

Aus dem DRFZ
eingereicht über das Institut für Virologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Neuer Therapieansatz zur Behandlung des Sommerkzems beim Pferd auf
molekularbiologischer und immunologischer Ebene: TACI-Ig als Kontrolle seiner pro-
inflammatorischen Bindungspartner BAFF und APRIL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Silvia Kühnel, geb. Hein
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3674

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Andreas Radbruch
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Schmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Horses, sweet itch, eczema, *Culicoides*, treatment, cytokines, ELISA, allergic reactions, plasma cells, B lymphocytes, ligands

Tag der Promotion: 28.08.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-528-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Meinem Thomas,
der mich immer unterstützt
und für mich da ist.*



„Wir leben alle von dem,
was uns Menschen in bedeutungsvollen
Stunden unseres Lebens gegeben haben.“

Novalis

| <u>Inhaltsverzeichnis</u> | Seite |
|--|-------|
| 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 Immunotherapie (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 | 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 |
| | 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 | 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 |
| 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 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 |
| 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 |

Abkürzungen

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| A | Adenin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Antigenpräsentierende Zellen |
| APRIL | A proliferation inducing ligand |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ASIT | Allergen-spezifische Immuntherapie |
| BAFF | B cell activating factor |
| BAFF R | B cell activating factor- receptor |
| BCA | Bicinchoinic Acid |
| BCMA | B cell maturation antigen |
| BLyS | B lymphocyte stimulator |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| C | Cytosin |
| C. | <i>Culicoides</i> |
| CAST | Cellular antigen stimulation test |
| CD | Cluster of differentiation |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CMV | Cytomegalovirus |
| COB | Chronisch obstruktive Bronchitis |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA/ DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphate |
| DRFZ | Deutsches Rheumaforschungszentrum |
| dT (oligo) | Desoxy-Thymine |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| E. | <i>Escherichia</i> |
| eAPRIL | Equines APRIL |
| eBAFF | Equines BAFF |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|-------------------------|---|
| eGFP | enhanced green fluorescent protein |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| eTACI | Equine TACI |
| F_C | Crystallisable fragment |
| Fc_εRI | F _C epsilon Receptor I |
| FCS | Fötales Kälberserum (fetal calf serum) |
| FIT | Funktioneller in vitro Test |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| for | forward |
| FSC | Forward Scatter |
| G | Guanin |
| HBS | HEPES-buffered saline |
| HEK | Human Embryonic Kidney |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRT | Histamine release test |
| hTACI | Humans TACI |
| IBH | Insect bites hypersensitivity |
| Ig | Immunoglobulin |
| IGHG | Immunoglobulin heavy chain gamma |
| IL | Interleukin |
| ITK | Intrakutantest |
| IVIG | Intravenös Immunoglobulin |
| kb | Kilobase |
| kD | Kilodalton |
| KM | Knochenmark |
| LB | lysogeny broth |
| LN | Lupusnephritis |
| LZ | Langerhans'sche Zellen |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| MHC II | Major histocompatibility complex II |
| mLK | Mesenterial Lymphknoten |
| MOPS | 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid |
| MS | Multiple Sklerose |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |

| | |
|-----------------|---|
| OD | Optische Dichte |
| -OH | Hydroxygruppe |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre periphere Blutzellen) |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Pfu | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pH | potentia Hydrogenii |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RAO | rezidivierende Atemwegsobstruktion |
| rev | reverse |
| RIA | Radioimmunoassay |
| rpm | revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RNA/ RNS | Ribonekleinsäure |
| RT | Reverse Transkription |
| SCC | Side Scatter |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SDS Page | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel |
| SE | Sommerekzem |
| SIT | Spezifische Immuntherapie |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematoses |
| sLT | Sulfidoleukotrienen |
| Spp. | Species pluralis |
| SSRD | Summer seasonal recurrent dermatitis |
| T | Thymidin |
| TACI | transmembrane activator and calcium modulator ligand interaction |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TALL-1 | TNF- and ApoL related leukocyte expressed ligand 1 |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBST | Tris-Buffered Saline and Tween 20 |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Th | T-Helferzellen |
| THANK | TNF homolog activates apoptosis, nuclear factor-B und c-Jun NH2 terminal kinase |
| TNFSF | Tumor necrose factor superfamily |
| U | Umdrehung |
| UCSC | University of California Santa Cruz |

| | |
|--------------|---------------------------|
| UV | Ultraviolet |
| V | Volt |
| zTNF4 | z-tumor necrosis factor 4 |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

- 1** Fotographie einer Gnitze
- 2** Symptome des SE
- 3** Symptome des SE
- 4** Typ I Mechanismus beim SE
- 5** Mechanismus der Plasmazell-Differenzierung
- 6** Dichtegradientenzentrifugation
- 7** pCR 2.1 Vektorkarte von Invitrogen
- 8** pASK-IBA6 Vektorkarte von IBA GmbH
- 9** pcDNA 3.1 Vektorkarte von Invitrogen
- 10** Aufbau der Blot-Vorrichtung von Anode bis Kathode
- 11** Schematische Darstellung für ELISA am Beispiel für eAPRIL
- 12** a) Homologieverhältnis für TACI
 b) Homologieverhältnis für BAFF
 c) Homologieverhältnis für APRIL
- 13** a) DNA-Sequenz von eBAFF
 b) DNA-Sequenz von eAPRIL
 c) DNA-Sequenz von eTACI
- 14** Kontrolle der cDNA Synthese durch β -Actin PCR
- 15** PCR-Nachweis von eBAFF, eAPRIL und eTACI
- 16** a) Grundeinstellung der Durchflusszytometrie
 b) Durchflusszytometrie von TACI-Ig 1 und 4
- 17** Western-Blot-Auswertung zu TACI-Ig 1 und 4
- 18** Western-Blot-Auswertung zu eBAFF
- 19** Western-Blot-Auswertung zu eAPRIL
- 20** BSA-Standard-Kurve
- 21** BCA Bradford Protein Assay
- 22** Standardkurve der Positivkontrolle
- 23** Extinktionsmessung von TACI-Ig 1
- 24** Extinktionswerte aus dem ELISA-Test von TACI-Ig
- 25** Formel für die Umrechnung der Humandosis in die Dosierung für das Tier nach Ungemach

Tabellen

- 1 Dermatitis Index
- 2 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription
- 3 Primer für die PCR von eBAFF, eAPRIL und eTACI
- 4 Genexpressions-Primer für eAPRIL
- 5 Genexpressions-Primer für eBAFF
- 6 Genexpressions-Primer für eTACI
- 7 Konstrukt-Längen für eBAFF, eAPRIL und eTACI
- 8 Primer für die Sequenzierung
- 9 β -Aktin
- 10 PCR-Reaktionsansatz
- 11 PCR-Bedingungen
- 12 Spezifische Annealing-Temperaturen
- 13 Ergebnisse der Insert-Berechnung für den PCR 2.1 Vektor
- 14 Pipettierschema der Ligationsansätze für den PCR 2.1 Vektor
- 15 Ergebnisse der Insert-Berechnung für den pASK-IBA6 Vektor
- 16 Pipettierschema der Ligationsansätze für den pASK-IBA6 Vektor
- 17 Ergebnis der Insert-Berechnung für den pcDNA IGHG 1/4 Vektor
- 18 Pipettierschema der Ligationsansätze für den pcDNA IGHG 1/4 Vektor
- 19 Sequenz von *EcoRI*
- 20 Pipettierschema für den Restriktionsenzymverdau vom PCR 2.1 Vektor
- 21 Pipettierschema für den Verdau des pASK IBA6 Vektors mit *BsaHF I* für die Ligation
- 22 Sequenzen von *EcoRV HF* und *Xba I*
- 23 Pipettierschema für den Verdau des pASK-IBA6 Vektors mit *EcoRV HF* und *Xba I*
- 24 Sequenzen von *BamH I* und *Nhe I*
- 25 Pipettierschema für den Verdau des pcDNA IGHG 1/4 Vektor mit *BamH I* und *Nhe I*
- 26 Pipettierschema für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele
- 27 Pipettierschema für die Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Proteinmenge
- 28 Pipettierschema der 96-Well-Platte
- 29 Die Daten der equinen Zytokine eBAFF und eAPRIL aus der Gendatenbank NCBI
- 30 Vergleich der Homologien von equinen BAFF, APRIL und TACI zu Mensch und Maus

- 31** Vorkommen der Genen auf den Chromosomen
- 32** Primersequenzen von eBAFF, eAPRIL und eTACI mit den ermittelten Annealing-Temperaturen
- 33** Annealing-Temperaturen mit den besten Ergebnissen
- 34** Berechnete Molekulargewichte von eTACI und den F_C-Teilen von IGHG 1 und IGHG 4
- 35** Berechnete Molekulargewichte von eBAFF und eAPRIL
- 36** Auswertung vom ELISA bei OD 405

Einleitung

Diese Arbeit handelt vom Sommerexzem (SE) der Pferde. Das SE ist eine Erkrankung von der nahezu alle Rassen betroffen sein können. Importierte Pferde, z.B. aus Island oder Argentinien, sind aufgrund einer Überreaktion des Immunsystems nach dem Import besonders anfällig für die Ausprägung des SE (Lange et al. 2005). Es handelt sich um eine Erkrankung, die fast überall auf der Welt vorkommt und deren Prävalenz zwischen 3 und 72% variiert (Brostrom et al. 1987, Halldorsottir, Larsen 1991, Lange et al. 2005). Das SE ist eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I (Marti et al. 1999) und vom Typ IV (Anderson et al. 1991) auf InsektenSpeichel und führt zu den Flugzeiten der Insekten, besonders von *Culicoides spp.*, von etwa März bis Oktober zu klinischen Symptomen. Aber auch andere Insekten wie die Kriebelmücken (*Simulium spp.*), Stechmücken (*Culex spp.*), Wadenstecher (*Stomoxys spp.*) und Bremsen (*Tabanus spp.*) könnten in der Lage sein das SE auszulösen (Wagner 2007). Das SE geht einher mit starkem Pruritus mit Scheuern der Pferde bis hin zur Selbstverletzung und Sekundärinfektionen. Die Nutzung der Tiere kann bis zur Unbrauchbarkeit eingeschränkt werden. Nach wie vor ist diese Erkrankung des Pferdes ein großes Problem ohne bisherige Aussicht auf Heilung. Existierende Behandlungsmöglichkeiten wie die symptomatische Behandlung oder die Allergenspezifische Immuntherapie (ASIT) stellen lediglich Therapieversuche dar und können eventuell eine Reduzierung der klinischen Symptome bewirken. Daher wurde in dieser Arbeit ein neuer Therapieansatz zur Behandlung des Sommerexzems beim Pferd auf molekularbiologischer und immunologischer Ebene erforscht. Es wurde das equine TACI-Ig hergestellt und seine Funktion mit Hilfe seiner pro-inflammatorischen Bindungspartnern equines BAFF (eBAFF) und equines APRIL (eAPRIL) kontrolliert. Im Hinblick auf die Hintergründe und zum genauen Verständnis dieser Forschungsarbeit wird das Krankheitsbild des Sommerexzems mit deren Ätiologie und Pathogenese ausführlich beschrieben. Auch auf die Allergietypen, die Diagnostik und die Therapiemöglichkeiten wird umfangreich eingegangen. Um ausreichende Informationen zum Wirkmechanismus des TACI-Ig zu bekommen, wird die Kontrolle der B-Zellaktivität, mit den B-Zell-aktivierende Faktoren BAFF und APRIL und dem Mechanismus der Plasmazelldifferenzierung beschrieben. Außerdem werden Therapieansätze des TACI-Ig in der Humanmedizin, deren Forschungsergebnisse im Mausmodell, die Hemmung der Plasmazelldifferenzierung durch TACI-Ig und Ideen zum Therapieeinsatz in der Pferdemedizin erläutert.

1.Literaturübersicht

1.1 Sommerekzem (SE)

Das Sommerekzem ist eine Überempfindlichkeitsreaktion von Pferden gegenüber Stichen von Insekten wie z.B. den Gnitzen (*Culicoides spp.*). Diese Überempfindlichkeit geht einher mit sehr starkem Juckreiz, der sekundär durch Scheuern zu verschiedenen anderen Symptomen führen kann. Es bildet sich eine rezidivierende allergische Dermatitis aus. Die betroffenen Pferde können bis hin zur Unbrauchbarkeit stark in ihrer Nutzung eingeschränkt werden. Aber auch für das Tier selbst besteht ein hoher Leidensdruck. Das SE wurde häufig bei Islandpferden beschrieben, aber es tritt auch bei vielen anderen Pferderassen auf, z.B. Vollblüter, Araber, Warmblüter, Kaltblüter und Ponies (Wagner, et al. 2006). Grundsätzlich kann jedes Pferd davon betroffen sein (Dietz, Huskamp 2006). Importierte Pferde, z.B. aus Island oder Argentinien, sind aufgrund einer Überreaktion des Immunsystems (allergische Reaktion) auf die ihnen bisher unbekannt haemophagen Insekten nach dem Import besonders anfällig für die Ausprägung des SE, da sich das Immunsystem bisher noch nicht mit diesen Allergenen auseinandergesetzt hat (Lange et al. 2005). Es handelt sich um eine Erkrankung, die fast überall auf der Welt vorkommt und deren Prävalenz zwischen 3 % und 72 % variiert (Brostrom et al. 1987, Halldorsdottir, Larsen 1991, Lange et al. 2005). Derzeit gibt es keine Heilung für das SE. Alle bisherigen Therapieversuche sind lediglich eine Reduzierung der klinischen Symptome.

1.1.1 Synonyme

Für das Sommerekzem des Pferdes gibt es, sowohl im deutschen als auch im englischen Sprachgebrauch, viele verschiedene Bezeichnungen. Man spricht hierbei von einer Insektenhypersensitivität, die auch als Sommerdermatitis, Culicoides-Hypersensitivität, summer seasonal recurrent dermatitis (SSRD), Queensland itch, sweet itch, oder insect bites hypersensitivity (IBH) in der Literatur zu finden ist.

1.1.2 Ätiologie

Verantwortlich für das SE sind die blutsaugenden weiblichen Gnitzen der Gattung *Culicoides spp.* Diese Insekten gehören zur Ordnung der Zweiflügler (*Diptera*) und zur Unterordnung der Mücken (*Nematocera*). Der wissenschaftliche Familienname lautet *Ceratopogonidae* und stammt aus dem Jahr 1834 von Edward Newman. Es handelt sich um sehr kleine Mücken von 1 - 4 mm mit einem buckelartig aufgewölbten Thorax, wie die Abbildung 1 zeigt. Die Flügel sind hell-dunkel gefleckt und behaart und die Antennen bestehen aus 12 - 15 Gliedern, die beim Männchen eine büschelartige Behaarung besitzen (Eckert et al. 2008). Mit nahezu 1000 Arten der Gattung *Culicoides* kommen sie weltweit, besonders in

Sumpfbereichen (Mehlhorn et al. 1998), vor. In Deutschland gehören die Spezies *C. impunctatus*, *C. obsoletus*, *C. pectipennis*, *C. pulicaris*, *C. punctatus* und *C. stigma* zu den Mücken, die das SE auslösen können (Strothmann 1982). Saisonal und regional treten sie mit großer Anzahl auf und werden damit zu einer unerträglichen Plage. Ihre Stiche verursachen bei Mensch und Tier starken Juckreiz und ein unangenehmes Brennen, es kommt zu entzündlichen Reaktionen mit Bläschenbildung und zu allergischen Hautreaktionen (Eckert et al. 2008). Weiterhin spielen einige Spezies als Vektoren für Krankheitserreger, wie Viren, Bakterien, Protozoen und Nematoden eine Rolle. Zu den übertragenen Krankheiten gehören z.B. das Blauzungenvirus und das Schmallenberg Virus. Die Eiablage erfolgt nach der Blutmahlzeit an schlammigen, feuchten Plätzen. Nach 4 Larvenstadien erfolgt die Entwicklung zu einer wenig beweglichen Puppe, aus der sich dann die adulte Gnitze entwickelt (Eckert et al. 2008). Für die Entwicklung werden je nach vorherrschender Temperatur mehrere Wochen benötigt, in den tropischen Gebieten genügt meist eine Woche (Mehlhorn et al. 1998). In den kälteren Monaten bleibt die Entwicklung der Gnitzen aus, so dass das SE saisonal zu den Flugzeiten von Frühjahr (März) bis Herbst (Oktober) auftritt (Hunsinger 2002).



Abb.1: Fotographie einer Gnitze

Eine weibliche *Culicoides pulicaris* mit buckelartig aufgewölbten Thorax, gegliederten Antennen und hell-dunkel gefleckten Flügeln (Quelle: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin)

Aber auch andere Insekten wie die Kriebelmücken (*Simulium spp.*), Stechmücken (*Culex spp.*), Wadenstecher (*Stomoxys spp.*) und Bremsen (*Tabanus spp.*) könnten in der Lage sein das SE auszulösen (Wagner 2007). Bei all diesen haemophagen Insekten wird während des Saugaktes Speichel in die Haut des Pferdes injiziert, der dann die allergische Reaktion hervorruft. Der Speichel der Gnitzen ist bereits gut untersucht und es wurden mehrere Proteine identifiziert, die allergen wirken und das SE auslösen können. Marti hat bei ihren aktuellen Forschungsergebnissen im Jahr 2009, 15 verschiedene Kandidatenallergene aus den

Speicheldrüsen der *Culicoides* identifiziert, kloniert und exprimiert. Sie hat dadurch herausgefunden, dass nicht alle am SE leidenden Pferde einen Immunglobulin (Ig) E-Antikörper gegen die gleichen rekombinanten Proteine haben, sondern unterschiedliche Allergene im Speichel der Gnitzen bei verschiedenen Pferden das SE auslösen.

1.1.3 Pathogenese

Der Pathomechanismus beim SE beruht primär auf einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I). Dies wird durch die Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchung von Marti et al. (1999) verdeutlicht, die eine Freisetzung von Sulfidoleukotrienen (sLT) aus equinen Leukozyten des peripheren Blutes zeigten. Bei dem Experiment wurden die aus dem Blut gesunder und an SE erkrankter Pferde isolierten Leukozyten mit dem Zytokin Concanavalin A sowie mit unterschiedlichen Extrakten aus Insekten und einem Gemisch aus Gräserpollen inkubiert. Die Leukozyten der an SE erkrankten Pferde produzierten signifikant mehr sLT als die von gesunden Pferden. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten sLT-Produktion und der gesteigerten Histaminfreisetzung nachgewiesen werden. Untersuchungen zu histopathologischen Hautveränderungen von Pferden mit SE von Kurotaki et al. (1994) zeigen eine deutliche Erhöhung von Mastzellen und basophilen Granulozyten, was ebenfalls zum Bild der Typ-I-Allergie passt. Weiterhin zeigten Anderson et al. (1991) und Kurotaki et al. (2002) eine zusätzliche Beteiligung einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV). Kurotaki et al. (2002) zeigten diese in weiteren histopathologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Langerhans'schen Zellen (LZ). Dabei wurden die LZ im Epithel der Haarfollikel und in den intradermalen Schweißdrüsenausführungsgängen bei erkrankten Pferden betrachtet und es konnten charakteristische Merkmale für Phasen der Aufnahme, Erkennung und Präsentation der Antigene durch die LZ gefunden werden.

1.1.4 Symptome

Das Sommer ekzem ist eine allergische Reaktion und ist dem atopischen Ekzem beim Menschen sehr ähnlich. Es handelt sich hierbei um keine lebensbedrohliche Erkrankung, doch die Beschwerden durch die starken Symptome, können zu einer Minderung des Gebrauchswertes der Pferde (um bis zu 50%) führen. Bei besonders schweren Formen von SE mit starkem Pruritus und hochgradigen Sekundärinfektionen kann es sogar zu einer Euthanasie des Tieres kommen (Hunsinger, 2002). Die Symptome sind anfänglich Papeln und ein schuppiges Ekzem im Bereich der Mähne (Abb. 2), der Rückenlinie und des Schweifes (Abb. 3), aber auch andere Regionen, wie die Ohren, Brustkorb oder ventrale Mittellinie können betroffen sein.



Abb. 2/3: Symptome des SE
Schuppiges Ekzem im Bereich von Mähne (links) und Schweif (rechts) mit Hautläsionen bei einem Criollo mit SE, der aus Argentinien eingeführt wurde (Fotos: S.Kühnel)

Das Sommerexzem geht mit hochgradigem Pruritus bis hin zur Automutilation, Alopezie, Hautläsionen und starker Unruhe des Pferdes einher (Wagner et al. 2006). Des Weiteren kommt es durch das Scheuern der Haut zu Exkorationen, exsudativen Erosionen und es entstehen Lichenifikationen (Dietz, Huskamp, 2006). Auf die defekten Hautstellen können sich Bakterien oder Pilze setzen und zu Sekundärinfektionen führen. Meist verschlimmern sich die Symptome von Jahr zu Jahr und die allergenfreie Zeit in den Wintermonaten reicht nicht mehr für die Regeneration der Haut aus. In solchen Fällen entwickeln sich ganzjährige Dermatosen (Hunsinger, 2002).

1.2 Allergietypen

Beim SE handelt es sich um eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I) mit zusätzlicher Beteiligung vom verzögerten Typ (Typ IV) (Anderson et al. 1991, Kurotaki et al. 2002). Die Einteilung der vier Allergietypen für die Humanmedizin erfolgte erstmals im Jahr 1963 von dem britischen Pathologen Robin R. A. Coombs und seinem Kollegen Philip G. Gell und wurden inzwischen für die allergischen Reaktionen in der Veterinärmedizin übernommen.

Bei der Typ I Reaktion handelt es sich um eine Allergische Reaktion vom Soforttyp. Sie ist IgE vermittelt und führt nach einem vorausgegangenen sensibilisierenden Erstkontakt mit dem Allergen durch Zweitkontakt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine) aus den Mastzellen und damit zur Ausbildung des klinischen Bildes der Allergie. Es kommt nach Allergenkontakt sehr schnell (wenige Minuten oder bis zu 40 Minuten) zum Auftreten der Symptome. Beim Pferd gehören u.a. das Sommerexzem, die rezidivierende Atemwegsobstruktion (RAO), der anaphylaktische Schock und die Urtikaria

zur allergischen Reaktion vom Soforttyp. Der Mechanismus für die Typ I Reaktion wird unter 1.2.1 am Beispiel für das SE verdeutlicht.

Die Typ II Reaktion ist antikörpervermittelt und wird auch als zytotoxischer Typ bezeichnet. Es kommt zur Bildung von IgM- und IgG-Antikörpern, die an die Antigene auf den Zellen und Geweben binden. Ihr F_c -Teil führt zur Aktivierung der Komplementkaskade und damit zur Zellyse von Zielzellen und Geweben oder zur Überstimulierung der Zelle. Ausgelöst wird dieser Allergie-Typ beispielsweise durch Medikamente.

Bei der Typ III Reaktion spricht man auch vom Immunkomplextyp. Hierbei entstehen durch die überschießende Antikörperbildung auf lösliche Allergene unlösliche Immunkomplexe. Die Immunkomplexe lagern sich an den Gefäßwänden und im Gewebe ab und lösen dort durch die Aktivierung von Granulozyten und Mastzellen eine lokale oder systemische Entzündungsreaktion aus. Hervorgerufen werden kann eine solche allergische Reaktion z.B. durch Pilzsporen oder durch bestimmte Viren.

Die Typ IV Reaktion ist eine verzögerte Reaktion vom Spättyp. Sie ist zellvermittelt und tritt nach ein bis drei Tagen auf. Es kommt zu einer Aktivierung von u.a. T-Lymphozyten (T_h1 und T_h2), Makrophagen, Monozyten und basophile Granulozyten. Ein typisches Beispiel für diesen Reaktionstyp ist der Tuberkulin-Test. Bei diesem diagnostischen Test werden mit Hilfe von Tuberkulin (gewonnen aus Mykobakterienkulturen) antigenspezifische T-Gedächtniszellen reaktiviert, die zu einem früheren Zeitpunkt bei einer Immunreaktion gegen die in den Makrophagen eingeschlossenen Mykobakterien generiert wurden. Bei Typ IV Reaktionen lösen diese T-Gedächtniszellen also eine infiltrative Entzündung aus, wenn es zu einem erneuten Kontakt mit dem Allergen kommt. Auch Kontaktallergien (Klein, 1991; Janeway et al. 1997; Roitt et al. 1987) und das SE (Anderson et al. 1991) gehören zu den Typ IV Allergien, wobei das Sommereczem hauptsächlich vom Soforttyp ist.

1.2.1 Typ I Mechanismus des SE

Das SE beruht auf einer Typ I Überempfindlichkeitsreaktion, diese ist IgE vermittelt und führt beim Zweitkontakt zur Freisetzung der Entzündungsmediatoren aus den Mastzellen nach vorangegangenem sensibilisierendem Erstkontakt mit dem Allergen. IgE ist ein Antikörper, er besitzt eine natürliche Abwehrfunktion gegen Parasiten und vermittelt die allergische Reaktion. Bettina Wagner (2006) hat mit der Durchführung von zwei Experimenten den ersten direkten Beweis geliefert, dass IgE die klassische Typ-I-Allergie in Pferden vermittelt und damit die Hauptrolle in der Pathogenese des SE spielt. Auch hat sie gezeigt, dass IgGs an die Mastzellen der Haut binden können und somit an den klinischen Symptomen der Allergie beteiligt sein könnten. Das IgE bindet mit einer hohen Affinität an den IgE-Rezeptor ($Fc_\epsilon RI$) auf den Mastzellen und spielt damit die Schlüsselrolle bei der allergischen Entzündungsreaktion. Durch den Erstkontakt mit dem Allergen kommt es zur IgE-

Sensibilisierung der Mastzellen, dadurch führt jeder folgende Kontakt mit dem Allergen zur Freigabe von Entzündungsmediatoren. Bei den Entzündungsmediatoren handelt es sich u.a. um das Histamin, das eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen und für das Immunsystem spielt. Des Weiteren wird die Synthese und Freisetzung von Leukotrienen, Prostaglandinen und Zytokinen induziert, die alle zusammen die Entzündungsreaktion einleiten und die Produktion der allergiespezifischen Antikörper aufrechterhalten (Wagner et al. 2006). Die Abbildung 4 zeigt den typischen Ablauf der Sensibilisierung mit dem Antigen bei Erstkontakt (gekennzeichnet mit 1.) und bei Zweitkontakt (gekennzeichnet mit 2.) einer Typ-I-Allergie beim SE. Das Allergen gelangt durch den Speichel der *Culicoides spp.* mit dem Saugakt in das Pferd. Es wird beim ersten Kontakt von den Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, dadurch können diese mit Hilfe des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes II (engl. Major histocompatibility complex II; MHC-II) eine Verbindung mit den T-Helferzellen (Th2-Zellen) eingehen. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen (z.B. Interleukin- (IL-) 4, 5, 6, 10, 13, Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF) 13, 13b), die zur Aktivierung und Reifung der B-Zellen (siehe 1.2) führen. Die B-Zellen differenzieren sich zu Plasmazellen, die dann für die Produktion und Sezernierung der Antikörper zuständig sind. Die Antikörper (IgE) binden auf Grund der hohen Affinität des IgE-Rezeptors (Fc_εRI) an die Mastzellen. Beim Zweitkontakt mit dem Allergen, kommt es bereits nach kürzester Zeit (Sekunden bis Minuten) zur allergischen Reaktion. Dies liegt daran, dass das Allergen direkt an die spezifischen Antikörper auf der Oberfläche der Mastzellen bindet und es damit zur Ausschüttung der Entzündungsmediatoren (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine) kommt, die für die Ausbildung des klinischen Bildes des SE verantwortlich sind.

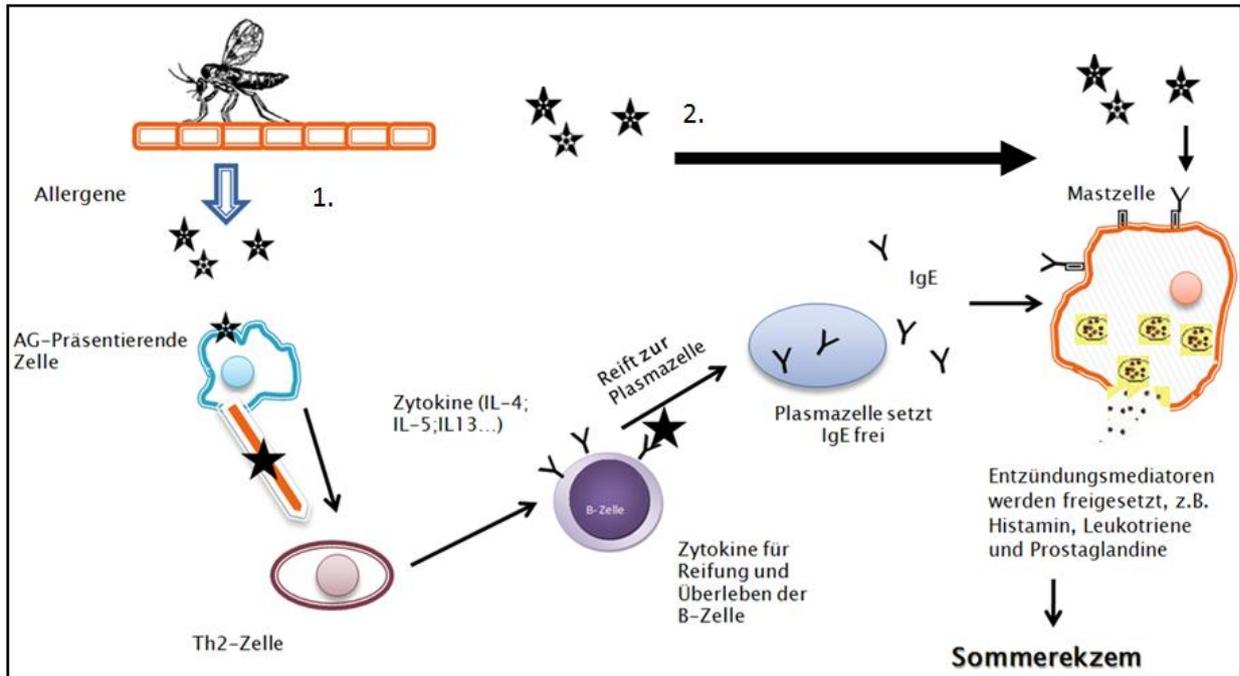


Abb. 4: Typ I Mechanismus beim Sommerekzem

Mechanismen zum Erstkontakt (1.): Das Allergen gelangt über den Speichel des haemophagen Insekts in das Pferd, wird von den APCs aufgenommen und mit Hilfe des MHC II wird eine Verbindung zur Th2-Zelle eingegangen, wodurch es zur Freisetzung von Zytokinen kommt, die zur Aktivierung der B-Zellen und zur Reifung zu Plasmazellen führen. Die Plasmazellen produzieren die Antikörper, die sich an die Mastzelle binden. Beim Zweitkontakt (2.) bindet das Allergen direkt an den spezifischen Antikörper auf der Oberfläche der Mastzelle, es kommt zur Ausschüttung der Entzündungsmediatoren und führt zur allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ-I-Allergie) beim SE.

1.2.2 Typ IV Mechanismus des Sommerekzems

Anderson et al. (1991) wiesen eine zusätzliche Reaktion vom Spättyp nach, indem sie den Pferden intrakutan ein Extrakt aus *Culicoides obsoletus* inokulierten und dadurch Effloreszenzen der Haut erzeugten, die nach 24 Stunden ihr Maximum erreichten. Diese späte Reaktion wird nicht von den Antikörpern ausgelöst, sondern ist auf die Reaktion von T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und basophilen Granulozyten zurückzuführen. Wie auch bei der Typ I Reaktion kommt es beim Erstkontakt zu einer Sensibilisierung der Allergen-/Antigen-spezifischen T-Lymphozyten und es bilden sich Gedächtnis-T-Zellen, die die einmal gelernte Immunreaktion speichern. Kurotaki et al. (1994) untersuchten Hautbiopsien bei Pferden mit SE und konnte dabei eine erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten und Langerhans'scher Zellen in den Proben feststellen, die aus der erkrankten Epidermis entnommen wurden. Dies spricht dafür, dass beim SE die epidermalen LZ die Antigene aufnehmen, erkennen und präsentieren, was Kurotaki et al. (2002) beweisen konnte. Es werden die in die Epidermis penetrierten und immunisierten Allergene von den APC's (besonders den LZ) aufgenommen, abgebaut und auf der Oberfläche exprimiert. Anschließend wandern die LZ in die regionalen Lymphknoten um dort zu dendritischen

Zellen zu reifen, die dann ruhende T-Lymphozyten stimulieren können (Schuler, 1990). In den Lymphknoten werden selektiv Antigen-spezifische T-Zellen aktiviert, diese gelangen in die Blutzirkulation und können bei einer erneuten Allergenapplikation in die Haut in das Epidermisgewebe einwandern. Dort kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, die zur Anreicherung und Aktivierung von basophilen Granulozyten und Makrophagen führen. Es entsteht eine starke Schädigung des umliegenden Gewebes, die zum klinischen Erscheinungsbild der Haut beim SE des Pferdes beiträgt. Ein gewisser Teil der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten persistiert als Gedächtniszellen (T-Memory Lymphozyten) des Immunsystems im lymphatischen Gewebe, wie z.B. den Lymphknoten und der Milz (Meurer et al. 2007). Beim Zweitkontakt mit dem Allergen/Antigen kommt es zu einer schnellen Aktivierung und Vermehrung der Zellen, die gegen das auslösende Antigen gerichtet sind, es kann zu einer heftigen allergischen Reaktion kommen. Die Symptome treten dann allerdings im Vergleich zur Typ I-Reaktion zeitlich verzögert, etwa 24 bis 72 Stunden, nach Allergenkontakt auf.

1.3 Diagnostik des SE

Für die Diagnosestellung des SE bedarf es einer ausführlichen Anamnese. Dazu gehört die Prüfung des saisonalen Auftretens der typischen Symptome, der Lokalisation der Hautveränderungen, der Haltungsbedingungen der betroffenen Pferde und der Fütterung. Weiterhin muss eine familiäre Disposition in Betracht gezogen werden, da eine Heritabilität (h^2) von $h^2 = 0,36 \pm 0,08$ (Lange, 2004) bestimmt wurde, spielt die Möglichkeit der Vererbung des SE eine entscheidende Rolle. Zur Absicherung der Diagnose können verschiedene intradermale oder serologische Test durchgeführt werden. Zur Auswahl stehen der Intrakutantest (IKT), der Nachweis von IgE und funktionelle *In-vitro*-Tests, wie der Histamine Release Test (HRT) und der Cellular Antigen Stimulation Test (CAST).

1.3.1 Intrakutantest

Der Intrakutantest wird verwendet, um eine Sensibilisierung gegenüber einem Allergen nachzuweisen. Hierbei wird die funktionelle Reaktionslage der Typ I-Effektorzellen der Haut (die Hautmastzellen) untersucht und nicht die allergische Erkrankung diagnostiziert (Hampel et al. 2008). Dafür werden definierte Testallergene, die von guter Qualität sind und eine hohe Reinheit und Spezifität besitzen, in einer bestimmten Konzentration subkutan in die vorbereitete Haut appliziert. Als Positivkontrolle wird Histamin und als Negativkontrolle wird Kochsalzlösung verwendet. Die Kontrolle der Haut im Testbereich erfolgt in regelmäßigen Zeitabständen (30 min bis 48 Stunden). Die Beurteilung erfolgt aufgrund der Volumenzunahme einer einzelnen Quaddel im Lauf der Zeit (Hampel et al. 2008). Als deutlich positive Reaktion gelten Quaddeln die einen Durchmesser von über 3,6 mm haben.

Die Bewertung der IKT wird oft kritisch gesehen, da die Verteilung der Mastzellen und deren Histamingehalt an verschiedenen Hautstellen nicht gleichmäßig sind und der Test dadurch schlecht reproduzierbar ist (Hampel et al. 2008). Des Weiteren treten teilweise Kreuzreaktionen und falsch positive Ergebnisse auf, da eine Quaddelbildungsreaktion für das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern (IgE oder IgG) spricht, die aber nicht mit einer klinisch manifestierten Allergie einhergehen müssen (Gehlen et al. 2009). Die Durchführung des IKT ist aufwendig und bedarf viel Erfahrung bei der Auswertung.

1.3.2 Nachweis von IgE

Beim Nachweis vom IgE handelt es sich um einen serologischen Allergietest mit monoklonalen Antikörpern zur Gruppen- und Einzelallergenbestimmung, bei dem der IgE-Titer gegen ein bestimmtes Allergen im Serum bestimmt wird (Wagner et al. 2005). Dafür verwendet wird die ELISA- (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik, wodurch die an der Immunreaktion beteiligten zirkulierenden Immunglobuline im Serum bestimmt werden. So kann freies IgE im Serum nachgewiesen werden, was bei einer Überproduktion von IgE auf eine allergische Reaktion schließen lässt (Wagner 2012). Allerdings müssen diese freien Antikörper nicht zwingend eine Allergie auslösen. Das IgE kommt nur zu einem geringen Anteil frei im Serum vor und besitzt nur eine kurze Halbwertszeit von zwei bis zweieinhalb Tagen (Geiben, 2003). Ein Unterschied im Gesamt-IgE-Spiegel im Serum bei Islandpferden mit und ohne SE konnte nicht festgestellt werden (Wagner et al. 2003). Deshalb bringt dieser Test ein hohes Risiko für falsch positive Ergebnisse mit sich (Gehlen et al. 2009). Aber aufgrund der einfacheren Durchführung im Vergleich zu IKT wird diese diagnostische Methode von vielen Tierärzten bevorzugt.

Eine weitere Methode zum Nachweis von IgE ist die Fc_ϵ -Rezeptor-Technologie, die darauf basiert, dass der Fc_ϵ -Epsilon- R_1 -Rezeptor der Mastzellen mit einer hohen Spezifität und Affinität Serum-IgE bindet. Mit Hilfe einer gentechnologisch hergestellten α -Kette des Mastzellrezeptors als Detektionsreagenz, weißt man die Bindung von IgE nach (Stuke, 2005; Wagner et al. 2005). Auch hier muss die kurze Halbwertszeit des IgE beachtet werden, auf Grund derer bei saisonalen allergischen Reaktionen der Test in der Saison durchgeführt werden muss, da er sonst negativ ausfällt (Wagner 2005). Da ein Nachweis von IgE lediglich Aufschluss über eine Allergen-Sensibilisierung gibt, nicht aber über die Art und Schwere der Symptome, müssen Ergebnisse dieser Tests zum Nachweis von IgE immer im Zusammenhang mit der Anamnese und den Vorbefunden interpretiert werden.

1.3.3 Funktionelle *In-vitro*-Tests

Die funktionellen *In-vitro*-Tests basieren auf der Untersuchung der Zellen im Blut, die für die Typ-I-Allergie verantwortlich sind, also die Mastzellen und basophilen Granulozyten. Mit

diesen Tests ist es möglich saisonal unabhängig und zuverlässig zu bestimmen, welche Allergene eine allergische Reaktion beim Pferd auslösen und wie stark die Reaktionsbereitschaft ist. Für das SE bedeutet dies, dass mit Hilfe der eingesetzten spezifischen Allergene festgestellt werden kann welche Insekten an der Allergie beteiligt sind und ob evtl. mehrere Allergene die Ursache sind. Dafür wird das Pferdeblut gereinigt, die eosinophilen Granulozyten werden isoliert und anschließend mit den zu testenden Allergenen inkubiert. Durch die Bindung der Allergene an die allergenspezifischen Antikörper auf der Oberfläche der Zellmembran kommt es zur Freisetzung von Mediatoren (Histamin, Sulfidoleukotriene), die sich qualitativ und quantitativ beurteilen lassen.

Zu den funktionellen *In-vitro*-Tests gehören der Histamine Release Test und der Cellular Antigen Stimulation Test. Der Vorteil dieser Tests ist die Tatsache, dass sie genau kontrollierbar sind und wiederholbare Versuchskonditionen gewährleisten.

1.3.3.1 Histamine Release Test (HRT)

Der Histamine Release Test, auch funktioneller *in vitro* Test (FIT) genannt, wurde von Kaul (1998) entwickelt. Mit diesem Test wird die Histaminfreisetzung gemessen, die bei der Inkubation des vorbereiteten Blutes mit unterschiedlichen Antigenen entsteht. Hierbei spielen die basophilen Granulozyten eine wichtige Rolle, da ausschließlich sie in der Lage sind kurzfristig (in der Inkubationszeit mit den Antigenen) Histamin freizusetzen. Damit ist es möglich die funktionelle Sensibilisierung der Effektorzellen der Typ I-Allergie zu bestimmen. Das freigesetzte Histamin wird im Radioimmunoassay (RIA) oder im Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen und mit der Gesamthistaminmenge ins Verhältnis gesetzt. Dadurch wird die prozentuale Histaminmenge bestimmt. Aufgrund dieser Relation zu bestimmten Allergenen lässt sich eine Aussage über den qualitativen und quantitativen Sensibilisierungsgrad treffen. Laut Kaul liefert der HRT zuverlässige Ergebnisse.

1.3.3.2 Cellular Antigen Stimulationstest (CAST)

Der Cellular Antigen Stimulationstest ist ebenfalls ein *in vitro* Allergietest. Anders als beim HRT wird hierbei mit Hilfe eines ELISA-Tests die gesamte Menge des Entzündungsmediators Sulfidoleukotrien bestimmt, der bei der Inkubation des Antigens mit den basophilen Granulozyten neu synthetisiert und freigesetzt wird. Getestet werden Antigene von verschiedenen Insekten, wie den *Culicoides* (Gnizen), *Simulium* (Kriebelmücken), *Culex* (Stechmücken) und *Tabanus* (Bremsen). Für die Allergenspezifische Immuntherapie (ASIT, siehe 1.4.3) ist die Durchführung dieses CAST unbedingt erforderlich, damit bei einer Hyposensibilisierung das richtige Allergen zum Einsatz kommt.

1.4 Therapie des Sommerekzems

Bisher gibt es für das SE keine Heilung. Existierende Therapien bewirken eine Reduzierung der klinischen Symptome durch Verminderung der Allergenexposition, die Allergie-Symptom-Behandlung. Andere Behandlungsversuche sind die Hypo- oder Desensibilisierung sowie die Therapie mit homöopathischen Komplex-Präparaten in Verbindung mit Eigenblut. Manchmal können mit einer Behandlung individuelle Einzelerfolge erzielt werden, allerdings gibt es für das SE keine einheitliche Behandlung und für erfolgte Behandlungen keine Erfolgsgarantie.

1.4.1 Verminderung der Allergenexposition

Da das SE durch blutsaugende Insekten ausgelöst wird, versucht man diesen auslösenden Faktor zu vermeiden bzw. wenigstens zu minimieren. Zur Verminderung der Allergenexposition können Ekzemerdecken verwendet werden. Manche Pferde akzeptieren diese jedoch nicht und es besteht eine gewisse Gefahr des Hängenbleibens z.B. an Zäunen oder Gattern. Eine andere Art zur Vermeidung der Insektenstiche sind verschiedene Insektenrepellentien, die in der Wirksamkeit und Wirkdauer sehr verschieden sind. Die Haltungsbedingungen von Pferden mit SE kann man optimieren, indem die Ställe sauber gehalten und die Stalleingänge und Fenster möglichst klein konstruiert, geschlossen oder mit Gazen versehen werden. Auch wenn die Ställe nicht in unmittelbarer Nähe von Gewässern, Kühen und Schafen angelegt sind, wird das quantitative Vorkommen von *Culicoides spp.* mit zunehmender Distanz reduziert (Barnard, 1997). Schließlich sollte auch der Weidegang der Pferde zur Prävention außerhalb der Flugzeiten der Insekten ausgeführt werden um die Symptomatik des SEs möglichst gering zu halten.

1.4.2 Symptomatische Behandlung

Bei der symptomatischen Behandlung stehen die Reduzierung des Juckreizes und die lokale Wundbehandlung im Vordergrund. Der Einsatz von Kortikosteroiden oder Antihistaminika bewirken eine Suppression der Immunantwort und damit eine schnelle Linderung der Symptome. Folglich wird ebenfalls die starke Eingentraumatisierung der Pferde vermieden (Dietz, Huskamp, 2006). Allerdings ist diese Therapie nicht als Langzeittherapie geeignet, da Nebenwirkungen, wie Hufrehe, erhöhtes Infektionsrisiko durch Immunsuppression, Magen-Darm-Ulzeration, verzögerte Wundheilung u.v.m. auftreten können (Löscher et al. 2010). Zur Vermeidung von Sekundärinfektionen der Haut mit Hautpilzen oder zur Behandlung dieser, kann das Vakzin Insol®/Dermaphyton angewendet werden, wobei Bruennlein (2001) bei ihren Untersuchungen zum SE keinen dauerhaften und zuverlässigen Einfluss des Vazins auf die *Culicoides*-spezifische Sensibilisierung nachweisen konnte. Auch für die Therapien mit Ökozon und Allergostop®, die häufig als alternative Therapien verwendet werden, konnte sie keinen zuverlässigen Erfolg gegen die Sensibilisierung nachweisen. Geiben (2003)

untersuchte den Einfluss des Immunmodulators BaypamunN® auf das SE und konnte in ihrer Studie keine immunmodulatorischen Effekte feststellen.

1.4.3 Allergen-spezifische Immuntherapie (ASIT)

Die Allergen-spezifische Immuntherapie oder spezifische Immuntherapie (SIT) wird auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt. Dabei handelt es sich um eine schrittweise Gewöhnung des Organismus an steigende Allergenkonzentrationen, um die allergische Überreaktion des Immunsystems zu vermindern. Die Wirkungsweise der ASIT ist komplex, es werden zahlreiche immunologische Vorgänge induziert. Die gängigste Theorie zur Wirkungsweise ist laut Regina Wagner (2005) die Modulation der T-Zellfunktion des Immunsystems zur Bildung von antigenspezifischen Th1-Zellen, die Interferon- γ produzieren und sowohl die IgE-Bildung, als auch die Th2-Zell-Entwicklung hemmen. Bei einem guten Ansprechen der Therapie ist eine lebenslange Anwendung der ASIT empfohlen, da es nach Absetzen der Therapie häufig innerhalb von 1 - 2 Jahren zu Rezidiven kommen kann. Hunsinger (2002) beschreibt die ASIT als weitestgehend nebenwirkungsfrei, da eine Inzidenz einer anaphylaktischen Reaktion bei unter 1 % der behandelten Pferde liegt. Die ASIT sollte so allergenspezifisch wie möglich erfolgen, dafür ist eine genaue Diagnostik mit einer guten Identifizierung des auslösenden Allergens unerlässlich (CAST 1.3.3.2). Für den Therapieerfolg spielt die Krankheitsdauer eine entscheidende Rolle, denn bei frühzeitiger Diagnosestellung und schnellem Therapiebeginn (max. 1 bis 2 Jahre nach erstmaligem Auftreten) sprachen zwei Drittel der behandelten Tiere mit deutlicher Besserung der klinischen Symptome auf die ASIT an. Bei Erkrankungen, die bereits 3 Jahre oder länger bestanden, konnte eine ASIT die klinische Symptomatik nur geringfügig oder gar nicht beeinflussen (Wagner 2005). Der allgemeine Therapieerfolg einer ASIT beim SE schwankt in der Literatur zwischen 16% (Barbet et al. 1990) und 60% (Anderson et al. 1996), wobei White (2005) sogar von 60-70% spricht.

1.4.4 Homöopathische Komplexbehandlung in Verbindung mit Eigenblut

Steidle konnte 2009 in ihrer Studie zur Prophylaxe und Therapie mit homöopathischen Komplex-Präparaten in Verbindung mit Eigenblut beim Sommer ekzem eine Verbesserung der klinischen Symptomatik, sowie eine desensibilisierungsähnliche Entwicklung belegen. Für die Durchführung der Prophylaxephase wurden Engystol® ad us. vet., Carduus und Coenzyme comp. in Kombination mit Eigenblut verwendet. Damit konnte der Ausbruch des Ekzems zwar nicht signifikant verzögert werden, allerdings wurde der Gesamthistamingehalt der basophilen Granulozyten stabilisiert und die Reaktion auf das Allergen mäßigend beeinflusst. Die Therapie bei Ausbruch des SE erfolgte mit Traumeel und Eigenblut in Kombination mit Carduus und Coenzyme comp., wodurch der Juckreiz und der Dermatitis-

Index (Tab. 1) bereits nach einer Woche reduziert werden konnte. Der Dermatitis-Index ist eine Einteilung der Art und Fläche der Veränderungen der Haut beim SE die von Steidle (2009) vorgenommen wurde und mit der sie den klinischen Krankheitsverlauf erfassen konnte.

Tab. 1: Dermatitis Index

Index zur Klassifizierung des Schweregrades des Sommerexzems in Bezug auf das Ausmaß der betroffenen Körperoberfläche nach Steidle (2009).

| Grad | Art der Veränderungen | betr. Fläche |
|-------------|---|---------------------------|
| Grad 0 | Keine Hautveränderungen sichtbar, Fell glatt und ohne Veränderungen | - |
| Grad 1 | Erste Verdickungen in der Haut, erste Scheuerstellen im Fell | ~ |
| Grad 2 | Erste oberflächliche offene Stellen in der Haut | bis zu 5 cm ² |
| Grad 3 | Erste oberflächliche offene Stellen in der Haut | bis zu 10 cm ² |
| Grad 4 | Oberflächliche offene Stellen, leicht nässend | bis zu 15 cm ² |
| Grad 5 | Oberflächliche offene Stellen, leicht nässend | bis zu 20 cm ² |
| Grad 6 | Tiefgehend offene Stellen, deutlich nässend und blutig gescheuert | bis zu 10 cm ² |
| Grad 7 | Tiefgehend offene Stellen, deutlich nässend und blutig gescheuert | bis zu 15 cm ² |
| Grad 8 | Tiefgehend offene Stellen, deutlich nässend und blutig gescheuert | bis zu 20 cm ² |
| Grad 9 | Tiefgehend offene Stellen, nässend und blutig gescheuert | bis zu 25 cm ² |
| Grad 10 | Tiefgehend offene Stellen, nässend und blutig gescheuert | bis zu 50 cm ² |

Klassifizierung in 10 Grade; - = nicht vorhanden; ~ = beliebig

Engbergs et al. (2005) zeigten, dass das homöopathischen Komplex-Präparat Engystol® ad us. vet. in der Lage ist, die für die allergische Reaktion typische Th₂-Zell-Antwort hin zur Th₁-Immunantwort umzuwandeln, wodurch die Anregung der B-Zellen reduziert wird. Für Taumeel konnte Engbergs (1998) eine lymphozytenaktivierende Wirkung und eine dosisabhängige Stimulation der Phagozytoseaktivität von Granulozyten nachweisen. Die Eigenbluttherapie wird von Krebs (1999) als natürliche Heilbestrebung des Körpers beschrieben, mit den Eigenschaften den Organismus anzuregen. Es erfolgt hierbei eine Stimulierung der unspezifischen und der spezifischen Abwehr und damit ein Anstieg der Monozyten im Blut. Demnach konnten mit diesen Behandlungen jeweils positive Effekte im Bezug auf allergische Reaktionen erzielt werden.

1.5 Kontrolle der B-Zell-Aktivität

1.5.1 B- Lymphozyten

Die B-Lymphozyten (auch B-Zellen genannt) gehören, genau wie die T-Lymphozyten, zum adaptiven Immunsystem. Sie befinden sich hauptsächlich in bestimmten Strukturen des peripheren lymphatischen Gewebes (Meurer et al. 2007) und dienen der humoralen Immunantwort durch das Ausschütten von Antikörpern. Die B-Zellen werden im Knochenmark aus haematopoetischen Stammzellen gebildet. Dabei durchlaufen sie als unreife B-Zellen die Stadien Pro-B-Zelle und Prä-B-Zelle bevor sie in der Peripherie zu reifen B-Zellen werden. Die einzelnen Reifungsstufen der B-Zelle lassen sich durch verschiedene Oberflächenmarker (cluster of differentiation, CD) erkennen. Auf heranreifenden B-Zellen findet man die Marker CD19 und CD20, der Marker CD27 charakterisiert ausgereifte Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen exprimieren CD138 (Faltermeier, 2010). Nach Antigen-Kontakt und klonaler Selektion in den peripheren Keimzentren differenzieren die reifen B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder werden zu Gedächtnis-B-Zellen (Hiepe et al. 2005). Durch den Antigen-Kontakt kommt es im Rahmen der Immunantwort zur Ausschüttung verschiedenster Zytokine. Diese regulieren u.a. das Wachstum, die Differenzierung und die Proliferation von Zellen des Immunsystems. Zu den Hauptgruppen der Zytokine gehören Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Von besonderem Interesse sind der B-Zell-Überlebensfaktor BAFF (B cell activating factor) und dessen verwandtes Protein APRIL (a proliferation inducing ligand), die zur Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF) gehören (Roll, Tony, 2009). Diese Liganden binden u.a. an Rezeptoren der B-Zell-Oberfläche, wodurch es zur Zellteilung und zur Differenzierung reifer B-Zellen kommt. Dabei werden aus den aktivierten naiven B-Zellen Plasmablasten, die sich zu Plasmazellen ausdifferenzieren können, dabei entstehen zum Einen antikörpersezernierende Plasmazellen und zum Anderen langlebige Plasmazellen, die eine Rolle im immunologischen Gedächtnis spielen (Hoyer et al. 2008) .

1.5.2 B-Zell aktivierende Faktoren

Zu den B-Zell aktivierenden Faktoren gehören BAFF und APRIL. Beide sind Liganden, die die B-Zell-Aktivierung (Laabi et al. 2000), das Überleben der B-Zellen (Batten et al. 2000; Thompson et al. 2000) und deren Entwicklung (Gross et al. 2000; Mackay et al. 1999) regulieren. Sie fördern die Generierung von Plasmablasten und Plasmazellen, wobei bisher nicht geklärt ist, welcher der beiden Liganden die entscheidende Rolle für das Überleben von Plasmazellen spielt (Benson et al. 2008; Dillon et al. 2006).

1.5.3 BAFF

BAFF ist ein Glykoprotein. Es existiert als aktive lösliche und als membrangebundene Form (Bodmer et al. 2002) und besteht beim Hauspferd aus 291 Aminosäuren. Als Synonyme für BAFF sind BLyS (B Lymphocyte Stimulator), TALL-1 (TNF- and ApoL related leukocyte expressed ligand 1), THANK (TNF homolog activates apoptosis, nuclear factor-B und c-Jun NH2 terminal kinase), zTNF4 (z-tumor necrosis factor 4) und TNFSF 13b (TNF-Superfamily Member 13b) in der Literatur zu finden (Morre et al. 1999; Shu et al. 1999; Mukhopadhyay et al. 1999; Gross et al. 2000). Die Expression von BAFF findet u.a. in den Stromazellen der Milz und der Lymphknoten sowie in den peripheren myeloiden Zellen, wie den Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen und zum geringeren Teil auch von aktivierten T-Zellen und Mastzellen statt (Morre et al. 1999; Hase et al. 2004). Die konstitutive Produktion von BAFF durch die Stromazellen der lymphoiden Organe bestimmt die Größe des peripheren B-Zell-Pools und reguliert somit die B-Zell-Homöostase, während die induzierte BAFF-Sekretion den entscheidenden Faktor bei der Aufrechterhaltung des B-Zell-Überlebens darstellt (Schneider 2005; Sutherland et al. 2006). BAFF bindet an die Rezeptoren TACI (transmembrane activator and calcium modulator ligand interaction), BAFF R (B cell activating factor- receptor) und BCMA (B cell maturation antigen). Allerdings ist die Bindungsaffinität zum BCMA Rezeptor geringer (Masters et al. 2000; Yan et al. 2000; Thompson et al. 2000), wie auch der dünnere Pfeil vom BAFF in Abbildung 5 zeigt. BAFF bewirkt durch die Bindung an TACI einen Ig-Klassenwechsel und es wird eine T-Zell-unabhängige Immunantwort vermittelt (Faltermeier, 2010). Studien haben gezeigt, dass bei einer Hemmung von BAFF die Anzahl der B-Zellen und die Antikörperproduktion reduziert wurden (Yan et al. 2000). Bei kompletter Eliminierung von BAFF konnte ein über 90%iger Verlust der Reifen peripheren B-Zellen nachgewiesen werden (Bossen et al. 2006).

1.5.4 APRIL

APRIL ist ebenfalls ein Glykoprotein, das aber ausschließlich in gelöster Form vorliegt (Nagel 2009) und beim Hauspferd aus 251 Aminosäuren besteht. Ein Synonym für APRIL ist TNFSF 13A (TNF-Superfamily Member 13A). Exprimiert wird APRIL vor allem von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Osteoklasten und Tumorzellen, wobei besonders in verschiedenen malignen Erkrankungen und einigen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Lupus Erythematodes eine Überexpression von APRIL beschrieben wurde (Dillon et al. 2006; Stohl et al. 2006). Untersuchungen im Mausmodell haben gezeigt, dass die Hemmung von BAFF und APRIL im Gegensatz zur alleinigen Inhibition von BAFF das Überleben und die Migration von neugebildeten Plasmazellen ins Knochenmark verhindern. Das zeigt die wichtige Funktion von APRIL während der

Immunantwort (Ingold et al. 2005). Die Blockade von BAFF und APRIL führt zur Eliminierung langlebiger Plasmazellen (Benson et al. 2008).

1.5.5 Plasmazellen

Die Plasmazellen haben beim Sommereczem eine bedeutende Rolle. Sie produzieren und sezernieren die Antikörper, die sich beim Erstkontakt mit dem Allergen an die Mastzellen binden und beim Allergen-Zweitkontakt zur Ausschüttung der Entzündungsmediatoren und damit zur klinischen Ausbildung des SE führen (Abb. 4). Plasmazellen sind das letzte Stadium der Differenzierung der B-Lymphozyten. Sie gehören zum adaptiven Immunsystem und sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sowohl die Plasmazellen als auch deren Vorläufer, die Plasmablasten, sind in der Lage Antikörper zu sezernieren, wobei die Plasmablasten zudem noch die Teilungsfähigkeit besitzen. Ein Teil der Plasmazellen, die aus einer aktuellen Immunreaktion hervorgegangen sind, werden zu langlebigen Plasmazellen und können unter bestimmten Bedingungen in Nischen im Knochenmark und entzündeten Geweben für Monate bis Jahrzehnte überleben und in diesem Zeitraum im Sinne eines humoralen Gedächtnisses kontinuierlich Antikörper sezernieren (Davidson et al. 2001). Die Funktion und das Überleben der langlebigen Plasmazellen ist abhängig vom Empfang verschiedener bereitgestellter Signale (Hoyer et al. 2008; Cassese et al. 2003), mitunter auch von den Zytokinen BAFF und APRIL (Benson et al. 2008). Die langlebigen Plasmazellen sind resistent gegenüber konventionellen Behandlungen (wie z.B. Kortikosteroide oder Antihistaminika) und stellen daher ein wichtiges Therapieziel dar. Dieses könnte darin bestehen die Überlebenssignale in deren Nischen zu stören, wodurch die langlebigen Plasmazellen aus den Überlebens-Nischen heraus wandern. Da die langlebigen Plasmazellen ihre migratorische Kapazität verloren haben, können sie nicht wieder in ihre Nischen zurückwandern und sterben (Moser, 2008).

1.5.6 Mechanismus der Plasmazell-Differenzierung

Die Plasmazell-Differenzierung setzt ein, wenn sich die dafür erforderlichen Zytokine an die Rezeptoren der B-Zellen anlagern. Zytokine die u.a. am Mechanismus der Plasmazell-Differenzierung beteiligt sind, sind BAFF und APRIL, aber auch andere Zytokine wie z.B. IL-21, IL-10, IL-6 spielen hierfür eine Rolle. Bei den Rezeptoren handelt es sich um TACI, BCMA und BAFF R. BCMA und TACI werden auch von Plasmazellen exprimiert, wodurch das Überleben und ihre Migration beeinflusst werden (Roll et al. 2009). Die hierfür wichtigen Zytokine sind BAFF und APRIL. Es handelt sich um zwei miteinander eng verwandte Liganden der TNF Superfamilie. Beide Liganden binden an die Rezeptoren TACI und BCMA, an BAFF R bindet lediglich BAFF. Beide Zytokine bewirken die Reifung und Differenzierung zu Plasmazellen, die für die Antikörperausschüttung verantwortlich sind (Schneider et al.

1999). Zur Unterdrückung dieses Mechanismus ist es erforderlich sowohl BAFF als auch APRIL zu blocken. Die folgende Abbildung (Abb. 5) zeigt den für diese Arbeit bedeutenden Mechanismus für die Plasmazell-Differenzierung.

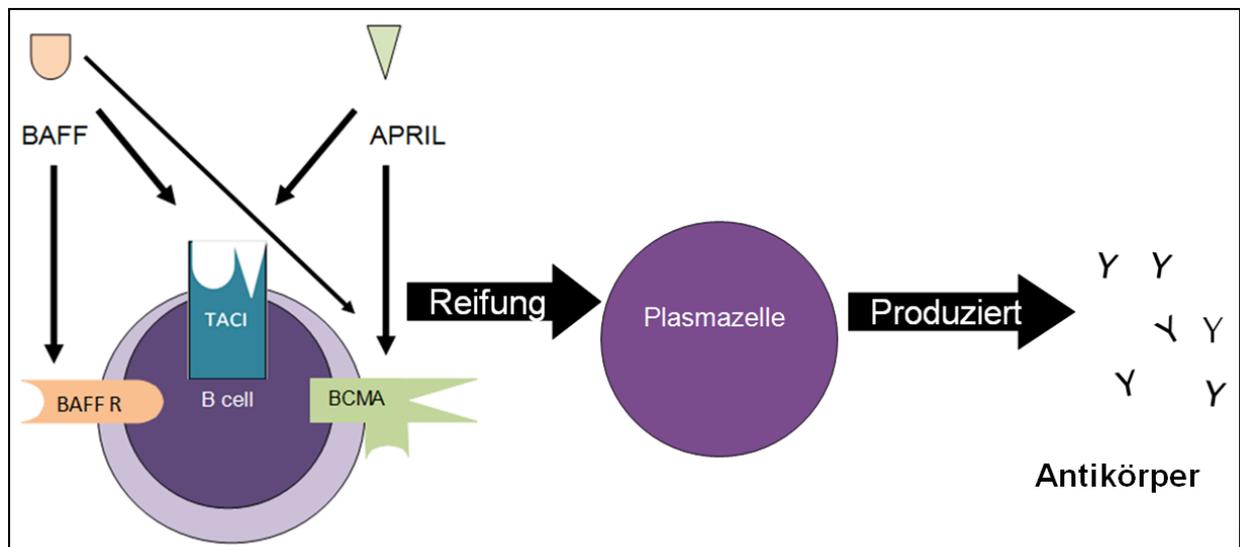


Abb. 5: Mechanismus der Plasmazell-Differenzierung
An die B-Zelle mit den Rezeptoren TACI, BCMA und BAFF R binden die Zytokine BAFF und APRIL, wodurch es zur Plasmazell-Differenzierung kommt, die dann die Antikörper produzieren und sezernieren.

1.6 Atacicept/ TACI-Ig

Atacicept, auch TACI-Ig genannt, ist ein rekombinantes Fusionsprotein. Es besteht aus dem extrazellulären Teil des TACI-Rezeptors, der an das F_C -Fragment von Immunglobulin G gekoppelt wurde. Atacicept enthält den löslichen TACI-Rezeptor, der BAFF und APRIL bindet und damit die Bindung von BAFF und APRIL an die passenden Rezeptoren auf den B-Zellen verhindert (Yaccobi et al. 2008). Somit besteht ein direkter Einfluss auf die B-Zell-Homöostase. Die Zellfunktion und die Überlebensdauer werden reguliert, wodurch das Atacicept zu den B-Zell-gerichteten Therapieansätzen zählt (Missler-Karger, 2008).

1.6.1 Forschungsergebnisse im Mausmodell

Bei Experimenten von Gross et al. (2000) wurden naive Mäuse mit 100 μ g humanem Atacicept (hTACI-Ig) behandelt und die Entwicklung von B-Zellen und verschiedenen anderen Zellen des Immunsystems über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht. Für die absoluten Zellzahlen der B-Zellen in Milz, Thymus, mesenteriale Lymphknoten (mLK) oder Knochenmark (KM) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Behandlung mit hTACI-Ig hatte keinen Effekt auf reife und unreife Thymozyten und reife T-Zellen. Bei den B-Zellen konnte ein mäßiger Abfall der durchschnittlichen prozentualen Anzahl in den mesenterialen Lymphknoten und in der Milz festgestellt werden. Für die neu in

Umlauf kommenden reifen B-Zellen aus dem KM zeigte sich ein deutlicher Abfall unter hTACI-Ig. Des Weiteren wurden Messungen des IgM- Levels im Serum durchgeführt. Diese zeigten eine Reduktion um das 2,3-fache nach 2 Wochen Behandlung. Im Mausmodell mit induzierter rheumatoider Arthritis wurden die Tiere prophylaktisch mit hTACI-Ig behandelt, dadurch konnte der Beginn des Krankheitsausbruchs verzögert und die Schwere der Entzündung gemildert werden. Mäuse die hTACI-Ig erhielten hatten unbeschädigte Gelenkknorpel, sie waren weniger entzündlich und hypertrophiert und es konnten weniger entzündungstypische Zellen im weichen Gewebe um die Gelenke nachgewiesen werden. Solange eine Therapie mit hTACI-Ig fortgeführt wurde, konnte keine Erkrankung beobachtet werden. Lediglich nach Beendigung der Verabreichung von hTACI-Ig wurden Symptome sichtbar.

1.6.2 Therapieansätze in der Humanmedizin

In der Humanmedizin ist das Atacicept für Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA), Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Lupusnephritis (LN), Multipler Sklerose (MS) und maligner B-Zell-Erkrankungen von Bedeutung und befindet sich dafür in den Testphasen. In einer vorklinischen Studie beim Menschen zeigte sich, bei der Anwendung von Atacicept, ein Abfall reifer B-Zellen im peripheren Blut und in lymphatischen Geweben um 70% und einen Abfall der Serumspiegel von Antikörpern und Immunglobulinen, insbesondere vom IgM (Tak et al. 2008). In verschiedenen Studien wurde das Atacicept sowohl systemisch wie auch lokal gut vertragen. Keiner der Patienten entwickelte Antikörper gegen das Atacicept und auch der vorhandene Immunstatus von Tetanus und Diphtherie wurden nicht verändert (Missler-Karger, 2008).

1.6.3 Idee zum Therapieeinsatz in der Pferdemedizin

Beim Pferd soll nun dieser Mechanismus des TACI-Ig genutzt werden um eine wirksame Therapie für das Sommerekzem zu entwickeln. Der Mechanismus des SE (Abb.4) zeigt, dass hier allergen-spezifische Plasmazellen und deren Ausschüttung von Immunglobulinen (Ig) zum klinischen Bild des SE führen. Um nun diesen Mechanismus zu unterbrechen soll das Überleben der Plasmazelle und damit die Produktion von Immunglobulinen gestoppt werden. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit das equine TACI-Ig (eTACI-Ig) hergestellt, das über die Homologie zum humanen TACI-Ig (Gross et al. 2000) hergeleitet wurde.

2. Zielsetzung

Atacicept (TACI-Ig) ist ein in der Humanmedizin entwickeltes Medikament, das gegen Autoimmunkrankheiten wie z.B. rheumatoide Arthritis, Lupus Erythematoses und Multiple Sklerose zum Einsatz kommen soll. Es befindet sich zurzeit noch in der Testphase. Es handelt sich um ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem extrazellulären Teil des TACI- (transmembrane activator and calcium modulator ligand interaction) Rezeptors, der an das F_C-Fragment von Immunglobulin G gekoppelt wurde. TACI ist ein Rezeptor an dem die Zytokine BAFF und APRIL binden. BAFF und APRIL sind wichtige Regulatoren für die Reifung, Funktion und das Überleben von B-Zellen und Plasmazellen. Durch die Bindung dieser Zytokine an das TACI-Ig wird deren Wirkung auf die B- und Plasmazellen neutralisiert, damit wird insbesondere das Überleben von Plasmazellen gestört und es werden keine Immunglobuline produziert. Das verhindert wiederum die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen. Zusätzlich wird die Apoptoserate der B-Zellen erhöht. Mit Hilfe des TACI-Igs sollen immunologische Interaktionen beeinflusst werden, die für die Entstehung und Unterhaltung von Autoimmunkrankheiten und allergischen Reaktionen relevant sind. Atacicept ist bisher noch nicht zugelassen. Die Wirksamkeit des Atacicepts bei Autoimmunkrankheiten wurde bereits im Tiermodell an Mäusen nachgewiesen (Gross et al. 2001; Yaccoby et al. 2008). Derzeit laufen klinische Studien am Patienten. Diese werden auf Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit durchgeführt. Bisher wurde TACI-Ig sowohl systemisch als auch lokal gut vertragen. Bisherige Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung der biologischen Aktivität von Atacicept mit dem Wirkmechanismus.

Das Sommererkzem bei Pferden ist die gleiche Art von allergischer Reaktion vom Typ I (und teilweise Typ IV) mit starken epidemiologischen Folgen. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin ein equines TACI-Ig-Homolog zu entwickeln, was für die Behandlung von Pferden ähnliche Erfolge bieten kann, wie das humane Atacicept in den Tiermodellen und für den Menschen.

Für das Erreichen dieses Ziels mussten folgende Schritte erfolgen:

1. die extrazelluläre Domäne des equinen TACI (eTACI) erstmals klonieren
2. eTACI an einen F_C-Teil eines equinen Immunglobulins binden (eTACI-Ig)
3. Herstellung von rekombinanten eTACI-Ig

Um die Bindung des hergestellten Fusionsproteins an eBAFF und eAPRIL zu überprüfen, musste ein *in vitro* System zur Testung hergestellt werden. Die Grundlage hierfür stellen die equinen Zytokine eBAFF und eAPRIL dar, mit deren Hilfe dann eine Neutralisation durch

eTACI-Ig nachgewiesen werden kann. Für die Herstellung des Testsystems mussten folgende Schritte erfolgen:

1. eBAFF und eAPRIL erstmals klonieren
2. Herstellung von rekombinanten eBAFF und eAPRIL

Der Test erfolgte im Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und soll beweisen, dass das rekombinante equine TACI-Ig an das equine BAFF und APRIL binden kann, also funktional ist.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Gerätenachweis

| | |
|--|--|
| Gilson Pipetman , Limburg-Offheim | Pipetten 10µl; 20µl; 100µl; 200µl; 1000µl |
| IBS Integra Biosciences , Fernwald | Pipetboy acu, Pipettierhilfe für Glaspipetten |
| Eppendorf , Wesseling-Berzdorf | eppendorf centrifuge 5415C Mastercycler personal 5332 |
| Heraeus Instruments , Osterode | Biofuge pico Zentrifuge 3 S-R Heraeus Zentrifuge Inkubator B6 CO ₂ - Inkubator 6000 Hera safe Sicherheitswerkbank |
| Thermo scientific , Karlsruhe | Sorvall RC 5B Plus Zentrifuge |
| Peqlab Biotechnologie , Erlangen | PerfectBlue Gelsystem Mini L Model 401214 Gelelektrophoresekammer und Zubehör (Gelschlitten, Kämme) |
| Sebia GmbH , Fulda | Elektrophorese Einheit GD251D Stromquelle |
| Bio-Rad , München | System Molecular Imager Gel DOC XR Mini Trans-Blot System |
| Biometra , Göttingen | Thermocycler Serial No 2704248 |
| Biostep GmbH , Jahnsdorf | Techne Dri-Block DB- 2A Heizblock |
| Edmund Bühler GmbH , Hechingen | TH 30/ SM 30 Schüttelinkubator |
| IKA-Labortechnik , Staufen | VF-2-Vortexer |
| Vacuubrand , Wertheim | Vacuu Hand Control |
| Kompernaß , Bochum | Bifinett Mikrowelle KH 1106 |
| HBG Henneberg-Sander , Giessen | Improvord Precicolor Zählkammer |
| NanoDrop products , Wilmington | ND 1000 Spektrometer |
| Applied Biosystems , Darmstadt | ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Squenziierer |
| Helmut Hund GmbH , Wetzlar | Wiloverts Standard Mikroskop |
| GFL GmbH , Burgwedel | Wasserbad |
| Amersham Biosciences Europe GmbH , Freiburg | Ultrospec 10 (Messung der OD) |
| BioTek , Vereinigte Staaten | ELx50 Microplate Strip Washer |
| Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach | MACSQuant Analyzer |
| Mitsubishi Electric Europe B.V. , Ratingen | P93 D (Drucker) |
| Heidolph Instruments , Schwabach | Duomax 1030 (Schüttler) |

| | |
|---|--------------|
| IKA-Werke GmbH & Co KG , Staufen | Magnetrührer |
|---|--------------|

3.1.2 Gebrauchsmaterialiennachweis

| | |
|--|---|
| Sarstedt AG & Co , Nümbrecht | Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 13 ml Petrischalen |
| B.Braun Melsungen AG , Melsungen | Einmalskalpelle |
| Kimberly-Clark GmbH , Koblenz-Rheinhafen | Einmalhandschuhe, Einmalwischtücher |
| Eppendorf , Wesseling-Berzdorf | Reagiergefäß mit Sicherheitsverschluss, 2 ml |
| Carl Roth GmbH + Co , Karlsruhe | Einmalküvette aus PMMA |
| Rapidozym GmbH , Berlin | 0,2 ml Thermo Tube |
| Becton Dickinson GmbH , Heidelberg | BD Prescisionslide™ Kanüle 20 G, gelb BD Vacutainer™ Röhrchen aus PET EDTA, 4 ml / 10 ml Vacutainer Holder 50 ml Falcon Blue Max |
| Nerbe plus GmbH , Winsen/Luhe | Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1250 µl |
| Brand GmbH & Co KG , Wertheim | Glaspipetten 5ml; 10ml; 20ml |
| Greiner Bio one GmbH , Essen | Cellstar Tissue Culture Flaks |
| New England Biolabs GmbH , Frankfurt am Main | 1 kb DNA Ladder 100 bp DNA Ladder Tri Dye 2log Ladder Gel Loading Dye Blue (6x) <i>EcoRI</i> 10x Reaction Buffer B0101S <i>EcoRI</i> R0101M <i>Xho I</i> R0146S NEBuffer 3 B 7003S <i>BSA</i> HF I R3535S NEBuffer 4 B 1004S Purified <i>BSA</i> 100x B9001S <i>Xba I</i> R0145S <i>Hind</i> HF III R3104S NEBuffer 2 B7002S <i>EcoRV</i> -HF R3195S Arctic Phosphatase M0289S NEBuffer for Arctic Phosphatase M0289S |

| | |
|---------------------------------|---|
| | <i>Nhe I</i> R3131S <i>BamH I</i> |
| Bio-RAD , München | Precision Plus Protein Dual Color standards |
| GE Healthcare , Freiburg | Chemilumineszenz-Reagenz |

3.1.3 Chemikaliennachweis

| | |
|---|---|
| Invitrogen GmbH , Karlsruhe | Ultra pure, distilled water DNase/RNase free DMEM+GibcoGlutaMax-I (standardisiertes Nährstoffmedium) |
| Biochrom AG , Berlin | FCS (Foetal Calf Serum) X-Gal (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid, fertige Gebrauchslösung) |
| Sigma- Aldrich Chemie GmbH , München | Natriumacetat Kaliumchlorid Natriumhydrogenphosphat Ponceau S solution Select Agar Brefeldin A Xylene Cyanol FF |
| Qiagen GmbH , Hilden | QIAzol Lysis Reagent |
| Promega GmbH , Mannheim | Pfu-DNA Polymerase |
| Carl Roth GmbH + Co , Karlsruhe | Ethidiumbromidlösung Ethanol > 99,5 % Methanol Aceton Isopropanol Natriumchlorid Salzsäure (HCl) Chloroform Milchpulver Ammoniumpersulfat (APS) Bromphenolblau Glycerin >98% |
| PAA Laboratories GmbH , Cölbe | Ficoll, LSM 1077 Lymphayte Trypsin EDTA (1x) |
| Fermentas GmbH , St. Leon-Rot | Dream Taq DNA Polymerase |

| | |
|--|--|
| | 10x Dream Taq Green Buffer <i>BamH</i> 1 ER0051 |
| Bioline GmbH , Luckenwalde | Soc-Medium dNTPs Ampicillin Solution |
| MP Biomedicals , Illkirch | LB-Medium |
| peQLab Biotechnologie GmbH , Erlangen | PeqGOLD Universal Agarose |
| Merck KGaA , Darmstadt | Calciumchlorid |

3.1.4 Verwendete Gemische

| | |
|--|---|
| PBS (Phosphat buffered saline) | 8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ pH auf 7,2 eingestellt, Lösung autoklaviert |
| HBS (HEPES-buffered saline) | 128 mM NaCl 6 mM KCl 1 mM Na ₂ HPO ₄ 5,5 mM Glucose 10 mM Hepes 1 mM CaCl ₂ 0,2% BSA |
| Ery-Lysis Puffer (pH 7,2) | 155 mmol NH ₄ Cl 10 mmol KHCO ₃ 0,1 mmol EDTA |
| TAE- Puffer | 40 mM Tris 0,5 mM Na-Acetat 0,01 mM Na- EDTA |
| 10x RT Puffer | 500 mM Tris-HCl, pH 8.3 750 mM KCl 30 mM MgCl ₂ 50 mM DTT (Dithiothreitol) |
| DNA-Ladungspuffer (Loading-Buffer 6x) | 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol FF 30 % Glycerin |
| NT - Bindungspuffer | 100 mM Tris-Cl, pH 9.5 100 mM NaCl |

| | |
|--|--|
| NT3 Puffer (Waschpuffer) | 100 mM Tris-HCl, pH 8,7 1 mM MgCl ₂ |
| Ligationspuffer (10x) | 300 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 10 mM ATP |
| A1 Puffer (Resuspensionspuffer) | 100 mM Hepes-Tris 1 M KNO ₃ 100 mM Mg(NO ₃) ₂ 1 M Sucrose Wasser (Ultra pure, DNase /RNase free) |
| A2 Puffer (Lysispuffer) | 100 mM MOPS-Tris 1 M KCl 1 M MgCl ₂ Wasser (Ultra pure, DNase /RNase free) |
| A3 Puffer (Neutralisationspuffer) | 3,2 M Kaliumacetat Essigsäure pH 5,5 |
| AW Puffer (Waschpuffer) | Waschpuffer mit Guanidiniumhydrochlorid |
| A4 Puffer (Waschpuffer) | Ethanolischer Waschpuffer |
| RES+RNaseA- Resuspensionspuffer | 100 µg/ml RNase A 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA, pH 8,0 |
| LYS (Lysispuffer) | 100 mM MOPS-Tris 1 M KCl 1 M MgCl ₂ Wasser (Ultra pure, DNase /RNase free) |
| NEU (Neutralisationspuffer) | 3,2 M Kaliumacetat Essigsäure pH 5,5 |
| EQU (Äquilibrierungspuffer) | 750 mM NaCl 50 mM MOPS 15 % Ethanol 0,15 % Triton X-100 |
| WASH (Waschpuffer) | 1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Ethanol |
| ELU (Eluationspuffer) | 1,25 M NaCl |

| | |
|---|--|
| | 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % Ethanol |
| Calcium-Chlorid-Lösung (2,5 M) | 2,5 M Calciumchlorid Wasser (Ultra pure, DNase /RNase free) |
| Puffer P (Präparationspuffer) | 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 500 mM Sucrose 1 mM EDTA |
| Puffer W (Waschpuffer) | 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 1 mM EDTA |
| Puffer E (Elutionspuffer) | 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA (Hydroxy-azophenyl-benzoic acid) |
| SDS-Puffer (sodium dodecyl sulfate) (2x) | 60 mM Tris-HCl, pH 6.8 10 % Glycerol 2 % SDS 5 % β -Mercaptoethanol 1 % Bromphenolblau Wasser (Ultra pure, DNase /RNase free) |
| Beschichtungspuffer | 15 mM Na ₂ CO ₃ 35 mM NaHCO ₃ |
| PBS-T (Waschpuffer ELISA) | 0,05% Tween 20 in PBS |
| Verdünnungspuffer | Waschpuffer ELISA + 1% BSA |

3.1.5 Kommerzielle KITS

| | |
|---------------------------------------|---|
| Applied Biosystems , Darmstadt | TaqMan Reverse Transcription Reagents ABI Prism Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing Kit |
| Invitrogen GmbH , Karlsruhe | TOPO TA Cloning Kit for Sequencing The Original TA Cloning Kit PCR 2.1 Vektor (Ligation) |
| Macherey Nagel GmbH , Düren | NucleoSpin Extract II (Gel-Aufreinigung) NucleoSpin Plasmid I (Plasmidaufreinigung) NucleoBond Xtra Midi Plus |
| Qiagen GmbH , Hilden | miRNeasy Mini Kit |

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| IBA GmbH , Göttingen | Strep-tag Starter Kit 3C |
|-----------------------------|--------------------------|

3.1.6 PC-Programme

| Programm | Anwendung |
|---------------------------|---|
| Adobe Photoshop CS4 | Auswertung der Western-Blot Bilder |
| Chromas Lite Version 2.01 | Auswertung der Sequenzierung |
| FlowJo | Auswertung der Durchflusszytometrie |
| Image Lab 3.0 | Auswertung und Bearbeitung der Agarosegelelektrophorese |
| KyPlot | Datenauswertung und Datendarstellung vom ELISA |
| Primer Express 2 | Entwerfen der Primer |
| Soft Max Pro | Auswertung für den BCA |

3.1.7 Sonstiges

| | |
|--|--|
| Invitrogen GmbH , Karlsruhe | E. coli TOP10 Zellen |
| New England Biolabs GmbH , Frankfurt am Main | BL21 (DE3) 102527H |
| IBA GmbH , Göttingen | pASK-IBA 6 |
| Bettina Wagner | IGHG 1 pc DNA 3.1 IGHG 4 pc DNA 3.1 |
| TIB Molbiol Syntheselabor GmbH , Berlin | Primer |
| Eurofins MWG GmbH , Ebersberg | Sequenzierung |

3.2 Methoden

3.2.1 Klinisch-diagnostische Methoden

3.2.1.1 Blutentnahme

Die Blutabnahme wurde durch die Punktion der *Vena jugularis externa* durchgeführt. Das Fell wurde vor der Punktion an dieser Stelle geschoren und rasiert und nach gründlicher Desinfektion der Einstichstelle wurde mit einem sterilen Vacutainer-System (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) das Blut in Blutentnahmeröhrchen mit Heparin-Zusatz und in ein Serum-Röhrchen steril abgenommen. Die Heparin-Röhrchen wurden sechs Mal geschwenkt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Das Blut wurde gekühlt bei 4°C ins Labor gebracht und bereits nach drei Stunden weiter verarbeitet. Das Serum-Röhrchen wurde bei 2200 U/min für 10 min zentrifugiert (3 S-R Thermo, Heraeus Instruments, Osterrode) und das Serum wurde abpipettiert und bis zur Verwendung als Positivkontrolle im ELISA-Test bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Zellkultur-Methoden

3.2.2.1 Isolierung von equinen PBMC aus heparinisiertem Blut durch

Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurde das heparinisierte Blut mit sterilem PBS in Raumtemperatur in einem 50 ml Falcon-Röhrchen im Verhältnis 1:3 gemischt. Nun wurden 15 ml Ficoll (LMS 1077 Lymphocyte, PAA) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml des verdünnten Blutes überschichtet, ohne dabei das Blut mit dem Ficoll zu vermischen. Anschließend wurde das gefüllte Röhrchen für 25 Minuten bei 2200 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert (3 S-R Thermo Zentrifuge, Heraeus Instruments, Osterrode). Nach der Zentrifugation können in dem 50 ml Falcon 4 Schichten unterschieden werden. Unten befinden sich die Erythrozyten und Thrombozyten, darüber ist das Ficoll, auf dem ein weißer Ring sichtbar ist, das sind die PBMCs und darauf befindet sich das Plasma-PBS-Gemisch (Abb. 6).

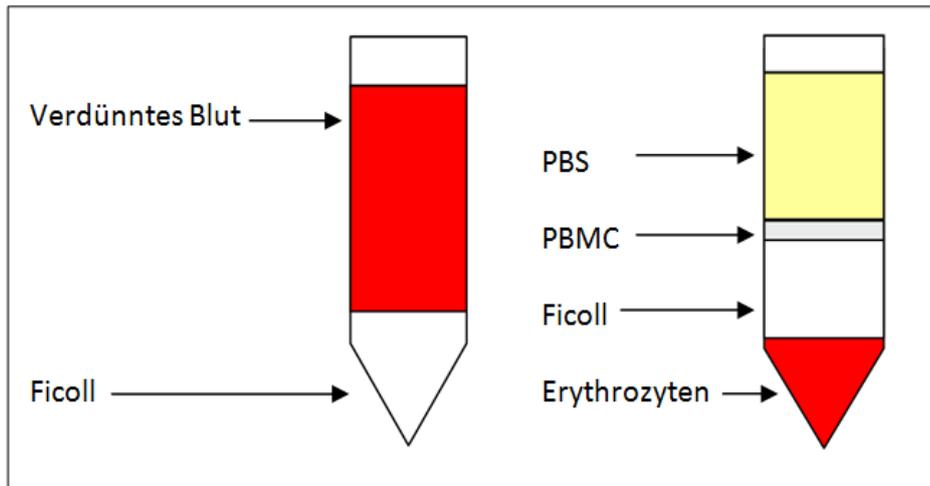


Abb. 6: Dichtegradientenzentrifugation
Schichtung vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation

Die Schicht aus PBMCs wurde vorsichtig in ein neues 50 ml Falcon überführt und mit PBS (4°C) auf 50 ml aufgefüllt und anschließend für 7 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml PBS resuspendiert und ein zweites Mal gewaschen. Vor dem zweiten Waschgang wurden 50 µl der Zellsuspension zum Zählen der Zellen entnommen (Zellzählung 3.2.2.2). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

3.2.2.2 Zell-Zählung

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden 10 µl von den 50 µl der Zellsuspension, die vor dem zweiten Waschen entnommen wurden in die Neugebauer Zählkammer pipettiert und anschließend unter dem Lichtmikroskop (Wiloverts Standard, Helmut Hund GmbH, Wetzlar) mit Hilfe eines Handzählers meanderförmig ausgezählt. Ermittelt wurden die Zellen, die sich in zwei 4x4 Kleinstquadranten (=Quadrant) mit je 0,05 mm Kantenlänge und mit je 0,0025 mm² Fläche befunden haben. Für die Berechnung der Zellzahl wurde nun folgende Formel verwendet:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen / Quadranten (2) x Verdünnungsfaktor x } 10^4 \text{ (=Kammerkonstante) = Zellkonzentration in Zellzahl pro Volumeneinheit [ml].}$$

3.2.3 Molekulargenetische Methoden

3.2.3.1 Extraktion der RNA aus PBMCs

Die Isolierung und Reinigung der RNA erfolgte im Doppelansatz mit dem RNeasy mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Pro Ansatz können maximal 1×10^7 Zellen verwendet werden, da sonst die Säulen aufgrund der zu hohen Zellzahl

verstopfen. Die auf Eis gestellten PBMCs werden je nach ausgezählter Zellzahl auf die gebrauchte Menge mit PBS verdünnt. In zwei Reaktionsgefäße (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit 1,5 ml Fassungsvermögen wurden dann je 0,5 ml der Zellsuspension gegeben, dem wurden 0,1% Trypsin (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München) zugesetzt und dann für 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Osterode). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden unter dem Abzug in je 700 µl QIAzol (basiert auf Phenol und Guanidine Thiocyanat und hemmt dadurch RNAsen, beseitigt zelluläre DNA und Proteine) aus dem Kit durch 1 Minute vortexen (VF-2-Vortexer, IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurden unter dem Abzug je 140 µl Chloroform (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) dazugegeben, das Reaktionsgefäß wurde sicher verschlossen, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 12000 U/min bei 4°C zentrifugiert (3 S-R Thermo Zentrifuge, Heraeus Instruments, Osterode). Nun zeigten die Proben 3 Phasen, oben: farblos die wässrige Phase mit der RNA, die Zwischenphase weiß und unten die organische rote Phase. Die wässrige obere Phase (ca. 350 µl) wurde in ein neues Gefäß aus dem Kit gegeben, das 1,5 fache an 100% Ethanol (525 µl) (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) dazugegeben und mit Hilfe einer Pipette gut gemischt. 700 µl von der Probe wurden in ein 2 ml Probengefäß gegeben, davon wurde die Hälfte auf eine Säule aus dem Kit gegeben, die in ein 2 ml Probengefäß aus dem Kit gesteckt wurde. Die Säulen wurden nun für 15 Sekunden bei Raumtemperatur bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde mit der zweiten Hälfte der Probe wiederholt. Anschließend wurden 700 µl RTW Puffer aus dem Kit auf die Säulen pipettiert, für 15 Sekunden bei Raumtemperatur bei 8000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal mit 500 µl RPE Puffer aus dem Kit wiederholt. Danach wurden die Säulen für 2 Minuten bei 8000 U/min trocken zentrifugiert und im Anschluss die Säulen in ein neues 2 ml Gefäß überführt und für 1 Minute bei höchster Stufe zentrifugiert. Nun wurden die Säulen in 1,5 ml Eppendorfgefäße aus dem Kit gesteckt, 40 µl Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden direkt auf die Säulen pipettiert und für 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert, damit wird die RNA aus der Membran eluiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säulen gegeben und der Vorgang wiederholt. Die Messung der Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem ND 1000 Spektrometer (NanoDrop products, Wilmington) durchgeführt (Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA 3.2.3.2).

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmungen von RNA und DNA

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des ND 1000 Spektrometer (NanoDrop products, Wilmington) bestimmt. An dem Computer in dem sich die Software für das ND

1000 Spektrometer befindet, wird die Einstellung für die RNA-Messung vorgenommen. Danach wurden auf dem gereinigten Sensor 1,5 µl der RNA-Lösung aufgetragen. Die RNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei 1 OD 40 µg/ml RNA entspricht. Parallel dazu erfolgt als zusätzliche Qualitätskontrolle die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Außerdem erhält man eine Aussage über die Reinheit der vorliegenden RNA-Lösung aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm. Dieser Koeffizient sollte bei 1,8 bis 2 liegen, ist er kleiner, ist die RNA-Präparation kontaminiert. Bei den Kontaminanten handelt es sich um Proteine, genomische DNA oder um aromatische Substanzen. Die Angabe der RNA-Konzentration erfolgt in µg RNA/ml. Ebenfalls kann an diesem Gerät auch die Messung für die DNA-Konzentration durchgeführt werden, wobei 1 OD 50 µg/ml DNA entspricht.

3.2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkriptase Reaktion beinhaltet das Umschreiben von RNA, die aus den peripheren mononukleären Zellen des Pferdes gewonnen wurde, in komplementäre DNA (cDNA). Dafür wurde das TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Ein Kit enthält MultiScribe Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor, Oligo(dT)-Primer, Random Hexamer Primer, desoxyNTP Mix, 10x RT Puffer und MgCl₂ Lösung. Das Enzym MultiScribe Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die RNA als Matrize für die Synthese eines cDNA-Stranges nutzt. Es handelt sich hierbei um eine rekombinante Reverse Transkriptase aus dem „Moloney Murine Leukemia Virus“, mit RNase H-Aktivität. Das bedeutet, die RT kann den abgeschrieben mRNA-Strang gleichzeitig verdauen, wodurch ein Verhältnis von 1:1 zwischen mRNA (Matrize) und cDNA (Produkt) entsteht. Um nun die mRNA aus der Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben, wurden Oligo(dT)-Primer eingesetzt, diese binden selektiv an Poly-A⁺-Schwänze und synthetisieren in 5'-Richtung die cDNA. Das Vorhandensein von Poly-A⁺-Schwänze ist ein Charakteristikum für die mRNA. Des Weiteren wurden Random Hexamer Primer verwendet, diese sind willkürlich zusammengesetzte Hexanukleotid-Gemische, die an zufälligen Positionen der RNA binden.

Tab. 2: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Reaktionsansatz für 20 µl Gesamtvolumen nach Herstellerangaben:

| Komponente | Menge |
|--|--------------|
| Gesamt RNA | 400 ng |
| 10 mM dNTP Mix | 2,0 µl |
| Oligo (dT)- Primer (50 µM) | 0,5 µl |
| Random Hexamer-Primer (50 µM) | 0,5 µl |
| 10x RT Puffer | 2,0 µl |
| 25 mM MgCl ₂ | 4,4 µl |
| RNase Inhibitor | 0,4 µl |
| 10 mM MultiScribe Reverse Transkriptase | 0,5 µl |
| H ₂ O (Ultra pure, DNase /RNase free) | Ad 20 µl |

Die Durchführung zur Herstellung des gesamten Ansatzes erfolgte auf Eis. Nachdem alle Komponenten in ein 0,2 ml Thermo Tube (Rapidozym GmbH, Berlin) gegeben wurden, wurde das Reaktionsgefäß in einen Thermocycler (Biometra, Göttingen) gestellt.

Die Reaktion erfolgte in drei Schritten:

1. 10 min 25°C (Hexanukleotid-mRNA Hybridisierung)
2. 40 min 48°C (Strangsynthese)
3. 5 min 95°C (Denaturierung)

Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.4 Primerdesign

Primer sind Oligonukleotide, die den Start- und Endpunkt für die Amplifizierung in der Polymerasekettenreaktion (PCR) vorgeben. Sie sind einzelsträngig und komplementär zu ihrer Zielsequenz und stellen mit ihrem 3'-OH-Ende eine passende Hydroxygruppe für die erste Verknüpfungsreaktion zur Verfügung.

3.2.3.4.1 Primer für die PCR

Die Primer wurden mit Hilfe der Gendatenbank UCSC Genome Browser (2007 [<http://genome.ucsc.edu/>]) entworfen und dann synthetisch hergestellt (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin). Der Entwurf der Primer für das equine BAFF (eBAFF), das equine APRIL (eAPRIL) und das equine TACI (eTACI) erfolgte über ein so genanntes „Alignment“, da die Gensequenz von TACI für das Hauspferd noch nicht in der Gendatenbank erfasst ist, bzw. nur als Vorhersage in der NCBI (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]). Hierfür wurden nun die

Sequenzhomologien von BAFF, APRIL und TACI zu den bekannten Gensequenzen vom Menschen überprüft und es zeigten sich eine Deckung für BAFF von 92%, für APRIL von 87% und für TACI von 81%. Beim Primerdesign wurde lediglich der extrazelluläre Teil von TACI verwendet, da nur dieser von Relevanz ist. Die Primer von eBAFF, eAPRIL und eTACI wurden entworfen um erstmals diese Gene aus der DNA des Pferdes zu klonieren.

Tab. 3: Primer für die PCR von eBAFF, eAPRIL und eTACI

Equines BAFF

| Primer | Sequenz |
|--------------|-----------------------------------|
| Eq BAFF-for | 5' AGG AGT GAA ATG GAT GAC TC |
| Eq BAFF- rev | 5' GTA AGT AGG TCA CAG AAG TTT CA |

Equines APRIL

| Primer | Sequenz |
|---------------|--------------------------------|
| Eq APRIL-for | 5' CAG CTC ATG CCA GCT TCA |
| Eq APRIL- rev | 5' CAA TCA CAG TTT CAC AAA CCC |

Equines extrazelluläres TACI

| Primer | Sequenz |
|--------------|-------------------------------|
| Eq TACI-for | 5' TCC TGA GTA ATG AGT GGC CT |
| Eq TACI- rev | 5' CTT CAG CCC TGA GGG TGC T |

Beim Entwerfen der Primer wurde darauf geachtet, dass die Bindungsstelle an der Grenze zwischen Exon und Intron liegt, damit die Amplifikation mRNA- spezifisch ist und es nicht zu einer unspezifischen Amplifizierung von DNA-Sequenzen kommt. Um sicher gehen zu können, dass der entworfene Primer auch nur diese eine Gensequenz amplifiziert, wurden alle entworfenen Primer in der Gendatenbank auf Sequenzhomologien mit anderen bekannten Gensequenzen überprüft und nur dann eingesetzt, wenn sie ausschließlich für die vorgesehene Gensequenz spezifisch waren. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Länge der Primer zwischen 18-30 Basen liegen, da die Schmelztemperatur linear mit der Länge wächst. Die Schmelztemperatur wird auch von der Basenpaarung beeinflusst, diese steigt mit dem Anteil an Guanin (G) und Cytosin (C) an, da die G-C-Basenpaarungen durch drei Wasserstoffbrücken stabilisiert werden, wohingegen Adenin (A) und Thymin (T) nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen in der A-T-Basenpaarung ausbilden, daher sollte der GC-Gehalt im Primer auch höher sein, um eine festere Bindung zu erreichen. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55 und 80°C liegen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben (Mühlhardt, 2009). Je höher die Schmelztemperatur ist,

desto stringenter können die PCR Bedingungen sein, da es bei niedrigeren Temperaturen häufiger zu unspezifischen Bindungen kommt. Weitere wesentliche Kriterien für das Design der Primer sind das Vermeiden von vier gleichen, aufeinander folgenden Basen, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen vorzubeugen. Auch sollten Primerpaare keine komplementären Basensequenzen aufweisen, vor allem nicht an den jeweiligen 3'-Ende, um die Bildung von Primerdimeren zu verhindern. Ebenfalls sollten die Primer keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln bilden, da diese die Hybridisierung mit der Template-DNA reduzieren. Die synthetisch hergestellten Primer (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin) wurden gefriergetrocknet geliefert und nach Herstellerangaben so in Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gelöst, dass die Primer eine Konzentration von 100 µM aufwiesen. Eingesetzt in der PCR wurden die Primer in einer Endkonzentration von 20 µM.

3.2.3.4.2 Primer für das Klonieren

Die Primer für das Klonieren wurden mit Hilfe des Software-Programms „Primer Express 2“ entworfen. Dafür wurden die Primer jeweils mit spezifischen Erkennungssequenzen (fettgedruckt) für bestimmte Restriktionsenzyme versehen um sie für die Genexpression an den richtigen Stellen schneiden zu können. Was in den folgenden Tabellen 4-6 deutlich wird:

Tab. 4: Genexpressions-Primer für eAPRIL

Primer mit Enzymschnittstellen für *Bsa* I für die Genexpression von **eAPRIL**

| Primer | Sequenz |
|-----------------------------|---|
| Eq APRIL- <i>Bsa</i> I- for | ATG GTA GGT CTC AGC GCA TGC CAG CTT CAT CTC CTT CCT T |
| Eq APRIL- <i>Bsa</i> I- rev | ATG GTA GGT CTC ATA TCA CAG TTT CAC AAA CCC CAG GAA GG |

Tab. 5: Genexpressions-Primer für eBAFF

Primer mit Enzymschnittstellen für *Bsa* I für die Genexpression von **eBAFF**

| Primer | Sequenz |
|----------------------------|--|
| Eq BAFF- <i>Bsa</i> I- for | ATG GTA GGT CTC AGC GCA TGG ATG ACT CCA CAC AAG GGG |
| Eq BAFF- <i>Bsa</i> I- rev | ATG GTA GGT CTC ATA TCA CAG AAG TTT CAG TGC ACC AAA AAA T |

Tab. 6: Genexpressions-Primer für eTACI

Primer mit Enzymschnittstellen für *Nhe* I und *Bam*H I für die Genexpression von **eTACI**

| Primer | Sequenz |
|------------------------------|--|
| Eq TACI- <i>Nhe</i> I-for | CTA GCT AGC TAT GAG TGG CCT GGG CCG |
| Eq TACI- <i>Bam</i> H I- rev | CGC GGA TCC GCC CTG AGG GTG CTG GAC |

Durch den Einbau der Schnittstelle für die Restriktionsenzyme erhöht sich die Anzahl der Nukleotide für die einzelnen Primer, wodurch es insgesamt zu einer Verlängerung der Konstrukte kommt.

Tab. 7: Konstrukt-Längen für eBAFF, eAPRIL und eTACI

Länge der Konstrukte vor und nach Einbau der Schnittstelle für die Restriktionsenzyme

| Komponente | Länge vor Einbau | Länge nach Einbau |
|------------|------------------|-------------------|
| eBAFF | 873 bp | 905 bp |
| eAPRIL | 702 bp | 734 bp |
| eTACI | 433 bp | 481 bp |

Auch diese Primer wurden für die synthetische Herstellung zu TIB Molbiol Syntheselabor (Berlin) geschickt. Nach Erhalt wurden sie so in Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gelöst, dass die Primer eine Konzentration von 100 µM aufwiesen. Eingesetzt in der PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 20 µM.

3.2.3.4.3 Primer für die Sequenzierung

Die Primer für die Sequenzierung wurden zum Teil aus einer vorhandenen Liste bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg [www.eurofinsdny.com]) ausgesucht. Dazu gehörten M 13 rev (29) und T7. Der Primer pASK-IBA6 for wurde mit Hilfe der „Primer Express 2“ Software entworfen und von Eurofins MWG Operon für die Sequenzierung synthetisiert.

Tab. 8: Primer für die Sequenzierung

| | |
|---------------|----------------------------|
| M13 rev (29) | CAG GAA ACA GCT ATG ACC |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG |
| pASK-IBA6 for | GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT |

3.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Vervielfältigung der definierten DNA-Sequenzen durchgeführt und beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten. Erstens die Denaturierung von doppelsträngiger DNA in Einzelstränge. Zweitens die Anlagerung (Annealing) von Primern an die Enden des zu amplifizierenden Genbereiches und drittens die Polymerisierung (Neubildung) der doppelsträngigen DNA mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase, sowie der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Mit jedem Zyklus der durchgeführt wird, wird die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt, dies entspricht einer exponentiellen Vermehrung (Mühlhardt, 2009). Der Einsatz der PCR

sollte zum Einen zur Überprüfung der Qualität der cDNA mit Hilfe der β -Aktin-PCR dienen und zum Anderen zur Synthese der definierten cDNA-Fragmente für die Klonierung genutzt werden.

Bei der verwendeten DNA-Polymerase, handelt es sich sowohl um die Taq-DNA-Polymerase (Dream-Taq Polymerase, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) als auch um die Pfu-DNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim). Die Pfu-DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) besitzt gegenüber der Taq-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) eine deutlich höhere Temperaturstabilität und eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität erlaubt, wodurch die Fehlerrate geringer ist. Sie liegt für die Pfu-DNA-Polymerase bei einem Fehlereinbau alle 10^6 Basen. Sie ist demnach um den Faktor zehn seltener als bei der Taq-DNA-Polymerase. Die Taq-DNA-Polymerase hat den Vorteil einer ca. zehnmal höheren Prozessivität, das heißt die Zahl der Nukleotide pro Zeit, die eine Polymerase in einem Anlauf an das 3'-Ende einer DNA knüpft, bevor sie wieder abdissoziiert. Um nun die guten Eigenschaften beider Polymerasen zu nutzen, wurden die Taq-DNA-Polymerase und die Pfu-DNA-Polymerase gemeinsam eingesetzt. Zu den weiteren Substraten die eingesetzt wurden, gehören Desoxyribonukleinsäure-Triphosphate (dNTPs, 25 μ M Bioline GmbH, Luckenwalde), 10x Dream Taq Green Puffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), Wasser (Ultra pure, distilled water DNase/ RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), das Primerpaar und die cDNA (Reverse Transkription 3.2.3.3). Die Durchführung der PCR erfolgte für die Denaturierung bei 95°C, dann folgte das Annealing bei den Temperaturen, die für die Primersequenzen spezifisch sind (Primerdesign 3.2.3.4). Die Elongation fand bei 72°C statt, dem Arbeitsoptimum der DNA-Polymerasen, wobei es dann zur Neubildung an den einzelsträngigen DNA-Templates in 5'-3'-Richtung kommt.

Als Kontrolle wurde eine β -Aktin-PCR durchgeführt, um die Qualität und die Reinheit der cDNA zu überprüfen. Bei dem verwendeten β -Aktin handelt es sich um ein Gen, das in allen eukaryotischen Zellen enthalten ist und als hoch konserviertes Zellstrukturprotein von allen Zellen gebildet wird (Shankar et al. 1992). Mit der unten angegebenen Sequenz erhält man ein Fragment mit 433 bp.

Tab. 9: β -Aktin

Primersequenz von β -Aktin für *Equus caballus*

| Primer | Sequenz |
|------------------------|---------------------------------------|
| β -Actin Forward | 5'- CCC CAA GGC CAA CCG CGA GAA GAT G |
| β -Actin Reverse | 5'- GAA CCG CTC GTT GCC GAT GGT GAT G |

Parallel dazu wurde auch eine Negativkontrolle als Präparationskontrolle durchgeführt, dafür wurde die cDNA durch Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) ersetzt.

Tab. 10: PCR-Reaktionsansatz

Reaktionsansatz für 20 µl des verwendeten PCR-Gemisches

| Komponente | Menge |
|--|---------|
| 10x Reaktionspuffer Dream Taq Green | 2,0 µl |
| dNTPs [25 µM] | 0,2 µl |
| Vorwärts Primer [20 µM] | 1,0 µl |
| Rückwärts Primer [20 µM] | 1,0 µl |
| cDNA (oder Kontrollsubstrat) | 1,0 µl |
| Dream Taq- Polymerase [5 U/µl] | 0,1 µl |
| Pfu- Polymerase [3 U/µl] | 0,1 µl |
| H ₂ O (Ultra pure, DNase /RNAse free) | 14,6 µl |

Die Verwendeten PCR- Bedingungen für den Thermozycler (Biometra, Göttingen), können den folgenden Tabellen entnommen werden. Es wurden immer 40 Zyklen durchgeführt.

Tab. 11: PCR-Bedingungen

| PCR-Programm | Temperatur | Zeit |
|------------------------|------------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95°C | 2 min |
| Denaturierung | 95°C | 1 min |
| Annealing | siehe Tabelle 12 | 1 min |
| Elongation | 72°C | 1 min |
| Finale Elongation | 72°C | 10 min |

Tab. 12: Spezifische Annealing-Temperaturen

| Gen | Annealing-Temperatur | Zyklenzahl | Fragmentgröße |
|------------------------------|----------------------|------------|---------------|
| Equines BAFF | 60°C | 40 | 873 bp |
| Equines APRIL | 55°C | 40 | 702 bp |
| Equines extrazelluläres TACI | 60°C | 40 | 462 bp |
| β- Aktin | 65°C | 40 | 433 bp |

Die Auswertung des PCR-Laufes erfolgte in einer analytischen Agarosegelelektrophorese (Agarosegelelektrophorese 3.2.3.6), wobei zur Abschätzung der Fragmentgröße immer ein DNA-Leiter mit aufgetragen wurde. Je nach Größe der Fragmente wurden verschiedene

DNA-Leiter verwendet. Um dann die Basenabfolge der entstandenen Produkte zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung durchgeführt (Sequenzierung 3.2.3.7.6).

3.2.3.5.1 Kontroll-PCR

Eine Kontroll-PCR wurde durchgeführt um zu prüfen, ob das gewünschte Konstrukt z.B. in den Bakterienzellen nach der Transformation oder nach der Plasmid-DNA-Präparation vorliegt. Zum Überprüfen der Bakterienzellen wurden die Einzelkolonien gepickt und in 50 µl Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gelöst. 10 µl der Verdünnung wurden für 1 min bei 95°C aufgespalten und 1,0 µl davon wurden in die PCR (3.2.3.5) eingesetzt. Falls die PCR positiv war, also Banden an den zu erwarteten Stellen, wurden die restlichen 40 µl zum Animpfen der Übernachtskultur verwendet um die Bakterienzellen zu vermehren. Nach der Plasmid-DNA-Präparation wurde 1,0 µl des Eluats in die PCR eingesetzt.

3.2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Identifizierung, Trennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten. Des Weiteren kann man durch die Intensität der Bande Rückschlüsse auf die Konzentration der DNA treffen. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel geladen und eine elektrische Spannung angelegt, wodurch die negativ geladene DNA im Gel zur Anode wandert und sich entsprechend ihrer Molekülmasse auftrennt. Die Agarosegele wurden in einer Konzentration von 1,5% verwendet, dafür wurden 1,5 g PeqGOLD Universal Agarose (peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 100 ml 1x TAE-Laufpuffer unter kurzem Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, wurden unter dem Abzug 5 µl Ethidiumbromidlösung 1% ig (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) hinzu pipettiert, das färbt die DNA und macht sie unter dem UV-Licht sichtbar. Die Agarosegel-Lösung wurde anschließend in einen horizontalen Gelschlitten gegeben, in der zwei Kämme, die je 20 Taschen bilden, eingespannt waren. Nachdem das Gel vollständig erstarrt war, wurde die Gelkammer (PerfectBlue Gelsystem Mini L, Peqlab Biotechnologie, Erlangen) mit 1x TAE Laufpuffer aufgefüllt und der Gelschlitten wurde nachdem die Kämme entfernt wurden in die Gelkammer gestellt. In die Geltaschen wurden die gesamten 20 µl des PCR-Produktes aufgetragen. Eine farbliche Markierung der PCR-Produkte erfolgte zum Teil schon durch den 10x Reaktionspuffer Dream Taq Green (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), der einen Ladungspuffer schon enthält, doch in anderen Fällen, musste zusätzlich ein DNA-Ladungspuffer in die aufzutragende Lösung gegeben werden. Der DNA-Ladungspuffer dient zum Einbringen von Indikatorfarbe zur Kontrolle des Gellaufes und zum Beschweren der PCR-Produkte damit die Proben zuverlässig in die Geltaschen absinken. Zusätzlich wurde zur Ermittlung der DNA-Fragmentgröße ein

Längenstandard in Form eines 1 kb DNA-Leiters (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) mitgeführt, davon wurden 12 µl in eine Geltasche gegeben, das entspricht einer Konzentration von 6 µg. Nach beladen der Geltaschen wurde eine Spannung von 100 V (Elektrophorese Einheit GD251D Stromquelle, Sebia GmbH, Fulda) für ca. 1 Stunde angeschlossen und anschließend unter UV-Licht im Gel-Dokumentationssystem (System Molecular Imager Gel DOC XR, Bio-Rad, München) ausgewertet und das Ergebnis direkt ausgedruckt (P93 D, Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen).

3.2.3.7 Klonierung und Sequenzierung

3.2.3.7.1 DNA Isolierung und Aufreinigung

Die PCR-Amplifikate, die bei der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dann sichtbar gemacht wurden, wurden aus dem Agarosegel isoliert. Dafür wurden die Banden, die der erwarteten Größe entsprachen mit einem sterilen Einmalskalpell (Aesculap AG, Tuttlingen) unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt. Anschließend wurden die PCR-Amplifikate mit dem NucleoSpin Extract II System (Macherey Nagel GmbH, Düren) nach Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt und isoliert. Das Gel in dem Reaktionsgefäß wurde gewogen und dem Gewicht entsprechend in 200 µl NT (Bindungspuffer) pro 100 mg Gel gelöst. Der NT Puffer bewirkt, dass die Nukleinsäuren von ihrer Hydrathülle befreit werden, wodurch dann eine Bindung an eine Membran möglich wird. Danach wurden die Reaktionsgefäße für ca. 10 min bei 50°C in den Heizblock (Techne Dri-Block DB-2A, Biostep GmbH, Jahnsdorf) gestellt, bis das Gel vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Lösung auf eine Säule aus dem Kit gegeben und bei Raumtemperatur bei 11000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Osterode). Bei diesem Schritt bindet die DNA an die Membran. Nach einmaligem Waschen der Membran mit 700 µl NT3 (Waschpuffer) bei der gleichen Einstellung der Zentrifuge, wurde die Membran getrocknet, dafür wurde die Dauer des Zentrifugierens auf 2 min verlängert. Zum Eluieren der DNA aus der Membran wurden 15 µl Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) auf die Membran gegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde die aufgereinigte DNA in ein neues steriles Reaktionsgefäß eluiert. Die Konzentration des erhaltenen Isolates wurde mit Hilfe des ND 1000 Spektrometer (NanoDrop products, Wilmington), wie zuvor in 3.2.3.2 beschrieben, bestimmt.

3.2.3.7.2 Ligation

Die Ligation dient dazu, die isolierte DNA aus den PCR-Fragmenten (Insert) in einen Plasmid-Vektor einzubringen.

3.2.3.7.2.1 Ligation in den PCR 2.1 Vektor

Der PCR 2.1 Vektor ist linearisiert, 3,9 kb groß und lag in einer Konzentration von 25 ng/μl vor. Hierfür wurde „The Original TA Cloning Kit PCR 2.1 Vector“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Dieser Vektor verfügt über das Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen. Dieses dient zur Kontrolle, ob das Plasmid im Bakterium ist. Des Weiteren besitzt der PCR 2.1 Vektor im Bereich der Insertionsstelle das Gen *lacZ*, das für β-Galaktosidase kodiert.

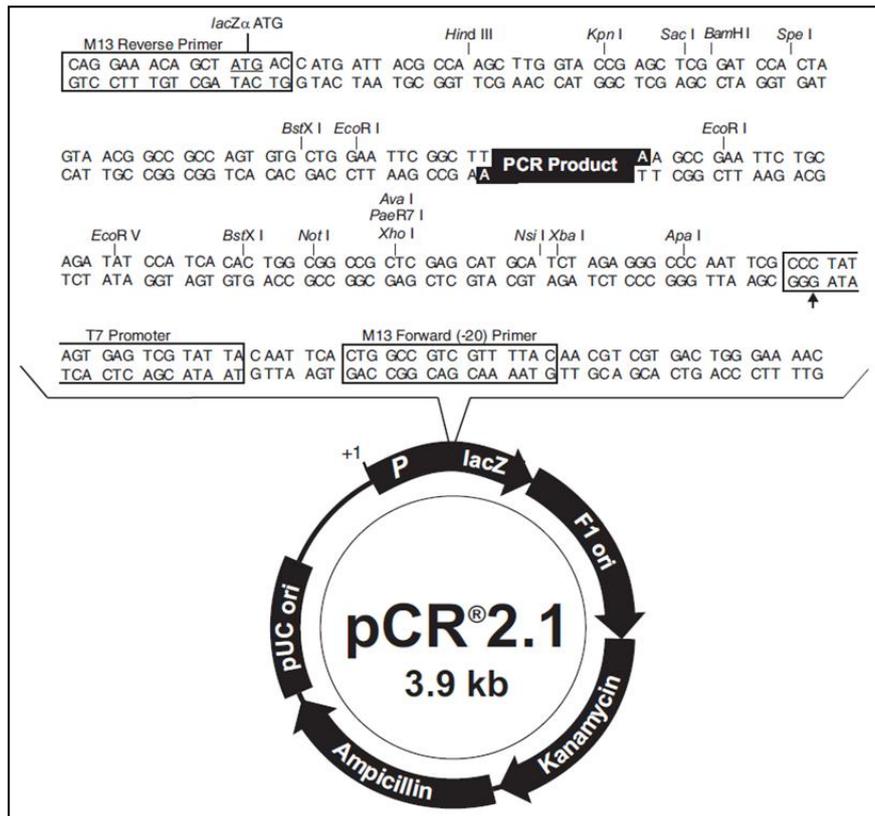


Abb. 7: pCR 2.1 Vektorkarte von Invitrogen

Durch Ligation eines Inserts wird der Leserahmen für β-Galaktosidase zerstört. In Anwesenheit von X-Gal entsteht durch dieses Enzym ein blauer Farbstoff. Dadurch erscheinen transfizierte Kolonien farblos. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und das verwendete Insert-Vektor-Verhältnis betrug 3:1. Das Insert-Vektor-Verhältnis ist vom Hersteller vorgegeben und ausgetestet. Es entspricht dem Verhältnis mit der das Insert der höchsten Wahrscheinlichkeit noch in den Vektor kloniert wird. Die Menge des einzusetzenden Inserts wurde nach folgender Formel für den PCR 2.1 Vektor berechnet:

$$\text{Insert[ng]} = \frac{\text{Vektor [50 ng]} \times \text{Insert [bp]} \times 3 \text{ [molares Verhältnis Insert: Vektor]}}{\text{Vektor [3900 bp]}}$$

Aus dieser Berechnung ergeben sich für die Inserts folgende Mengen:

Tab. 13: Ergebnisse der Insert-Berechnung für den PCR 2.1 Vektor

| Komponente | Menge |
|----------------|---------|
| BAFF (873 bp) | 33,6 ng |
| APRIL (702 bp) | 27,0 ng |
| TACI (462 bp) | 17,8 ng |

Die Ligationsansätze hatten jeweils ein Volumen von 10 µl und wurden nach folgendem Pipettierschema pipettiert:

Tab. 14: Pipettierschema der Ligationsansätze für den PCR 2.1 Vektor

| Komponente | Menge |
|--|----------------------|
| PCR 2.1 Vektor | 2,0 µl |
| Insert je nach Berechnung | Siehe Insert-Tabelle |
| 10 x Ligationspuffer | 1,0 µl |
| T4 DNA- Ligase | 1,0 µl |
| Wasser (Ultra pure, DNase /RNAse free) | Ad 10,0 µl |

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 14°C im Mastercycler personal 5332 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze direkt in kompetente *Escherichia coli* - Zellen (E. coli) TOP 10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert.

3.2.3.7.2.2 Ligation in den pASK- IBA6 Vektor

Bei dem pASK-IBA6 Vektor (IBA GmbH, Göttingen) handelt es sich um einen Expressionsvektor, mit einer Größe von 3306 bp.

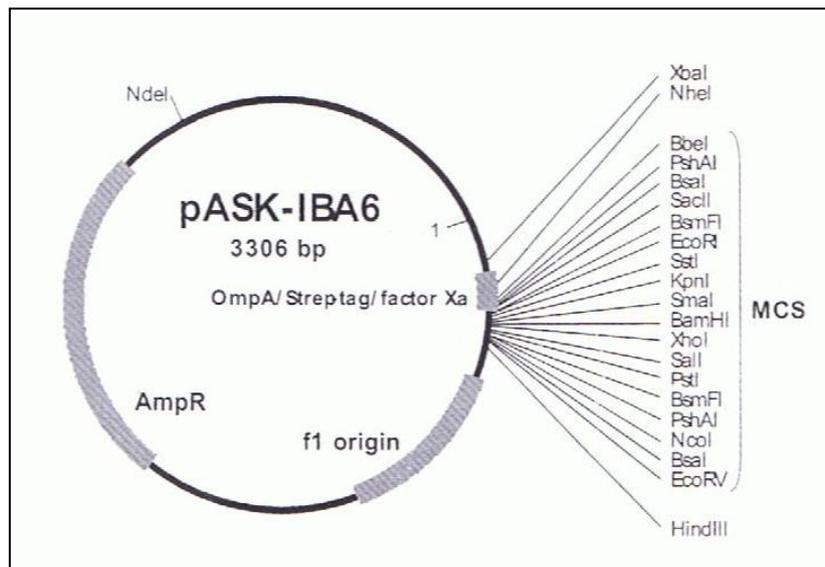


Abb. 8: pASK-IBA6 Vektorkarte von IBA GmbH

Er diente zur Proteingewinnung von BAFF und APRIL mittels Strep-tag Starter Kit 3C (IBA GmbH, Göttingen). Dafür wurden zunächst über eine PCR (PCR 3.2.3.5) die Konstrukte für BAFF und APRIL, unter Verwendung neuer Primer (Primer für das Klonieren 3.2.3.4.2), aus dem PCR 2.1 Vektor herausamplifiziert. Durch Verwendung dieser Primer entsteht eine zusätzliche Bindungsstelle für das Restriktionsenzym *Bsa* HF I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main), wodurch die einzelnen Konstrukte länger werden. *Bsa* HF I ist eine aus dem Bakterium *Bacillus stearothermophilus* isolierte Restriktionsendonuklease, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneidet.

Im Anschluss an die PCR, erfolgten die Isolierung, die Aufreinigung (DNA Isolierung und Aufreinigung 3.2.3.7.1) und die Konzentrationsbestimmung (Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA 3.2.3.2). Für die Ligation wurde die Menge des einzusetzenden Inserts nach folgender Formel für den pASK-IBA6 Vektor berechnet, wobei hier Insert und Vektor in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt wurden.

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [100ng]} \times \text{Insert [bp]}}{\text{Vektor [3306bp]}}$$

Aus dieser Berechnung ergeben sich für die Inserts folgende Mengen:

Tab. 15: Ergebnisse der Insert-Berechnung für den pASK-IBA6 Vektor

| Komponente | Menge |
|----------------|---------|
| BAFF (905 bp) | 27,3 ng |
| APRIL (734 bp) | 22,2 ng |

Der pASK IBA6 Vektor wurde bevor er zur Ligation eingesetzt wurde ebenfalls mit dem *Bsa* HF I Restriktionsenzym verdaut um die Schnittstelle freizulegen (Ligation 3.2.3.7.5.2).

Das Pipettierschema für die Ligation in den mit *Bsa* HF I verdauten pASK IBA6 Vektor wird in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tab. 16: Pipettierschema der Ligationsansätze für den pASK-IBA6 Vektor

| Komponente | Menge |
|---------------------------------------|----------------------|
| pASK IBA6 Vektor verdaut | 4,0 µl |
| Insert je nach Berechnung | Siehe Insert-Tab. 15 |
| 10 x Ligationspuffer | 1,0 µl |
| T4 DNA- Ligase | 1,0 µl |
| Wasser(Ultra pure, DNase /RNase free) | Ad 10,0 µl |

Die Ligationsreaktion wurde wie in 3.2.3.7.2.1 beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden auch hier die Ansätze direkt in kompetente *Escherichia coli* - Zellen (*E. coli*) TOP 10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert (Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen 3.2.3.7.3).

3.2.3.7.2.3 Ligation in pcDNA IGHG 1 und 4

Die hier verwendeten pcDNA-IGHG 1 und 4 Vektoren wurden von Dr. Bettina Wagner (Cornell University, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Vektoren, die für die Herstellung der Fusion-Proteine TACI-IGHG1 und TACI-IGHG4 und zur anschließenden Expression in HEK 293 Zellen (Zellkultur für die Expression der Proteine in HEK 293 Zellen 3.2.4.2 und Transfektion von TACI-IGHG 1 und 4 3.2.4.2.1) verwendet wurden. Es wurde der Vektor pcDNA3.1 verwendet, dieser enthält einen CMV-Promotor und besitzt Resistenzgene gegen die Antibiotika Neomycin/ Kanamycin und Ampicillin. Er hat eine Größe von 5499 bp.

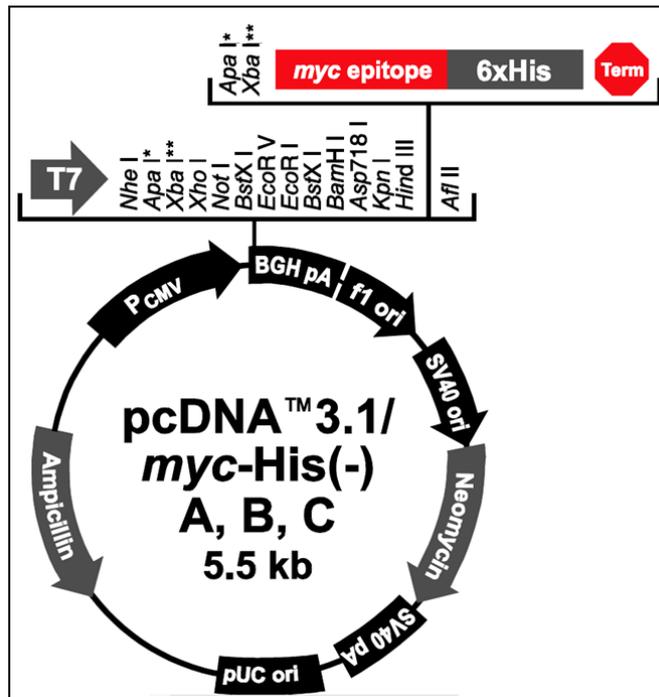


Abb. 9: pcDNA 3.1Vektorkarte von Invitrogen

Zunächst wurde unter Verwendung neuer Primer mit Restriktionsenzym-Schnittstellen für *Nhe* I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und *Bam*H I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) (Primer für das Klonieren 3.2.3.4.2) das Konstrukt für TAC1 aus dem PCR 2.1 Vektor mittels PCR (3.2.3.5) herausamplifiziert. Mit den neuen Bindungsstellen konnte TAC1 genau in den pcDNA-IGHG 1 und 4 Vektoren, die ebenfalls mit *Nhe* I und *Bam*H I verdaut wurden, eingebaut werden (Restriktionsenzymanalyse von pcDNA IGHG1 und 4 3.2.3.7.5.3), so dass sich TAC1-IGHG 1 und TAC1-IGHG 4 bildeten. Im Anschluss an die PCR, erfolgten die Isolierung, die Aufreinigung (DNA Isolierung und Aufreinigung 3.2.3.7.1) und die Konzentrationsbestimmung (Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA 3.2.3.2). Für die Ligation wurde die Menge des einzusetzenden Inserts nach folgender Formel für den pcDNA IGHG 1/4 Vektor berechnet, wobei hier Insert und Vektor in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt wurden.

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [100 ng]} \times \text{Insert [bp]} \times 3}{\text{Vektor [5499 bp]}}$$

Aus dieser Berechnung ergab sich für das Insert folgende Menge:

Tab. 17: Ergebnis der Insert-Berechnung für den pcDNA IGHG 1/4 Vektor

| Komponente | Menge |
|---------------|---------|
| TACI (481 bp) | 26,2 ng |

Das Pipettierschema für die Ligation kann in der folgenden Tabelle abgelesen werden.

Tab. 18: Pipettierschema der Ligationsansätze für den pcDNA IGHG 1/4 Vektor

| Komponente | Menge |
|---------------------------------------|------------|
| pcDNA IGHG 1/4 Vektor verdaut | 100 ng |
| TACI-Insert | 26,2 ng |
| 10 x Ligationspuffer | 1,0 µl |
| T4 DNA- Ligase | 1,0 µl |
| Wasser(Ultra pure, DNase /RNAse free) | Ad 10,0 µl |

Die Ligationsreaktion wurde wie in 3.2.3.7.2.1 beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden auch hier die Ansätze direkt in kompetente *Escherichia coli* - Zellen (E. coli) TOP 10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert (Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen 3.2.3.7.3).

3.2.3.7.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Die Transformation bezeichnet den Vorgang bei dem Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen eingebracht werden. Hierbei handelte es sich um *Escherichia coli* (E. coli) TOP 10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan et al. (1991). Dabei wird durch einen Hitzeschock die Membran der Bakterien durchlässig gemacht und die Zellen können die Plasmide aufnehmen. Hierfür wurden 50 µl kompetente Zellen aus -80°C auf Eis aufgetaut, dann wurde jeweils der komplette Ligationsansatz von 10 µl in die Zellen pipettiert und gut vermischt. Das Gemisch inkubierte für 10 min auf Eis, dann wurde es für 45 sek bei 42°C in den Heizblock gestellt und anschließend nochmal für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zusatz von vorgewärmten 200 µl Soc-Medium (Bioline GmbH, Luckenwalde) kamen die Transformationsansätze für 30 min bei 37°C in den TH30/SM30 Schüttelinkubator (Edmund Bühler GmbH, Hechingen). Im Anschluss wurden die Ansätze auf den vorbereiteten Agarplatten (Herstellung von Kulturplatten 3.2.3.7.3.1) ausplattiert und über Nacht im Inkubator B6 (Heraeus Instruments, Osterode) bei 37°C inkubiert.

Bei einer Transformation mit dem Vektor PCR 2.1 wurden die Platten zusätzlich mit 40 µl X-Gal-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) versetzt, dadurch ergibt sich für die Bakterienkulturen eine Blau/Weiß Selektion (Ligation in den PCR 2.1 Vektor 3.2.3.7.2.1). Für

andere hier verwendete Vektoren ist dies nicht erforderlich, da hier eine positive Selektion mit Hilfe der Antibiotika-Resistenz-Gene auf den Plasmiden erfolgt.

3.2.3.7.3.1 Herstellung von Kulturplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium (MP Biomedicals, Illkirch) mit 1,5% Agar (Select Agar, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München) versetzt und autoklaviert. Das ausgehärtete Agarmedium wurde anschließend vorsichtig in der Mikrowelle verflüssigt und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 100 µg/ml Ampicillin (Bioline GmbH, Luckenwalde) zugesetzt. Das Agarmedium konnte dann in die 10 cm Petrischalen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) gegeben werden, so dass der Boden mit mindestens 0,3 cm bedeckt wurde. Nach dem Abkühlen wurden die Schalen mit Deckel versehen und bis zur Verwendung bei 4°C mit dem LB-Agar nach oben aufbewahrt.

3.2.3.7.4 Plasmid-DNA Präparation

3.2.3.7.4.1 Mini-Präparation

Von den Bakterienkolonien, die nach der Transformation auf den Agarplatten gewachsen sind, wurden Übernachtskulturen in 4,0 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angelegt, zum Teil erst nach Durchführung einer Kontroll-PCR (3.2.3.5.1). Die Ansätze kamen über Nacht in den TH30/SM30 Schüttelinkubator (Edmund Bühler GmbH, Hechingen) bei 37°C und 225 rpm Schüttelstärke. Für die DNA-Plasmid-Präparation wurde das NucleoSpin Plasmid I Kit (Macherey Nagel GmbH, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zentrifuge (Biofuge pico) wurde immer mit der Einstellung 11000 U/min bei Raumtemperatur verwendet. Aus den Bakterienflüssigkulturen wurden 2 Mal hintereinander 1,5 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für jeweils 30 sek zentrifugiert. Die Überstände wurde jeweils verworfen. Anschließend fand die Zellyse statt, dafür wurde das Zellpellet in 250 µl A1 Puffer (4°C) resuspendiert, dann wurden 250 µl A2 Puffer (30-40°C) hinzupipettiert und 8 Mal geschwenkt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden 300 µl A3 Puffer (Raumtemperatur) hinzugegeben und erneut 8 Mal geschwenkt. Bei diesen Schritten wurde die Membran der Bakterienzellen zerstört und die Plasmid-DNA freigesetzt. Um nun einen klaren Überstand mit der Plasmid-DNA zu erhalten wurde das Gemisch für 10 min zentrifugiert, dabei setzen sich die Zellreste als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Falls der Überstand im Anschluss nicht klar war, wurde dieser Schritt wiederholt. Im nächsten Schritt wurde die DNA an eine spezielle Membran gebunden, dafür wurden 750 µl des klaren Überstandes auf eine Säule aus dem Kit gegeben und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang wurde ggf. mit dem restlichen Überstand wiederholt. Es folgten zwei Waschschrte der Silikonmembran:

1. 500 µl AW Puffer (50°C)
2. 600 µl A4 Puffer (Raumtemperatur)

Jeweils gefolgt von 1 min Zentrifugation. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Nachdem die Membran für 2 min in der Zentrifuge getrocknet wurde, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und die Membran mit 30 µl Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur die DNA zu eluieren, wurde die Säule für 1 min zentrifugiert.

Im Anschluss wurde mit Hilfe des ND 1000 Spektrometer die Konzentration des erhaltenen Eluats wie in 3.2.3.2 beschrieben bestimmt.

Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Plasmid-Präparation wurde eine Restriktionsenzymanalyse (3.2.3.7.5) durchgeführt. Als Kontrolle der richtigen DNA-Sequenz wurde 1,0 µl des Eluats in die Kontroll-PCR (3.2.3.5.1) eingesetzt.

3.2.3.7.4.2 Midi-Präparation

Die Plasmid-DNA Präparation im Midiformat wurde durchgeführt um größere Mengen an DNA zu erhalten. Diese werden für die Proteingewinnung benötigt. Verwendet wurde hier das Kit NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey Nagel GmbH, Düren) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip entspricht dem der Mini-Präparation. Die Bakterienflüssigkultur wurde in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angelegt und über Nacht in den TH30/SM30 Schüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm Schüttelstärke inkubiert. Die Übernachtskultur wurde für 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert (Sorvall RC 5B Plus Zentrifuge, Thermo scientific, Karlsruhe). Das Pellet wurde in 8 ml RES+RNaseA (Resuspensionspuffer) resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 8 ml LYS (Lysispuffer), das Schwenken des Gemisches und eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Nach der Zugabe von 8 ml NEU (Neutralisationspuffer) wurde die neutralisierte Lösung über einen Filter geklärt, der zuvor mit 12 ml EQU (Äquilibriumspuffer) benetzt wurde und dann auf eine Säule gegeben. Die Rückstände aus dem Filter wurden durch die Zugabe von 5 ml EQU ausgewaschen und ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule mit 8 ml WASH (Waschpuffer) gewaschen und die DNA mit 5 ml ELU (Eluationspuffer) in ein steriles Reaktionsgefäß eluiert. Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren wurde das Eluat mit 3,5 ml 70%igem Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) versetzt, gut gemischt und nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde das Gemisch durch den mitgelieferten Spritzen-Filter filtriert. Das Präzipitat im Filter wurde mit 2 ml 70%igem Ethanol (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) gewaschen. Anschließend folgten das Trocknen der Membran und die Eluation der DNA aus dem Filter mit 0,5 ml Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Dann wurde die Konzentration bestimmt

(Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA 3.2.3.2). Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Plasmid-Präparation wurde eine Restriktionsenzymanalyse (3.2.3.7.5) durchgeführt.

3.2.3.7.5 Restriktionsenzymanalyse

Mit der Restriktionsenzymanalyse werden klonierte Inserts je nach Enzym sequenzspezifisch wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten und es entstehen dabei zwei DNA Fragmente oder es können bestimmte Schnittstellen im Vektor freigelegt werden um sie für das Klonieren von Inserts kompatibel zu machen. Die Verdauungsprodukte lassen sich mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.3.6) gut darstellen. Mit dieser Methode lässt sich unter anderem feststellen, ob die Klonierung der DNA in das Plasmid erfolgreich war oder bzw. die verdauten Produkte können in die Ligation eingesetzt werden.

3.2.3.7.5.1 Restriktionsenzymanalyse vom PCR 2.1 Vektor

Der Vektor PCR 2.1 besitzt zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym *EcoR1* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main), diese enthalten den Bereich in dem das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut wurde. Wichtig ist, dass sich im Insert keine *EcoR1*-Schnittstellen befinden, damit das Fragment nicht zerschnitten wird und weitere Fragmente entstehen, die die Kontrolle erschweren.

Tab. 19: Erkennungssequenz von *EcoR1*

| | |
|--------------------------------------|--|
| Erkennungssequenz von <i>EcoR1</i> : | 5'- GAATTC - 3' 3'- CTTAAG - 5' |
|--------------------------------------|--|

Für den Restriktionsenzymverdau wurden 600ng der Plasmid-DNA-Präparation eingesetzt und mit *EcoR1* Puffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main), *EcoR1* Enzym (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gemischt und für 2 h bei 37°C in dem Inkubator B6 inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Reaktionsvolumen mit Ladepuffer vermischt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte wie in 3.2.3.6 beschrieben.

Tab. 20: Pipettierschema für den Restriktionsenzymverdau vom PCR 2.1 Vektor

| Komponente | Menge |
|--|------------|
| Plasmid-DNA | 600 ng |
| <i>EcoR1</i> -Puffer | 2,0 µl |
| <i>EcoR1</i> -Enzym | 1,0 µl |
| Wasser (Ultra pure, DNase /RNAse free) | Ad 20,0 µl |

3.2.3.7.5.2 Restriktionsenzymanalyse vom pASK-IBA6 Vektor

Für den Restriktionsenzymverdau des Vektors pASK-IBA6 wurde das Enzyme *Bsa* I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verwendet, damit bekommt der Vektor eine Schnittstelle, die kompatibel zu den Enden des Inserts ist. Dafür wurden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß pipettiert (Tabelle 21), bei 50°C für 1 h im Inkubator B6 inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt (3.2.3.6 und 3.2.3.7.1) und anschließend in die Ligation (3.2.3.7.2.2) eingesetzt.

Tab.21: Pipettierschema für den Verdau des pASK IBA6 Vektors mit *Bsa*HF I für die Ligation

| Komponente | Menge |
|--|---------|
| pASK IBA6 Vektor | 600 ng |
| <i>Bsa</i> I Enzym | 1,0 µl |
| 10x Puffer 4 | 3,0 µl |
| BSA 1:10 | 3,0 µl |
| Wasser (Ultra pure, DNase/ RNAse free) | 15,0 µl |

Nach der Plasmid-DNA Präparation (3.2.3.7.4) wurde zur Klonierungskontrolle das Insert mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Eco*RV (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und *Xba* I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten, wobei zwei DNA Fragmente entstanden, die durch die Agarosegelelektrophorese (3.2.3.6) dargestellt wurden.

Tab. 22: Erkennungssequenzen von *Eco*RV und *Xba* I

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Erkennungssequenz von <i>Eco</i> RV : | 5'- GATATC - 3' 3'- CTATAG - 5' |
| Erkennungssequenz von <i>Xba</i> I: | 5'- TCTAGA - 3' 3'- AGATCT - 5' |

Das Pipettierschema für den Restriktionsenzymverdau vom pASK-IBA6 Vektor ist in der Tabelle 23 dargestellt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 50°C für 1h inkubiert.

Tab.23: Pipettierschema für den Verdau des pASK-IBA6 Vektors mit *EcoRV* und *Xba I*

| Komponente | Menge |
|--|------------|
| Plasmid-DNA | 600 ng |
| <i>EcoRV</i> Enzym | 1,0 µl |
| <i>Xba I</i> Enzym | 1,0 µl |
| Puffer 4 | 2,0 µl |
| BSA Purified 1:10 | 1,0 µl |
| Wasser (Ultra pure, DNase /RNase free) | Ad 20,0 µl |

3.2.3.7.5.3 Restriktionsenzymanalyse von pcDNA IGHG1 und 4

Die pcDNA-IGHG 1 und 4 Vektoren wurden bevor sie in der Ligation zum Einsatz kamen mit den Restriktionsenzymen *Nhe I* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) und *BamH I* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verdaut um die Schnittstelle freizulegen, damit sie kompatibel zu den Enden des Inserts sind.

Tab. 24: Erkennungssequenzen von *BamH I* und *Nhe I*

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Sequenz von <i>BamH I</i> : | 5' - GGATCC - 3' 3' - CCTAGG - 5' |
| Sequenz von <i>Nhe I</i> : | 5' - GCTAGC - 3' 3' - CGATCG - 5' |

Dafür wurden folgende Komponenten bei 50°C für 1 h inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt (3.2.3.6 und 3.2.3.7.1). Das Pipettierschema kann der Tabelle 25 entnommen werden.

Tab.25: Pipettierschema für den Verdau des pcDNA IGHG 1/4 Vektor mit *BamH I* und *Nhe I*

| Komponente | Menge |
|--|---------|
| pcDNA IGHG 1/4 Vektor | 600 ng |
| <i>Nhe I</i> Enzym | 1,0 µl |
| <i>BamH I</i> Enzym | 1,0 µl |
| 10x Puffer 2 | 3,0 µl |
| BSA 1:10 | 3,0 µl |
| Wasser (Ultra pure, DNase/ RNase free) | 15,0 µl |

3.2.3.7.6 Sequenzierung

Nachdem die Restriktionsenzymanalyse (3.2.3.7.5.3) und ggf. die durchgeführte Kontroll-PCR (3.2.3.5.1) positiv waren, wurde eine Probe der Plasmid-DNA-Präparation zur

Sequenzierung zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg [www.eurofinsdny.com]) geschickt. Dafür mussten 15 µl pro Probe mit einer Konzentration von 50-100 ng/µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) mit Sicherheitsverschluss eingeschickt werden. Die häufigen Primer für die Sequenzierung konnten aus einer vorhandenen Liste bei Eurofins MWG Operon ausgewählt werden (z.B. M13 rev (29) und T7) und spezifische Primer die für die Sequenzierung benötigt wurden, konnten dort auf Wunsch synthetisiert werden (z.B. pASK-IBA6 for) oder es konnten die benötigten Primer mitgeschickt werden. In dem Fall musste der Primer in einer Konzentration von 2 µg/µl vorliegen. Die Ergebnisse erhält man ca. 20 Stunden später, in Form einer E-Mail und kann die Sequenz dann am Computer auswerten. Die Sequenzen der Primer für die Sequenzierung sind in der Tabelle 8 dargestellt.

3.2.4 Herstellung rekombinanter Proteine

3.2.4.1 Prinzip der Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese ist ein biochemischer Prozess bei dem aus Aminosäuren Proteine synthetisiert werden. Die Information über die spezifische Aminosäuren-Abfolge ist in der DNA verschlüsselt. Für die Proteinbiosynthese der generierten Fusionskonstrukte wurden zwei Methoden angewendet:

- a) die Transfektion in HEK 293 Zellen für die Synthese von den Fusionsproteinen TACI-IGHG 1/4 und
- b) das Strep-tag Starter Kit 3C (IBA GmbH, Göttingen) für die Zytokine eBAFF und eAPRIL.

Es wurden diese beiden Methoden aus technischen Gründen ausgewählt. Bei dem TACI-IGHG 1 und 4 handelt es sich um einen experimentellen Arzneistoff, der auch am Pferd getestet werden soll. Da es hierbei wichtig ist eine gute Qualität zu bekommen und die Proteine richtig gefaltet und glykosyliert werden müssen, wurden sie in eukaryotischen Zellen, den HEK 293, synthetisiert. Bei eBAFF und eAPRIL handelt es sich um Zytokine, die für das Testsystem benötigt werden, daher wurden diese der Einfachheit halber in *E.coli*-Zellen exprimiert, so konnte auch eine ausreichende Menge hergestellt werden.

3.2.4.2 Zellkultur für die Expression der Proteine in HEK 293 Zellen

Unter Zellkultur versteht man die Kultivierung von Zellen außerhalb eines Organismus, also *in vitro*, unter kontrollierten Bedingungen. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um HEK (Human Embryonic Kidney) 293 Zellen, diese wurden freundlicherweise vom DRFZ zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden diese Zellen zur Proteingewinnung. Alle

Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Hera safe, Heraeus Instruments, Osterrode).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Cellstar Tissue Culture Flaks, Greiner Bio one GmbH, Essen) mit DMEM (Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium, Gibco BRL, Eggenstein), welches mit IgG-freiem, fetalem Kälberserum (FCS) in einer Endkonzentration von 10% versetzt wurde. Sowohl das Zellkulturmedium als auch das PBS (Waschpuffer) wurden vor Verwendung im Wasserbad (GFL GmbH, Burgwedel) auf 37°C erwärmt. Inkubiert wurden die Zellen in einem befeuchteten Brutschrank (CO₂- Inkubator 6000, Heraeus Instruments, Osterrode) bei 37°C und 5% CO₂. Passagiert wurden die Zellen alle 2-3 Tage, abhängig von deren zellulärer Dichte (Konfluenz). Dafür wurde das verbrauchte Kulturmedium von den Zellen abgesaugt (Vacuu Hand Control, Vacuubrand, Wertheim) und es folgte ein kurzer Waschschrift mit sterilem PBS. Nachdem dieses abgesaugt wurde, konnten die adhärennten Zellen durch Zugabe von 2,0 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) vom Untergrund gelöst werden. Die Reaktion wurde mit 10 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS IgG- frei) gestoppt und das gesamte Volumen wurde in ein 50 ml Falkon (Blue Max, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) überführt. Die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut vereinzelt und anschließend mit dem Zellkulturmedium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde für 8 min bei 900 U/min bei 4°C zentrifugiert (3 S-R Heraeus Zentrifuge, Heraeus Instruments, Osterrode), dann wurde der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium wurde 1 ml der Zellsuspension ausplattiert, d.h. im Verhältnis von 1:10.

Bei der Vorbereitung der Transfektion werden die HEK-Zellen wie oben beschrieben gewaschen und vereinzelt. Nach dem anschließenden Zählen (Zell-Zählung 3.2.3.2) werden $2,5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Zellkulturmedium in einer beschichteten Zellkulturschale (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Im Anschluss wurden die Zellkulturschalen für ca. 24 h im CO₂- Inkubator bei 37°C und 4,5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss kann dann die Transfektion erfolgen (3.2.4.2.1).

3.2.4.2.1 Transfektion von TACI-IGHG 1 und 4

Die Transfektion wird verwendet, um die fremde DNA in Form von Plasmiden in die HEK 293 Zellen einzubringen. Die verwendete Plasmid-DNA wurde zuvor in *E.coli*-Bakterien amplifiziert und mit Hilfe eines Plasmidpräparationskit (NucleoBond Xtra Midi Plus, Macherey Nagel GmbH, Düren) aufgereinigt. Die Transfektion der Plasmid-DNA in die HEK-Zellen wird methodisch über die Calcium-Phosphat-Präzipitation erreicht. Dafür wurden die Plasmide von TACI-IGHG 1, TACI-IGHG 2 und das Kontrollplasmid eGFP (grün fluoreszierendes Protein vom DRFZ zur Verfügung gestellt) in einer Konzentration von 20 µg mit 200 µl einer

2,5 M Calcium-Chloridlösung gemischt und auf 1000 µl mit Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNAse free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aufgefüllt. Dazu wurden unter kontinuierlichen begasen (Bläschenentwicklung) mit einer elektronischen Pipettierhilfe (Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences, Fernwald), 1,0 ml phosphathaltige Pufferlösung, (HBS) tröpfchenweise hinzupipettiert. Bei diesem Vorgang treffen Calciumchlorid und Natriumphosphat aufeinander und es kommt zur Bildung von Calciumphosphatkristallen an den DNA-Molekülen, welche ausfallen. Das kontinuierliche Begasen gewährleistet eine homogene Mischung aller Komponenten und vermeidet die Entstehung zu großer Kristalle, die nicht so gut von den Zellen aufgenommen werden können. Der Transfektionsansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise vorsichtig in die Zellkulturschale vom Vortag gegeben, dabei wurde diese gleichmäßig geschwenkt. Danach kamen die Zellkulturschalen für 4 h in den CO₂-Inkubator, in dieser Zeit können die ausgefallenen Kristalle von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig von den Zellen abgesaugt, es wurde zwei Mal mit sterilem, 37°C warmem PBS gewaschen und es wurde neues 37°C warmes Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben.

Nach 24 h und nach 48 h wurden die Überstände von den ursprünglich $2,5 \times 10^6$ Zellen, die in 10 ml Zellkulturmedium ausgesät wurden, abgenommen und in ein steriles Gefäß überführt. Die Überstände wurden steril gefiltert und zur Proteinaufreinigung und Konzentrierung der Überstände den labortechnischen Angestellten übergeben. Anschließend wurde die Erfolgsrate der Transfektion durch die Durchflusszytometrie (3.2.5.1) überprüft. Hierbei wurden als Negativkontrolle die ungefärbten HEK 293 Zellen und als Positivkontrolle die HEK 293 Zellen nach der Transfektion mit dem Kontrollplasmid eGFP verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle der Proteinbiosynthese von TACI-Ig 1 und 4 ein Westernblot (3.2.6.1) durchgeführt, hierbei wurden die HEK 293 Zellen als Negativkontrolle verwendet.

3.2.4.3 Expression der Proteine mit Strep-tag

3.2.4.3.1 Expression in *E.coli*

Für die Proteingewinnung wurde das Strep-tag C3 Kit (IBA GmbH, Göttingen) verwendet. Die in den pASK- IBA6 Vektor klonierten Konstrukte BAFF und APRIL wurden in TOP10 *E.coli* Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert. Dafür wurden jeweils 50 ng des jeweiligen Plasmids in 50 µl kompetente Zellen gegeben und wie unter 3.2.3.7.3 (Transfektion von Plasmid-DNA in Bakterienzellen) beschrieben weiter verfahren. Nach der Inkubationszeit wurde eine Kolonie in eine Vorkultur mit 2,0 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht inkubiert. Anschließend konnten die 2,0 ml Vorkultur in eine 100 ml Kultur mit identischem Medium gegeben werden. Die Zellsuspension kam bei 37°C und 200 rpm in den Schüttelinkubator, bis eine optische Dichte von 550 nm erreicht

war. Dann wurde, vor der Induktion mit 20 µg Anhydrotetracycline, 1,0 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß gegeben, für 30 sek bei höchster Einstellung zentrifugiert (Biofuge pico) und das Zellpellet als nicht induzierte Kontrolle für den Western Blot bei -20°C eingefroren. Nach der Induktion inkubierte das Gemisch für 3 h im Schüttelinkubator bei 30°C und 200 rpm. Im Anschluss wurde für 10 min bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5B Plus, Thermo scientific, Karlsruhe) und das Zellpellet wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

3.2.4.3.2 Aufbereitung des Lysates

Das mit Anhydrotetracycline induzierte Zellpellet (aus 3.2.4.3.1) wurde in 1,0 ml Puffer P (Präparationspuffer) aus dem Strep-tag C3 Kit resuspendiert und dann für 30 min auf Eis gestellt. Dadurch wird die äußere Membran der *E.coli*-Zellen permeabilisiert um die lösliche Komponenten freizugeben, wie z.B. die Plasmid-DNA. Hierbei bleiben Murein-Reste bei den Bakterienzellen vorhanden und man spricht dann von Sphaeroplasten. Der Vorteil dieser Sphaeroplasten ist, dass die Kontamination bei der Proteinpräparation minimiert wird und damit das Protein eine höhere Reinheit besitzt. Nach Ablauf der Zeit, werden 10 µl des gelösten Zellpellets abgefüllt, mit 90 µl Puffer W (Waschpuffer) gemischt und bei -20°C eingefroren, um als spätere Kontrollprobe für die funktionierte Induktion im Western Blot aufgetragen zu werden. Die resuspendierte Lösung wurde für 5 min bei 13000 U/min bei 4°C zentrifugiert (Biofuge pico) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde ebenfalls bei -20°C eingefroren um als Probe im Westernblot aufgetragen zu werden.

3.2.4.3.3 Aufreinigung des Proteins mittels Gravitationsdurchfluss- Säulen

Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Strep-tag Säulen wurden in eine Halterung über ein Becherglas eingespannt und geöffnet. Der Säulenüberstand (Puffer W) wurde aus der Säule gelassen und anschließend diese mit weiteren 2,0 ml Puffer W gewaschen um die Säule zu equilibrieren. Nachdem die Lösung durchgeflossen war, wurde der Überstand mit dem Proteinextrakt aus 3.2.4.3.2 auf die Säule gegeben und es wurde gewartet bis die Lösung komplett von der Säule aufgenommen wurde. Im Anschluss folgten fünf Waschschrte mit jeweils 1,0 ml Puffer W, um die unspezifischen Proteine aus der Säule zu waschen. Von den Waschschrten wurden die Durchflüsse vom ersten und vom vierten Waschschrte aufgefangen um später im Westernblot mit aufgetragen zu werden. Die Eluation der spezifischen Strep-tag Proteine erfolgte im Anschluss durch Zugabe von Puffer E (Eluationspuffer). Dafür wurden sieben Mal 0,5 ml auf die Säule gegeben und jeweils aufgefangen um im Western Blot aufgetragen zu werden, um dann die Durchflüsse mit den vorhandenen Proteinen eBAFF und eAPRIL für

den ELISA-Test zur Kontrolle der Bindungsfähigkeit von TACI-Ig 1 und 4 einsetzen zu können. Alle Reaktionsgefäße mit aufgefangenen Durchflüssen, wurden bis zu ihrer Weiterbearbeitung bei -20°C eingefroren.

Die Säulen wurden nach Herstellerangaben regeneriert, verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.5 Zellbiologische Methoden

3.2.5.1 Durchflusszytometrie

3.2.5.1.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren zur Analyse von Zellen. Hierfür wurde der MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet, der die Zellsuspension ansaugt und sie in einen parallelen Strom von Trägerflüssigkeit injiziert. Dadurch wurden die Zellen vereinzelt und passierten mit hoher Geschwindigkeit genau in der Mitte des Flüssigkeitsstrahls eine Messkammer, wo sie von einem Laserstrahl getroffen werden. Es kommt zu einer Lichtstreuung des Laserstrahls und zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome). Dadurch wird das Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und es kann durch ein komplexes System aus Linsen, Spiegel, Filter und Detektoren im MACSQuant Analyzer gebündelt und zerlegt werden. Dabei können die Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften, intrazellulärer Zusammensetzung und ihrer Färbung erfasst werden. Die Registrierung der Lichtstreuung und die Fluoreszenz der Farbstoffe erfolgt durch die Lichtdetektoren. Die Lichtstreuung unterteilt sich in Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), für die Komplexität und Granularität der Zellen und das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist proportional zur Zellgröße. Die Lichtimpulse werden in elektrische Impulse umgewandelt, die gegen die Zeit aufgetragen werden. Dadurch ergibt sich für jede Zelle eine Kurve, die die Höhe (H), die Weite (W) und die Fläche (A) wiedergibt und es können dann am Computer die sogenannten Gates dargestellt und ausgewertet werden. Diese Methode wurde verwendet um die Effektivität der Transfektion mit den HEK 293 Zellen zu testen. Für die Probenvorbereitung wurden die Zellen (HEK 293) mit Fluoreszenzfarbstoff markiert (Zellmarkierung 3.2.5.1.2), wobei jeder der unterschiedlichen Farbstoffe ein spezifisches Signal besitzt.

3.2.5.1.2 Zellmarkierung

Von den transfizierten HEK 293 Zellen in den Zellkulturschalen wurde jeweils eine mit TACI-IGHG 1, TACI-IGHG 2 und dem Kontrollplasmid eGFP nach 48 h für die Auswertung der Effektivität der Transfektion im Durchflusszytometer verwendet. Die Zellkulturschalen wurden mit 1,0 µg/ml Brefeldin A (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München) für 2 h im CO₂-

Inkubator 6000 (Heraeus Instruments, Osterode) inkubiert. Brefeldin A ist ein Antibiotikum aus Pilzen (*Eupenicillium brefeldianum*), es hemmt den intrazellulären Proteintransport und die Sekretion von Proteinen. Nach der Inkubation erfolgte das Fixieren der Zellen. Dafür wurden sie mit dem vorhandenen Medium von der Zellkulturschale abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 900 U/min bei 4°C zentrifugiert (3 S-R, Heraeus Instruments, Osterode). Es folgte ein Waschschrift mit PBS und nochmaliges Zentrifugieren. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml PFA 4%ig (Paraformaldehyd) und 2 ml PBS resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschwenkt (Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach). Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellsuspension für 10 min bei gleichbleibender Zentrifugeneinstellung zentrifugiert und dann das Zellpellet in 2 ml PBS/BSA resuspendiert. Zum Färben wurden je 50 µl der fixierten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und mit 100 µl Saponin 0,5%ig gemischt. Zu den Proben mit TACI-IGHG 1 und TACI-IGHG 2 wurden in einem Verhältnis von 1:300 Goat Anti Horse IgG FITC (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) pipettiert. Anschließend inkubierten sie für 15 min im Kühlschrank, dann erfolgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml Saponin 0,5 %ig und das Pellet wurde in 300 µl PBS/BSA resuspendiert. Die fixierten und markierten Zellen konnten nun der Durchflusszytometrie zugeführt werden.

Als Kontrollprobe zur Einstellung und Orientierung dienten HEK 293 Zellen, die nicht transfiziert wurden.

3.2.6 Proteinchemische Methoden

3.2.6.1 Western- Blot

3.2.6.1.1 Prinzip

Der Western-Blot wird als Nachweis für Proteine durchgeführt, er ermöglicht eine Identifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Dafür wurden die in 3.2.4.2 (Zellkultur für die Expression der Proteine in HEK 293 Zellen) und 3.2.4.3 (Expression der Proteine mit Strep-tag) gewonnenen Eluate auf ein Gel aufgetragen, nach Größe und Ladung elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend erfolgte der Transfer auf eine Blot Membran. Diese wurde für die Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern angefärbt und im Image Quant LAS 400 (GE Healthcare, München) dargestellt und anschließend ausgewertet.

Alle Verwendeten Western-Blot-Apparaturen und Zubehörteile waren von der Firma Bio-RAD, München).

3.2.6.1.2 Methode

3.2.6.1.2.1 Vorbereitung Sammel- und Trenngel

Für den Western-Blot wurde die diskontinuierliche Variante der Gelelektrophorese verwendet, dabei passierten die Proteine zuerst ein Sammelgel, in dem sie zu einer scharfen Bande fokussiert wurden, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwanderten und eine Trennung der Proteine in ihre Molekularmasse erfolgte. Der Acrylamidgehalt der Trenngele richtet sich nach der Molekularmasse des aufzutrennenden Proteingemisches. Je größer die Molekularmasse ist, desto geringer ist der Acrylamidgehalt, denn dadurch werden die Maschen im gebildeten Gelnetzwerk größer und das Protein mit der größeren Molekularmasse kann gut in dem Gel aufgetrennt werden. Die Trenngele wurden mit einem Acrylamidgehalt von 7,5% (für TACI-Ig) und 12,5% (BAFF und APRIL) verwendet, da die unterschiedlichen Proteine unterschiedliche Molekulargewichte besitzen. Je höher das Molekulargewicht ist umso geringer ist der Acrylamidgehalt der Trenngele, damit sich die Proteine gut in dem Gel bewegen können. TACI- Ig 1 und 4 haben ein Molekulargewicht von 53 kDa und BAFF und APRIL liegen um die 30 kDa. Das Sammelgel hatte immer eine Konzentration von 5%. Das Pipettierschema kann der Tabelle 26 entnommen werden.

Tab.26: Pipettierschema für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele

| Komponente | Trenngel 7,5% | Trenngel 12,5% | Sammelgel 5% |
|---|----------------------|-----------------------|---------------------|
| Rotiphoresegel; 30% acrylamide, 0,8% bisacrylamide | 1,5 ml | 2,5 ml | 0,33 ml |
| Tris/HCl 1,88M, pH 8,8 | 1,2 ml | 1,2 ml | / |
| Tris/HCl 0,625M, pH 6,8 | / | / | 0,4 ml |
| 0,5% SDS | 1,2 ml | 1,2 ml | 0,4 ml |
| Aqua dest. | 2,1 ml | 1,1 ml | 0,87 ml |
| TEMED | 5,0 µl | 5,0 µl | 2,0 µl |
| APS 10% | 30,0 µl | 30,0 µl | 10,0 µl |

Die Substanzen für das Trenngel wurden in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, zuletzt kamen TEMED (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) als Starter und 10%iges APS (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) als Beschleuniger dazu. Das Gemisch wurde zügig und blasenfrei zwischen die Glasplatten gegeben, bis 1,5 cm unterhalb des Randes und dann für eine saubere Phasengrenze mit Aqua dest. überschichten. Die Glasplatten mit einem 1,0 mm Spalt Zwischenraum wurden vorher Senkrecht in die Haltevorrichtung auf Dichtegummis eingespannt, so dass nichts auslaufen kann. Nach etwa 20 min ist das Trenngel zwischen den Glasplatten komplett polymerisiert und das Sammelgel kann angesetzt werden. Dieses wurde dann nach Entfernung des überschichteten Aqua dest. auf das ausgehärtete Trenngel

gegeben, ein Kamm wurde vorsichtig (um Blasenbildung zu vermeiden) eingesetzt und gute, gleichförmige Geltaschen entstehen. Das Gel ist nach ca. 10 min vollständig polymerisiert und der Kamm kann gerade und langsam rausgezogen werden, dann kann die Glasplatte aus der Halterung gelöst werden und in die Vorrichtung für die Gelelektrophorese eingespannt werden. Die Kammer wird mit Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, in Aqua dest.) schaumfrei gefüllt und die Geltaschen werden vorsichtig mit dem Laufpuffer mit einer Pipette ausgespült.

3.2.6.1.2.2 Probenvorbereitung

Nach Auftauen der weggefrorenen Proben die bei der Herstellung der rekombinanten Proteine entstanden sind, wurden jeweils 25 µl jeder Probe mit 3 µl SDS Puffer (2x) gemischt, für 5 min bei 95°C im Heizblock (Techne Dri-Block DB-2A, Biostep GmbH, Jahnsdorf) gestellt, um die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzuheben und dann bei höchste Stufe für 3 min zentrifugiert (Biofuge pico), um entstandenes Kondensat am Deckel der Probe zurückzuführen. Anschließend konnte die gesamte Probenmenge in die Geltaschen gegeben werden. In mindestens eine Geltasche wurden als Molekulargewichtsstandard 10 µl eines Proteinmarkers (Precision Plus Protein Dual Color standards, Bio-RAD, München) mit einer Größenmarkierung von 10 bis 250 kD aufgetragen um die Proteingröße der Proben bestimmen zu können.

3.2.6.1.2.3 Gelelektrophorese

Nachdem das Gel vollständig beladen war, wurde der Deckel aufgesetzt und die Spannungsquelle angeschlossen. Die Einstellung der Spannungsquelle erfolgt je nach Anzahl der Gele, die sich in der Kammer befinden. Bei zwei Gelen wurde das Gerät für die ersten 10 min auf 20 mA eingestellt und dann auf 50 mA hochgeregelt, bei nur einem Gel wurde die Einstellung jeweils um die Hälfte herunter reguliert. Je nach Konzentration der verwendeten Trenngele, dauerte die Auftrennung 60-150 min und eine optische Kontrolle der Elektrophorese war über den aufgetragenen Marker möglich.

3.2.6.1.2.4. Blot

Vorbereitend für den Blot wurden für jedes Gel passend zwei Stücken Filterpapier und eine Blot Membran zugeschnitten, wobei die Membran lediglich mit einer Plastikpinzette angefasst werden darf. Die Membran wurde für 10 sek in Methanol (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) gelegt, um eine Aktivierung der hydrophoben Membran zu erreichen, dann mit Aqua dest. gespült und anschließend mit dem Filterpapier und der Schwamm-Polsterung in einfach konzentriertem Transferpuffer pH 8,3 (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 20% Methanol, in Aqua dest.) eingeweicht. Das vorsichtig aus den Glasplatten herausgelöste

Trenngel wurde blasenfrei auf die Membran gelegt und die Blot-Vorrichtung wie folgt zusammengebaut:

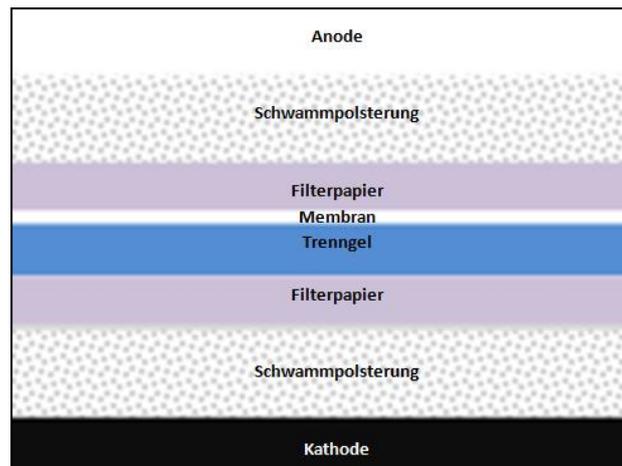


Abb.10: Aufbau der Blot-Vorrichtung von Anode bis Kathode

Nachdem alle Bestandteile blasenfrei aufeinandergelegt wurden, kann die Vorrichtung zusammengeklappt werden und in die Halterung für das Blotten gestellt werden. Diese wurde dann mit Transferpuffer gefüllt, an eine Spannungsquelle mit 14 V angeschlossen, auf einen Magnetrührer (IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen) gestellt und unter leichtem Rühren über Nacht im Kühlraum belassen. Anschließend wird die Membran wieder ausgebaut, mit Aqua dest. gespült und die linke obere Ecke wird zur Orientierung abgeschnitten. Bei erfolgreichem Blot sind auf der Membran die Banden vom Marker zu sehen.

3.2.6.1.2.5 Proteinnachweis

Zum Nachweis des erfolgreichen Proteintransfers auf die Membran benutzt man eine Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), die Proteine färbt. Anschließend wurde die Membran mit Aqua dest. mehrmals gespült. Dadurch konnten Proteinbanden sichtbar gemacht werden und zur Dokumentation eingescannt oder abfotografiert werden.

3.2.6.1.2.6 Blocken und Antikörper-Färbung

Die Membran wurde nach dem Blot von TACI-Ig mit 5% Milchpulver (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und nach dem Blot von BAFF und APRIL mit 3% BSA (jeweils gelöst in TBST) bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler geblockt, um proteinfreie Stellen der Membran zu blockieren und spätere unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Auswahl des Blockmediums erfolgt je nach Antikörper. Es folgten 1,5 h Waschen mit TBST bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, wobei die Lösung mehrfach gewechselt wurde. Nach dem Waschen wurde die Membran im Antikörper Strep-Tactin horse radisch peroxidase

conjugate (HRP) 1:100 aus dem Strep-tag Starter Kit 3C (für BAFF und APRIL) oder mit Goat-anti horse HRP 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für TACI-IGHG 1/4 für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut mehrmals mit TBST für 30 min gewaschen.

3.2.6.1.2.7 Entwicklung

Die Membran wurde auf eine Klarsichtfolie gelegt und mit der Chemilumineszenz Entwicklerlösung (GE Healthcare, Freiburg) gleichmäßig benetzt, dafür wurden vorher jeweils 1 ml der Reagenzien 1 und 2 gemischt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurde die Membran blasenfrei mit einer zweiten Klarsichtfolie abgedeckt und im Image Quant LAS 4000 mit Chemilumineszenz belichtet und die Abbildung gespeichert. Es wurde zum Vergleich auch ein digitales Bild gemacht, auf dem die Banden vom Marker sichtbar sind, um später die Proteingrößen den detektierten Banden zuordnen zu können. Zum Auswerten der Western-Blots wurde das Programm Adobe Photoshop CS4 verwendet.

3.2.6.2 Quantifizierung der Proteinmenge

Für die Quantifizierung der Proteinmenge wurde der Bicinchoinic Acid (BCA) Bradford Protein Assay (Uptima Interchim SA, Montluçon France) verwendet. Dies ist eine photometrische Methode zur Bestimmung von Proteinen im Mikrogramm-Bereich. Dabei kommt es zu Farbkombinationen mit BCA, die bedingt werden durch die Makromolekülstruktur des Proteins, durch die Anzahl der Proteinbindungen und durch die Anwesenheit der vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin. Es finden zwei Reaktionen statt:

1. Protein + Cu²⁺ $\xrightarrow{\text{OH}^-}$ Tetridentat - Cu¹⁺ - Komplex
2. Cu¹⁺ + BCA \rightarrow BCA - Cu¹⁺ - Komplex (purpur gefärbt)

Als Leerwert diente der unter 3.2.4.3 (Expression der Proteine mit Strep-tag) verwendete Elutionspuffer und für die Berechnung des Proteingehaltes aus den Proben wurde eine Verdünnungsreihe von BSA-Lösungen hergestellt. Die verwendeten BSA-Endkonzentrationen waren 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 125 µg/ml und 25 µg/ml. Von der BSA-Standardreihe wurden je 25 µl in ein Well einer 96-Well-Platte eingesetzt und es erfolgten Doppelansätze. Wichtig ist es den Proben-Lösungsmittel-Leerwert der BSA-Verdünnungsreihe (H₂O) mitzuführen. Des Weiteren wurden je 25 µl der aus 3.2.4.3 (Expression der Proteine mit Strep-tag) gewonnen Eluate in die Wells gegeben. Die folgende Darstellung zeigt wie die Proben aufgetragen wurden.

Tab.27: Pipettierschema für die Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Proteinmenge

| | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| H ₂ O | BSA 2000 | BSA 1000 | BSA 500 | BSA 125 | BSA 25 | Eluat Puffer | BAFF E3 | BAFF E4 | BAFF E5 | BAFF E6 | BAFF E7 |
| H ₂ O | BSA 2000 | BSA 1000 | BSA 500 | BSA 125 | BSA 25 | Eluat Puffer | APRIL E3 | APRIL E4 | APRIL E5 | APRIL E6 | APRIL E7 |

Zu den Proben werden anschließend jeweils 0,2 ml BCA-Reagenz pipettiert, dafür werden 50 Teile Reagenz A (Uptima Interchim SA, Montluçon France) mit 1 Teil Reagenz B (Uptima Interchim SA, Montluçon France) gut gemischt, bis die Lösung hellgrün und frei von Schlieren ist. Dann wurde die 96-Well-Platte mit dem Deckel verschlossen, der Inhalt gut vermischen und die Platte für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach abkühlen der Platte wurde die Extinktion in einem Platten-Detektor (EMax Molecular Devices Microplates Reader, VWR International GmbH, Dresden) bei 550 nm bestimmt. Die Auswertung konnte anschließend am Computer mit dem Programm Soft Max Pro vorgenommen werden.

3.2.7 Serologische Methoden

3.2.7.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.7.1.1 Prinzip

Enzyme Linked Immunosorbent Assay ist ein antikörperbasierendes Nachweisverfahren für Proteine. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze. Der Antikörper ist an ein Enzym (hier Alkalische Phosphatase (AP)) gebunden und das Enzym setzt das Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat (p-NPP)) um. Das Produkt der Reaktion hat eine andere Farbe, nämlich gelb, die sich photometrisch auswerten lässt. Mit Hilfe des ELISA soll bewiesen werden, dass das hergestellte eTACI-Ig an die Zytokine eBAFF und eAPRIL bindet.

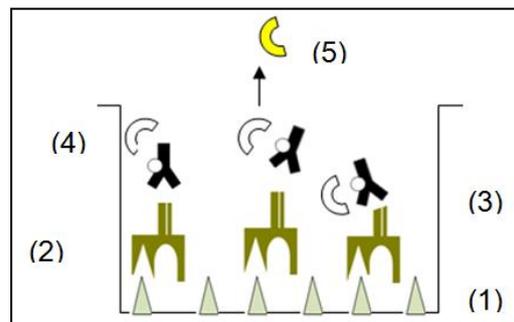


Abb. 11: Schematische Darstellung für ELISA am Beispiel für eAPRIL

- (1) Coating der beschichtete Mikrotiterplatte mit eAPRIL
- (2) Zugabe des Bindungsproteins eTACI-Ig
- (3) Zugabe des enzyme-linked Antikörpers
- (4) Zugabe des Substrates
- (5) Reaktionsprodukt (gelb)

3.2.7.1.2 Methode

Eine beschichtete 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) wurde mit den Zytokinen eBAFF (ca. 4,0 µg/ml) und eAPRIL (ca. 5,5 µg/ml) jeweils im Doppelansatz und mit einer Verdünnungsreihe in Zehnerschritten beschichtet. Aufgrund der hohen Sensitivität (bis zu ng/ml) sind hier nur geringe Konzentrationen der Proteine erforderlich. eTACI-IGHG 1 und 4 (mit ca. 2 und 1 µg/ml) wurden ebenfalls direkt in die Wells gegeben, um zu zeigen, dass der Antikörper überhaupt an das Antigen binden kann. Des Weiteren wurden als Negativkontrolle FCS verwendet und als Positivkontrolle für den Antikörper Pferdeserum, da dieses viel IgG enthält. In jedes Well wurden 50 µl Beschichtungspuffer pipettiert und dann wurde die Platte über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Für die Verdünnungsreihen wurde Verdünnungspuffer verwendet.

Tab. 28: Pipettierschema der 96-Well-Platte

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| eBAFF | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | | eBAFF | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | |
| eBAFF | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | | eBAFF | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | |
| eAPRIL | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | | eAPRIL | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | |
| eAPRIL | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | | eAPRIL | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | | |
| eTACI-IGHG1 | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | eTACI-IGHG4 | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ |
| eTACI-IGHG1 | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | eTACI-IGHG4 | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ |
| FCS | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | Serum | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | 1:10 ⁶ | 1:10 ⁷ | 1:10 ⁸ |
| FCS | 1:10 ¹ | 1:10 ² | 1:10 ³ | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | Serum | 1:10 ⁴ | 1:10 ⁵ | 1:10 ⁶ | 1:10 ⁷ | 1:10 ⁸ |

Anschließend wurde die Platte drei Mal im ELx50 Microplate Strip Washer (BioTek, Vereinigte Staaten) mit PBS-T (Waschpuffer ELISA) gewaschen und dann jedes Well mit je 50 µl 3%igem FCS überschichtet um die Platte für 1,5 h auf dem Schüttler (Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) bei Raumtemperatur zu blocken. Nach dieser Zeit wurde erneut mit drei Durchgängen gewaschen und auf die mit eBAFF und eAPRIL beschichteten Wells 1-6 wurden je 50 µl TACI-Ig 1 und auf die Wells 7-12 je 50 µl TACI-Ig 4 gegeben. Alle anderen Wells versetzte man mit 50 µl PBS, dann kam die Platte für 1,5 h bei 37°C in den Inkubator B6 (Heraeus Instruments, Osterode). Es folgten drei Waschschrte und 50 µl des Antikörpers Goat anti-horse IgG AP (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) wurde in einem Verhältnis 1:1000 in PBS in alle Wells gegeben, dann wurde nochmals 1,5 h

bei 37°C inkubiert, wieder drei Mal gewaschen und anschließend die Detektion mit Sigma FAST p-Nitrophenyl-phosphate Tablets (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 30-60 min erfolgte ein Farbumschlag von transparent nach gelb und die Reaktion wurde mit Natronlauge abgestoppt, welche das Enzym denaturiert. Das Abstoppen der Reaktion gewährleistet, dass kein Substrat mehr umgesetzt werden kann und die Platte im Plattendetektor photometrisch ausgewertet werden konnte.

4. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse beschreiben, entsprechend der Zielsetzung den Weg für die Herstellung des equinen Fusionsproteins eTACI-Ig (Atacicept) und dessen Testung der Bindungsfähigkeit im *in vitro* System. Darunter versteht man, ob das hergestellte eTACI-Ig an die Zytokine eBAFF und eAPRIL binden würden und man damit im Pferd die gewünschte Reaktion erwarten könnte.

4.1 Ergebnisse der *in silico* Analysen des equinen BAFF, APRIL und des extrazellulären TACI

4.1.1 Einleitung

Bei der *in silico* Analyse wurden die equinen Gene für BAFF, APRIL und TACI ermittelt. Da diese Gene zu Beginn der Arbeit für das Hauspferd (*Equus caballus*) in den genetischen Datenbanken UCSC Genome Browser (2007 [<http://genome.ucsc.edu/>]) und NCBI (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) noch nicht erfasst waren, musste der Entwurf der Primer über eine Homologieanalyse ermittelt werden. Die Zytokine eBAFF und eAPRIL sind nun mit folgenden Daten in den Datenbanken vermerkt:

Tab. 29: Die Daten der equinen Zytokine eBAFF und eAPRIL aus der Gendatenbank NCBI

| Zytokin | Accession Number | Referenz |
|-------------------|------------------|--------------------------------|
| eBAFF (TNFSF 13b) | NM_001242445.1 | Marchler-Bauer A et al. (2011) |
| eAPRIL (TNFSF 13) | NM_001205161.1 | Marchler-Bauer A et al. (2011) |

4.1.2 Sequenzhomologie-Analyse

Für die Analyse zur Homologie von BAFF, APRIL und TACI stellte sich nun die Frage ob die Homologie bezüglich dieser Gene größer zur Maus oder zum Menschen ist. Um diese Frage zu beantworten wurde mit Hilfe der Datenbank UCSC Genome Browser ein Sequenzalignment durchgeführt, d.h. ein Genabgleich der gesuchten equinen Gene mit deren menschlichen und murinen Äquivalent. Die Analyse zeigt deutlich eine höhere Homologie des equinen BAFF, APRIL und TACI mit dem Menschen:

Tab. 30: Vergleich der Homologien von equinen BAFF, APRIL und TACI zu Mensch und Maus

| Gen | Homologie Mensch | Homologie Maus |
|-------|------------------|----------------|
| BAFF | 89,6% | 78,3% |
| APRIL | 89,9% | 84,9% |
| TACI | 81,4% | 76,5% |

Unter zur Hilfenahme der rVista 2.0 Software ([<http://rvista.dcode.org/>]) wurden die Homologieverhältnisse der equinen Gene jeweils mit Maus und Mensch anschaulich dargestellt (Abb. 12a, 12b, 12c). Diese Software vergleicht die evolutionären Konservierungen der einzelnen Gene und Genabschnitte und zeigt so die Homologie auf. Die folgenden Abbildungen verdeutlichen die Homologien der Gene TACI, BAFF und APRIL im Vergleich Pferd zu Mensch und Pferd zu Maus.

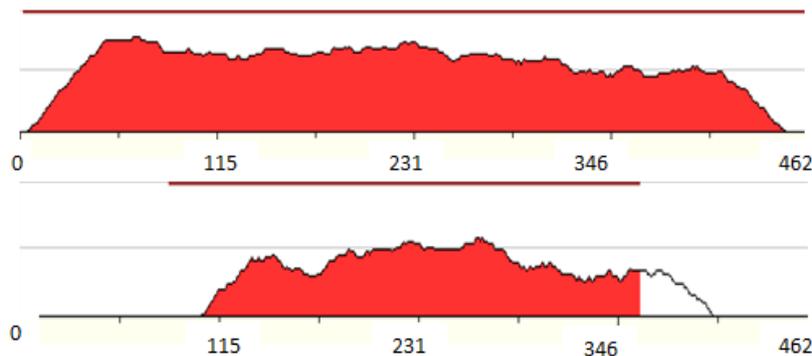


Abb. 12a: Homologieverhältnis des **TACI**-Genlocus im Vergleich Pferd zu Mensch (oben) beträgt 81,4%, sowie von Pferd zu Maus (unten) mit einer Homologie von 76,5%. Die Konservierung lässt eindeutig erkennen, dass die Homologie dieses Gens zum Menschen höher ist.

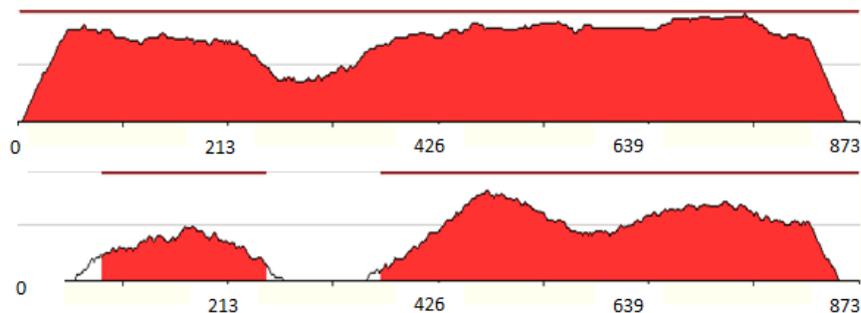


Abb. 12b: Homologieverhältnis des **BAFF**-Genlocus zwischen Pferd und Mensch (oben) beträgt 89,6%, sowie zwischen Pferd und Maus (unten) mit einer Homologie von 78,3%. Die Konservierung lässt eindeutig erkennen, dass die Homologie dieses Gens zum Menschen höher ist.

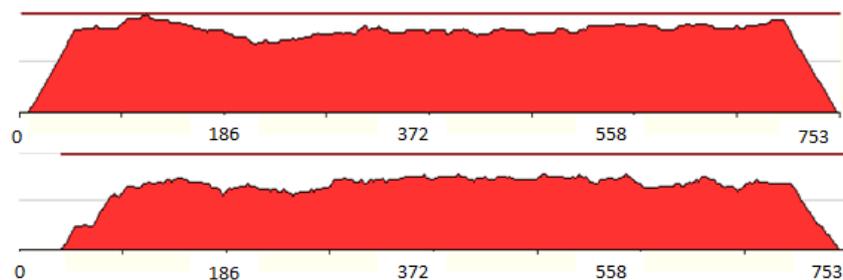


Abb. 12c: Homologieverhältnis des **APRIL**-Genlocus im Vergleich Pferd zu Mensch (oben) beträgt 89,9%, sowie von Pferd zu Maus (unten) mit einer Homologie von 84,9%. Auch hier lässt die Konservierung wieder eindeutig erkennen, dass die Homologie dieses Gens zum Menschen höher ist.

Dabei zeigen sich im Homologievergleich von Pferd mit Mensch prozentuale Übereinstimmungen von 81,4% bei TACI, 89,6% bei BAFF und 89,6% bei APRIL. Beim Vergleich der Gene von Pferd mit den Maus ergaben sich prozentuale Übereinstimmungen von 76,5% bei TACI, 78,3% bei BAFF und 84,9% bei APRIL. Demnach ergibt sich jeweils ein höheres Homologieverhältnis der Genloci zwischen Pferd und Mensch. Das Vorkommen der Gene auf den Chromosomen weicht bei Pferd, Mensch und Maus voneinander ab. Die Verteilung der Gene auf den Chromosomen ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 31: Vorkommen der Gene auf den Chromosomen

| Gen | Mensch | Maus | Pferd |
|------------|---------------|-------------|--------------|
| BAFF | 13 | 8 | 17 |
| APRIL | 13 | 11 | 17 |
| TACI | 17 | 11 | 11 |

4.1.3 Sequenzen der equinen Gene BAFF, APRIL und TACI

Anhand der Sequenzhomologie ergaben sich bzgl. des Hauspferdes (*Equus caballus*) die in Abb. 13a, 13b und 13c dargestellten Gensequenzen für eBAFF, eAPRIL und eTACI. Im Fall von eBAFF und eAPRIL sind die Gensequenzen nun in den Datenbanken erfasst und stimmen mit der ermittelten Homologieanalyse überein. BAFF und APRIL befinden sich beim Pferd auf dem 17. Chromosom, anders als beim Menschen, wo sie auf dem 13. Chromosom liegen.

4.2 Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI

4.2.1 Einleitung

Bevor die optimalen Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI ermittelt werden konnten, mussten die PBMCs aus dem bei der Blutentnahme (3.2.1.1) gewonnenen Pferdeblut isoliert werden (3.2.2.1) und daran anschließend die Extraktion der RNA (3.2.3.1) erfolgen. Bei der Konzentrationsbestimmung der RNA (3.2.3.2) ergaben sich Konzentrationen von 60 bis 95 ng/ μ l. Im Anschluss wurde die Reverse Transkription (3.2.3.3) durchgeführt, wobei die RNA in cDNA umgeschrieben wurde.

4.2.2 Kontrolle der hergestellten cDNA

Die hergestellte cDNA wurde auf ihre Qualität und Reinheit getestet, um im Anschluss die optimalen Bedingungen für die Amplifikation zu ermitteln. Um zu sehen, ob die hergestellte cDNA funktioniert, wurde für diese Kontrolle die Primer (Tabelle 9) des β -Actins vom Hauspferd (*Equus caballus* actin, beta (ACTB), Acc.Nr. NM_001081838) verwendet. Diese ergeben einen Ausschnitt des β -Actins mit 433 bp. Die hiermit durchgeführte PCR und anschließende Agarosegelelektrophorese mit einer Agarosegelkonzentration von 1,5%, hat gezeigt, dass die hergestellte cDNA in ihrer Qualität und Reinheit als Template geeignet ist. Die Bedingungen für die PCR sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt. Die eingestellte Annealing-Temperatur betrug 65°C. Die Abbildung 14 zeigt in beiden Ansätzen eine deutliche Bande bei ca. 433 bp, der Größe die für das β -Aktin zu erwarten war. Die durchgeführte PCR der cDNA mit dem Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) anstelle von Primern, gibt Auskunft über die Reinheit der cDNA.

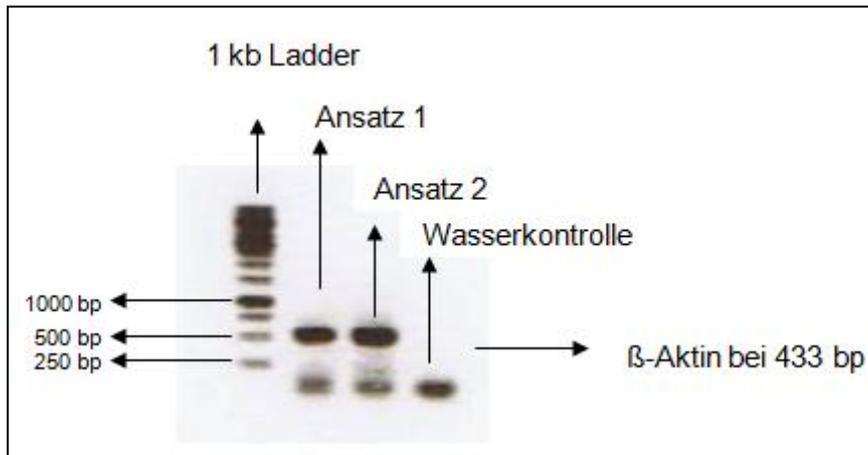


Abb. 14: Kontrolle der cDNA Synthese durch β -Actin PCR
 Es wurde die cDNA im Doppelansatz (Ansatz 1 und 2) mit den β -Aktin-Primern in der PCR getestet und zeigt deutliche Banden bei der zu erwartenden Größe des β -Aktins. Als Kontrolle der cDNA Reinheit erfolgte eine PCR mit Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) anstelle von Primern. Für diese Kontrolle wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt mit einer Agarosegelkonzentration von 1,5%. Die schwachen, unspezifischen Banden, die unterhalb von 250 bp sichtbar sind, sind die Primerpaare, die sich aneinandergelegt haben.

4.2.3 Ermittlung der PCR- Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI

Nachdem sicher gestellt war, dass die hergestellte equine cDNA als Amplifikationsausgangsmaterial geeignet ist, konnten die PCR- Bedingungen für die Primer von eBAFF, eAPRIL und eTACI ermittelt werden. Dafür wurden Verschiedene Annealing-Temperaturen (zwischen 50-65°C) getestet, da die mit Hilfe von der Gendatenbank UCSC berechneten Temperaturen der Primer zwischen 53,1°C und 62,9°C liegen, wie die folgende Tabelle zeigt:

Tab. 32: Primersequenzen von eBAFF, eAPRIL und eTACI mit den ermittelten Annealing-Temperaturen

| Primer | Sequenz | Temperatur |
|--------------|-----------------------------------|------------|
| Eq BAFF- for | 5' AGG AGT GAA ATG GAT GAC TC | 54.0°C |
| Eq BAFF- rev | 5' GTA AGT AGG TCA CAG AAG TTT CA | 53.1°C |

| Primer | Sequenz | Temperatur |
|---------------|--------------------------------|------------|
| Eq APRIL-for | 5' CAG CTC ATG CCA GCT TCA | 59.8°C |
| Eq APRIL- rev | 5' CAA TCA CAG TTT CAC AAA CCC | 58.0°C |

| Primer | Sequenz | Temperatur |
|--------------|-------------------------------|------------|
| Eq TACI-for | 5' TCC TGA GTA ATG AGT GGC CT | 57.3°C |
| Eq TACI- rev | 5' CTT CAG CCC TGA GGG TGC T | 62.9°C |

Die weiteren Bedingungen im PCR Programm erfolgten wie in der Tabelle 11 dargestellt. Die PCR funktionierte für eBAFF, eAPRIL und dem extrazellulärem eTACI am Besten bei folgenden Annealing Temperaturen:

Tab. 33: Annealing-Temperaturen mit den besten Ergebnissen

| Gen | Annealing-Temperatur |
|------------------------------|----------------------|
| Equines BAFF | 60°C |
| Equines APRIL | 55°C |
| Equines extrazelluläres TACI | 60°C |

In der Agarosegelelektrophorese (3.2.3.6) bei einer Gelkonzentration von 1,5% konnten folgende Banden (Abb.15) dargestellt werden. Dabei wurde zur Bestimmung der Bandengröße ein 100 bp DNA- Leiter (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verwendet. Als Positivkontrolle wurden jeweils Sequenzierungen durchgeführt, da es keine geeigneten Positivkontrollen gibt. Das β -Actin vom Hauspferd zeigt, dass die hergestellte cDNA vom Pferd ist und dass sie für die PCR von eBAFF, eAPRIL und eTACI geeignet ist. Als Negativkontrolle wurden anstatt Primer Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eingesetzt.

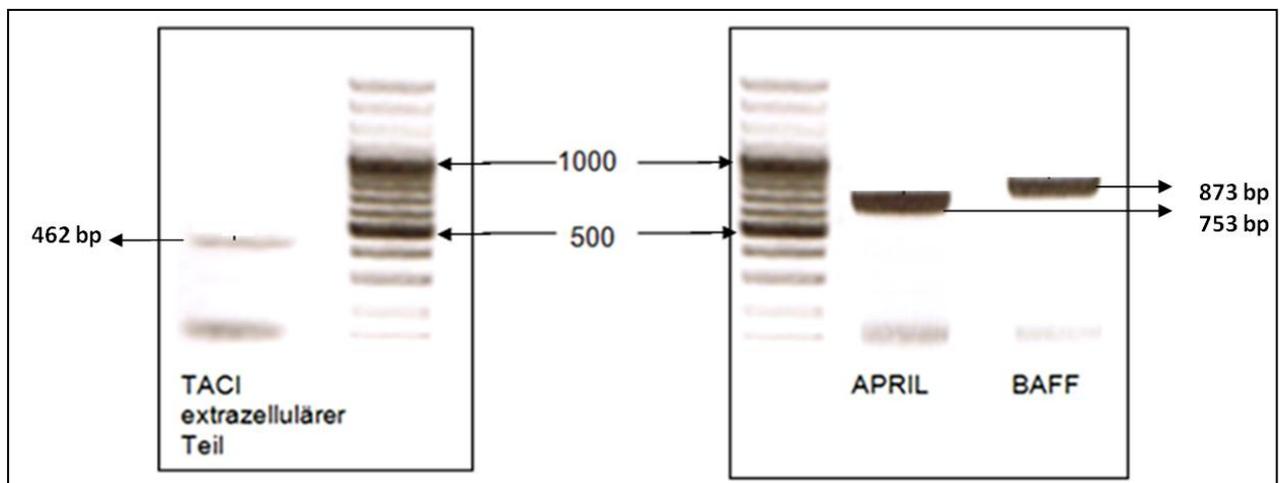


Abb.15: PCR-Nachweis von eBAFF, eAPRIL und eTACI
 Nachweis der Amplifikate vom equinen BAFF mit einer Bandengröße von 873 bp, APRIL mit einer Bandengröße von 753 bp und extrazellulären TACI mit einer Bandengröße von 462 bp. Die sichtbaren Banden sind in den jeweils erwarteten Fragmentgrößen. Für diese Kontrolle wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt mit einer Agarosegelkonzentration von 1,5% und ein 100 bp DNA-Leiter verwendet. Zur Überprüfung der Amplifikate wurden diese Sequenziert. Eine Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung. Als Negativkontrolle wurde Wasser (Ultra pure, distilled water DNase /RNase free, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wie in Abb. 14 verwendet. Die schwachen unspezifischen Banden, die bei ca. 100 bp sichtbar sind, sind die Primerpaare, die sich aneinandergelegt haben.

4.3 Ergebnisse zur Herstellung des Fusionsproteins TACI-Ig

4.3.1 Einleitung

Für die Herstellung des equinen Atacicepts, also des Fusionsproteins TACI-Ig, wurden die Expressionsvektoren pcDNA-IGHG 1 (Wagner et al., 2005) und pcDNA-IGHG 4 (Wagner et al., 2008) verwendet. Diese enthalten bereits das F_C-Fragment des equinen Immunglobulin IgG 1 und 4, an das dann der extrazelluläre Teil des eTACI- Rezeptors gekoppelt wurde. Dafür wurde das extrazelluläre eTACI mittels Primern mit Enzymschnittstellen für *Nhe* I und *Bam*H I (Primer für die Genexpression 3.2.3.4.2) aus dem PCR 2.1 Vektor (Polymerase-Kettenreaktion 3.2.3.5) durch PCR amplifiziert. Durch die neuen Bindungsstellen des extrazellulären eTACI konnte das Konstrukt in die neuen Vektoren pcDNA IGHG 1 und 4 eingebaut und ligiert werden (3.2.3.7.2.3). Vor der Ligation wurde mit den Vektoren ein Restriktionsenzymverdau mit *Nhe* I und *Bam*H I durchgeführt (3.2.3.7.5.3) um die Enden des Inserts mit dem Vektor kompatibel zu machen. Im Anschluss an die Ligation, wurde die Plasmid-DNA, deren Richtigkeit mit der Sequenzierung überprüft wurde, in Bakterienzellen transformiert (3.2.3.7.3) und die gewachsenen Bakterienkulturen einer Plasmid-DNA Präparation (3.2.3.7.4) unterzogen. Die gewonnene Plasmid DNA konnte dann für die Expression der Proteine in HEK 293 Zellen (Zellkultur für die Expression der Proteine in HEK 293 Zellen 3.2.4.2) durch Transfektion (Transfektion von TACI-IGHG 1 und 2; 3.2.4.2.1) eingesetzt werden. Anschließend wurden Messungen mittels Durchflusszytometrie (3.2.5.1) und ein Proteinnachweis mit Hilfe eines Western-Blots (3.2.6.1) durchgeführt.

4.3.2 Transfektionsrate der HEK 293 Zellen

Der Erfolg der Transfektion wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (3.2.5.1) untersucht. Dafür wurden zuerst die ungefärbten HEK 293 Zellen als Kontrollprobe zur Einstellung der Maschine und Orientierung der Gates gemessen (Abb. 16a). Wichtig hierfür ist es Faktoren die die Messung verfälschen zu eliminieren. Dazu zählen Zelltrümmer, Doppelzellen (Dubletten) und Eigenfluoreszenz der HEK 293 Zellen. Gleichzeitig stellen diese ungefärbten Zellen die Negativkontrolle dar.

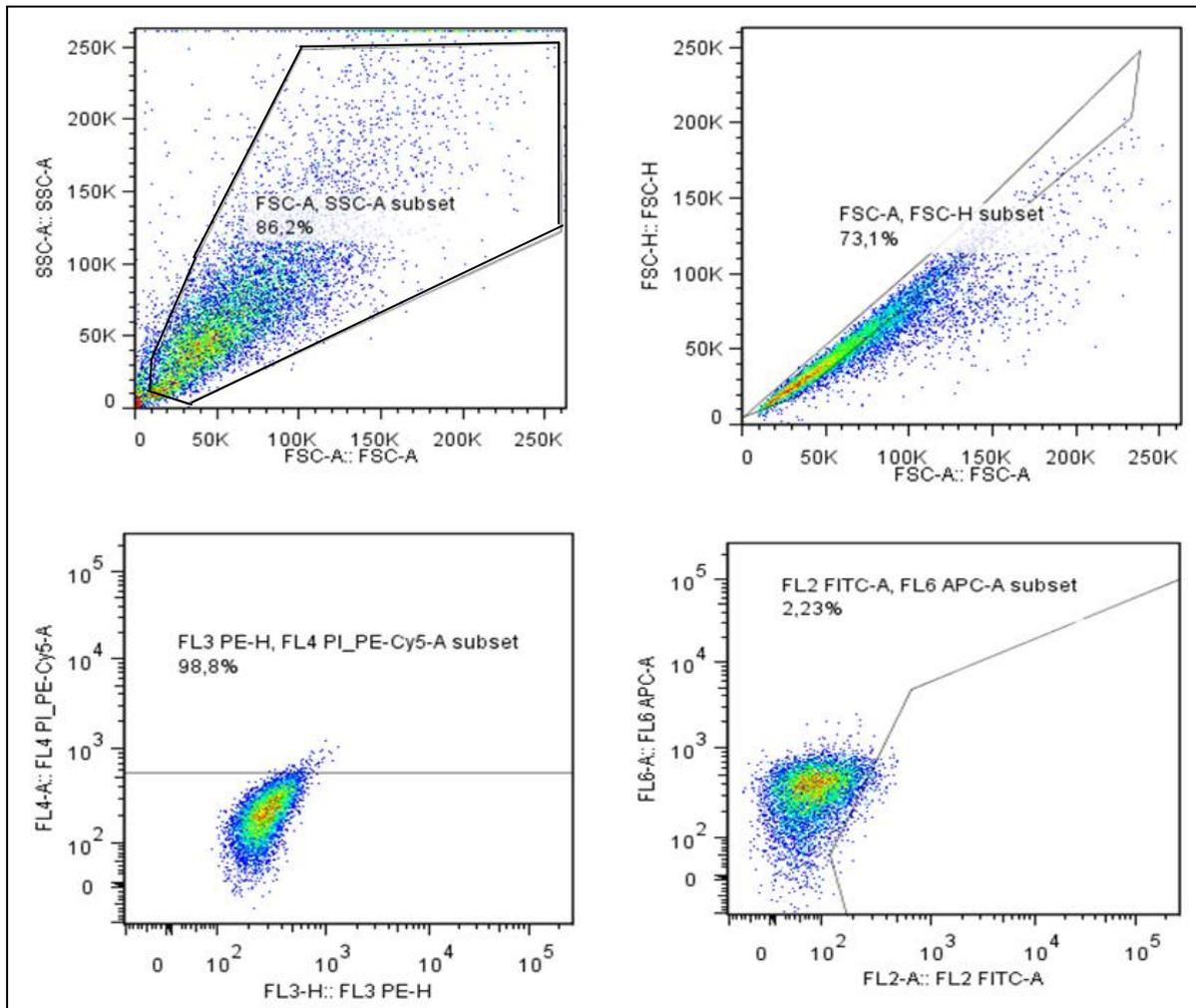


Abb. 16a: Grundeinstellung der Durchflusszytometrie

Diese Darstellungen zeigen die vorgenommenen Einstellungen der ungefärbten HEK 293 Zellen für die Durchflusszytometrie. **Oben links:** Das Seitwärtsstreulicht (SSC) für die Granularität der Zellen wurde gegen das Vorwärtsstreulicht (FCS) für die Zellgröße aufgetragen und mit dem eingezeichneten Gate wurden die vorhandenen Zellrümpfer ausgeschlossen. **Oben rechts:** Die Höhe des Signals einer einzelnen HEK 293 Zelle wird gegen die Fläche des Signals aufgetragen, wodurch Doppelzellen (Dubletten) ausgeschlossen wurden. **Unten links:** Die verschiedenen Fluorochrome wurden gegeneinander aufgetragen, wodurch die Eigenfluoreszenz der Zellen eliminiert werden konnte. **Unten rechts:** Die ungefärbten HEK 293 Zellen wurden so vor ein Gate gesetzt, dass die Verlagerung der Zellen durch die Fluoreszin-Färbung deutlich wird und dadurch die transfizierten Zellen von den untransfizierten Zellen abgrenzbar sind.

Nachdem diese Grundeinstellung des Gerätes erfolgt ist, konnten die Messungen der mit Fluoreszin gefärbten transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt werden und die Transfektionsrate anhand der Einstellung der ungefärbten Zellen berechnet werden. Die Zellen, die mit dem Kontrollplasmid eGFP (enhanced green fluorescent protein) transfiziert wurden, stellen die Positivkontrolle der Transfektion dar. Diese Zellen sind ungefärbt, jedoch enthält dieses Konstrukt das Gen eGFP, das entspricht dem Fluoreszenz-Signal der

Transfektionsrate. Die weiteren Abbildungen (Abb. 16b) zeigen die Transfektionsrate von TACI-Ig 1 und TACI-Ig 4 im Vergleich zu den ungefärbten Zellen und zu der Positivkontrolle. Die Positivkontrolle zeigt ein Fluoreszenz-Signal von 88,1%. Dieses ist deutlich an der Verschiebung der Zellen im Vergleich zu den ungefärbten HEK 293 Zellen erkennbar. Die Transfektionsrate für das TACI-Ig 1, das mit dem IGHG1 gekoppelt wurde beträgt 47,1% und für das TACI-Ig 4, das mit dem IGHG4 gekoppelt wurde beträgt 34,0%.

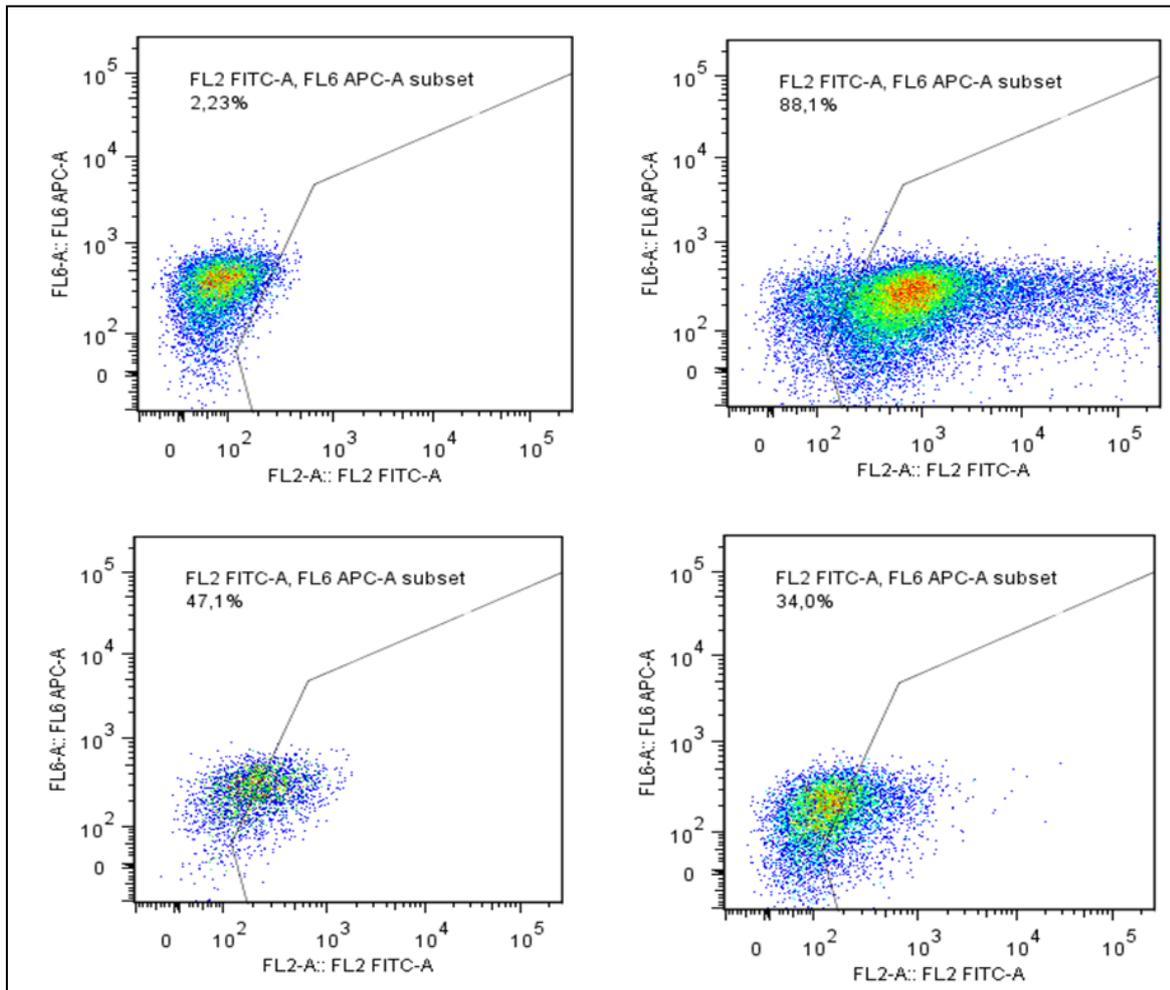


Abb. 16b: Durchflusszytometrie von TACI-Ig 1 und 4

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Transfektion von TACI-Ig 1 und TACI-Ig 4 im Vergleich zur Negativkontrolle (die ungefärbten HEK 293 Zellen) und zur Positivkontrolle (die eGFP Zellen). **Oben links:** Die ungefärbten HEK 293 Zellen als Negativkontrolle. **Oben rechts:** Die Positivkontrolle mit dem Kontrollplasmid eGFP zeigt eine Transfektionsrate von 88,1%. **Unten links:** Transfektion des TACI-Ig 1 mit einer Transfektionsrate von 47,1%. **Unten rechts:** TACI-Ig 4 mit einer Transfektionsrate von 34,0%.

4.3.3 Überprüfung der Proteinbiosynthese von TACI-Ig im Western Blot

Nach der Proteinaufreinigung der Überstände der transfizierten HEK 293 Zellen, wurde mit Hilfe des Western Blots (3.2.6.1) der Proteinnachweis für die Fusionsproteine für TACI-Ig 1 und 4 durchgeführt. Dafür mussten zuvor die Molekulargewichte der Fusionsproteine

bestimmt werden. Mittels der Gendatenbank UCSC Genome Browser (2007 [<http://genome.ucsc.edu/>]) wurde die Proteinsequenz bestimmt und mit Hilfe eines Molekularrechners (http://www.bioinformatics.org/sms/port_mw.html) wurde das Molekulargewicht berechnet. Das Ergebnis der Berechnung lag für beide Fusionsproteine bei ca. 53 kDa.

Tab. 34: Berechnete Molekulargewichte von eTACI und den F_C-Teilen von IGHG 1 und IGHG 4, daraus ergibt sich für die jeweiligen Fusionsproteine TACI-IGHG 1 und 4 ein gesamt Molekulargewicht von ca. 53 kDa

| | Aminosäuren | Molekulargewicht in kDa |
|----------------------|-------------|-------------------------|
| extrazelluläres TACI | 154 | 17,1 |
| equines IGHG 1 | 330 | 36,1 |
| equines IGHG 4 | 327 | 35,8 |

Im Western Blot wurde als Negativkontrolle eine Probe mit HEK 293 Zellen aufgetragen. Die unten dargestellte Abbildung zeigt die Membran des Western Blots mit einem Acrylamidgehalt von 7,5%. Mittels Chemilumineszenz konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Da der Proteinmarker durch die spezifischen Antikörper Goat-anti horse HRP 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für TACI-IGHG 1/ 4 nicht detektiert wird und daher durch Chemilumineszenz nicht sichtbar gemacht werden kann, wurde der Proteinmarker nachträglich aus dem eingescannten Foto derselben Membran, die beim Proteinnachweis (3.2.6.1.2.5) mit Ponceau S eingescannt wurde, ausgeschnitten und an die entsprechende Stelle eingefügt. Im Western Blot zeigten sich deutliche Banden bei dem zu erwartenden Molekulargewicht der Fusionsproteine.

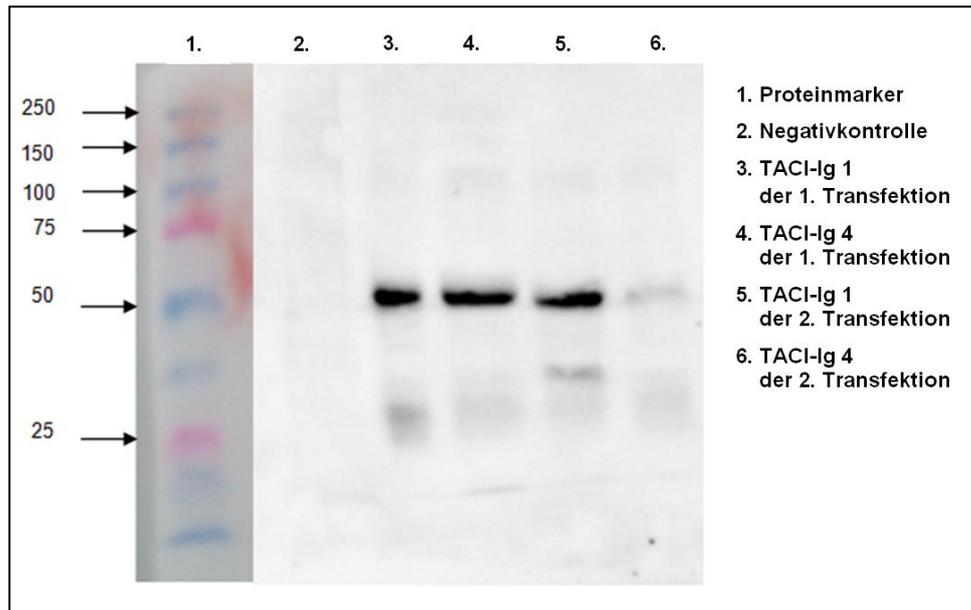


Abb. 17: Western-Blot-Auswertung zu TACI-Ig 1 und 4

Auf der Membran des Western Blots mit einem Acrylamidgehalt von 7,5% sind deutliche Proteinbanden für die Proben von TACI-Ig 1 und 4 im Doppelansatz durchgeführten Transfektionen (1. und 2.) für das zu erwartende Molekulargewicht von etwa 53 kDa sichtbar. In der 6. Spur sind nur schwache Proteinbanden zu sehen, da hier das TACI-Ig 4 geringer konzentriert ist. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK 293 Zellen verwendet. Außerdem sind noch unspezifische Proteinbanden oberhalb und unterhalb der TACI-Ig Banden sichtbar.

4.4 Ergebnisse zur Proteinbiosynthese von eBAFF und eAPRIL

4.4.1 Einleitung

Für die Herstellung der Proteine für die equinen Zytokine BAFF und APRIL wurde der Expressionsvektor pASK- IBA6 verwendet. eBAFF und eAPRIL wurden mit Primern (Primer für die Genexpression 3.2.3.4.2), die die Enzymschnittstelle für *Bsa* I enthalten aus dem PCR 2.1 Vektor durch PCR (3.2.3.5) herausamplifiziert. Der pASK-IBA6 Vektor wurde vor Einsatz in die Ligation (Ligation in den pASK- IBA6 Vektor 3.2.3.7.2.2) mit dem *Bsa* I Restriktionsenzym verdaut (Restriktionsenzymanalyse vom pASK-IBA6 Vektor 3.2.3.7.5.2), so dass die Enden des Inserts kompatibel mit dem des Vektors sind. Im Anschluss an die Ligation wurde die Plasmid-DNA in Bakterienzellen transformiert (Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen 3.2.3.7.3) und die gewachsenen Bakterienkulturen einer Plasmid-DNA Präparation unterzogen (3.2.3.7.4). Die gewonnene Plasmid DNA wurde durch Sequenzierung bestimmt und konnte dann nach Angaben des Strep-tag C3 Kit (Expression der Proteine mit Strep-tag 3.2.4.3) für die Expression der Proteine verwendet werden. Ein Proteinnachweis wurde mit Hilfe eines Western-Blotes (3.2.6.1) mit einem Acrylamidgehalt von 12% durchgeführt.

4.4.2 Überprüfung der Proteinbiosynthese von eBAFF und eAPRIL im Western Blot

Im Anschluss an die Proteingewinnung wurde der Proteinnachweis von eBAFF und eAPRIL mit Hilfe des Western Blots (3.2.6.1) mit einem Acrylamidgehalt von 12% durchgeführt. Dafür mussten zuvor die Molekulargewichte der Fusionsproteine bestimmt werden. Mittels der Gendatenbank UCSC Genome Browser (2007 [<http://genome.ucsc.edu/>]) wurde die Proteinsequenz bestimmt und mit Hilfe eines Molekularrechners (http://www.bioinformatics.org/sms/port_mw.html) das Molekulargewicht berechnet. Die Ergebnisse der Berechnung sind der Tabelle 35 zu entnehmen.

Tab. 35: Berechnete Molekulargewichte von eBAFF und eAPRIL

| | Aminosäuren | Molekulargewicht in kDa |
|---------------|-------------|-------------------------|
| equines BAFF | 291 | 31,9 |
| equines APRIL | 251 | 27,8 |

Die Banden von eBAFF liegen im Western Blot zwischen 25 und 37 kDa (rote Pfeile), was zu der Größe von eBAFF mit ca. 32 kDa passt. Sie sind nicht genauer bestimmbar, da das SDS-Gel auf Grund unbalancierter Proteinbeladung schief gelaufen ist, auch bei mehrfacher Wiederholung konnten der Grund für die Imbalancen nicht isoliert werden. Die schwachen Banden lassen auf eine geringe Konzentration des Proteins schließen, die schwächste Konzentration enthält hier das Eluat 4 auf der 8. Spur.

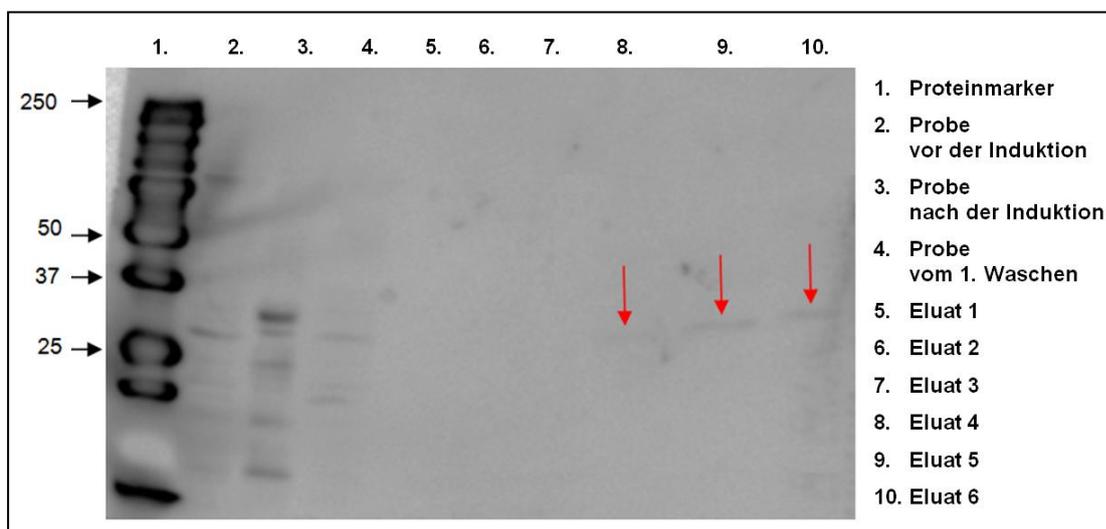


Abb.18: Western-Blot-Auswertung zu eBAFF

Die Membran des Western Blots zeigt nach durchgeführter Entwicklung mit Chemilumineszenz Entwicklerlösung (GE Healthcare, Freiburg) die Erfolgreiche Induktion von der 2. zur 3. Spur und in den Proben Eluat 4, 5 und 6 auf den Spuren 8, 9 und 10 sind Proteinbanden für eBAFF bei der zu erwartenden Molekülgröße von etwa 32 kDa sichtbar.

Die Auswertung von eAPRIL im Western Blot (Abb.19) mit einem Acrylamidgehalt von 12% zeigt für die Eluate 3 bis 6 auf den Spuren 6 bis 9 eine Bande, die hier mit roten Pfeilen gekennzeichnet sind. Diese Banden befinden sich etwa bei 28 kDa und entsprechen dem Molekulargewicht von eAPRIL.

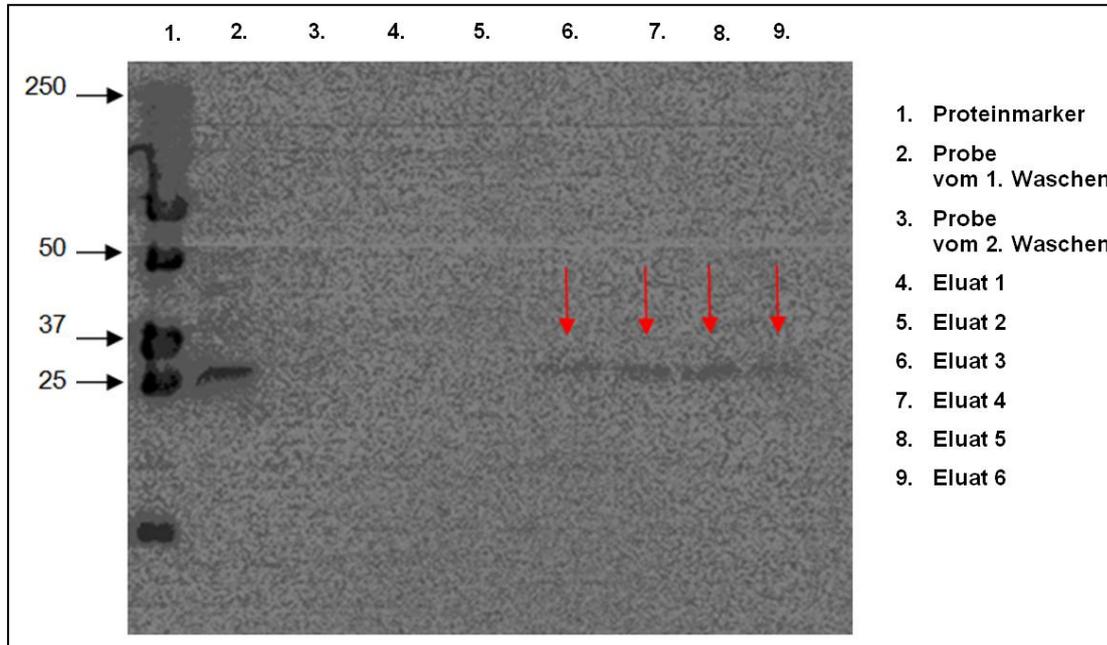


Abb. 19: Western-Blot-Auswertung zu eAPRIL

Auf der Membran des Western Blots für das Zytokin eAPRIL sind Proteinbanden für die Eluate 3-6 auf den Spuren 6-9 in der zu erwartenden Größe von etwa 28 kDa sichtbar.

4.5 Ermittlungen der Proteinmenge von eBAFF und eAPRIL

Die Quantifizierung der Proteinmenge von eBAFF und eAPRIL erfolgte durch den BCA Bradford Protein Assay (Quantifizierung der Proteinmenge 3.2.6.2). Die dabei verwendete Verdünnungsreihe mit 5 Standardverdünnungen der BSA-Proteinstammlösungen wird mittels einer Konzentrations-Extinktions-Kurve ausgewertet, diese ist in der Abbildung 20 dargestellt. Mit Hilfe dieser Standard-Kurve können die unbekannt Proteinkonzentrationen von eBAFF und eAPRIL im Photometer ermittelt werden.

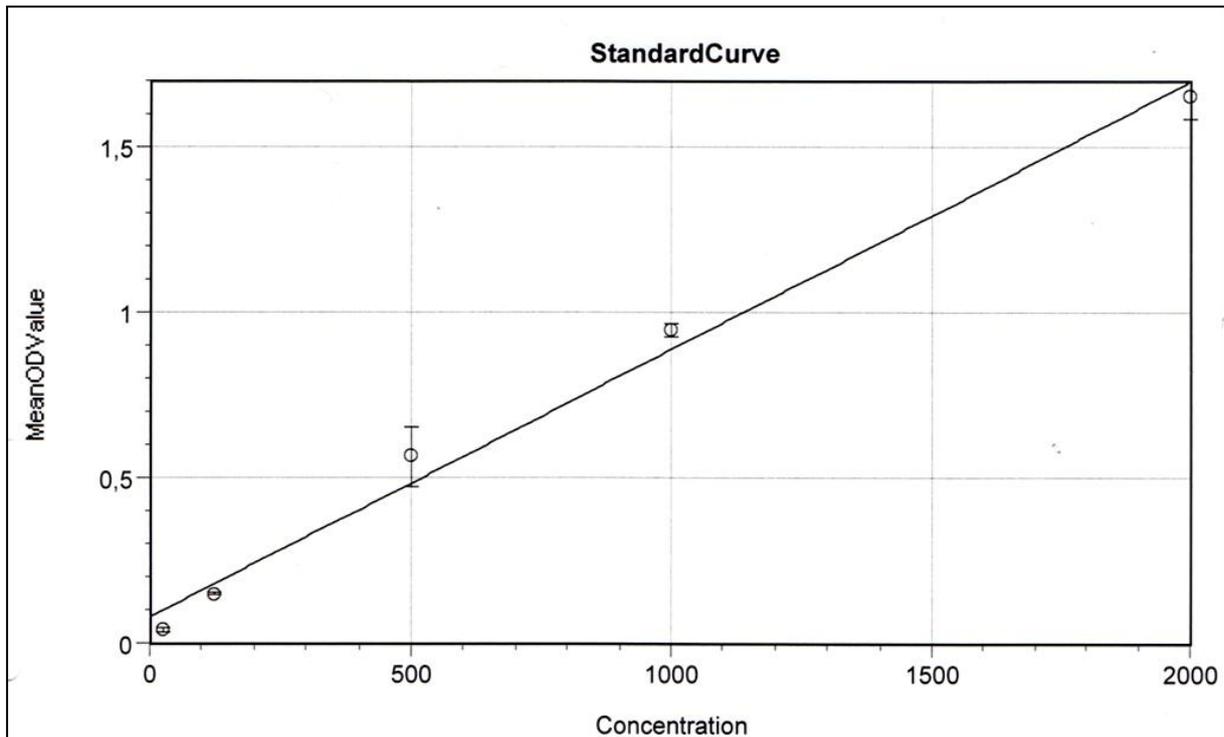


Abb.20: BSA-Standard-Kurve

Die verwendeten BSA-Konzentrationen waren 25, 125, 500, 1000 und 2000 µg/ml, diese wurden gegen die optische Dichte aufgetragen und in einer Standard-Kurve dargestellt.

Aufgrund nur geringer Mengen von eBAFF und eAPRIL konnte die Konzentrationsbestimmung nicht wiederholt werden. Die Auswertung mit dem SoftMax Pro 5.0 ergab für die Proben von eBAFF einen Durchschnittswert von ca. 4,0 µg/ml und für eAPRIL von ca. 5,5 µg/ml.

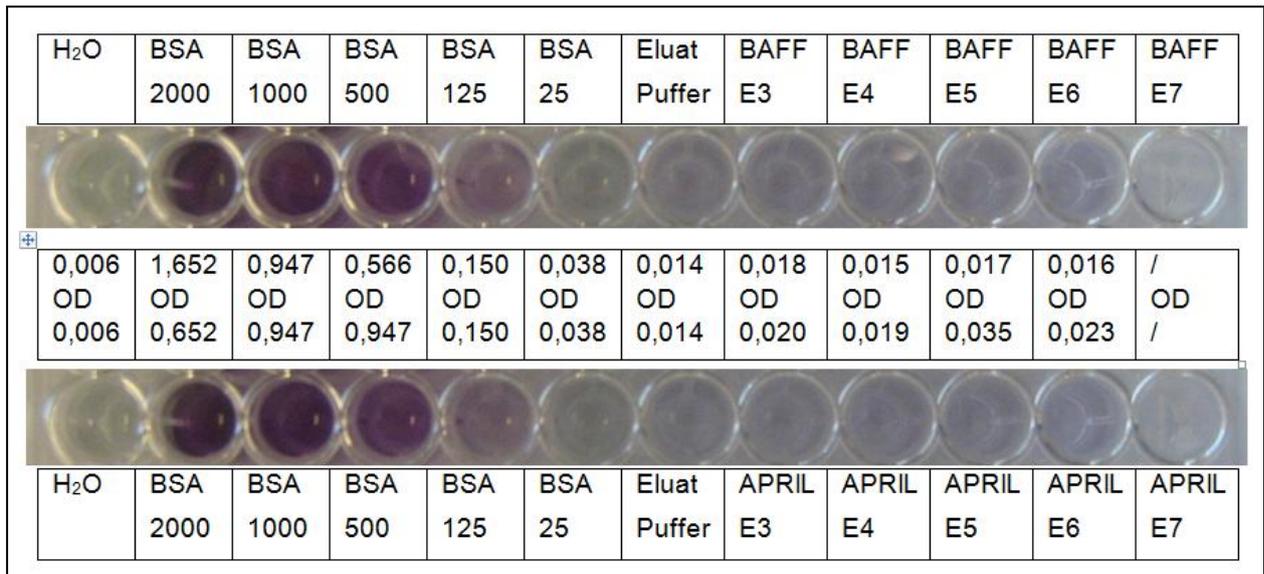


Abb. 21: BCA Bradford Protein Assay
Darstellung der aufgetragenen Proben für die Quantifizierung der Proteine unter Verwendung des BCA Bradford Protein Assay. In der Mitte der Abbildung sind die Werte für die optische Dichte eingetragen. Aus diesen Werten konnte mit Hilfe des SoftMax Pro 5.0 Programm für die Proben von eBAFF ein Durchschnittswert von ca. 4,0 µg/ml und für eAPRIL von ca. 5,5 µg/ml ermittelt werden.

4.6 Ermittlung der Bindungsfähigkeit von TACI-Ig 1 und 4

Für die Ermittlung der Bindungsfähigkeit von TACI-Ig 1 und 4 wurde ein ELISA wie in 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Hierfür wurde eine 96 Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit den Zytokinen eBAFF (ca. 4,0 µg/ml) und eAPRIL (ca. 5,5 µg/ml) jeweils im Doppelansatz und mit einer Verdünnungsreihe in Zehnerschritten beschichtet. Ebenfalls wurde direkt TACI-Ig 1 und 4 (mit ca. 2 und 1 µg/ml) in die Wells gegeben, um zu zeigen, dass der Antikörper überhaupt an das Antigen binden kann. Des Weiteren wurden als Negativkontrolle FCS verwendet und als Positivkontrolle für den Antikörper Pferdeserum (hergestellt in 3.2.1.1) da dieses viel IgG enthält.

Tab. 36: Auswertung vom ELISA bei OD 405

| | | | | | | | |
|----------------|---------------------------------------|--|--|----------------|--|--|--|
| BAFF | Mittelwert bei 0,06 mit TACI-Ig 1 | | | BAFF | Mittelwert bei 0,0135 mit TACI-Ig 4 | | |
| BAFF | Standardabweichung 0,0014 | | | BAFF | Standardabweichung 0,011 | | |
| APRIL | Mittelwert bei 0,062 mit TACI-Ig 1 | | | APRIL | Mittelwert bei 0,0125 mit TACI-Ig 4 | | |
| APRIL | Standardabweichung 0,0071 | | | APRIL | Standardabweichung 0,023 | | |
| TACI- IGHG1 | Mittelwert bei 0,519 | | | TACI- IGHG4 | Mittelwert bei 0,162 | | |
| TACI- IGHG1 | Standardabweichung 0,0085 | | | TACI- IGHG4 | Standardabweichung 0,014 | | |
| FCS | Negativkontrolle | | | Serum | Positivkontrolle | | |
| FCS | | | | Serum | | | |

Die verwendete Positivkontrolle (Pferdeserum aus 3.2.1.1) wurde in einer Verdünnungsreihe von $1:10^4$ bis $1:10^8$ aufgetragen. Aus dieser Verdünnungsreihe und der Messung der Extinktion bei 405 nm ergibt sich eine Standard-Kurve mit sigmoidalem Verlauf, die zeigt bei welcher Verdünnungsreihe eine Sättigung erreicht wird (Abb. 22).

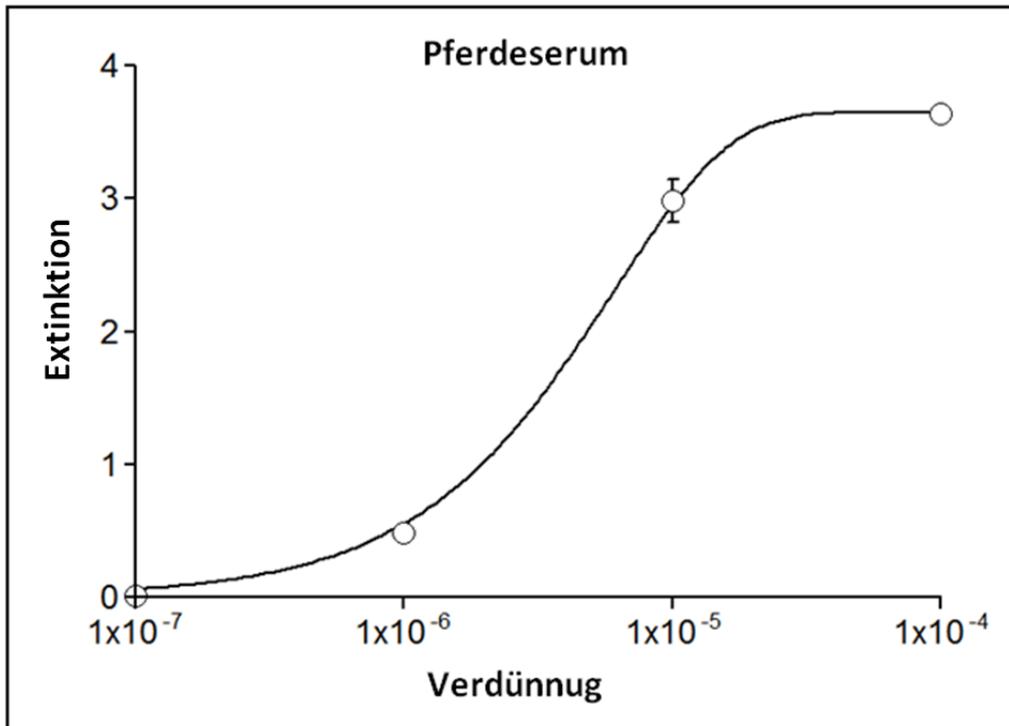


Abb. 22: Standardkurve der Positivkontrolle

Der Kurvenverlauf zeigt die Bindung des Antikörpers Goat anti-horse IgG AP an das Pferdeserum von einer geringen Konzentration (1×10^{-7}) bis zur Sättigung bei einer höheren Konzentration (1×10^{-4}).

Um zu zeigen, dass der Antikörper Goat anti-horse IgG AP an das TACI-Ig bindet, wurde eine Verdünnungsreihe von unverdünnt bis 1:1000 von dem Antigen direkt in die Wells gegeben. Das Ergebnis der Extinktionsmessung von TACI-Ig 1 ist in der Abbildung 23 zu sehen. Hierbei handelt es sich um eine Gerade, da es aufgrund von geringen Konzentrationen zu keiner Sättigung kommt.

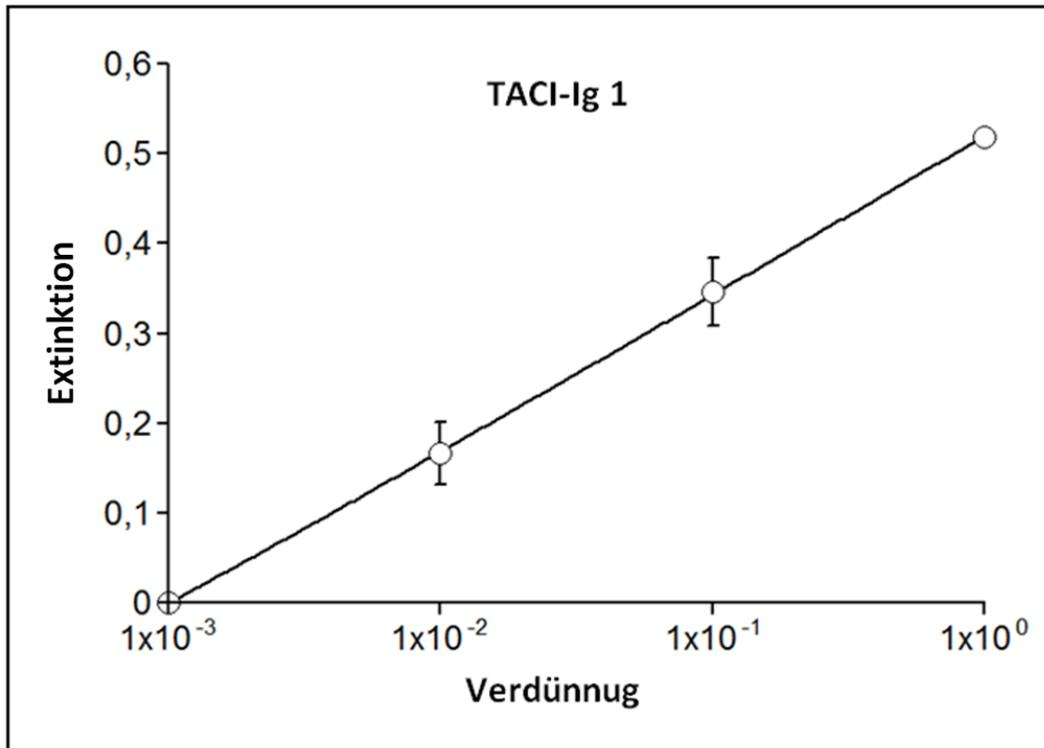


Abb. 23: Extinktionsmessung von TACI-Ig 1

Der Kurvenverlauf zeigt die Bindung des Antikörpers Goat anti-horse IgG AP an TACI-Ig 1, wobei hier mit Abnahme der Verdünnung eine Zunahme der Extinktion deutlich erkennbar ist. Eine Sättigung wird nicht erreicht, da die vorhandenen Konzentrationen dafür nicht ausreichend waren. Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei Wiederholungsansätzen für jede der Verdünnungen.

Die Bindungsfähigkeit von TACI-Ig wird ermittelt indem im ELISA-Test die Bindung von eBAFF und eAPRIL an TACI-Ig nachgewiesen wird. Insgesamt zeigt sich bei der photometrischen Auswertung des ELISAs, dass der Antikörper Goat anti-horse IgG AP an das Immunglobulin gebunden wurde und es bei der Detektion zu einer enzymatischen Reaktion mit Farbumschlag gekommen ist. Aufgrund von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von TACI-Ig 1 und 4 kommt es zu Differenzen in der Antikörperbindung, was deutlich in der Abbildung 24 zu erkennen ist. Die ersten beiden Säulen zeigen, dass TACI-Ig 1 und 4 an den Antikörper Goat anti-horse IgG AP eine Bindung eingehen.

Aufgrund der höheren Konzentration von TACI-Ig 1 kann mehr von dem Antikörper Goat anti-horse IgG AP an das Immunglobulin gebunden werden, wodurch bei der Detektion mit Sigma FAST p-Nitrophenyl-phosphate Tablets (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) eine stärker Farbumschlag durch die enzymatische Reaktion erreicht werden konnte, was die höhere Extinktionssäule in der Abb. 24 erklärt. TACI-Ig 4 besitzt ungefähr $\frac{1}{3}$ der Konzentration von TACI-Ig 1, dadurch erklärt sich die kleinere Extinktionssäule.

Die Säulen 3 bis 6 zeigen, dass TACI-Ig 4 und 1 die in die Wells auf die Zytokine eBAFF und eAPRIL gegeben wurden, jeweils eine Bindung mit eBAFF und eAPRIL eingegangen sind. An das TACI-Ig konnte dann der Antikörper Goat anti-horse IgG AP binden und mittels Detektion mit Sigma FAST p-Nitrophenyl-phosphate Tablets (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) zu einem Farbumschlag führen. Aufgrund der nur geringen Konzentrationen ist auch nur eine geringe Extinktion messbar, doch reicht die dargestellte Bindung von TACI-Ig1 und 4 an eBAFF und eAPRIL aus um damit die die Bindungsfähigkeit von TACI-Ig 1 und 4 an die Zytokine nachzuweisen.

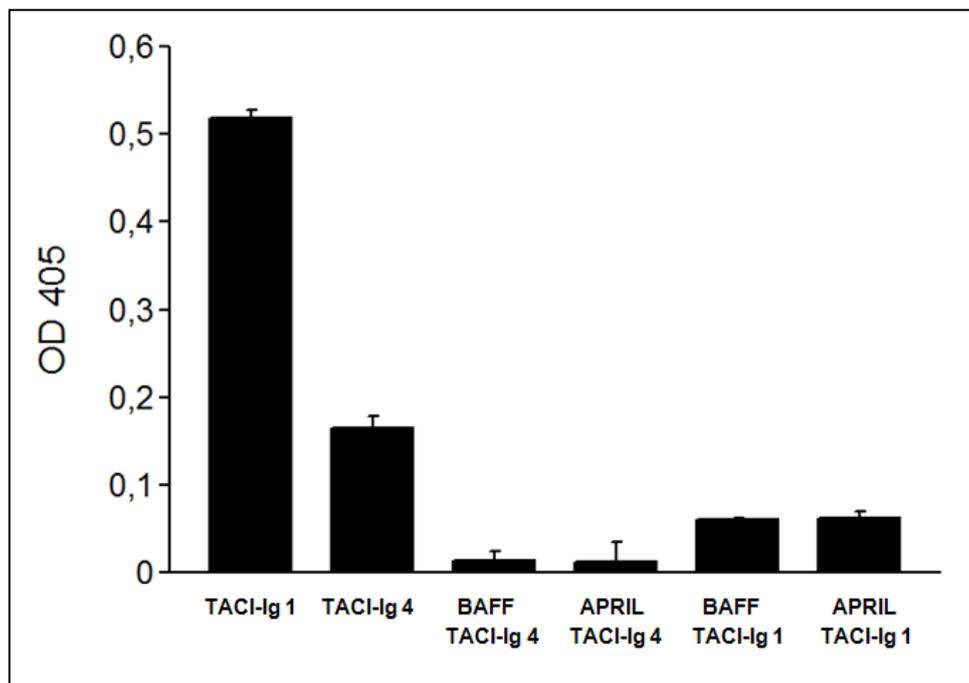


Abb. 24: Extinktionswerte aus dem ELISA-Test von TACI-Ig

Mit den Säulen 1 und 2 für TACI-Ig 1 und 4 soll gezeigt werden, dass der eingesetzte Antikörper Goat anti-horse IgG AP an das hergestellte TACI-Ig bindet. Bei TACI-Ig 1 ist die Konzentration und damit die Bindung des Antikörpers Goat anti-horse IgG AP am Höchsten, dadurch wird hier das meiste Enzym umgesetzt und die Säule für die Extinktion ist am Größten. Bei TACI-Ig 4 beträgt die Extinktion etwas mehr als $\frac{1}{3}$ von TACI-Ig 1, weil die Konzentration von TACI-Ig 4 geringer ist. Dadurch erklären sich auch die Unterschiede zwischen den Reaktionen von eBAFF und eAPRIL mit TACI-Ig 1 und 4. Da für eBAFF und eAPRIL nur geringe Konzentrationen vorhanden sind und sich die Konzentrationen von TACI-Ig 1 und 4 auch unterscheiden, fällt die Bindung von eBAFF und eAPRIL an TACI-Ig 1 und 4 unterschiedlich aus. Bei geringeren Konzentrationen ist die Bindung des Antikörpers geringer und damit das umgesetzte Enzym. Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei Wiederholungsansätzen für jede der Verdünnungen.

5. Diskussion

Das Sommerexzem der Pferde ist eine Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber Insektenstichen. Dabei handelt es sich zwar um keine lebensbedrohliche Erkrankung, doch die Beschwerden durch die starken Symptome, wie Juckreiz bis zur Automutilation, Alopezie, Hautläsionen und starker Unruhe (Wagner et al. 2006), können zu einer Minderung des Gebrauchswertes der betroffenen Pferde (um bis zu 50%) führen. Bei besonders schweren Formen kann es sogar zu einer Euthanasie des Tieres kommen (Hunsinger, 2002). Für das SE gibt es bis heute keine Heilung, sondern lediglich Therapieversuche, die eine Reduzierung der klinischen Symptome oder eine Verzögerung des Krankheitsausbruches bewirken. Diese möglichen Therapieversuche besitzen mehr oder weniger starke Nebenwirkungen. Besonders der Einsatz von Kortikosteroiden oder Antihistaminika, die zwar durch eine Suppression der Immunantwort eine schnelle Linderung der Symptome bewirken besitzen eine ganze Reihe an Nebenwirkungen, wodurch diese Therapie nicht als Langzeittherapie geeignet ist. Zu den Nebenwirkungen zählen u.a. Hufrehe, erhöhtes Infektionsrisiko durch Immunsuppression, Magen-Darm-Ulzeration, verzögerte Wundheilung (Löscher et al. 2010). Aufgrund des Mechanismus der Typ I Reaktion des SEs werden die B-Zellen nach Antigen-Kontakt aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen, die dann die Antikörper (IgE) produzieren und sezernieren oder sie werden zu Gedächtnis-B-Zellen (Hiepe et al. 2005). Um nun diesen Mechanismus zu unterbrechen wurde das equine TACI-Ig entwickelt, damit sollen die Mediatoren BAFF und APRIL, die für das Überleben der Plasmazellen notwendig sind, gebunden und somit die Produktion von Antikörpern verhindert werden. Damit sollen langlebige Plasmazellen die in Nischen sitzen, die von Medikamenten nicht erreicht werden, durch das Blocken von BAFF und APRIL zur Apoptose gezwungen werden, da auch diese von den Zytokinen BAFF und APRIL abhängig sind. Dadurch kann das Gedächtnis für das Immunsystem gelöscht werden und muss im Anschluss neu aufgebaut werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund des Therapienotstandes bei der Behandlung des SEs das equine TACI-Ig (eTACI-Ig) entwickelt und dessen Bindungsfähigkeit mit Hilfe eines *in vitro* Test-Systems nachgewiesen. Mit der Bindungsfähigkeit ist gemeint, dass das hergestellte TACI-Ig die Zytokine eBAFF und eAPRIL binden kann und damit auch die erwünschte Wirkung im Pferd hervorrufen kann.

Dafür mussten folgende Ziele erreicht werden:

1. die extrazelluläre Domäne des equinen TACI (eTACI) erstmals klonieren
2. eTACI an einen F_C-Teil eines equinen Immunglobulins binden (eTACI-Ig)
3. Herstellung von rekombinanten eTACI-Ig

Um dann beweisen zu können, dass das hergestellte Fusionsproteins funktioniert, musste ein *in vitro* System zur Testung hergestellt werden. Dafür war es erforderlich die equinen Zytokine eBAFF und eAPRIL herzustellen, um mit deren Hilfe dann eine Neutralisation durch eTACI-Ig nachzuweisen. Für die Herstellung des Testsystems waren folgende Schritte erforderlich:

3. eBAFF und eAPRIL erstmals klonieren
4. Herstellung von rekombinanten eBAFF und eAPRIL

Der Test erfolgte im Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und soll beweisen, dass das rekombinante equine TACI-Ig an das equine BAFF und APRIL binden kann, also funktional ist.

5.1 In silico Analysen des equinen BAFF, APRIL und der extrazellulären TACI

In Anbetracht der fehlenden Informationen der equinen Gene BAFF, APRIL und TACI in den genetischen Datenbanken zu Beginn dieser Arbeit, mussten die Sequenzen zu diesen Genen über eine Homologieanalyse ermittelt werden. Hierzu musste abgeklärt werden, ob eine höhere Homologie zum Menschen oder zur Maus besteht. Die Ergebnisse zeigen eine höhere Homologie zum Menschen, daher wurden mit Hilfe dieser Homologie die Sequenzen von eBAFF, eAPRIL und eTACI hergeleitet. Die Zytokine eBAFF und eAPRIL wurden im Verlauf dieser Arbeit in den Gendatenbanken vermerkt und stimmen mit den ermittelten Sequenzen aus der Homologieanalyse mit dem Mensch überein. Für eTACI existieren lediglich Vorhersagen in den Gendatenbanken, die sich in den Anfangssequenzen je nach Datenbank unterscheiden. Daher wurden die Sequenz und die Primer aus der Homologieanalyse zum Menschen entworfen und im Anschluss über die Gendatenbank mit der vorhandenen Sequenz des Pferdes verglichen. Aufgrund der verschiedenen vorliegenden Anfangssequenzen für TACI mussten mehrere Versuche mit unterschiedlichen Primern durchgeführt werden, bis die Amplifikation von TACI erfolgreich war. TACI besteht aus einem extrazellulären, intramembranen und intrazellulären Teil. Da nur der extrazelluläre Teil von Bedeutung für das eTACI-Ig ist und um das Fusionsprotein möglichst klein zu halten, wurde auch nur dieser Teil amplifiziert. Aus den Sequenzen für eBAFF, eAPRIL und eTACI konnten die für die Amplifikation benötigten Primer für die PCR entworfen werden. Hierbei war es erforderlich Primer zu entwerfen, die spezifisch sind und nur die eine Gensequenz amplifizieren, daher mussten alle entworfenen Primer in der Gendatenbank durch Analyse der Sequenzhomologien mit den bekannten Gensequenzen vom Pferd überprüft werden. Des Weiteren mussten bestimmte Bedingungen, wie Länge, Schmelztemperatur und Basenpaarabfolge von den Primern erfüllt werden, damit sie zu den gewünschten Ergebnissen führen.

5.2 Optimale Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI

Für die Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Amplifikation von eBAFF, eAPRIL und eTACI musste erst mal sichergestellt werden, dass die hergestellte equine cDNA für die Amplifikation der equinen Gene geeignet ist. Dafür wurden bereits bekannte und funktionierende Primer für das equine β -Aktin eingesetzt. Im Anschluss konnten die optimalen Bedingungen für die entworfenen Primer ermittelt werden. Die Schwierigkeit der Ermittlung der Annealing-Temperaturen bestand in der doch zum Teil großen Abweichung zu den mit der Datenbank UCSC berechneten Temperaturen, wodurch die Ermittlung der richtigen Annealing-Temperaturen für die PCR nicht ganz einfach war.

Es mussten immer wieder PCRs bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt werden, bis in der anschließenden Agarosegelelektrophorese Banden bei den zu erwartenden Größen sichtbar waren. Es erfolgte daraufhin die Sequenzierung um die Richtigkeit der Sequenzen nachzuweisen. Im Anschluss wurden mehrere Wiederholungen der PCR bei den erfolgreichen Temperaturen durchgeführt um die Wiederholbarkeit sicherzustellen.

5.3 Herstellung des Fusionsproteins TACI-Ig

Aus dem equine extrazelluläre TACI wurde mit Hilfe der Expressionsvektoren pcDNA-IGHG 1 und pcDNA-IGHG 4, die von Dr. Bettina Wagner bereitgestellt wurden, die Plasmid-DNA für die Fusionsproteine TACI-IGHG 1 und TACI-IGHG 4 hergestellt. Die Expressionsvektoren enthalten bereits das F_C-Fragment, das für die Herstellung der Fusionsproteine benötigt wird. Der Erfolg der Herstellung der Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft und anschließend konnte die Plasmid-DNA für die Expression der Proteine in den HEK 293 Zellen verwendet werden. Die HEK 293 Zellen wurden für die Proteinbiosynthese verwendet, da es sich bei dem TACI-IGHG 1 und 4 um einen experimentellen Arzneistoff handelt, der auch am Pferd getestet werden soll. Hierbei ist es also wichtig eine gute Qualität des Proteins zu bekommen und dafür müssen die Proteine richtig gefaltet und glykosyliert werden. Für diesen Fall eignen sich besonders eukaryotischen Zellen, wie die HEK 293. Die Durchflusszytometrie wurde zum Nachweis der Transfektionsrate durchgeführt, die für das eTACI-Ig 1 bei 47,1% lag und für eTACI-Ig 4 bei 34%. Die Überprüfung der Proteinbiosynthese konnte im Western Blot erfolgen. Die Ergebnisse im Western Blot zeigen die Proteinbanden in der zu erwartenden Größenordnung.

5.4 Proteinbiosynthese von eBAFF und eAPRIL

Bei eBAFF und eAPRIL handelt es sich um Zytokine, die für das Testsystem benötigt werden. Diese wurden mittels Ligation in den pASK-IBA 6 Vektor eingebracht und der Erfolg mittels Sequenzierung kontrolliert. Für die Proteinbiosynthese wurde das Step-taq C3 Kit

verwendet, wodurch diese der Einfachheit halber in *E.coli*-Zellen exprimiert werden konnten. Damit konnte auch eine ausreichende Menge hergestellt werden. Der Erfolg der Expression von eBAFF und eAPRIL wurde im Western Blot überprüft und die Banden sind bei der zu erwartenden Molekülgröße sichtbar. Die Ermittlung der Proteinmenge von eBAFF und eAPRIL erfolgte im BCA Bradford Protein Assay. Aufgrund nur geringer Volumina von eBAFF und eAPRIL konnte der Test nicht wiederholt werden. Die Konzentrationen sind nur sehr gering, doch für den Nachweis der Bindungsfähigkeit von TACI-Ig reichen sie aus.

5.5 Bindungsfähigkeit des equinen TACI-Ig

Für die Überprüfung der Bindungsfähigkeit vom equinen TACI-Ig muss nachgewiesen werden, dass das hergestellte eTACI-Ig die Zytokine eBAFF und eAPRIL binden kann und damit auch die erwünschte Wirkung im Pferd hervorrufen kann. Die nun als Protein vorliegenden Zytokine eBAFF und eAPRIL wurden dafür in einen ELISA Test eingesetzt, das eTACI-Ig wurde als Bindungsprotein dazugegeben. Darauf wurde der Antikörper Goat anti-horse IgG AP gegeben, der dann durch Zugabe des Substrates zu einem enzymatischen Farbumschlag führte, der durch eine Extinktionsmessung nachgewiesen werden konnte. Im ELISA-Test konnte die Bindungseigenschaft von dem entwickelten eTACI-Ig *in vitro* nachgewiesen werden. Es bindet sowohl an eBAFF als auch an eAPRIL. Die dafür erforderliche Positivkontrolle zeigt die Bindung des Antikörpers Goat anti-horse IgG AP mit Pferdeserum und ergibt einen sigmoidalen Kurvenverlauf, wobei bei höher eingesetzten Konzentrationen des Pferdeserums eine Bindung an den Antikörper bis zur Sättigung erreicht wird. Um nun zu testen ob der Antikörper Goat anti-horse IgG AP auch an das eTACI-Ig bindet, wurde auch hierzu ein Versuch durchgeführt, der zeigt, dass eine Bindung zustande kommt. Die geringen Mengen und Konzentrationen der Zytokine eBAFF und eAPRIL und auch die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von eTACI-Ig 1 und 4 waren hierbei ein wenig problematisch, da nur geringe Extinktionen darstellbar waren. Dieser ELISA-Test lässt keinen Zweifel an der Bindungsfähigkeit des entwickelten eTACI-Ig und das sollte hiermit bewiesen werden.

Für das Pferd handelt es sich um die erste Herstellung von eTACI-Ig und den Zytokinen eBAFF und eAPRIL. In der Humanmedizin und bei der Testung an Mäusen ist dieses System bereits länger bekannt und auch in ihrer Funktionsweise nachgewiesen worden (Gross et al. 2001; Yaccoby et al. 2008)

5.6 eTACI-Ig als Therapie beim SE beim Pferd

TACI-Ig, das rekombinante Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären Teil des TACI-Rezeptors, gekoppelt mit dem F_C-Fragment des Immunglobulins G und zählt zu den B-Zell-gerichteten Therapieeinsätzen (Missler-Karger, 2008). Das TACI-Ig bindet die Zytokine

BAFF und APRIL an sich. BAFF und APRIL sind für die B-Zell-Aktivierung (Laabi, Strasser, 2000), das Überleben der B-Zellen (Batten et al. 2000; Thompson et al. 2000) und deren Entwicklung (Gross et al. 2000; Mackay et al. 1999) notwendig. Sie fördern die Generierung von Plasmablasten und Plasmazellen. Bei der Anwendung von TACI-Ig wird verhindert, dass sich diese Zytokine an die Rezeptoren TACI, BCMA und BAFF-R auf der Oberfläche der B-Zellen und Plasmazellen binden können und der Mechanismus der Plasmazelldifferenzierung und die Entstehung von Antikörpern werden unterbrochen. Beim SE spielt ebenfalls dieser Mechanismus eine Rolle. Es kommt durch das auslösende Allergen zu einer Allergischen Reaktion vom Typ I. Es kommt zum Ablauf einer Reaktionskaskade, die für diese Reaktion typisch ist (Abb.4). Dabei kommt es zur Freisetzung von Zytokinen die zur Aktivierung der B-Zellen und zur Reifung zu Plasmazellen führen. Die Plasmazellen produzieren die Antikörper, die dann für die Ausschüttung der Entzündungsmediatoren verantwortlich sind und damit die Symptome des SE hervorrufen. Die Idee war nun das TACI-Ig beim Pferd einzusetzen, wofür das equine TACI-Ig hergestellt wurde. Mit der Anwendung des equinen TACI-Ig beim Pferd soll der Reaktionsablauf dieser Erkrankung verhindert werden, um damit einen Ausbruch des SE zu unterbinden bzw. eine Heilung herbeizuführen. Das TACI-Ig soll beim Pferd, wie auch schon beim Einsatz bei Mensch und Maus, dazu dienen die vorhandenen Plasmazellen zu eliminieren, einen Abfall der reifen B-Zellen im peripheren Blut und in den lymphatischen Geweben bewirken und einen Abfall des Serumspiegels von Antikörpern und Immunglobulinen (Roll, Tony, 2009). Dadurch konnte im Mausmodell mit induzierter rheumatoider Arthritis der Beginn des Krankheitsausbruchs verzögert und die Schwere der Entzündung gemildert werden und solange die Therapie mit TACI-Ig weitergeführt wurde, konnte eine Erkrankung nicht beobachtet werden (Gross, 2001). Dieser Effekt wäre beim SE beim Pferd wünschenswert. Auch soll mit dem TACI-Ig bewirkt werden, dass die von BAFF und APRIL abhängigen langlebigen Plasmazellen aus ihren Nischen geholt werden und rasch sterben, um damit das immunologische Gedächtnis zu beeinflussen und eine Heilung herbeizuführen bzw. ein Wiederauftreten zu verhindern.

5.7 TACI-Ig als Mittel der Wahl

Alternativ zum TACI-Ig hätte die Wahl der Therapie auch auf den monoklonalen Antikörper anti-BAFF fallen können, das in der Humanmedizin das Belimumab ist. Dabei handelt es sich um einen selektiv immunsuppressiven Wirkstoff, deren Wirkmechanismus auf der Bindung an das lösliche BAFF beruht und somit zur Verkürzung der Lebensdauer von B-Zellen führt (Ding, 2008). Untersuchungen im Mausmodell haben allerdings gezeigt, dass die Hemmung von BAFF und APRIL im Gegensatz zur alleinigen Inhibition von BAFF, das Überleben und die Migration von neugebildeten Plasmazellen ins Knochenmark verhindern. Hierdurch wird

die wichtige Funktion von APRIL während der Immunantwort deutlich (Ingold et al. 2005). Demnach ist es für einen erhofften guten Therapieerfolg, bei der Anwendung im Pferd, wichtig beide Zytokine, BAFF und APRIL, zu hemmen um die Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen zu verhindern. Ein weiteres Medikament in der Humanmedizin ist das Rituximab, dies ist ein chimärer monoklonaler anti-CD20 Antikörper, der sich gegen das Oberflächenmolekül CD20 auf dafür positive B-Zell-Subpopulationen richtet. Es kommt zur B-Zell-Depletion, diese wird durch Apoptose, komplementabhängige B-Zell-Lyse und durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität über Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen bewirkt. Damit wird das Wiederaufkommen von neuen Plasmazellen und von Gedächtnis B-Zellen verhindert. Es wird in der Onkologie bei Lymphomen eingesetzt und bei rheumatoider Arthritis. Der Wirkstoff Rituximab bindet an das CD20-Protein auf der Oberfläche von B-Zellen. Bei den frühen Entwicklungsstufen der B-Zellen, den Stammzellen, ist kein CD20 vorhanden, so dass nach einigen Monaten die Anzahl der B-Zellen wieder normal ist. Auch auf Plasmazellen ist kein CD20 vorhanden, demnach ist der Einsatz von anti CD20 nur für Erkrankungen mit positiven CD20 B-Zellen von Bedeutung (Wolff, 2012), daher ist das TACI-Ig das Mittel der Wahl.

Bei der Betrachtung der Nebenwirkungen beim Einsatz von TACI-Ig in der Humanmedizin wurden bei einer klinischen Studie zur rheumatoiden Arthritis keine signifikanten, durch die Behandlung hervorgerufenen unerwünschten Wirkungen beobachtet. Keiner der Patienten entwickelte Antikörper gegen TACI-Ig. Auch der durch eine Immunisierung gegen Tetanus oder Diphtherie bewirkte Immunstatus wurde durch TACI-Ig nicht verändert (Missler-Karger, 2008). Spätere Studien von Genovese et al. (2011) zur Anwendung von hTACI-Ig bei rheumatoider Arthritis zeigten auch nur vereinzelte Nebenwirkungen. Es traten Muskel-Skelett-Erkrankungen, Bindegewebserkrankungen, Herzerkrankungen, Magen-Darm-Störungen, Infektionen, Hormonstörungen, Störungen im Nervensystem, Blutsystem, Lymphsystem und Immunsystem auf. Auch kam es selten zu Erkrankungen der Haut und des Respirationstraktes. Zwei Patienten starben, einer 145 Tage nach der letzten Gabe des Atacicepts an Darmverschluss und der andere Patient mit bestehenden Herzproblemen verstarb an Herzstillstand. Beim Einsatz von Atacicept bei einer klinischen Studie zum B-Zell Non-Hodgkin's Lymphom, darunter versteht man alle bösartigen Erkrankungen des lymphatischen Systems ausgehend von den B-lymphatischen Zellen, zeigte sich größtenteils eine gute Verträglichkeit. Zu den aufgetretenen unerwünschten Wirkungen gehörten Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Durchfall, Atemnot und Übelkeit. Allerdings hatte ein Forschungsteilnehmer eine Magen-Darm-Blutung mit Blutvergiftung entwickelt und ist am 41. Studientag verstorben (Ansell et al. 2008). Eine weitere Studie zur Anwendung von hTACI-Ig wurde von Ginzler et al. (2012) bei Patienten mit Lupus Nephritis durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Entzündung der Nieren ausgelöst durch Systemischen Lupus

Erythematodes (SLE), eine Erkrankung des Immunsystems, die u.a. auch die Haut, die Gelenke und das Nervensystem schädigen kann. Hierbei wurde das TACI-Ig in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil und Corticosteroiden verabreicht. Beide Medikamente wirken immunsupprimierend und dienen vor allem zur Prophylaxe von akuten Transplantationsreaktionen. Diese Studie musste aufgrund des unerwarteten und schnellen Rückgangs des IgG-Niveaus und dem Auftreten von schwerwiegenden Infektionen vorzeitig beendet werden. Zum Einen könnte hierbei die vorherige Gabe von Mycophenolat-Mofetil und Corticosteroiden eine Rolle spielen und zum Anderen könnte die Biologie dieser Erkrankung zu diesem Effekt beitragen, doch dafür werden weitere Studien erforderlich.

Der schnelle Rückgang des IgG-Niveaus könnte allerdings auch darauf beruhen, dass das TACI-Ig die Plasmazellen sehr effizient depletiert hat und dadurch die Ig Level gesunken sind. Dies könnte man beim Menschen und vielleicht auch beim Pferd durch die Gabe von IVIG (Intravenös Immunglobulin) verhindern.

Die unerwünschten Wirkungen von TACI-Ig beim Menschen lassen sich nicht auf das Pferd übertragen, daher bedarf es Anwendungsstudien am Pferd um eine Aussage über die Verträglichkeit und natürlich auch die Wirksamkeit treffen zu können.

5.8 eTACI-Ig als neue Perspektive für die Behandlung des SEs beim Pferd

Dadurch, dass das TACI-Ig die Zytokine BAFF und APRIL an sich bindet und es zu einer Minderung des Immunglobulin-Niveaus von IgG, IgM und IgA um ca. 30% kommt und auch die naiven B-Zellen und Plasmazellen im Blut reduziert werden (Ginzler et al. 2012), besteht für den Therapieeinsatz beim Pferd zur Behandlung und evtl. zur Heilung des Sommerekzems eine gute Chance, da das TACI-Ig die Zellen beeinflusst, die für den Krankheitsmechanismus verantwortlichen sind. Die Erkenntnisse von Atacicept und den beiden Liganden BAFF und APRIL wurden aus den Mausmodellen und der humanen Forschung gezogen und sollen nun auf das Pferd übertragen werden. Rein hypothetisch gesehen, kann mit den Kenntnissen zum Immunsystem vom Pferd und zum Krankheitsmechanismus des Sommerekzems, die Möglichkeit einer Wirksamkeit des eTACI-Ig und damit einer Linderung und/ oder Heilung der Erkrankung bestehen. Für die Anwendung am Pferd werden dementsprechend höhere Dosen des Medikamentes benötigt. Beim Mensch wurden je nach Literatur Dosierungen von 25-150 mg/ Dosis (Genovese et al. 2011) eingesetzt, das bedeutet umgerechnet (Abb. 25) auf ein Pferd mit 500 kg eine Dosierung von ca. 115-690 mg/ Dosis.

$$\text{Metabolisches Körpergewicht [kg}^{0,75}\text{]} \times \text{Humandosis [mg/kg]} \times \text{Faktor [kg/ kg}^{0,75}\text{]} = \text{Dosis [mg/Tier]}$$

Abb. 25: Formel für die Umrechnung der Humandosis in die Dosierung für das Tier nach Ungemach (Löscher et al. 2010). Für ein 500 kg Pferd müssen $105,7 \text{ kg}^{0,75}$ für das metabolische Körpergewicht in die Formel eingesetzt werden.

Für die Durchführung einer Studienreihe mit eTACI-Ig beim Pferd bedarf es einen Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes. Die Durchführung solcher Studien am Pferd sind aufgrund der Größe der Tiere, deren Bereitstellung zu Versuchszwecken und der entstehenden Kosten nicht ganz unproblematisch. Um Aussagen zur Wirksamkeit, Verträglichkeit und zur Dosierung treffen zu können, muss das eTACI-Ig jedoch am Pferd getestet werden. Doch vorher könnte man noch verschiedene *in vitro* Tests durchführen, bevor es zum Einsatz von eTACI-Ig am Pferd kommt, denn aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen bei verschiedenen Studien am Menschen könnte der Einsatz von eTACI-Ig beim Pferd nicht ganz ungefährlich sein. Es könnten Versuche mit Pferdeblut durchgeführt werden, wobei die Wirkung des eTACI-Igs auf die verschiedenen Zellen (z.B. B-Zellen, Plasmazellen) und die Immunglobuline untersucht werden. Für die Zukunft könnte das eTACI-Ig für die Pferdemedizin ein interessantes Medikament werden, denn es lässt auf eine Therapie mit Heilung bei Sommerekzem hoffen, wodurch vielen betroffenen Pferden ein normales Pferdeleben ermöglicht werden könnte.

6. Zusammenfassung

Neuer Therapieansatz zur Behandlung des Sommerekzems beim Pferd auf molekularbiologischer und immunologischer Ebene: TACI-Ig als Kontrolle seiner pro-inflammatorischen Bindungspartnern BAFF und APRIL

Bei dem Sommerekzem der Pferde kommt es aufgrund einer Überempfindlichkeitsreaktion auf InsektenSpeichel, der beim Saugakt übertragen wird, zu klinischen Symptomen wie z.B. Juckreiz, Alopezie und Hautläsionen. Dies führt zu einer Gebrauchsminderung der betroffenen Pferde bis zu 50% während der Flugzeiten der Insekten von ca. März bis Oktober. Zusätzlich haben diese Pferde einen hohen Leidensdruck. Die Behandlung der Erkrankung ist sehr individuell und alle Therapien sind lediglich Versuche, auf die jedes betroffene Pferd anders anspricht. Sie bewirken teilweise eine Reduzierung der klinischen Symptome, doch gibt es derzeit keine Heilung für das SE.

Diese Arbeit basiert auf einem neuartigen Therapieansatz für das Sommerekzem beim Pferd. Es wurde das als Therapeutikum bei menschlichen Autoimmunerkrankungen bekannte TACI-Ig für das Pferd entwickelt. Damit sollen die Zytokine BAFF und APRIL, die wichtige Regulatoren für die Reifung, Funktion und das Überleben von B-Zellen sind, gebunden werden um deren Wirkung auf die B-Zellen zu neutralisieren. Dadurch wird die Apoptoserate der B-Zellen erhöht. Die Reifung der B-Zellen zur Plasmazellen bleibt aus und es werden keine Immunglobuline produziert. Das wiederum verhindert die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen. Mit dem equinen TACI-Ig (eTACI-Ig) soll auf das Immunsystem des Pferdes eingewirkt werden, um die relevanten Reaktionsmechanismen für die Entstehung und Unterhaltung des Sommerekzems zu beeinflussen und damit den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern.

Für die Entwicklung des eTACI-Igs wurde der extrazelluläre Teil des equinen TACI aus der DNA des Pferdes herausamplifiziert und an einen F_C-Teil eines equinen Immunglobulins gebunden. Im Anschluss wurde die Proteinbiosynthese von eTACI-Ig durchgeführt. Das nun vorliegende Protein wurde in einem *in vitro* Test-System auf seine Bindungsfähigkeit geprüft. Dafür wurden die equinen Zytokine eBAFF und eAPRIL produziert. Mit der Hilfe dieser beiden Zytokine konnte eine Bindung an eTACI-Ig nachgewiesen werden und liefert damit den Beweis für die Funktionsfähigkeit von TACI-Ig. In dem erfolgten ELISA konnte demnach bewiesen werden, dass das entwickelte eTACI-Ig an eBAFF und eAPRIL bindet, womit die Funktionalität des eTACI-Ig *in vitro* nachgewiesen wurde.

Ziel dieses Projektes war es mit Hilfe der Kenntnissen zum Immunsystem des Pferdes und zum Krankheitsmechanismus des Sommerekzems, eine neuartige Therapie durch eTACI-Ig

zu entwickeln und damit einer Linderung und/ oder Heilung des Sommerekzems zu forcieren. Um die richtige Funktionsweise der Therapie im lebenden Organismus zu verifizieren, müssen jedoch einige Vorversuche ausgeführt werden. Es empfehlen sich *ex-vivo* Tests, also Testreihen mit frischem Pferdeblut um eine Wirkung des eTACI-Igs auf die verschiedenen Zellen (z.B. B-Zellen, Plasmazellen) und die Immunglobuline zu untersuchen. Auch müssen Analysen stattfinden, die Einblick auf Wirksamkeit, Verträglichkeit und Dosierung des eTACI-Ig im Pferd geben. Trotz der Schwierigkeiten und hohen Kosten der Produktion von großen Mengen eTACI-Ig zur Behandlung des Sommerekzems sind finale Tests im Pferd nötig.

Für die Zukunft könnte das eTACI-Ig in der Pferdemedizin für den Einsatz beim Sommerekzem ein interessantes Medikament werden, denn es lässt auf eine Therapie mit Aussicht auf Heilung hoffen, wodurch vielen betroffenen Pferden ein normales und unbeschwertes Pferdeleben ermöglicht werden könnte und vielleicht lässt es sich für weitere allergisch bedingte Erkrankungen beim Pferd einsetzen.

7. Summary

New therapeutic approach for treatment of summer eczema in horses on molecular and immunological level: TACI-Ig controlling its pro-inflammatory ligands BAFF and APRIL

Summer eczema in horses represents a seasonal recurrent allergic dermatitis to the insect's salivary proteins of *Culicoides* biting midges. Clinical symptoms of affected horses include itching, alopecia and skin lesions, resulting in a diminished usability of up to 50% during the flight time of the insect from March to October. In addition, horses with summer eczema suffer from a lot of strain. Therapeutical treatment can be very individual as all therapies are approach only and every horse can react distinctly. State of the art therapy can only reduce clinical symptoms, yet a cure of summer eczema is still to be found.

This work is thought to found a new therapeutical approach for the treatment of summer eczema in horse. On the basis of a therapeutical called TACI-Ig used to remedy human autoimmune diseases a strategy was developed to transfer the effective mechanism to the equine model. TACI-Ig neutralizes its pro-inflammatory cytokine ligands BAFF and APRIL, resulting in impaired maturation, functioning and survival of B cells, increases the apoptosis rate of these cells and thereby inhibiting their development into B cells as well as the consecutive production of immunoglobulins. As a result, no inflammatory molecules will be released from mast cells. A systemic administration of equine TACI-Ig (eTACI-Ig) could inhibit mechanisms relevant for development and sustentation of this disease.

In this study eTACI-Ig was developed via PCR amplification of the extracellular part of TACI from horse DNA and coupling it to the F_C region of an equine immunoglobulin. The resulting fusion protein eTACI-Ig was tested for functionality by means of neutralizing its ligands equine BAFF and APRIL, which were also produced in the context of this work. ELISA tests clearly showed binding of eTACI-Ig to eBAFF and eAPRIL, proving the functionality of the newly synthesized fusion protein *in vitro*.

Goal of this project was to transfer knowledge of the immune system of horses and the disease mechanisms to an effective approach for therapeutical treatment and potential cure of summer eczema by eTACI-Ig. Further *ex* and *in vivo* functionality tests are needed, e.g. the *ex vivo* study of its impact on various cell types and equine immunoglobulins on the base of fresh horse blood. Additionally, *in vivo* efficacy, dose responses and tolerance need to be determined. Although, production of big amounts of TACI-Ig can be difficult and expensive, its necessary in order to finally treat summer eczema systemically in horses.

A successful treatment of summer eczema with eTACI-Ig could potentially give rise to treatment and curation of other allergic illnesses in horses and would be a fundamental break-through in horse medical science.

8. Literaturverzeichnis

- Anderson, G.S.; Belton, P.; Kleider, N. (1991):
Culicoides obsoletus (Diptera: Ceratopogonidae) as a causal agent of *Culicoides* hypersensitivity (sweet itch) in British Columbia
J. Med. Entomol. 28: 685-693
- Anderson G.S.; Belton P.; Jahren E.; Lange H.; Kleider N. (1996):
Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Colicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) hyposensitivity
J. Med. Entomol 33: 458-466
- Ansell S.M.; Witzig, T.E.; Inwards, D.J.; Porrata, L.F.; Ythier, A.; Ferrande, L.; Nestorov, I; Devries, T.; Dillon, S.R.; Hausman, D.; Novak, A.J. (2008):
Phase I clinical study of atacept in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma
Clin Cancer Res. 14 (4):1105-1110
- Barbet, J.L.; Bevier, D.; Greiner, E.C. (1990):
Specific immunotherapy in the treatment of *Culicoides* hypersensitivite horses: a double-blind study
Equine Vet. J. 22 (4): 232-235
- Barnard, B.J. (1997):
Some factors governing the entry of *Culicoides spp.* (Diptera: Ceratopogonidae) into stables
Onderstepoort J. Vet. Res. 64 (3): 227-233
- Baselgia, S.; Doherr, M.G.; Mellor, P.; Torsteinsdottir, S.; Jermann, T.; Zubriggen, A.; Jung, T.; Marti, E. (2006):
Evaluation of an in vitro sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses
Equine vet. J. 38 (1): 40-46
- Batten, M.; Groom, J.; Cachero, T.G.; Qian, F.; Schneider, P.; Tschopp, J.; Browning, J.L.; Mackay F. (2000):
BAFF Mediates Survival of Peripheral Immature B Lymphocytes
J. Exp. Med. 192: 1453-1466
- Benson, M.J.; Dillon, S.R.; Castigli, E.; Geha, R.S.; Xu, S.; Lam, K.P.; Noelle, R.J. (2008):
Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL
J. Immunol. 180: 3655–3659
- Bodmer, J.L.; Schneider, P.; Tschopp, J. (2002):
The molecular architecture of the TNF superfamily
Trends Biochem Sci 27: 19-26
- Bossen, C.; Schneider, P. (2006):
BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling
Sem in Immunol. 18: 263- 275
- Brostrom, H.; Larsson, A.; Troedsson, M. (1987):
Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: an epidemiological study
Equine Vet. J. 19: 229-236

- Bruennlein, G. (2001):
 Funktioneller *in-vitro*-Test (FIT) für Typ I-Allergien beim Pferd: Nachweis allergischer Sensibilisierung bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB) sowie Einflüsse verschiedener Therapiemaßnahmen auf den Sensibilisierungsgrad von Patienten
 Vet. Med. Diss. Hannover
- Cassese, G.; Arce, S.; Hauser, AE; Lehnert, K.; Moewes, B.; Mostarac, M.; Muehlinghaus, G.; Szyska, M.; Radbruch, A.; Manz, RA. (2003)
 Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals
 Journal of Immunology 171: 1684–1690
- Coiffier, B.; Haioun, C.; Ketterer, N.; Engert, A.; Tilly, H.; Ma, D.; Johnson, P.; Lister, A.; Feuring-Buske, M.; Radford, J.A.; Capdeville, R.; Diehl, V.; Reyes, F. (1998)
 Rituximab (Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for the Treatment of Patients with Relapsing or Refractory Aggressive Lymphoma: A Multicenter Phase II Study
 Blood 92:1927-1932
- Coombs, R.R.; Gell, P.G.H. (1975)
 The classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity and disease
 Clinical Aspect of Immunology. Oxford, Blackwell Scientific 761-781
- Davidson, A.; Diamond, B. (2001)
 Autoimmune diseases
 N Eng J Med 345: 340-350
- Dietz, O.; Huskamp, B. (2006):
 Handbuch Pferdepraxis
 Enke Verlag 209-210
- Dillon, S.R.; Gross, J.A.; Ansell, S.M.; Novak A.J. (2006):
 An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets
 Nat Rev Drug Discov 5: 235-246
- Ding, C. (2008):
 Belimumab, an anti-BLyS human monoclonal antibody for potential treatment of inflammatory autoimmune diseases
 Expert Opin Biol Ther. 8(11): 1805-1814
- Dubey, A.K.; Handu, S.S.; Dubey, S.; Sharma, P.; Sharma, K.K.; Ahmed, Q.M. (2011):
 Belimumab: First targeted biological treatment for systemic lupus erythematosus
 J Pharmacol Pharmacother 2(4): 317-319
- Eckert, J.; Friedhoff, K.T.; Zahner, H.; Deplazes, P. (2008):
 Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin
 Enke Verlag 455 f.
- Enbergs, H.; Verdross, S. (2005):
 Induktion von Interferon- γ in T-Lymphozyten nach Applikation von Engystol® ad us. vet.
 Biol. Tiermed., Sonderdruck aus 22. Jahrgang, Heft 1: 7-11

- Enbergs, H. (1998):
Wirkung ausgewählter potenziertes Suis-Organpräparate und von Traumeel auf die Aktivität von Phagozyten und Lymphozyten aus dem peripheren Blut von gesunden menschlichen Probanden
Biol. Med. 27 (1): 3-11
- Faltermeier K.A. (2010):
Die Konzentration des B-Zell aktivierenden Faktors BAFF in Serum und Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose
Med. Diss. Giessen
- Gehlen, H.; Niedermaier, G. (2009):
Hauterkrankungen der Pferde Teil 2: Weiterführende Untersuchungen
Praktischer Tierarzt 90, Heft 7
- Geiben, T. (2003):
Untersuchungen zum Sommerexzem sowie zum Einfluss des Immunmodulators Baypamun N® auf die Typ I-Allergie der Pferde
Vet. Med. Diss. Hannover
- Genovese, M. C.; Kinnman, N.; de La Bourdonnaye, G.; Pena Rossi, C.; Tak, P.P. (2011):
Atacicept in Patients With Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Tumor Necrosis Factor Antagonist Therapy
Results of a Phase II, Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Finding Trial
Arthritis & Rheumatism Vol. 63, No. 7: 1793–1803
- Ginzler, E.M.; Wax, S.; Rajeswaran, A.; Copt, S.; Hillson, J.; Ramos, E.; Singer, N.G. (2012):
Atacicept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial
Arthritis Research & Therapy 14:R33
- Gross, J.A.; Johnston, J.; Mudri, S.; Enselman, R.; Dillon, S.R.; Madden, K.; Xu, W.; Parrish-Novak, J.; Foster, D.; Lofton-Day, C.; Moore, M.; Littau, A.; Grossman, A.; Haugen, H.; Foley, K.; Blumberg, H.; Harrison, K.; Kindsvogel, W.; Clegg C.H. (2000):
TAC1 and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease
Nature 404: 995-999
- Gross, J.A.; Dillon, S.R.; Mudri, S.; Johnston, J.; Littau, A.; Roque, R.; Rixon, M.; Schou, O.; Foley, K.P.; Haugen, H.; McMillen, S.; Waggle, K.; Schreckhise, R.W.; Shoemaker, K.; Vu, T.; Clegg, C.H. (2001):
TAC1-Ig Neutralizes Molecules Critical for B Cell Development and Autoimmune Disease: Impaired B Cell Maturation in Mice Lacking BLYS
Immunity, Vol. 15: 289–302
- Halldorsottir, S.; Larsen H.J., (1991):
An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway
Equine Vet. J. 23: 296-299
- Hampel, S.; Rohwer, J.; Leinemann, H.; Schrop, C.; Esch, R.E.; Leibold, W. (2008):
Der Intrakutantest beim Pferd: Realistischere Betrachtung zur Anwendung -
Wissenschaftliche Grundlagen und praktische Durchführung
Pferdeheilkunde 24: 381-396

- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991)
Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria
Methods Enzymol. 20: 63-113.
- Hartung, H.-P. (2012):
Atacicept bei Multipler Sklerose
Der Nervenarzt 80(12):1462-1472
- Hase, H.; Kanno, Y.; Kojima, M.; Hasegawa, K.; Sakurai, D.; Kojima, H.; Tsuchiya, N.; Tokunaga, K.; Masawa, N.; Azuma, M.; Okumura, K.; Kobata, T.; (2004):
BAFF/Blys can potentiate B-cell selection with the B- cell coreceptor complex
Blood 103: 2257-2265
- Hiepe, F.; Dörner, T. (2005):
Autoantikörper und die Zellen, die sie machen
Z Rheumatol. 64: 389-395
- Hunsinger, B. (2002):
Sommerekzem der Pferde: Spezifische Immunotherapie (SIT)
VETimpulse 11/21
- Ingold, K.; Zumsteg, A.; Tardivel, A.; Huard, B.; Steiner, Q.G.; Cachero, T.G.; Qiang, F.; Gorelik, L.; Kalled, S.L.; Acha-Orbea, H.; Rennert, P.D.; Tschopp, J. and Schneider, P. (2005):
Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners
J Exp Med. 201: 1375-1383
- Janeway, Ch. A.; Travers, P. (1997):
Immunologie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford
- Kaul, S. (1998):
Typ I-Allergie beim Pferd: Prinzipielle Entwicklung eines funktionellen *in-vitro* Nachweises
Vet. Med. Diss. Hannover
- Klein, J. (1991):
Immunologie
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Krebs, H. (1999):
Eigenbluttherapie; Methoden, Indikation, Praxis
Verl. Urban und Fischer bei Elsevier, 4. Auflage
- Kurotaki, T.; Narayama, K.; Oyamada, T.; Yoshikawa, H.; Yoshikawa, T. (1994):
Immunopathological study on equine insect hypersensitivity ("kasen") in Japan
J. Comp. Pathol. 110 (2): 145-152
- Kurotaki, T.; Narayama, K.; Arai, Y.; Arai, S.; Oyamada, T.; Yoshikawa, H.; Yoshikawa, T. (2002):
Langerhans cells within the follicular epithelium and the intradermal sweat duct in equine insect hypersensitivity "Kasen"
J Vet Med Sci. 64 (6): 539-541

- Laâbi, Y.; Strasser, A. (2000):
Immunology Lymphocyte survival-ignorance is BLys
Science 289(5481): 883-884
- Lange, S. (2004):
Untersuchung zur Vererbung des Sommer ekzems beim Islandpferd
Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Lange, S.; Hamann, H.; Deegen, E.; Ohnesorge, B.; Distl, O. (2005):
Investigation of the prevalence of summer eczema in Icelandic horses in northern Germany
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118: 481-489
- Langner, K. F. A. (2005):
Das Sommer ekzem des Pferdes: Untersuchungen zu potentiellen Allergenen aus *Culicoides nubeculosus*
Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Löscher, W., Ungemach, F. R., Kroker, R. (2010):
Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren
Enke Verlag 411 ff.
- Mackay, F.; Woodcock, S.A.; Lawton, P.; Ambrose, C.; Baetscher, M.; Schneider, P.;
Tschopp, J.; Browning, J.L. (1999):
Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune
manifestations
J Exp. Med. 190: 1697-1710
- Marti, E.; Urwyler, A.; Neuenschwander, M.; Eicher, R.; Meier, D.; De Weck, A.L.; Gerber, H.;
Lazary, S.; Dahinden, C.A. (1999):
Sulfidoleukotriene generation from peripheral blood leukocytes of horses affected with insect
bite dermal hypersensitivity
Vet. Immunol. Immunopathol. 71 (3-4): 307-320
- Marti, E. (2004):
Cloning and sequencing of a cDNA expressing a ribosomal P0 peptide from *Culicoides
nubeculosus* (Diptera)
Veterinary immunology and immunopathology 99-111
- Marti, E. (2009):
Aktuelle Forschungsergebnisse zum Sommer ekzem beim Pferd
Gruppe Klinische Immunologie Departement für klinische Forschung
Vetsuisse Fakultät Bern
- Mehlhorn, H.; Piekarski, G. (1998):
Grundriss der Parasitenkunde
Gustav Fischer Verlag 427
- Meurer, D. G.; Wolf, S. (2007):
Allgemeine Pathologie
Schattauer GmbH 125-154
- Missler-Karger B. (2008):
Die Rally geht weiter: Atacicept ist der nächste Kandidat unter den Biologicals der dritten
Generation
Arthritis & Rheumatism 58 (1): 61-72

Moore, P.A.; Belvedere, O.; Orr, A.; Pieri, K.; LaFleur, D.W.; Feng, P.; Soppet, D.; Charters, M.; Gentz, R.; Parmelee, D.; Li, Y.; Galperina, O.; Giri, J.; Roschke, V.; Nardelli, B.; Carrell, J.; Sosnovtseva, S.; Greenfield, W.; Ruben, S.M.; Olsen, H.S.; Fikes, J.; Hilbert, D.M. (1999): BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator
Science 285: 260-263

Moser, K.(2008):
Grundlagen des Überlebens von Plasmazellen im autoimmunen (NZBxNZW)F1 Mausmodell des Systemischen Lupus Erythematoses
Dissertation DRFZ

Mülhardt, C. (2009):
Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics
Spektrum Akademischer Verlag

Mukhopadhyay, A.; Ni, J.; Zhai, Y.; Yu, G.L. and Aggarwal, B.B. (1999):
Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase
J Biol Chem. 274: 15978-15981.

Nagel, A (2009)
Charakterisierung der humoralen und zellulären Autoimmunantwort nach B-Zell-depletierender Therapie beim Pemphigus vulgaris
Dissertation Marburg

Newman, E. (1834)
Attempted division of British Insects into natural orders
Entomological Magazine

Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K. (1987):
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Roll P.; Tony H.-P. (2009):
B-Zell-gerichtete Therapie bei Autoimmunkrankheiten
Z Rheumatol. 68: 255-259

Schneider, P.; MacKay, F.; Steiner, V.; Hofmann, K.; Bodmer, JL.; Holler, N.; Ambrose, C.; Lawton, P.; Bixler, S.; Acha-Orbea, H.; Valmori, D.; Romero, P.; Werner-Favre, C.; Zubler, RH.; Browning, JL.; Tschopp, J. (1999)
BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth
J Exp Med 189(11): 1747-1756

Schneider, P. (2005):
The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation.
Curr Opin Immunol. 17:282-289.

Schuler, G. (1990):
Die Rolle epidermaler Langerhanszellen beim allergischen Kontaktekzem
Macher, E., G. Kolde u. E.B. Bröcker (Hrsg.): Jahrbuch der Dermatologie 1989/90,
Jahrbücher zur Medizin, Biermann-Verlag Münster 21-40

- Shu, HB.; Hu, WH.; Johnson H. (1999):
TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens
J. Leukoc. Biol. 65: 680-683
- Steidle B.; Enbergs H. (2003):
Behandlung des Sommerekzems beim Pferd
Biol. Tiermed., 20. Jahrgang, Heft 1: 8-11
- Steidle B. (2009):
Felduntersuchungen zur Ätiologie und Diagnose des Sommerekzems beim Islandpferd
sowie zur Verlaufskontrolle einer Prophylaxe und Therapie mit homöopathischen Komplex-
Präparaten in Verbindung mit Eigenblut anhand der funktionellen *In-vitro*-Tests HRT und
CAST
Vet. Med. Diss. Berlin Journal-Nr. 3362
- Stohl, W.; Looney, R.J. (2006):
B cell depletion therapy in systemic rheumatic diseases: different strokes for different folks?
Clin Immunol 121: 1–12
- Strothmann, A. (1982):
Beitrag zum Sommerekzem (Allergische Dermatitis) der Islandpferde. Literaturstudie und
eigene Untersuchungen
Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- Stuke, K. (2005):
Entwicklung eines funktionellen in vitro Test (FIT) zur Prüfung der Sensibilisierung feliner
basophiler Granulozyten von Katzen mit kontrollierter Flohexposition
PhD Vet. Med. Diss. Hannover
- Sutherland, C.L.; Rabinovich, B.; Chalupny, N.J.; Brawand, P.; Miller, R.; Cosman, D. (2006):
ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity
with enhancement by IL-15.
Blood 108(4): 1313-1319
- Thompson, JS.; Schneider, P.; Kalled, SL.; Wang, L.; Lefevre, EA.; Cacheros, TG.; Mac Kay,
F.; Bixler, SA.; Zafari, M.; Liu, ZY.; Woodcock, SA.; Qian, F.; Batten, M.; Madry, C.; Richard,
Y.; Benjamin, CD.; Browning, JL.; Tsapis A.; Tschopp, J.; Ambrose, C. (2000):
BAFF binds to the tumor necrosis factor- receptor- like molecule B cell maturation antigen
and is important for maintaining the peripheral B cell population
J Exp Med. 192:129
- Tak, PP.; Thurlings, RM.; Rossier, C.; Nestorov, I.; Dimic, A.; Mircetic, V.; Rischmueller, M.;
Nasonov, E.; Schmidt, E.; Emery, P.; Munafo, A. (2008)
Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: result of a multicenter, phase Ib double-blind,
placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated dose study
Arthritis Rheum 58(1):61–72
- Wagner, B.; Radbruch, A.; Rohwer, J.; Leibold, W. (2003):
Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the
immunoglobulin heavy chain of native IgE
Vet. Immunol. Immunopathol. 92 (1-2): 45-60

Wagner, B.; Miller, W.H.; Morgan, E. E.; Hillegas, J. M.; Erb, H.N.; Leipold, W.; Antczak, D. F. (2006):
IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse
Vet. Res. 37: 813-825

Wagner, R.; Hunsinger, B. (2005):
Serologische Allergietests und spezifische Immunotherapie
Pferdespiegel 2

Wagner, R. (2007):
Was juckt?
Hundkatzeperd 1: 44-47

Wagner, R.; Raabs/ Thaya (2012):
Krustige und schuppige Haut beim Pferd
Vet-MedReport 4/36

Withe, S. D. (2005):
Advances in equine atopic dermatitis, serologic and intradermal allergy testing
Clin. Tech Equine Pract. 4: 311-313

Wolff; J. (2012):
Wirksamkeit und Sicherheit von Rituximab bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis –
Ergebnisse zur B-Zell-Therapie
Medizin Aspekte 2012/06

Xia, X.Z.; Treanor, J.; Senaldi, G.; Khare, S.D.; Boone, T.; Kelley, M.; Theill, L.E.;
Colombero, A.; Solov'yev, I.; Lee, F.; McCabe, S.; Elliott, R.; Miner, K.; Hawkins, N.; Guo, J.;
Stolina, M.; Yu, G.; Wang, J.; Delaney, J.; Meng, S.Y.; Boyle, W.J.; Hsu, H. (2000):
TACI is a Traf-Interacting Receptor for Tall-1, a Tumor Necrosis Factor Family Member
Involved in B Cell Regulation
J Exp Med. 192(1): 137–144.

Yaccoby, S.; Pennisi, A.; Li, X.; Dillon, SR.; Zhan, F.; Barlogie, B.; Shaughnessy, JD. Jr
(2008)
Atacicept (TACI-Ig) inhibits growth of TACI^{high} primary myeloma cells in SCID-hu mice and in
coculture with osteoclasts
Leukemia. 22(2): 406–413.

Yan, M.; Marsters, S.A.; Grewal, I.S.; Wang, H.; Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. (2000):
Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity
Nat Immunol 1: 37-41

9. Anhang

Ergebnisse der Sequenzierungen

eTACI, Sequenzierung durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH, Ebersberg**

```
AGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGGCTTCGCG  
GATCCCTTCAGCCCTGAGGGTGCTGGACCTGCCTCCGAGCCTCTGTGCTCTGGTCCCTGGTACCTTCCCAAGCCG  
TCTGACCTGGTTTCAAGCTGGCCCCGGCCGCTGCCTCCTGAGCTCCGGGGGCGGGTGCATGAGGCTCTTGAGCTTG  
TTCTCACAGAAGAAC  
GTGCACTGCTTGGGGTGGCGTCCGCAGATGGAGGCGCAGCTGACACAGTCCCTCAACAGCTGGTGTAGTACCTG  
CCTTGCTCCTTGAGGCAACTCAGTGACTTGCAGAAGGCTGCACAGGCGCGGGAGTCTGATGGCTGCAGATGGGT  
CTGCAGGAGAGGCAGGCGTTTTCAGCAGGGGGTCCCAGTACTGCTCTTCGGGGCAGGATGGCATGGCCGCCCCCGC  
CGCAGGCCCTGTGGA  
GACCGCTCCTCCCGGTCCGCCCGGCTCCGGCCACCTCGCCTGCTGCGGCCAGGCCACTCATAGCTAGCTAGAAG  
CCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA  
GCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAACGAGCCGGAAGCATAAAAGTGTAAAG  
CTGGGGTGCCTAATG  
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCCGGGAAACCTGTGTCGTCAGCTGCA  
TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTC  
GCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC  
AGGGGATAACGCAGG  
AAG
```

Extracelluläres TACI gekoppelt an das IGHG1 (Sequenz von TACI- Ig); Sequenzierung
durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH, Ebersberg**

```
CTTGAGTGGCCTGGGCCGAGCAGGCGAGGTGGCCGGAGCCGGGGCGGACCGGGAGGAGCGGTCTCCACAGGGCCT  
GCGGCCGGGGGCGGCCATGCCATCCTGCCCCGAAGAGCAGTACTGGGACCCCTGCTGAACGCCTGCCTCTCCTG  
CAGACCCATCTGCAGCCATCAGACTCCGCGCGCCTGTGCAGCCTTCTGCAAGTCACTGAGTTGCCTCAAGGAGCA  
AGGCAGGTACTIONACGA  
CCAGCTGTTGAGGGACTGTGTGAGCTGCGCCTCCATCTGCGGACGCCACCCCAAGCAGTGCACGTTCTTCTGTGA  
GAACAAGCTCAAGAGCCTCATGCACCCGCCCCGGAGCTCAGGAGGCAGCGGCCGGCCAGCTTGAACCAGGTC  
AGACGGCTTGGGAAGGTACCAGGGACCAGAGCACAGAGGCTCGGAGGCAGGTCCAGCACCCCTCAGGGCGGATCCG  
GATCTGTACGACGAT  
GACGATAAGGCCTCCACCACCGCCCCGAAGGTCTTCCGCTGCCCCCGGCTGTGGGACCACATCTGACTCCACG  
GTGGCCCTGGGCTGCCTTGTCTCCGGATACTTCCCCGAGCCAGTGAAGGTGTCTTGGAACTCGGGCTCCCTGACC  
AGTGGCGTGCACACCTTCCCTTCCGCTCCTGCAGTCTCAGGGTTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCT  
GCCAGCACCTGGACC  
AGCGAGACCTACATCTGCAACGTAGTCCACGCGGCCAGCAACTTCAAGGTGGACAAGAGAATCGAGCCCATTTCCC  
AACAACCACCAAAAAGTGTGCGACATGAGCAAGTGTCCCAAATGCCAGCTCCTGAGCTCCTGGGAGGGCCTTCG  
GTCTTTCATCTTCCCCCGAATCCCAAGGACACCCTCATGATACCCGAACACCCGACGT
```

Extracelluläres TACI gekoppelt an das IGHG4 (Sequenz von TACI- Ig); Sequenzierung
durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH, Ebersberg**

```
TTGAGTGGCCTGGGCCGAGCAGGCGAGGTGGCCGGAGCCGGGGCGGACCGGGAGGAGCGGTCTCCACAGGGCCTG  
CGGCCGGGGGCGGCCATGCCATCCTGCCCCGAAGAGCAGTACTGGGACCCCTGCTGAACGCCTGCCTCTCCTGC  
AGACCCATCTGCAGCCATCAGACTCCGCGCGCCTGTGCAGCCTTCTGCAAGTCACTGAGTTGCCTCAAGGAGCAA  
GGCAGGTACTIONACGAC  
CAGCTGTTGAGGGACTGTGTGAGCTGCGCCTCCATCTGCGGACGCCACCCCAAGCAGTGCACGTTCTTCTGTGAG  
AACAAGCTCAAGAGCCTCATGCACCCGCCCCGGAGCTCAGGAGGCAGCGGCCGGCCAGCTTGAACCAGGTC  
GACGGCTTGGGAAGGTACCAGGGACCAGAGCACAGAGGCTCGGAGGCAGGTCCAGCACCCCTAGGGCGGATCCGGA  
TCTGTACGACGATGA  
CGATAAGGCCTCCACCACGGCCCCGAAGGTCTTCCGCTGGCCTCGCACTCTGCGGCCACATCTGGCTCCACGGT  
GGCCCTGGGCTGCCTGGTCTCCAGTACTTCCCAGAGCCGGTACCCTGTCTTGGAACTCAGGAGCCCTGACCAG  
CGGCGTGCACACCTTCCGCTCCGCTCCTGCAGTCTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCTGC  
CAGCAGCTTGAAGAG  
CCAGACCTACATCTGCAACGTAGTCCACCCGCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATCGTCATAAAAAGAGTG  
TAACGGCGGCTGCCCCGAGAATGTCTCCAAGTTGGGCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCCCGAAGCCCAAGGACGT  
CCT
```

eBAFF, Sequenzierung durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH**, Ebersberg

```
ATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGGCTTAG
GAGTGAAATGGATGACTCCACACAAGGGGAGCAGTCACGCCTTTCTTCTTGCCTTAAGAGAAGAGAAGAAATGAA
ACTGAAGGAGACTGTCTCCATCCTCCCCAGAAGGAAAGCCCCTCTGTCCGACTCTCCAAAGATGGAAAGCTGCT
GGCCGTGACCCTGCT
GCTTGCCCTGCTGTCTGCTGCCTCACGGTGGTGTCTTTCTGCCGGGTGGCCACCCTGCAAGCGGAGCTGGGGAG
CCTCCGGGCGGAAGTGCAGGAGCACCAAGCTGAGCAGCTGCAGGGCCCTCGCCAGGCGGGAGCGGCCGCCGCGG
GCCAGCTGTGTGGCGGGCGCCAGCTGCCACCTCCGCGCTGAAAGGGATCTTTGTACCACCAGCTGTAGGAGAAG
CAACTCCAGTCAAAG
AAGCAGGAATAAGCGTGCCGCTCAGGACTCAGAAGAAGCAGTCACCCAAGACTGCTTGCAACTGATTGCAGACAG
TGACACACCTACTATACGAAAAGGAGCTTACACATTTGTTCCGTGGCTTCTCAGCTTTAAAAGAGGAAAAGCCCT
AGAAGAAAAAGAAAATAAAATATTGGTCAAAGAAACCGTTACTTTTTTATATATGGTCAGGTTTTATACACCGA
TAACACCTTTGCCAT
GGGACATCTAATACAGAGGAAAAAGGTCCATGTCTTTGGGGATGAACTGAGTCTGGTGACTTTGTTCCGATGTAT
TCAAATATGCCTGAAACACTACCCAATAATTCCTGTTATTCAGCTGGCATTGCAAAGCTGGAAGAAGGAGATGA
ACTCCAACCTTGCAATACCACGTGAAGATGCTAAAATTTCCCGGGACGGAGATGGCACATTTTTTGGTGCACTGAA
ACTTCTGTGACCTAC
TTACAAGCCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTT
```

eBAFF gekoppelt an den pASK- IBA6 Vektor; Sequenzierung durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH**, Ebersberg

```
GATGATAGTTTCGACAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACT
GGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAAATCGAAGGGCGCATGGA
TGACTCCACACAAGGGGAGCAGTCACGCCTTTCTTCTTGCCTTAAGAGAAGAGAAGAAATGAACTGAAGGAGAC
TGCTCCATCCTCCC
CCAGAAGGAAAGCCCCTCTGTCCGACTCTCCAAAGATGAAAGCTGCTGGCCGTGACCCTGCTGCTTGCCCTGCT
GTCTGCTGCCTCACGGTGGTGTCTTTCTGCCGGGTGGCCACCCTGCAAGCGGAGCTGGGGAGCCTCCGGGCGGA
ACTGCAGGAGCACCAAGCTGAGCAGCTGCAGGGCCCTCGCCAGGCGGGAGCGGCCGCCGCGGGCCAGCTGTGTG
GCGGGCGCCAGCTGC
CACCTCCGCGCTGAAAGGGATCTTTGTACCACCAGCTGTAGGAGAAGGCAACTCCAGTCAAAGAAGCAGGAATAA
GCGTGCCGCTCAGGACTCAGAAGAAGCAGTCACCCAAGACTGCTTGCAACTGATTGCAGACAGTGACACACCTAC
TATACGAAAAGGAGCTTACACATTTGTTCCGTGGCTTCTCAGCTTTAAAAGAGGAAAAGCCCTAGAAGAAAAAGA
AAATAAAATATTGGT
CAAAGAAACCGGTTACTTTTTTATATATGGTCAGGTTTTATACACCGATAACACCTTTGCCATGGGACATCTAAT
ACAGAGGAAAAAGGTCCATGTCTTTGGGGATGAACTGAGTCTGGTGACTTTGTTCCGATGTATTCAAATATGCC
TGAAACACTACCCAATAATTCCTGTTATTCAGCTGGCATTGCAAAGCTGGAAGAAGGAGATGAACTCCAACCTGC
AATACCACGTGAAGA
TGCTAAAATTTCCCGGGACGGAGATG
```

eAPRIL; Sequenzierung durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH**, Ebersberg

```
TATATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGGC
TTCAGCTCATGCCAGCTTCATCTCCTTCCTTGCTAGCCCCAAAGGGCCCCGGGAGACATGGGGGGCCCCGGTCC
GAGAGCCGGCACTCTCAGTTGCCCTCTGGTTGAGTTGGGGGGCAGCTCTGGGGGCTGTGGCTTGTGCCATGGCTC
TGCTGACCCAACAACAGAGCTGCAAACCCTAAGGAGAGAGGTGACCCGGCTGCAGAGGACTGGAGGGCCCTCCG
AGAAGGGGGAAGGGTATCCATGGCTGAGCCTCCGGGAGCAGATCCTGGANGACAGCCAGCACCAAGACTCAGCTT
GCTGGGGAAAGAGCCCTGAGGCCCTAGAAGCCCGGGAGAATGGGGAGAGATCCCCGAGAAGGAGACAGTGTCTAC
CCATAACAGAAGAAAAGCACTCAGTTCTGCACCTTGTTCCTTAACATCACCTCCAAAGAGGACTCTGATGTG
ACAGAGGTGATGTGGCAACCAGCTCTAAGGCGTGGGAGAGGCCTGGAGGCCCAAGGATATGTTGTTTCGAGTCTGG
GATGCTGGAGTTTATCTGCTGTACAGCCAGGTCTGTTTCATGATGTGACTTTACCATGGGTCAGGTGGTGTCT
CGGGAGGGCCAGGGAAGGCAAGAGACTCTATCCCAGTGTATAAGAAGTATGCCCTCCAACCCGGACTGGGCCAC
AATAGCTGCTACAGTGCAGGTGTCTTCCATTTACACCAAGGAGATATTCTGAGTGTCTTAATCCCCGGGCAAGG
GCGAAACTTAGCCTCTCTCCACATGGAACCTTCTGGGGTTTTGTGAAACTGTGATTGAAGCCGAATTCAGCACAC
CTGGCGGCCGTTACTAGGGACCGAGTCGGACCAAGCTGGCGTAAC
```

eAPRIL gekoppelt an den pASK- IBA6 Vektor; Sequenzierung durchgeführt von: **Eurofins MWG GmbH, Ebersberg**

```
GATGATAGTTTCGACAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACT
GGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAATCGAAGGGCGCATGCC
AGCTTCATCTCCTTCCTTGCTAGCTCCCAAAGGGCCCCGGGGAGACATGGGGGGCCCGGTCCGAGAGCCGGCACT
CTCAGTTGCCCTCTG
GTTGAGTTGGGGGGCAGCTCTGGGGGCTGTGGCTTGTGCCATGGCTCTGCTGACCCAACAAACAGAGCTGCAAAC
CCTAAGGAGAGAGGTGACCCGGCTGCAGAGGACTGGAGGGCCCTCCGAGAAGGGGGAAGGGTATCCATGGCTGAG
CCTCCGGGAGCAGAGCCCTGAGGCCCTAGAAGCCCGGGAGAATGGGGAGAGATCCCGGAGAAGGAGAGCAGTGCT
CACCCATAAACAGAA
GAAAAAGCACTCAGTTCTGCACCTTGTTCCTTAACATCACCTCCAAAGAGGACTCTGATGTGACAGAGGTGAT
GTGGCAACCAGCTCTAAGGCGTGGGAGAGGCCTGGAGGCCCAAGGATATGTTGTTTCGAGTCTGGGATGCTGGAGT
TTATCTGCTGTACAGCCAGGTCTTTCATGATGTGACTTTCACCATGGGTCAGGTGGTGTCTCGGGAGGGCCA
GGGAAGGCAAGAGAC
TCTATTCCGATGTATAAGAAGTATGCCCTCCAACCCGGACTGGGCCTACAATAGCTGCTACAGTGCAGGTGTCTT
CCATTTACACCAAGGAGATATTCTGAGTGTCTTAATCCCCGGGCAAGGGCGAAACTTAGCCTCTCTCCACATGG
AACCTTCCTGGGGTTTGTGAAACTGTGATATCTAACTAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTG
CGACATTTTTTTTTTG
TCTGCCGTTTACCGCTACT
```

Publikation

Cloning of equine TACI, BAFF and APRIL (Poster)

Kühnel, S., Mashreghi, MF, Borchers K., Schmidt, M., Radbruch, A., Chang, HD
40. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI),
Leipzig 2010

Neuer Therapieansatz: Sommerexzem beim Pferd (Poster)

Kühnel, S., Mashreghi, MF, Borchers K., Schmidt, M., Radbruch, A., Chang, HD
Tag der offenen Tür der Freien Universität Berlin
Berlin 2011

Danksagung

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit und die Überlassung des Themas möchte ich mich bei Frau Dr. Kerstin Borchers, Frau Dr. Daniela Heinemann, Herrn Prof. Dr. Michael F.G. Schmidt und Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch recht herzlich bedanken.

An Frau Dr. Kerstin Borchers ein ganz besonderer Dank für die Übernahme meiner Betreuung, die geduldigen Treffen, die anregenden Diskussionen und die hilfsbereiten Gespräche.

Mein besonderer Dank geht an das Deutsche Rheumaforschungszentrum und seinem Leiter Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Arbeitsmaterialien und der Finanzierung. Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern für deren Hilfsbereitschaft und bei den Labmanagern für die Aufreinigung meiner Proteine danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Dr. Hyun-Dong Chang für seinen Einsatz für meine Finanzierung, für die Betreuung dieser Arbeit im DRFZ und für die komplizierten Diskussionen und Vorschläge. Auch für die Tipps zum Schreiben dieser Dissertation möchte ich mich bedanken.

Darüber hinaus gilt mein ganz persönlicher Dank Dr. Mir-Farzin Mashreghi für seine endlose Geduld, die gute Einführung in die notwendigen Methoden und Geräte und die Bestellung der notwendigen Materialien. Danke dafür, dass er sich im Labor um mich gekümmert hat und immer versucht hat mir alles verständlich zu erklären.

Ebenfalls ist mir sehr daran gelegen mich bei Claudia Haftmann zu bedanken, dafür dass wir ein so gutes Team waren, für die gute Zusammenarbeit und Zuarbeit und für die unendliche Ausdauer beim Korrekturlesen. Danke für alles.

Für die Motivation diese Arbeit zu Ende zu schreiben und am Schreibtisch zu sitzen, möchte ich mich bei Dörthe Flad bedanken, die genau in der richtigen Zeit die richtige Motivation für mich hatte, bei Stephanie Frank und Angela Jensch, die mich immer wieder diszipliniert haben und bei Kristina Dietert für endlose Diskussionen und Ideen. Ihr standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite und habt dafür gesorgt, dass ich mein Ziel nicht aus den Augen verliere. Auch möchte ich mich bei Silke Stange und Mandy Hölzel bedanken, Lady und Wotan sind euch auch sehr dankbar.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, dafür dass er mir das alles erst ermöglicht hat, mir immer den Rücken freihält und trotz all der schweren Zeiten immer hinter mir steht.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ahrensfelde, den 09.10.2013

Silvia Kühnel