

VETResearch 2015 Retreat



www.vetmed.uni-muenchen.de

LEHRE@VET
Research



Arne Auste, Theresa Dölle, Julia Gedon,
Ulrike Gerster, Annika Graaf, Agnes
Ludwig, Andreas Öhm, Ranya Özcelik,
Lena Pfaff, Franziska Rohde, Winfried
Schön, Angela Schug, Isabel Seiffert,
Verena Stössel, Christian Zenner

Herausgeber: Ludwig-Maximilians-Universität, Tierärztliche Fakultät,
Veterinärstr. 13, 80539 München, Tel: +49 (0) 89 / 2180 - 2512

Stand: März 2016



Dieses Vorhaben wird aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01PL12016 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Grußwort

In der hier nun vorliegenden **VETResearch** Online-Broschüre 2015 werden unsere Ergebnisse des dritten Jahres eines sehr erfolgreichen Konzepts aus der Förderung Lehre@LMU vorgestellt. Als Betreuer einiger Projekte kann auch ich schon auf 3 Jahre Erfahrung mit **VETResearch** zurückblicken. Zum Start 2013/2014 erschien mir die zentrale Idee von **VETResearch**, ein frühzeitiges Heranführen von Studierenden an die tierärztliche Forschung, als prinzipiell gut und ich wollte sie vorbehaltlos unterstützen. Die Rahmenbedingungen waren günstig: Eine freiwillige Veranstaltung bringt interessierte Studierende in Kontakt mit engagierten Betreuern aus hochinteressanten Forschungsfeldern.

Zugegebenermaßen erhoffte ich mir zugleich Zugang zu einer frühen „Talentsichtung“, buchte dies als virtuellen „Ertrag“ und kalkulierte die Aussicht auf zusätzliche Betreuungs-/ Organisations- und Verwaltungsarbeit als „Aufwand“. Den Quotienten „Ertrag/Aufwand“ schätzte ich mit bestenfalls 1 ein.

Was hat sich in den 3 Jahren nun ergeben? Kurz gesagt, meine Erwartungen wurden klar übertroffen! Persönlich schätze ich den Input seitens der Studierenden auf das Betreuer-Team, gewöhnlich in der Zusammensetzung aus wissenschaftlichem Mitarbeiter, Doktorand und technischer Assistenz, als sehr positiv ein. Manche Frage der Studierenden gab dem Team Anlass, die eigene bisher praktizierte Arbeitsweise zu reflektieren und gegebenenfalls zu verbessern. Wird der Doktorand mit der Aufgabe betraut, Studierende konkret anzuleiten, schärft er eigene Struktur, Teamfähigkeit und kommunikative Kompetenz.

Nicht zuletzt gewinnt man persönlich ganz rasch einen Eindruck über die bereits vorhandenen „Soft Skills“ der Beteiligten. In einem **VETResearch** Projekt geben gewissermaßen **beide** Seiten Ihre Visitenkarte ab, im Hinblick auf künftige Promotionsarbeiten ein großer Vorteil!

Nach meinen Erfahrungen kann ich jeden Studierenden, aber auch mögliche künftige Betreuer nur ermuntern, ein **VETResearch** Projekt in Betracht zu ziehen.

Zum Ende möchte ich noch einen aufrichtigen Dank an das Studiendekanat mit Hr. Prof. Göbel und Fr. Dr. Beitz-Radzio aussprechen, die jederzeit als Ansprechpartner bereit stehen und mit deren Hilfe bislang noch jedes Problem gelöst werden konnte!

Dr. Frank Weber
Betreuer

Projekt 1: Quantitative PCR zum Nachweis keimbahntransgener Hähne

Lena Pfaff
am Institut für Tierphysiologie
Betreuer: Herr Dr. med. vet. Schusser

Projekt 2: Knockout der konstanten Region der alpha Kette des alpha/beta T-Zell-Rezeptors in primordialen Keimzellen des Huhnes

Angela Schug
am Institut für Tierphysiologie
Betreuer: Herr Dr. med. vet. Schusser

Ziel der Untersuchung:

Obwohl das Huhn eines der bedeutendsten landwirtschaftlichen Nutztiere weltweit darstellt und in der Vergangenheit zu wichtigen Erkenntnissen in der biomedizinischen Forschung beigetragen hat ist es in den letzten Jahren im Bereich der Forschung etwas aus dem Fokus gerückt. Zwar wurde das Genom des Huhnes auf Grund der großen wirtschaftlichen Bedeutung des Huhnes als erstes Genom einer Nutztierspezies veröffentlicht jedoch fehlten bis vor kurzem Techniken der reversen Genetik, welche in Säugern seit längerem zur Verfügung stehen.

Mit dem zur Verfügung stehen eines Zellkultursystems für primordiale Keimzellen des Huhnes wurde es möglich undifferenzierte Keimzellen zu kultivieren und vor allem in vitro zu verändern. Dies eröffnete erstmals die Möglichkeit Hühner mit einer gezielten Gen-Deletion zu erzeugen. Erstmals wurde mit Hilfe dieser Technologie ein gezielter Gen-knockout im Huhn erzeugt. Hühner mit einer Deletion des J-Elementes der Immunglobulin schweren Kette zeigen einen Block in der postbursalen B-Zellentwicklung.

Folgende Schritte sind zur Erstellung genetisch manipulierter Hühner notwendig. Zunächst werden primordiale Keimzellen mit Targeting Vektoren für das Gen von Interesse transfiziert und mit Hilfe eines integrierten Selektionsmarkers auf Keimzellen mit der gewünschten genetischen Manipulation selektiert. Diese genetisch manipulierte Keimzellen werden nun in 65 Stunden alte Hühnerembryonen zurückinjiziert. Im Embryo wandern die Keimzellen in die Gonaden-Anlage und differenzieren sich im weiteren Verlauf der Entwicklung des heranwachsenden Huhnes zu Spermium bzw. Ei. Bei dem hier heranwachsenden Tier handelt es sich um eine Keimbahnchimäre, welche die genetische Manipulation in ihrer Keimbahn trägt.

Durch Anpaarung der hier entstandenen Chimären entsteht in der nächsten Generation, bei erfolgreicher Vererbung ein Huhn, welches heterozygot für die gewünschte genetische Veränderung ist.

Ein limitierender Faktor bei der Erstellung neuer genetisch manipulierter Hühner ist besonders der letztgenannte Punkt der Keimbahntransmission. Um die Wahrscheinlichkeit der Keimbahntransmission zu erhöhen ist es vonnöten Hähne mit einem besonders hohen Anteil genetisch veränderten Spermias für die Anpaarungen auszuwählen. Eine Möglichkeit besteht darin einen Fluoreszenzmarker zu verwenden und somit fluoreszierende primordiale Keimzellen zu injizieren. Da sich diese Keimzellen zu Spermien differenzieren sind auch die Spermien, welche aus genetisch veränderten Keimzellen entstehen fluoreszierend. Somit es möglich Spermia von Hähnen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren und den Anteil fluoreszierenden Spermias zu ermitteln. Hähne mit dem höchsten Prozentsatz fluoreszierenden Spermias können dann für Anpaarungen verwendet werden.

Jedoch ist es nicht im Rahmen aller genetischer Veränderungen und Projekte möglich Fluoreszenzmarker zu verwenden. Aus diesem Grund wird auch eine Methode benötigt die unabhängig eines Fluorochroms funktioniert.

Im Rahmen des VetResearch Programms sollte eine Alternativmethode zur Durchflusszytometrie zur Quantifizierung des Anteils genetisch veränderten Spermias im Ejakulat von Hähnen etabliert werden. Methode der Wahl ist hier die semiquantitative bzw. quantitative PCR. Bei der Erstellung von Gen-Knockout Hühnern als auch bei der zufälligen Integration von Expressionskonstrukten werden selektierbare Marker wie z.B. eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin zur Selektion der primordialen Keimzellen verwendet. Da es sich hierbei um eine nicht natürlich im Huhn vorkommende DNA-Sequenz handelt ist es möglich eine PCR spezifisch für die selektierbaren Marker zu etablieren. Mit Hilfe dieser PCR ist es möglich genetisch verändertes Spermia zu detektieren. In einem ersten Schritt wurden Primer für das Puromycinresistenzgen erstellt und auf DNA eines targeting Vektors, welcher diese Sequenz enthält, getestet. Nach erfolgreichem ermitteln der richtigen Schmelztemperatur wurden die Primer auf genomischer DNA von existierenden genetisch veränderten Tieren verwendet. Auch hier funktionierten die Primer einwandfrei, jedoch waren Primerdimer zu sehen. Da das Ziel die Quantifizierung des Anteils genetisch veränderten Spermias an der Gesamtprobe ist sollte eine quantitative PCR etabliert werden. Hierzu wurden die Primer nun auf ihre Tauglichkeit für den quantitativen PCR Assay getestet. Hierbei stellte sich die Bildung der Primerdimere jedoch als Problem dar, da kein für das Amplikon spezifisches Signal ermittelt werden konnte.

Im weiteren Verlauf des Projektes wurden mehrere Primerpaare für die verschiedenen Selektionsmarker entwickelt und bezüglich ihrer Verwendbarkeit für die quantitative PCR getestet. Es stellte sich heraus, dass die meisten Primerpaare nicht die Qualitätskriterien für die quantitative PCR erfüllten. Aus diesem Grund wurde parallel ein semiquantitativer



Nachweis der Menge des genetischen veränderten Sperma's etabliert. Hierzu wurde zunächst ein Standard, bestehend aus Plasmid-DANN, verdünnt in genomischer DNA, gewonnen von Sperma genetisch unveränderter Tiere, erstellt. Dieser Standard wurde nun log10 titriert und als Vergleichsstandard in der PCR eingesetzt. Weiterhin wurden die genomische DNA Proben der Keimbahnchimären hinsichtlich ihrer Konzentration einheitlich verdünnt. Sowohl die Proben mit der unbekanntem Menge genetisch veränderten Spermas als auch die Verdünnungsreihe des Standards wurden dann in eine gemeinsame PCR eingesetzt und gleiche Mengen auf einem Agarosegel analysiert. Für die Standardverdünnungsreihe war eine deutliche Abnahme der Bandenintensität zu erkennen. Weiterhin wurden unterschiedlich intensive Banden für die verschiedenen Keimbahnchimären detektiert. Dieser Assay wurde auf bis zu drei unabhängigen Ejakulaten wiederholt. Chimären mit einer mehrfach intensiven Bande wurden dann für die Anpaarung ausgewählt. Eier aus dieser Anpaarung wurden eingelegt und die Embryonen sechs Tage nach Beginn der Inkubation auf die genetische Veränderung hin untersucht. Es zeigte sich, dass bis zu 1% der Nachkommen die genetische Veränderung in sich trugen. Da es sich hierbei um einen sehr geringen Prozentsatz handelt, welche auf die Verwendung einer Inzucht-hühnerlinie zurückzuführen war, wurden diese Tiere nicht geschlüpft.

Insgesamt ist es jedoch im Rahmen dieses Projektes gelungen eine quantitative Methode zum Nachweis genetisch veränderten Spermas im Ejakulat von Hähnen in unserem Labor zu etablieren. Diese Technik wird nun im Rahmen der Erstellung neuer genetisch manipulierter Hühnermodelle routinemäßig verwendet.

In einem zweiten Projekt war das Ziel einen knockout der konstanten Region der alpha Kette des T-Zellrezeptors mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie zu generieren. Wie bereits beschrieben wurde in einem vorherigen Projekt bereits ein Knockout der leichten als auch der schweren Kette des Immunglobulin erzeugt. Tiere mit dem Immunglobulin schwere Ketten knockout besitzen keine Antikörper. Hiermit fehlt der wichtigste Teil der humoralen Immunantwort. Diese Tiere stellen ein wichtiges Tool bei der Entschlüsselung der Wirt-Pathogen-Interaktion verschiedener Pathogene dar. Um jedoch die Wirt-Pathogen-Interaktion vollständig untersuchen zu können werden weitere Knockouts im Bereich der zelluläre Immunantwort benötigt. Insbesondere das T-Zellsystem bestehend aus alpha/beta und gamma/delta T-Zellen. In den landwirtschaftlichen Nutztieren Rind, Schwein und Huhn findet sich eine außergewöhnlich große Population gamma/delta T-Zellen im Vergleich zum Säuger. Um deren Funktion besser untersuchen zu können wurde in einem vorherigen VETResearch Projekt die Grundlage für eine Deletion dieser Zellen im Huhn gelegt. Da, wie in der Maus gezeigt, der größte Wissenszuwachs aus einer Kombination von gamma/delta und alpha/beta T-Zell knockout und einem Vergleich beider Knockouts erwartet wird muss ebenfalls ein alpha/beta T-Zell Knockout-Huhn erstellt werden.

Im Rahmen dieses Projektes soll mit Hilfe von CRISPR/Cas9 Technologie die konstante Region der alpha Kette des alpha/beta T-Zellrezeptors deletiert werden.

In einem ersten Schritt wurden zwei guide RNAs spezifisch für das 5' Ende der konstanten Region der alpha Kette und zwei guide RNAs spezifisch für das 3' Ende der konstanten Region der alpha Kette in ein CRISPR/Cas9 Vektor kloniert.

Um die guide RNAs zu testen wurden diese in DT40 Zellen, eine gut zu transfizierende Hühner B-Zelllinie, transfiziert und diese per PCR auf eine Deletion der konstanten Region analysiert. Hierfür wurden Primer 5' und 3' der konstanten Region verwendet und die Extensionszeit so kurz gewählt, dass nur ein Amplikon bei erfolgreicher Deletion der konstanten Region detektierbar sein sollte. Diese Theorie wurde im Experiment bestätigt.

In einem nächsten Versuch wurde eine alpha/beta T-Zelllinie des Huhnes mit dem Ziel kultiviert einen knockout des alpha/beta T-Zellrezeptors in dieser Zelllinie herbeizuführen und diesen auch auf Proteinebene detektieren zu können. Zunächst mussten hierfür Transfektionsbedingungen für diese Zelllinie etabliert werden. Hierfür wurde ein Vektor verwendet, welcher für ein rotfluoreszierendes Gen kodiert. Verschiedene Transfektionsbedingungen wurden getestet und der Prozentsatz rotfluoreszierender Zellen per Durchflusszytometrie untersucht. Weiterhin wurden die Zellen nach Transfektion auf die Expression des alpha/beta T-Zellrezeptors hin untersucht, da sichergestellt werden musste, dass durch Transfektion der Zellen mit einer zufälligen DNA die Expression des Rezeptors nicht verloren geht. Im Rahmen dieser Versuche wurden Transfektionsbedingungen ermittelt mit denen es möglich war bis zu 7% der Zellen erfolgreich zu transfizieren ohne, dass die T-Zellrezeptorexpression verloren ging.

Im weiteren Verlauf wurden verschieden 5' guide RNAs gegen die konstante Region der alpha Kette als auch eine Kombination aus 5' und 3' guide RNAs in die T-Zelllinie transfiziert und die Zellen 3 Tage nach Transfektion per Durchflusszytometrie auf den Verlust der alpha/beta T-Zellrezeptorexpression hin untersucht. Leider war keine eindeutig verminderte T-Zellrezeptorexpression feststellbar. Dies ist vermutlich auf die niedrige Transfektionseffizienz zurückzuführen. In weiteren zukünftigen Versuchen soll eine selektierbare Marker-kassette integriert werden um auf erfolgreich transfizierte Zellen selektieren zu können und den Knockout auf Proteinebene nachweisen zu können.

Die Arbeiten aus diesem Projekt legen eine wichtige Grundlage für den erfolgreichen knockout der konstanten Region der alpha Kette des alpha/beta T-Zellrezeptors in primordialen Keimzellen des Huhnes und für die Erzeugung eines T-Zell-Knockout-Huhnes. ■

Beurteilung der Impfreaktion mittels Magnetresonanztomographie bei Schafen und Kälbern

Theresa Dölle
 am Lehr- und Versuchsgut Oberschleissheim
 Betreuerin: Frau Dr. med. vet. Bernau

Ziel der Untersuchung:

Ziel der Untersuchung im Rahmen des VET Research Projektes war die Auswertung und Beurteilung der Impfreaktionen bei Schafen und Kälbern anhand von MRT-Bildern über einen Untersuchungszeitraum von 29 Tagen (bei den Schafen) bzw. 22 Tagen (bei den Kälbern).

Tiermaterial & Methode:

Bei der hier vorgestellten Studie handelt es sich um ein durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördertes Projekt in dem insgesamt 32 Schafe und 16 Kälber untersucht wurden. Die Versuchstiere wurden in drei Versuchsgruppen mit jeweils 16 Tieren eingeteilt und mit einem für die Altersklasse entsprechend zugelassenem Impfstoff nach Packungsbeilage geimpft. Anschließend wurden sie mittels MRT an den Tagen 1, 3, 8, 15, 22 und 29 untersucht (siehe Abb. 1).

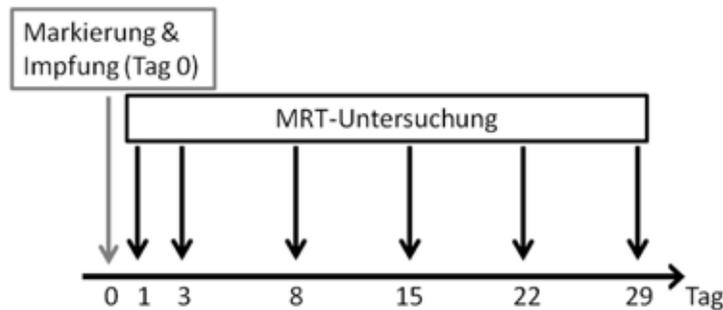


Abb. 1: Darstellung des Versuchsablaufs

Für die MRT-Untersuchung wurde ein Siemens Magnetom Open eingesetzt. Für die Evaluierung der lokalen Impfreaktion wurden die folgenden Sequenzen verwendet:

- T1-gewichtete coronare Sequenz, nativ (T1cn)
- T2- gewichtete coronare Sequenz (T2)
- T1- gewichtete coronare Sequenz , mit Kontrastmittel (T1cKM)
- T1-gewichtete axiale Sequenz (T1a)

Die Beurteilung der Impfreaktionen erfolgte durch ein Scoring, bei dem die Impfseite mit der Kontrollseite verglichen wurde. Dabei wurden folgende Variablen erfasst:

- Anzahl der Bilder mit einer Veränderung
- Score für die Signalintensivierung (0-3)

Abbildung 2 stellt den Verlauf der Impfreaktion eines Schafes bei Gruppe 1 dar.

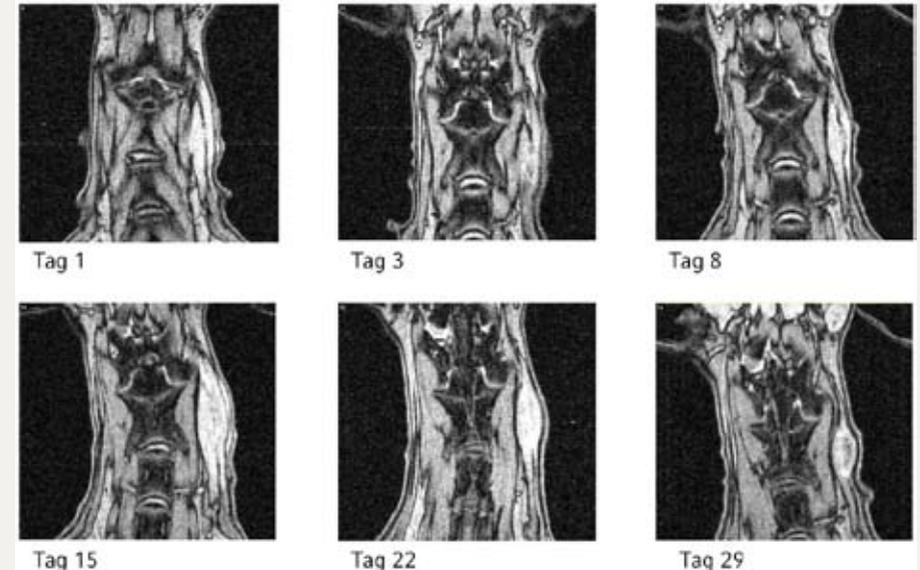


Abb. 2: Verlauf der Impfreaktion, beispielhaft für ein Tier aus der Gruppe 1 (T1cKm)

Ergebnisse:

Die Ergebnisse dieser Studie scheinen zu zeigen, dass es möglich ist Impfreaktionen mittels MRT zu beurteilen. Bei allen Versuchsgruppen ist schon ab dem ersten Untersuchungstag eine Veränderung der Signalintensivierung zu beobachten, welche je nach Untersuchungsgruppe im Laufe der Untersuchung zu- oder abnimmt.

Persönliche Meinung:

Meiner Meinung nach bietet VET Research eine sehr gute Möglichkeit erste Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten zu erhalten. Durch die Bearbeitung eines eigenen studentischen Forschungsprojektes ist es Studierenden möglich wissenschaftliche Daten auszuwerten, zu interpretieren und vorzustellen. So können Studierende während des Studiums herausfinden, ob sie Freude am wissenschaftlichen Arbeiten haben und vielleicht nach dem Studium eine Dissertation anfertigen möchten.

Immunhistochemische Validierung einer Proteomanalyse im Verlauf der Epileptogenese

Julia Gedon, Franziska Rohde

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuerinnen: Frau Dr. med. vet. Russmann und Frau Prof. Dr. med. vet. Potschka

Etablierung immunhistochemischer Färbungen zur Evaluierung des Expressionsmusters von Hsp70:

Epilepsien werden als Störung des Gehirns definiert und zeichnen sich durch eine gesteigerte oder synchronisierte neuronale Aktivität aus. Als häufigste chronische neurologische Erkrankung betreffen Epilepsien sowohl Haustiere, insbesondere Hunde und Katzen, als auch den Menschen. Die Möglichkeiten der Therapie beschränken sich derzeit auf die medikamentöse Unterdrückung der Anfälle mit Hilfe von Antiepileptika. Das Ziel neuer Therapieansätze ist es, Strategien zu entwickeln, durch die der Entstehung einer Epilepsie (Epileptogenese) nach einer Gehirnschädigung vorgebeugt werden kann.

Im Rahmen der Epileptogenese kommt es zur Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und reaktiver Sauerstoff-Spezies. Demgegenüber stehen neuroprotektive Faktoren, wie Hsp70 (Heat shock protein). Hauptfunktionen des Hsp70 sind dabei die Inhibition der Apoptose, sowie die Steuerung der Immunantwort (Benarroch 2011, Kim und Yenari 2013). Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden drei immunhistologische Färbungen etabliert,

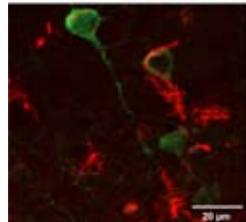
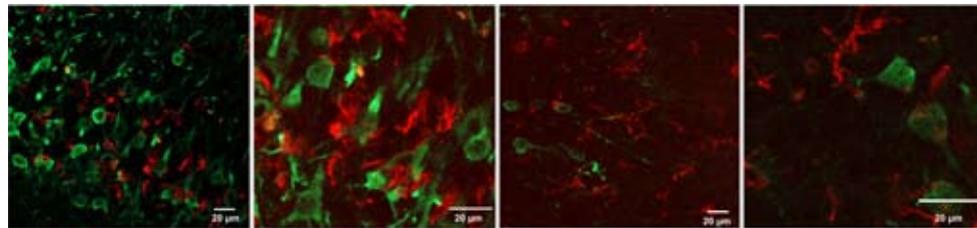


Abb. 1: *Hsp70/Iba1* Doppelmarkierung von Hsp70 in Mikroglia der Ratte zwei Tage nach der Induktion eines Status Epilepticus

mit deren Hilfe die Hsp70-Expression in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten im Gehirn untersucht werden soll. Das vorliegende Projekt bildet somit die Basis für die Validierung bereits gewonnener Proteomdaten.

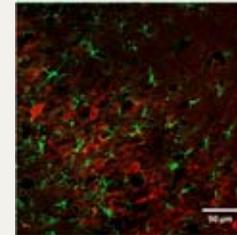


Abb. 2: *Hsp70/GFAP* Doppelmarkierung von Hsp70 in Astrozyten der Ratte zwei Tage nach der Induktion eines Status Epilepticus

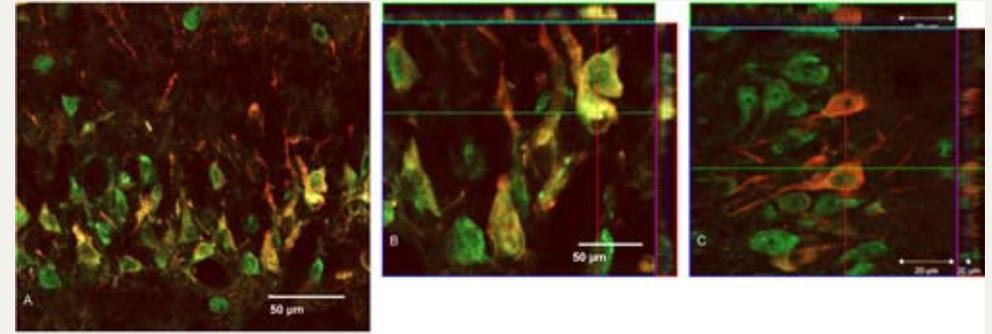


Abb. 3: *Hsp70/NeuN* Doppelmarkierung von Hsp70 in Neuronen der Ratte zwei Tage nach Induktion eines Status Epilepticus

Material und Methoden

Epileptogenese-induzierte Veränderungen können mittels immunhistochemischer Färbungen auf zellulärer Ebene dargestellt werden. Dazu werden 40 µm dicke coronale Schnitte mit Hilfe des *Free Floating* Verfahrens angefärbt.

Färbungen:

1. Nachweis von Hsp70 und Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) im Rattengehirn (*Free Floating*)
2. Nachweis von Hsp70 und GFAP (*Anti-Glial Fibrillary Acid Protein*) im Rattengehirn (Fluoreszenz, *Free Floating*)
3. Nachweis von Hsp70 und NeuN (*Neuronal Nuklear Antigen*) im Rattengehirn (*Free Floating*)



Ergebnisse

Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnte sowohl die Hsp70/Iba1, Hsp70/GFAP als auch die Hsp70/NeuN-Doppelmarkierung etabliert werden. Bereits durchgeführte Proteomanalysen deuten auf eine Hochregulation des Hsp70-Proteins zwei Tage nach Induktion des Status Epilepticus hin. Daher wurden die Färbungen an Gehirnschnitten von Ratten etabliert, die zwei Tage nach Induktion des Status epilepticus euthanasiert wurden. Mithilfe der etablierten Methoden sollen im Rahmen weiterführender Projekte die gewonnenen Daten der Proteomanalyse validiert werden.

Etablierung immunhistochemischer Färbungen zur Darstellung des Expressionsmusters von Apolipoprotein E, Alpha-Synuclein und Tau

Zwischen der Temporallappenepilepsie und dem Morbus Alzheimer besteht eine bidirektionale klinische Beziehung. Daher besteht ein besonderes Interesse gemeinsame pathophysiologische Mechanismen zu analysieren.

In einer mithilfe des Status Epilepticus Modells der Ratte durchgeführten Proteom-Analyse konnte unter anderem der Alzheimer-/ (Kegg)-Pathway als signifikant reguliert identifiziert werden. Die genauer betrachteten Proteine Apolipoprotein E (ApoE), Alpha-Synuclein (α -Syn) und Protein Tau wurden bereits mit Morbus Alzheimer und weiteren neurodegenerativen Krankheiten sowie mit Epilepsien in Verbindung gebracht.

ApoE gilt als wichtiger genetischer Risikofaktor für die Entwicklung von Alzheimer. Es beeinflusst vornehmlich die Amyloid- β (A- β) -Produktion/ -Aggregation, bewirkt Neuro- und Synaptotoxizität und führt zu einer gesteigerten Tau-Phosphorylierung. Des Weiteren bewirkt ApoE durch Mikroglia-Aktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine im Rahmen einer gesteigerten Neuroinflammation eine veränderte neuronale Funktion, Hypersynchronie und Übererregung.

α -Syn ist ein synaptisches Protein, das physiologisch eine wichtige regulatorische Rolle in der Vermittlung der Transmitter-Freisetzung besitzt. Die Neurotoxizität verschiedener α -Syn-Konformationen wird hauptsächlich über reduzierte synaptische Plastizität, gestörte Signalübertragung von Neuron zu Neuron, Aktivierung von Mikroglia und Astroglia, sowie damit verbundene neuronale Veränderungen und Zelluntergänge vermittelt. Nachweislich kann dadurch zum einen das Erinnerungsvermögen beeinträchtigt und zum anderen ein Teufelskreis aus neuroaler Entzündung und Zelltod angestoßen werden.

Tau wird vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem als *Mikrotubule Assembly Factor* exprimiert. Hyperphosphoryliertes unlösliches Tau ist Hauptbestandteil der bei Morbus Alzheimer auftretenden neurofibrillären Ablagerungen. Tau scheint außerdem für die durch A β -Peptide und ApoE ausgelösten kognitiven Defizite und Veränderungen an Synapsen essentiell

zu sein. Ein Auftreten von Tau im Liquor spricht für axonalen und neuronalen Schaden im ZNS und wird bereits bei Alzheimer, der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung und möglicherweise auch bald bei Epilepsien in die Diagnostik miteinbezogen.

Material und Methoden

Zur optischen Darstellung der Expressionsmuster von ApoE, α -Syn und Tau im Gehirngewebe sollten immunhistochemische Färbungen entwickelt werden. Hierfür wurden Gehirnschnitte euthanasierter Ratten aus einem Status Epilepticus-Modell verwendet. Die Färbungen von ApoE und α -Syn wurden an 40 μ m dicken Schnittpräparaten im Free-Floating-Verfahren durchgeführt. Tau wurde an 2 μ m Paraffinschnitten mittels Cover-Plate-Apparatur detektiert.

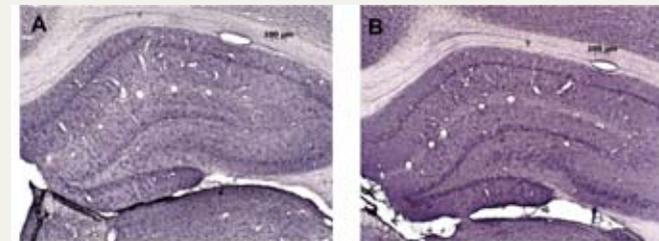


Abb. 4: ApoE (A)- und α -Syn (B)-Expression von Gehirnschnitten der Ratte

Ergebnisse

Es konnten Färbungen für die Expressionsmuster von ApoE, α -Syn und Tau etabliert werden (siehe Abbildung 4).

Basierend auf diesen Färbungen sollen die Ergebnisse der Proteom-Analyse validiert werden.

Wir danken Marion Fisch, Sieglinde Fischlein, Carmen Meyer, Claudia Siegl und Angela Vicidomini für ihre exzellente technische Unterstützung. Die Autoren sind dankbar für die Unterstützung durch das Förderprogramm VETResearch.

Pharmakologische Charakterisierung therapeutisch eingesetzter Opioide beim Hund

Verena Stössel, Christian Zenner

am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Herr Prof. Dr. med. vet. Ammer

Ziel der Untersuchung:

Opioide werden zur Behandlung starker Schmerzzustände, zur Narkosepraemedikation und zur postoperativen Analgesie eingesetzt. Neben vollen Agonisten wie Fentanyl, Morphin und Levomethadon werden in der Tiermedizin vor allem auch gemischte Agonisten/Antagonisten verwendet, die teilweise starke speziesspezifische Unterschiede in ihrer Wirkung aufweisen. Ziel der vorgestellten Studie war es, die molekularen Grundlagen für einen indikationsbezogenen Einsatz gemischter Agonisten/Antagonisten beim Hund zu erarbeiten.

Um diese Fragestellung bearbeiten zu können, wurden zunächst die für die analgetische Wirkung der Opioide verantwortlichen κ - und μ -Opioidrezeptoren (OPRK1, OPRM1) des Hundes kloniert, stabil in HEK293 Zellen exprimiert und anschließend ihre Bindungseigenschaften sowie ihre Wirkeigenschaften *in-vitro* im cAMP-Akkumulationstest bestimmt. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die therapeutisch eingesetzten partiellen und gemischten Agonisten/Antagonisten am κ -Opioidrezeptor gelegt, da diese beim Hund einige Besonderheiten bei der klinischen Anwendung besitzen. So ist das beim Menschen als partieller μ -Agonist und voller κ -Antagonist beschriebene Buprenorphin beim Hund lediglich zur postoperativen Analgesie und zur Verstärkung der sedativen Eigenschaften zentral wirksamer Arzneimittel (z.B. Buprenovet® Multidose 0,3 mg/ml, Injektionslösung für Hunde und Katzen) zugelassen. Das beim Menschen als partieller κ - und μ -Agonist beschriebene Butorphanol wird beim Hund zur Linderung leichter bis mittelschwerer viszeraler Schmerzen sowie zur Kontrolle von Schmerzen nach chirurgischen Eingriffen (z.B. Dolorex® 10 mg/ml, Injektionslösung für Pferde, Hunde und Katzen) vermarktet.

Experimenteller Ablauf und Ergebnisse

Zunächst konnten wir die bereits in den vorangegangenen Berichtszeiten begonnene und mit vielen experimentellen Rückschlägen behaftete Klonierung der caninen OPRK1 und OPRM1 mittels RT-PCR aus einer hypothalamischen cDNA Bibliothek des Hundes erfolgreich abschließen. Die Klonierung war insbesondere deshalb problematisch, da das verfügbare Genom des Hundes nur unvollständig und kaum annotiert ist. Beim OPRK1 fehlte das 4. Exon in der Referenzsequenz und musste mithilfe einer 3'RACE-PCR amplifiziert werden. Beim OPRM1 stellte sich unter anderem heraus, dass die in der Genbank hinterlegte Sequenz ein alternatives Startcodon besitzt. Schließlich konnten wir jeweils 3 cDNA-Klone für jeden Rezeptor durch Doppelstrangsequenzierung isolieren und die cDNA Sequenzen im Mai 2015 veröffentlichen:

LOCUS	KP676947
DEFINITION	Canis lupus familiaris kappa-type opioid receptor 1 (OPRK1) mRNA, complete cds.
VERSION	GI:815891268
SOURCE	Canis lupus familiaris (dog)
REFERENCE 1	mRNA (bases 1 to 1143)
AUTHORS	Koutnik,S., Zenner,C. and Ammer,H.

LOCUS	KP676946
DEFINITION	Canis lupus familiaris mu-type opioid receptor 1 (OPRM1) mRNA,complete cds.
VERSION	GI:815891266
SOURCE	Canis lupus familiaris (dog)
REFERENCE 1	mRNA (bases 1 to 1206)
AUTHORS	Koutnik,S., Zenner,C. and Ammer,H.

Im Anschluss an die Klonierung wurden die Rezeptoren in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3.1 (Fa. Invitrogen) subkloniert, in der humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) stabil exprimiert und einer pharmakologischen Charakterisierung unterzogen. Nachdem die interessantesten Unterschiede für den κ -Opioidrezeptor beobachtet wurden, werden diese im Folgenden vorgestellt:

1. Bestimmung der inhibitorischen Konstante pKi (Affinität) der einzelnen Opioide.

Um tierartige Unterschiede im Bindungsprofil der therapeutisch eingesetzten Opioide Morphin, Fentanyl, Levomethadon (L-Polamivet® 2,5/0,125 mg/ml, Injektionslösung für Pferde und Hunde), Buprenorphin und Butorphanol zu identifizieren, wurde die Affinität der Liganden an den klonierten κ -Opioidrezeptoren des Hundes mit dem des Menschen verglichen. Hierfür wurden zunächst Membranpräparationen hergestellt und diese mit einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem [3-H]Diprenorphin inkubiert. Als Radioligand wurde [3-H]Diprenorphin ausgewählt, da es als nicht-selektiver Wirkstoff an alle Opioidrezeptoren bindet und als Antagonist nicht zwischen hoch- und niederaffinen Rezeptorzuständen unterscheiden kann. Inkubiert man nun die Membranen zusammen mit steigenden Konzentrationen der Opioide, so wird Diprenorphin mehr und mehr vom Rezeptor verdrängt, wodurch man die in *Abbildung 1* dargestellten Verdrängungskurven erhält. Aus diesen sogenannten heterologen Verdrängungskurven (Radioligand ungleich Kompetitor) kann man 2 wesentliche Informationen herauslesen. Zum einen die Konzentration des Opioids, die für die halbmaximale Verdrängung einer bekannten Konzentration von [3-H]Diprenorphin benötigt wird. Der Logarithmus der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}) wird auch als inhibitorische Konstante (pK_i) bezeichnet und stellt ein Maß für die Affinität des Kompetitors dar. Zum anderen weist die Steigung der

Hemmkurve auf die Anwesenheit einer oder mehrerer Affinitätszustände des verdrängenden Opioids hin. So können bereits aus den heterologen Verdrängungsexperimenten Hinweise darüber erhalten werden, ob ein Kompetitor als Agonist (kann zwischen hoch- und niederaffinen Rezeptorzuständen unterscheiden) oder Antagonist wirkt.

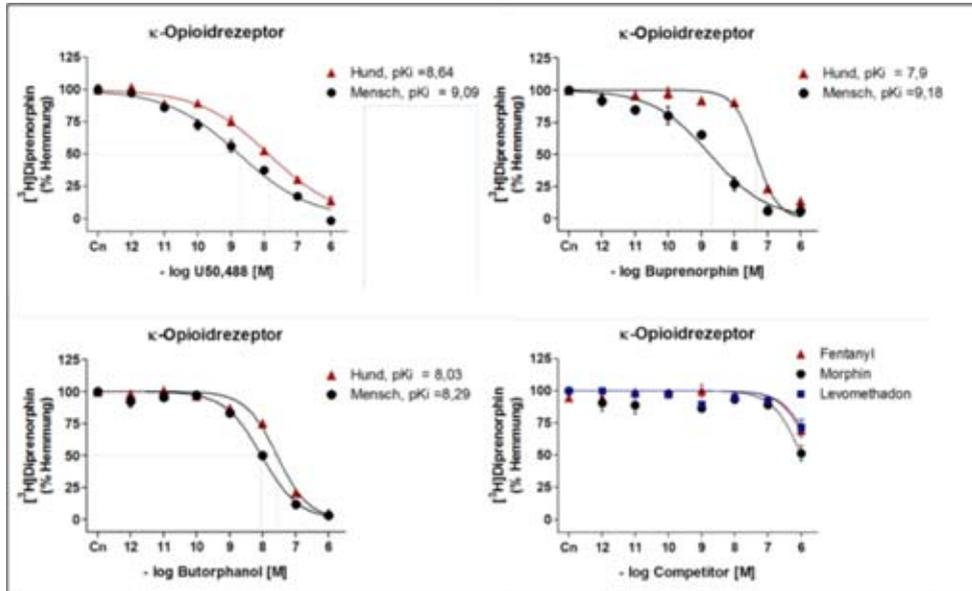


Abb. 1: Bestimmung der inhibitorischen Konstante pK_i (Affinität) verschiedener Opioiden an den klonierten κ -Opioidrezeptoren des Hundes und des Menschen im heterologen Verdrängungsexperiment.

Zunächst haben wir die Bindungseigenschaften des caninen und humanen ORPK1 mit einer experimentellen Testsubstanz untersucht (Abbildung 1, oben links). Hierfür wurde U50,488 verwendet, das einen selektiven Agonisten am κ 1- und κ 2-Opioidrezeptor des Menschen darstellt. Diese Substanz wird regelmäßig zur Charakterisierung κ -Opioidrezeptor-vermittelter zellulärer Effekte verwendet. Zu unserer großen Überraschung fiel auf, dass die Verdrängungskurven beim Hund im Vergleich zum Menschen um etwa den Faktor 3 nach rechts verschoben waren. U50,488 besitzt demnach eine niedrigere Affinität zum κ -Opioidrezeptor des Hundes als zu dem des Menschen. Keinen Unterschied fanden wir dagegen bei der Steigung der Verdrängungskurve. Diese lag für beide Rezeptoren bei $-0,4$. Dies bedeutet, dass in unseren Membranpräparationen etwa die Hälfte der Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt ist. U50,488 stellt demnach einen Agonisten dar.

Einen weiteren deutlichen und nicht zu erwartenden Unterschied haben wir für Buprenorphin gefunden. Wie in *Abbildung 1* oben rechts dargestellt, verhält sich Buprenorphin am OPRK1 des Menschen erwartungsgemäß als Agonist, was aus der flachen Verdrängungskurve mit der Steigung von $-0,5$ abgeleitet werden kann. Am OPRK1 des Hundes fällt die Kurve dagegen sehr viel steiler und mit einer Steigung von ca. $-1,2$ ab. Dies weist zusammen mit einer um etwa das 20-fach niedrigeren Affinität darauf hin, dass Buprenorphin am OPRK1 des Hundes keine partiell agonistische Aktivität besitzt, sondern einen reinen kompetitiven Antagonisten darstellt.

Auch bei Butorphanol erzielten wir unvorhergesehene Ergebnisse. Butorphanol stellt beim Pferd einen vollen, beim Menschen dagegen nur einen partiellen κ -Opioidrezeptoragonisten dar. Wie aus *Abbildung 1* unten links ersichtlich ist, unterscheiden sich die Verdrängungskurven von Butorphanol zwischen Mensch und Hund nicht. Aufgrund der Steigung von $-0,8$ stellt es auch beim Hund nur einen schwachen partiellen Agonisten dar und dürfte im Vergleich zum Pferd beim viszeralen Schmerz nicht besonders wirksam sein.

In *Abbildung 1* unten rechts ist schließlich zu sehen, dass sowohl Fentanyl, Morphin als auch Levomethadon nur eine vergleichsweise geringe Affinität zum OPRK1 des Hundes aufweisen. Bei therapeutischen Dosierungen dürften sie daher hauptsächlich bei traumatischen Schmerzen wirksam sein.

2. Bestimmung der Wirkpotenz (IC50) und Effizienz (Emax) im cAMP-Akkumulationstest.

Um die in der Radioligandenbindung gewonnenen Hinweise zur intrinsischen Aktivität der Liganden zu bestätigen, haben wir die Wirkpotenz und Effizienz der einzelnen Opioiden im cAMP-Akkumulationstest bestimmt. Hierfür wurden die Zellen in Gegenwart von Forskolin und steigenden Konzentrationen der Liganden stimuliert. Forskolin ist ein natürliches Diterpen, das alle vorkommenden Isoformen der Adenylzyklase aktiviert. Über die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine sind Opioiden nun in der Lage, die intrazelluläre cAMP-Produktion dosisabhängig zu hemmen. Dabei stellt die halbmaximale Hemmkonzentration ein Maß für die Wirkpotenz, die maximale prozentuale Hemmung ein Maß für die Wirkeffizienz einer Substanz dar.

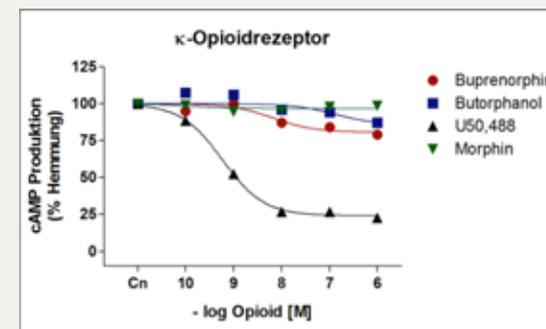


Abb. 2: Bestimmung der intrinsischen Aktivität therapeutisch eingesetzter Opioiden am klonierten OPRK1 des Hundes.



Wie aus *Abbildung 2* hervorgeht, stellt die Testsubstanz U50,488 in der Tat einen vollen Agonisten am OPRK1 des Hundes dar. Buprenorphin und Butorphanol können dagegen nur in höchsten Konzentrationen die cAMP Produktion um etwa 20% hemmen. Somit stellen Buprenorphin und Butorphanol am OPRK1 des Hundes nur schwache partielle Agonisten dar. Morphin, ebenso wie Fentanyl und Levomethadon (nicht gezeigt), können in therapeutischen Dosierungen die Adenylylzyklase über den OPRK1 des Hundes dagegen nicht beeinflussen.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse unserer Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Der prototypische Agonist U50,488 weist am klonierten OPRK1 des Hundes im Vergleich zum Menschen eine niedrigere Affinität auf.
2. Buprenorphin verhält sich am OPRK1 des Menschen als Agonist, am OPRK1 des Hundes als Antagonist.
3. Butorphanol wirkt sowohl am OPRK1 des Menschen als auch des Hundes nur als schwacher partieller Agonist.
4. Fentanyl, Morphin und Levomethadon weisen in therapeutischen Konzentrationen keine Wirkung am OPRK1 des Hundes auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass therapeutisch eingesetzte Opioide an ein und demselben Rezeptor verschiedener Spezies unterschiedliche intrinsische Aktivitäten besitzen können. Dies bedeutet im vorliegenden Fall, dass Buprenorphin beim Hund nur zur Praemedikation bei gering bis mittelgradig schmerzhaften Operationen am Bewegungsapparat, nicht aber bei Eingriffen in der Bauchhöhle geeignet ist. Im Vergleich zum Pferd lässt Butorphanol nur eine schwache Wirkung beim viszeralem Schmerz des Hundes erwarten. Dies steht im Gegensatz zu den für dieses Opioid in den Zulassungsbestimmungen genannten Indikationsgebieten. Zusammen mit den Ergebnissen für den OPRM1 werden wir über unsere Arbeit ein Manuskript erarbeiten und die Ergebnisse publizieren.

Danksagung

Wir danken Frau Sarah Koutnik für die technische Anleitung und Fortführung des Projekts sowie dem Förderprogramm VETResearch für die finanzielle Unterstützung. ■

Generation of a recombinant Modified Vaccinia virus Ankara for peptide delivery

Arne Auste

am Lehrstuhl für Virologie

Betreuer: Herr Dr. rer. nat. Lehmann und Herr Prof. Dr. med. vet. Sutter

Vaccines are effective and economic drugs for protection of animals and humans against infectious diseases. Today, there are several tools available how an antigen can be delivered to induce protective immunity in an individual. Viral vectors are an option. However, due to safety concerns and limited efficiency they frequently do not fulfill the regulatory requirements to get market authorization.

Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) was developed from chorioallantois vaccinia virus Ankara (CVA) as a safe vaccine against smallpox between 1960 and 1970. During the attenuation process of more than 500 passages in chicken embryo fibroblasts, CVA lost about twenty percent of its genetic material, which appeared as six major deletions in the genome of MVA when compared to the original CVA strain. Additionally, there are many minor deletions and small nucleotide polymorphisms, which substantially contribute to the specific phenotype of MVA, which constitutes in its inability to replicate in mammalian cells and to trigger rapidly innate immune responses.

Hence, MVA can be used as a viral vector to deliver antigens in animals and humans for inducing immunity. In general, this works well when complete proteins are used. However, only few complete coding sequences of foreign genes can be introduced into the genome of MVA. This restricts the number of immunodominant epitopes, which can be delivered by conventionally generated recombinant MVA's, and thereby limits the broadness of a potential immune response. Therefore, a first step to overcome this problem was addressed in the present project. It was tested whether a peptide sequence composed of three immunodominant epitopes originating from three different proteins can be efficiently expressed by MVA.

During the VETResearch project, the nucleotide sequence of three epitopes from three different proteins of an important infectious agent was cloned into a plasmid where its expression is directed by a strong vaccinia virus promoter. Then this plasmid was introduced by homologous recombination into the genome of MVA. Positive viral clones were selected using fluorescence microscopy and verified by PCR and immunoblot. The results are illustrated in the adjacent poster demonstrating that the goal of this two-month study was completely reached. The following large scale production, purification and quality control of the recombinant MVA as well as testing of this potential vaccine candidate in vivo will be continued.

The activity to integrate undergraduate students in real research projects is highly appreciated and we would even welcome to extend the support and time these students can spend in a

laboratory to perform experiments. Summarized, the project outcome was very satisfying especially in regard to the short time period available for the experimental work.

Background

Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) was primarily developed as a safe and effective vaccine against human smallpox. After more than 500 passages in chicken embryo fibroblasts MVA has lost about 15 percent of its genome. Because of this attenuation MVA is no longer able to grow in human and most other mammalian cell lines leading to its high biological and clinical safety when used as a vector vaccine.

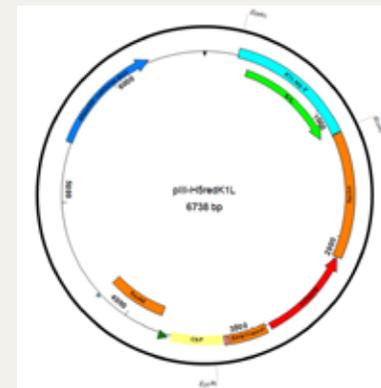


Fig. 1: The cloning vector

The plasmid pIII-H5redK1L served as a vector for introducing the coding sequence of a peptide (CSP) into the genome of MVA. It carries two flanking regions from deletion III of MVA, the coding sequence of the red fluorescent protein mCherry and the beta-lactamase gene conferring resistance to ampicillin.

After ligation of vector and CSP, *E.coli* strain Top10 were transformed by heat shock to propagate our vector plasmid. We plated out the bacterial solution on agar which was added ampicillin before. The next day resistant colonies were growing. To affirm the uptake of the complete plasmid, we conducted a diagnostic digestion with *EcoRI*. pIII-H5redK1L has three *EcoRI* restriction sites (Fig. 1). Software analysis of our vector gave us the length of the three bands we would expect in gel electrophoresis: 3611

Fig. 2: Screening for positive clones

Diagnostic digestion with *EcoRI* of seven picked clones proved existence of an inserted gene sequence, which was highly likely our CSP.

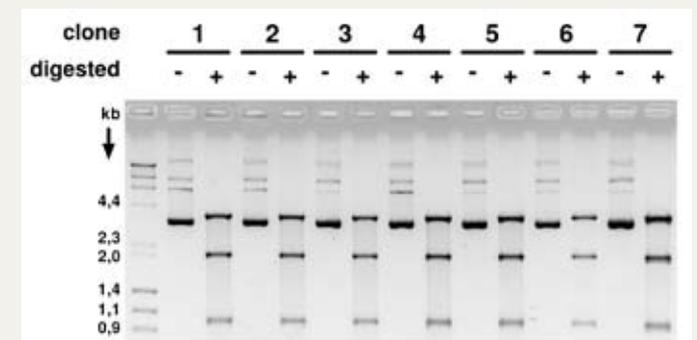


Fig. 3: Verification of MVA driven peptide expression

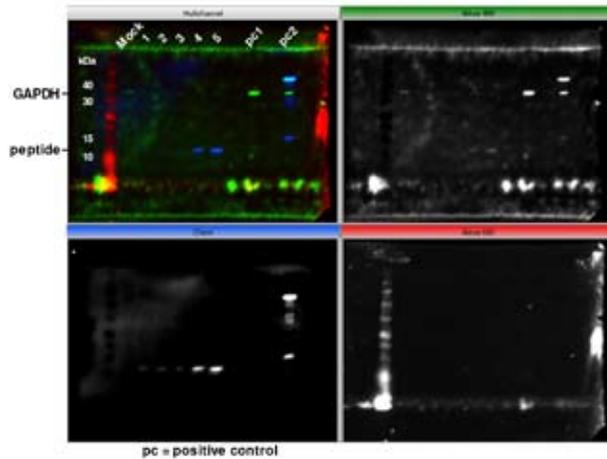
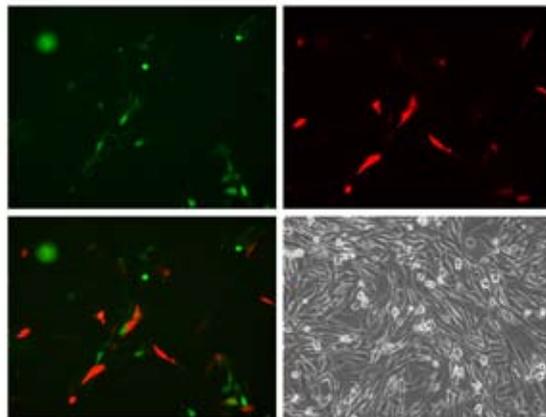


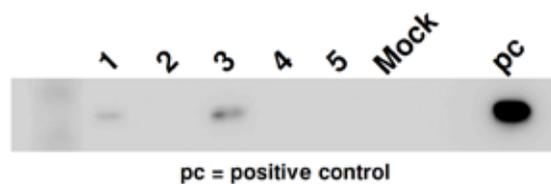
Fig. 4: Visualization of emerged recombination



Baby hamster kidney (BHK) cells were transfected with plasmids isolated from five different clones. After that, cells were infected with a MVA encoding the green fluorescent protein. The next day cells infected with the recombinant virus were detected using fluorescence microscopy (Fig.4).

Fig. 5: Quality Control of rMVA

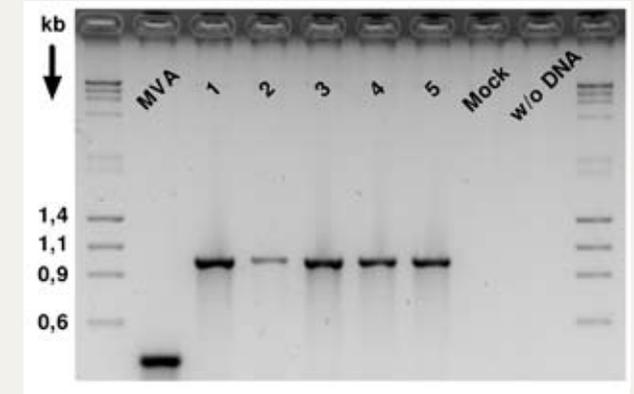
Western Blot showed the expression of the CSP in two purified clones.



Red color indicated homologous recombination of the plasmid with the genome of MVA. We isolated and propagated these red fluorescent cells to raise their concentration. Eventually 100 percent of the fluorescent cells appeared to be red. During several passages of virus purification mutations might occur which could lead to the loss of our CSP. As a verification of expression we checked the purified clones by Western Blot (Fig.5). A Deletion III PCR (Fig.6) showed the persistence of our CSP. In this respect two clones showed ability for further procedures of vaccine production.

Fig. 6: Quality Control of rMVA

MVA has six major deletions (H. Meyer et al. 1991). This deletion III PCR shows a band shift in every clone in comparison to wild type MVA. Moreover, there is no wild type virus in our five virus isolates.



Summary

MVA is a proven vector vaccine for delivering recombinant genes. There is plenty of knowledge and experience in genetic engineering of the virus. Procedures have been established which enable virus production even on an industrial scale (M. Kremer et al., 2012). Recombinant genes are efficiently expressed (G. Sutter et al., 1992) and have proven to be immunogenic as shown in several studies (F. Song et al., 2013; P. van den Doel et al., 2014). MVA is also an efficient candidate vector vaccine for delivering recombinant genes and inducing long lasting immunity in men (J. H. Kreijtz et al., 2014).

Einfluß von Vitamin D3 auf die Aktivierung boviner Neutrophiler Granulozyten

Annika Graaf
 an der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
 Betreuer: Herr Dr. med. vet. Petzl und Herr Dr. Dipl. Ing. Agr. Weber

Hintergrund:

Vitamin D3 besitzt neben seiner Funktion bei der Calcium-Homöostase eine entscheidende Rolle für die Regulation des Immunsystems. Hierzu zählen vor allem die gesteigerte Induktion antimikrobieller Peptide in Abwehrzellen nach Pathogen-Kontakt. Neutrophile Granulozyten (PMN) gelten als Haupteffektorzellen bei den wichtigsten bakteriellen Infektionserkrankungen des Rindes und sind Synthese- und Speicherort einer Vielzahl antimikrobieller Peptide.

Zielsetzung:

- Untersuchung des Einflusses von Vitamin D3 auf die Aktivierung von PMN
- Etablierung einer durchflusszytometrischen Echtzeitmessung des intrazellulären

Methodik:

1. Dichtegradientenzentrifugation: Isolierung boviner PMN aus gerinnungsgehemmtem Vollblut über einen Biocoll®-Gradienten.
2. Inkubation: PMN in An- und Abwesenheit von Vitamin D3 (40ng/mL, 2 h, 37°C).
3. Fluo-4-Färbung: Anfärben der Zellen durch Inkubation mit dem Fluorochrom Fluo-4-Acetylmethylester als Calcium-Indikator.
4. Durchflusszytometrische Quantifizierung: Messung von Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration in unstimulierten PMN (Medium-Kontrolle) und nach Stimul

Ergebnis:

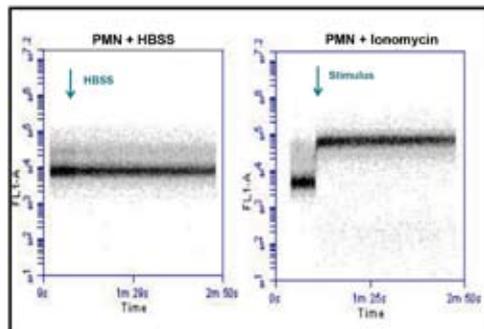


Abb. 1

Abb. 1:

Intrazelluläre Calcium-Messung an bovinen PMN nach Zugabe von HBSS (Hank's Buffer Salt Solution, Medium-Kontrolle) bzw. Ionomycin (Positivkontrolle). Die Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit Ionomycin geht mit einer maximalen Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels einher, was durch einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität des Ca²⁺-bindenden Fluo-4 erkennbar wird.

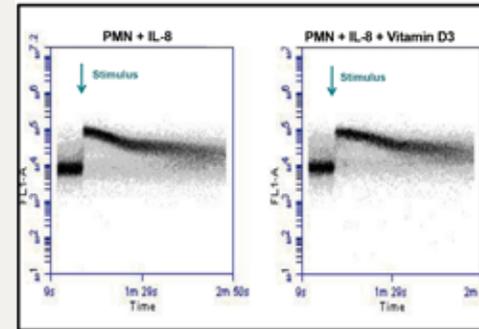


Abb. 2

Abb. 2:

Intrazelluläre Calcium-Messung an bovinen PMN nach Stimulus mit IL-8 ohne bzw. nach Inkubation mit Vitamin D3. Die Inkubation von PMN in An- und Abwesenheit von Vit D3 hatte keinen Einfluss auf die Dauer und Höhe des intrazellulären Calciumspiegels nach Zugabe von IL-8 (3 biologische Replikate).

Zusammenfassung:

- Eine zweistündige Inkubation von PMN mit Vitamin D3 hat keinen Einfluss auf den IL-8 vermittelten Calcium-Einstrom in PMN.
- Bei der Zugabe von Vitamin D3 während der durchflusszytometrischen Messung konnte kein direkter Einfluss von Vitamin D3 auf den intrazellulären Calciumspiegel in PMN festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Persönliche Meinung:

Insgesamt wurde meine Erwartung erfüllt, durch die Teilnahme an diesem Projekt einen Einblick in das wissenschaftliches Arbeiten und Denken zu erhalten. Spielt man bereits während des Studiums mit dem Gedanken einer möglichen Promotion, kann ich empfehlen, an einem solchen Projekt teilzunehmen, um den Tagesablauf eines Wissenschaftlers hautnah zu erleben.

Abschließend möchte ich mich sowohl bei Herrn Dr. Petzl als auch bei Herrn Dr. Weber und Laura Macias für die große Flexibilität bei der Terminfindung und die Betreuung während des Projektes bedanken. Ganz besonders danke ich Laura Macias und Sandra Kirsch dafür, dass sie mir bei Fragen jederzeit hilfreich zur Seite standen. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Zerbe und VetResearch für die Möglichkeit zur Teilnahme an diesem Projekt. ■

The testicle – another site for Equid Herpesvirus type 1 infection complications in the horse

Ranya Özcelik
an der Klinik für Pferde
Betreuer: Herr Prof. Dr. Göhring

Introduction

Equid herpesvirus Type – 1 (EHV-1) is a common pathogen among horse populations world-wide. It typically causes respiratory tract disease, but is feared for its severe complications: abortion in late-term pregnant mares, chorioretinopathies and myeloencephalopathies. All herpesviruses are known for their potential to cause latent infection. Latency is a non-replicative stage of the virus which is characterized by transcription of parts of the immediate early (IE)-gene of the virus' genome.

The aborted fetus, fetal membranes and fluids are besides respiratory tract secretions major sources of horizontal transmission of EHV-1 (important source of horizontal spread.). It has been shown that experimentally infected as well as naturally infected intact male horse are shedding EHV-1 with their ejaculate for several weeks (Tearle 1998, Walter. 2014) What role EHV-1 positive semen have in disease transmission and epidemiology of EHV-1 needs to be elucidated. However, the male reproductive tract could be an alternative location of EHV-1 latency and periodic recrudescence and transmission via semen could be an important link in (sub)clinical disease transmission.

Objectives

We investigated whether the testicles of EHV-1 purpose infected intact males 50 days post infection show evidence of EHV-1 infection. Histopathological examination was performed in addition to PCR testing. Specifically, we wanted to know whether testicles could be alternative sites of EHV-1 latency in the horse.

Hypothesis

EHV-1 infection in the intact male horse will cause a chronic persistent infection of the testicle.

Materials and Methods

As part of a larger study on EHV-1 immunopathology a total of 7 testicles from 4 intact male yearling horses were collected post infection on day 50 following nasopharyngeal application of 5mL of 10^7 TCID₅₀/mL of EHV-1 (strain: Ab4). The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA. The testicles were fixed in formalin and paraffin embedded. Sections were collected and prepared for routine Hematoxylin and Eosin (H&E) staining for histopathological evaluation. In

addition cut sections were prepared for DNA and RNA extraction. First, extracts were analyzed for presence of viral genomic DNA via quantitative PCR. Viral DNA positive samples were further analyzed for the presence of transcriptional activity (mRNA) of EHV-1 immediate early (IE), early (E) and late (L) genes.

Table 1: Primers and Probe

1. Genomic DNA
2. IE, E, L-gene transcriptome

Results

Histological evaluation of the H&E sections showed histopathological changes such as mononuclear cell infiltration and absence of spermiogenesis. We have observed extensive degeneration of seminiferous tubule epithelium, wide-spread perivascular monocyctic/lymphocytic infiltrates and orchitis with lymphoid follicles.

Viral genomic DNA could not be detected in any of the 7 samples. Evaluation of the tissue sections for transcriptional activity in the absence of genomic DNA was not pursued.

Conclusion

The histopathological results of this study support that testicular infection with EHV-1 has occurred. However, evidence of a chronic-persistent infection beyond day 50 could not be found.

The testicle is unlikely a location of EHV-1 latency; however, as there is evidence of blood-testicle barrier breach, other structures such as accessory sex glands should be evaluated.

Erfahrungsbericht

Ich hatte schon immer den Wunsch tiefere Einblicke in tiermedizinische Forschungsgebiete zu gewinnen. Der Vorschlag von Prof. Göhring von der Pferde Klinik der LMU im Rahmen des VetResearch Projekts 2015 über die Latenz der Equinen Herpes Viren im Pferde Hoden zu forschen war für mich eine einmalige Möglichkeit. In der Kombination Pferde Medizin und Krankheitsforschung habe ich meine zwei großen Interessenbereiche vereint vor gefunden. Besonders das Verstehen von fundamentalen Prozessen und die sehr präzise Arbeit im Labor haben mir große Freude zubereitet. Es war ebenfalls sehr wertvoll von erfahrenen Tierärzten aus dem Team der Pferde Klinik zu lernen. Durch mein Projekt bei VetResearch 2015 bin ich ein Schritt näher an mehr Wissen und Erfahrung gekommen. Einen herzlichen Dank daher an allen Beteiligten und Organisatoren an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU.
Ranya Özcelik, 11. Semester

Erfassung von Lokalreaktionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren mittels Ultraschall

Winfried Schön

am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuerin: Frau Dr. med. vet. Bernau

Ziel der Untersuchung:

Ziel der Untersuchung im Rahmen des VET Research Projektes war es, zusätzlich zu einer adspektorischen und palpatorischen Erfassung von injektionsbedingten Lokalreaktionen *in vivo*, wie sie in Zulassungsstudien für Biologika durchgeführt werden, eine sonografische Untersuchung durchzuführen und diese Methode zu bewerten.

Versuchstiere & Methoden:

Die im Rahmen dieses Forschungsprojektes erhobenen Daten stammten aus zwei Versuchsgruppen mit 16 (Kälber) und fünf hochtragenden Milchkühen. Die Injektionsstelle der Tiere wurden an Tag 0 vor der Injektion sonografisch untersucht, anschließend mit einem für die jeweilige Versuchsgruppe entsprechend zugelassenem Impfstoff nach Packungsbeilage geimpft. Die Folgeuntersuchungen fanden an den Tagen 1, 8, 15 & 22 statt.

Für die Untersuchung wurde die Lokalreaktion in Länge, Breite und Tiefe mittels eines Lineals ausgemessen und Qualität von Schwellung/Verhärtung palpatorisch erfasst und dokumentiert (siehe Abb. 1). Die innere rektale Körpertemperatur wurde bei jeder Untersuchung dokumentiert. Für die sonographische Untersuchung wurde ein transportables Ultraschallgerät (Sonosite Micromaxx) mit einem 58 mm Linearschallkopf und einer Eindringtiefe von 3,1 cm verwendet.



Abb. 1: Palpatorische Beurteilung einer Lokalreaktion bei einem Kalb.

Auswertung der sonografischen Daten:

Zunächst wurde das Bildmaterial nach Qualität selektiert, sodass pro Untersuchungstag ein Bild mit zwei Methoden parallel ausgewertet wurde. Es wurde zum einen versucht, mit der Änderung des Aufhellungsgrades zu arbeiten. Zum anderen wurden die Bilder neu kalibriert und die Umfangsvermehrung mittels der Software Synedra View Personal zweidimensional vermessen (siehe Abb. 2). Die Fläche wurde grafisch dargestellt und der zeitliche Verlauf der Flächenänderung mit allen erhobenen Daten, sowie den tierärztlichen Daten auf etwaige, während des Versuches diagnostizierte oder behandelte Krankheiten verglichen.

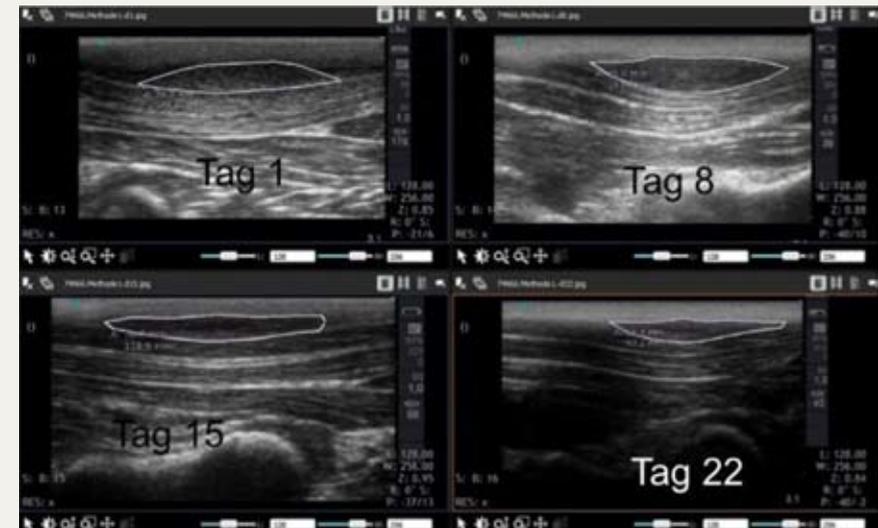


Abb. 2: Verlauf der Größe der Lokalreaktion bei einem Tier.

Ergebnisse:

Die Versuchsgruppe der hochträchtigen Kühe wurde nicht vollständig ausgewertet, da sich bei der Methode der Flächenvermessung von Lokalreaktionen keine mittels Sonografie eindeutig abgrenzbaren Veränderungen darstellen ließen. Bei der Auswertung der Kälbergruppe zeigte sich, dass der handelsübliche 58 mm Linearschallkopf Umfangsvermehrungen von > 400 mm² nicht komplett erfassen kann. Bei allen Kälbern ging die Schwellung relativ rasch zurück, die Verhärtungen blieben bei mehr als 60 % der Tiere auch über den letzten Untersuchungstag hinaus bestehen (siehe Tab. 1). Bei den Kälber, deren Umfangsvermehrungen zu jedem Zeitpunkt im messbaren Bereich lagen, zeigten 4 Tiere (25 %) nach Tag 1 eine Zunahme der Umfangsvermehrung im Vergleich auf den vorangegangenen Untersuchungstag. Diesen Kälbern konnte durch die Behandlungsdaten eine tierärztlich diagnostizierte und/oder behandelte Erkrankung des Respirations- oder Verdauungsapparates im Zeitraum von innerhalb 4 Tagen um die Messung des erhöhten Wertes zugeordnet werden.



Tab. 1: Ergebnisse der palpatorischen Untersuchung der Lokalreaktion der Kälber.

	Tag 1	Tag 8	Tag 15	Tag 22
Hgr. Schwellung	62,5%	6,25%	0%	0%
Ggr. Schwellung	37,5 %	12,5%	0%	0%
Keine Schwellung	0%	81,25%	100%	100%
Hgr. Verhärtung	18,75	0%	0%	0%
Ggr. Verhärtung	81,25	100%	81,25%	62,25%
Keine Verhärtung	0%	0%	18,75%	37,5%

Persönliche Meinung:

Das VET Research Programm bot mir eine einmalige Gelegenheit, mich bereits während dem Studium mit wissenschaftlichem Arbeiten, kombiniert mit der Planung & Durchführung des praktischen Teils, zu beschäftigen. Speziell, das von meiner, mich tatkräftig unterstützenden, Betreuung auf eine studentische Kapazität zugeschnittene Projekt machten dieses für mich zu einer sehr lehrreichen und wegweisenden Erfahrung, bei der ich viel Eigeninitiative einbringen durfte. Dazu gehören für mich neben der Motivation, seinem Interesse freien Lauf lassen zu können, auch die Erkenntnis, dass auch ein noch so gut geplantes Projekt teilweise Misserfolge zu verzeichnen weiß.

Ich wünsche mir für die Zukunft von VetResearch, dass noch vielen Studenten die Möglichkeit zuteil wird, sich ihrem eigenen kleinen Forschungsprojekt widmen zu können. ■

Erfassung von Lokalreaktionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren mittels Ultraschall

Ulrike Gerster
 am Lehr- und Versuchsgut Oberschleissheim
 Betreuerin: Frau Dr. med. vet. Bernau

Hintergrund der Studie:

Das Ziel der durchgeführten Untersuchung war die Erfassung einer Lokalreaktion mittels Ultraschall nach Applikation eines Arzneimittels beim Schwein sowie die anschließende Auswertung der gewonnenen Bilder.

Versuchstiere & Methoden:

Die Untersuchung wurde in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe bestand aus 17 Muttersauen (Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschweine, Kreuzungssauen), die vor dem Abferkeln mit einer Muttertierimpfung gegen Clostridien und Escherichia coli (2 ml Injektionsvolumen) in den Ohrgrund geimpft wurden.

Die zweite Gruppe setzte sich aus 18 schwäbisch-hällischen Ferkeln (4 Wochen alt) zusammen, die mit 0,5 ml eines Antiparasitikums subkutan entwurmt wurden.

Der Untersuchungsablauf an Tag 0 setzte sich aus der Identifikation der Tiere, dem Scheren der Injektionsstelle, dem Erstellen des Ultraschallbildes und anschließender Applikation des Arzneimittels sowie einer Temperaturkontrolle zusammen. An Tag 1, 8, und 15 wurde zusätzlich das Allgemeinbefinden und die Lokalreaktion adspektorisch, palpatorisch und mittels Ultraschall untersucht. Alle Daten wurden mithilfe eines Scorings in einem Untersuchungsbogen vermerkt. Dabei sind je nach Impfstoff unterschiedliche Reaktionsgrößen möglich. Eine Schwellung wurde mit einem Score zwischen 0 und 3 bewertet, wobei 0 keine Schwellung bedeutete, bei Score 1 war die Lokalreaktion unter den Herstellerangaben, aber vorhanden, bei Score 2 entsprach die Größe der Reaktion den Herstellerangaben und bei Score 3 lag die Größe der Reaktion über den Angaben des Herstellers. Eine Verhärtung beschrieb die palpatorische Verhärtung an der Injektionsstelle. Hier wurde zwischen nicht vorhanden (Score 0) und vorhanden (Score 1) unterschieden. Mit den Computerprogrammen Sante Editor 3 und Synedra View Personal wurde das Ausmaß der Schwellung in den Ultraschallbildern erfasst und vermessen. Die gewonnenen Messwerte wurden grafisch aufgearbeitet um Aussagen über das Ausmaß und die Entwicklung der Schwellung treffen zu können.

Ergebnisse:

In der Gruppe der Muttersauen zeigten 13 von 17 Tieren an Tag 1 deutliche Lokalreaktionen, jedoch deutlich mehr Verhärtungen (siehe Abb.1) als Schwellungen. Die Reaktion war bei allen Tieren an Tag 8 deutlich abgeschwächt und an Tag 15 mit der gewählten Methode nicht mehr erfassbar.

In der Ferkelgruppe zeigten 4 von 18 Tieren an Tag 1 eine geringgradige (ggr.) Reaktion, an Tag 8 waren keine Auffälligkeiten mehr an der Injektionsstelle feststellbar. Über die einzelnen Untersuchungstage ließ sich das Ausmaß der Schwellung in der Muttersauengruppe bei 6 Schweinen und in der Ferkelgruppe bei 5 Tieren am Ultraschallbild nachvollziehbar darstellen.

Gruppe 1 Muttersauen	Tag 1	Tag 8	Tag 15
	<ul style="list-style-type: none"> keine Temperaturveränderung 13 Sauen Verhärtung zw. 0,3 – 1,8 cm 2 Sauen Schwellung zw. 1 – 2 cm 1 Sau leichte Rötung 	<ul style="list-style-type: none"> keine Temperaturveränderung 4 Sauen ggr. Schwellung 1 Sau ggr. Verhärtung 2 Sauen leichte Rötung 	<ul style="list-style-type: none"> keine Temperaturveränderung keine Verhärtung, Schwellung, Rötung

Abb. 1: Darstellung der Ergebnisse der Muttersauen-Gruppe. ggr. = geringgradig.

Gruppe 2 Ferkel	Tag 1	Tag 8
	<ul style="list-style-type: none"> keine Temperaturveränderung 2 Ferkel zeigen 1cm große Schwellung 2 Ferkel kleine Verhärtung 	<ul style="list-style-type: none"> 2 Ferkel ggr. Temperaturveränderung keine Verhärtung, Schwellung, Rötung

Abb. 2: Darstellung der Ergebnisse der Ferkel-Gruppe.

Diskussion und Schlussfolgerung:

Der Ultraschall eignet sich grundsätzlich, um Lokalreaktionen beim Schwein darzustellen, jedoch erscheint das Darstellen von vorhandenen Schwellungen und deren exakte Messung nicht zufriedenstellend zu gelingen. Um diese exakter zu messen, müsste in folgenden Studien die Impfstelle genauer gekennzeichnet werden, sowie eine Fixierungsmöglichkeiten für die Sauen vorhanden sein.

Persönliche Meinung:

Das Projekt vermittelte mir einen guten Einblick in das Erarbeiten wissenschaftlicher Fragestellungen und die dabei einzuhaltenden Strukturen. Besonders hat mir das selbstständige Untersuchen der Tiere gefallen und das Erstellen der Ultraschallbilder. Meine Erwartungen an das Projekt wurden erfüllt, auch wenn ich mir aussagekräftigere Ergebnisse der Ultraschallbilddauswertung gewünscht hätte. Mein Dank geht an Frau Dr. Maren Bernau für die gute Betreuung und an das gesamte Team am Lehr- und Versuchsgut Oberschleissheim für die gute Zusammenarbeit.

Erfassung von Lokalreaktionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren mittels Ultraschall

Agnes Ludwig
am Lehr- und Versuchsgut Oberschleissheim
Betreuerin: Frau Dr. med. vet. Bernau

Ziel der Untersuchung:

Im Rahmen dieses VetResearch Projektes wurden Alpakas und Rinder untersucht. Es sollte mit Hilfe verschiedener Tiergruppen herausgefunden werden inwiefern sich der Ultraschall als nicht- invasives bildgebendes Verfahren eignet, die aufgrund von Injektionen stattfindende Lokalreaktion in Größe und Beschaffenheit zu dokumentieren.

Tiermaterial und Methode:

Die Alpakaversuchsgruppe bestand aus 8 weiblichen und 5 männlichen Alpakas, die an Tag 0, nachdem ein Bild der Injektionsstelle angefertigt wurde, mit einem Clostridienimpfstoff (2ml Injektionsvolumen) subkutan geimpft wurde. An den Tagen 1,8,15 und 29 wurde die Körpertemperatur kontrolliert, adspektorische und palpatorische Auffälligkeiten (Schwellung und/ oder Verhärtung) in einem Untersuchungsbogen festgehalten und ein Ultraschallbild angefertigt. Da sich auch am letzten geplanten Tag bei einigen Tieren noch Veränderungen zeigten, wurde der Versuch für diese Tiere bis Tag 36 verlängert. Desweiteren wurden 7 Kühe untersucht, die an Tag 0 nach dem Anfertigen eines Kontrollbildes mit einem Muttertiervakzine (5ml Injektionsvolumen) subkutan geimpft wurden. Der allgemeine Ablauf entsprach dem der Alpakas, wobei die Untersuchungen in dieser Gruppe an den Tagen 1,8, 15 und 22 nach der Injektion stattfanden. Für die Ultraschalluntersuchungen wurde ein portables Ultraschallsystem verwendet (MicroMaxx, GE). Als Sonde wurde ein Linearschallkopf (Länge 58mm) verwendet und eine Eindringtiefe von 3,1cm ausgewählt.

Zur Auswertung der Bilder wurden diese zunächst mit Bewertungen von +, Ok, - versehen, die sich auf die Qualität des Einzelbildes, aber auch auf die Logik der Bilderfolge bezogen. Die Bewertungen wurden dann in ein Punktesystem umgesetzt, so dass 5 von 13 Alpakas und 4 von 7 Kühen für eine genauere Vermessung der Bilderfolgen ausgewählt wurden.

Die Vermessung erfolgte mit dem humanmedizinischen Programm „Sante DICOM Editor“. Die Bilder wurden zunächst kalibriert, daraufhin die auffällige Stelle umrandet, so dass die Parameter Fläche [mm²], maximale Breite [mm] und Tiefe [mm] bestimmt wurden. Die zunächst vorhandene Idee mit dem ebenfalls aus der Humanmedizin stammenden Programm Synedra View personal die Grauwerte der Lokalreaktionen zu bestimmen und mittels dieser Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Auffälligkeiten zu ziehen erwies sich als nicht durchführbar, da die Helligkeit der Bilder aufgrund der unterschiedlichen Lichtverhältnisse angepasst werden mussten.

Ergebnisse und Diskussion:

Bei der Gruppe der Alpakas zeigten alle Tiere erfassbare Lokalreaktionen, wobei bei keinem der Tiere ein Anstieg der Körpertemperatur zu verzeichnen war. Der maximale Durchschnitt der Abmessungen fand sich an Tag15: Fläche= 289,8 mm² (± 97,7mm²), Länge= 38,7mm (± 1,9mm), Tiefe 7,8mm (± 6,9mm).

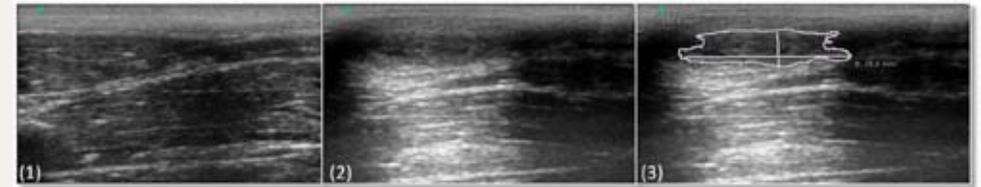


Abb. 1: Darstellung der Ultraschallbilder am Beispiel des Alpakas „Sunny“. (1) = Ultraschallbild an Tag 0; (2) = Ultraschallbild an Tag 29 ohne Bildbearbeitung; (3) = Ultraschallbild an Tag 29 mit vermessener Umfangsvermehrung.

Von den 7 untersuchten Kühen wiesen an Tag1 6 von 7 Tieren eine Veränderung auf. An Tag 15 konnte bei allen 7 Tieren eine Veränderung erfasst werden. Die Lokalreaktionen waren mit bloßem Auge Annäherung an das Tier zu erkennen. Ebenfalls auffällig waren die Abwehrreaktionen der Rinder, wenn die Stelle berührt oder geschallt werden sollte. Desweiteren reagierten 2 der Rinder an Tag1 mit einer Erhöhung der Körpertemperatur. Die maximalen Durchschnittswerte konnten wie bei den Alpakas an Tag 15 erfasst: Fläche =310,9mm² (±154,4mm²), Länge= 33,6mm (± 5,7mm), Tiefe= 10,6mm (± 3,8mm).



Abb. 2: Darstellung der Ultraschallbilder am Beispiel der Kuh 138. (1) = Ultraschallbild an Tag 0; (2) = Ultraschallbild an Tag 15 ohne Bildbearbeitung; (3) = Ultraschallbild an Tag 15 mit vermessener Umfangsvermehrung.

Der Ultraschall kann als nicht- invasive, zweidimensionale Methode dienen, um die Ausmaße einer Lokalreaktion objektiv und vergleichbar darzustellen. Im Gegensatz zur Beurteilung durch Adspektion und Palpation lässt sich auch die Tiefe einer vorhandenen Veränderung ermitteln. Um das Verfahren zu verbessern könnten genauere Versuchsprotokolle helfen, die es ermöglichen Bilder immer aus der genau gleichen Perspektive zu erhalten, so dass die Vergleichbarkeit noch →

weiter verbessert wird. Darüberhinaus wäre es möglich durch die Minimierung äußerer Einflüsse die Methode der Grauwertanalyse nutzbar zu machen, so dass diese ebenso als Methode der Auswertung zur Verfügung stünde.

Persönliche Meinung:

Das Projekt war mit seinen praktischen und theoretischen Teilen sehr abwechslungsreich. Zudem war es positiv, dass man oftmals sehr selbstständig tätig sein konnte, aber bei Schwierigkeiten immer Unterstützung im Hintergrund vorhanden war. Es war sehr schön auch gemeinsam in einem Team zu arbeiten und so auch die anderen Untersuchungen (Schwein, Kälber) mitzerleben. Mir gefiel der Einblick in die Durchführung einer wissenschaftlichen Studie und ich werde sicherlich die gewonnenen Erfahrungen in Hinblick auf eine spätere Dissertation und meine spätere berufliche Laufbahn einsetzen können. ■

Charakterisierung von neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) aus Rinderblut für die Verwendung in einem Entzündungsmodell

Isabel Seiffert, Andreas Öhm

an der Klinik für Wiederkäufer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Herr Dr. Dipl. Ing. Agr. Weber

Aufgabenstellung:

Ziel des Projektes war es, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) aus bovinem Blut im Rahmen einer Qualitätssicherung im Hinblick auf ihre Aktivität mittels Durchflusszytometer und Transmigrationskammer zu charakterisieren.

Hintergrund:

Neutrophile Granulozyten gehören neben den Makrophagen zu den Phagozyten. Sie sind die ersten Zellen, die die Endothelwand bei Entzündungsvorgängen durchqueren und gelten als Haupteffektorzellen im Entzündungsgeschehen. Dieser Prozess geschieht innerhalb von Minuten bis Stunden und könnte somit zur Diagnostik subklinischer Entzündungsgeschehen wie bei der subklinischen Endometritis herangezogen werden.

Versuchsaufbau

Aus dem zuvor gewonnen Rinderblut wurden mittels PMN-Dichtegradient-Zentrifugation mit Biocoll und hypertoner Lyse die PMN isoliert. Nachdem in einer Boydenkammer ein Konzentrationsgefälle eines geeigneten Chemotaktikums angelegt war, wanderten die dadurch angeregten Zellen durch die Polycarbonatmembran von dem oberen Well in das untere Well. Diese beiden Populationen wurden im Durchflusszytometer nach ihren Zelleigenschaften charakterisiert: Gewanderte PMN nehmen im Vergleich zu den nicht gewanderten an Zellgröße (Rechtsverschiebung, Abb. 1a + 1 b) sowie der Zellkern an Größe und Granularität (Verschiebung entlang der y-Achse, Abb. 1a + 1b).

Zu klären war: Handelt es sich bei den gewanderten und nicht gewanderten PMN um zwei unterschiedliche Populationen, die die in vitro aktivierbaren und nicht aktivierbaren PMN darstellen? Und ist es möglich diese Populationen durch eine geeignete Färbung voneinander zu differenzieren?

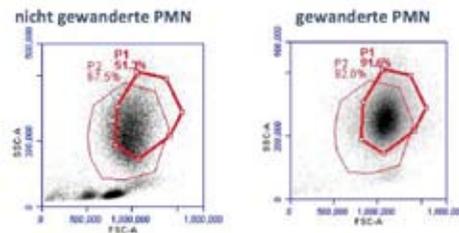


Abbildung 1a

Abbildung 1b

PMN-Adhäsionswechselwirkungen zu Infektionsherden

Die Adhäsion erfolgt im Allgemeinen in zwei Schritten: Der erste Kontakt zwischen Granulozyten und dem Endothel ist Selektin-vermittelt und nennt sich „Rollen“. Hierfür wurde ein Antikörper zu CD62L verwendet. Die anschließenden Adhäsion und Transmigration ist Integrin-vermittelt und wurde mit CD11b abgedeckt. In diesem Projekt wurde versucht, beide Signalwege erfassen.

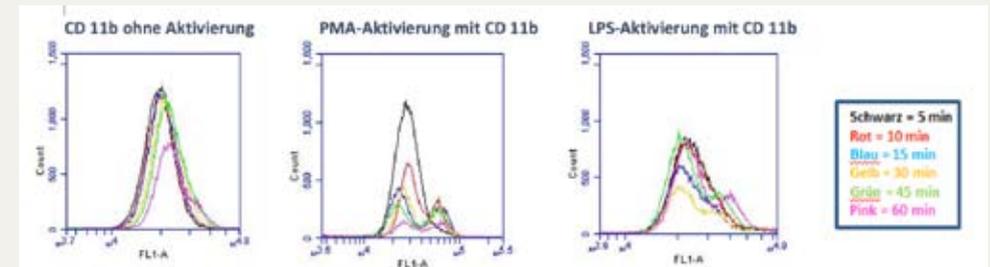


Abbildung 2a

Abbildung 2b

Abbildung 2c

Färbungen mit CD11b

CD11b bindet an die α -Untereinheit des MAC-1 Rezeptors, wenn dieser aktiviert ist. In einer Versuchsreihe mit diesem Marker wurden die optimalen Versuchsbedingungen bezüglich der Stimulanzen PMA und LPS, sowie der Messzeitpunkt für die Färbung ermittelt. Hierbei zeigte sich unter anderem, dass sich dieser Marker nur durch PMA adäquat aktivieren lässt: Bei beiden Stimulanzen bildet sich nach bereits 10-15 Minuten ein zweiter Peak mit verstärkter Fluoreszenz im Durchflusszytometer. Dies bedeutet, es gibt zwei Populationen von PMN, die sich unterschiedlich intensiv von CD11b anfärben lassen. Allerdings zeigte sich der zweite Peak ausschließlich bei Verwendung des Chemotaktikums PMA in Kontrolldurchgängen erneut eindeutig. Somit spielt nur PMA eine Rolle bei der Ausbildung der zweiten Population.

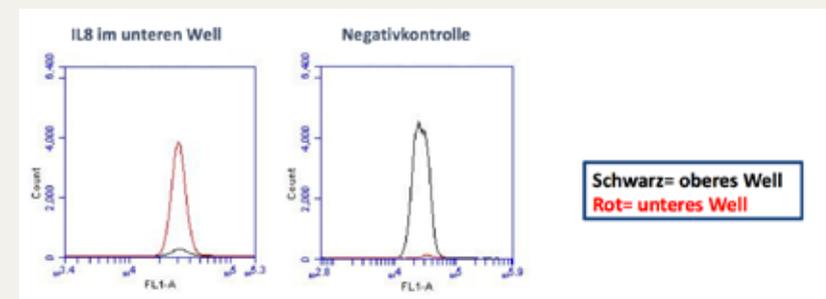


Abbildung 3a

Abbildung 3b



Mit dem Marker CD11b konnten die PMN nicht näher charakterisiert werden. Woran könnte das liegen?

In diesem Versuchsaufbau wurde mit CD11b gefärbt, was eine ungenügende Methode zu sein scheint, um gewanderte von nicht gewanderten PMN in einer Färbung differenzieren zu können. Dies kann an zwei Punkten liegen: Zum einen könnte es sein, dass alle PMN von CD11b markiert werden. Zum anderen war die Färbung ungenügend. In diesem Fall wäre eine Kombinationsfärbung mit CD18, der an der Beta2-Untereinheit bindet, sinnvoll.

Außerdem könnte IL8 nur ein ungenügender Reiz für die Zellen sein: Es lockt zwar die PMN, aktiviert diese aber nicht ausreichend oder auf eine Weise, durch die der CD 11b-Marker nicht vermehrt binden kann. Müssen die gewanderten PMN gegebenenfalls nochmals durch PMA aktiviert werden?

Für uns ist CD11b im Rahmen dieses Projektes zweitrangig geworden, da die unterschiedlichen Populationen nicht differenziert werden konnten.

Verwendung von CD62L

In den folgenden Versuchsreihen wurden Ansätze mit CD62L, einem Mitglied der L-Selectin-Familie, welcher beim Rind exprimiert wird, durchgeführt.

L-Selectine sind Moleküle auf der Oberfläche von Leukocyten, sie kommen also als erstes mit dem Gefäßendothel in Berührung. Durch gering affine, ständig auf- und wieder abgebaute Interaktionen zwischen diesen Molekülen und entsprechenden Liganden auf der Endotheloberfläche kommt es zum „Rollen“ der PMN entlang der Gefäßwand.

Bei Entzündungsprozessen erfolgt im Gewebe die Freisetzung verschiedener Mediatoren und Chemotaktika. Binden derartige Liganden an die extrazelluläre Domäne entsprechender L-Selectine auf der Oberfläche der PMN, ist eine Konformationsänderung die Folge und eine Signaltransduktionskaskade im Zellinneren („outside-in-signaling“) läuft ab.

Im weiteren Verlauf werden β 2-Integrine (CD11b/CD18) aktiviert und hochreguliert („inside-out-signaling“) und die Zelle bindet hochaffin an den entsprechenden Liganden. Somit ist der Extravasation der Weg geebnet.

Die Verwendung von CD62L wurde aufgrund eines wichtigen Gedanken begründet: Bei der Aktivierung der PMN kommt es zum sog. „Shedding“ des Rezeptors, er wird also proteolytisch abgebaut. Dementsprechend war anzunehmen, dass aktivierte Neutrophile Granulocyten eine verminderte oder fehlende Expression von CD62L aufweisen.

Im ersten Versuch wurde deshalb eine Transmigrationskammer ange-setzt und nach zweistündiger Wanderung (Stimulus IL-8) isolierter PMN wurden obere und untere Wells der jeweiligen Positiv- und Negativkontrolle im Durchflusszytometer gemessen, wobei die Hälfte der Wells mit CD62L angefärbt wurde.

In Abbildung 4 lässt sich erkennen, dass gefärbte Zellen (schwarzer Graph) stärker fluoreszieren als ungefärbte (roter Graph), wobei 2 Peaks im oberen Well der Positivkontrolle auffallen.

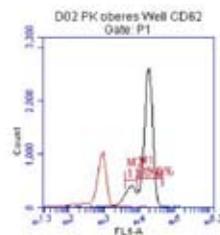


Abbildung 4

Daraus ergibt sich die Vermutung, dass diese 2 Peaks zwei unterschiedliche, durch IL-8 aktivierte Populationen von PMN repräsentieren.

Im nächsten Schritt sollte dies reproduziert werden, wobei die Zellen nicht in eine Kammer eingesetzt wurden, sondern verschiedenen Aktivatoren (IL-8, PMA, LPS) ausgesetzt wurden und dann nach Färbung in zeitlichen Abständen von 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min eine Messung im Durchflusszytometer erfolgte. Dabei wurde deutlich, dass mit zunehmender Zeitdauer die Fluoreszenz sinkt, was jedoch auch bei Wanderung in der Migrationskammer im direkten Vergleich zwischen oberem und unterem Well zu beobachten war.

Weitere Verdünnungsreihen mit IL-8 und PMA in Verbindung mit Messungen nach unterschiedlichen Zeitabständen brachten nicht die gewünschten Kurven, sodass in einer neuen Versuchsreihe an 3 Tagen Migrationskammern von jeweils immer den 3 gleichen Tieren angesetzt, mit IL-8 stimuliert und nach Färbung mit CD62L im Durchflusszytometer ausgewertet wurden. Nachdem in verschiedenen Versuchen immer wieder 2 Peaks in den oberen Wells einiger Positivkontrollen auffielen, lag die Vermutung nahe, dass die Ausbildung dieser Peaks erst nach Kontakt mit IL-8 erfolgte und diese 2 Peaks im oberen Well aktivierte und nicht aktivierte PMN darstellen, wobei nach der Wanderung im unteren Well nur ein Peak, also eine Population übrig blieb.

Die Zellen wurden vor dem Einsetzen in die Kammer (nach Färbung) und dann nach erfolgter, zweistündiger Migration im oberen und unteren Well gemessen.

Während sich die Kurven von Tier 1 am ersten Tag noch relativ unspezifisch verhielten, wurde an den folgenden Tagen bei allen 3 Tieren nach Stimulation mit IL-8 im oberen Well die Ausbildung von 2 Peaks beobachtet, die vor und nach der Wanderung nicht vorhanden waren (Abbildung 5a, c, d). Die entsprechenden Negativkontrollen (Abbildung 5b) bestätigten die Richtigkeit der Ergebnisse.

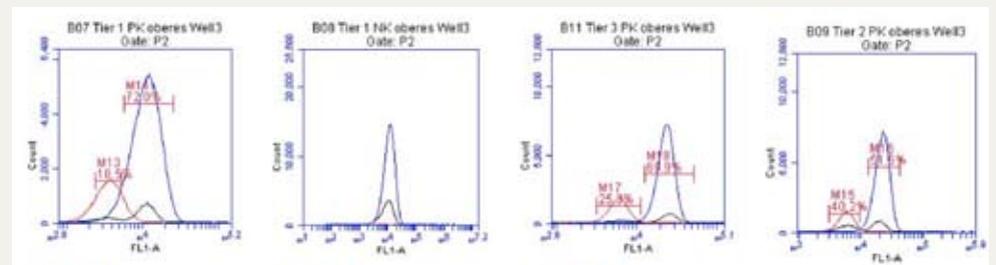


Abbildung 5a

Abbildung 5b

Abbildung 5c

Abbildung 5d

Fazit

Hinsichtlich der Vitalität der verwendeten PMN lässt sich sagen, dass eine erfolgte Wanderung Ausdruck dieser ist. Gewanderte Zellen verändern sich hinsichtlich ihrer Größe und der Granularität des Zellkern (s.o.) Auf unterschiedliche Stimuli reagieren die Zellen in sehr unterschiedlicher Weise wobei sich infolge einer Stimulation mit IL-8 2 Peaks ausbilden. Während



der Wanderung sinkt die Fluoreszenz, was sich mit dem Gedanken, dass der Rezeptor infolge der Aktivierung der Zellen abgebaut wird, deckt.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass sich isolierte PMN sowohl des selben Tieres als auch verschiedener Tiere an verschiedenen Tagen komplett unterschiedlich verhalten (können). Eine konkrete Aussage, wie sich die Zellen eines bestimmten Tieres verhalten werden, lässt sich dementsprechend nicht treffen.

Es stellt sich die Frage, ob das verwendete Protokoll zur Isolation der PMN tatsächlich geeignet ist, da die gewonnenen Zellen in keinsten Weise eine reine PMN-Population darstellen. Auch ist unklar, inwiefern eine Voraktivierung der Zellen besteht und in welcher Form sich der Reifegrad der Zellen auf die Versuchsergebnisse auswirkt. Gegebenenfalls müsste ein anderes Verfahren zur Isolation der Zellen versucht werden.

Hinsichtlich weiterführender Versuche wäre es interessant, sich zu fragen, ob gewanderte Zellen noch einmal eine Migration durchführen würden und ob eine Modifikation oder Abwandlung des durchgeführten Migrationsverfahrens in irgendeiner Weise veränderte Ergebnisse erbringen würde und wenn ja, welcher Art.

Auch auf genetischer Ebene könnten sich Genotypen verschiedener Tiere auf das Verhalten ihrer Neutrophilen Granulozyten auswirken.

Kritik am Versuchsaufbau

Das verwendete PMN-Isolationsverfahren liefert nur einen Reinheitsgrad von ca 67,5%. Dieses Isolationsverfahren könnte optimiert werden.

Eine Alternative stellt das Magnetic Cell Sorting dar, das jedoch den Rahmen dieses Projektes sprengen würde. ■