

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines über Herpesviren.....	1
1.2	Die Unterfamilie der Gammaherpesviren.....	3
1.2.1	Mitglieder der Gammaherpesviren.....	3
1.2.2	Pathogenese der Gammaherpesviren	3
1.2.3	Replikation der Gammaherpesviren	4
1.2.4	Latenz der Gammaherpesviren	4
1.3	Das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2).....	6
1.3.1	Das Genom von EHV-2	6
1.3.2	Pathogenese und klinische Eigenschaften der EHV-2-Infektion.....	7
1.3.3	Latenz von EHV-2	9
1.4	Wirtshomologe Gene der Gammaherpesviren.....	10
1.5	vIL-10-Gene	12
1.6	Das EHV-2-IL-10	16
2	Zielsetzung	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Materialnachweis.....	20
3.2	Testgruppen	21
3.2.1	Pferde aus der Klinik für Fortpflanzung der FU-Berlin	21
3.3	Viren und Zellen	21
3.3.1	Viren.....	21
3.3.2	Zellkulturen.....	22
3.3.3	Zellzählung und Zellviabilitätstest mit Trypanblaufärbung.....	23
3.3.4	Virusvermehrung	23
3.3.5	Isolierung und Reinigung von DNA aus Virionen	24
3.3.6	Virustitration	25
3.3.7	Wachstumskinetik.....	26
3.3.8	Wachstumskinetik mit Inhibitoren der Virusreplikation	26
3.4	Serologische Tests.....	27
3.4.1	Neutralisationstest (NT).....	27
3.4.2	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	27
3.5	Isolierung von equinen PBMC aus Citratblut mittels Dichtegradientenzentrifugation	28
3.6	Verfahren zum direkten Virusnachweis aus equinen PBMC in der Zellkultur	28

3.6.1	Nachweis infektiöser Viren in equinen PBMC nach Virusfreisetzung und Virusvermehrung im Plaquetest.....	28
3.6.2	Nachweis von infektiösem und latentem Virus in equinen PBMC mit der Kokultivierung.....	29
3.6.3	Nachweis von latentem Virus in equinen PBMC unter Verwendung von 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	29
3.7	DNA-Isolierung aus PBMC	29
3.8	RNA-Isolierung aus Zellkulturen und PBMC	30
3.8.1	Vorbereitung von Materialien und Reagenzien für die Arbeit mit RNA	30
3.8.2	Herstellung von Trizol™-Lysaten aus Zellkulturen und PBMC	30
3.8.3	Gesamt-RNA-Präparation aus Trizol™-Lysaten	30
3.8.4	RNA-Qualitätskontrolle mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese.....	31
3.9	Polymerasekettenreaktion (PCR) und PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) zum Nachweis viraler DNA und viraler Transkripte	32
3.9.1	Reverse Transkription	32
3.9.2	Polymerasekettenreaktion	33
3.9.3	Analytische Agarosegelelektrophorese.....	36
3.10	Restriktionsenzymanalyse (REA)	37
3.11	Nukleinsäurenachweis durch Southernhybridisierung (Southern Blot).....	37
3.11.1	DNA-Transfer	37
3.11.2	Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUTP.....	38
3.11.3	Southernhybridisierung und Farbreaktion	39
3.12	Horizontale <i>in situ</i> Lysisgele nach Gardella (Gardella-Gel)	41
3.12.1	DNA-Extraktion aus Gardella-Gelen	42
3.13	Sequenzierung der IL-10-Gene verschiedener EHV-2-Isolate und computer-gestützte Sequenzanalysen.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Untersuchungen zur EHV-2-IL-10-Expression in der Zellkultur.....	45
4.1.1	Etablierung einer EHV-2-IL-10-spezifischen PCR.....	45
4.1.1.1	Primerauswahl und Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen	45
4.1.1.2	Bestimmung der Nachweisgrenze der EHV-2-IL-10-snPCR	47
4.1.1.3	Einsatz verschiedener EHV-2-Stämme in der snPCR und Ausschluss der Kreuzreaktivität mit der DNA anderer equiner Herpesviren und Pferdespezifischen Gensequenzen.....	47
4.1.2	Verknüpfung der EHV-2-IL-10-snPCR mit einer reversen Transkription zum Nachweis von EHV-2-IL-10-Transkripten.....	48

4.1.2.1	Bestimmung der optimalen Bedingungen für die snRT-PCR	48
4.1.3	Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression	50
4.1.3.1	Studien zur Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression in experimentell infizierten ED-Zellen am Beispiel des EHV-2-Referenzstammes LK-4.....	50
4.1.3.2	Untersuchung der Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression unter Verwendung von Inhibitoren der Virusreplikation	53
4.2	Expression des EHV-2-IL-10 in natürlich infizierten equinen PBMC.....	58
4.2.1.	Nachweis einer EHV-2-Infektion mittels nested PCR.....	58
4.2.2.	Untersuchung des EHV-2-Infektionsstatus und Differenzierung zwischen einer akuten und einer latenten Infektion.....	60
4.2.2.1	Nachweis von infektiösem und latentem Virus in der Zellkultur.....	60
4.2.2.1.1	Charakterisierung der gewonnenen Virusisolate.....	63
4.2.2.2.	Nachweis von EHV-2-Transkripten des lytischen Replikationszyklus.....	65
4.2.2.3	Nachweis EHV-2-spezifischer Antikörper	67
4.2.2.4	Untersuchung der Genomkonformation von EHV-2 in natürlich infizierten PBMC von Pferd A	70
4.2.2.4.1	Etablierung der Gardella-Gel-Technik mit EBV-infizierten Zellen	71
4.2.2.4.2	Anwendung der Gardella-Gel-Technik auf EHV-2-infizierte PBMC von Pferd A...	72
4.2.3	Untersuchung der Expression des EHV-2-IL-10 in equinen PBMC.....	76
4.3	Vergleichende Untersuchungen der Nuklein- und Aminosäuresequenzen der IL-10-Gene verschiedener EHV-2-Isolate untereinander und mit bekannten vIL-10- und Wirts-IL-10-Genen	79
4.3.1	Untersuchte Sequenzen und methodisches Vorgehen	80
4.3.2	Vergleich der IL-10-Gene bzw. -Proteine verschiedener EHV-2-Isolate untereinander und mit dem IL-10 des Pferdes	81
4.3.3	Aminosäuresequenzalignment verschiedener vIL-10- und cIL-10-Proteine.....	81
4.3.3	Phylogenetische Untersuchungen verschiedener vIL-10- und cIL-10-Proteine	84
5	Diskussion	86
5.1	EHV-2-IL-10-Expression in experimentell und natürlich infizierten Zellen	86
5.2	Vergleichende Untersuchungen der Primärstruktur des EHV-2-IL-10	92
6	Zusammenfassung.....	98
7	Summary	100
8	Literaturverzeichnis	102
9	Anhang.....	118
9.1	Detaillierte Zusammenstellung aller Untersuchungsergebnisse.....	118
9.2	Liste der eigenen Veröffentlichungen.....	122
9.3	Selbständigkeitserklärung.....	123

9.4	Danksagung	124
9.5	Lebenslauf.....	125