

	Seite
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungen	9
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	13
Einleitung	16
1. Literaturübersicht	17
1.1 Sommerekzem (SE)	17
1.1.1 Synonyme	17
1.1.2 Ätiologie	17
1.1.3 Pathogenese	19
1.1.4 Symptome	19
1.2 Allergietypen	20
1.2.1 Typ I Mechanismus des SE	21
1.2.2 Typ IV Mechanismus des SE	23
1.3 Diagnostik des SE	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
1.4 Therapie des SE	27
1.4.1 Verminderung der Allergenexposition	27
1.4.2 Symptomatische Behandlung	27
1.4.3 Allergen-spezifische Immuntherapie (ASIT)	28
1.4.4 Homöopathische Komplexbehandlung in Verbindung mit Eigenblut	28
1.5 Kontrolle der B-Zell-Aktivität	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
1.6 Atacicept/ TACI-Ig	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
2. Zielsetzung	35

3.	Material und Methoden	37
3.1	Material	37
3.1.1	Gerätenachweis	37
3.1.2	Gebrauchsmaterialienachweis	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
3.2	Methoden	44
3.2.1	Klinisch-diagnostische Methoden	44
3.2.1.1	Blutabnahme	44
3.2.2	Zellkultur-Methoden	44
3.2.2.1	Isolierung von equinen PBMC aus heparinisiertem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation	44
3.2.2.2	Zell-Zählung	45
3.2.3	Molekulargenetische Methoden	45
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	Agarosegelektrophorese	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
3.2.4 Herstellung rekombinanter Proteine	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 TAC1-IGHG 1 und 2	68
3.2.4.3 Expression der Proteine mit Strep-tag	69
3.2.4.3.1 Expression in E.coli	69
3.2.4.3.2 Aufbereitung des Lysates	70
3.2.4.3.3 Aufreinigung des Proteins mittels Gravitationsdurchflusssäulen	70
3.2.5 Zellbiologische Methoden	71
3.2.5.1 Durchflusszytometrie	71
3.2.5.1.1 Prinzip	71
3.2.5.1.2 Zellmarkierung	71
3.2.6 Proteinchemische Methoden	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 Serologische Methoden	77
3.2.7.1 ELISA	77
3.2.7.1.1 Prinzip	77
3.2.7.1.2 Methode	78
4. Ergebnisse	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. Diskussion	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

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