

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
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
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
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
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
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
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>86</b>
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
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>118</b>
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