfe des Suchalgorithmus 'BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blastn](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blastn)) mit den Datenbankeinträgen in der GenBank verglichen. Von 59 Fällen, in denen eine absolute Übereinstimmung mit GenBank-Einträgen zu finden war, konnten 17 als *Haemoproteus majoris* identifiziert werden. Die anderen 42 DNA-Sequenzen konnten zwar keiner bekannten Erregerspezies zugeordnet werden, zeigten aber eine vollständige Sequenzübereinstimmung mit GenBank-Einträgen für *Plasmodium spec.*. Die verbleibenden siebzehn der 76 Sequenzen zeigten immerhin eine mehr als 98 %ige Übereinstimmung mit GenBank-Einträgen für die Gattungen *Plasmodium* und *Haemoproteus*.

In den Tabellen 20 bis 22 sind die aufgrund des Genbank-Abgleiches für die einzelnen infizierten Vögel ermittelten Erreger aufgeführt, wobei jedes Kästchen für einen infizierten Vogel steht und jede Farbe eine spezifische DNA-Sequenz repräsentiert.

### 3.1.2.1 Erregerspektrum bei den Tannenmeisen

Bei den Tannenmeisen wurden insgesamt drei unterschiedliche DNA-Sequenzen gefunden, die möglicherweise für verschiedene Erregerspezies stehen. Eine Sequenz trat 13mal, eine viermal und eine einmal auf (Tab. 20). Eine DNA-Sequenz war sowohl bei den Lingener als auch bei den Bahrdorfer Tannenmeisen zu finden und je eine DNA-Sequenz ausschließlich in einer der beiden Vogelpopulationen.

**Tab. 20:** Spektrum der cyt b-Sequenzen bei den Tannenmeisen

Bahrdorf 1993	Lingen 2002
<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495576)*
<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*
9/25	9/69

Die GenBank-Zugangsnummern entsprechen den GenBank-Einträgen mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei \*\* eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.

Zu der Sequenz, die nur bei einer Tannenmeise aus Bahrdorf nachgewiesen wurde, konnte keine 100 %ig übereinstimmende in der GenBank gefunden werden. Die höchste Übereinstimmung (98,48 %) wurde zu einer Sequenz für *Plasmodium spec.* mit der Zugangsnummer AF069611 ermittelt. Dieselbe cyt b-DNA-Sequenz wurde noch zehnmal bei den Bahrdorfer Kohlmeisen festgestellt.

Die bei den Tannenmeisen mit 13mal häufigste DNA-Sequenz kam in beiden niedersächsischen Fanggebieten vor. Ebenso wurde sie bei den Lingener Trauerschnäppern und bei den Bahrdorfer Kohlmeisen gefunden. Insgesamt war sie die am häufigsten vertretene Sequenz und die einzige, die bei allen drei Vogelwirtsarten ermittelt wurde. Die bei den Tannenmeisen viermal vorkommende DNA-Sequenz trat nur in Lingen auf, die einzeln aufgetretene nur in Bahrdorf.

### 3.1.2.2 Erregerspektrum bei den Trauerschnäppern

Bei den Trauerschnäppern wurden zehn unterschiedliche DNA-Sequenzen ermittelt. Davon trat eine dreimal auf, drei traten je zweimal und sechs je einmal auf (Tab. 21). In Lingen wurden sechs und in Bahrdorf vier unterschiedliche DNA-Sequenzen gefunden.

**Tab. 21:** Spektrum der cyt b-Sequenzen bei den Trauerschnäppern

Lingen 1996	Bahrdorf 1996
<i>Haemoproteus</i> spec. (AY714154)	<i>Plasmodium</i> spec. (DQ060773)
<i>Haemoproteus</i> spec. (AY714154)	<i>Plasmodium</i> spec. (AF495568)
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495576)*	<i>Plasmodium</i> spec. (AF254963)
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495571)*	<i>Plasmodium</i> spec. (AF254963)
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495571)*	<i>Plasmodium</i> spec. (AF465555)
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495568)*	
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495568)*	
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495568)*	
<i>Plasmodium</i> spec. (AF495577)*	
<i>Plasmodium</i> spec. (AY393792)*	
10/147	5/72

Die GenBank-Zugangsnummern entsprechen den GenBank-Einträgen mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei \*\* eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.

Bei den Trauerschnäppern konnte für vier DNA-Sequenzen, von denen zwei je zweimal und zwei je einmal vorkamen, keine identische GenBank-Sequenz gefunden werden. Nichtsdestoweniger wurde eine Sequenz davon, die bei den Vögeln aus Lingen zweimal vorkam, der Gattung *Haemoproteus* zugewiesen, da sie einer entsprechenden Sequenz aus der GenBank (Zugangsnummer AY714154) am meisten ähnelte (98,06 % Übereinstimmung). Die zweimal vorkommende Sequenz bei den Vögeln aus Bahrdorf stimmte zu 98,33 % mit einer Sequenz aus der GenBank (Zugangsnummer AF254963) überein, die als *Plasmodium* spec. gekennzeichnet war. Die übrigen zwei Sequenzen, die keine Identität mit GenBank-Einträgen zeigten, wurden bei den Trauerschnäppern aus Bahrdorf gefunden. Sie zeigten die höchsten Übereinstimmungen mit den GenBank-Zugangsnummern AF465555 (99,41 %) und AF495568 (99,32 %), die ebenfalls für *Plasmodium* spec. stehen.

Von den neun Trauerschnäppern, deren DNA-Sequenzen vollständig mit einem Eintrag in der GenBank übereinstimmten (*Plasmodium spec.*), stammten alle bis auf eine aus Lingen. Drei Sequenzen, von denen eine dreimal und zwei je einmal vorkamen, wurden ausschließlich bei Trauerschnäppern gefunden. Von den restlichen beiden Sequenzen, die bei den Lingener Trauerschnäppern gefunden wurden, kam eine, die zweimal auftrat, auch bei den Tannenmeisen aus Lingen und Bahrdorf sowie bei den Kohlmeisen vor. Die andere nur einmal gefundene DNA-Sequenz wurde auch bei den Lingener Tannenmeisen viermal gefunden. Die einzelne bei den Vögeln aus Bahrdorf gefundene Sequenz, die eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem GenBank-Eintrag zeigte, trat bei den beiden anderen untersuchten Vogelarten nicht auf.

### 3.1.2.3. Erregerspektrum bei den Kohlmeisen

Bei den Kohlmeisen, die nur in Bahrdorf gefangen worden waren, wurden insgesamt vier verschiedene DNA-Sequenzen festgestellt. Die Sequenzen kamen jeweils 17-, 14-, zehn- und einmal vor (Tab. 22).

**Tab. 22:** Spektrum der cyt b-Sequenzen bei den Kohlmeisen

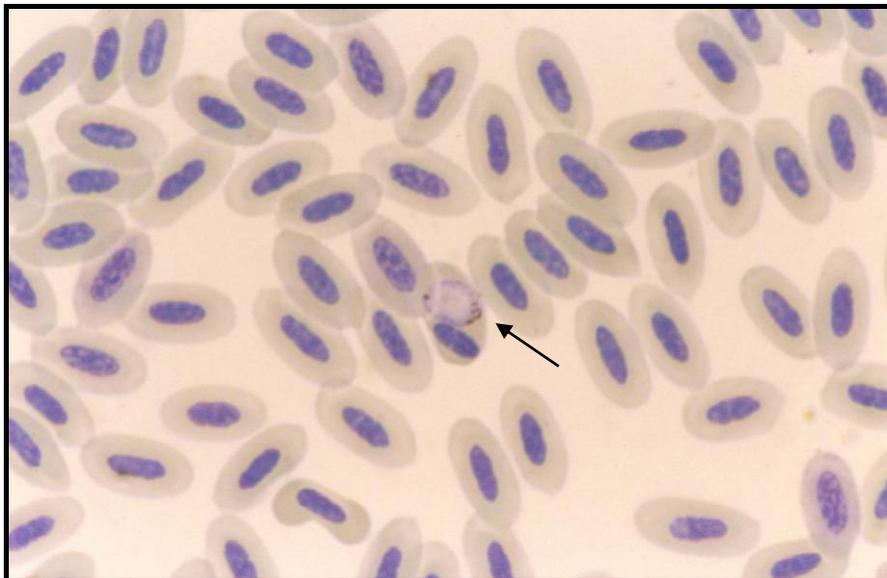
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495553)*
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF069611)	
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*		
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*		
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*		
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*		
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*	<i>Plasmodium spec.</i> (AF495571)*		
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*			
<i>Haemoproteus majoris</i> (AF254977)*			

Die GenBank-Zugangsnummern entsprechen den GenBank-Einträgen mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei \*\* eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.

Die bei den Kohlmeisen am häufigsten vorkommende DNA-Sequenz war identisch mit einer GenBank-Sequenz für *Haemoproteus majoris*, und gleichzeitig die einzige, die eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem GenBank-Eintrag aufwies. Am zweithäufigsten war eine DNA-Sequenz (*Plasmodium spec.*), die bei allen drei untersuchten Vogelarten vorkam und bei den Kohlmeisen insgesamt vierzehnmal nachgewiesen wurde. Eine weitere Sequenz der Gattung *Plasmodium*, die auch bei einer Bahrdorfer Tannenmeise gefunden worden war, trat bei den Kohlmeisen zehnmal auf. Die vierte DNA-Sequenz, die bei den Kohlmeisen nur einmal vorkam, ähnelte bei einer Sequenz-Übereinstimmung von 99,58 % am meisten der *Plasmodium spec.*-Sequenz mit der GenBank-Zugangsnummer AF495553.

### 3.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Vögel auf Malariaparasiten

Nur in einem der insgesamt 20 lichtmikroskopisch untersuchten Blutaussstriche der Lingener Tannenmeisen konnte ein einzelner unbekannter Vogelmalariaerreger der Gattung *Plasmodium* gefunden werden (Abb. 4). Nach dem Bestimmungsschlüssel von Peirce und Bennett (1996) konnte dieser der Untergattung *Haemamoeba* zugeordnet werden. Eine weiterführende Spezies-Identifikation war nicht möglich.



**Abb. 4:** Unbekannter Malariaerreger (*Plasmodium spec.*) im Blutaussstrich einer Tannenmeise

## 3.2 Untersuchungen an Zoovögeln

### 3.2.1 Vorkommen der Vogel malaria in heimischen Zoos und Tierparks

Insgesamt wurden 47 Zoos und Tierparks angeschrieben, um Daten über das Vorkommen der Vogel malaria in Deutschland zu sammeln. Von 25 Einrichtungen, die auf die Anfrage reagierten, berichteten neun von positiven Fällen von Vogel malaria bei Pinguinen in den vergangenen Jahren. Die Untersuchungsmaterialien von den bestätigten Malariafällen waren allerdings bis auf die Organproben eines Balistars (*Leucopsar rothschildi*) aus dem Jahr 1996 und eines Brillenpinguins (*Spheniscus demersus*) aus dem Jahr 1991 vernichtet worden. Beide noch verfügbaren Materialien stammten von Vögeln aus dem Kölner Zoo.

### 3.2.2 Untersuchung der Organproben des Brillenpinguins

Mit der nested PCR nach Waldenström et al. (2004) konnte ein DNA-Abschnitt des parasitären cyt b-Gens aus der Organprobe des Brillenpinguins amplifiziert werden. Seine Länge betrug 523 bp und seine Sequenz (Abb. 5) stimmte zu 100 % mit der des Genbank-Eintrags AF254977 für *Haemoproteus majoris* überein.

```

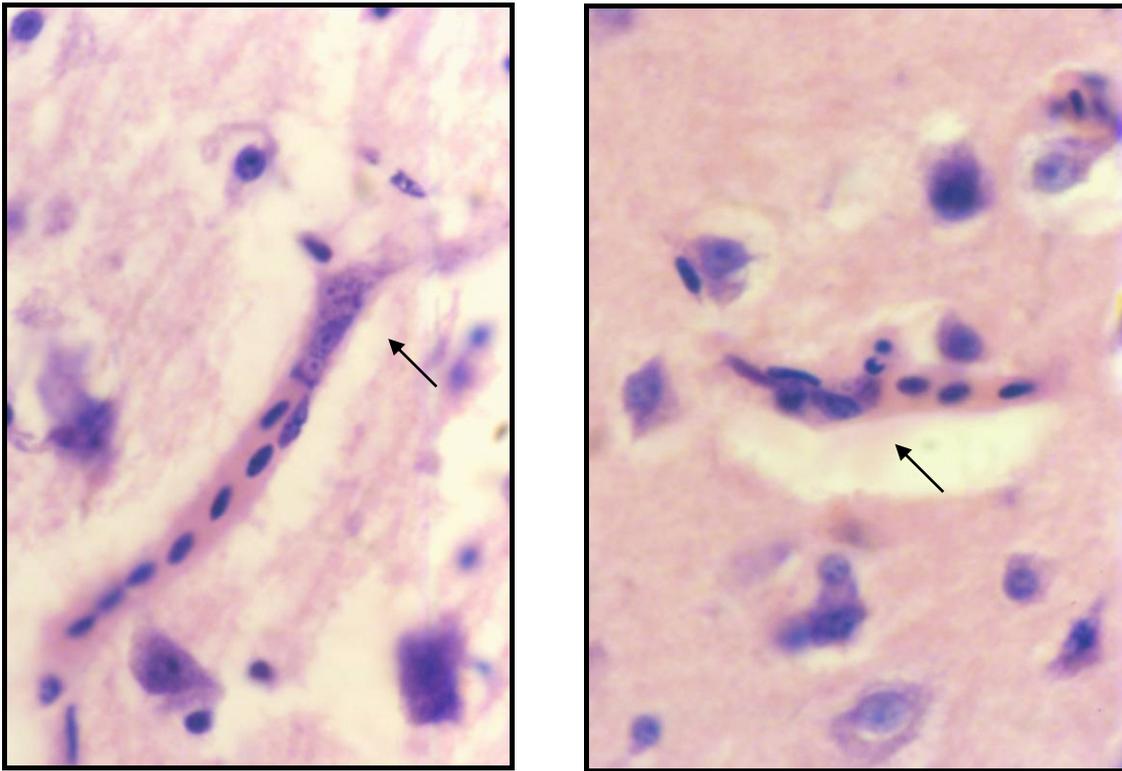
      HAEMF          →
ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCTACTGGTGCTACATTTGTTTTTATTTTAAACATATTTACATATTTTAAAGAGGATTTAAATTA
TTCATACTCATATTTACCTTTATCATGGATAACTGGATTAGTAATATTTCTTAATTTCTATTGTCACAGCTTTTATGGGTTATGT
ATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACCGTTATTACTAACTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTTCATGGAT
TTGTGGAGGATATATTATTAGTGATCCAACCTTAAAAAGATTTTTTGTATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTAT
AGTATTTATACATATATTCTTTTTTACACTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTAAAAATACCTTTCTAT
CCAAGTCTATTATGTCTAGATATAAAGGATTTAATAATATATTAGTCCTATTTCTAGCACAAAGTTTATTGGAAATATTACCA
HAEMR2
TTATCACATCCAGATAATGC

```

**Abb. 5:** aus dem Brillenpinguin gewonnene DNA-Teilsequenz des cyt b-Gens von *Haemoproteus majoris*

(Farbig unterlegt sind die Primer der 2. nested PCR nach Waldenström et al. (2004), wobei die Symbole ,→' für den ,forward'-Primer und ,←' für den ,reverse'-Primer stehen.)

In den nach Giemsa gefärbten Paraffinschnitten des Gehirns des Brillenpinguins konnten die Erreger auch lichtmikroskopisch ausgemacht werden (Abb. 6).



**Abb. 6:** *Haemoproteus majoris*-Erreger in Gehirnkapillaren des Brillenpinguins

### 3.2.3 Untersuchung der Organproben des Balistars

Auch in der DNA, die aus der Organprobe des Balistars gewonnen worden war, konnte mit Hilfe der nested PCR nach Waldenström et al. (2004) der cyt b-Genabschnitt nachgewiesen werden. Die DNA-Sequenzierung ergab für diesen eine Länge von 522 Basenpaaren, die zu 99,40 % mit einer in der GenBank gefundenen *P. falciparum*-Sequenz (AY283019) übereinstimmten (Abb. 7).

```

      HAEMF           →
ATGGTGCTTTTCGATATATTGAGT CAGGTGCTTCTCTGTATTTTATTTAACATATCTTCATATTTTAAGAGGATTA AATTACT
CATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTTATTTATGATATTTATGTAACTGCTTTCGTTGGTTATGTCT
TACCATGGGGTCAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTAATTACTA AACTTGTTATCCTCTATTCCAGTAGCAGTAATTTGGATAT
GTGGAGGATATACTGTGAGTGATCCTACAATAAAACGATTTTTTGTACTACATTTTATCTTACCATTTATTGGATTATGTATTG
TATTTATACATATATTTTTCTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCATTAAAAATACCCTTTTATC
CAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATGTTATAATTTATTTCTAATAACAAAGTTTATTTGGAATTATACCTT
      ←
HAEMR2
TATCACATCCCGATAATGC
  
```

**Abb. 7:** aus dem Balistar gewonnene DNA-Teilsequenz des cyt b-Gens eines unbekanntes Malariaerregers

(Farbig unterlegt sind die Primer der 2. nested PCR nach Waldenström et al. (2004), wobei die Symbole ,→' für den ,forward'-Primer und ,←' für den ,reverse'-Primer stehen.)

In den mit Hämatoxylin gefärbten Paraffinschnitten des Balistars konnten lichtmikroskopisch mehrere Gewebsschizonten des Erregers gefunden werden (Abb. 8).



**Abb. 8:** Gewebsschizont eines unbekanntes Malariaerregers in der Leber des Balistars

### 3.3 Sequenzierung einzelner Gene der Malariaerger *P. cathemerium*, *P. y. yoelii*, *P. chabaudi* und *P. ovale*

Mit Hilfe publizierter sowie selbst konstruierter PCR-Primer wurden die vollständigen DNA-Sequenzen des ClpC-Gens von *P. cathemerium*, *P. y. yoelii*, *P. chabaudi* und *P. ovale* sowie des cyt b-Gens von *P. cathemerium* und des 18 SSU rRNA-Gens von *P. cathemerium* und *P. chabaudi* gewonnen.

Die Amplifikate des ClpC-Gens der vier Malariaerger *P. cathemerium*, *P. ovale*, *P. y. yoelii* und *P. chabaudi* wiesen alle eine einheitliche Länge von 641 bp auf. Sie unterschieden sich allerdings in ihren GC-Anteilen. Diese lagen für den Vogelmalariareger *P. cathemerium* bei 17,3 %, für den Humanparasiten *P. ovale* bei 17,9 % und für die beiden Nagermalariareger *P. y. yoelii* und *P. chabaudi* bei 17,6 % bzw. 17,8 %.

Nachfolgend sind die vier neu gewonnenen Sequenzen des ClpC-Gens im Alignment dargestellt (Abb. 9).



**Abb. 9:** Alignment des ClpC-Gens der vier Malariaerreger *P. cathemerium*, *P. ovale*, *P. y. yoelii* und *P. chabaudi*

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' steht für den ,forward'-Primer das Symbol ,←' für den ,reverse'-Primer.

\* = vollständige Nukleotidübereinstimmung zwischen den verschiedenen Sequenzen

: = entweder zwei verschiedene Purin- oder zwei verschiedene Pyrimidinbasen

. = zwei unterschiedliche Nukleotidsorten)

Das vollständig sequenzierte cyt b-Gen des Vogelmalariareggers *P. cathemerium* (Abb. 10) hat eine Basenpaarlänge von 1032. Der GC-Anteil beträgt 27,1 %.

```

      cytbF1      →
AATTACGGGTTGCTTTTAGGAATTGTATTTTTTATACAAATTTTAACAGGTGTATTATTAGCTACTTGTTATACTCCAGAAAT
ATCTTATGCATACTATAGTGTACAACATATATTAAGAGAAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACAGGTG
      cytbF2      →
CTTCATTTGTATTTATTTAACTTATTTACATATTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCA TGGATA ←
cytbR3
TCTGGATTACTTATA TTTTAAATATCTATTGTAACAGCTTTTATGGGTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGG
TGCTACAGTTATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAA
CCTTAAAAAGATTC TTTGTATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTTTACAT
TTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGCTTGATATTA
AGGATTTAATAATGTATTAGTATTATCTTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCCCATCCAGATAATGCTATTA
CAGTAGATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTTTTACCTTTTTATGCAATGTAAAAACAATTCCT
      cytbF3      →
AACAAAAACAGCAGGTTTACTAGTTATGTTAGCATCTTTA CAAATATTATTTCTATTAGCAGAACAAGAAACTTAACAACCTCT
TATCCAATTTAAATTTGCTTTTGGTGCAAGAGAATATCTGTTCCCTACTATCTGGTTTATATGTTTCATCTATGCTTTATTAT
GGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTACATTTTATATGGTCGTTTATTTATTATATTATTCTTCTTTAGTGGTTTATTT
      ←      cytbR1
ACACTTGTTC AATCAAAAAGAACACATTATGATTAC

```

**Abb. 10:** DNA-Sequenz des cyt b-Gens von *P. cathemerium*

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' steht für die ,forward'-Primer, das Symbol ,←' für die ,reverse'-Primer.)

Das 18 SSU rRNA-Gen von *P. cathemerium* hat eine Gesamtlänge von 2098 Basenpaaren und einen GC-Gehalt von 35,0 % (Abb. 11).

A1399 →  
 AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGAAAAGTATATATATATTTAATATAT  
 AGAAACTGCGAACGGCTCATTAAACAGTTATAATCTACTTGACATTTTTTTTCATAAGGATAACTACGGAAAATCTGTAGCTA  
 ATACTTGAACGATTGTTTTTCAGTTCCCCAAAAGGTTCTGAAAAACACGTATTTGTAAAGCCTTATAAGAAAAAGTTATT  
 AACTTAAGGAATTATAACAAAGAAGGAACACATAATGGAACCTCCGTTTCATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATC  
 AGCTTTTGATGTTAGGGTATTGGCCTAAC ← AL399R  
 ATGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGA  
 GAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACA  
 AGGTAAGGTCAAATTTTGGCTTTATCATTGGAATGATAGGAATTTAAAACTTCCATAAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGG  
 TGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTTGAATTTCAAAGA  
 ATCATTTTTTAAGTTAATGCTTTATCGGATATGTGTTAATGGCGCTACGGCGCATATTATCACAATTCTGATAATTTGCGT  
 TCCTTAAAATAAAATAGGTTCTTTTTAAAAATTCTTCGTTGCATTTTTTATGTGATGAGAATTTTTGCTACTTTGAGTAAATTA  
 GAGTGTTCAAAGCAAACAGTTTAAAACAGGTAACCTGTGTTGAATACTACAGCATGGAATAACAAAATTGAACAAGCTAAAAT  
 TTTTTGTTCTTTTTTCTTATTTTGGCTTAGTTACGATTAATAGGAGTAG ← INTR2  
 CTGGGGGCATTCTGATTAGATGTCAGAGGTGA  
 AATTCCTAGATTTTCTGGAGACGAACAACCTGCGAAAGCATTTCCTAAAATATTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGA  
 INTF2 →  
 GTGAAGACGATCAGATACCGTCTGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTAAAAATAAAAGAT  
 GGCCTAATGTAACAGTTGGGTTGTCTTTTAGCTTACTTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCG  
 INTR  
 AGTATTCGCGCAAGCGAGAAAGTTAAAAGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCTTGC GGCTTAATTTGACTCAAC  
 ACGGGAAAACCTCACTAGTTTAAAGACAAGAGTAGGATTGACAGATTAATAGCTCTTTCTTGATTTCTTGGATGGTGATGCATGG  
 INTF6 →  
 CCGTTTTAGTTCTGTAATATGATTTGCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAAATACA  
 ACATATTTCTTAAGTAAATAAGAATATAGATAAAAAATTACAATTAAGAGAAAATATTAGGATATTATATAATATCTTTTTCCCT  
 TTTCTTCTTATATTGTATTTTTATTCTGTTTCTTTTTTTGCATAAGAATGTATTTACTTGGATTGTAAGCTTCTTAGAGGGAC  
 INTF7 →  
 ATTTGTGTCTAACACAAGGAAGTTAAGGCAACAACAGGTCGGTGTATGTCCTTAGATGAAGTACGGCTGACGCGTGGTACT  
 GATATATATAACGAGTTAATAAAAAATATATCCTTGATATGTATATTCTTATATATATACAAAAGGATATAATTTTCTCCAC  
 PL2R  
 TGAAAAAGTGTAGGTAATCTTTATCAATAATATATCGTATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCT  
 AGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCTCGCCCTTTGTACACACCGCCCGTGCCTCCTACCGATTGAAAGATA  
 TGATGAATTGTTTGGACAAGAAAAATAAATTATATTTGTTTTTTTTTTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTAAAGGAAGGAG  
 AL400  
 AAGTCGTAACAAGGCTTCCGTAGG

### Abb. 11: DNA-Sequenz des 18 SSU rRNA-Gens von *P. cathemerium*

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' steht für die ,forward'-Primer, das Symbol ,←' für die ,reverse'-Primer.)

Die vollständige Sequenz des 18 SSU rRNA-Gens von *P. chabaudi* hat eine Gesamtlänge von 2045 bp und einen GC-Gehalt von 38,68 % (Abb. 12).

A1399 →  
 AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGAAAGTATATGCATATTTTATATGT  
 AGAAACTGCGAACGGCTCATTAAACAGTTATAATCTACTTGACATTTTATTATAAGGATACCTACGGAAAAGCTGTAGCTAA  
 TACTTGCTTTAATTGCTTTTACTCCCCGAGATATTTGCATGTATTTGTAAAGCCTTATAAGAAAATTTTAAATTGAAGGAAT  
 TATAACAAAGAAGTAACACATAATATATTTACTATATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGTATGTTA  
 ← AL399R  
 GGGTATTGGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCAC  
 ATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATATCAATATAAGGCCAAAT  
 TTTGGTTTTATAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTTCCCAAAAATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG  
 TAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTTGAACTTCAAGGGTATCATTATTTTATAG  
 A1400F →  
 CAACTCACTTGGCTAGATCTTGGCTCTGCCTCGCTATCTCATGCCTCGTTGCAGTTCTTTAATTACCGGCCCTTTGAGATCC  
 CTTTGATCATTCACTGGGTTCTCGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTCAAAGCAAACATTTAAAGCGTTTTTCGCGTTTTGAAT  
 GCTATAGCATGGAATAACAAAATTGAACAAGTCAAATTTGTTTTTTTTCTTATTTTGGCTTAGTTACGATTAATAGGAGTAG  
 ← INTR2  
 CTTGGGGGCATTTGTATTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTTCTGGAGACAAACAACACTGCGAAAAGCATTGTCCTAAA  
 ATACTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGATACCGATCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGA  
 CTAGGTTTTGGATGAAAATTTTTAAATAAGGTTTCCCTCCGGGATTCTTAGATTGCTTCCCTCAGTACCTTATGAGAAATT  
 ← INTR  
 CAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCGAGTATTCGCGCAAGCGAGAAAAGTTAAAAGAATTTGCCGGAAGGGCACCACCAGGCGTGG  
 AGCTTGCGGACTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACTAGTGTAAAGACAAGAGTAGGATTGACAGATTAATAGCTCTTTC  
 INTF6 →  
 TTGATTTCTGGACGGTGATGCATGGCCGTTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGATCT  
 TAACCTGCTAATTAGCGGCGAGTACGCTATATCCTCTATCGGGAGTTTGGTTTTGACGTTTATGCGAACTATGGTTAACCAAT  
 TGGTTTACCTTTTGCTCTTTTGCAGATGCTTCTGCATTTACTTCTCCTCTCTTCTGATAAGGATGTATTCGCTTTATTTAAG  
 INTF7 →  
 GCTTCTTAGAGGAACGATGTGTGTCTAACACAAGGAAGTTAAGGCAACAACAGGTCTGTGATGTCCTTAGATATACTAGGGT  
 GCA  
 CGCGTGATACTGATAGGTAAAACGAGTTTTTAAATTTATATTTGCGCGTGGTTCATGCCTGCGCGGGATATATTTTTC  
 ← PL2R  
 CTCCACTGAAAA GTGTAGGTAATCTTTATCAATA CATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGA  
 ATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTCCTACCGATTGA  
 AAGATATGATGAATTTGTTGGACAAGAAAATAGAAATTTTATTTTATTTTTTTGGAAAGGACCGTAAATCCGATCTTTTAAAG  
 ← AL400  
 GAAGGAGAAGTCGAAACAAGGTTTCCGTAGG

**Abb. 12:** DNA-Sequenz des 18 SSU rRNA-Gens von *P. chabaudi*

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' steht für die ,forward'-Primer, das Symbol ,←' für die ,reverse'-Primer.)

Die Sequenz-Alignments der in der Arbeit verwendeten Plasmodienspezies für das 18 SSU rRNA-, das ClpC- und für das cyt b-Gen sind im Anhang hinterlegt (Abb. 30-32).

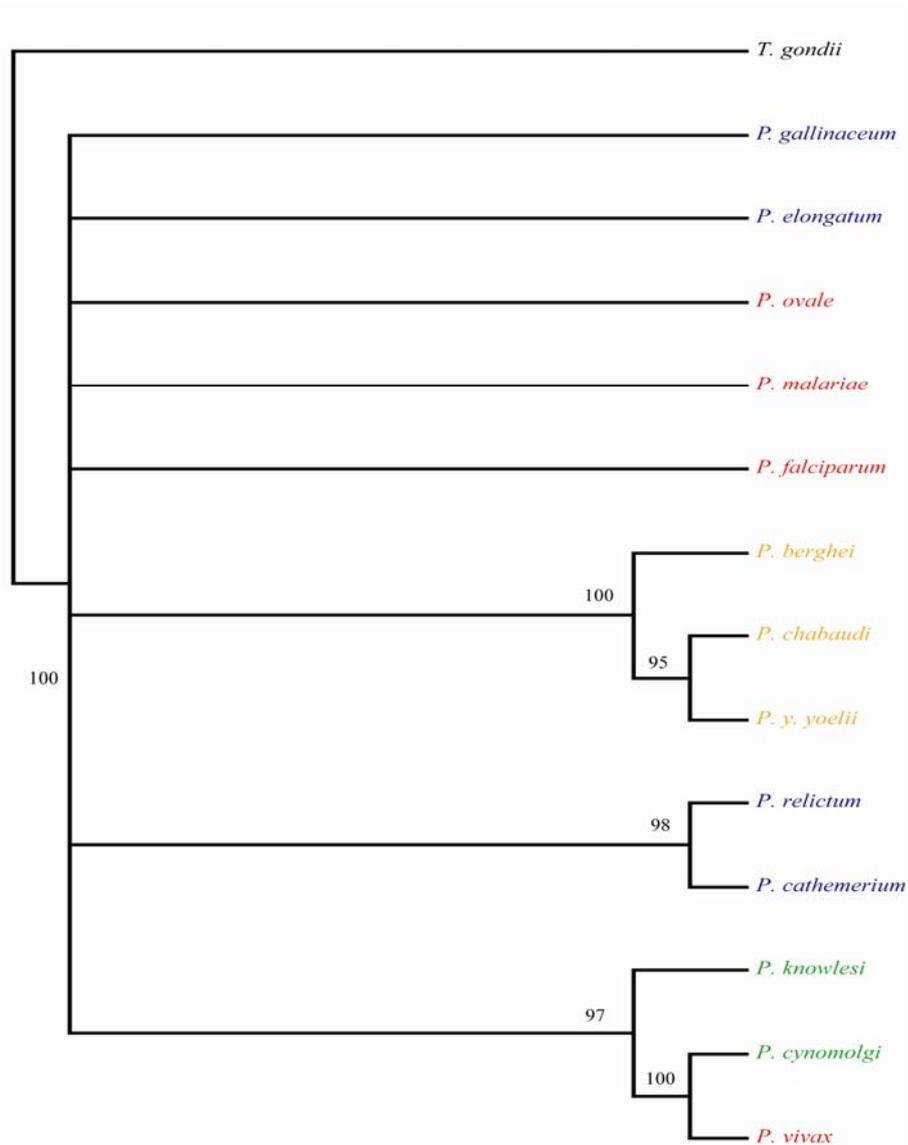
### 3.4 Molekulare Phylogenie

Unter Einbeziehung der neu ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen PAUP 4.0 beta 10 (Swofford 1999), Modeltest 3.0 (Posada und Crandall 1998), MrBayes V3 b4 v2win (Huelsenbeck 2001) und PHASE 2.0 beta (Jow et al. 2005) Stammbäume der Malariaerreger für das ClpC-, das cyt b- und das 18 SSU rRNA-Gen berechnet. Diese wurden mit den Programmen Treeview (Page 1996) und Adobe Illustrator 9.0 visualisiert (Abb. 13 bis 15). Betragen die posterioren bzw. Bayes'schen Wahrscheinlichkeitswerte an den Verzweigungen der Bäume 95 % und mehr, spricht man von zuverlässigen Werten. Die Positionen der Malariaerreger im Stammbaum und die berechneten Verwandtschaftsverhältnisse können dann als relativ sicher angesehen werden.

Um die in den Stammbaumdarstellungen verwendeten Erreger leichter nach ihren Wirten unterscheiden zu können, wurden sie farblich abgesetzt: Humanparasiten rot, andere Primatenparasiten grün, Nagerparasiten orange, weitere Säugetierparasiten rosa, Vogelparasiten blau und Eidechsenparasiten violett. Die Außengruppen wurden in schwarz gehalten.

#### 3.4.1 Phylogenetischer Stammbaum des ClpC-Gens

Der auf den Sequenzen des ClpC-Gens basierende phylogenetische Stammbaum der Plasmodien wurde mit *T. gondii* als Außengruppe gewurzelt (Abb. 13). Die drei Nagerplasmodien bilden eine gemeinsame Gruppe mit einem zuverlässigen Bayes'schen Wahrscheinlichkeitswert von 100 %, wobei *P. chabaudi* und *P. y. yoelii* mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 95 % eine Schwestergruppe zu *P. berghei* bilden (als Schwestergruppe wird nach von Haeseler und Liebers (2003) die zu einer monophyletischen Einheit nächstverwandte monophyletische Gruppe in einem dichotomen Baum bezeichnet). Zwei der vier in der Berechnung des Stammbaumes einbezogenen Vogelmalariaerreger, *P. cathemerium* und *P. relictum*, bilden mit einer Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 98 % eine Einheit. Der menschliche Malaria tertiana-Erreger *P. vivax* formt mit dem Primaten-Erreger *P. cynomolgi* eine Gruppe mit einer zuverlässigen posterioren Wahrscheinlichkeit von 100 %. Diese wiederum bildet zu dem Primaten-Erreger *P. knowlesi* eine Schwestergruppe mit einer Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 97 %. Die anderen fünf aufgeführten Malariaerreger (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. elongatum*, *P. gallinaceum*) münden, wie die Stämme der drei bisher beschriebenen Gruppen (der drei Nagermalariaerreger, der beiden Vogelmalariaerreger und der drei Primatenerreger), an der Wurzel des Stammbaumes.



**Abb. 13:** Phylogenetischer Stammbaum der Plasmodien basierend auf ClpC-DNA-Sequenzen

### 3.4.2 Phylogenetischer Stammbaum des cyt b-Gens

Um den cyt b-Stammbaum zu wurzeln, wurde *Th. annulata* als Außengruppe gewählt. Dieser Parasit ist mit den Haemosporidae entfernter verwandt als *T. gondii*.

Von der basalen polytomen Verzweigung des phylogenetischen Stammbaums (Abb. 14) gehen sechs Linien aus, von denen die mit der größten Gruppe aus Eidechsen-, Nager- und Primatenplasmodien besteht. Zwei der Linien bestehen jeweils aus einem Vogel-malariaerreger, während eine weitere Linie viele verschiedene Vogelmalariaspezies enthält. Eine Linie endet bei diversen Eidechsenmalariaparasitenarten, während die letzte Linie *Haemoproteus*-Erreger der Vögel und Eidechsen sowie *Leucocytozoon*-Arten verschiedener Vogelspezies enthält.

Die Linie mit der größten Innengruppe enthält sämtliche Nager- und Säugetierplasmodienspezies. *P. falciparum* bildet mit *P. reichenowi*, einem Malariaerreger, der Schimpansen befällt, eine Einheit mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 94 %, die an der Basis des Stammbaumes der Säugetierplasmodien steht. Letztere scheinen polyphyletisch zu sein, da die beiden in diese Studie einbezogenen Erreger der Gattung *Hepatocystis* auch innerhalb der Stammbaumäste der Plasmodien vorkommen, und zwar als Schwestergruppe zu *P. ovale*, einem der beiden menschlichen Malaria tertiana-Erreger (Bayes'sche Wahrscheinlichkeit von 98 %). *P. malariae*, der Erreger der menschlichen Malaria quartana, steht getrennt von den restlichen Plasmodienarten der Primaten, die zusammen mit *P. vivax* eine Gruppe bilden. *P. vivax* bildet mit *P. simium* eine gut abgesicherte Einheit (posteriore Wahrscheinlichkeit von 100 %). Die Nagermalariaparasiten bilden mit einer gesicherten Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 100 % eine monophyletische Gruppe innerhalb der Säugetiergruppe. Am Fuße des gemeinsamen Stammes der Säugetierparasiten befinden sich zwei Malariaparasiten von afrikanischen Eidechsen, *P. agamae* und *P. giganteum*; allerdings werden deren Verwandtschaftsverhältnisse nur durch sehr schwache posteriore Wahrscheinlichkeitswerte von 60 % bzw. 58 % gestützt.

Drei Linien mit Malariaerregern der Vögel gehen von der polytomen Grundverzweigung aus, eine davon mit einem einzelnen Erreger, die andere Linie mit zwei Erregern. Die dritte Linie besteht aus sieben Vogelmalariaparasiten, darunter *P. cathemerium*, das mit *P. elongatum* eine Einheit bildet (Bayes'sche Wahrscheinlichkeit von 95 %). Allerdings wird die Platzierung dieser Gruppe der Vogelparasiten innerhalb des cyt b-Stammbaums nur mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 65 % unterstützt.

Die Linie der restlichen Eidechsenparasiten wird nur mit einer niedrigen Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 61 % gestützt. Die in dieser Studie berücksichtigten *Haemoproteus*-Arten sind alle in der letzten Linie zu finden; allerdings scheinen diese polyphyletisch zu sein, da in dieser Gruppe auch *Leucocytozoon*-Spezies mit einem abgesicherten posterioren Wahrscheinlichkeitswert von 97 % enthalten sind.

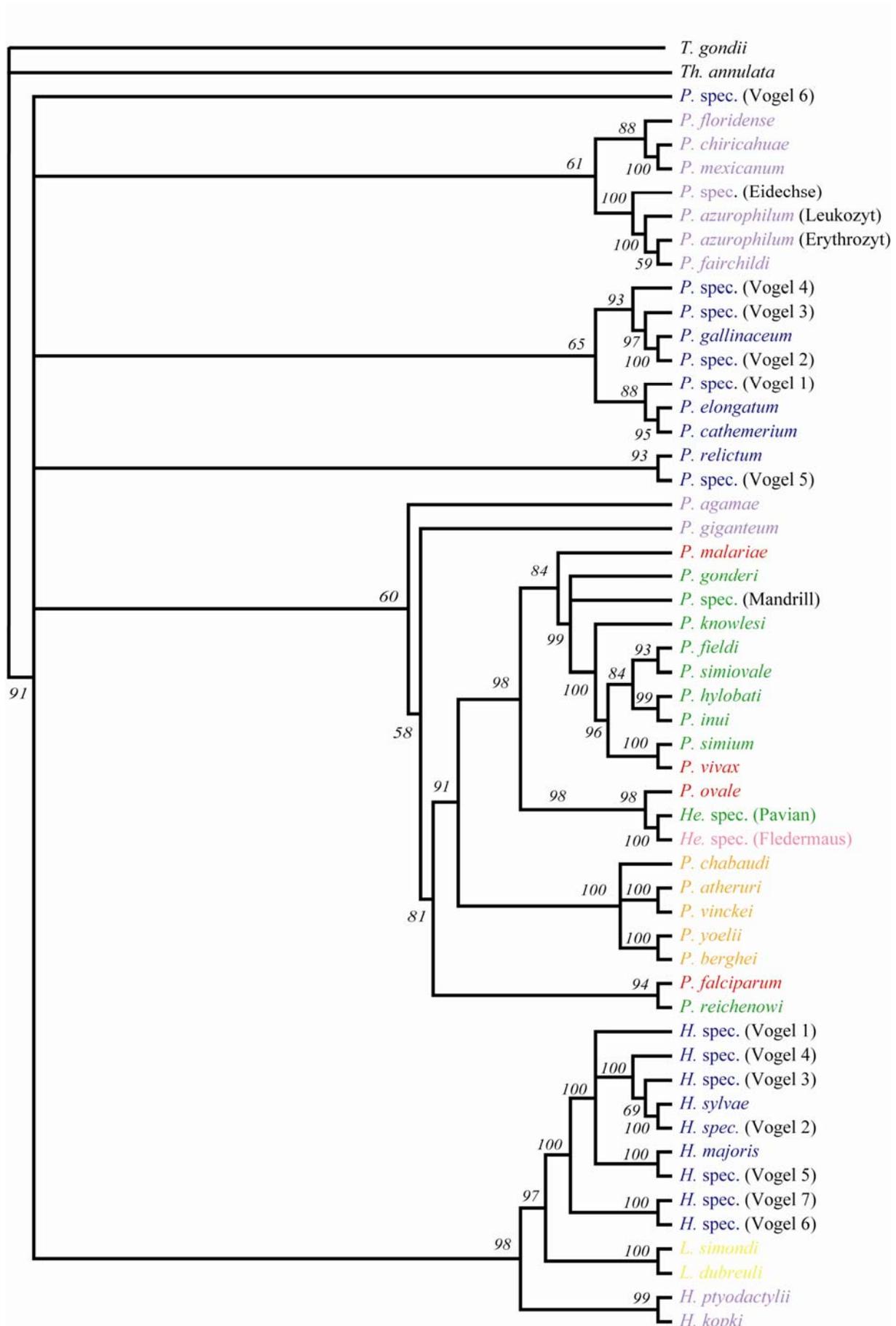
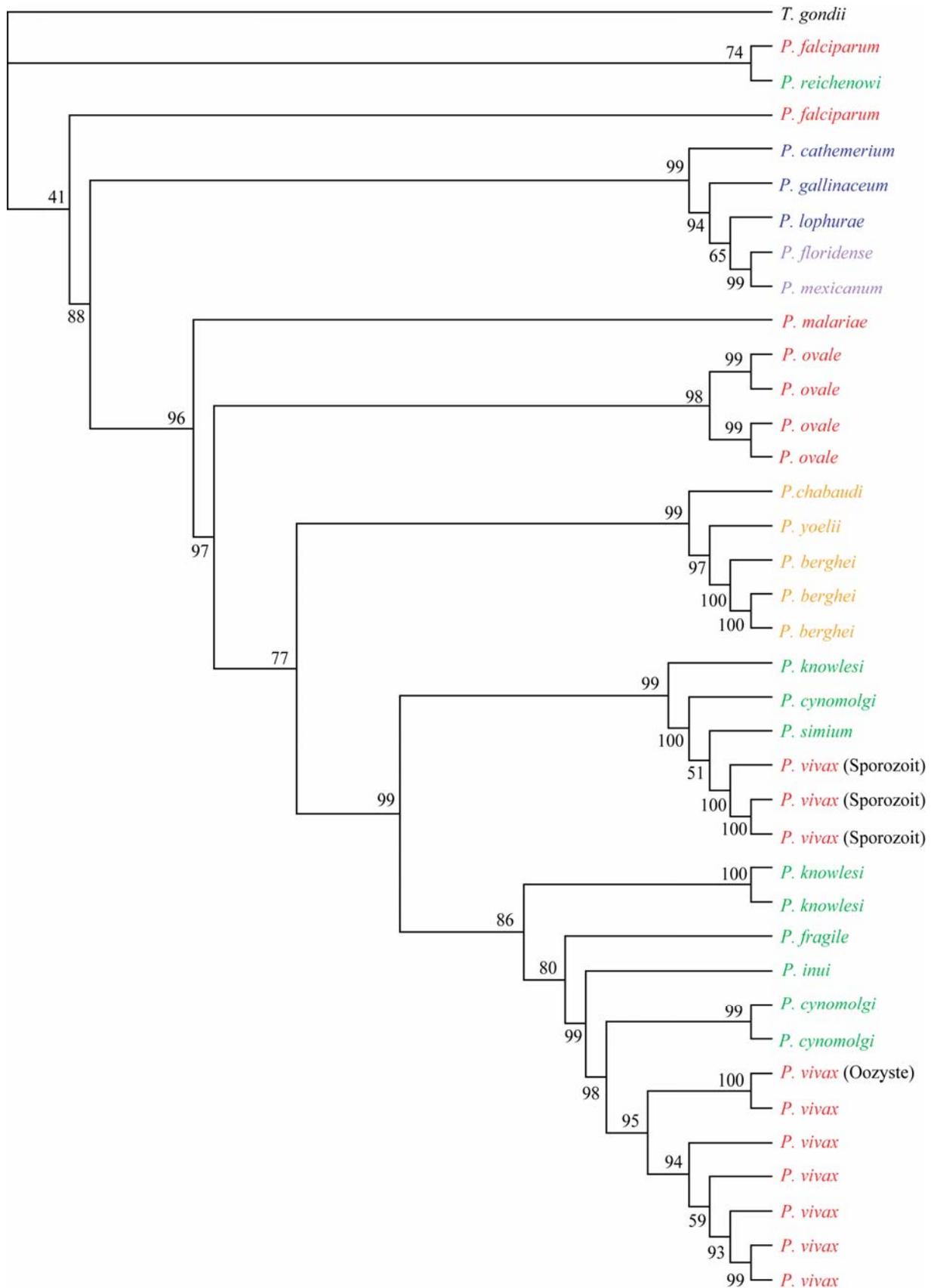


Abb.14: Phylogenetischer Stammbaum der Plasmodien, basierend auf cytb-Gen-Sequenzen

### 3.4.3 Phylogenetischer Stammbaum des 18 SSU rRNA-Gens

Der mit dem Programm PHASE 2.0 beta (Jow et al. 2005) ermittelte Stammbaum des 18 SSU rRNA-Gens wurde mit der Außengruppe *T. gondii* gewurzelt. Die Innengruppe teilt sich in einer ersten Verzweigung in eine *P. falciparum*-/*P. reichenowi*-Gruppe und eine monophyletische Gruppe, die alle anderen Plasmodien enthält. Der Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse gruppiert *P. falciparum* zwar mit einer weiteren Linie als paraphyletisch ein, doch ist die posteriore Wahrscheinlichkeit von 41 % nicht aussagekräftig. Eine andere Möglichkeit der Gruppierung wäre, dass die beiden *P. falciparum*-Stämme und *P. reichenowi* aus demselben Knoten hervorgehen und den restlichen Plasmodien gegenüberstehen.

Gestützt mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 88 % trennt die nächstfolgende Verzweigung die Vogel-Eidechsenparasiten von den restlichen Säugerplasmodien. Die erste Gruppe enthält drei Vogelmalariaerreger mit *P. cathemerium* an der Basis, in der sich zunächst *P. gallinaceum* und später *P. lophurae* mit Bayes'schen Wahrscheinlichkeitswerten von 99 % und 94 % abzweigen. Die monophyletische Gruppe der Eidechsenmalariaparasiten zweigt schließlich mit einer sehr niedrigen posterioren Wahrscheinlichkeit von 65 % von den Vogelparasiten ab. Sie bilden allerdings eine in sich stabile Gruppe mit einer Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 99 %. Auf der nächsten Ebene separiert sich *P. malariae*, der menschliche Malaria quartana-Erreger, mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 96 % von den restlichen Primaten- und den Nagerparasiten. Innerhalb dieser bilden die verschiedenen *P. ovale*-Stämme eine eigene Gruppe (Bayes'sche Wahrscheinlichkeit von 97 %). Mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 77 % schließen sich die Gruppen der Nagermalariaparasiten und die der restlichen Primatenmalariaerreger an. In der monophyletischen Gruppe der Nagermalariaparasiten steht *P. chabaudi* *P. yoelii* und drei *P. berghei*-Stämmen gegenüber (Bayes'sche Wahrscheinlichkeit von 99 %). Die Gruppe der Primatenmalariaerreger setzt sich mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 99 % wiederum aus zwei Gruppen zusammen. Die eine enthält einen Verband aus den drei Spezies *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* und *P. simium* (Bayes'sche Wahrscheinlichkeitswerte von 99 bzw. 100 %). Diese haben scheinbar (mit einer sehr schwach unterstützten posterioren Wahrscheinlichkeit von 51 %) einen gemeinsamen Vorfahren mit *P. vivax*. Mit Bayes'schen Wahrscheinlichkeitswerten von 86 %, 80 % und 99 % spalten sich in der zweiten Gruppe erst zwei Stämme von *P. knowlesi* ab, an die sich in der dichotomen Hierarchie *P. fragile* und *P. inui* anschließen. Weitere *P. vivax*-Stämme sind mit einer Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 98 % in einer Schwestergruppe zu *P. cynomolgi* zu finden.



**Abb. 15:** Phylogenetischer Stammbaum der Plasmodien, basierend auf 18 SSU rDNA-Gen-Sequenzen

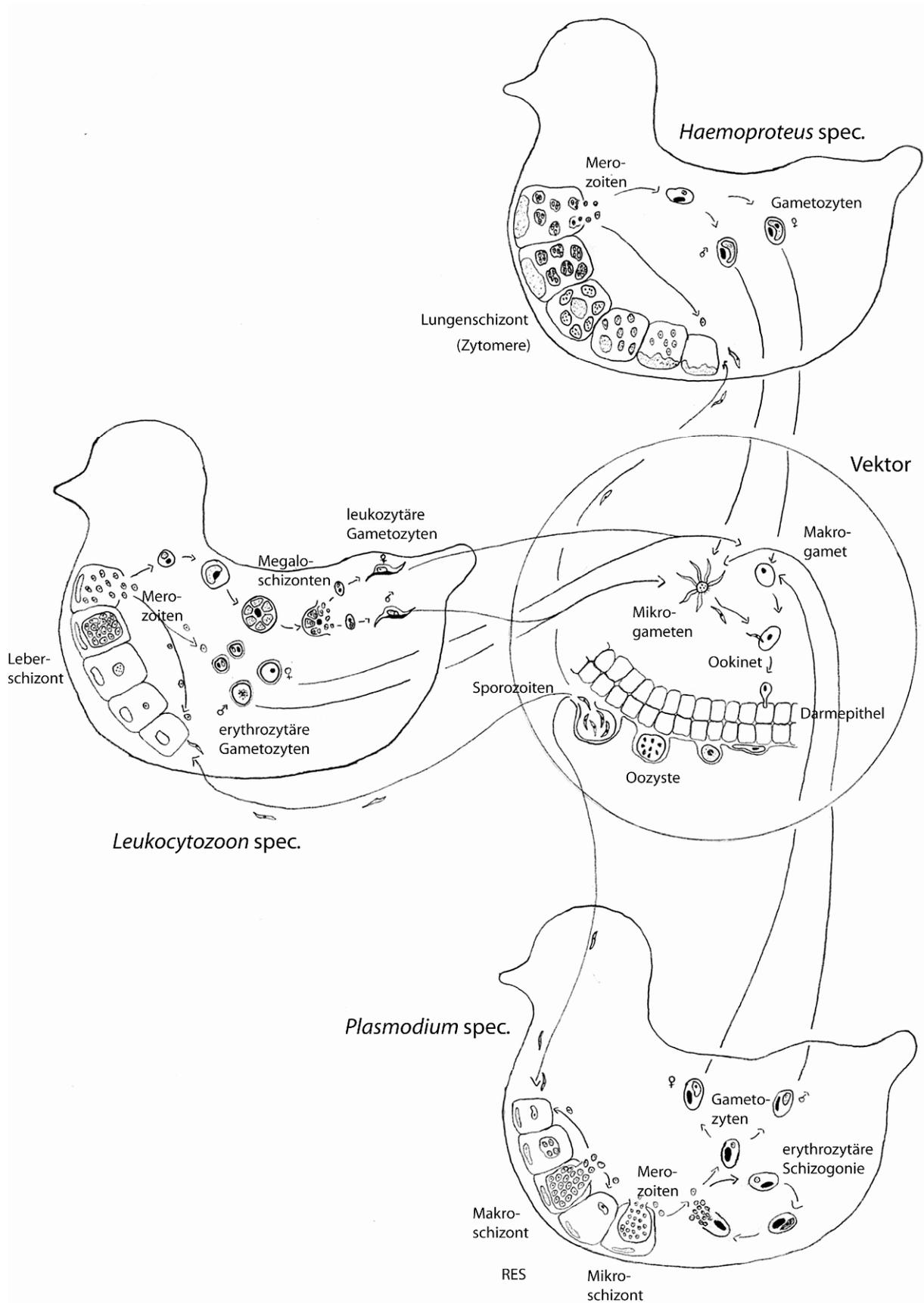
## 4 Diskussion

### 4.1 Entdeckung der Vogelmalariaerreger

1884 wurden von Danilewsky in einem Blutausschnitt eines Wildvogels aus der Ukraine erstmals Malariaerreger bei Vögeln entdeckt, nur vier Jahre nachdem von Laveran Plasmodien als Verursacher der humanen Malaria erkannt worden waren (Haberkorn 1978). In den darauffolgenden Jahren kam es zu Konfusionen bei der Bestimmung der Vogelparasiten, da Kruse 1890 auch Erreger der Gattung *Haemoproteus* gefunden hatte (Bennett et al. 1994), deren Gametozyten z.T. denen mancher *Plasmodium*-Arten gleichen (Seed und Manwell 1977). Wie sich später zeigte, ist das alleinige Auftreten von Gametozyten im Blut des Wirtes bei den *Haemoproteus*-Parasiten ein wichtiges Unterscheidungskriterium zwischen den beiden Gattungen; bei den Plasmodien sind aufgrund der erythrozytären Schizogonie auch andere Blutstadien zu finden (Smyth 1976). Die erste gesicherte korrekte Artbestimmung von Vogelmalariaerregern der Gattung *Plasmodium* erfolgte 1891 durch Grassi und Felletti (Garnham 1966). 1906 definierte Sambon schließlich die Gattung *Leucocytozoon*, deren Gametozyten sich fast ausschließlich in den weißen Blutkörperchen des Vogels entwickeln. Die Arten der Gattungen *Plasmodium*, *Haemoproteus* und *Leucocytozoon* werden heute zusammen zu den Vogelmalariaparasiten gezählt.

### 4.2 Entwicklung der Vogelmalariaerreger und ihre Auswirkungen auf den Wirt

Die Entwicklung von Arten der Gattung *Plasmodium* im Vogel (Abb. 16) wird durch die Übertragung von Sporozoiten durch weibliche Mücken (meistens *Aedes*- und *Culex*-Arten) eingeleitet (Piekarski 1954). Die Sporozoiten dringen in Phagozyten und Zellen des retikuloendothelialen Systems (Leber, Milz und Knochenmark) ein und wachsen innerhalb weniger Stunden zu pigmentlosen Makroschizonten heran (exoerythrozytäre Schizogonie). Innerhalb der Makroschizonten bilden sich Tausende von Merozoiten, die nach der Zerstörung der Wirtszelle in neue Gewebszellen eindringen. In der zweiten und dritten Schizontengeneration werden neben den Makroschizonten auch Mikroschizonten gebildet, aus denen Mikromerozoiten hervorgehen, die nun in Erythrozyten eindringen, um sich teils zu geschlechtlich differenzierten Formen (männliche oder weibliche Gametozyten), teils wieder zu Schizonten weiterzuentwickeln (erythrozytäre Schizogonie) (Piekarski 1954). Wenn Gametozyten durch den Stich einer Mücke aufgenommen werden, findet in deren Mitteldarm die Reifung der Gameten statt. Der weibliche Gametozyt differenziert sich zum



**Abb. 16:** Entwicklungszyklen der Gattungen *Plasmodium*, *Haemoproteus* und *Leukocytozoon* (RES = retikuloendotheliales System)

Makrogameten, während sich der männliche Gametozyt in mehrere fadenförmige Mikrogameten teilt, die dann jeweils einen Makrogameten befruchten. Der daraus hervorgehende bewegliche Ookinet durchwandert das Mitteldarmepithel, siedelt sich zwischen Epithelzellen und Basalmembran an und wächst unter vielfacher Kernteilung zur Oozyste heran. Indem den Tochterkernen Zytoplasma zugeteilt wird, entstehen Sporozoit, die aus der Oozyste in die Leibeshöhle gelangen und über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Mücke wandern. Beim nächsten Stich werden die Sporozoit auf einen neuen Vogel übertragen.

Die neben den geschlechtlich differenzierten Parasitenformen in den Erythrozyten des Wirtes ungeschlechtlich heranwachsenden Schizonten gewährleisten durch die Bildung von Merozoiten, die nach dem Platzen der Erythrozyten neue rote Blutkörperchen befallen, die ständige Aufrechterhaltung der Blutinfektion. Nach einer Reihe von Generationen setzen immunologische Abwehrmechanismen seitens des Wirtes ein, die die im Blut befindliche Anzahl von Erregern vorübergehend limitieren oder auch völlig zum Verschwinden bringen, so dass die akute Phase der Infektion dadurch beendet wird. Die exoerythrozytäre Phase wird dagegen durch das Immunsystem nicht beeinflusst; die persistierende Gewebsinfektion ist somit eine Quelle von Rezidiven (Hiepe und Jungmann 1983), die stressbedingt (besonders in der Brutsaison) auftreten können (Applegate 1970).

In natürlichen Wirten sind die Vogelplasmodien i.A. avirulent (Hiepe und Jungmann 1983). In inadäquaten Zwischenwirten jedoch können, je nach Verlauf der Infektion, verschiedene klinische Symptome auftreten (Hayworth et al. 1987). Diese können von einem aufgeplusterten oder zerzausten Aussehen des Vogels über Gewichtsverlust und Lethargie bis zur Ausbildung einer schweren Anämie, zu Dehydration, Hämolyse, Anoxämie und einem Organversagen von Leber und Milz mit Todesfolge führen (Seed und Manwell 1977). Falls ein Vogel an der Malaria verstirbt, liegen nach Viner et al. (2001) zwischen dem Auftreten erster klinischer Symptome und dem Tod im Durchschnitt 24 Stunden. Auch wenn ein Tier die initiale Krise überlebt, kann es aufgrund von Rezidiven später noch an einer Malariaerkrankung zu Grunde gehen. Eine stressvolle Situation (z.B. ein Kälteeinbruch), die einen klinisch apparenten Rückfall auslöst, kann seine Überlebenschancen durch den zusätzlichen Einfluss der abnehmenden Fähigkeit zur Thermoregulation und der damit einhergehenden mangelnden Sauerstoffzufuhr zu den einzelnen Organen weiter verringern (Hayworth et al. 1987).

Die durch Erreger der Gattung *Plasmodium* verursachte Morbidität und Mortalität bei Wildvögeln ist nicht genau bekannt (Garnham 1966), aber sie ist vermutlich hoch in Vogelpopulationen, die nicht an den Erregerstamm adaptiert sind.

Eine sehr hohe Pathogenität ist vielen Arten der Gattung *Leucocytozoon* eigen. Besonders stark betroffen sind domestizierte Vögel, wobei der Prozess der Domestizierung anscheinend die natürliche Resistenz der Tiere gegenüber der parasitären Infektion erniedrigt hat (Desser und Bennett 1993).

Die Entwicklung der Erreger der Gattung *Leucocytozoon* (Abb. 16) beginnt mit dem Stich einer Kriebelmücke der Gattung *Simulium*. Die dabei übertragenen Sporozoiten dringen in die Blutbahn des Vogels ein, tauchen nach ca. 48 Stunden in der Leber auf und beginnen dort den Schizogoniezyklus (Olsen 1974). Sie verlassen die Kapillaren, durchdringen die Parenchymzellen und bilden Trophozoiten, die innerhalb weniger Tage zu Leberschizonten heranwachsen und durch Teilung unzählige Merozoiten bilden. Nach dem Aufplatzen der Zelle dringen einige Merozoiten wiederum in Leberzellen ein und machen erneute Schizogoniezyklen durch. Andere Merozoiten gelangen in die Lebersinusoide, befallen rote Blutkörperchen und werden in ihnen zu runden Gametozyten. Diese werden mit dem Blutstrom in periphere Gefäße transportiert, aus denen sie von Simuliiden aufgenommen werden können. Schließlich können die Merozoiten nach dem Freiwerden aus den Leberzellen auch von Makrophagen phagozytiert werden, in denen sie sich zu Megaloszizonten heranbilden, die insbesondere in der Leber, Milz, Lunge, Niere, Herz und Gehirn zu finden sind. Leberschizonten, die nicht in der Lage waren, sich vollständig in einzelne Merozoiten aufzuteilen, zerfallen in Zytoplasmaanteile (so genannte ‚Inseln‘), die einige sich entwickelnde Merozoiten enthalten. Auch diese werden von Makrophagen aufgenommen und reifen in ihnen zu Megaloszizonten weiter. Innerhalb dieser trennen sich Zytoplasmapakete (Zytomere) ab, in denen wiederum Millionen männlicher und weiblicher Merozoiten entstehen. Diese dringen nach dem Platzen der Schizonten in weiße Blutkörperchen, vornehmlich Leukozyten, ein und entwickeln sich dort zu länglichen Gametozyten. Die länglichen Gametozyten, die gegenüber den runden erythrozytären Gametozyten bei Weitem in der Überzahl sind, werden zusammen mit diesen bei der nächsten Blutmahlzeit vom Vektor aufgenommen. In ihm verläuft die weitere Entwicklung zu den für die Vögel infektiösen Sporozoiten analog zu den *Plasmodium*-Parasiten.

Erreger der Gattung *Haemoproteus* sind extrem weit verbreitet, verursachen i.d.R. aber keine relevante Erkrankung ihrer Vogelwirte (Levine 1961). Z.T. können sie bis zu 95 % der roten

Blutkörperchen der Vögel besiedeln, ohne dass diese heftige Symptome zeigen (Desser und Bennett 1993).

*Haemoproteus*-Arten werden durch Lausfliegen (Fam. Hippoboscidae) übertragen (Abb. 16). Sporozoiten aus dem Speichel der Lausfliegen gelangen in die Blutbahn des Vogels und befallen diverse innere Organe, wobei hauptsächlich die Lunge betroffen wird (Olsen 1974). Die in die Endothelzellen der Lungenkapillaren eingedrungenen Sporozoiten wachsen schnell zu Schizonten heran, der 12 bis 15 Zytomere bildet, die aus von Zytoplasma umgebenden Tochnuklei bestehen. Unter Vergrößerung der Wirtszelle kommt es zu einer vielfachen Teilung des Nukleus' jedes Zytomers, die nun die Oozysten darstellen. Während der weiteren Größenzunahme der Zytomere wächst die Wirtszelle entlang der sich verzweigenden Kapillaren und bildet eine so große Masse, dass sie die Blutgefäße verschließt. Innerhalb der nächsten Wochen wandern die Nuklei an die Oberfläche der Zytomere, umgeben sich mit Zytoplasma und werden so zu Merozoiten.

Es treten zwei Sorten von Schizonten auf: die Makroschizonten, welche sehr große Zytomere ausbilden, und die Mikroschizonten, welche um die Hälfte kleiner sind und häufig keine Zytomere entwickeln. Wenn die Schizonten platzen, gelangt eine Vielzahl an Merozoiten in den Blutstrom. Einige dringen wieder in Endothelzellen ein und wiederholen den Schizogoniezzyklus, die meisten aber differenzieren sich in Erythrozyten zu weiblichen und männlichen Gametozyten. Diese werden relativ groß und bilden schließlich um den Zellkern die ‚Halteridium‘-Form aus. Die Gametozyten gelangen beim Saugakt des Vektors in dessen Verdauungstrakt, wo sich die Parasiten entsprechend der der Gattungen *Plasmodium* und *Leucocytozoon* zu Sporozoiten entwickeln.

### 4.3 Nachweis der Vogelmalariareger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden

Die meisten Daten zur Verbreitung und Prävalenz der Vogelmalaria wurden durch lichtmikroskopische Untersuchungen gewonnen. Angaben zur Jahreszeit der Untersuchungen fehlen aber meistens. Laut Garnham (1966) sollten Blutaussstriche von wildlebenden Vögeln im Frühjahr angefertigt werden, da es in der Brutsaison stressbedingt vermehrt zu Rezidiven kommt und somit die Wahrscheinlichkeit höher ist, in diesem Zeitraum Parasiten zu finden. Nach Valkiūnas und Iezhova (2001) wird bei lichtmikroskopischen Untersuchungen von Blutaussstrichen das Vorkommen von *Plasmodium spec.* meistens unterschätzt, denn die Erreger werden nicht nur wegen der in den Blutaussstrichen meist sehr geringen Parasitämie übersehen, sondern auch weil befallene Erythrozyten die Eigenschaft haben zu aggregieren

und daher nur an einzelnen Stellen im Präparat vorkommen (Garnham et al. 1966; Barker et al. 1989).

Da auch die Kenntnisse zum natürlichen Vorkommen der Vogel malaria in Deutschland auf lichtmikroskopischen Studien basieren (Kučera 1981a,b,c; Haberkorn 1984; Krone et al. 2001), sollten in dieser Arbeit die Infektionsprävalenzen ausgewählter einheimischer Vogelpopulationen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode liegt im Vergleich zur Lichtmikroskopie v.A. darin, dass sie wesentlich sensitiver ist und weitaus geringere Parasitämien detektieren kann (Richard et al. 2002; Fallon et al. 2003; Freed und Cann 2003; Waldenström et al. 2004). Darüber hinaus können die gewonnenen Amplifikate einer Sequenzierung unterzogen und mit Hinblick auf das Erregerspektrum analysiert werden.

Außerhalb von Deutschland wurden in den letzten Jahren mit Hilfe molekularbiologischer Nachweistechiken bereits Infektionsprävalenzen von Vögeln mit Malariaerregern und Daten zur Verbreitung der verschiedenen Erregerspezies ermittelt (Feldman et al. 1995; Bensch et al. 2000, 2004; Ricklefs et al. 2004; Richard et al. 2002; Waldenström et al. 2004). Verschiedene PCR-Screeningverfahren, die sich hauptsächlich auf die 18 SSU rDNA und einen Teilbereich des cyt b-Gens konzentrierten, wurden eingesetzt, um die Prävalenzen möglichst zuverlässig zu bestimmen.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete PCR-Protokoll von Hulier et al. (1996), das einen Teilbereich der 18 SSU rDNA amplifiziert, wurde von den Autoren als hoch sensitiv beschrieben, da es in der Lage ist, nicht nur Blutstadien, sondern auch exoerythrozytäre Stadien im Gewebe zu detektieren. Die Autoren testeten das Verfahren an den vier verschiedenen humanpathogenen Malariaerregern, an diversen Nagermalariaerregern und an einem Affenmalariaparasiten mit positiven Resultaten. In den eigenen Voruntersuchungen mit *P. cathemerium*-DNA, die aus tiefgekühltem Vogelblut isoliert worden war, konnte ebenso zuverlässig immer ein Amplifikat gewonnen werden. Trotzdem wurde vor der Untersuchung der in Lingen und Bahrdorf gefangenen Vögel in allen in der GenBank abgelegten 18 SSU rDNA-Sequenzen von Plasmodien nach den Hybridisierungssites für die beiden Primer dieses PCR-Protokolls gesucht. Der ‚reverse‘-Primer stimmte immer vollständig mit den abgelegten Sequenzen überein, während der ‚forward‘-Primer in einigen Fällen einzelne Nukleotidabweichungen aufwies. Nichtsdestoweniger wurde das Protokoll übernommen, da die 18 SSU rDNA aufgrund ihrer relativ konservierten Nukleotidsequenz (Li et al. 1995) generell als ein

ideales molekulares Ziel für die Identifizierung der Malariaparasiten gilt (Lal et al. 1989; Waters und McCutchan 1989; Li et al. 1991, 1994a; Waters et al. 1993a, Qari et al. 1996).

Ungeachtet dessen müssen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse unter Berücksichtigung der Tatsache betrachtet werden, dass zur Zeit kein PCR-Verfahren verfügbar ist, das universell zuverlässig Infektionen mit Vogelmalariaerregern detektiert (Fallon et al. 2003). Zwar sind PCR-Techniken laut Jarvi et al. (2002) drei- bis viermal sensitiver als mikroskopische Untersuchungen, um chronische Infektionen zu erkennen, doch werden trotz Einsatzes der PCR die wirklichen Malariaprävalenzen immer noch um ca. 20 % unterschätzt. Voraussetzung für einen Erregernachweis mittels Blutuntersuchung durch PCR sind zirkulierende Gametozyten oder andere Stadien der erythrozytären Schizogonie. Bei chronischer oder sehr schwach ausgeprägter Infektion des Vogels kann die Parasitämie so niedrig sein, dass sie trotz der hohen Sensitivität der PCR nicht detektiert wird (Jarvi et al. 2002; Waldenström et al. 2004). Die Anzahl der Parasiten im Blut ist bei einer Infektion mit Erregern der Gattung *Plasmodium* darüber hinaus von Natur aus geringer als bei einem Befall mit *Haemoproteus spec.* (Atkinson und van Riper 1991).

Ein weiteres Problem können nach Freed und Cann (2003) PCR-Protokolle sein, die an regionale Erregerpopulationen angepasst sind. Unterschiede zwischen den Parasitenstämmen können dazu führen, dass die vorausgesagte Sensitivität mit anderem Untersuchungsmaterial nicht erreicht wird. Richard et al. (2002) untersuchten die Sensitivität von vier verschiedenen PCR-Protokollen, indem sie diese an denselben Blutproben testeten und die gewonnenen Ergebnisse mit lichtmikroskopisch gewonnenen Daten verglichen. In dieser Studie an afrikanischen Vögeln konnten mit der PCR und Primern, die von Feldman et al. (1995) im Rahmen der Untersuchung hawaiianischer Vögel konstruiert worden waren, nicht alle lichtmikroskopisch gewonnenen positiven Befunde bestätigt werden. Es wird gegenwärtig an der Entwicklung noch zuverlässigerer und sensitiverer PCR-Protokolle zum Nachweis von Vogelmalariaerregern gearbeitet. Während das PCR-Protokoll nach Waldenström et al. (2004) offenbar geeignet ist, Spezies der Gattungen *Plasmodium* und *Haemoproteus* zu detektieren, wurde kürzlich ein Protokoll zum gleichzeitigen Nachweis von *Plasmodium*-, *Haemoproteus*- und *Leucocytozoon*-Erregern etabliert (Hellgren et al. 2004).

#### 4.4 Infektionsprävalenzen heimischer Vögel mit Malariaerregern

Mit dem von Hulier et al. (1996) entwickelten PCR-Protokoll zur Amplifikation eines Teilbereiches der 18 SSU rDNA wurden in der vorliegenden Arbeit 76 von insgesamt 369 auf einen Befall mit Vogelmalariaerregern untersuchten adulten Individuen drei verschiedener Vogelarten aus zwei Familien positiv getestet. Von den untersuchten Vögeln waren 188 Tiere männlichen und 181 weiblichen Geschlechts, wobei von diesen 43 bzw. 33 Tiere infiziert waren. Der Unterschied zwischen den Geschlechtern ist nicht signifikant (Fischer-Test;  $p=0,304$ ,  $df=1$ ) und unterstützt somit die Aussage von Kirkpatrick et al. (1991), dass es keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von Blutparasiten zwischen den Geschlechtern der Wirte gibt.

Die ermittelten Infektionsprävalenzen wiesen dagegen große Unterschiede zwischen den verschiedenen Vogelarten auf. Insgesamt waren 6,8 % der untersuchten Trauerschnäpper mit Vogelmalariaerregern infiziert. Dagegen waren 19,1 % der Tannenmeisen und sogar 76,8 % der Kohlmeisen Träger von Parasiten. Diese Infektionsprävalenzen unterscheiden sich alle drei signifikant voneinander. Während es zwischen den verschiedenen Fangorten bei den Trauerschnäppern keine signifikant unterschiedlichen Werte gab, war das bei den Tannenmeisen sehr wohl der Fall. Von diesen waren in Bahrdorf 36 % und in Lingen 13 % infiziert. Für die Kohlmeisen können keine Vergleiche zwischen den Fangorten gezogen werden, da nur Individuen aus Bahrdorf zur Untersuchung vorlagen.

Über die Ursachen der unterschiedlichen Infektionsprävalenzen zwischen den Fanggebieten kann nur spekuliert werden. Primär ist an Unterschiede in der Culiciden-Fauna zu denken, in der ja die Überträger der Malariaerreger zu suchen sind. Hierbei kann sowohl die Artenzusammensetzung, als auch die Individuendichte eine Rolle spielen. So ist z.B. das Vorkommen anderer Culiciden-Spezies mit unterschiedlichen Vektorkompetenzen für die Vogelmalariaerreger denkbar. Auch können die unterschiedlichen Waldformen in den beiden Fanggebieten ebenso wie unterschiedliche regional- oder lokal-klimatische Bedingungen Einfluss auf die Ausbildung der lokalen Mückenfauna und damit auf die bei den Vögeln vorkommenden Infektionsprävalenzen haben. Der in Lingen vorherrschende Nadelwald lässt z.B. auf ein geringeres Vorkommen von stehenden Wasserflächen als Brutstätten für Stechmücken schließen.

Warum sich die drei verschiedenen Vogelspezies in ihren Infektionsprävalenzen signifikant voneinander unterscheiden, bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen. Differierende Infektionsprävalenzen könnten z.B. durch unterschiedliches Artverhalten der Vögel entstehen.

Eine Übertragung von Parasiten durch die Mücken könnte u.A. durch die Reviergröße (Entfernung der Bruthöhlen), das Paarungs- oder das Schwarmverhalten beeinflusst werden.

## 4.5 Identifizierung der Malariaparasiten

### 4.5.1 Problematik der Speziesdifferenzierung nach morphologischen Gesichtspunkten

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Versuche gemacht, den Artbegriff zu definieren. 1997 katalogisierte Mayden schon 22 verschiedene gebräuchliche Definitionen, die später durch weitere ergänzt wurden (Perkins 2000). Grob kann man die verschiedenen Spezieskonzepte in drei Kategorien unterteilen: Individuen einer Art sind gekennzeichnet durch (1) ihre phänotypische Übereinstimmung, (2) ihre Fähigkeit durch Reproduktion fertile Nachkommen zu zeugen und (3) ihre gemeinsame phylogenetische Herkunft.

Für die Malariaerreger wurde lange Zeit ausschließlich das erste Konzept angewandt. Nach McManus und Bowles (1996) gilt die lichtmikroskopische Untersuchung von Blutaussstrichen immer noch als Hauptstütze zur Speziesidentifikation. Eine Unterscheidung von Erregerspezies in einem Blutaussstrich ist aber über die bloße Detektion der Infektion hinaus oftmals außerordentlich schwierig. Dies liegt z.B. daran, dass wichtige Unterscheidungsmerkmale nicht immer in einem Blutaussstrich vorliegen. Zu diesen gehören z.B. die Zahl der Merozoiten in einem Schizonten, die Verschiebung des Kernes der Wirtszelle in Richtung des Pols oder der Ausschluss des Kernes aus der Wirtszelle. Diese Merkmale würde man aber nur bei einem ausgewachsenen Schizonten finden. Lediglich das Vorkommen von Gametozyten in Leukozyten spricht eindeutig für einen *Leucocytozoon*-Befall. Nichtsdestoweniger kann ein solcher auch vorliegen, wenn keine Gametozyten in den Leukozyten zu finden sind, da dieses Merkmal nur bei einer länger bestehenden Infektion gültig ist. In den ersten zehn bis zwölf Tagen einer Infektion übersteigt die Anzahl der runden, in den Erythrozyten vorhandenen Gametozyten bei Weitem die Zahl der länglichen, in den Leukozyten vorkommenden Parasiten (Olsen 1974).

Ein weiterer Nachteil der Lichtmikroskopie ist, dass die Parasiten aufgrund der Färbung und einer langen Lagerungszeit der Präparate stark verzerrt oder deformiert sein können (Perkins 2000). Selbst wenn alle Entwicklungsstadien eines Parasiten in einem Blutaussstrich vorkommen, ist es oftmals schwer, aufgrund der Morphologie eine Artdiagnose zu stellen (Bennett et al. 1993).

Nach Valkiūnas und Peirce (2000) ist die Studie der Parasiten im Blutausschlag eine gerechtfertigte Methode, um ergänzende Informationen zur Klassifizierung einer Spezies zu erhalten. Die Autoren weisen aber, ebenso wie Garnham (1966) und McConkey (1996), darauf hin, dass morphologische Untersuchungen der verschiedenen Blutstadien als einziges Kriterium für eine Speziesbeschreibung keinen uneingeschränkten systematischen Wert besitzen. Valkiūnas und Peirce (2000) stellten sogar fest, dass einige Erregerspezies der Gattung *Plasmodium* in verschiedenen Vogelwirtsspezies und sogar -ordnungen auftreten und in diesen diverse morphologische Formen annehmen können, die durch Stammvariationen und Übertragung durch verschiedene Vektoren in unterschiedlichen geographischen Gebieten bedingt sind. So kann z.B. die Anzahl der Merozoiten zwischen verschiedenen Stämmen einer Erregerart unterschiedlich sein und sich selbst innerhalb desselben Stammes von Vermehrungszyklus zu Vermehrungszyklus verändern (Schall 1996). Garnham (1966) fand im Experiment, dass manche Plasmodienarten morphologische Unterschiede zeigen, wenn Wirbeltierwirte aus verschiedenen systematischen Familien befallen werden.

So wiesen bereits Manwell (1935) und Garnham (1966) darauf hin, dass neben den morphologischen Unterschieden noch eine Vielzahl weiterer Kriterien taxonomisch relevant sein dürften: Vektorarten, Besonderheiten der parasitären Entwicklung im Vektor, Periodizität der asexuellen Vermehrungszyklen, immunologische und physiologische Daten und geographische Verbreitung der Parasiten und ihrer Wirte.

Die auf morphologischen Kriterien basierende systematische Einordnung der Malariaparasiten steht nun auch deshalb generell in Frage, weil neuere molekularbiologische Erkenntnisse auf andere Verwandtschaftsverhältnisse hinweisen (z.B. Kissinger et al. 2002). Es erscheint daher sinnvoll, die lichtmikroskopische Untersuchung zur systematischen Einordnung der Malariaparasiten durch eine molekularbiologische Identifizierung zu ersetzen.

#### **4.5.2 Unterstützung der Speziesidentifizierung durch DNA-Sequenzanalyse**

Mit der PCR und nachfolgender DNA-Sequenzanalyse wurden solche molekularbiologische Methoden zur Ermittlung des Erregerspektrums bei den niedersächsischen Vögeln eingesetzt. Die Proben, in denen mit der PCR nach Hulier et al. (1996) *Plasmodium*-DNA nachgewiesen worden war, wurden einer weiteren PCR nach Waldenström et al. (2004) unterzogen, die ein für DNA-Sequenzvergleiche besser geeignetes, da längeres, Amplifikat hervorbringen sollte.

Das Protokoll nach Waldenström et al. (2004) ist eines von mehreren, die entwickelt wurden, um DNA unbekannter Vogelmalariaparasiten zu amplifizieren (Feldman et al. 1995; Bensch et al. 2000; Ricklefs und Fallon 2002; Fallon et al. 2003; Waldenström et al. 2004). Richard et al. (2002) verglichen vier verschiedene PCR-Protokolle und kamen zu dem Schluss, dass das von Bensch et al. (2000) das zuverlässigste und sensitivste ist. Waldenström et al. (2004) modifizierten das von Bensch et al. (2000) entwickelte, indem sie nach dem Prinzip der nested PCR eine zusätzliche DNA-Amplifikation mit selbst konstruierten PCR-Primern vorschalteten. Die Autoren beschreiben mit dem neuen nested PCR-Protokoll eine deutliche Steigerung der Sensitivität bei der Detektion schwach ausgeprägter Infektionen.

Mit der PCR nach Waldenström et al. (2004) wurde ein Teilstück des cyt-b Gens amplifiziert, das mehr als doppelt so lang war wie das Amplifikat, das mit der PCR nach Hulier et al. (1996) für das 18 SSU rRNA-Gen erhalten worden war, so dass wesentlich mehr Sequenzinformation zur Verfügung stand. Für das cyt-b Gen liegen außerdem sehr viel mehr analysierbare Sequenzdaten in der GenBank vor, da es von vielen Wissenschaftlern als Zielsequenz für systematische Untersuchungen genutzt wird (z.B. Bensch et al. 2000; Ricklefs und Fallon 2002; Perkins und Schall 2002; Schrenzel et al. 2003). Durch den direkten Vergleich einer gefundenen DNA-Sequenz mit den in der GenBank abgelegten Sequenzen ist daher eine Gattungszuordnung und möglicherweise sogar eine Artidentifizierung möglich.

#### **4.5.3 Problematik der Speziesdifferenzierung aufgrund von DNA-Sequenzen**

Durch die Sequenzierung der 76 amplifizierten cyt b-Genabschnitte nach dem PCR-Protokoll von Waldenström et al. (2004) wurden 13 DNA-Sequenzen ermittelt, die sich in 2,9 % bis 8,5 % ihrer Nukleotidbausteine voneinander unterschieden. Diese 13 verschiedenen DNA-Sequenzen stehen möglicherweise für ebenso viele Erregerspezies.

Über die Frage, ab wie viel Prozent Sequenzunterschied eines Gens man von verschiedenen Arten sprechen kann, wird generell diskutiert. Beim cyt b-Gen kann es z.B. zu intra-spezifischen Sequenzunterschieden von 0,2 % bei verschiedenen Stämmen des Malaria-Parasiten *P. falciparum* (Joy et al. 2003) bis zu 4 % bei verschiedenen Individuen des Rotschwanz-Streifenhörnchens *Tamias ruficaudus* (Good und Sullivan 2001) kommen. Bei den Primaten inkl. *Homo sapiens* werden dagegen sogar Malariaerregerspezies unterschieden, deren Sequenzunterschiede lediglich 1 % betragen (Escalante et al. 1998).

Nach Ricklefs et al. (2004) muss man, wenn keine näheren Angaben zur Populationsgenetik vorliegen, einen willkürlichen Prozentwert setzen, um die verschiedenen Spezies anhand ihrer

Sequenzunterschiede zu definieren. Perkins (2000) schlägt einen Wert von 3 % Sequenzunterschied für das cyt b-Gen vor, ab dem von einer neuen Spezies gesprochen werden kann. Diesen Wert sehen Ricklefs et al. (2004) allerdings als zu hoch an.

Bensch et al. analysierten 2004 das cyt b-Gen diverser Vogelmalariaparasiten und kamen zu dem Schluss, dass die unterschiedlichen ermittelten DNA-Sequenzen tatsächlich verschiedene Erregerspezies darstellen, da die mitochondrialen DNA-Linien der Parasiten unabhängige evolutionäre Einheiten repräsentieren und somit jede einzelne als separate biologische Art betrachtet werden kann. Im Falle der cyt b-DNA-Sequenzen der Vogelmalariaparasiten nimmt man inzwischen aufgrund der hohen Diversität der Sequenzen sogar an, dass es möglicherweise genauso viele Parasitenarten gibt wie Wirtsarten unter den Vögeln (Ricklefs und Fallon 2002; Waldenström et al. 2004). Nach Bensch et al. (2004) wäre es möglich, dass an die 10000 Arten von *Plasmodium*- und *Haemoproteus*-Spezies existieren. Dies stünde allerdings in starkem Widerspruch zu den Ergebnissen morphologischer Untersuchungen. Nach diesen werden zur Zeit lediglich 34 *Plasmodium*- (Bennett et al. 1993) und 134 *Haemoproteus*-Arten (Bennett et al. 1994) als valide anerkannt. Da in der GenBank nur für acht der 34 Plasmodienarten der Vögel Sequenzdaten abgelegt sind, könnte es sein, dass die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen zu bereits bekannten Arten gehören. Dies kann natürlich auch für nicht eingetragene *Haemoproteus*-Arten gelten.

Auch wenn sich abzeichnet, dass die Anzahl der existierenden Parasitenspezies ähnlich hoch wie die der Vogelspezies ist, wurde das früher geltende ‚ein Wirt-ein Parasit‘-Prinzip (Garnham 1966), das oftmals dazu führte, dass identische Parasiten (d.h. solche, für die später dieselben DNA-Sequenzen ermittelt wurden) in verschiedenen Vogelarten unterschiedliche Speziesnamen bekamen (Bensch et al. 2004), in letzter Zeit durch molekularbiologische Studien widerlegt (Waldenström et al. 2004).

#### **4.6 Auswirkungen allochthoner Malariaerreger auf die Avifauna**

Nach Schrenzel et al. (2003) fand eine umfassende Wirt-Parasit-Koevolution statt, während der es zu einem regelmäßig auftretenden Transfer von Malariaerregern auf neue Wirte kam, die nicht zuletzt auf eine Vielzahl von Generalisten unter den Mückenvektoren zurückzuführen ist (Ricklefs et al. 2004). Durch die Fähigkeit der Vogelmalariaerreger, neue Wirte zu befallen, die weltweite Verbreitung der Wirtsgruppe und die i.d.R. hohe Mobilität des einzelnen Wirtes kann es schnell zur Verbreitung einer Parasitenspezies oder eines -stammes in Gebiete kommen, in denen sie/er vorher nicht vorkam.

Zum Verhalten eines Parasiten in einem neuen Wirt gibt es zwei Theorien. Die eine besagt, dass der Parasitismus sich in Richtung eines avirulenten Kommensalismus bewegt, da es für das Überleben des Parasiten vorteilhaft ist, den Wirt nicht zu sehr zu schädigen (Palmieri 1982). Nach der anderen Theorie stehen Wirt und Parasit unter ständigem Selektionsdruck und steigern ihre Resistenz bzw. Virulenz daher immer weiter (Anderson und May 1982).

Nach Bensch et al. (2000) führt jedoch der Wechsel eines Parasiten auf eine neue Wirtsspezies i.d.R. zunächst zu einem Anstieg der Mortalität in der neuen Wirtspopulation. Wirtspopulationen, die vorher nicht mit den Erregern in Kontakt gekommen und daher nicht an sie angepasst sind, können sogar in ihrer Existenz gefährdet werden. Dieses Phänomen ist bei einigen Vogelarten auf Hawaii zu beobachten. Die unbeabsichtigte Einschleppung von *Culex quinquefasciatus* und die spätere Einführung von Vogelmalariaerregern zu Anfang des letzten Jahrhunderts (Woodworth et al. 2005) hatte nach Benning et al. (2002) dramatische Konsequenzen für die heimische Vogelfauna. Durch das Vordringen der Malaria sind einige Arten der Drepanididae (hawaiianische Kleidervögel) (Feldman et al. 1995; Benning et al. 2002) und die hawaiianische Krähe (*Corvus hawaiiensis*) (Massey et al. 1996) bereits vom Aussterben bedroht. Atkinson et al. (1995) beschreiben, dass 50 bis 100 % der Waldvögel auf Hawaii nach einer Infektion mit *P. relictum* sterben.

#### **4.7 Erregerspektrum bei den niedersächsischen Vögeln**

Bei keinem der infizierten Vögel in dieser Arbeit konnte ein Mehrfachbefall mit verschiedenen Erregern festgestellt werden, da die Sequenzieroelektropherogramme keine Doppelspitzen aufwiesen. Nach Manwell und Rossi (1975) sowie Perkins (2000) und Waldenström et al. (2004) ist ein Mehrfachbefall in der freien Natur aber nicht selten.

##### **4.7.1 Tannenmeisen**

Bei den Tannenmeisen wurden in dieser Studie drei unterschiedliche DNA-Sequenzen gefunden, die möglicherweise verschiedene Erregerspezies darstellen. Alle drei konnten GenBank-Einträgen der Gattung *Plasmodium* zugeordnet werden. Zwei der drei Sequenzen wiesen eine 100 %ige Übereinstimmung mit in der Datenbank hinterlegten Sequenzen auf; die dritte war nicht gelistet, ließ aber aufgrund ihrer Sequenzübereinstimmung von 98,5 % mit einem GenBank-Eintrag den Schluss zu, dass auch sie der Gattung *Plasmodium* angehört.

In der von Bishop und Bennett (1992a,b) verfassten Übersicht der Vogelmalariaerreger und ihrer Wirtsspezies sind keine Einträge für *Plasmodium*-Spezies bei Tannenmeisen zu finden. Aufgeführt sind lediglich Vermerke über die *Haemoproteus*-Art *Haemoproteus majoris* und je einen nicht weiter spezifizierten *Haemoproteus*- und *Leucocytozoon*-Erreger, wovon der erste 1989 von Rogge bei einer Tannenmeise in Ostdeutschland nachgewiesen wurde.

Das Fehlen der Gattung *Plasmodium* als Parasit der Tannenmeise in dem Kompendium von Bishop und Bennett (1992a,b) ist möglicherweise auf die in der Natur vorkommende sehr niedrige Anzahl von Plasmodien im Blut infizierter Vögel zurückzuführen (Atkinson und van Riper 1991), so dass Infektionen leicht übersehen werden können. Da Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie und selbst mit Hilfe der PCR-Methode deshalb nicht in der Lage sind, alle Infektionen zu detektieren, ist die Infektionsprävalenz von Vögeln mit Plasmodien tatsächlich wahrscheinlich höher als bisher dokumentiert (Fallon et al. 2003). Obwohl auch in der aktuellen Literatur keine Einträge für Plasmodien bei Tannenmeisen zu finden sind, ist eher davon auszugehen, dass Tannenmeisen keine neue Wirtsspezies für Plasmodien darstellen, sondern dass diese bislang nur noch nicht in jenen entdeckt worden sind.

#### 4.7.2 Trauerschnäpper

Bei den Trauerschnäppern wurden insgesamt zehn unterschiedliche DNA-Sequenzen ermittelt. Von diesen konnten nach Vergleich mit GenBank-Einträgen neun der Gattung *Plasmodium* und eine der Gattung *Haemoproteus* zugewiesen werden. Im Laufe der Arbeit hatte sich herausgestellt, dass die Genus-spezifische PCR nach Hulier et al. (1996), die zum schnellen Screening der DNA-Extrakte auf *Plasmodium spec.* diente, anscheinend auch *Haemoproteus*-DNA detektieren kann. Da das PCR-Protokoll von den Autoren ursprünglich nur an Menschen, Primaten und Nagern getestet worden war, die keine Träger von *Haemoproteus*-Arten sind, war dieser Umstand vorher nicht entdeckt worden. Ob das Protokoll allerdings in der Lage ist, sämtliche *Haemoproteus*-Spezies zu detektieren, muss noch geklärt werden.

Von den insgesamt zehn verschiedenen Sequenzen wiesen fünf eine Übereinstimmung von 100 % mit einem GenBank-Eintrag für *Plasmodium spec.* auf. Die anderen fünf Sequenzen konnten aufgrund hoher Sequenzübereinstimmungen von mindestens 98 % ihren jeweiligen Gattungen (*Haemoproteus* und *Plasmodium*) zugewiesen werden.

Die hohe Anzahl verschiedener DNA-Sequenzen von Vogelmalariaerregern bei den Trauerschnäppern (zehn bei 15 infizierten Tieren) steht einerseits im Gegensatz zu ihrer niedrigen Infektionsprävalenz und andererseits zur geringen Anzahl von Sequenzen bei den

Tannenmeisen (drei bei 18 infizierten Tieren). Bishop und Bennett (1992a,b) beschreiben aber ähnliche Befunde. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es sich bei dem Trauerschnäpper um einen Zugvogel handelt, der in Afrika überwintert (Glutz von Blotzheim et al. 1993). So ist diese Art nicht nur den in Deutschland, sondern zusätzlich auch den in Afrika vorkommenden Malariaparasiten potentiell ausgesetzt.

Insgesamt waren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung des Kompendiums von Bishop und Bennett (1992a,b) fünf *Haemoproteus*-Arten als Parasiten der Trauerschnäpper bekannt. Des Weiteren sind nicht näher beschriebene *Haemoproteus*-, *Leucocytozoon*- und Plasmodien-Spezies aufgelistet sowie Infektionen mit Trypanosomen. Der einzige, einer gültigen Spezies zugeordnete *Plasmodium*-Erreger ist *P. vaughani*, der in Norwegen in Trauerschnäppern gefunden wurde.

#### 4.7.3 Kohlmeisen

Bei den 43 infizierten Kohlmeisen wurden vier verschiedene DNA-Sequenzen ermittelt. Drei Sequenzen konnten der Gattung *Plasmodium* zugeordnet werden, wobei zwei Sequenzen eine vollständige Sequenzübereinstimmung mit bereits hinterlegten GenBank-Einträgen aufwiesen und die dritte eine sehr hohe Ähnlichkeit von 99,6 % mit einem *Plasmodium*-Erreger aufzeigte. Die vierte Sequenz, die 17mal auftrat, ist die einzige in dieser Arbeit gefundene DNA-Sequenz, die aufgrund vollständiger Sequenzübereinstimmung einer definierten Erregerspezies, nämlich *Haemoproteus majoris*, zugewiesen werden konnte.

Die vier bei den Kohlmeisen gefundenen DNA-Sequenzen können maximal vier verschiedene Erregerspezies widerspiegeln. Bei Bishop und Bennett (1992a,b) sind dagegen 12 Erregerarten als Blutparasiten von Kohlmeisen aufgelistet. Zu diesen gehören sowohl die vier *Plasmodium*-Arten *P. relictum*, *P. polare*, *P. circumflexum* und *P. vaughani*, als auch der in der vorliegenden Arbeit gefundene Erreger *Haemoproteus majoris*, die in Frankreich, Schweden und Polen nachgewiesen worden waren (Bishop und Bennett 1992a,b). Auch Haberkorn (1984) und Rogge (1989) erwähnen das Vorhandensein von Plasmodien bei Kohlmeisen, allerdings wurde von den Autoren keine Speziesidentifikation durchgeführt.

#### 4.8 Lichtmikroskopische Einordnung des Malariaerregers aus dem Blut der Tannenmeise

Die Vogelmalariaparasiten werden aufgrund der Morphologie der Gametozyten und Schizonten sowie des Verhaltens des ausgewachsenen Parasiten gegenüber dem Kern der

Wirtszelle in die vier Untergattungen *Haemamoeba*, *Huffia*, *Giovannolaia* und *Novyella* eingeteilt (Corradetti et al. 1963).

Die neun verschiedenen Arten, die zur Untergattung *Haemamoeba* gezählt werden, haben rundlich-ovale Gametozyten, und der ausgewachsene Parasit tendiert dazu, den Zellkern der Wirtszelle Richtung Pol zu verschieben.

Von der Untergattung *Huffia* sind nur drei Vertreter bekannt. Charakteristisch ist für sie, dass die Gametozyten eine längliche Form aufweisen, die Schizonten nur in den Retikulozyten zu finden sind und der ausgewachsene Parasit keinen Einfluss auf die Position des Zellkernes hat.

Die Schizonten der Untergattung *Giovannolaia*, von denen bisher 13 Arten bekannt sind, zeichnen sich durch Zytoplasma-reiche Schizonten aus, die größer sind als der Zellkern der Wirtszelle.

Die Untergattung *Novyella*, von der bisher neun Arten beschrieben sind, besitzt Schizonten, die viel kleiner sind als der Zellkern der Wirtszelle und einen geringen Zytoplasmaanteil haben (Kissinger et al. 2002).

Da bisher erst DNA-Sequenzen von acht verschiedenen Vogelmalariaerregern in der GenBank vorliegen (*P. elongatum*, *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *P. lophurae*, *P. nucleophilum*, *P. relictum*, *P. rouxi*), wäre es für die Analyse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen förderlich gewesen, die zugehörigen Parasiten auch lichtmikroskopisch untersuchen zu können. Leider lagen aber nur 20 Blutaussstriche der Tannenmeisen aus Lingen vor, die von ausreichender Qualität für eine lichtmikroskopische Untersuchung waren. In lediglich einem dieser Ausstriche wurde ein Vogelmalariaerreger gefunden (s. Kap. 3.1.3). Dieser lichtmikroskopische Befund konnte später molekularbiologisch verifiziert werden. Nach dem Ergebnis des PCR-Screenings der Blutpräparate hätten lichtmikroskopisch allerdings in noch acht weiteren Blutaussstrichen Erreger gefunden werden müssen, wenn man aufgrund der mitgeführten Kontrollen und der üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Durchführung der PCR eher von falsch negativen lichtmikroskopischen Ergebnissen als von falsch positiven PCR-Ergebnissen ausgeht. Dieses falsch negative lichtmikroskopische Resultat ist vermutlich auf die höhere Sensitivität der PCR zurückzuführen (Feldman et al. 1995; Fallon et al. 2003; Freed und Cann 2003; Waldenström et al. 2004).

Das einzelne in dieser Arbeit gefundene *Plasmodium* im Blutausstrich der Tannenmeise war sehr wahrscheinlich ein männlicher Gametozyt, auch wenn das Pigment nicht verteilt vorlag, sondern an einem Pol konzentriert war. Wäre es ein weiblicher Gametozyt gewesen, hätte er einen kompakten dunkelroten Kern besitzen müssen. Ein solcher war in dem vorliegenden Parasiten allerdings nicht zu erkennen. Ein männlicher Gametozyt dagegen besitzt einen diffusen Kern, der schlecht anfärbbar ist (Seed und Manwell 1977). Entsprechend konnte in dem gefundenen *Plasmodium* überhaupt keine kern-ähnliche Struktur gesehen werden. Gegen eine Einordnung des Parasiten als Schizont sprach, dass keine Merozoitenkerne zu sehen waren. Ein Trophozoit konnte es aufgrund der bereits großen Menge an produziertem Malariapigment nicht gewesen sein. Es scheint sich daher am ehesten um einen männlichen Gametozyten der Untergattung *Haemamoeba* gehandelt zu haben.

Nach dem Bestimmungsschlüssel von Peirce und Bennett (1996) besitzen Parasiten der Untergattung *Haemamoeba* runde Gametozyten, die, wenn sie reif sind, den Kern der Wirtszelle in Richtung des Pols verschieben, wie es in Abb. 4 (Kap. 3.1.3) zu sehen ist.

Zur Gattung *Leucocytozoon* konnte der gefundene Erreger nicht gehören, da diese kein Malariapigment besitzen (Atkinson und van Riper 1991).

Ein Gametozyt der Gattung *Haemoproteus* dagegen umwächst den Zellkern der Wirtszelle in der sogenannten ‚Halteridium‘-Form (Garnham 1966) und ist viel größer als ein Gametozyt der Plasmodien. Ein *Haemoproteus*-Schizont nimmt eine längliche Form an.

#### **4.9 Untersuchung der Zoovögel auf Haemosporina**

Da die Vogel malaria weltweit verbreitet ist (Valentin et al. 1994) und ihre Erreger von einer Vielzahl verschiedener Vektoren verbreitet werden, stellen Vögel eine potentielle Gefahr als Erregerreservoir dar (Hiepe und Jungmann 1983). Die Tatsache, dass heimische Vögel als Träger von Infektionserregern fungieren können, ist von großer Bedeutung für importierte Vögel aus anderen Regionen der Welt (Manwell und Rossi 1975), da sich Tiere, die hier in Zoos, Wildparks oder in privater Hand gehalten werden, infizieren können.

Vogelmalaria parasiten sind häufig nicht sehr pathogen bei Vögeln, die auf eine gemeinsame Koevolution mit dem Erreger zurückblicken können (Cranfield et al. 1990; Hiepe und Jungmann 1983), allerdings ist die Mortalität hoch bei Vögeln, die neu in Kontakt mit dem Erreger kommen. Dies ist ein seit langem bekanntes und insbesondere bei der Haltung von Pinguinen im Zoo sehr schwerwiegendes Problem (Reichenow 1947). So stellt die Malaria weltweit die häufigste Todesursache bei in Außenkäfigen gehaltenen Pinguinpopulationen dar

(Cranfield et al. 1990; Redrobe 2000). Die hohe Pathogenität der Malariaerreger für Pinguine ist vermutlich damit zu begründen, dass Pinguine unter natürlichen Bedingungen i.d.R. nicht mit Malariaerregern in Kontakt kommen, u.A. auch weil mögliche Vektoren in ihrem antarktischen Lebensraum nicht vorkommen (Lindt und Hörning 1966).

Um genaue Daten zu erhalten, wie häufig die Vogel malaria bei Pinguinen in Europa vorkommt, führte Petit 1997 eine umfassende Studie durch. Er kam zu dem Ergebnis, dass die Krankheit in ganz Europa anzutreffen ist und dass sämtliche Altersgruppen an Pinguinen betroffen sind. Ein weiteres wichtiges Ergebnis seiner Studie war, dass die Vogel malariaerreger im lebenden Tier sehr schwer zu diagnostizieren sind. Dies liegt daran, dass beim Pinguin, der kein adäquater Wirt ist und dessen endotheliale Entwicklungsphase sehr viel schwerwiegender verläuft als bei anderen Vogelwirten, im Blut fast nie Entwicklungsstadien des Parasiten zu finden sind (Reichenow 1947; Cranfield et al. 1990). Außerdem werden die Infektionen i.d.R. erst sehr spät entdeckt, da initial klinische Symptome bei den Tieren normalerweise fehlen (Seed und Manwell 1977; Graczyk et al. 1993). Wenn die Erkrankung dann endlich klinisch manifest wird, ist es häufig zu spät, um durch therapeutische Maßnahmen das Leben des Tieres zu retten (Cranfield et al. 1990).

Ein weiteres Problem ist aber auch, dass Vögel, die keine erythrozytären (und damit routinemäßig nachweisbaren) Entwicklungsstadien mehr aufweisen, aufgrund einer persistierenden Gewebsinfektion Rezidive erleiden und wieder infektiös für Mücken werden können. Diese können dann wiederum andere im Zoo lebende Tiere infizieren (Waldenström et al. 2004).

Da Pinguine in der freien Natur immer seltener werden (Redrobe 2000) und die Einfuhr der Tiere aus ihren Ursprungsländern schon seit langem stark eingeschränkt ist (Schröder 1986), muss der gesundheitlichen Betreuung der vorhandenen Tiere besondere Bedeutung zukommen. Daher werden verschiedene Ansätze evaluiert, um die Malariaparasiten so früh wie möglich im lebenden Tier zu entdecken. Dazu zählen die Entwicklung von ELISA-Testverfahren (Graczyk et al. 1993; Graczyk et al. 1994) und eine Aufstellung von serologischen Referenzwerten (Graczyk et al. 1995). Durch eine regelmäßige Blutabnahme sollen die Pinguine überwacht werden, damit eine Infektion so schnell wie möglich entdeckt wird und eine wirksame Behandlung durchgeführt werden kann.

PCR-Verfahren sind geeignet, um bei einer postmortalen Untersuchung Gewissheit über die Todesart zu erlangen. Die Untersuchung des verstorbenen Tieres geschieht, damit bei einem eventuellen Befall des verendeten Tieres mit Vogel malariaerregern die anderen Mitglieder der Zookolonie vor dem gleichen Schicksal durch prophylaktische Medikamentengaben geschützt werden können (McConkey et al. 1996). Mittlerweile wird aber in vielen Zoos (Petit 1997)

eine grundsätzliche prophylaktische Medikation in den Sommermonaten durchgeführt, damit es erst gar nicht zu Todesfällen kommen kann. Darüber hinaus sollten noch weitere vorbeugende Maßnahmen ergriffen werden, um Infektionen zu vermeiden (Petit 1997). Dazu gehört u.A. die Behandlung der in Zoos meist häufig vorkommenden stehenden Gewässer mit Insektiziden, um die Verbreitung von Stechmücken einzuschränken und damit den Übertragungszyklus zu unterbrechen.

Schließlich sollte noch erwähnt werden, dass der Import von nicht ausreichend untersuchten Vögeln auch ein hohes Risiko für die heimische Vogelfauna birgt, da die eingeführten Tiere ebenfalls Pathogene einschleppen können (Manwell und Rossi 1975).

In Rahmen dieser Arbeit wurden 47 deutsche Zoos und Tierparks angeschrieben, um Daten über das Vorkommen der Vogel malaria bei in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln zu erlangen. Von den 25 Einrichtungen, die antworteten, berichteten neun von positiven Fällen. Leider konnten nur vom Kölner Zoo Organproben der verstorbenen Tiere erhalten werden. Bei den beiden Proben handelte es sich um Gehirnproben eines 1991 verstorbenen Brillenpinguins und um in Paraffin eingebettetes Organmaterial eines 1996 im Zoo verstorbenen Balistars.

Der Balistar wird im Kölner Zoo seit 1992 im Rahmen des EEP (Europäisches Erhaltungszuchtprogramm) gehalten. Das natürliche Verbreitungsgebiet dieser Starenart beschränkt sich auf die Insel Bali, Indonesien. Der Vogel zeichnet sich durch weißes Gefieder mit schwarzen Flügelspitzen und blauen Augenringen aus. Durch sein besondere Aussehen und seine Fähigkeit, die menschliche Sprache nachzuahmen, ist der 1912 von Stresemann entdeckte Vogel ein begehrtes Tier für den Sammler und wurde infolgedessen stark gejagt. 2001 wurde der Bestand auf nur noch 5-6 freilebende Tiere geschätzt. In dem Katalog von Bishop und Bennett (1992a,b) findet der Balistar als Träger von Blutparasiten keine Erwähnung.

Der Brillenpinguin bewohnt die Küstenbereiche und vorgelagerten Inseln von Namibia und Südafrika. Bekannte Blutparasiten sind nach Bishop und Bennett (1992a,b) Babesien und Plasmodien, unter letzteren *P. elongatum* und *P. relictum*, wobei *P. relictum* als virulenter gilt (Cranfield et al. 1990).

Nach dem Tod der beiden Tiere wurden Organproben an das Institut für Tierpathologie der Universität Gießen geschickt. Dort wurde die Diagnose ‚Tod durch Vogel malaria‘ für beide Tiere festgestellt. Eine nähere Beschreibung der Erregerspezies wurde nicht vorgenommen.

Die in Paraffin eingebetteten Organproben der Vögel wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl molekularbiologisch als auch lichtmikroskopisch untersucht. Durch das

Einbetten in Paraffin konnte das Gewebe der beiden Tiere zwar über Jahre hinweg erhalten werden, aber für DNA-Isolierungen ist solches Material wesentlich schlechter geeignet als Frischgewebe (Bielawski et al. 2001), da es im Paraffin zu Kreuzverbindungen der DNA-Stränge kommen kann. Auch treten Basenmodifikationen während der Lagerung auf, die mit der Zeit zunehmen, während die Menge an DNA und die Länge der DNA-Moleküle immer mehr abnehmen. So traten auch in der vorliegenden Arbeit Probleme bei der Qualität und Menge der extrahierten DNA auf, denen aber durch Modifikationen des Protokolls (z.B. unspezifische DNA-Präamplifikation mit Hilfe des ‚GenomiPhi Kits‘) weitgehend beigegeben werden konnten. Ein Screening der Proben mit dem PCR-Protokoll nach Hulier et al. (1996) entfiel, da eine Infektion bereits als vorausgesetzt angesehen werden konnte.

Über die Sequenzierung des cyt b-Genabschnittes, der durch das PCR-Protokoll nach Waldenström et al. (2004) gewonnen worden war, konnte beim Brillenpinguin der Erreger *Haemoproteus majoris* nachgewiesen werden. Die aus den Organproben des Balistars extrahierte DNA lieferte hingegen ein PCR-Amplifikat, dessen Sequenz zu 99,4 % mit derjenigen des humanen Malariaerregers *P. falciparum* übereinstimmte. Diese Übereinstimmung war wesentlich höher als die mit irgendeiner anderen Sequenz der zahlreichen in der GenBank hinterlegten Vogelmalariareger. Die nächstgrößte Ähnlichkeit mit einem Vogelmalariareger lag bei 85,5 % (*Plasmodium spec.*). Da man nichtsdestoweniger von einer Infektion des Balistars mit einem Vogelmalariareger und nicht mit *P. falciparum* ausgehen muss, scheint dieser Befund die Hypothese einer nahen Verwandtschaft von *P. falciparum* und Vogelmalariaregern zu unterstützen.

#### 4.10 Molekulare Systematik

Die Phylogenese, die Stammesentwicklung der Organismen (Hentschel und Wagner 1993), beschreibt den Prozess, durch den aus einer gemeinsamen Stammart durch fortlaufende Aufspaltungen neue Artengruppen entstehen. Jede Art hat ein bestimmtes, charakteristisches Merkmalsmuster oder Merkmalsgefüge. Dieses Muster setzt sich zusammen aus früh entstandenen, ursprünglichen Merkmalen und später evolvierten, abgeleiteten Merkmalen; es ist also das Resultat der Evolution (Ax 1995).

Charles Darwin stellte 1859 in seinem epochalen Werk ‚On the Origin of Species by Means of Natural Selection‘ seine Evolutionstheorie vor. Er verstand die Evolution als historisches

Ereignis, in dem sämtliche Organismen der Erde in einem universellen Stammbaum mit einem einzigen Ursprung dargestellt werden können. Entscheidende Faktoren der Evolution sind nach Darwins Meinung Überproduktion, Variabilität und Selektion. Mit der Überproduktion ist gemeint, dass allen Lebewesen die Fähigkeit zum exponentiellen Wachstum innewohnt. Dies bedeutet, dass sie sich stärker vermehren können als es zum Fortbestand der Population nötig ist. Da aber die Ressourcen für das Überleben der Individuen begrenzt sind (z.B. Lebensraum, Nahrung), nimmt die Größe der Population nicht unbegrenzt zu. Weniger gut angepasste Mitglieder einer Art sterben aus (Selektion), und nur die Gene der besser angepassten sind es, die den Genbestand nachfolgender Generationen ausmachen. Des Weiteren stellte Darwin fest, dass die Nachkommen der Eltern Varietäten aufweisen und somit jedes Individuum einzigartig ist.

Die Merkmale, die man untersucht, um Individuen einem phylogenetischen System einzuordnen, können unterschiedlichen Ursprungs sein. Es können morphologische Strukturen, physiologische Prozesse, Verhaltensabläufe oder molekulare Muster sein (Wehner und Gehring 1990). Als molekulares Muster kann die DNA zu phylogenetischen Vergleichen herangezogen werden. 1944 konnte Avery durch Transformationsexperimente nachweisen, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist; 1953 entdeckten Watson und Crick die Doppelhelixstruktur der DNA (Watson und Crick 1953). Die von Mullis entwickelte Polymeraseketten-Reaktion (PCR) erlaubt es seit den 1980er Jahren, DNA in vitro zu vervielfältigen (Saiki et al. 1985). Deren Basenabfolge kann mit der von Sanger 1975 entwickelten Methode der DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977) abgelesen werden. Durch diese Entdeckungen wurde der Weg zur molekularen Evolutionsforschung möglich gemacht. Aufgrund der fortgeschrittenen Sequenzieretechnik wurde bereits eine Vielzahl an Genen und Genomen vollständig sequenziert und konnten der molekularen Systematik zugänglich gemacht werden.

Bei der molekularen Systematik werden die Divergenzen zwischen orthologen Gensequenzen verschiedener Lebensformen untersucht. DNA-Sequenzen eignen sich gut zur Aufklärung von systematischen Fragen, da sie aus zahlreichen, meistens homologisierbaren Positionen bestehen. Jedes einzelne Nukleotid nimmt eine bestimmte Position in einer bestimmten Sequenz ein und stellt außerdem einen eindeutigen Merkmalszustand (A, C, G oder T) dar. Die Anzahl der Merkmale wird nur durch die Länge der zu vergleichenden Gensequenzen reglementiert. Um homologe Basenabfolgen in der molekularen Systematik zu erkennen, wird

ein Sequenzalignment (Sequenzabgleich) der DNA mit Hilfe von Computerprogrammen durchgeführt.

Die Unterschiede zwischen den Sequenzen entstehen durch Mutationen. Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes muss eine Mutation allerdings nicht unbedingt zu einer Ausprägung auf der Proteinebene kommen. So können Mutationen auf der Aminosäureebene ohne Auswirkungen bleiben, allerdings werden sie auf der Ebene der DNA festgehalten. Falls es aber an ein und derselben Stelle in der DNA zu zeitlich aufeinanderfolgenden multiplen Substitutionen kommt, können auch diese unerkant bleiben. Multiple Substitutionen sind z.B. eine Veränderung von A (Adenin) nach G (Guanin) und wieder zurück oder von A nach G und dann nach C (Cytosin). Im ersten Fall würde man anstatt zwei Substitution keine feststellen und im zweiten eine anstatt zwei. Nach Hall (2001) nimmt die Wahrscheinlichkeit, dass multiple Substitutionen auftreten, mit der Zeit zu. Die tatsächliche Anzahl stattgefundener Mutationsereignisse ist demnach nicht unmittelbar nachvollziehbar.

Diejenigen Mutationen, die die Funktion des Proteins verbessern, sammeln sich im Laufe der Zeit im Erbgut an. Kimura formulierte allerdings 1968 die Theorie der neutralen molekularen Evolution, die besagt, dass ein großer Anteil der Veränderungen von Molekülen auf zufällige Mutationen zurückzuführen ist, die nicht oder nur geringfügig der Selektion unterliegen.

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurden verschiedene Evolutionsmodelle auf der Basis von DNA-Sequenzen und Algorithmen erstellt, die die tatsächlich abgelaufene Evolution darstellen sollen. Hauptsächlich kommen dabei die Verfahren der Distanz-Methode und die Maximum-Likelihood-Methode (ML; Kap. 2.10.3) zur Anwendung. Ein weiteres Modell zur Rekonstruktion der Phylogenese ist das Maximum-Parsimonie (MP)-Verfahren (Kap. 2.10.2), welches versucht, die beobachteten Sequenzunterschiede zwischen den Arten mit so wenigen Substitutionsereignissen wie möglich zu erklären.

Bei der Distanz-Methode werden die Distanzen als das Maß von Nukleotidunterschieden zwischen den einzelnen Sequenzen ausgedrückt. Es erscheint offensichtlich, dass zwei Sequenzen umso entfernter verwandt sind, je mehr sie divergieren. Auch scheint es wahrscheinlich zu sein, dass sich die Sequenzen in ihrer Nukleotidzusammensetzung umso mehr voneinander unterscheiden, je mehr Zeit vergangen ist, seitdem sie sich von ihrem gemeinsamen Vorfahren abgespalten haben. Diese Annahme wird unter der Hypothese der ‚molekularen Uhr‘ gemacht (Zuckerkanndl und Pauling 1965), die darauf beruht, dass die Unterschiede zwischen den Nukleotidsequenzen proportional zur Aufspaltungszeit der Arten sind. Die Autoren schlagen daher vor, dass für jedes Protein die Evolutionsrate mehr oder

wenig konstant ist. Aber auch wenn die vorangegangenen Annahmen wahrscheinlich sind, müssen sie nicht unbedingt vollständig zutreffen. Außerdem können verschiedene Gene oder verschiedene Arten unterschiedlich schnell evolvieren. Auch die tatsächliche Anzahl der Nukleotidaustausche kann aufgrund von multiplen Substitutionen nicht immer nachvollziehbar sein. Ebenso gibt es Reparaturmechanismen der DNA, die zu einer zeitlichen Verzerrung führen können. Man nimmt daher an, dass die Distanz-Methoden die tatsächliche Anzahl der Sequenzunterschiede unterschätzen (Hall 2001).

Die beiden bekanntesten Distanz-Methoden sind UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) und NJ (neighbour joining). Distanz-Methoden berechnen die genetische Distanz zwischen den Sequenzen des Datensatzes und benutzen zur Erstellung eines Phenograms die Distanzmatrix. Die Sequenzen selber spielen bei der Berechnung des Baumes keine Rolle. Bei der UPGMA-Methode werden die beiden Arten mit der geringsten Distanz zusammengefasst. Im nächsten Schritt wird eine vereinfachte Distanzmatrix errechnet, bei der die zusammengefassten Taxa als Gruppe vorkommen (Cluster). Auf diese Weise werden schrittweise die Arten und Gruppen mit den jeweils kleinsten genetischen Distanzen miteinander verbunden bis alle Taxa zu einem einzigen Baum verknüpft sind. Das UPGMA-Verfahren setzt allerdings voraus, dass die Substitutionsrate in allen Linien bis zum terminalen Taxon gleich ist. Das NJ-Verfahren hingegen kann auch dann angewandt werden, wenn es für die Evolutionsprozesse keine ‚gleichförmige molekulare Uhr‘ gibt. Bei diesem werden zunächst paarweise evolutionäre Distanzen für die terminalen Taxonpaare geschätzt, die dann korrigiert werden, um für benachbarte terminale Taxa eine mittlere Distanz zu den anderen Taxa zu erhalten. Dieser korrigierte Matrixwert wird für die weitere Berechnung verwendet.

Die Ergebnisse verschiedener phylogenetischer Analysen desselben Datensatzes liefern oft nicht vollkommen gleiche Ergebnisse. Um zu überprüfen, welchem Ergebnis man mehr vertrauen kann, kann das Bootstrap-Verfahren eingesetzt werden (Felsenstein 1985). Dieses bildet eine Pseudoreplikation des Datensatzes. Man erstellt ca. 100 bis 1000mal einen neuen Datensatz von gleicher Größe wie der ursprüngliche Datensatz, indem man zufällig Merkmale (Spalten) des Alignments auswählt. Durch die zufällige Auswahl treten einige Merkmale mehrmals auf, andere fallen weg. Jede Pseudoreplikation des Datensatzes unterscheidet sich von den anderen. Man errechnet für jeden Datensatz einen separaten Stammbaum, erstellt aus den Bäumen einen Konsensusbaum und kann für jeden Ast dieses Baumes ermitteln, in wie vielen der Bootstrap-Bäume er vorhanden war. Diese Bootstrap-Unterstützung darf man aber nicht mit Wahrscheinlichkeit gleichsetzen. Ein Wert von z.B. 70 % bedeutet nicht, dass der

entsprechende Ast mit einer ‚Wahrscheinlichkeit‘ von 0,7 auch im unbekanntem (wahren) Stammbaum vorkommt, sondern dass die verwendete Methode auf der Grundlage der Daten in 70 % der Fälle diesen Ast rekonstruiert. Nur Werte von über 95 % sollte man als sehr gestützt werten.

Wie bei der Bootstrap-Methode wird auch beim Jackknifing-Verfahren, die Datenmatrix, die dem Baum zugrunde liegt, zufällig modifiziert. Die entstehende Matrix besteht beim Jackknifing allerdings nur aus einem gewissen Prozentsatz der Merkmale. In der Regel wird die Matrixgröße zwischen 30 – 50 % reduziert, das heißt, dass bei jedem der 100 bis 1000 Pseudoreplikationen immer nur die Hälfte der Merkmale berücksichtigt wird.

#### **4.10.1 Theorien über die Abstammung von *P. falciparum***

Die Gattung *Plasmodium* gehört zum Stamm der Apicomplexa, von denen zur Zeit mehr als 5000 Arten beschrieben sind (Rich und Ayala 2003). Alle Apicomplexa leben parasitär und zeichnen sich durch den apikalen Komplex, bestehend aus dem Conoid, den Rhoptrien und den Micronemen, aus. Die meisten Apicomplexa besitzen darüber hinaus den Apicoplasten, ein Organell, welches ein nicht-photosynthetisch aktives Homolog zu dem Chloroplasten der Pflanzen und Algen darstellt (Gardner et al. 2002). Die Funktion des Apicoplasten ist noch nicht genau geklärt, aber u.A. spielt er eine wichtige Rolle beim Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle (Rich und Ayala 2003).

Innerhalb des Stammes der Apicomplexa, der mehr als eine Milliarde Jahre alt ist (Rich und Ayala 2003), bildeten sich vor 500-600 Millionen Jahren die Plasmodien (Ayala et al. 1999). Die Radiation der Plasmodien fand laut Escalante und Ayala (1995) vor ca. 129 Millionen Jahren statt, und die spätere Eroberung der menschlichen Vorfahren, die schließlich zu den heutigen humanpathogenen Erregern führte, kam mehrfach unabhängig voneinander vor (Escalante und Ayala 1995).

Die zeitliche Einordnung der Eroberung des Menschen bzw. seiner Vorfahren durch die vier heutigen humanpathogenen Malariaerreger ist allerdings noch nicht genau geklärt, genauso wenig wie die Frage nach ihrem jeweiligen Ursprung (Coatney et al. 1971; Carter und Mendis 2002; Carter 2003). Besonders die Herkunft von *P. falciparum* wird intensiv diskutiert (Ayala und Fitch 1992; Coluzzi 1999; Ayala und Rich 2000; Conway und Baum 2002; Hughes und Verra 2002; Hume et al. 2003; Joy et al. 2003), da übereinstimmend festgestellt wurde, dass *P. falciparum* mit den anderen menschlichen Malariaerregern nur entfernt verwandt ist (Escalante und Ayala 1994; Escalante et al. 1995; Qari et al. 1996; Ayala et al. 1999). Anlass für die These einer Sonderstellung von *P. falciparum* unter den menschlichen Malariaerregern

sind hauptsächlich die hohe Pathogenität des Parasiten (Brooks und McLennan 1992) und die andersartige Gestalt seiner Gametozyten.

In Garnhams 1966 verfasstem bedeutendem Werk über die Malariaparasiten und andere Haemosporida war eines der wichtigsten systematischen Kriterien die Einteilung der Parasiten nach ihren Wirten. *P. falciparum* wurde dementsprechend zu den anderen menschlichen Malariaparasiten gestellt. Dies geschah unter der Annahme, dass die Evolution der Parasiten zusammen mit dem der Wirte erfolgt und daher nah verwandte Parasiten in nah verwandten Wirten zu finden sind (McCutchan et al. 1984).

Die Einteilung von *P. falciparum* als angestammter menschlicher Parasit wurde aber schon früh von einigen Autoren in Frage gestellt. Mit dem Aufkommen gentechnischer Methoden gab es zwar neue Möglichkeiten, diese Fragestellung zu untersuchen, doch stehen sich heute immer noch zwei Hypothesen über den Ursprung von *P. falciparum* gegenüber: 1) es handelt es sich um einen vom Menschen neu erworbenen Parasiten (der vor nicht allzu langer Zeit von einem anderen Wirt, z.B. einem Vogel, erworben wurde); oder 2) es handelt es sich um einen ‚alten‘ Parasiten, den es frühgeschichtlich schon beim Vorfahren des Menschen gab und dessen Virulenz später gestiegen ist.

#### **Argumente für einen lateralen Transfer von *P. falciparum***

Nach der Analyse von Gensequenzen kamen Waters et al. (1991, 1993a) zu dem Schluss, dass es sich bei *P. falciparum* um einen neu erworbenen Parasiten des Menschen handeln müsse, der sehr wahrscheinlich vom Vogel abstammt. Ihrer Meinung nach kam es zu einem lateralen Transfer zwischen den Vertebraten. Mit einem lateralen Transfer ist die erfolgreiche Infektion einer neuen Vertebratenspezies mit einem Parasiten gemeint, in diesem Falle des Menschen mit einem Vogelparasiten. Die Fähigkeit der Sporozoiten der Vogelplasmodien, in verschiedene Gewebe einzudringen, ermöglichte nach Meinung der Autoren diesen lateralen Transfer. Dass ein solcher prinzipiell möglich ist, konnten schon McGhee (1951) und Gehring (1974) zeigen, die beide Plasmodien der Vögel (*P. lophurae* bzw. *P. cathemerium*) experimentell auf Mäuse übertragen konnten. Der laterale Transfer des Vogelparasiten auf den Menschen geschah nach Meinung von Waters et al. (1991, 1993a) vor ca. 5000 Jahren. Zu dieser Zeit entstanden durch das Aufkommen der Landwirtschaft größere Menschenpopulationen, die eine stabile, für die Aufrechterhaltung des parasitären Entwicklungszyklus‘ notwendige Beziehung zum Vektor ermöglichten (Waters et al. 1991).

Als ein Beweis dafür, dass *P. falciparum* ein neuer Parasit des Menschen ist, wurde die starke Pathogenität des Parasiten herangezogen, denn diese ließe auf eine junge Wirt-Parasit-

Wechselbeziehung schließen (Waters et al. 1991, 1993a). Weitere Hinweise für die Abstammung von *P. falciparum* vom Vogel sind laut McCutchan et al. (1996) die ähnliche Gametozytenform, Übereinstimmungen im GC-Gehalt der DNA und der ähnliche ultrastrukturelle Aufbau der Mitochondrien.

Auch nach Meinung von Rathore et al. (2001) kann ein lateraler Transfer vom Vogel zum Menschen stattgefunden haben, denn auch wenn die Mücken als Vektoren Präferenzen für bestimmte Wirtsspezies haben, weichen sie von dieser Vorliebe ab, wenn passende Wirte fehlen. Die Weibchen mancher *Aedes*- und *Culex*-Arten, welche die häufigsten Wirte für Vogelparasiten sind, stechen auch Menschen, und *Anopheles*-Mücken, die Vektoren der menschlichen Malariaparasiten, können als Wirte für Vogelmalariaerreger dienen. Diese „indiscriminative bites“ kommen zwar nicht allzu häufig vor, aber nach Meinung der Autoren ist der Kontakt von Menschen mit Vogelparasiten gar nicht so selten, nur etablieren sich die Parasiten im neuen Wirt i.d.R. nicht, so dass es zu keiner klinischen Symptomatik kommt.

#### **Argumente für eine Koevolution von *P. falciparum* mit dem Menschen**

Nach Escalante et al. (1995) ist *P. falciparum* ein Parasit, den es seit dem Erscheinen der ersten Menschen gibt. Sie sehen *P. reichenowi* als nächsten Verwandten von *P. falciparum* an, ein Malariaerreger der Schimpansen (Escalante et al. 1995; Ayala et al. 1999). Nach Meinung von Rich und Ayala (2003) stammen *P. falciparum* und *P. reichenowi* von einem gemeinsamen Vorfahren ab und trennten sich vor 5-7 Millionen Jahren voneinander, etwa gleichzeitig mit der Aufspaltung der Entwicklungslinien ihrer heutigen Wirtsspezies Mensch und Schimpanse (Escalante et al. 1998).

Nach der von vielen Autoren anerkannten ‚Malaria’s Eve‘-Hypothese wird davon ausgegangen, dass die weltweit verbreiteten *P. falciparum*-Stämme sich innerhalb der letzten 6000 Jahre aus einer sehr begrenzten Zahl von Stämmen aus Afrika entwickelt haben, die es schon lange im Menschen gab (Ayala et al. 1999; Joy et al. 2003). Dieser sogenannte ‚bottle neck‘ wurde anhand einer fehlenden genetischen Diversität bei Genen, die in die Wirt-Parasit-Wechselbeziehung involviert sind, festgestellt (Escalante et al. 1997). Nach Ayala et al. (1999) könnte der Grund für die nach langer geographischer Isolation erst kürzlich erfolgte Radiation von *P. falciparum* in einer Verhaltensänderung der menschlichen Gemeinschaft liegen: die Entwicklung der Agrarwirtschaft führte zu einer Dichtezunahme der Bevölkerung und einer damit einhergehenden Städtebildung.

Nach Ayala und Rich (2000) ist die weltweite Verbreitung von *P. falciparum* zum Teil als Konsequenz eines entwicklungsgeschichtlich noch nicht lang zurückliegenden dramatischen

Anstiegs der Vektorkompetenzen als Folge wiederholter Spezialisierungsereignisse bei den stark anthropophilen Zwillingarten der afrikanischen *An. gambiae*- und *An. funestus*-Komplexe zu sehen. Als weiteren Grund sehen sie die steigenden Umgebungstemperaturen nach dem Ende der Würm-Eiszeit vor ca. 6000 Jahren an, die es dem Parasiten und seinen Vektoren ermöglichten, außerhalb des tropischen Afrikas zu überleben.

Ein weiteres Indiz für die Hypothese einer erst in den letzten paar Tausend Jahren stattgefundenen Ausbreitung von *P. falciparum* ist die in dieser Zeit aufgetretene Häufung und Stabilisierung von Krankheiten, die Malaria-protektiv wirken. Diese Krankheiten (Sichelzellanämie, Thalassämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Hämoglobin C- und E-Veränderungen, Ovalozytose), die entwicklungsgeschichtlich mehrfach in verschiedenen Regionen (hauptsächlich in Afrika, aber auch im Mittelmeerraum und auf den Westpazifischen Inseln) unabhängig voneinander aufgetreten sind, haben zwar einen negativen Einfluss auf die Gesundheit der betroffenen Menschen, bleiben genotypisch aber trotzdem stabil in der Bevölkerung, da sie einen Selektionsvorteil bieten, indem sie einen gewissen Schutz bei einer Infektion mit *P. falciparum* verschaffen (Carter und Mendis 2002).

Das von den Befürwortern der ‚Vogelhypothese‘ angeführte Argument, dass die hohe Virulenz ein Zeichen dafür sei, dass die Wirt-Parasit-Beziehung noch jung ist, ist nach Meinung von Escalante et al. (1998) nicht zutreffend, denn in Experimenten mit verschiedenen Stämmen von Nager- und Eidechsenmalariaerregern (Escalante et al. 1997) konnte gezeigt werden, dass sich die Virulenz bereits nach ein paar Generationen ändern kann.

Der Ursprung von *P. falciparum* wird also immer noch weiter diskutiert, und dieselben Beweise, die eine Forschergruppe für die Abstammung vom Vogel anführt (z.B. Aufkommen der Landwirtschaft und Sesshaftigkeit der menschlichen Bevölkerung, Spezialisierung der Mücken; Waters et al. 1991, 1993a), werden z.T. von den anderen Gruppen als Gegenargumente verwandt (Rich und Ayala 2003).

#### **4.10.2 Überblick über vorangegangene phylogenetische Untersuchungen an Malariaerregern**

Mit Hilfe der molekularen Systematik wurden in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche phylogenetische Analysen zur Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Malariaerregern und des möglichen Ursprungs von *P. falciparum* vorgestellt (Tab. 23). Nachstehend soll ein Überblick über die wichtigsten Ansätze der letzten Jahre mit einer Aufführung der untersuchten Erregerarten und -gene sowie der verwendeten Berechnungs-

methoden gegeben werden. Eine Reihe weiterer Untersuchungen wird hier nicht berücksichtigt, da die entsprechenden Studien (z.B. Escalante et al. 1995; Kissinger et al. 1998; Ayala und Rich 2000; Mu et al. 2005) keine Vogelmalariaerregerssequenzen berücksichtigen und sie dementsprechend keine Informationen über einen möglichen aviären Ursprung von *P. falciparum* liefern können.

**Tab. 23:** Publikationen über die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Malariaparasiten inklusive der Vogelmalariaerreger auf der Basis von DNA-Sequenzen

Referenz	Gen	Anzahl der untersuchten Spezies	Gemeinsamer Ursprung von <i>P. falciparum</i> und Vogelmalariaparasiten?
Waters et al. (1991)	18 SSU rRNA	10	ja
Waters et al. (1993b)	18 SSU rRNA	9	ja
Escalante und Ayala (1994), Ayala et al. (1999)	18 SSU rRNA	11	nein
Qari et al. (1996)	18 SSU rRNA	13	nein
Escalante et al. (1997)	18 SSU rRNA	14	ja
Kissinger et al. (2002)	18 SSU rRNA	10	ja
Leclerc et al. (2004)	18 SSU rRNA	21	nein
Escalante und Ayala (1995)	30 SSU rRNA	5	ja
McCutchan et al. (1996)	CSP	18	ja
Vargas-Serrato et al. (2003)	CSP	13	ja
Escalante et al. (1998)	cyt b	17	ja
Perkins und Schall (2002)	cyt b	52	nein
Rathore et al. (2001)	18 SSU rRNA, cyt b, ClpC	8, 8, 9	ja
Kedzierski et al. (2002)	ASL	7	ja

(CSP: Circumsporozoiten-Protein; cyt b: Cytochrom b; ClpC: caseinolytische Protease C; ASL: Adenylsuccinatlyase)

#### 4.10.3 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des 18 SSU rRNA-Gens

1991 publizierten Waters und Kollegen einen phylogenetischen Stammbaum, der auf der Analyse von zehn Sequenzen der in der asexuellen Entwicklungsphase exprimierten Form des 18 SSU rRNA-Gens von Primaten-, Nager- und Vogelmalariaerregern beruhte. Ihre Untersuchungsergebnisse wiesen darauf hin, dass der menschliche Malariaerreger *P. falciparum* eine monophyletische Einheit mit einer Untergruppe von Vogelmalariaerregern bildet. Den Autoren zufolge ist ein Vorfahre von *P. falciparum* vor nicht allzu langer Zeit durch einen lateralen Transfer vom Vogel auf den Menschen übergegangen. Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit Hilfe der Distanz-Methode geschätzt. Die paarweisen Distanzen wurden mit dem K2P-Modell (Kimura 1980; s. Kap. 2.10.3) berechnet, die Baum-Topologie mit der NJ-Methode nach Saitou und Nei (Saitou und Nei 1987; s. Kap. 4.10). Mit dem Programm PAUP (Swofford 1990) wurden 1000 Pseudoreplikationen nach dem Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) durchgeführt. *Acanthamoeba castellani* (Kl. Lobosea, Ord. Amoebida) wurde als Außengruppe verwendet.

Zwei Jahre später stellten Waters et al. (1993b) eine neue Studie vor, in der sie die Sequenzen desselben Gens von neun verschiedenen Malariaerregern untersuchten. Die Autoren richteten in dieser Studie ihr Hauptaugenmerk auf die Verwandtschaftsbeziehungen der Primaten und stellten daher zwei neue Sequenzen von Parasiten vor (*P. knowlesi* und *P. cynomolgi*), die Rhesusaffen befallen. Zwei verschiedene phylogenetische Berechnungen wurden durchgeführt: eine mit Hilfe der Distanz-Methode (NJ-Verfahren nach Saitou und Nei 1987), die zweite mit den DNAmI- und DNAmI-K-Programmen des PHYLIP (phylogeny inference package)-Programmpaketes (Felsenstein 1989). DNAmI und DNAmI-K sind Module von PHYLIP, die DNA-Sequenzen nach ML-Algorithmen bearbeiten. Zur Abschätzung des Stichprobenfehlers wurde mit PHYLIP ein Bootstrap-Verfahren (1000 Pseudoreplikationen; Felsenstein 1985) durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Bäume stimmten darin überein, dass *P. falciparum* eine Schwestergruppe zu den Vogelmalariaerregern *P. gallinaceum* und *P. lophurae* bildet.

1994 veröffentlichten Escalante und Ayala ebenfalls eine Arbeit zur in der asexuellen Entwicklungsphase exprimierten Form des 18 SSU rRNA-Gens, in der elf unterschiedliche Sequenzen verwendet wurden. Neben Primaten-, Nager- und Vogelmalariaparasiten wurde dem Datensatz zum erstenmal ein Eidechsenmalariaerreger hinzugefügt. Die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen wurden mit zwei Methoden ermittelt. Zum einen wurden die Bäume mit der Distanz-Methode unter Zuhilfenahme des NJ-Verfahrens (Saitou und Nei 1987) und Tamuras Drei-Parameter-Modell (Tamura 1992; berücksichtigt

Transitions- und Transversionsraten sowie GC-Gehalt) erstellt. 1000 Pseudoreplikationen wurden mittels des Bootstrap-Verfahrens durchgeführt (Felsenstein 1985). Des Weiteren wurde ein Stammbaum mit den Modulen DNAm1 und DNAmk des PHYLIP-Programmpaketes unter Zuhilfenahme des HKY-Modells (Hasegawa et al. 1985; s. Kap. 2.10.3) konstruiert. Drei Außengruppen wurden integriert, um den Baum zu wurzeln: *Babesia bovis* und *Theileria parva* (Kl. Piroplasma, Ord. Piroplasmida) sowie *Sarcocystis fusiformis* (Kl. Coccidia, Ord. Eimeriida). Die Autoren folgern nach der Analyse, dass *P. falciparum* eine monophyletische Gruppe mit dem Schimpansenmalariaparasiten *P. reichenowi* bildet und dass diese beiden einen weit entfernten Vorfahren mit den Vogelmalariaerregern teilen. Die Autoren stellten des Weiteren fest, dass die *P. falciparum/P. reichenowi*-Gruppe nur weitläufig mit den anderen in dieser Studie aufgeführten menschlichen Malariaparasiten (*P. vivax* und *P. malariae*) verwandt ist.

Eine weitere Studie, die sich mit der asexuell exprimierten Form des 18 SSU rRNA-Gens befasste, stammte von Qari et al. (1996). In dieser wurden DNA-Sequenzen von 13 verschiedenen Primaten-, Vogel-, Nager- und Eidechsenmalariaerregern zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes der Malariaparasiten genutzt. Die Sequenzen der *Plasmodium*- und der beiden Außengruppen-Arten (*Paramecium tetraurelia*: Kl. Ciliata, Ord. Hymenostomatida; *T. gondii*: Kl. Coccidia, Ord. Eimeriida) wurden untereinander gestellt und nach Entfernung von Lücken innerhalb des Sequenzalignments mit ML- (DNAm1 des PHYLIP-Paketes; Felsenstein 1993) und Distanz-Methoden (NJ; Saitou und Nei 1987) analysiert. Die alternativen Baum-Topologien wurden mit dem KH-Test (Kishino und Hasegawa 1989) aus PHYLIP getestet. Nach Angabe der Autoren ist *P. falciparum* am nächsten verwandt mit *P. reichenowi* und nicht das Resultat eines lateralen Transfers von einem Vogelparasiten auf den Menschen. Die beiden in die Studie einbezogenen Vogelmalariaerreger bildeten eine Gruppe mit den Eidechsenparasiten.

Eine weitere Veröffentlichung, die sich mit dem 18 SSU rRNA-Gen der Malariaerreger beschäftigt, stammt von Escalante et al. (1997). In dieser wurden 14 verschiedene *Plasmodium*-Spezies untersucht, die Primaten, Nager, Vögel und Eidechsen befallen. Es wurde zum ersten Mal nicht nur die in der asexuellen Entwicklungsphase exprimierte Form des 18 SSU rRNA-Gens berücksichtigt (die, die im Wirbeltierwirt exprimiert wird), sondern auch die sexuell exprimierte Form (die in der Mücke exprimiert wird). Die Ergebnisse dieser Studie basieren auf einem Alignment, welches auch die Sekundärstruktur der RNA berücksichtigt (erstellt durch das DCSE Programm; de Rijk und de Wachter 1993). Zusätzlich zu der NJ-Methode (Saitou und Nei 1987) zur Berechnung der Distanzen wurde eine Kalibrierungs-

methode nach van de Peer et al. (1993) verwendet, die die individuellen Substitutionsraten der Nukleotide betrachtet und somit genetische Distanzen akkurater berechnen kann. Die Berechnungen wurden mit dem Programm Treecon durchgeführt (van de Peer und de Wachter 1994). Die Zuverlässigkeit des Baumes wurde mit dem Bootstrap-Verfahren geschätzt, indem 500 Pseudoreplikationen durchgeführt wurden (Felsenstein 1985). Die Autoren folgerten anhand ihrer Analyse, dass die ermittelte *P. falciparum/P. reichenowi*-Gruppe einen gemeinsamen Vorfahren mit den Vogel- und Eidechsenmalariaerregern teilt. Eine ergänzende Berechnung mit dem Galtier und Gouy-Korrekturmodell (Galtier und Gouy 1995), das die ungleichen Basenzusammensetzungen unter den Sequenzen korrigiert (die Plasmodien-Sequenzen sind außergewöhnlich AT-reich), führte zu ähnlichen Ergebnissen. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Studie war, dass die Säugetierplasmodien polyphyletisch sind.

In einer Studie von Rathore et al. (2001) wurde die asexuell exprimierte Form des 18 SSU rRNA-Gens für acht verschiedene Primaten-, Nager- und Vogelerregerspezies miteinander verglichen. *T. gondii* wurde als Außengruppe verwendet. Die Analyse wurde mit Hilfe der NJ-Methode (Saitou und Nei 1987) des Programms PAUP (Swofford 1990) durchgeführt. Um die Zuverlässigkeit der Bäume abzuschätzen, wurde das Bootstrap-Verfahren mit 1000 Pseudoreplikationen angewandt. Der resultierende Stammbaum stellt *P. falciparum* als Schwestergruppe zu den Vogelmalariaparasiten dar.

In einer Studie von 2002 untersuchten Kissinger et al. die asexuell exprimierte Form des 18 SSU rRNA-Gens verschiedener Plasmodien und stellten die Sequenz des Vogelmalariaerregers *P. juxtannucleare* vor. Insgesamt 10 Plasmodienarten von Primaten, Nagern und Vögeln wurden in die Studie einbezogen. Die Analysen wurden mit dem Programm PAUP (Swofford 1990) durchgeführt, wobei für die Distanz-Methode das NJ-Verfahren (Saitou und Nei 1987) und das K2P-Modell nach Kimura (Kimura 1980) verwendet wurden. Das Datenset wurde anschließend anhand von 10000 Pseudoreplikationen nach der Bootstrap-Methode (Felsenstein 1985) auf seine Zuverlässigkeit überprüft. Nach dieser Studie steht *P. juxtannucleare* an der Basis der monophyletischen Gruppe der Vogelmalariaerregere und bildet mit diesen zusammen eine Schwestergruppe zu der *P. falciparum/P. reichenowi*-Linie, was darauf hindeutet, dass alle von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen könnten. Als Außengruppen wurden *Th. parva* und *Babesia equi* (Kl. Piroplasma, Ord. Piroplasmida) verwendet.

Im Jahre 2004 veröffentlichten Leclerc et al. eine Studie, in der wiederum eine Teilsequenz der in der asexuellen Entwicklungsphase exprimierten Form des 18 SSU rRNA-Gens untersucht wurde. Hauptaugenmerk der Untersuchung waren die Verwandtschafts-

beziehungen zwischen den Plasmodien der Neu- und Altweltaffen. Insgesamt 21 verschiedene Plasmodien-Spezies der Primaten, Nager und Vögel wurden in der Studie berücksichtigt. Die phylogenetische Analyse wurde mit Hilfe des Programms PAUP (Swofford 1999) unter Einbeziehung des TBR-Verfahrens durchgeführt. Die Zuverlässigkeit des Baumes wurde mit der Bootstrap-Methode (Felsenstein 1985) getestet, wobei 1000 Pseudoreplikationen durchlaufen wurden. Unter Zuhilfenahme der drei Außengruppen *B. bovis*, *S. fusiformis* und *T. gondii* wurden Stammbäume erzeugt, die erneut *P. falciparum* und *P. reichenowi* in eine gemeinsame Linie stellten. Nach Ansicht der Autoren stammen diese allerdings nicht von einem Vogelmalariaerreger ab.

#### **4.10.4 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des 30 SSU rRNA-Gens**

1995 veröffentlichten Escalante und Ayala eine Arbeit, in der sie dem Ursprung der Plasmodien und anderer Apicomplexa durch die Untersuchung des 30 SSU rRNA-Gens näher kommen wollten. Sie untersuchten 20 verschiedene Apicomplexa verschiedener Klassen, von denen fünf Plasmodien-Arten waren (drei des Menschen, eine von Nagern und einer von Vögeln). Die phylogenetischen Verwandtschaften wurden gefolgert durch Verwendung des NJ-Verfahrens (Saitou und Nei 1987) unter Berücksichtigung der genetischen Distanzen mit Hilfe des Drei-Parameter-Modells (Tamura 1992), wobei 1000 Pseudoreplikationen des Datensets nach dem Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) durchgeführt wurden. Diese Berechnungen wurden mit dem MEGA 1.0 Programm (molecular evolutionary genetics analysis; Kumar et al. 1993) durchgeführt. Weitere ML-Untersuchungen wurden mit dem PHYLIP-Paket (Felsenstein 1989) ausgeführt. Das Ergebnis der Analyse war, dass die Plasmodien innerhalb der Apicomplexa eine monophyletische Gruppe darstellten, wobei *P. falciparum* und der Vogelmalariaerreger *P. gallinaceum* eine gemeinsame Einheit und eine Schwestergruppe zu *P. malariae*, einem weiteren menschlichen Malariaerreger, bildeten.

#### **4.10.5 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des Circumsporozoitenprotein-Gens**

McCutchan et al. verwendeten 1996 das Circumsporozoitenprotein (CSP)-Gen für die Analyse des *Plasmodium*-Stammbaumes. Das CSP der Malariaparasiten befindet sich auf der Oberfläche der Sporoziten, die in die Leberzellen des Säugers bzw. in die Makrophagen des Vogels eindringen. Das CSP-Gen war zwar schon 1995 von Escalante und Mitarbeitern verwendet worden, um einen *Plasmodium*-Stammbaum zu konstruieren, allerdings waren dabei die Vogelmalariaerreger nicht berücksichtigt worden. Daher wird auf diese Untersuchung hier nicht näher eingegangen. McCutchan et al. (1996) analysierten 18 CSP-

Gensequenzen von Plasmodien-Spezies der Primaten, Vögel und Nager mit dem Programm PAUP (Swofford 1990) und unterzogen das Datenset anschließend einer Bootstrap-Analyse mit 100 Pseudoreplikationen. Nach Meinung der Autoren unterstützt das Ergebnis der Analyse die Hypothese, dass der menschliche Malariaparasit *P. falciparum* näher mit Vogelmalariaerregern verwandt ist als mit Erregern, die Säugetiere befallen. *P. falciparum* bildet in dieser Analyse eine Gruppe mit *P. reichenowi*, die ihrerseits als Schwestergruppe neben dem Vogelmalariaerreger *P. gallinaceum* steht. Alle drei Parasiten würden sich demnach einen gemeinsamen Vorfahren teilen.

Vargas-Serrato et al. untersuchten 2003 ebenfalls das CSP-Gen, um über die Verwandtschaftsbeziehungen der Malariaerreger Aufschluss zu erhalten. Insgesamt 13 verschiedene *Plasmodium*-Spezies der Primaten, Nager und Vögel wurden berücksichtigt. Die phylogenetischen Analysen wurden mit dem Programm MEGA 2 (Kumar et al. 2001) durchgeführt. Die Bäume wurden erzeugt unter Verwendung des NJ-Algorithmus (Saitou und Nei 1987) nach den Distanzen des Drei-Parameter-Modells nach Tamura (Tamura 1992) oder nach anderen Distanz-Modellen, wie dem JC-Modell nach Jukes-Cantor (1969), dem K2P-Modell nach Kimura (1980) und dem TjN-Modell nach Tajima-Nei (1984). Bei dem TjN-Modell geht man von der Annahme aus, dass bei Substitutionen mit einer Base, die in den Sequenzen häufiger vorhanden ist, mit größerer Wahrscheinlichkeit eine zufällige Übereinstimmung zwischen zwei Sequenzen entsteht, als wenn die Substitution eine weniger häufige Base hervorbringt. Die Zuverlässigkeit der Knoten des Stammbaumes wurden mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens (Felsenstein 1985) nach 1000 Pseudoreplikationen geschätzt. Nach diesem Stammbaum bildet *P. falciparum* eine Linie mit *P. reichenowi*, die die Schwestergruppe zu *P. gallinaceum* darstellt, wobei die Möglichkeit, dass alle drei Parasiten von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, mit einem Bootstrap-Wert von 99 unterstützt wird.

#### **4.10.6 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des cyt b-Gens**

1998 führten Escalante et al. das cyt b-Gen ein, um einen Einblick in die Verwandtschaftsbeziehungen der Primatenmalariaerreger zu erhalten. Sie untersuchten neben 14 *Plasmodium*-Spezies von Primaten aber auch zwei Vogel- und einen Nagermalariaerreger. Je nach Art der Analyse wurden vier verschiedene Außengruppen verwendet, um die Stammbäume zu wurzeln: *Hepatocystis* spec. (Kl. Aconoidasida, Ord. Haemosporida), *Haemoproteus columbae* (Kl. Aconoidasida, Ord. Haemosporida), *T. gondii* und *Th. parva*. Wie in den anderen Studien zuvor, bildeten die Primatenparasiten eine monophyletische

Gruppe, zu der nur die *P. falciparum*/*P. reichenowi*-Linie nicht gehörte. Diese teilten sich dagegen einen gemeinsamen Vorfahren mit den beiden Vogelmalariaerregern. Dieser Vorfahre war nach der Berechnung der Autoren aber eher ein Säuger- als ein Vogelparasit, so dass sie einen Wirtswechsel vom Säugetier zum Vogel für wahrscheinlicher halten als umgekehrt (vgl. Brooks und McLennan 1992). Diese Ergebnisse wurden mit der NJ-Methode (Saitou und Nei 1987) und der Galtier und Gouy-Korrektur (Galtier und Gouy 1995) ermittelt; weitere Berechnungen wurden nach der ML-Methode mit dem PHYLIP-Paket durchgeführt (Felsenstein 1993). So wurden für eine Analyse mit Hilfe der ML- und der NJ-Methode Stammbäume nur für die verschiedenen Plasmodien-Spezies geschätzt. Um die Bäume zu wurzeln, wurde das DNAmk-Programm des PHYLIP-Paketes genutzt. Für eine zweite Analyse wurden *H. columbae* und *Hepatocystis* spec. als Außengruppen einbezogen, um den Baum zu wurzeln. Bei einer dritten Analyse wurden die DNA-Sequenzen zusätzlich noch in Protein-Sequenzen umgewandelt und diese für ein Alignment verwendet. Auf dessen Grundlage wurden dann Stammbaumberechnungen mit Hilfe der ML- und NJ-Methode durchgeführt. Als Außengruppen dienten hier *T. gondii* und *Th. parva*. Um die Zuverlässigkeit der Stammbäume zu prüfen, wurde das Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) mit 1000 Pseudoreplikationen für alle drei Analysen angewandt. Resümierend konnte auch für das cyt b-Gen gezeigt werden, dass der Stammbaum der Plasmodien anscheinend polyphyletisch ist.

In der Studie von Rathore et al. (2001) wurde der phylogenetische Stammbaum für das cyt b-Gen mit Hilfe der NJ-Methode (Saitou und Nei 1987) des Programms PAUP (Swofford 1990) berechnet. Acht verschiedene Plasmodienarten der Nager-, Primaten- und Vögel wurden berücksichtigt, wobei *T. gondii* als Außengruppe diente. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse abzuschätzen, wurde das Bootstrap-Verfahren mit 1000 Pseudoreplikationen verwendet. Beim resultierenden cyt b-Stammbaum standen an der Basis die Vogelmalariaerreger, von denen sich erst später alle anderen Plasmodien abzweigen.

2002 veröffentlichten Perkins und Schall eine umfangreiche Analyse des cyt b-Gens der Haemosporida. Neben 37 Plasmodien-Arten der Primaten, Nager, Vögel und Eidechsen wurden in dieser Arbeit auch Spezies der Gattung *Haemoproteus*, *Hepatocystis*, *Leucocytozoon* und *Theileria* in die Studie einbezogen. *Leucocytozoon* spec. (Kl. Aconoidasida, Ord. Haemosporida) und *Theileria annulata* (Kl. Piroplasma, Ord. Piroplasmida) dienten als Außengruppen. Die phylogenetischen Analysen wurden mit dem Programm PAUP (Swofford 1990) durchgeführt. Des Weiteren wurde von den Autoren das TBR-Verfahren (tree-bisection-reconnection) angewandt. Bei diesem Verfahren wird die

Topologie des kürzesten Baumes (der Baum mit der geringsten Anzahl an Merkmalsänderungen) an einer inneren Kante (d.h. an dem Ast, der Gruppen von je zwei oder mehr Taxa trennt) in zwei Stammbäume unterteilt, von denen dann zufällig gewählte innere Kanten wieder verknüpft werden, um den besten Baum zu finden. Um die Zuverlässigkeit der inneren Knoten des Baumes zu testen, wurde das Jackknifing-Verfahren mit 100 Pseudoreplikationen durchgeführt. Für weitere ML-Analysen wurde das Programm Modeltest verwendet (Posada und Crandall 1998). Um hierbei die beste Baum-Topologie zu finden, wurde der Shimodaira und Hasegawa-Test angewandt (Shimodaira und Hasegawa 1999), in der jede mögliche Topologie gegen alle konkurrierenden Topologien getestet wird. Anschließend wurden 1000 Pseudoreplikationen mit dem Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) durchgeführt. Nach Erkenntnis der Autoren stammt *P. falciparum* nicht von einem Vogelmalariaerreger ab und ist, mit Ausnahme von *P. reichenowi*, auch nicht näher mit einem der getesteten Haemosporida-Parasiten der Säugetiere verwandt.

#### **4.10.7 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des ClpC-Gens**

Rathore et al. (2001) verwendeten neun verschiedene ClpC-Gensequenzen von Vogel-, Primaten- und Nagermalariaerregern, um einen Stammbaum der Malariaparasiten zu erstellen. *T. gondii* wurde als Außengruppe verwendet. Die phylogenetischen Bäume wurden mit Hilfe der NJ-Methode (Saitou und Nei 1987) des Programms PAUP (Swofford 1990) berechnet. Die DNA-Sequenzen des ClpC-Gens wurden zusätzlich noch in Aminosäuresequenzen umgewandelt, um auch diese miteinander vergleichen zu können. Um die Zuverlässigkeit der Berechnung abzuschätzen, wurde das Bootstrap-Verfahren (Felsenstein 1985) mit 1000 Pseudoreplikationen angewandt. Das Ergebnis der Analyse zeigt *P. elongatum* an der Basis des Stammbaumes der Plasmodien, was darauf hinweist, dass der Vorfahre der Nagermalariaerreger und von *P. falciparum* möglicherweise ein Vogelparasit war.

#### **4.10.8 Versuche zur Stammbaumerstellung anhand des Adenylsuccinatlyase-Gens**

Mit dem Adenylsuccinatlyase-Gen (ASL) wurde von Kedzierski et al. (2002) ein weiteres Gen in die phylogenetische Analyse der Malariaerreger eingeführt. Für sieben Erregerspezies von Primaten, Nager und Vogelwirten wurden Stammbäume mit Hilfe der NJ-Methode (Saitou und Nei 1987) und der ‚Poisson Correction Distance‘ des Programms MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001) geschätzt. Die Poisson-Korrektur korrigiert multiple Substitutionen an derselben Stelle, geht aber von der Annahme aus, dass die Substitutionsraten an jeder Position gleich sind und dass alle Nukleotide gleich häufig vorkommen (Nei und Kumar 2000). Zur

Überprüfung der Bäume wurden 1000 Pseudoreplikationen des Bootstrap-Verfahrens angewandt (Felsenstein 1985). Der auf dieser Analyse basierende Baum zeigt, dass innerhalb dieser kleinen Gruppe von Arten *P. falciparum* und der Vogelmalariaerreger *P. gallinaceum* am engsten verwandt sind.

#### **4.11 Erstellung phylogenetischer Stammbäume unter Einbeziehung der neu vorgestellten Sequenzen**

Im vorangegangenen Kapitel wurde ein Überblick über die bisher publizierten phylogenetischen Studien gegeben, die den humanen Malariaparasiten *P. falciparum* und die Vogelmalariaerreger einbezogen. Die verschiedenen Untersuchungen wurden unter den zur jeweiligen Zeit optimalen Möglichkeiten durchgeführt, weisen aber im Vergleich zu heute verschiedene Nachteile auf. Zum Teil wurden die Studien mit einer sehr geringen Anzahl von Spezies durchgeführt, z.B. sieben bei Kedzierski et al. (2002) und acht bei Rathore et al. (2001). Auch eignen sich die heute verfügbaren Rekonstruktionsmethoden zur Ermittlung der Stammbäume besser als die früheren Modelle (z.B. Jackknifing-Verfahren nach Perkins und Schall 2002). Des Weiteren waren die verwendeten Außengruppen nicht immer gut geeignet. Waters et al. (1991) benutzten z.B. *Acanthamoeba castellanii* als Außengruppe, die aber nach Brooks und McLennan (1992) mit den *Plasmodium*-Spezies viel zu wenig verwandt ist, um die Position der Wurzel zuverlässig zu bestimmen. Zum Teil waren auch die verwendeten Genabschnitte sehr kurz. So wurde z.B. in der Stammbaumberechnung von Escalante et al. (1995), die auf dem Circumsporoziten-Gen basiert, nur partielle Gensequenzen berücksichtigt, die z.T. kaum mehr als die Hälfte der vollständigen Sequenzen ausmachten. Auch erscheinen die zur Validierung der Verwandtschaftsverhältnisse durchgeführten 100 Pseudoreplikationen (McCutchan et al. 1996; Perkins und Schall 2002) als zu wenig, um die erhaltenen Ergebnisse zu stützen. Diese unterschiedlichen Berechnungsgrundlagen sind dafür verantwortlich, dass die verschiedenen Studien immer wieder zu einander widersprechenden Ergebnissen kamen.

Gemeinsam an allen Studien, in die *P. falciparum* und *P. reichenowi* einbezogen worden waren, ist, dass diese immer eine monophyletische Gruppe bildeten (Escalante und Ayala 1994; Qari et al. 1996; McCutchan et al. 1996; Escalante et al. 1997; Escalante et al. 1998; Kissinger et al. 2002; Perkins und Schall 2002; Vargas-Serrato et al. 2003; Leclerc et al. 2004). Waters et al. (1993b) ziehen sogar in Erwägung, dass diese beiden Taxa konspezifisch sind. Eine weitere übereinstimmende Feststellung der früheren Stammbaumanalysen ist, dass

die vier humanen Malariaparasiten anscheinend nur entfernt miteinander verwandt und aus mindestens drei verschiedenen Linien entstanden sind (Waters et al. 1993b; Escalante und Ayala 1994; Escalante et al. 1995; Qari et al. 1996; Kissinger et al. 2002; Leclerc et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher, unter Verwendung einer größtmöglichen Anzahl an Erregerspezies und unter Verwendung neuer Computerprogramme, für drei verschiedene Gene möglichst zuverlässige Stammbäume der Malariaerreger erstellt werden.

Bei der Auswahl der Taxa wurde darauf geachtet, dass die Sequenzen für das jeweilige Gen möglichst vollständig waren. Die Genabschnitte mussten mindestens ca.  $\frac{3}{4}$  der Gesamtlänge des Gens entsprechen, um berücksichtigt zu werden. Nur auf vollständige Gensequenzen zurückzugreifen war nicht möglich, da sonst die analysierbare Anzahl an Erregerspezies zu gering gewesen wäre, um zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu gelangen.

*T. gondii* wurde für die phylogenetische Analyse aller drei Gene als Außengruppe gewählt, da nach einer Untersuchung von Egea und Lang-Unnasch (1995) diese Art im übergeordneten Stammbaum der Apicomplexa direkt vor dem Ast der Plasmodien abzweigt. *T. gondii* ist also relativ nah, aber nicht zu nah verwandt mit den Plasmodien (Hall 2001).

Ein großer Unterschied zu den vorangegangenen Studien war in dieser Arbeit die Verwendung der Bayes'schen Analyse, die bisher nicht zur Stammbaumerstellung der Plasmodien genutzt wurde. Für die Rekonstruktion des 18 SSU rRNA-Genbaumes wurde sie zusammen mit RNA-Substitutionsmodellen eingesetzt. Mit den entsprechenden Computerprogrammen sollte die phylogenetische Information der Sequenzen vollständig erfasst und somit ein zuverlässiges Bild über die Verwandtschaftsverhältnisse geliefert werden.

#### **4.11.1 DNA-Sequenzen von *P. cathemerium*, *P. y. yoelii*, *P. chabaudi* und *P. ovale***

Zum ersten Mal wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene des Vogelmalariaerregers *P. cathemerium* sequenziert und somit der phylogenetischen Analyse zugänglich gemacht. Die vollständigen Sequenzen des ClpC-, cyt b- und des 18 SSU rRNA-Gens von *P. cathemerium* wurden in die Rekonstruktion der Stammbäume integriert, genauso wie die ebenfalls neu vorgestellten ClpC-Sequenzen der Malariaerreger *P. chabaudi*, *P. y. yoelii* und *P. ovale*.

Die ClpC-Sequenzen der vier Plasmodien-Arten wiesen alle dieselbe Länge von 641 bp Basenpaaren auf und waren damit exakt genauso lang wie die in der GenBank abgelegten Sequenzen. Auch der GC-Gehalt der neuen Sequenzen (zwischen 17,3 % und 17,9 %) unterschied sich kaum untereinander und liegt größenordnungsmäßig bei den Werten der

bereits veröffentlichten ClpC-Sequenzen (zwischen 16,8 % für *P. malariae* und 20,2 % für *P. knowlesi*; Rathore et al. 2001).

Die Sequenz des cyt b-Gens von *P. cathemerium* war 1032 bp lang und ist unter den Plasmodien damit die bisher kürzeste Sequenz für dieses Gen. Die Länge der cyt b-Sequenzen anderer Plasmodien liegt zwischen 1035 bp (Escalante et al. 1998) und 1126 bp (Perkins und Schall 2002). Der für das cyt b-Gen recht hohe GC-Gehalt von *P. cathemerium* (27,1 %) wird nur noch von den GC-Gehalten von *P. falciparum* (27,7 %; Escalante et al. 1998), *P. gallinaceum* (27,6 %; Perkins und Schall 2002), *P. vinckei* (27,3 %; Perkins und Schall 2002) und *P. reichenowi* (27,2 %; Escalante et al. 1998) übertroffen; der niedrigste GC-Gehalt für dieses Gen wurde für *P. fairchildi* (23,4 %; Perkins und Schall 2002) ermittelt.

Die Länge des 18 SSU rRNA-Gens von *P. cathemerium* betrug 2098 bp und hatte einen GC-Gehalt von 35,0 %. Das 18 SSU rRNA-Gen von *P. chabaudi* wies eine Länge von 2045 bp auf und ist somit die kürzeste bisher ermittelte Sequenz für dieses Gen. Allerdings erreicht sein GC-Gehalt den bisher höchsten erfassten Wert von 38,7 %. Für andere Plasmodien ermittelte Sequenzlängen für dieses Gen liegen zwischen 2059 bp (*P. berghei*; Gunderson et al. 1986) und 2319 bp (*P. malariae*; Goman et al. 1991). Der niedrigste GC-Gehalt der 18 SSU rDNA bei Plasmodien beträgt 33,3 % für *P. malariae* und der höchste lag bislang bei 37,8 % für *P. fragile* (Waters et al. 1991).

Alle genannten Werte gelten allerdings nur für die vollständigen Gene.

#### **4.11.2 Auf der Analyse des ClpC-Gens basierender Stammbaum der Malariaerreger**

2001 wurde von Rathore et al. zum ersten Mal eine Untersuchung des Apicoplast-kodierten ClpC-Gens der Malariaerreger im Hinblick auf ihre Abstammung durchgeführt. Nach Ansicht der Autoren eignet sich dieses Gen gut für phylogenetische Analysen, da die Vererbung uniparental ist und somit Rekombinationen ausgeschlossen werden können.

In dem in dieser Arbeit berechneten, auf der Analyse des ClpC-Gens basierenden Stammbaum spalten sich viele Erreger bereits in der basalen polytomen Verzweigung des Baumes ab, so dass dieser nicht wesentlich zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Malariaerreger beitragen kann.

Die beiden neu bearbeiteten Nagermalariaerreger *P. chabaudi* und *P. y. yoelii* bildeten erwartungsgemäß eine gemeinsame, gut abgesicherte Gruppe mit *P. berghei*, einem weiteren Nagermalariaerreger. Der dritte erstmalig berücksichtigte humane Malariaerreger *P. ovale* mündete direkt in die Wurzel des Baumes und zeigte zu keinem der anderen involvierten Spezies eine nähere Verwandtschaft.

*P. cathemerium* formte zusammen mit *P. relictum*, einem anderen Vogelmalariaerreger der Untergattung *Haemamoeba*, eine Einheit mit einer gut abgesicherten Bayes'schen Wahrscheinlichkeit von 98 %. Die beiden anderen in die Berechnung einbezogenen Vogelmalariaerreger *P. (Haemamoeba) gallinaceum* und *P. (Huffia) elongatum* gehörten nicht zu dieser Gruppe, sondern mündeten jeweils getrennt an der Wurzel des Stammbaumes. Trotz der Zugehörigkeit zu derselben Untergattung *Haemamoeba* steht *P. gallinaceum* den beiden anderen *Haemamoeba*-Erregern nach diesem Stammbaum verwandtschaftlich offenbar nicht so nah, als dass es eine Gruppe mit diesen hätte bilden können. Dieser Befund bestätigt die Einschätzung von Kissinger et al. (2002), die ja bereits die morphologische Zuordnung der Vogelmalariaerreger anzweifelten.

Erkenntnisse zur Abstammung von *P. falciparum* konnten in diesem Stammbaum nicht gewonnen werden, da dieses direkt aus der Wurzel des Baumes austritt und mit keiner anderen Erregerspezies eine Gruppe bildet. Es ist davon auszugehen, dass die verfügbaren ClpC-Genabschnitte, möglicherweise aufgrund ihrer relativ kurzen Länge von nur 641 bp, zu wenig phylogenetisches Signal enthielten.

#### **4.11.3 Auf der Analyse des cyt b-Gens basierender Stammbaum der Malariaerreger**

Das cyt b-Gen eignet sich nach Ansicht von Escalante et al. (1998) gut zur Berechnung von Stammbäumen, da die meisten Substitutionen synonym sind (selektionsneutrale Mutationen bleiben häufiger erhalten als nicht neutrale, da diese meist schädlich sind) und man davon ausgehen kann, dass das kodierte Protein nicht unter einem selektiven Druck steht, Polymorphismen (gleichzeitiges Vorkommen verschiedener Varianten eines Merkmales in einer Population oder Art) auszubilden. Dies ist von Bedeutung, da nach Wägele (2001) Polymorphismen bei rezenten Arten, die von einer gemeinsamen Ahnenpopulation abstammen, für eine phylogenetische Analyse nicht zugelassen werden können. Auch ist nach Escalante et al. (1998) das cyt b-Gen interessant für phylogenetische Analysen, da es universell im mitochondrialen Genom vorkommt.

Die Position von *P. cathemerium* im neu berechneten cyt b-Stammbaum ist unerwartet. Es bildet eine gesonderte Linie mit *P. elongatum*, einem Vogelmalariaerreger der Untergattung *Huffia* (Bennett et al. 1993). Auch dieses Ergebnis unterstützt den Befund von Kissinger et al. (2002), dass die morphologische Klassifizierung der Malariaerreger nicht unbedingt mit den Verwandtschaftsverhältnissen übereinstimmt, wie sie sich in Stammbäumen auf molekularer Ebene darstellen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Perkins und Schall (2002) spalten sich die Vogel-malariaerreger in der vorliegenden Arbeit in drei verschiedene Linien auf, genauso wie die verschiedenen Eidechsenerregerspezies. Auch stehen die Plasmodien der Vögel und Eidechsen im phylogenetischen Stammbaum nicht nahe beieinander, sondern liegen verteilt, wobei dies aber auch an mangelnder phylogenetischer Information liegen kann. Des Weiteren bilden die Erreger der Gattungen *Haemoproteus* und *Leucocytozoon* eine paraphyletische Gruppe, ein Ergebnis, das ebenfalls nicht mit den Befunden von Perkins und Schall (2002) übereinstimmt. Diese definierten *Leucocytozoon* von vornherein als Außengruppe, als die sie sich im Stammbaum schließlich auch darstellte. *P. falciparum* und *P. reichenowi* bilden in diesem Stammbaum eine Schwestergruppe zu den restlichen Säugetiererregerspezies. Allerdings wird diese Position nur durch eine schwache posteriore Wahrscheinlichkeit von 81 % gestützt, so dass sie mit einiger Unsicherheit behaftet ist.

#### **4.11.4 Auf der Analyse des 18 SSU rRNA-Gens basierender Stammbaum der Malariaerreger**

Das 18 SSU rRNA-Gen wurde in einer Vielzahl von Studien genutzt, um die Verwandtschaftsbeziehungen der Plasmodien zu ermitteln. Waters et al. (1993a) geben an, dass das Gen aufgrund seiner langsamen Mutationsrate gut für die Bestimmung evolutionärer Verwandtschaftsverhältnisse geeignet sei. Nach Li et al. (1994a) zeichnet sich dieses Gen durch die Anordnung seiner konservierten und variablen Regionen besonders gut für phylogenetische Analysen aus; darüber hinaus kommt nach Schlegel (1991) ein lateraler Gentransfer kaum vor.

Bei der Analyse des 18 SSU rRNA-Gens wurde für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes die Sekundärstruktur der RNA berücksichtigt. Ansonsten wurde diese unter allen bisherigen auf der Basis der 18 SSU rDNA durchgeführten Stammbaumanalysen der Malariaerreger nur von Escalante et al. (1997) beachtet. Die Berücksichtigung der Sekundärstruktur bei der Rekonstruktion des 18 SSU rDNA-Stammbaums ist notwendig, da viele Positionen der Nukleotidsequenzen nicht unabhängig voneinander evolvieren, sondern als ganze Einheiten. Die Anwendung von einfachen DNA-Substitutionsmodellen würde daher zu zweifelhaften Resultaten führen, da sie, nur basierend auf der Informationen der gepaarten Positionen, die Wahrscheinlichkeit der Verbindungspunkte der verschiedenen Taxa innerhalb des Baumes überschätzen würden (Jow et al. 2002; Galtier 2004).

In dieser Arbeit wurde daher für die Ermittlung des phylogenetischen Stammbaums des 18 SSU rRNA-Gens das Programm PHASE 2.0 beta (Jow et al. 2005) verwendet, das neben der

Einbeziehung der Sekundärstruktur zusätzlich noch eine Bayes'sche Analyse durchführt. Der in der Arbeit neu eingeführte Erreger *P. cathemerium* steht nach dem Ergebnis dieser Analyse an der Basis der Gruppe der Vogel- und Eidechsenmalariaerreger. Die ebenfalls erstmals berücksichtigte Spezies *P. chabaudi* steht an der Wurzel der monophyletischen Gruppe der Nagermalariaerreger.

*P. falciparum* scheint nach der Analyse des 18 SSU rRNA-Gens an der Basis der Plasmodien zu stehen und wäre demzufolge als entwicklungsgeschichtlich älter anzusehen als die Vogel-malariaerreger. Allerdings sind die Bayes'schen Wahrscheinlichkeitswerte am Ursprung des Stammbaumes so niedrig, dass sie keine Unterstützung einer Hypothese über phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen zulassen.

#### 4.12 Resümee

Eine zentrale Frage wurde in der systematisch-phylogenetischen Bearbeitung der Plasmodien-Spezies immer wieder aufgebracht: Ist der menschliche Malariaparasit *P. falciparum* durch einen lateralen Transfer vom Vogel auf den Menschen übergegangen oder mit der Evolution des Menschen aus einem Primatenerreger hervorgegangen? Laterale Transfers einer Erregerspezies zwischen verschiedenen Vogelspezies (Bensch et al. 2000; Ricklefs und Fallon 2002), ebenso wie zwischen verschiedenen Primatenspezies (Rich und Ayala 2003; Jongwutiwes et al. 2004), kommen häufig vor, führen aber offenbar i.d.R. nicht zu manifesten Infektionen. Gelegentlich kommen aber auch solche in unterschiedlichen Wirtsspezies vor, und ein- und derselbe Erreger erhält dann womöglich verschiedene Namen. So weisen z.B. Waters et al. (1993b) daraufhin, dass es keinen Beweis gibt, dass *P. falciparum* (Mensch) nicht identisch mit *P. reichenowi* (Schimpanse) ist. Nach Rich und Ayala (2003) sind auch *P. malariae* (Mensch) und *P. brasilianum* (Kapuzineraffe) sowie *P. vivax* (Mensch) und *P. simium* (Kapuzineraffe) genetisch nicht voneinander unterscheidbar.

Je nach Anzahl der untersuchten Arten, der gewählten Gene und der verwendeten Rekonstruktionsmethoden kamen die bisher veröffentlichten Untersuchungen meistens zu klaren, aber sich widersprechenden Resultaten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die neue Berechnungsmodelle, eine erweiterte Anzahl von Erregerspezies und angemessene Außengruppen berücksichtigt, zeigen, dass die bislang vorliegenden ClpC- und 18 SSU rDNA-Sequenzen nicht genügend phylogenetisches Signal enthalten, um zu soliden Schlussfolgerungen über die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Erregerspezies zu gelangen. Dies steht in einem deutlichen Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen, die

auf diesen Genen aufgebaut sind, und veranschaulicht einmal mehr, dass die Auswahl der Berechnungsgrundlagen die Ergebnisse stark beeinflussen kann. Nur für die cyt b-Gen-Sequenzen wurde ein schwaches Signal (Bayes'sche Wahrscheinlichkeit von 81 %) für eine mögliche Monophylie der Säugetiererregerspezies gefunden, innerhalb derer *P. falciparum* und *P. reichenowi* eine gemeinsame Gruppe bilden.

Schlussfolgernd muss festgestellt werden, dass die entwicklungsgeschichtliche Herkunft der *P. falciparum*-/*P. reichenowi*-Gruppe derzeit nicht geklärt werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte erstmals mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ein Einblick in die Infektionsprävalenz einheimischer Vögel mit Malariaerregern und das vorhandene Erregerspektrum gewonnen werden. Hierzu wurden Blutproben von 94 Tannenmeisen (*Parus ater*) und 214 Trauerschnäpper (*Ficedula hypoleuca*) aus den niedersächsischen Gemeinden Bahrndorf und Lingen sowie von 56 Kohlmeisen (*Parus major*) aus Bahrndorf auf eine Infektion mit Malariaerregern untersucht. Von den insgesamt 369 Vögeln wurden mittels einer Parasiten-spezifischen PCR 76 Individuen (20,6 %) positiv getestet. Insgesamt waren 19,1 % der Tannenmeisen (18/94), 6,8 % der Trauerschnäpper (15/219) und 76,8 % der Kohlmeisen (43/56) infiziert. In Bahrndorf waren 37,7 % und in Lingen 8,8 % der Vögel positiv. Die Tannenmeisen in Bahrndorf wiesen eine dreimal so hohe Infektionsprävalenz auf wie in Lingen (36 % im Vergleich zu 13 %), während die Trauerschnäpper in beiden Orten zu etwa gleichen Prozentsätzen infiziert waren (6,9 % bzw. 6,8 %).

Zur Ermittlung des Erregerspektrums wurde aus den 76 positiven Proben ein Teil des parasitären Cytochrom b-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert. In verschiedenen Häufigkeiten (ein- bis 30mal) konnten insgesamt 13 DNA-Sequenzen festgestellt werden, die sich in 2,9 bis 8,5 % (entsprechend 13 bis 45 Nukleotide) voneinander unterschieden. Bei den Tannenmeisen wurden drei, bei den Kohlmeisen vier und bei den Trauerschnäppern zehn verschiedene DNA-Sequenzen gefunden. Aufgrund von Übereinstimmungen zwischen 98 und 100 % mit in der GenBank hinterlegten Einträgen konnten 11 Sequenzen der Gattung *Plasmodium* und zwei Sequenzen der Gattung *Haemoproteus* zugewiesen werden. Als einzige definierte Erregerspezies konnte *Haemoproteus majoris* bei 17 Kohlmeisen identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Vogel malaria in Deutschland offenbar kein selten vorkommendes Ereignis ist und zahlreiche Erregerspezies vertreten sind, wenn man davon ausgeht, dass jede DNA-Sequenz für eine separate Spezies steht.

Ein zweiter Aspekt der Arbeit war es, mit Hilfe phylogenetischer Stammbaumrekonstruktionen auf der Basis von DNA-Sequenzinformationen neue Erkenntnisse über die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *P. falciparum* und den Vogel malariaerregern zu erhalten. Die Analyse wurde anhand des Kern-kodierten Gens für die 18 SSU rRNA, des mitochondrial kodierten Gens für Cytochrom b (cyt b) und des Apicoplast-kodierten Gens für caseinolytische Protease C (ClpC) vorgenommen. Sie schloss neu ermittelte DNA-Sequenzen für verschiedene Malariaparasiten ein: von *P. cathemerium* wurden das cyt b-Gen, das rRNA-Gen und das ClpC-Gen amplifiziert und

sequenziert. Von diesem früher in der Medikamentenforschung häufig verwendeten Vogelmalariaerreger lagen bisher keinerlei Sequenzdaten vor. Weiterhin wurden die Sequenzen des ClpC-Gens der beiden Nagermalariaparasiten *P. chabaudi* und *P. y. yoelii* sowie des menschlichen Malariaparasiten *P. ovale* ermittelt. Von *P. chabaudi* wurde zusätzlich das 18 SSU rRNA-Gen sequenziert. Unter Verwendung aktueller Computerprogramme (PAUP, Modeltest, MrBayes, PHASE) zur Erstellung der wahrscheinlichsten Stammbäume und unter Berücksichtigung aller in der GenBank vorliegenden DNA-Sequenzen von Malariaerregern, die mindestens zwei Drittel des vollständigen Gens umfassten, konnte gezeigt werden, dass mit der zur Zeit vorhandenen Datenmenge für das ClpC- und das 18 SSU rRNA-Gen keine Aussage über die Abstammung von *P. falciparum* gemacht werden kann. Lediglich die Analyse des cyt b-Gens brachte einen schwachen Hinweis auf eine mögliche Monophylie der Säugetiererregerspezies, innerhalb derer *P. falciparum* mit *P. reichenowi* eine Gruppe bildeten. Dies würde also der Hypothese einer Abstammung von *P. falciparum* von Vogelmalariaerregern widersprechen.

Die Ergebnisse wurden ausführlich im Kontext einer kritischen Auseinandersetzung mit früher entstandenen Studien zur Phylogenie der Malariaerreger diskutiert, die zu verschiedenen Resultaten kamen. Ursache hierfür sind v.A. sehr unterschiedliche Berechnungsgrundlagen: Anzahl der berücksichtigten Spezies, Auswahl und Länge der verwendeten Gensequenzen, Festsetzung der Außengruppe(n) und Verwendung von Computerprogrammen, die nicht mehr den heutigen Standards entsprechen.

## 6 Literatur

- Altenkirch, W. & Winkel, W.** (1991): Versuche zur Bekämpfung der Lärchenminiermotte (*Colephora laricella*) mit Hilfe insektenfressender Singvögel: Untersuchungen in einem Aufforstungsgebiet mit Japanlärche (*Larix leptolepis*) im Emsland. *Waldhygiene* 18, 233-255.
- Anderson, R. M. & May, R. M.** (1982): Coevolution of hosts and parasite. *Parasitology* 85, 411-426.
- Applegate, J. E.** (1970): Population changes in latent avian malaria infections associated with season and corticosterone treatment. *J. Parasitol.* 56, 439-443.
- Arctander, P.** (1988): Comparative studies on avian DNA restriction fragment length polymorphism analysis: Convenient procedures based on blood samples from live birds. *J. Ornithol.* 129, 205-216.
- Atkinson, C. T. & van Riper, C.** (1991): Pathogenicity and epizootiology of avian hematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: Loye, J. E. & Zuk, M. (Hrsg.), *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*. Oxford University Press, Oxford, U.K., SS. 19-48.
- Atkinson, C. T., Yorkins, N., Woods, K. L., Dusek, R. J. & Iko, W. M.** (1995): Pathogenicity of malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected Hawaiian forest birds. Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), the Wildlife Disease Association (WDA), and the American Association of Wildlife Veterinarians (AAWV), East Lansing, Michigan, USA, 12.-17.8.1995, S. 510.
- Ax, P.** (1995): *Das System der Metazoa I: Ein Lehrbuch der phylogenetischen Systematik*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 226 SS.

- Ayala, F. J. & Fitch, W. M.** (1992): Phylogeny of *Plasmodium falciparum*. Parasitol. Today 8, 74-75.
- Ayala, F., Escalante, A. A. & Rich, S. M.** (1999): Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. Parasitologia 41, 55-68.
- Ayala, F. J. & Rich, S. M.** (2000): Genetic variation and the recent worldwide expansion of *Plasmodium falciparum*. Gene 261, 161-170.
- Babiker, H. A. & Walliker, D.** (1997): Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: Implications for control. Parasitol. Today 13, 262-267.
- Barker, R. H., Suebsang, L., Rooney, W. & Wirth, D. F.** (1989): Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human patients: A comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41, 266-272.
- Basco, L. K.** (1996): GenBank-Zugangsnummer X99790 (*P. ovale*).
- Bennett, G. F., Bishop, M. A. & Peirce, M. A.** (1993): Checklist for the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. Syst. Parasitol. 26, 171-179.
- Bennet, G. F., Peirce, M. A. & Earlé, R. A.** (1994): An annotated checklist of the valid avian species of *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). Syst. Parasitol. 29, 61-73.
- Benning, T. L., LaPointe, D., Atkinson, C. T. & Vitousek, P. M.** (2002): Interactions of climate change with biological invasions and land use in the Hawaiian islands: Modeling the fate of endemic birds using a geographic information system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 14246-14249.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Östman, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H. & Pinheiro, R. T.** (2000): Host specificity in avian blood parasites: A study of

- Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. Proc. R. Soc. Lond. B. 267, 1583-1589.
- Bensch, S., Perez-Tris, J., Waldenström, J. & Hellgren, O.** (2004): Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation. *Evolution* 58, 1617-1621.
- Bielawski, A., Zaczek, A., Lisowska, U., Dybikowska, A., Kowalska, A. & Falkiewicz, B.** (2001): The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int. J. Mol. Med.* 8, 573-578.
- Bishop, M. A. & Bennett, G. F.** (1992a): Host-parasite catalogue of the avian haematozoa, Supplement 1. *Occasional Papers in Biology (Memorial University of Newfoundland)* 15, 1-211.
- Bishop, M. A. & Bennett, G. F.** (1992b): Bibliography of the avian blood-inhabiting haematozoa, Supplement 2. *Occasional Papers in Biology (Memorial University of Newfoundland)* 15, 212-244.
- Brooks, D. R. & McLennan, D. A.** (1992): The evolutionary origin of *Plasmodium falciparum*. *J. Parasitol.* 78, 564-566.
- Carter, R. & Mendis, K. N.** (2002): Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 564-594.
- Carter, R.** (2003): Speculations of the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 19, 214-219.
- Coatney, G. R., Collins, W. E., Warren, M. & Contacos, P. G.** (1971): *The Primate Malarías*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 366 SS.

- Coluzzi, M.** (1999): The clay feet of the malaria giant and its African roots: Hypothesis and inferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia* 41, 277-283.
- Conway, D. J. & Baum, J.** (2002): In the blood – the remarkable ancestry of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 18, 351-355.
- Corradetti, A., Garnham, P. C. C. & Laird, M.** (1963): New classification of the avian malaria parasites. *Parassitologia* 5, 1-4.
- Corredor, V. & Enea, V.** (1994): The small ribosomal subunit RNA isoforms in *Plasmodium cynomolgi*. *Genetics* 136, 857-865.
- Cranfield, M. R., Shaw, M., Beall, F., Skjoldager, M. & Ialeggio, D.** (1990): A review and update of avian malaria in the African penguin (*Spheniscus demersus*). Proceedings of the Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), South Padre Island, Texas, USA, 21-26.10.1990, 243-248.
- Dame, J. B., Telford, S. R. Jr., Yowell, C. A., Higgins, D. & McCutchan, T. F.** (1993): GenBank-Zugangsnummern L11716 (*P. mexicanum*) und L11717 (*P. floridense*).
- De Rijk, P. & de Wachter, R.** (1993): DCSE v2.54, an interactive tool for sequence alignment and secondary structure research. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 735-740.
- Desser, S. S. & Bennett, G. F.** (1993): The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* and *Hepatocystis*. In: Kreier, J. P., *Parasitic Protozoa*, Vol. 4, 2nd ed. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, SS. 273-305.
- Egea, N. & Lang-Unnasch, N.** (1995): Phylogeny of the extrachromosomal DNA of organisms in the phylum Apicomplexa. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 679-684.
- Escalante, A. A. & Ayala, F. J.** (1994): Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11373-11377.

- Escalante, A. A., Barrio, E. & Ayala, F. J.** (1995): Evolutionary origin of human and primate malarias: Evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol. Biol. Evol.* 12, 616-626.
- Escalante, A. A. & Ayala, F. J.** (1995): Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5793-5797.
- Escalante, A. A., Goldman, I. F., de Rijk, P., de Wachter, R., Collins, W. E., Qari, S. H. & Lal, A. A.** (1997): Phylogenetic study of the genus *Plasmodium* based on the secondary structure-based alignment of the small subunit ribosomal RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 317-321.
- Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E. & Lal, A. A.** (1998): The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8124-8129.
- Fallon, S. M., Ricklefs, R. E., Swanson, B. L. & Bermingham, E.** (2003): Detecting avian malaria: An improved polymerase chain reaction diagnostic. *J. Parasitol.* 89, 1044-1047.
- Feldman, R. A., Freed, L. A. & Cann, R. L.** (1995): A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol. Ecol.* 4, 663-673.
- Felsenstein, J.** (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J.** (1989): PHYLIP: Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.
- Felsenstein, J.** (1993): PHYLIP, phylogeny inference package, program and documentation (version 3.5). University of Washington, Seattle.
- Fink, E. & Dann, O.** (1967): Eine Weiterentwicklung des Roehl-Test zur Prüfung von Malariamitteln an *Plasmodium cathemerium* beim Kanarienvogel durch intravenöse Verabreichung. *Zschr. Tropenmed. Parasitol.* 18, 466-474.

- Freed, L. A. & Cann, R. L.** (2003): On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds. *J. Parasitol.* 89, 1261-1264.
- Gabaldon, A., Ulloa, G. & de Montcourt, A. G.** (1974): Encuesta sobre malaria aviaria en Venezuela: Resultados del primer año. *Bol. Direc. Malariol. Saneam. Ambient.* 14, 80-104.
- Gabaldon, A., Ulloa, G. & de Montcourt, A. G.** (1975): Encuesta sobre malaria aviaria en Venezuela: Resultados del segundo año. *Bol. Direc. Malariol. Saneam. Ambient.* 15, 73-92.
- Gabaldon, A., Ulloa, G. & de Montcourt, A. G.** (1976): Encuesta sobre malaria aviaria en Venezuela: Resultados del tercer y último año. *Bol. Direc. Malariol. Saneam. Ambient.* 16, 107-118.
- Gabaldon, A., Ulloa, G. & de Montcourt, A. G.** (1978): Holoendemicity in avian malaria: A possible powerful factor of population regulation. *Fourth Int. Congr. Parasitol., Warschau, 19-26. 8.1978. Short communications, Sect. C:* 61.
- Galtier, N. & Gouy, M.** (1995): Inferring phylogenies from DNA sequences of unequal base composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11317-11321.
- Galtier, N.** (2004): Sampling properties of the bootstrap support in molecular phylogeny: influence of nonindependence among sites. *Syst. Biol.* 53, 38-46.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M. & Barrell, B.** (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.

- Garnham, P. C. C.** (1966): *Malaria Parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1114 SS.
- Gehring, C. U.** (1974): Versuche zur Übertragung von *Plasmodium cathemerium*, einem der Vogelmalariareger, auf weiße Mäuse. Dissertation, Med. Fakultät, Universität Bonn.
- Gerken, T.** (2001): Kopulationen außerhalb des Paarbundes bei der Kohlmeise (*Parus major*) – proximate Einflüsse und ultimate Faktoren. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn.
- Glutz von Blotzheim, U. N., Bauer, K. M. & Bezzel, E.** (1993): *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*. Aula Verlag, Wiesbaden, 808 SS.
- Goman, M., Mons, B. & Scaife, J.** (1991): The complete sequence of a *Plasmodium malariae* SSU rRNA gene and its comparison to other plasmodial SSU rRNA genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 281-288.
- Good, J. M. & Sullivan, J.** (2001): Phylogeography of the red-tailed chipmunk (*Tamias ruficaudus*), a northern Rocky Mountain endemic. *Mol. Ecol.* 10, 2683-2695.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R. & Shiff, C. J.** (1993): ELISA method for detecting anti-*Plasmodium relictum* and anti-*Plasmodium elongatum* antibody in infected duckling sera using *Plasmodium falciparum* antigens. *J. Parasitol.* 76, 879-885.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Skjoldager, M. L. & Shaw, M. L.** (1994): An ELISA for detecting anti-*Plasmodium* spp. antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Parasitol.* 80, 60-66.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R. & Bicknese, E. J.** (1995): Evaluation of serum chemistry values associated with avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol. Res.* 81, 316-319.
- Greenwood, B. & Mutabingwa, T.** (2002): Malaria in 2002. *Nature* 415, 670-672.

- Greiner, E. C., Bennett, G. F., White, E. M. & Coombs, R. F.** (1975): Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can. J. Zool.* 53, 1762-1787.
- Gunderson, J. H., McCutchan, T. F. & Sogin, M. L.** (1986): Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene expressed in the bloodstream stages of *Plasmodium berghei*: Evolutionary implications. *J. Protozool.* 33, 525-529.
- Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P. & McCutchan, T. F.** (1987): Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science* 238, 933-937.
- Haberkorn, A.** (1978): Geschichte der Malaria. *Therapiewoche* 28, 2625-2634.
- Haberkorn, A.** (1984): Observations on malaria in European perching birds (*Passeriformes*). *Zbl. Bakt. Hyg. A* 256, 288-295.
- Hall, B. G.** (2001): *Phylogenetic Trees Made Easy: A how-to Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts, 179 SS.
- Hall, T. A.** (1999): BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.** (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22, 160-174.
- Hayworth, A. M., van Riper, C. & Weathers, W. W.** (1987): Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in canaries (*Serinus canaria*). *J. Parasitol.* 73, 850-853.
- Hebbel, R. P.** (2003): Sickle hemoglobin instability: A mechanism for malarial protection. *Redox. Rep.* 8, 238-240.
- Heinzel, H., Fitter, R. & Parslow, J.** (1992): *Pareys Vogelbuch: Alle Vögel Europas, Nordafrikas und des Mittleren Ostens*. Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin, 334 SS.

- Hellgren, O., Waldenström, J. & Bensch, S.** (2004): A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 797-802.
- Hentschel, E. & Wagner, G.** (1993): *Zoologisches Wörterbuch*, 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, 576 SS.
- Hiepe, T. & Jungmann, R.** (1983): *Lehrbuch der Parasitologie*, Band 2: Veterinärmedizinische Protozoologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, SS. 177-178.
- Holmdahl, O. J., Mattsson, J. G., Uggla, A. & Johansson, K. E.** (1994): The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 187-192.
- Huelsenbeck, J. P.** (2001): MrBayes V3 b4 v2win: Bayesian Inference of Phylogeny. Univ. California-San Diego, La Jolla.
- Huff, C. G.** (1965): Susceptibility of mosquitoes to avian malaria. *Exp. Parasitol.* 16, 107-132.
- Hughes, A. L. & Verra, F.** (2002): Extensive polymorphism and ancient origin of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 18, 348-351.
- Hulier, E., Petour, P., Snounou, G., Nivez, M.-P., Miltgen, F., Mazier, D. & Renia, L.** (1996): A method for the quantitative assessment of malaria parasite development in organs of the mammalian host. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 127-135.
- Hume, J. C. C., Lyons, E. L. & Day, K. P.** (2003): Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 19, 144-149.
- Ippen, R. & Schröder H.-D.** (1972): Ein Beitrag zu den Erkrankungen der Zoovögel. *Verh.ber. Erkrank. Zootiere* 14, 11-27.

- Jarvi, S. I., Schultz, J. J. & Atkinson, C. T.** (2002): PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected passerines. *J. Parasitol.* 88, 153-158.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T. & Kanbara, H.** (2004): Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2211-2213.
- Jow, H., Hudelot, C., Rattray, M., Higgs, P. G.** (2002): Bayesian phylogenetics using an RNA substitution model applied to early mammalian evolution. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1591–1601.
- Jow, H., Gowri-Shankar, V. & Guillard, B.** (2005): PHASE: A Software Package for Phylogenetics and Sequence Evolution. University of Manchester, England.
- Joy, D. A., Feng, X., Mu, J., Furuya, T., Chotivanich, K., Krettli, A. U., Ho, M., Wang, A., White, N. J., Suh, E., Beerli, P. & Su, X.-Z.** (2003): Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* 300, 318-321.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R.** (1969): Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (Hrsg.), *Mammalian Protein Metabolism*, Vol. 3. Academic Press, New York, SS. 21-123.
- Kedzierski, L., Escalante, A. A., Isea, R., Black, C. G., Barnwell, J. W. & Coppel, R. L.** (2002): Phylogenetic analysis of the genus *Plasmodium* based on the gene encoding adenylosuccinate lysase. *Infect. Genet. Evol.* 1, 297-301.
- Kimura, M.** (1968): Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624-626.
- Kimura, M.** (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-20.
- Kirkpatrick, C. E., Robinson, S. K. & Kitron, U. D.** (1991): Phenotypic correlates of blood parasitism in the common grackle (*Quiscalus quiscula*). In: Loye, J. E. & Zuk, M.

- (Hrsg.), Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour. Oxford University Press, Oxford, U.K., SS. 349-358.
- Kishino, H. & Hasegawa, M.** (1989): Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29, 170-179.
- Kissinger, J. C., Collins, W. E., Li, J. & McCutchan, T. F.** (1998): *Plasmodium inui* is not closely related to other quartan *Plasmodium* species. *J. Parasitol.* 84, 278-282.
- Kissinger, J. C., Souza, P. C., Soares, C. O., Paul, R., Wahl, A. M., Rathore, D., McCutchan, T. F. & Krettli, A. U.** (2002): Molecular phylogenetic analysis of the avian malarial parasite *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare*. *J. Parasitol.* 88, 769-773.
- Kronberger, H. & Schüppel, K.-F.** (1977): Zwanzig Jahre postmortale Untersuchungen von Vögeln. *Verh.ber. Erkrank. Zootiere* 19, 153-169.
- Krone, O., Priemer, J., Streich, J., Sömmer, J., Langgemach, T. & Lessow, O.** (2001): Haemosporida of birds of prey and owls from Germany. *Acta Protozool.* 40, 281-289.
- Kučera, J.** (1981a): Blood parasites of central Europe. 1. Survey of literature. The incidence in domestic birds and general remarks to the incidence in wild birds. *Folia Parasitol.* 28, 13-22.
- Kučera, J.** (1981b): Blood parasites of birds in central Europe. 2. *Leucocytozoon*. *Folia Parasitol.* 28, 193-203.
- Kučera, J.** (1981c): Blood parasites of birds in central Europe. 3. *Plasmodium* and *Haemoproteus*. *Folia Parasitol.* 28, 303-312.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M.** (1993): MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.0. Pennsylvania State Univ. Press, University Park, Pennsylvania, USA.

- Kumar, S., Tamura, K., Jakobson, I. B. & Nei, M.** (2001): MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244-1245.
- Lal, A. A., Changkasirir, S., Hollingdale, M. R. & McCutchan, T. F.** (1989): Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 67-71.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C. & Serio, G.** (1984): A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20, 86-93.
- Landau, I., Chabaud, A. G., Bertani, S. & Snounou, G.** (2003): Taxonomic status and re-description of *Plasmodium relictum* (Grassi et Feletti 1891), *Plasmodium maior* (Raffaele 1931), and description of *P. bigueti* n. spec. in sparrows. *Parassitologia* 45, 119-123.
- Leclerc, M. C., Hugot, J. P., Durand, P. & Renaud, F.** (2004): Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): An 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology* 129, 677-684.
- Levine, N. D.** (1961): *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, SS. 1-412.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J. III, Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G.** (1980): A newly classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27, 37-58.
- Li, J., Zhu, J., Applah, A., McCutchan, T. F., Long, G. W., Milhous, W. K. & Hollingdale, M. R.** (1991): *Plasmodium berghei*: Quantitation of *in vitro* effects of antimalarial drugs in exoerythrocytic development by a ribosomal RNA probe. *Exp. Parasitol.* 72, 450-458.
- Li, J., McConkey, G. A., Rogers, M. J., Waters, A. P. & McCutchan, T. F.** (1994a): *Plasmodium*: The developmentally regulated ribosome. *Exp. Parasitol.* 78, 437-441.

- Li, J., Wirtz, R. A., McConkey, G. A., Sattabongkot, J. & McCutchan, T. F. (1994b):** Transition of *Plasmodium vivax* ribosome types corresponds to sporozoite differentiation in the mosquito. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 283-289.
- Li, J., Wirtz, R. A., McConkey, G.A., Sattabongkot, J., Waters, A. P., Rogers, M. J. & McCutchan, T. F. (1995):** *Plasmodium*: Genus-conserved primers for species identification and quantification. *Exp. Parasitol.* 81, 182-190.
- Li, J., Gutell, R. R., Damberger, S. H., Wirtz, R. A., Kissinger, J. C., Rogers, M. J., Sattabongkot, J. & McCutchan, T. F. (1997):** Regulation and trafficking of three distinct 18 S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite. *J. Mol. Biol.* 269, 203-213.
- Lindt, S. & Hörning, B. (1966):** Über Malaria und Pinguine. *Verh.ber. Erkrank. Zootiere* 8, 223-231.
- Manwell, R. D. (1935):** How many species of avian malaria parasites are there? *Am. J. Trop. Med.* 15, 265-282.
- Manwell, R. D. & Rossi, G. S. (1975):** Blood protozoa of imported birds. *J. Protozool.* 22, 124-127.
- Massey, J. G., Graczyk, T. K. & Cranfield, M. R. (1996):** Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranae* infections in naïve Hawaiian crows (*Corvus hawaiiensis*) in Hawaii. *J. Parasitol.* 82, 182-185.
- Mayden, R. L. (1997):** A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: Claridge, M. F., Dawah, A. & Wilson, M. R. (Hrsg.). *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London, SS. 381-424.
- McClure, H. E., Poonswad, P., Greiner, E. C. & Laird, M. (1978):** Haematozoa in the Birds of Eastern and Southern Asia. *Mem. Univ. Newfoundland, St. John's, Newfoundland*, 296 SS.

- McConkey, G. A., Li, J., Rogers, M. J., Seeley, D. C., Graczyk, T. K., Cranfield, M. R. & McCutchan, T. F.** (1996): Parasite diversity in an endemic region for avian malaria and identification of a parasite causing penguin mortality. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 393-399.
- McCutchan, T. F., Dame, J. B., Miller, L. H. & Barnwell, J.** (1984): Evolutionary relatedness of *Plasmodium* species as determined by the structure of DNA. *Science* 225, 808-811.
- McCutchan, T. F., de la Cruz, V. F., Lal, A. A., Gunderson, J. H., Elwood, H. J. & Sogin, M. L.** (1988): Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28, 63-68.
- McCutchan, T. F., Kissinger, J. C., Touray, M. G., Rogers, M. J., Li, J., Sullivan, M., Braga, E. M., Krettli, A. U. & Miller, L. H.** (1996): Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: Biological and phylogenetic implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11889-11894.
- McCutchan, T. F., Grim, K. C., Li, J., Weiss, W., Rathore, D., Sullivan, M., Graczyk, T. K., Kumar, S. & Cranfield, M. R.** (2004): Measuring effects of an ever-changing environment on malaria control. *Infect. Immun.* 72, 2248-2253.
- McGhee, R. B.** (1951): The adaptation of the avian malaria parasite *Plasmodium lophurae* to a continuous existence in infant mice. *J. Infect. Dis.* 88, 86-97.
- McManus, D. P. & Bowles, J.** (1996): Molecular genetic approaches to parasite identification: Their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int. J. Parasitol.* 26, 687-704.
- Megson, A., Inman, G. J., Hunt, P. D., Baylis, H. A. & Hall, R.** (1991): The gene for apocytochrome B of *Theileria annulata* resides on a small linear extrachromosomal element. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48, 113-115.

- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F.** (1988): A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 1215.
- Mockenhaupt, F. P., Erhardt, S., Gellert, S., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Anemana, S. D. & Bienzle, U.** (2004): Alpha (+)-thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood* 104, 2003-2006.
- Montoya, G. E., del Castillo, H. A. & Andrade, L. E.** (1996): GenBank-Zugangsnummer U72542 (*P. knowlesi*) und U72541 (*P. inui*).
- Montoya, G. E., Suarez, C. F., Florez, C., del Castillo, H. A. & Andrade, L. E.** (1997): GenBank-Zugangsnummern U83876 (*P. knowlesi*) und U83877 (*P. vivax*).
- Mu, J., Ferdig, M. T., Feng, X., Joy, D. A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R. A., Wootton, J. J., Xiong, M. & Su. X. Z.** (2003): Multiple transporters associated with malaria responses to chloroquine and quinine. *Mol. Microbiol.* 49, 977-989.
- Mu, J., Joy, D. A., Duan, J., Huang, Y., Carlton, J., Walker, J., Barnwell, J., Beerli, P., Charleston, M. A., Pybus, O. G. & Su, X.-Z.** (2005): Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1686-1693.
- Nei, M. & Kumar, S.** (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford Press, New York, SS. 348.
- Newbold, C., Craig, A., Kyes, S., Rowe, A., Fernandez-Reyes, D. & Fagan, T.** (1999): Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 29, 927-937.
- Olsen, O. W.** (1974): *Animal Parasites Their Life Cycles and Ecology*. University Park Press, Baltimore, SS. 1-562.
- Page, R. D. M.** (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.

- Palmieri, J. R.** (1982): Be fair to parasites. *Nature*, 298, 220.
- Peirce, M. A. & Bennett, G. F.** (1996): A revised key to the avian subgenera of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa). *Syst. Parasitol.* 33, 31-32.
- Perkins, S. L.** (2000): Species concepts and malaria parasites: Detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, 2345-2350.
- Perkins, S. L. & Schall, J. J.** (2002): A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.* 88, 972-978.
- Petit, T.** (1997): Penguin malaria survey. EEP (Europäisches Erhaltungszucht-Programm) Yearbook 1996/1997, inkl. Proceedings of the 14th Conference of the European Association of Zoos and Aquarists (EAZA), Alphen/Rijn, 8.-12.10.1997, SS. 481-482.
- Piekarski, G.** (1954): *Lehrbuch der Parasitologie*. Springer Verlag, Berlin, SS. 1-760.
- Posada, D. & Crandall, K. A.** (1998): Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
- Qari, S. H., Goldman, I. F., Pieniazek, N. J., Collins, W. E. & Lal, A. A.** (1994): Blood and sporozoite stage-specific small subunit ribosomal RNA-encoding genes of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene* 150, 43-49.
- Qari, S. H., Shi, Y. P., Pieniazek, N. J., Collins, W. E. & Lal, A. A.** (1996): Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: Monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 157-165.
- Rathore, D., Wahl, A. M., Sullivan, M. & McCutchan, T. F.** (2001): A phylogenetic comparison of gene trees constructed from plastid, mitochondrial and genomic DNA of *Plasmodium* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 89-94.

- Redrobe, S.** (2000): *Plasmodium* infection in a group of captive penguins including rockhopper penguins (*Eudyptes crestatus moseleyi*), king penguins (*Aptenodytes patagonica*), gentoo penguin (*Pygoscelis papua papua*), macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*). Proceedings of the Meeting of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV), Paris, France, 31.5.-4.6.2000, SS. 231-235.
- Reichenow, E.** (1947): Die Entwicklung des Malariaparasiten im Vogelkörper. Zbl. Bakt. I. Orig. 152, 272-284.
- Rich, S. M. & Ayala, F. J.** (2003): Phylogenetics in malaria research: The case for phylogenetics. Adv. Parasitol. 54, 255-280.
- Richard, F. A., Sehgal, R. N. M., Jones, H. I. & Smith, T. B.** (2002): A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. J. Parasitol. 88, 819-822.
- Ricklefs, R. E. & Fallon, S. M.** (2002): Diversification and host switching in avian malaria parasites. Proc. R. Soc. Lond. B 269, 885-892.
- Ricklefs, R. E., Fallon, S. M. & Bermingham, E.** (2004): Evolutionary relationships, cospeciation and host switching in avian malaria parasites. Syst. Biol. 53, 111-119.
- Roehl, W.** (1926): Die Wirkung des Plasmodiums auf die Vogelmalaria. Naturwissenschaften 14, 1156-1159.
- Rogge, D.** (1989): Untersuchungsergebnisse zur Malaria heimischer Passeriformes. Falke 36, 78-87.
- Romeis, B.** (1968): Mikroskopische Technik. Oldenburg Verlag, München, 757 SS.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.** (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic sickle cell anemia. Science 230, 1350-1304.

- Saitou, N. & Nei, M.** (1987): The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schall, J. J.** (1996): Malarial parasites of lizards: Diversity and ecology. *Adv. Parasitol.* 37, 255-333.
- Scheuerlein, A. & Ricklefs, R. E.** (2004): Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proc. Biol. Sci.* 271, 1363-1370.
- Schlegel, M.** (1991): Protist evolution and phylogeny as discerned from small subunit RNA sequence comparisons. *Europ. J. Protistol.* 27, 207-219.
- Schrenzel, M. D., Maalouf, G. A., Keener, L. L. & Gaffney, P. M.** (2003): Molecular characterisation of malarial parasites in captive passerine birds. *J. Parasitol.* 89, 1025-1033.
- Schröder, H.-D.** (1986): Beitrag zu den Erkrankungen der Pinguine. *Verh.ber. Erkrank. Zootiere* 28, 107-111.
- Seed, T. M. & Manwell, R. D.** (1977): Plasmodia of birds. In: Kreier, J. P. (Hrsg.), *Parasitic Protozoa*, Vol. 3. Academic Press, New York, SS. 311-357.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M.** (1999): Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1114-1116.
- Siddall, M. E. & Barta, J. R.** (1992): Phylogeny of *Plasmodium* species: Estimation and inference. *J. Parasitol.* 78, 567-568.
- Smyth, J. D.** (1976): *Introduction to Animal Parasitology*, 2nd ed. Halsted Press, John Wiley and Sons, New York, SS. 112-121.

- Suarez, C. F., Florez, C. J. & Andrade, L. E.** (1996): GenBank-Zugangsnummer U69605 (*P. simium*).
- Swofford, D. L.** (1990): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 3. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Swofford, D. L.** (1999): Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tahar, R. & Basco, L. K.** (1997): GenBank-Zugangsnummer AJ001527 (*P. ovale*).
- Tajima, F & Nei, M.** (1984): Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1, 269-285.
- Tamura, K.** (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 336-344.
- Telford, S. R. Jr. & Forrester, D. J.** (1992): Morphological comparison of the *Plasmodium* (*Novyella*) species reported from North American birds, with comments on a species from the barred owl *Strix varia* Barton. *Syst. Parasitol.* 22, 17-24.
- Thomas, A.W., Dubbeld, M. , Mons, B., Narum, D. & Waters, A. P.** (1993): GenBank-Zugangsnummer Z25819 (*P. reichenowi*).
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** (1997): The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Tillier, E. R. & Collins, R. A.** (1998): High apparent rate of simultaneous compensatory base-pair substitutions in ribosomal RNA. *Genetics* 148, 1993-2002.
- Valentin, A., Haberkorn, A., Hensch, B., & Jakob, W.** (1994): Massive Malaria-Infektionen mit *Parahaemoproteus* spec. in Schnee-Eulen (*Nyctea scandiaca*) und deren Behandlung mit Primaquin. *Verh.ber. Erkrang. Zootiere* 36, 401- 404.

- Valkiūnas, G. & Peirce, M. A.** (2000): The status of *Plasmodium corradettii* Laird, 1998 (Haemosporida: Plasmodiidae): A malarial parasite of birds. *Syst. Parasitol.* 45, 141-143.
- Valkiūnas, G. & Iezhova, T. A.** (2001): A comparison of the blood parasites in three subspecies of the yellow wagtail *Motacilla flava*. *J. Parasitol.* 87, 930-934.
- van Spaendonk, R. M., Ramesar, J., Janse, C. J. & Waters, A. P.** (2000): The rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* does not contain a typical O-type small subunit ribosomal RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 169-174.
- Van de Peer, Y., Neefs, J. M., de Rijk, P. & de Wachter, R.** (1993): Reconstructing evolution from eukaryotic small ribosomal subunit sequences: Calibration of the molecular clock. *J. Mol. Evol.* 42, 201-210.
- Van de Peer, Y. & de Wachter, R.** (1994): TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 569-570.
- Vargas-Serrato, E., Corredor, V. & Galinski, M. R.** (2003): Phylogenetic analysis of CSP and MSP-9 gene sequences demonstrates the close relationship of *Plasmodium coatneyi* and *Plasmodium knowlesi*. *Inf. Gen. Evol* 3, 67-73.
- Viner, T. C., Nichols, D. & Montali, R. J.** (2001): Malaria in birds at the Smithsonian National Zoological Park. Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), the American Association of Wildlife Veterinarians (AAWV), the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV) and the National Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (AZWV), Orlando, Florida, USA, 18.-23.9.2001, SS. 68-70.
- von Haeseler, A. & Liebers, D.** (2003): *Molekulare Evolution*. Fischer Taschenbuchverlag, Frankfurt am Main, 1-128.

- Wägele, J.-W.** (2001): Grundlagen der Phylogenetischen Systematik. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 320 SS.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboh, S., Hasselquist, D. & Ottosson, U.** (2002): Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol. Ecol.* 11, 1545-1554.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. & Östman, Ö.** (2004): A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 191-194.
- Walker, H. A. & Richardson, A. P.** (1948): Potentiation of the curative action of 8-aminoquinolines and naphthoquinones in avian malaria. *J. Natl. Mal. Soc.* 7, 4-11.
- Wang, L., Kedzierski, L., Wesselingh, S. L. & Coppel, R. L.** (2003): Oral immunization with a recombinant malaria protein induces conformational antibodies and protects mice against lethal malaria. *Infect. Immun.* 71, 2356-2364.
- Waters, A. P. & McCutchan, T. F.** (1989): Partial sequence of the asexually expressed SSU rRNA gene of *Plasmodium vivax*. *Nucl. Acids Res.* 17, 2135.
- Waters, A. P., Higgins, D. G. & McCutchan, T. F.** (1991): *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3140-3144.
- Waters, A. P., Higgins, D. G. & McCutchan, T. F.** (1993a): The phylogeny of malaria: A useful study. *Parasitol. Today* 9, 246-250.
- Waters, A. P., Higgins, D. G. & McCutchan, T. F.** (1993b): Evolutionary relatedness of some primate models of *Plasmodium*. *Mol. Biol. Evol.* 10, 914-923.
- Watson, J. D. & Crick, F. H C.** (1953): Molecular structure of Nucleic acids. *Nature* 171, 737-738.

- Wehner, R. & Gehring, W.** (1990): Zoologie, 22. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 816 SS.
- WHO** (2000): WHO Expert Committee on Malaria. WHO Tech. Rep. Ser. 892, 74 SS.
- Wiersch, S. C.** (2000): Untersuchungen zur Lagerung und Anreicherung von Retikulozyten. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn.
- Winkel, W.** (1975): Vergleichend-brutbiologische Untersuchungen an fünf Meisenarten (*Parus* spp.) in einem niedersächsischen Aufforstungsgebiet mit Japanischer Lärche (*Larix leptoplepis*). Vogelwelt 96, 41-63 u. 104-114.
- Winkel, W.** (1981): Zum Ortstreue-Verhalten von Kohl-, Blau- und Tannenmeisen (*Parus major*, *P. caeruleus* und *P. ater*) in einem 325 ha großen Untersuchungsgebiet. Vogelwelt 102, 81-106.
- Winkel, W. & Winkel, D.** (1997): Zum Einfluß der Populationsdichte auf die Zweitbrutrate von Tannenmeisen (*Parus ater*). Jahresber. Inst. Vogelforsch. ‚Vogelwarte Helgoland‘ 3, 29.
- Witney, A. A., Doolan, D. L., Anthony, R. M., Weiss, W. R., Hoffman, S. L. & Carucci, D. J.** (2001): Determining liver stage parasite burden by real time quantitative PCR as a method for evaluating pre-erythrocytic malaria vaccine efficacy. Mol. Biochem. Parasitol. 118, 233-245.
- Woodworth, B. L., Atkinson, C. T., LaPointe, D. A., Hart, P. J., Spiegel, C. S., Tweed, E. J., Hennemann, C., LeBrun, J., Denette, T., De Mots, R., Kozar, K. L., Triglia, D., Lease, D., Gregor, A., Smith, T. & Duffy, D.** (2005): Host population persistence in the face of introduced vector-borne diseases: Hawaii amakihi and avian malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1531-1536.
- Yang, Z.** (1994): Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. J. Mol. Evol. 39, 306-314.

**Zuckermandl, E. & Pauling, L.** (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V. & Vogel, H. J. (Hrsg.), *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, SS. 97-166.

## 7 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

**Wiersch, S. C., Maier, W. A. & Kampen, H. (2005):** *Plasmodium (Haemamoeba) cathemerium* gene sequences for phylogenetic analysis of malaria parasites. Parasitol. Res. 96, 90-94.

**Wiersch, S. C., Misof, B., Maier, W. A., Kampen, H.:** Bayesian analysis of new and old malaria parasite DNA sequence data demonstrates the need for more phylogenetic signal to clarify the descent of *Plasmodium falciparum*. Parasitology, eingereicht

**Wiersch, S. C., Lubjuhn, T., Maier, W. A., Kampen, H.:** Avian malaria in passerine birds from Lower Saxony. J. Ornithol., eingereicht

Posterpräsentation auf der 138. Jahresversammlung der Deutschen Ornithologen-Gesellschaft (DO-G), Stuttgart, 29.9. -4.10.2005:

**Wiersch, S. C., Kampen, H. & Lubjuhn, T.:** Die Verbreitung der Vogel malaria bei einigen niedersächsischen Sperlingsvögeln

## 8 Anhang

### Cyt b-DNA-Sequenzen der niedersächsischen Vögel

```

      HAEMF      →
ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCTGGTGCTTCATTTGTATTTATTTTAACTTATTTACATATTTTAAGAGGATT
AAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTAATAATATTTTAAATATCTATAGTAACAGC
TTTTATGGGTTACGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACCGTAATAACTAATTTATTTATATTT
TATACCTGGACTAGTTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACCTTAAAAAGATTCTTTGTACT
ACATTTTACATTTCCTTTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATAACATATATTCTTTCTACATTTACAAGGTAGCAC
AAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTAAGGATT
TAATAATGTATTAGTACTATTTTATAGCACAAAGTTTATTTGGAATACTACCATTATCACATCCAGATAATGC
      ←      HAEMR2

```

#### Abb. 17: *Plasmodium spec.* (AF495571)\*, 522 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)

```

      HAEMF      →
ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCACAGGTGCTTCATTTGTATTTATTCTAACTTATTTACATATTTTAAGAGGA
TTAAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTAATTTATATTTCTTAAATATCTATAGTTACA
GCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCCACTGTAATTACTAATCTATTTATAT
TTTATACCTGGACTTGTTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTTAAAAAGATTCTTTGTA
TTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATAACATATATTCTTTCTACATTTACAAGGTAGC
ACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTCGATATTAAGGA
TTAATAATGTATTAGTATTATTTTATAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGC
      ←      HAEMR2

```

#### Abb. 18: *Plasmodium spec.* (AF495576)\*, 523 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)

HAEMF →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTATTTATTTTAACTTATTTACATATTTTAAAGAG  
 GATTAAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTACTTATATTTTAAATATCTATTTGTAA  
 CAGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACAGTTATTACTAATTTATTTAT  
 ATTTTATACCTGGACTTGTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAAGTGACCCAACCTTAAAAAGATTCTTTG  
 TATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTTTACATTTACAAGGTA  
 GCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTAAG  
 GATTTAATAATGTATTAGTATTATTCTTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAATG  
 C

← HAEMR2

**Abb. 19:** *Plasmodium spec.* (AF069611), 526 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

HAEMF →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATCTACTGGTGCTACATTTGTCTTTTCTTTATTTTAACTTATTTACATATATTAA  
 GAGGATTAAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTAATAATATTCTTAAATTTCTATTG  
 TACTGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACCGTTATAACTAATTTAT  
 TATATTTTATACCTGGACTTGTTCATGGATTTGTGGTGGATATATTATTAGTGATCCAACCTTAAAAAGATTTT  
 TTGTATTACATTTTATATTCCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTTTACTTACAAG  
 GTAGCACTAATCCTTTAGGATATGATACTGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAGTCTATTATGTCTAGATATTA  
 AAGGATTTAATAATGTATTAGTCTTATTTCTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATA  
 ATG

← HAEMR2

**Abb. 20:** *Haemoproteus spec.* (AY714154), 528 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

HAEMF →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCACAGGTGCTTCATTTGTATTCACTTAACTTACTTACATATTTTAAAGAGGA  
 CTAAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGACTAATAATATTCTTAAATATCTATTGTTACT  
 GCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACTGTTATAACTAACTTATTATAT  
 TTTATACCAGGTCTTGTTCATGGATTTGCGGTGGATATCTTGTAAAGCGACCCAACACTAAAAAGATTTTGTGTA  
 TTACTTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTTTCTTACATTTACAAGGTAGC  
 ACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAGGA  
 TTTAATAATATATTAGTTTTATTTTATAGCTCAAAGTTTATTTGGAATCTTACCATTATCTCATCCAGATAATGC

← HAEMR2

**Abb. 21:** *Plasmodium spec.* (AF495568)\*, 524 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)

HAEMF →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTATTTATTTTACCTATTTACATATTTTAAGAG  
 ATTAATAACTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATTTTCAGGATTATTAATATTTTAATATCCATAGTTAC  
 TGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACAGTTATAACTAACTTATTATA  
 TTTTATACCTGGACTTGTCTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACCTTAAAAAGATTTTTTGT  
 ATTACATTTTACATTCCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTCATACATATATTCTTCTTACATTTACAAGGTAG  
 CACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAGATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAGG  
 ATTTAATAATGTATTAGTTTTATTCTTATCTCAAAGTTATTTGGAATTTTACCATTATCACATCCAGATAATGC

← HAEMR2

**Abb. 22:** *Plasmodium spec.* (AF495577)\*, 525 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)

HAEMF →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTAATTTATTTTACTTATTTACATATTTTAAGAG  
 GATTAATAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTAATTATATTTTAATATCTATAGTAA  
 CAGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACCGCAATTAATAATTTATTAT  
 ATTTTATACCTGGACTAGTTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACCTTAAAAAGATTTCTTTG  
 TATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTTTACATTTACAAGGTA  
 GCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTAAG  
 GATTTAATAATGTATTAGTATTATTTTTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGC

← HAEMR2

**Abb. 23:** *Plasmodium spec.* (AY393792)\*, 526 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)

HAEMF →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTATTTATTTTAACTTACTTACATATTTTAAGAG  
 GATTAATAATTATTCATACTCATATTTACCTCTATCATGGATATCTGGATTAATAATATTTCTTAATATCTATTGTTA  
 CTGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTTGGGGTGCAACTGTCATAACTAATTTATTAT  
 ATTTTATCCCAGGACTTGTTCATGGATTTGCGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTAATAAGATTTTTTG  
 TATTGCATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTCTTACATTTACAAGGTA  
 GCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAG  
 GGTTAATAATATATTAGTTTTATTTTTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCGGAATAATGC

← HAEMR2

**Abb. 24:** *Plasmodium spec.* (AF254963), 526 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

HAEMF                      →

ATGGTGTTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTATTTTTCTTACTTATTTACATATTTTAAGAGGA  
 TTAAATTATTCTTATTCTTATTTACCTTTATCATGGATATCAGGATTAATAATATTTTTAATCTCAATAGTTACT  
 GCTTTTATGGGATATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACCGTTATTACTAATTTATTTATAT  
 TTTTACCTGGTCTTGTTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTAAGGATTTTTTTGTA  
 TTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGGATTTATACATATATTCTTTCTACATTTACAAGGTAGC  
 ACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAGGA  
 TTTAATAATGTCTTAGTTTTATTTTTAGCACAAAGCTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGC

←                      HAEMR2

**Abb. 25:** *Plasmodium spec.* (DQ060773), 524 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

HAEMF                      →

ATGGTGCTTTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTATTTATTTTTACTTACTTACATATTTTAAGAGG  
 ACTAAATTATTCATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGACTAATAATATTCTTAATATCTATTGTTAC  
 TGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACCGTTATAACTAACTTATTATA  
 TTTTATAACCAGGTCTTGTTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTAAGCGACCCAACACTAAAAAGATTTTTTTGT  
 ATTACATTTTACATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTTTTCTTACATTTACAAGGTAG  
 CACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAGG  
 ATTTAATAATATATTAGTTTTATTCTTAGCTCAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCAGAATAATGC

←                      HAEMR2

**Abb. 26:** *Plasmodium spec.* (AF495568), 525 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

HAEMF                      →

ATGGTGCTTTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTATTTTTCTTACTTATTTACATATTTTAAGAGG  
 ATTAATTATTCTTATTCTTATTTACCTTTATCATGGATATCAGGATTAATAATATTTTTAATCTCAATAGTTAC  
 TGCTTTTATGGGATATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACCGTTATTACTAATTTATTATA  
 TTTTATAACCTGGTCTTGTTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTAAGGATTTTTTTGT  
 ATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATTGGATTTATACATATATTTCTTTCTACATTTACAAGGTAG  
 CACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAGG  
 ATTTAATAATGTCTTAGTTTTATTTTTAGCACAAAGCTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAATGC

←                      HAEMR2

**Abb. 27:** *Plasmodium spec.* (AF465555), 525 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

HAEMF                      →

ATGGTGTTCGATATATGCATGCTACTGGTGCTACATTTGTTTTTATTTTAAACATATTTACATATTTAAGAGG  
 ATTAAATTATTCATACTCATATTTACCTTTATCATGGATAACTGGATTAGTAATATTTCTTAATTTCTATGTGCAC  
 AGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACCGTTATTAATACTTATTATA  
 TTTTATACCTGGACTTGTTTCATGGATTTGTGGAGGATATATTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTTTTTGT  
 ATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATAGTATTTATACATATATTTCTTTTACACTTACAAGGTAG  
 CTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCTTTCTATCCAAGTCTATTATGTCTAGATATTAAGG  
 ATTTAATAATATATTAGTCTATTTCTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAATG

←                      HAEMR2

**Abb. 28:** *Haemoproteus maj.* (AF254977)\*, 528 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)

HAEMF                      →

ATGGTGCTTTTCGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTTTTTTTTTAAACATATTTACATATTTCTAAGAGG  
 ATTAAATTATTCATACTCATATTTACCTTTATCATGGATAACTGGACTAATAATATTTCTTAATTTCTATGTGCAC  
 AGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACCGTTATTAATACTTATTATA  
 TTTTATACCTGGACTTGTTTCATGGATTTGTGGAGGATATATTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTTTTTGT  
 ATTACATTTTATATTTCCATTTATAGCTTTATGTATAGTATTTATACATATATTTCTTTTACACTTACAAGGTAG  
 CTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCTTTCTATCCAAGTCTATTATGTCTAGATATTAAGG  
 ATTTAACAATATATTAGTCTATTTCTAGCACAAAGTTTATTTGGAATTTTACCATTATCACATCGGAATTAATG

←                      HAEMR2

**Abb. 29:** *Plasmodium spec.* (AF495553)\*, 526 bp

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer. Die GenBank-Zugangsnummer entspricht dem GenBank-Eintrag mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung, wobei '\*\*' eine 100 %ige Übereinstimmung bedeutet.)





```

P. chabaudi          ACAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTATTATATCTATTAATAATAAATTTTAAAT
P. yoelii            ACAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTATTATATCTATTAACAATAAATTTAAATAT
P. knowlesi          ATTAAATTTATATTTCAAATAAAATTAATATTACAATTTATATTAATAATGAATTTAAATAT
P. cynomolgi         ATTAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTACAATTTATATTAATAATGAATTTAAATAT
P. malariae          ATAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTAAATATTTATATTAATAATAAATTTAAATAT
P. vivax             ATTAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTACAATTTATATTAATAATGAATTTAAATAT
P. relictum          AATAAATTTAAATTTAAATAAAATTAATATAAATATTTCATATAAATAATAAATTTAAATAT
P. cathemerium       ATTAAATTTAAATTTAAATAAAATTAATATAAATATTTCATATAAATAATAAATTTAAATAT
P. ovale             ATAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTATTATTTCATATTAATAGAAAATTTAAATAT
P. gallinaceum       ATAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTTTAGTACATATAAATAATAAATTTAAATAT
P. elongatum         ATAAATTTATATTTAAATAAAATTAATATTATTATTAATTTAAATTTAAATAAATTTAAATAT
* :*****:*** *****:*****: :.*: .***:** :.:*:*:***:**

```

```

                                  ←                               ClpC2
P. chabaudi          ATTTTAATAAAATTAATTTGACTATAATCCTTTAAATGGAGCTCG
P. yoelii            TTTATAATTAATTAACT---TATAATCCTTTAAATGGAGCTCG
P. knowlesi          TTTTAAATTAATTAACT---TATAATCCTTTATATGGAGCACG
P. cynomolgi         TTTTAAATTAATTAACT---TATAATCCTTTATATGGAGCACG
P. malariae          TTTTAACTAAATTAACA---TATAATCCTTTATATGGAGCACG
P. vivax             TTTTAAATTAATTAACT---TATAATCCTTTATATGGAGCACG
P. relictum          ATATTAACTAAAATATCT---TATAATCCTTTATATGGAGCTCG
P. cathemerium       ATATTAACTAAAATATCT---TATAATCCTTTAAATGGAGCTCG
P. ovale             TTTTAAATAAAATTAACA---TATAATCCTTTAAATGGAGCTCG
P. gallinaceum       ATTATACCAAATTTATCA---TATAATCCATTATATGGAGCTCG
P. elongatum         ATTTTAGTTAAATTTATCA---TATAATCCTTTATATGGTGCACG
*:::** :***:**: : *****:***:**:**:**

```

### Abb. 30: Sequenz-Alignment des ClpC-Gens

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.

\* = vollständige Nukleotidübereinstimmung zwischen den verschiedenen Sequenzen

: = entweder zwei verschiedene Purin- oder zwei Pyrimidinnukleotide

. = zwei unterschiedliche Nukleotide)

Al 399 →

Pcynomolgi AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pfragile -ACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCCTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCAAGTG  
Pvivax AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pberghei AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
P. chabaudi AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Povale AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Preichenovi AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pfalci parum AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pgallinaceum AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Plophuræ AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pcathemerium AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pknowlesi AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
Pmalariae AACCTGGTTGATCTTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTG  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.

Pcynomolgi AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Pfragile AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Pvivax AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Pberghei AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
P. chabaudi AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Povale AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Preichenovi AAAGTATATATATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAGTC  
Pfalci parum AAAGTATATATATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAGTC  
Pgallinaceum AAAGTATATATATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Plophuræ AAAGTATATATATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Pcathemerium AAAGTATATATATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Pknowlesi AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAATC  
Pmalariae AAAGTATATGCATATTTTATATGTAGAAACTGCGAACGGCTCATTAAAACAGTTATAGTC  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.

Pcynomolgi TACTTGACATTTTTCTTATAAAG-ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Pfragile TACTTGACATTTTCTATATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Pvivax TACTTGACATTTTTCTATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Pberghei TACTTGACATTT--TATTATAAAG-ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
P. chabaudi TACTTGACATTT--TATTATAAAG-ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Povale TACTTGAATTTCTACCTACAAGGATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Preichenovi TACTTGACATTTTTATTATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Pfalci parum TACTTGACATTTTTATTATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
Pgallinaceum TACTTGACATTTTTTTTATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGACCG  
Plophuræ TACTTGACATTTTTTTTATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGATCG  
Pcathemerium TACTTGACATTTTTTTTATAAAG--ATAACTACGAAAATCTGTAGCTAATACTTGAACG  
Pknowlesi TACTTGACATTTTCTATATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTT-  
Pmalariae TACTTGACATTTTTTTTATAAAG--ATAACTACGAAAAGCTGTAGCTAATACTTGCTTT  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\* : : : . \*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.

Pcynomolgi AG-----CACTCTGATTAAGTTCTTG-AGTGTGTACTTGTTAAGCCTTTAAGA  
Pfragile AG-----CACTCTGATTTATTTCTTG-AGTGTGTACTTGTTAAGCCTTATAAGA  
Pvivax AG-----CACTCTGATTCATTTCTTG-AGTGTGTACTTGTTAAGCCTTTAAGA  
Pberghei AAG----TGCTTTTTACTTCTTGAGTAATT-AGCATGTATTTGTTAAGCCTTATAAGA  
P. chabaudi AAT----TGCTTTTACTCCCG--AGATATT-TGCATGTATTTGTTAAGCCTTATAAGA  
Povale AAT----GCGTTTGAATCCTTTTGATTCCCGCGTATGTACTTGTTAAGCCTTTAAG-A  
Preichenovi ATT----ATCCTT--TGATTTTATATCTTAGGATAAGTACTTGTTAGGCCTTATAAGA  
Pfalci parum ATT----ATCCTTG----ATTTTATCTTTGGATAAGTATTTGTTAGGCCTTATAAGA  
Pgallinaceum ATT-GTTCTCATCGCCTTTATAGGTAATGAAGAACACGTATTTGTTAAGCCTTATAAGA  
Plophuræ ATT-TTCTTCAAACCCCAAAAAGGTTCTGTGAAACACGTATTTGTTAAGCCTTATAAGA  
Pcathemerium ATTGTTTTTCAGTTCCCAAAAAGGTTCTGAAAAACACGTATTTGTTAAGCCTTATAAGA  
Pknowlesi -----TAGCACTCTGATTTCTTTCTTGAGTGTGTACTTGTTAAGCCTTATAAGA  
Pmalariae AAT----ACTCTTAATCTTATGTTTTTTGAGTATGTATTTGTTAAGCCTTATAAGA  
. . \*\*\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*. \*

Pcynomolgi AAAAAAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACGTAATGG-----ATCCGT  
Pfragile AAGAAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACGTAATGG-----ATCCGT  
Pvivax AAAAAAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTGACACGTAATGG-----ATCCGT  
Pberghei AAAAT--TTTAAATTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACATAATAT-----ATTTA  
P.chabaudi AAATT--TTTAAATTGAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACATAATAT-----ATTTA  
Povale AAGAAGTTTATAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACATAATAAG-----TTG  
Preichenovi AAAAAAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACGTAATAAAT-----TTA  
Pfalci parum AAAAAAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACGTAATAAAT-----TTA  
Pgallinaceum AAAAAAGTTATTAATTTAAGGAATTATAACAAAGAAGCAACACATAATAA-----AACTTTG  
Plophuræ AAAAAAGTTACTAATAAGGAATTATAACAAAGAAGCAACACATAATAA-----AGCTGCC  
Pcathemerium AAAAAAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGGAACACATAATGG-----AACTCCG  
Pknowlesi AAAGAGTTATTAACCTTAAGGAATTATAACAAAGAAGTAACACGTAATG-----GATTCTT  
Pmalariae GAAAAGTATATTAACCTTAAGGATTATAACAAAGAAGTAACACATAATAA-----ATTTCG-  
.\*. : :: :\* :\*.\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*.\*.:

Pcynomolgi CCATTTTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pfragile ATTTTTTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTACGGGTATT  
Pvivax CCATTTTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pberghei CTATATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
P.chabaudi CTATATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Povale CCTTATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Preichenovi TTTTATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pfalci parum TTTTATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pgallinaceum TTTTATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Plophuræ TCTTATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pcathemerium TTTTATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pknowlesi CCATTTTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
Pmalariae -AATATTTAGTGTGTATCAATCGAGTTTCTGACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGG-TATT  
: :\*\*\*\*\* \*\* \*\*

Pcynomolgi GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pfragile GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pvivax GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pberghei GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
P.chabaudi GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Povale GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Preichenovi GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pfalci parum GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pgallinaceum GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Plophuræ GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pcathemerium GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pknowlesi GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
Pmalariae GGCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT  
\*\*\*\*\*

Pcynomolgi GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pfragile GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pvivax GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pberghei GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAATA  
P.chabaudi GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAATA  
Povale GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Preichenovi GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pfalci parum GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pgallinaceum GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Plophuræ GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pcathemerium GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pknowlesi GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
Pmalariae GAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCTAAATTACCCAATTCTAAAGA  
\*\*\*\*\*

Pcynomolgi AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCCAATCTGG--CTTTGTAATTGGAATG  
Pfragile AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCCAATCTGG--CTTTGTAATTGGAATG  
Pvivax AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCCAATCTGG--CTTTGTAATTGGAATG  
Pberghei AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATATAAGGCCAAATTTTGGTTTTATAATTGGAATG  
P.chabaudi AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATATCAATATAAGGCCAAATTTTGGTTTTATAATTGGAATG  
Povale AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCCAATTTTCATGGTTTTGTAATTGGAATG  
Preichenovi AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATGCAAGGCCAATTTTGGTTTTGTAATTGGAATG  
Pfalci parum AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATGCAAGGCCAATTTTGGTTTTGTAATTGGAATG  
Pgallinaceum AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATGCAAGGCCAATTTTGGTTTTGCAATTGGAATG  
Plophuræ AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATGCAAGGTCAATTTTGTATTTGCAATTGGAATG  
Pcathemerium AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAAGGTAAAGTCAAATTTTGGCTTTTATCATTGGAATG  
Pknowlesi AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCCAATCTGG--CTTTGTAATTGGAATG  
Pmalarie AGAGAGGTTAGTGACAAGAAATAACAATGCAAGGCCAATTTTGGTTTTGCAATTGGAATG  
\*\*\*\*\*:\*\*\* . \*\*\*\* \*::: \*\*\*.\*\*\*\*\*

Pcynomolgi ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--ACTCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pfragile ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--ATTCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pvivax ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--ACTCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pberghei ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--AATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
P.chabaudi ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--AATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Povale ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--ATTCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Preichenovi GTGGGAATTTAAAACCTTCCAGAG-TAACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pfalci parum GTGGGAATTTAAAACCTTCCAGAG-TAACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pgallinaceum ATAGGAATTTAAAACCTTCCAAAAG-TAACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Plophuræ ATAGGAATTTAAAACCTTCCCTAAAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pcathemerium ATAGGAATTTAAAACCTTCCAAAAG-TAACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pknowlesi ATGGGAATTTAAAACCTTCCAAA--TTCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
Pmalarie ATGGGAATTTAAAACCTTCCAGAA--GGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC  
.\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* :.\* \*\*\*\*\*

Pcynomolgi GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pfragile GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pvivax GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pberghei GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
P.chabaudi GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Povale GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Preichenovi GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pfalci parum GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pgallinaceum GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Plophuræ GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pcathemerium GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pknowlesi GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
Pmalarie GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTT  
\*\*\*\*\*

Pcynomolgi GAATTTCAAAG-AATCGATATTTTAAGCAACGCTTGTAGCTTAA-----  
Pfragile GAATTTCAAAG-AATCGATATTTTAAGTACGCTTTTAGCTAAA-----  
Pvivax GAATTTCAAAG-AATCGATATTTTAAGCAACGCTTCTAGCTTAA-----  
Pberghei GAATTTCAAAGGATATTTATTTTAAGTAACTCACTTGGCGAGA-----  
P.chabaudi GAATTTCAAAGGATATTTATTTTAAAGCAACTCACTTGGCTAG-----  
Povale GAATTTCAAAGAATCAATATTTTAAAGTAATACTTTTGCTATAAG-----  
Preichenovi GAATTTCAAAGAATCGATATTTTATTGTAATACTATTAGGGGAA-----  
Pfalci parum GAATTTCAAAGAATCGATATTTTATTGTAATACTATTAGGGGAA-----  
Pgallinaceum GAATTTCAAAG-AATCAATTTTAAAAATG--CTTTATCGG-----ATGCG  
Plophuræ GAATTTCAAAG-AATCTATTTTAAAGGATGTG-CTTTATTGG-----AATTA  
Pcathemerium GAATTTCAAAG-AATCATTTTTAAAGTTAATGCTTTATCGG-----ATATG  
Pknowlesi GAATTTCAAAG-AATCGATATTTTAAGCAACGCTTCTAGCTAT-----AAATC  
Pmalarie GAATTTCAAAG-AATCAATATTTTAAGTAATGCTTTGTATATTTATAACATAGTTGTACG  
\*\*\* \*\*\*\*\*.\* ::: \*\*\*\*\*:







Pcynomolgi CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pfragile CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pvivax CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pberghei CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
P.chabaudi CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Povale CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Preichenovi CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pfalci parum CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pgallinaceum CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Plophuræ CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pcathemerium CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pknowlesi CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
Pmalariae CTTTCCTTGATTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTTAGTTTCGTGAATATGATTTGTC  
\*\*\*\*\* \*\*

Pcynomolgi TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCAAAATACGATATAT  
Pfragile TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCAAAATACGATATAT  
Pvivax TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCAAAATACGATATAT  
Pberghei TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAGTACTCTATAT  
P.chabaudi TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAGTACGCTATAT  
Povale TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAAATACGTTATAT  
Preichenovi TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAAGTACGCTATAT  
Pfalci parum TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAGTACACTATAT  
Pgallinaceum TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAATAACAACATAT  
Plophuræ TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAATAACAACATAT  
Pcathemerium TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAATAACAACATAT  
Pknowlesi TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCAAAATACGATATAT  
Pmalariae TGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGG-TAATAACTATAT  
\*\*\*\*\* \*\*

Pcynomolgi TCTTATGTGGGATTGAATACGGTTGATTTG---CTTATTTTGAAGAAAATATTGGGAT--  
Pfragile TCTTATGTGGAATTGAATATGGTTGATTTG---CTTATTTTGCAGAAAATATTGGAAT--  
Pvivax TCTTACGTGGGACTGAATTCGGTTGATTTG---CTTACTTGAAGAAAATATTGGGAT--  
Pberghei CCTTTTATGG-----GAGATTGGTTTT---GACGTTTATGTGGGCATATG-ATT--  
P.chabaudi CCTCTATCGG-----GAGTTTGGTTTT---GACGTTTATGCG--AACTATG-GTT--  
Povale TCTTATGTGAAATTGAATATAGCTGAATTTGCTTATTTTGAAGAATACATTAGG-----  
Preichenovi TCTTAAATTGAAATTGAATATAGGTAATTATACATTTATTTCAGTATCAAATTAGGATA--  
Pfalci parum TCTTATTTGAAATTGAACATAGGTAACATAACATTTATTTCAGTAATCAAATTAGGATA--  
Pgallinaceum TCTTAAAC-AAAGAAGAATATAG--ATAAAAATTACAAATAAGTGAAAATATTAGGAT--  
Plophuræ TCATGTAC-AAAAAAGAATATAGGCAAAAAATAACATAAGTAATACAAAATATTAGGA--  
Pcathemerium TCTTAAAGT-AAATAAGAATATAG--ATAAAAATTACAAATAAGAGAAAATATTAGGAT--  
Pknowlesi TCTTATGT-AGAATTGAATATAG-TGGATTTGTTAGATTTTGAAGAAAATATTGGAAT--  
Pmalariae TCTTAAAGTGAATTAGAATATAGATAAATGTGCTAATTTGATTAATAATTAGAATGT  
\* : . : : : \* : :

Pcynomolgi ---GCG--TAAAGTGTCCCTTTCCCTTTTCTACTTAAT----TTGCTTATCATACTGTT  
Pfragile ---GCGTAAACAAGTGTCCCTTTCCCTTTTCTACTAAAT----TTGCTTATCATACTATT  
Pvivax ---ACGTAACAG-TTTCCTTTCCCTTTTCTACTTAGT----TCGCTTTTACATACTGTT  
Pberghei ---AATCAATTGGTTTACCTTTTGTCTTTTTTTCATTATGATTCCTTGCCTTACGACATGC  
P.chabaudi ---AACCAATTGGTTTACCTTTTGTCTTTTTGCAGATG--CTTCTGCATTTACTTCCCT-C  
Povale ---ATACAATTAATGTGTCTTTTCCCTATTCTTCTTAATTCGCAATTCATGCTGTTTCT  
Preichenovi ---TTTTTATTAATAATATCCTTTTCCCTGTCTACTAATAAATTTGTTTTTTACTCTATTT  
Pfalci parum ---TTTTTATTAATAATATCCTTTTCCCTGTCTACTAATAAATTTGTTTTTTACTCTATTT  
Pgallinaceum ---ATTTTTTAAT--ATCCTTTTCCCTTTTCAACTATTTTGTTTTTTTACTCTATTT  
Plophuræ ---TATTTTTAAT--ATCTTAATCCCTTTTCTATTTATTTTG-TTTTTTGTCTATTT  
Pcathemerium ---ATTATATAAT--ATCCTTTTCCCTTTTCTTCTATATTTG-TATTTTTATCTGTTT  
Pknowlesi ---TACGTAAATGTGATTCCTTTCCCTTTTCTACTTAATTTA--CATTTCCATCTATTT  
Pmalariae TTTTTTAAATAAAACGTTCTTTTCCCTTTTCTTAAATATGCATATTTATCTTTTT  
: : . : \* \* \* : :



Pcynomolgi GTAATCTTTATCAATACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pfragile GTAATCTTTATCAATACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pvivax GTAATCTTTATCAGTACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pberghei GTAATCTTTATCAATACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
P.chabaudi GTAATCTTTATCAATACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Povale GTAATCTTTATCAGTACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Preichenovi GTAATCTTTATCAATATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pfalci parum GTAATCTTTATCAATATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pgallinaceum GTAATCTTTATCAATATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Plophuræ GTAATCTTTATCAATATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pcathemerium GTAATCTTTATCAATATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pknowlesi GTAATCTTTATCAATACATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
Pmalarie GTAATCTTTATCAATATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC  
\*\*\*\*\* . \* \*\*\*\*\*

Pcynomolgi GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pfragile GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pvivax GAGGAATGCCTGGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pberghei GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
P.chabaudi GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Povale GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Preichenovi GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pfalci parum GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pgallinaceum GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Plophuræ GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pcathemerium GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pknowlesi GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
Pmalarie GAGGAATGCCTAGTAAGCATGATTCATCAGATTGTGCTGACTACGTCCCTGCCCTTTGTA  
\*\*\*\*\* . \*\*\*\*\*

Pcynomolgi CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pfragile CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pvivax CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pberghei CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
P.chabaudi CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Povale CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Preichenovi CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pfalci parum CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pgallinaceum CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Plophuræ CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pcathemerium CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pknowlesi CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
Pmalarie CACACCGCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTTGGACAAGAAGAA  
\*\*\*\*\* . \* \*\*\*\*\*

Pcynomolgi GGGGATTA--TATCTTCTTTTTTCTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pfragile GGGGATTA--TATCTTTGTTTTTCTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pvivax GGGGATTA--TATCTCCTTTTTTCTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pberghei G-AAATTT--TATTTTTATTTTTTGGAAAGGACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
P.chabaudi G-AAATTT--TATTTTTATTTTTTGGAAAGGACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Povale AAGAATTT--ATATTTTTTTTTTCTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Preichenovi GG-AAATTA--TATCTTTTTTTTTCTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pfalci parum TG-AAATTA--TATCTTTTTTTTTCTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pgallinaceum TAAAATTTATATTTTTGTTTTTTTTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Plophuræ TAAAATTT--ATATTTGTTTTTTTTTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pcathemerium TAAATTTAT---ATTTGTTTTTTTTTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGG-AAGGA  
Pknowlesi TTGGATT----ATATCTTTTTTTTTTGGAAAAACCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
Pmalarie GGTTTTTT----ATCTTTTTTTTTCTGGAAAAATCGTAAATCCTATCTTTTTAAAGGAAGGA  
: \* : \*\*\*\*\* . \* \*\*\*\*\*

	←	A1400
Pcynomolgi	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Pfragile	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGCAGG	
Pvivax	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Pberghei	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
P.chabaudi	GAAG-TCGAAACAAGGTTTCCGTAGG	
Povale	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Preichenovi	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCC-----	
Pfalciparum	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Pgallinaceum	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Plophuræ	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Pcathemerium	GAAG-TCGTAACAAGGCTTCCGTAGG	
Pknowlesi	GAAG-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	
Pmalariae	GAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTCCG	
	***. ***:***** ****	

### Abb. 31: Sequenz-Alignment des 18 SSU rRNA-Gens

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten flankierenden Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.)

\* = vollständige Nukleotidübereinstimmung zwischen den verschiedenen Sequenzen

: = entweder zwei verschiedene Purin- oder zwei Pyrimidinnukleotide

. = zwei unterschiedliche Nukleotide

	CytbF1	→
<i>P. vivax</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. elongatum</i>	AATTACGGGTTTCCT---TTTAGGAATTGTATTTTTTATACAAATTTTAACAGGTGTATTA	
<i>P. simium</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. cynomolgi</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATAATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. gonderi</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. ovale</i>	AATTACGGGTTTCCT---TTTAGGAATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. inui</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTC	
<i>P. malariae</i>	AATTACGGGTTTCCT---TTTAGGAATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. reichenowi</i>	AATTACGGGTTTCCT---TTTAGGAATCATATTTTTTATTCAAATTATAACTGGTGTATTT	
<i>P. falciparum</i>	AATTACGGGTTTCCT---TTTAGGAATAATATTTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTT	
<i>P. gallinaceum</i>	AATTACGGGTTTCCT---TTTAGGAATAGTATTTTTTATACAAATTTTAACAGGTGTATTA	
<i>P. fieldi</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATAATATTTTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. knowlesi</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
<i>P. cathemerium</i>	AATTACGGGTTGCT---TTTAGGAATTGTATTTTTTATACAAATTTTAACAGGTGTATTA	
<i>P. simiovale</i>	AATTACGGGTTGCTGATTTTAGGTATTATATTCTTTATACAAATATTAACAGGTGTATTT	
	***** ** *****:*** ** * *****:*****:*****:*****	
<i>P. vivax</i>	TTAGCAAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. elongatum</i>	TTAGCAACTTGTATATACTCCAGAAATATCTTATGCATATACTATAGTGTACAACATATATTA	
<i>P. simium</i>	TTAGCAAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. cynomolgi</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. gonderi</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATATCATATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. ovale</i>	TTAGCAAGTCGTTATACTCCTGAAATATCTTACGCATATTATAGTATACAACATATATTA	
<i>P. inui</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. malariae</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGATATATCATATGCATATTATAGTATTCAACACATTTTA	
<i>P. reichenowi</i>	TTAGCAAGTCGATATACACCAGATGTATCATATGCATATTATAGTATACAACACATTTTA	
<i>P. falciparum</i>	TTAGCAAGTCGATATACACCAGATGTTTCATATGCATATTATAGTATACAACACATTTTA	
<i>P. gallinaceum</i>	TTAGCAACTTGTATATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTGTACAACACATATTA	
<i>P. fieldi</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. knowlesi</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATTTCTTACGCATACTACAGTATACAACATATTTTA	
<i>P. cathemerium</i>	TTAGCTACTTGTATATACTCCAGAAATATCTTATGCATACTATAGTGTACAACATATATTA	
<i>P. simiovale</i>	TTAGCTAGTCGTTATACTCCAGAAATATCTTATGCATATTATAGTATACAACATATTTTA	
	*****: * * *:*****:*****:*.**:*.** ***** * * ***.**:***** ***:**	
<i>P. vivax</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. elongatum</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTA	
<i>P. simium</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. cynomolgi</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. gonderi</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. ovale</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACTGGTGCATCATTAGTA	
<i>P. inui</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. malariae</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACAGGTGCATCACTTGTA	
<i>P. reichenowi</i>	AGAAAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCTCTTGTA	
<i>P. falciparum</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTA	
<i>P. gallinaceum</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTA	
<i>P. fieldi</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. knowlesi</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
<i>P. cathemerium</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCAACAGGTGCTTCATTTGTA	
<i>P. simiovale</i>	AGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATATATGCATGCTACAGGTGCATCTCTTGTA	
	***.***** ***** ***:*****:***: ***:**	
<i>P. vivax</i>	TTCTTATTAACCTATTTACACATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATTTACCA	
<i>P. elongatum</i>	TTTATTTTAACCTACTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCCTATTCATATTTACCT	
<i>P. simium</i>	TTCTTATTAACCTATTTACACATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATTTACCA	
<i>P. cynomolgi</i>	TTCTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATCTACCT	
<i>P. gonderi</i>	TTTTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATTTACCT	
<i>P. ovale</i>	TTTTTCTTAACCTATCTACATATTTTAAGAAGATTA AATTATTCATATTTATATTTACCT	
<i>P. inui</i>	TTTTTATTAACCTACTTACACATTTTAAGAGGATTA AACTATTCATATTTATATCTACCT	
<i>P. malariae</i>	TTTTTCTTAACCTATTTACATATTTTAAGAAGATTA AATTATTCATATTTATATTTACCA	
<i>P. reichenowi</i>	TTTTTATTAACATATTTGCATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATATGTATTTACCA	
<i>P. falciparum</i>	TTTTTATTAACATATCTTCATATTTTAAGAGGATTA AATTACTCATATATGTATTTACCA	
<i>P. gallinaceum</i>	TTTATTTTAACCTACTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTCATATTTACCT	
<i>P. fieldi</i>	TTCTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATCTACCT	
<i>P. knowlesi</i>	TTTTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATCTACCA	
<i>P. cathemerium</i>	TTTTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTCATATTTACCT	
<i>P. simiovale</i>	TTCTTATTAACCTATTTACACATTTTAAGAGGATTA AATTATTCATATTTATATCTACCT	
	** :* *****:*** * ** *****.***** ** ** ***: .*** ***:	



*P. vivax* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. elongatum* ATACATATATTCTTTTTACATTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. simium* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. cynomolgi* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. gonderi* ATACATATTTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. ovale* ATACATATATTCTTCTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCA  
*P. inui* ATACATATATTCTTTTTACATTTACACGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. malariae* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTACGATACAGCT  
*P. reichenowi* ATACATATATTTTTCTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCA  
*P. falciparum* ATACATATATTTTTCTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCA  
*P. gallinaceum* ATACACATATTCTTCTTACATCTACAAGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. fieldi* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. knowlesi* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. cathemerium* ATACATATATTCTTTTTACATTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
*P. simiovale* ATACATATATTCTTTTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT  
\*\*\*\*\* \*\*:\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:

*P. vivax* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
*P. elongatum* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTAAGGATTTAATAATGTA  
*P. simium* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
*P. cynomolgi* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
*P. gonderi* TTAAAAATACCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
*P. ovale* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATATC  
*P. inui* TTTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
*P. malariae* TTAAAAATACCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATAT  
*P. reichenowi* TTAAAAATACCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATGTA  
*P. falciparum* TTAAAAATACCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATGTT  
*P. gallinaceum* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGACATTAAGGATTTAATAATGTA  
*P. fieldi* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
*P. knowlesi* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATATA  
*P. cathemerium* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTAAGGATTTAATAATGTA  
*P. simiovale* TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAGGATTTAATAATATA  
\*\*:\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*:\*:\*\*\*\*\* \*

*P. vivax* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. elongatum* TTAGTATTATTCTTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAAT  
*P. simium* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. cynomolgi* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. gonderi* TTTATATTATTTTTATTACAAAGTTTATTTGGTATTATTCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. ovale* TTTATATTATTTTTATTACAAAGTTTATTTGGAATAATACCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. inui* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. malariae* ATTATTATATTTTTACTACAAAGTTTATTTGGTATTATACCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. reichenowi* ATCATTTTATTTTTAATACAAAGTTTATTTGGAATTATACCTTTATCACATCTGATAAT  
*P. falciparum* ATAATTTTATTCTTAATACAAAGTTTATTTGGAATTATACCTTTATCACATCCAGATAAT  
*P. gallinaceum* TTAGTATTATTCTTAGCTCAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCACATCCAGATAAT  
*P. fieldi* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. knowlesi* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
*P. cathemerium* TTAGTATTATTCTTAGCACAAAGTTTATTTGGAATATTACCATTATCCCATCCAGATAAT  
*P. simiovale* TTTATATTATTCTTATTACAAAGTATTTTGGTATAATCCATTATCTCATCCAGATAAT  
:\* \*:\*:\*\*\*\*\* \*\* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

*P. vivax* GCTATATTAGTTAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCTGAATGGTACTTTTTTA  
*P. elongatum* GCTATTACAGTAGATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTTTTA  
*P. simium* GCTATATTAGTTAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCTGAATGGTACTTTTTTA  
*P. cynomolgi* GCTATATTAGTAAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCTGAATGGTACTTTTTTA  
*P. gonderi* GCAATATTAGTTAATACATATGTTACACCAATACAAATGTTCCAGAATGGTATTTTTTA  
*P. ovale* GCAATTTAGTTAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCCAGAATGGTATTTTTTA  
*P. inui* GCTATATTAGTTAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCTGAATGGTACTTTTTTA  
*P. malariae* GCAATTTAGTTAATACATATGTTACACCAATACAAATGTTCCAGAATGGTATTTTTTA  
*P. reichenowi* GCTATTGTAGTAAATACATATGTTACTCCATCTCAAATAGTACCTGAATGGTACTTTCTA  
*P. falciparum* GCTATCGTAGTAAATACATATGTTACTCCATCTCAAATGTTACCTGAATGGTACTTTCTA  
*P. gallinaceum* GCAATTTACAGTAGATAGATATGCTACACCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTCTTA  
*P. fieldi* GCTATATTAGTTAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCTGAATGGTACTTTTTTA  
*P. knowlesi* GCTATATTAGTTAATACATATGTTACACCAATTCAAATGTTCTGAATGGTACTTTTTTA  
*P. cathemerium* GCTATTACAGTAGATAGATATGCTACTCCTTTACATATTGTTCCAGAATGGTATTTTTTA  
*P. simiovale* GCTATATTAGTCAATACATATGTTACACCAATTCAAATAGTTCCTGAATGGTACTTTTTTA  
\*\*:\* \*\* \* \*\* \* :\*\*\*:\*\*\*: :\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\* \*\* \*

*P. vivax* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. elongatum* CCTTTTTATGCTATGTTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCAGGTTTATTAGTTATGTTA  
*P. simium* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. cynomolgi* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACCGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. gonderi* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. ovale* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. inui* CCATTTTTATGCAATATTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. malariae* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. reichenowi* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACTGTTCCAAGTAAACCAGCTGGTTTAGTAATTGTATTA  
*P. falciparum* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACTGTTCCAAGTAAACCAGCTGGTTTAGTAATTGTATTA  
*P. gallinaceum* CCTTTTTATGCAATGTTAAAAACCATTCTAACAAAACCTGCTGGTTTATTAGTTATGTTA  
*P. fieldi* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. knowlesi* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACAGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
*P. cathemerium* CCTTTTTATGCAATGTTAAAAACAATTCCTAACAAAACAGCAGGTTTACTAGTTATGTTA  
*P. simiovale* CCATTTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAAACCTGCAGGTTTATTAATTGTTTTA  
 \*\*:\*\*\*\*\*:\*. \* .\*\*\*\*\* .\*:\*\*.\*. \*\*\*.\* \*\*:\*\*\*\*\* \*\*.\*.\* \*\*

*P. vivax* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. elongatum* GCATCTTTACAATTATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. simium* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. cynomolgi* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. gonderi* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. ovale* GCGTCATTACAATTATTATTTTTATTAGCCGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. inui* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. malariae* GCATCATTACAATTATTATTTTTAATGGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. reichenowi* TTATCATTACAATTATTATTTCTATTAGCCGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. falciparum* TTATCATTACAATTATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. gallinaceum* GCATCATTACAATTATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. fieldi* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. knowlesi* GCATCTTTACAATTATTATTTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. cathemerium* GCATCTTTACAATTATTATTTCTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
*P. simiovale* GCATCTTTACAATTATTATTTCTATTAGCTGAACAAAGAAGTTTAACTACTATAATACAA  
 .\*\* : \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*:\* \*\* \*\*\*\*\*. \*\*\*\*\* \*\* .:\*\* \*\*

*P. vivax* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. elongatum* TTTAAATTTGCTTTTGGTGCAAGAGAATATTCCTGTTCCCTACTATCTGGTTTATATGTTCCG  
*P. simium* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. cynomolgi* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATACTCAGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. gonderi* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCCTGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. ovale* TTTAAAATGGCATTGGTGCTAGAGAATATTCCTGTTCCAAATATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. inui* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. malariae* TTTAAAATGTTATTTGGTGCAAGAGAATATTCCTGTTCCAAATATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. reichenowi* TTTAAAATGATTTTGGTGCTAGAGAATATTCCTGTTCCCTATATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. falciparum* TTTAAAATGATTTTGGTGCTAGAGAATATTCCTGTTCCCTATATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. gallinaceum* TTTAAAATTTGCTTTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTTCCTACAATTTGGTTTATATGTTCA  
*P. fieldi* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCCTGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. knowlesi* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCAGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
*P. cathemerium* TTTAAAATTTGCTTTTGGTGCAAGAGAATATTCCTGTTCCCTACTATCTGGTTTATATGTTCA  
*P. simiovale* TTTAAAATGACATTTGGTGCTAGAGAATATTCCTGTACCAATGATATGGTTTATGTGTTCA  
 \*\* \*\*:\* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*:\* \*\* \*\*:\* \*\*:\* \*\* \*\* \*\*\*\*\*.\*\*\* \*

*P. vivax* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTATTTTATATGGT  
*P. elongatum* TTCTATGCTTTACTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTACATTTTATATGGT  
*P. simium* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTATTTTATATGGT  
*P. cynomolgi* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. gonderi* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. ovale* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. inui* TTCTATGCTTTACTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. malariae* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGAAATTTTCATTTTATATGGT  
*P. reichenowi* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. falciparum* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. gallinaceum* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTACATTTTATATGGT  
*P. fieldi* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. knowlesi* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. cathemerium* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
*P. simiovale* TTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* .\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*: \*\*\*\*\*

<i>P. vivax</i>	CGTTTATTTATAATATCATTCCTTCTCTAGTGGATTATTTGCACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. elongatum</i>	CGTTTATTTATTATATTATTCCTTCTTTAGTGGTTTATTTACACTTGTTCATCAAAAAGA
<i>P. simium</i>	CGTTTATTTATAATATCATTCCTTCTCTAGTGGATTATTTGCACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. cynomolgi</i>	CGTTTATTTATAATATATTATTCCTTCTCTAGTGGATTATTTGCACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. gonderi</i>	CGTTTATTTATAATATCATTCCTTCTCTAGTGGATTATTTGTACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. ovale</i>	CGTTTATTTATAATATCATTTTTCTCCAGTGGGTTATTTGTACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. inui</i>	CGTTTATTTATAATAATATTCCTTTCTAGTGGATTATTTGCACTTGTTCATTATAACAGA
<i>P. malariae</i>	CGTTTATTTATTATATCATTCCTTTCTAGTGGTTTATTTGCACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. reichenowi</i>	CGATTATTTATTGTATTATTTTTCTGTAGTGGTTTATTTGTACTTGTTCATTATAAAGCA
<i>P. falciparum</i>	CGATTATTTATTGTATTATTTTTCTGTAGTGGTTTATTTGTACTTGTTCATTATAGACGA
<i>P. gallinaceum</i>	CGTTTATTTATTATATTATTCCTTTTTTAGTGGTTTATTTACACTTGTTCATCTAAAAGA
<i>P. fieldi</i>	CGTTTATTTATAATATCATTCCTTCTCTAGTGGATTATTTGCACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. knowlesi</i>	CGTTTATTTATAATATTATTCCTTCTTTAGTGGATTATTTACACTTGTTCATTATAAAAAGA
<i>P. cathemerium</i>	CGTTTATTTATTATATTATTCCTTCTTTAGTGGTTTATTTACACTTGTTCATCAAAAAGA
<i>P. simiovale</i>	CGTTTATTTATAATATCATTTTTCTCTAGTGGATTATTTGCACTTGTTCATTATAAAAAGA
	***:*****:.*: ** * * * ***** ***** . *****:* :*. * *
	← cytbR1
<i>P. vivax</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. elongatum</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. simium</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. cynomolgi</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. gonderi</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. ovale</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. inui</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. malariae</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. reichenowi</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. falciparum</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. gallinaceum</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. fieldi</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. knowlesi</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. cathemerium</i>	ACACATTATGATTAC
<i>P. simiovale</i>	ACACATTATGATTAC
	*****

### Abb. 32: Sequenz-Alignment des cyt b-Gens

(Die zur DNA-Amplifikation verwendeten Primer sind farbig markiert; das Symbol ,→' kennzeichnet den ,forward'-Primer, das Symbol ,←' den ,reverse'-Primer.

\* = vollständige Nukleotidübereinstimmung zwischen den verschiedenen Sequenzen

: = entweder zwei verschiedene Purin- oder zwei Pyrimidinnukleotide

. = zwei unterschiedliche Nukleotide)

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. W. A. Maier möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass er mir diese Arbeit ermöglicht und mir stets in seiner freundlichen Art gerade auch in schwierigen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ebenso möchte ich mich für die Bereitstellung des *P. cathemerium*-Photos bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. J.-W. Wägele möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. H.-M. Seitz, der mir im Institut für Medizinische Parasitologie einen Arbeitsplatz bereitgestellt hat. Die Anstellung, die er mir zukommen ließ, hat es mir wesentlich erleichtert, die Dissertation zu beginnen. Auch bedanke ich mich für die Anfertigung der Gewebephotos des Balistars und für die konstruktiven Gespräche.

Ich danke Herrn Professor Dr. A. Hörauf, der mir als Nachfolger von Herrn Professor Dr. H.-M. Seitz als Institutsdirektor die weitergehende Benutzung des Arbeitsplatzes erlaubte.

Für die stetig währende intensive Betreuung und immer hilfsbereite Unterstützung während der praktischen molekularbiologischen Arbeit danke ich ganz herzlich Herrn Dr. rer. nat. Helge Kampen. Weiterhin und insbesondere möchte ich mich herzlich für das geduldige und unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn PD Dr. T. Lubjuhn bedanke ich mich für das freundliche Bereitstellen der vielen Vogelblutproben und die Hilfe seines Labors. Auch möchte ich ihm für die hilfreiche Unterstützung beim Drittmittelantrag bei der Deutschen Ornithologischen Gesellschaft danken.

Herrn PD Dr. B. Misof danke ich für seine Bereitschaft, mich in die Welt der molekularen Systematik einzuführen und mir diese mit vielen Anregungen und netten Gesprächen näher zu bringen.

Vielen Dank an Frau Sabrina Bleidissel, Frau Maria Orland und Frau Christiane Wallnisch für ihre großartige Unterstützung beim Screenen der zahlreichen Vogelproben.

Danken möchte ich auch Frau Lemke für das Schneiden und Färben der Paraffinblöcke.

Herrn Dipl.-Biol. Carsten Pollmann danke ich für das Einarbeiten in die Methode des Sequenzierens.

Herrn Dr. rer. nat. Sirk Engels danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Den heutigen und ehemaligen Doktoranden, Diplomanden und den Mitarbeitern des Institutes möchte ich danken für das nette Arbeitsklima, jegliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors und für viele unterhaltsame und hilfreiche Gespräche über mehr – oder weniger – arbeitsassoziierte Themen.

Meinen Freunden, meiner Familie und meinem Verlobten Martin Hagner danke ich für Ihren uneingeschränkten Beistand und Ihre Geduld, ohne die diese Arbeit nicht erfolgreich zustande gekommen wäre.