

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Klonierung von IFN γ und IL-4 von Zootieren und ein Ansatz zur Bestimmung der Expression dieser Zytokine mittels real-time PCR

Die Bestimmung von Zytokinen bietet wertvolle Informationen über die Eigenschaften der Immunantwort des Wirtes gegen Infektionen. In dieser Arbeit wurde eine spezies-spezifische real-time PCR etabliert um die mRNA Expression von equinem IFN γ und IL-4 zu bestimmen, die als Schlüsselzytokine an der Th1 und Th2 Immunregulation beteiligt sind. Um die Möglichkeit zu haben, diese Analyse auf Wildtiere zu erweitern, wurden die cDNAs von IFN γ und IL-4 aus PBMC von unterschiedlichen Zootier-Spezies wie z.B. von Somali Wild Esel (*Equus africanus somalicus*), Grevy Zebra (*Equus grevyi*), Hartmann Zebra (*Equus zebra hartmannae*), Indian Ein-Horn Nashorn (*Rhinoceros unicornis*), Asiatischer Elefant (*Elephas maximus*), Europäisches Bison (*Bison bonasus*), Afrikanischer Büffel (*Syncerus caffer*) und Nubische Giraffe (*Giraffa camelopardalis*) kloniert. Die IFN γ Sequenzen zeigten eine deutliche Konservierung (72-79%) zwischen der humanen Sequenz und den untersuchten Spezies, während IL-4 eine höhere Diskrepanz (nur 62-64% Homologie) zwischen humaner Sequenz und den untersuchten Spezies aufwies. Für Pferde, als Modell, wurden spezies-spezifische Primer und Sonden entwickelt, um eine real-time RT-PCR zu etablieren. Mittels IFN γ oder IL-4 Plasmiden wurde ermittelt, dass die Nachweisgrenze nahe einem DNA Molekül lag. Unterschiede zwischen den Proben bezüglich des Wirkungsgrades der RT, als auch in der Quantität und Qualität der RNA wurden mit der endogenen 18S rRNA abgeglichen. Der Assay wurde angewandt, um die Kinetik der IFN γ und IL-4 mRNA Expression nach Mitogen oder Anti-equine CD3 Aktivierung *in vitro*, unterstützt durch anti-CD28 co-stimulation, zu bestimmen.

Danach wurden Antigene die typischerweise zur Impfung eingesetzt werden, wie das equine *Herpesvirus-1* (EHV-1) und Tetanus Toxoid (TT) zur Wiederholungs-Aktivierung *in vitro* angewandt. Die Kinetik der Mitogen-stimulierten PBMC zeigte einen schnellen und stabilen Anstieg der IFN γ mRNA Expression und einen schnellen aber vorübergehenden Anstieg der IL-4 mRNA Expression. Die EHV-1 und TT Stimulation führte zu einer mRNA Expressions-Spitze beider Zytokine innerhalb von 12 Stunden nach Aktivierung. Die hohe Sensitivität und Spezifität solcher real-time PCRs könnte diese zu einem wertvollen Werkzeug bei der Studie von immunologischen Antworten und der Erstellung von Zytokinprofilen bei Zoo- und Wildtierspezies machen, welches in Zukunft die Möglichkeit bietet, auch eine große Anzahl von Proben über ein breites Nachweis-Spektrum zu analysieren.