

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<b>Abkürzungen</b>	9
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	13
<b>Einleitung</b>	16
<b>1. Literaturübersicht</b>	17
<b>1.1 Sommerekzem (SE)</b>	17
1.1.1 Synonyme	17
1.1.2 Ätiologie	17
1.1.3 Pathogenese	19
1.1.4 Symptome	19
<b>1.2 Allergietypen</b>	20
1.2.1 Typ I Mechanismus des SE	21
1.2.2 Typ IV Mechanismus des SE	23
<b>1.3 Diagnostik des SE</b>	24
1.3.1 Intrakutantest	24
1.3.2 Nachweis von IgE	25
1.3.3 Funktionelle <i>In-vitro</i> -Tests	25
1.3.3.1 Histamine Release Test (HRT)	26
1.3.3.2 Cellular Antigen Stimulation Test (CAST)	26
<b>1.4 Therapie des SE</b>	27
1.4.1 Verminderung der Allergenexposition	27
1.4.2 Symptomatische Behandlung	27
1.4.3 Allergen-spezifische Immunotherapie (ASIT)	28
1.4.4 Homöopathische Komplexbehandlung in Verbindung mit Eigenblut	28
<b>1.5 Kontrolle der B-Zell-Aktivität</b>	30
1.5.1 B-Lymphozyten	30
1.5.2 B-Zell-aktivierende Faktoren	30
1.5.3 BAFF	31
1.5.4 APRIL	31
1.5.5 Plasmazellen	32
1.5.6 Mechanismus der Plasmazelldifferenzierung	32
<b>1.6 Atacept/ TACI-Ig</b>	33
1.6.1 Forschungsergebnisse im Mausmodell	33
1.6.2 Therapieansätze in der Humanmedizin	34
1.6.3 Idee zum Therapieeinsatz in der Pferdemedizin	34
<b>2. Zielsetzung</b>	35

<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>37</b>
3.1.1	Gerätenachweis	37
3.1.2	Gebrauchsmaterialiennachweis	38
3.1.3	Chemikaliennachweis	39
3.1.4	Verwendete Gemische	40
3.1.5	Kommerzielle KITs	42
3.1.6	PC Programme	42
3.1.7	Sonstiges	43
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Klinisch-diagnostische Methoden</b>	<b>44</b>
3.2.1.1	Blutabnahme	44
<b>3.2.2</b>	<b>Zellkultur-Methoden</b>	<b>44</b>
3.2.2.1	Isolierung von equinen PBMC aus heparinisiertem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation	44
3.2.2.2	Zell-Zählung	45
<b>3.2.3</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>45</b>
3.2.3.1	Extraktion der RNA aus PBMCs	45
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA	46
3.2.3.3	Reverse Transkription (RT)	47
3.2.3.4	Primerdesign	48
3.2.3.4.1	Primer für die PCR	48
3.2.3.4.2	Primer für das Klonieren	50
3.2.3.4.3	Primer für die Sequenzierung	51
3.2.3.5	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	51
3.2.3.5.1	Kontroll-PCR	54
3.2.3.6	Agarosegelelektrophorese	54
3.2.3.7	Klonierung und Sequenzierung	55
3.2.3.7.1	DNA Isolierung und Aufreinigung	55
3.2.3.7.2	Ligation	55
3.2.3.7.2.1	Ligation in den PCR 2.1 Vektor	56
3.2.3.7.2.2	Ligation in den pASK- IBA6 Vektor	57
3.2.3.7.2.3	Ligation in pcDNA IGHG1 und 4	59
3.2.3.7.3	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	61
3.2.3.7.3.1	Herstellung von Kulturplatten	62

3.2.3.7.4	Plasmid-DNA Präparation	62
3.2.3.7.4.1	Mini-Präparation	62
3.2.3.7.4.2	Midi-Präparation	63
3.2.3.7.5	Restriktionsenzymanalyse	64
3.2.3.7.5.1	Restriktionsenzymanalyse vom PCR 2.1 Vektor	64
3.2.3.7.5.2	Restriktionsenzymanalyse vom pASK-IBA6 Vektor	65
3.2.3.7.5.3	Restriktionsenzymanalyse von pcDNA IGHG1/ 4	66
3.2.3.7.6	Sequenzierung	66
<b>3.2.4</b>	<b>Herstellung rekombinanter Proteine</b>	67
3.2.4.1	Prinzip der Proteinbiosynthese	67
3.2.4.2	Zellkultur für die Expression der Proteine in HEK 293 Zellen	67
3.2.4.2.1	Transfektion von TACI-IGHG 1 und 2	68
3.2.4.3	Expression der Proteine mit Strep-tag	69
3.2.4.3.1	Expression in <i>E.coli</i>	69
3.2.4.3.2	Aufbereitung des Lysates	70
3.2.4.3.3	Aufreinigung des Proteins mittels Gravitationsdurchflusssäulen	70
<b>3.2.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	71
3.2.5.1	Durchflusszytometrie	71
3.2.5.1.1	Prinzip	71
3.2.5.1.2	Zellmarkierung	71
<b>3.2.6</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	72
3.2.6.1	Western-Blot	72
3.2.6.1.1	Prinzip	72
3.2.6.1.2	Methode	73
3.2.6.1.2.1	Vorbereitung Sammel- und Trenngel	73
3.2.6.1.2.2	Probenvorbereitung	74
3.2.6.1.2.3	Gelelektrophorese	74
3.2.6.1.2.4	Blot	74
3.2.6.1.2.5	Proteinnachweis	75
3.2.6.1.2.6	Blocken und Antikörper-Färbung	75
3.2.6.1.2.7	Entwicklung	76
3.2.6.2	Quantifizierung der Proteinmenge	76

3.2.7	<b>Serologische Methoden</b>	77
3.2.7.1	ELISA	77
3.2.7.1.1	Prinzip	77
3.2.7.1.2	Methode	78
4.	<b>Ergebnisse</b>	80
4.1	Ergebnisse der <i>in silico</i> Analysen des equinen BAFF, APRIL und des extrazellulären TACI	80
4.1.1	Einleitung	80
4.1.2	Sequenzhomologie-Analyse	80
4.1.3	Sequenzen der equinen Gene eBAFF, eAPRIL und eTACI	82
4.2	Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI	86
4.2.1	Einleitung	86
4.2.2	Kontrolle der hergestellten cDNA	86
4.2.3	Ermittlung der PCR- Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI	87
4.3	Ergebnisse zur Herstellung des Fusionsproteins TACI-Ig	89
4.3.1	Einleitung	89
4.3.2	Transfektionsrate der HEK 293 Zellen	89
4.3.3	Überprüfung der Proteinbiosynthese von TACI-Ig im Western Blot	91
4.4	Ergebnisse zur Proteinbiosynthese von eBAFF und eAPRIL	93
4.4.1	Einleitung	93
4.4.2	Überprüfung der Proteinbiosynthese von eBAFF und eAPRIL im Western Blot	94
4.5	Ermittlungen der Proteinmenge von eBAFF und eAPRIL	95
4.6	Ermittlung der Bindungsfähigkeit von TACI-Ig 1 und 4	97
5.	<b>Diskussion</b>	101
5.1	<i>In silico</i> Analysen des equinen BAFF, APRIL und des extrazellulären TACI	103
5.2	Optimale Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI	104
5.3	Herstellung des Fusionsproteins TACI-Ig	104
5.4	Proteinbiosynthese von eBAFF und eAPRIL	104
5.5	Bindungsfähigkeit des equinen TACI-Ig	105
5.6	TACI-Ig als Therapie beim SE beim Pferd	105
5.7	TACI-Ig als Mittel der Wahl	106
5.8	eTACI-Ig als neue Perspektive für die Behandlung des SEs beim Pferd	108

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>Summery</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>122</b>
	<b>Puplikation</b>	<b>125</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>126</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>127</b>