



www.vetmed.uni-muenchen.de

VETResearch 2016 Retreat

LEHRE@VET
Research



Eunike Bahlinger, Philipp-Michael Beindorf,
Marina Beisl, Ulrike Gerster, Jan Großhoff,
Anne-Sophie Hoffmann, Sigena Junker, Julia
Karbacher, Ines Koska, Johannes Köck, Katha-
rina Ratzke, Anne Reus, Antonina Schlicken-
rieder, Juliane Schrott, Jan Hendrik Schwarz,
Isabel Seiffert, Sara Steer, Verena Stössel,
Raquel Vazquez Aguion, Christian Zenner

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

Stand: März 2017



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 vorliegenden **VETResearch** Online-Broschüre 2016 werden die Ergebnisse der im vierten Jahr erfolgreich durchgeführten studentischen Forschungsprojekte vorgestellt. Die Projekte zeigen die Vielseitigkeit der Forschungsgebiete an der Tierärztlichen Fakultät auf. Als Betreuer eigener Projekte im mittlerweile vierten Jahr kann ich die große Bandbreite der Projekte über die Jahre hinweg bestätigen.

Die Idee Studierenden in der frühen Phase Ihrer Ausbildung die Möglichkeit zu geben ein eigenes Forschungsprojekt zu bearbeiten, fand ich hervorragend und hätte ich mir dergleichen für meine Ausbildung ebenfalls gewünscht. Durch die Teilnahme an **VETResearch** können Studierende erstmals „hinter die Kulissen blicken“, sie erfahren was hinter der Durchführung eines Forschungsprojektes steht und welche Arbeiten anstehen, bevor es z.B. wirklich praktisch losgehen kann. Zudem bietet es den Studierenden einen Einblick in die Strukturen des/ der jeweiligen Instituts/Klinik, und die Möglichkeit auf einer anderen Ebene mit den Betreuern, Doktoranden und technischen Mitarbeitern in Kontakt zu treten. Aber auch für die Betreuer bietet **VETResearch** eine Möglichkeit besonders motivierte Studierende kennen zu lernen, so dass nicht selten aus einem **VETResearch** Projekt eine Doktorarbeit entsteht, oder der Wunsch geäußert wird, im Rahmen einer Doktorarbeit weiter am Institut zu bleiben.

Der Abschluss einer jeden Förderphase mit dem Retreat ist aus meiner Sicht eine gute Gelegenheit, um den Studierenden einen Rahmen zu geben, ihre eigenen Forschungsergebnisse vorzustellen und ihnen damit auch den Respekt entgegen zu bringen, den ihre Arbeit ausmacht. Wir dürfen nicht vergessen, dass die Studierenden die Projekte neben ihren Vorlesungen, Prüfungen oder in der vorlesungsfreien Zeit bearbeiten. Für viele Studierende ist es das erste Mal, dass sie ein wissenschaftliches Projekt vor Publikum vorstellen und sich der anschließenden Diskussion stellen. Dies fördert nicht zuletzt auch die soft skills.

Ich kann nur jedem zukünftigen Betreuer und Studierenden empfehlen, an **VETResearch** teilzunehmen. Ein studentisches Forschungsprojekt bedeutet Gewinn auf beiden Seiten. Während die eine Seite viele praktische Einblicke in den Bereich der Forschung bekommt, erhält die andere Seite frische und unvorbelastete Ansichten, die nicht selten neue Wege eröffnen. Und nicht zuletzt entstehen so auch Kontakte, die in spannenden Doktorarbeiten münden.

Ein ganz besonderer Dank geht an das Studiendekanat mit Hr. Prof. Göbel, Fr. Dr. Beitz-Radzio und Hr. Thielemann, die jederzeit bei Fragen oder Problemen helfend zur Seite standen.

Dr. Maren Bernau
Betreuerin

Knochenmineralisierung beim Schwein

Juliane Schrott

Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

Betreuerin: Dr. Maren Bernau

Hintergrund und Ziel der Untersuchung

Das Auftreten von Defiziten in der Knochenmineralisierung kann zu Lahmheiten bei Mastschweinen sowie bei Zuchtebern zum vorzeitigen, krankheitsbedingten Ausscheiden aus der Zucht führen. Durch das Wissen um die Untersuchungsmöglichkeiten von Knochenmineralisierungsproblemen können zukünftig geeignete Tiere für die Zucht ausgewählt werden, die zur Verbesserung der Genetik beitragen.

Ziel der Untersuchung war es beim Schwein mittels Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie (DXA) geeignete Regionen zu ermitteln, in denen Unterschiede in der Knochenmineralisierung deutlich erkennbar und einfach zu definieren sind. Weiter sollte festgestellt werden, ob es Unterschiede in der Knochenmineralisierung zwischen den Geschlechtern (männlich intakten, immunologisch kastrierten, chirurgisch kastrierten und weiblichen Tieren), abhängig vom Alter oder von Umweltfaktoren (Jahreszeit, Fütterung und Haltung) gibt.

Versuchstiere & Methoden

Die Daten der Versuchstiere wurden 2013 im Rahmen einer Doktorarbeit erhoben. Alle Tiere sind vom Genotyp Piétrain x Deutsche Landrasse. Die 101 männlichen Tiere (zu gleichen Teilen intakte Eber, immunologisch und chirurgisch kastrierte Tiere) wurden in drei ca. gleich großen Gruppen (Gruppe 1 geboren im Juli, Gruppe 2 geboren im September, Gruppe 3 geboren im Januar) unter konventionellen Bedingungen im Außenklimastall auf Stroh gemästet. Während der Mastperiode wurde jeweils mit durchschnittlich 27 kg, 51 kg und mit 90 kg Körpermasse ein DXA-Scan durchgeführt. Die 18 weiblichen Tiere (Jungsauen; geboren im November) wurden konventionell in einem Vollspalten-Maststall gemästet und mit durchschnittlich 44 kg, 67 kg und mit 104 kg Körpermasse untersucht.

Für die Untersuchung wurde eine intramuskuläre Injektionsnarkose aus Ketamin (Ursotamin®; 15mg/kg) und Azaperon (Stresnil®; 2mg/kg) verwendet und im Bedarfsfall Ketamin (7mg/kg i.v.) nachdosiert.

Die Tiere wurden in Bauchlage mit angewinkelten Vorder- und nach hinten gestreckten Hintergliedmaßen auf dem Tisch positioniert und von rostral nach caudal mäanderförmig gescannt, was einen Zeitraum von ca. 13 Minuten beanspruchte. Verwendet wurde ein „GE Lunar iDXA“ (siehe Abb. 1). Für die männlichen Tiere wurde der Scanmodus „Dick“ und für die weiblichen Tiere der Scanmodus „Standard“ gewählt.

Die DXA eignet sich zur nicht invasiven Messung der Knochenmineraldichte (BMD) und des Knochenmineralgehalts (BMC) beim Schwein. Die Röntgenröhre erzeugt Strahlung, welche über einen Filter in zwei unterschiedliche Energieniveaus (35 und 70 keV) gespalten wird. Die

Photonen durchdringen den zu untersuchenden Körper und werden abhängig vom Gewebe aufgrund des Foto- und Compton-Effekts unterschiedlich stark abgeschwächt, was vom Detektor erfasst wird. Für die Berechnung wird von einem 3-Komponenten-Modell ausgegangen: Die Körpermasse besteht im Modell aus Fett-, Magerweich- und Knochenmineralgewebe.



Abb. 1: GE Lunar iDXA

Für das weitere Vorgehen war es entscheidend, geeignete Körperregionen zu definieren; Kriterien hierfür waren die Abgrenzbarkeit gegenüber benachbarten Strukturen und die Vergleichbarkeit der Altersstufen. Es wurden 9 Regionen definiert, wobei die Gliedmaßen im Seitenvergleich berücksichtigt wurden (Abb. 2).

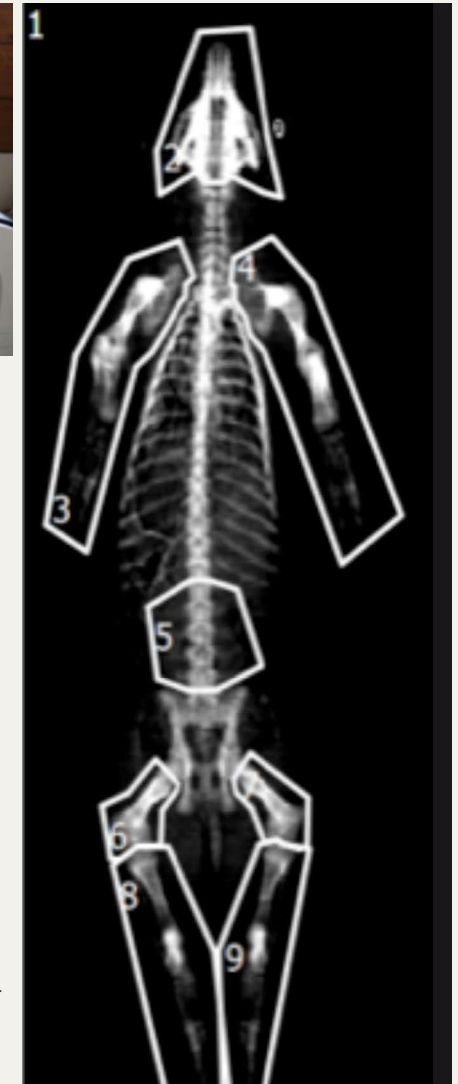


Abb. 2: ausgewertetes DXA-Bild mit den 9 definierten Regionen.

Region 1 – gesamter Körper

Region 2 – Kopf

Region 3/4 – linke/rechte Vordergliedmaße
inkl. Schulterblatt

Region 5 – 1. bis 5. Lendenwirbel

Region 6/7 – linker/rechter Femur distal der
jüngsten Stelle am Femurkopf

Region 8/9 – linke/rechte Hintergliedmaße
distal des Kniegelenks

Die statistische Analyse der Werte BMD und BMC für alle neun Regionen erfolgte mit der SAS Software. In der Mischmodellanalyse (Proc mixed) waren Geschlecht und Gruppe fixe Effekte, die Zufallseffekte waren Alter und Gewicht. Die Signifikanzgrenze lag bei $p < 0,05$.

Ergebnisse & Diskussion

Mastperiodeneffekt/Saisoneffekt: 30 kg-Scan

Im 30 kg-Scan zeigt sich ein Mastperiodeneffekt sowohl für BMD als auch für BMC. Die Tiere aus Gruppe 3 (Januar bis Juli) weisen die höchsten Werte auf, gefolgt von Gruppe 2 (September bis Februar). Gruppe 1 (Juli bis Dezember) hat die geringste Knochenmineralisierung. Bei Tieren, die in Perioden mit größerer Tageslichtlänge gemästet wurden, ist die Knochenmineralisierung höher.

Geschlechtseffekt: 60 kg-Scan & 90 kg-Scan

Im 60 kg-Scan zeichnet sich der Geschlechtereffekt bereits deutlich ab. Eber weisen in allen Regionen mit signifikanten Unterschieden die geringste BMD auf, während Jungsauen und Kastraten tendenziell die höchste BMD haben. Region 6/7 haben bei Kastraten die höchste BMD, während Region 8/9 bei Jungsauen die höchsten Werte zeigen. Für den BMC zeigen sich im 60 kg-Scan nur selten signifikante Unterschiede. Im 90 kg-Scan werden die Unterschiede deutlich: Eber weisen in allen Regionen die mit Abstand geringste BMD auf, während immunologisch kastrierte Tiere etwas geringere Werte als Jungsauen und Kastraten haben. Wieder zeigt sich für die BMD, dass in Region 6/7 die Kastraten und in Region 8/9 die Jungsauen den höchsten Wert haben. Betrachtet man die Regionen mit signifikanten Unterschieden im BMC, lässt sich feststellen, dass Jungsauen den höchsten BMC haben, gefolgt von den immunologisch kastrierten, an dritter Stelle folgen Kastraten, an letzter Stelle stehen die Eber (Abb. 3).

In dieser Untersuchung zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern, wobei Kastraten und Jungsauen die höchste und Eber die geringste Knochenmineralisierung aufweisen. Die Annahme liegt nahe, dass eine hohe Knochenmineralisierung mit einem geringen Muskelansatzvermögen korreliert. Interessant sind weiter die Unterschiede, die sich innerhalb des Skeletts zwischen den unterschiedlichen Geschlechtern gezeigt haben.

Persönliche Meinung

Das VET Research-Projekt hat mir unglaublich viel Spaß gemacht und das, obwohl die Arbeit größtenteils darin bestand, Daten am Computer auszuwerten. Ich bin sehr froh darüber, die Möglichkeit erhalten zu haben, schon während des Studiums Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten zu nehmen. Aus meiner Sicht ist es wahnsinnig spannend einer Fragestellung nachzugehen, zu der es noch keine befriedigenden Ergebnisse gibt. Neben den Vorlesungen und Prüfungen war das Projekt am LVG ein toller Ausgleich und am Schluss kann man ein kleines bisschen stolz auf seine Arbeit, das Ergebnis und den Vortrag sein. Ich hab es als sehr angenehm empfunden, dass mit so viel Vertrauen eigene Ideen und selbstständiges Handeln gefördert wurden. ■

BMD [g/cm ²]: Ergebnisse des 90 kg Scans							
Gruppe	R1	R3	R4	R6	R7	R8	R9
Eber	0,96 ± 0,011	1,02 ± 0,014	1,00 ± 0,013	1,13 ± 0,016	1,13 ± 0,018	0,80 ± 0,012	0,80 ± 0,013
immunologisch kastriert	0,99 ± 0,008	1,05 ± 0,010	1,05 ± 0,009	1,18 ± 0,012	1,17 ± 0,013	0,83 ± 0,010	0,84 ± 0,009
Kastrat	1,00 ± 0,010	1,07 ± 0,012	1,06 ± 0,012	1,18 ± 0,015	1,20 ± 0,016	0,85 ± 0,011	0,85 ± 0,012
Jungsau	1,02 ± 0,033	1,03 ± 0,044	1,08 ± 0,042	1,16 ± 0,050	1,17 ± 0,057	0,95 ± 0,038	0,94 ± 0,040

Abb. 3: Ausgewählte BMD-Werte des 90 kg Scans, unterteilt in die 4 Geschlechter.

Lahmheitsscoring und Klauenbonitur beim Mastschwein in verschiedenen Haltungsformen

Raquel Vazquez Aguion

Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

Betreuerin: Dr. Maren Bernau

Hintergrund und Ziel der Studie

Ziel dieses VET Research-Projektes war es, eine Statuserhebung der Klauengesundheit bei Mastschweinen am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim zu erfassen. Des Weiteren sollte durch Wahl zweier unterschiedlicher Haltungsbedingungen und zweier Hybridlinien der Einfluss der Haltung und der der Genetik auf die Lahmheitsproblematik beim Mastschwein untersucht werden. Dies hat sowohl eine wirtschaftliche Bedeutung für den Landwirt, als auch einen ethischen Aspekt im Bezug auf die Verbesserung der Tiergesundheit.

Versuchstiere, Methoden und Versuchsablauf

Es wurden zwei Versuchsgruppen (insgesamt 66 Tiere) untersucht. Die Versuchsgruppen unterschieden sich in ihrer Genetik: eine Gruppe Piétrain x Deutsche Landrasse (Pi-DL), die andere Gruppe Piétrain x Piétrain-Duroc (Pi-PiDu). Von jeder Versuchsgruppe wurde jeweils die Hälfte der Tiere in einem Außenklimastall (AKS; Stroh und Vollspaltenboden) und die andere Hälfte in einem Maststall (MS; ausschließlich Vollspaltenboden) gemästet. Alle Tiere durchliefen den gleichen Versuchsablauf.

Vor Beginn der Mast, im Alter von 77 Tagen wurde eine Klauenbonitur an jeder einzelnen Gliedmaße durchgeführt. Hierbei wurden die folgenden 8 Einzelmerkmale auf einer Skala von 1 (keine Veränderung) bis 4 (hochgradige Veränderung) bewertet: Unterentwicklung der Innenklauen, überlange Klauen, überlange Afterklauen, Kronsaumverletzungen, Lederhautblutungen, Hornrisse, Sohlendefekte und Weiße-Linien-Defekte. Zusätzlich wurde der Klauenwinkel an der jeweiligen Außenklaue jeder Gliedmaße gemessen. Diese Klauenbonitur wurde am Ende der Mastperiode (ca. 150 Tage) wiederholt. Des Weiteren wurde alle zwei Wochen ein Lahmheitsscoring durchgeführt. Durch Vorführen des Tieres wurde das Gangbild auf einer Skala von 0 (keine Lahmheit) bis 3 (hochgradige Lahmheit) beurteilt.

Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels SAS Software. Es wurde ein Chi-Quadrat-Test verwendet, um signifikante Unterschiede bezogen auf die Haltung oder die Hybridlinien zu erfassen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich einteilen in Hybridlinien- und Haltungsunterschiede. Tab. 1 stellt die Unterschiede bei der zweiten Klauenbonitur dar. Pi-PiDu zeigen häufiger Veränderungen (Score 2) in den Merkmalen Hornrisse und überlange Afterklauen als Pi-DL bei der zweiten Klauenbonitur (siehe Tab. 1).

Tiere im Maststall (MS) zeigen signifikant häufiger Lederhautblutungen (Score 1,5) als Tiere im AKS, sowohl an den Vorder- als auch an den Hintergliedmaßen. Im MS zeigen sich ebenso häufiger überlange Afterklauen (Score 2) im Vergleich zum AKS.

Tab. 1: Darstellung signifikanter Unterschiede bei der zweiten Klauenbonitur.

Unterschied	Merkmal	Ergebnis (Score 2)		Chi-Quadrat-Test
		Pi-PiDu	Pi-DL	
"Genetik"	Hornrisse vorne	21,88 %	1,56 %	p = 0.0020
	Hornrisse hinten	18,75 %	7,81 %	p = 0.0236
	Überlange Afterklauen vorne	25 %	9,38 %	p = 0.0272
Unterschied	Merkmal	Ergebnis (Score 1,5)		Chi-Quadrat-Test
		MS	AKS	
Haltung	Lederhautblutungen vorne	25 %	0%	p < 0.0001
	Lederhautblutungen hinten	12,5 %	7,81 %	p = 0.0143
	Ergebnis (Score 2)			
	MS		AKS	
	Überlange Afterklauen vorne	28,13 %	6,25 %	p = 0.0002
	Überlange Afterklauen hinten	28,13 %	14,06 %	p = 0.0044

(Score Skala von 1 (keine Veränderung) bis 4 (hochgradige Veränderung). MS = Maststall; AKS = Außenklimastall)

Bei der Messung des Klauenwinkels konnten die folgende Ergebnisse festgestellt werden: Pi-DL weisen im Vergleich mit Pi-PiDu sowohl an den Vorder- als auch an den Hintergliedmaßen den signifikant größeren Klauenwinkel auf ($54,96 \pm 0,67$ Pi-PiDu vs. $57,38 \pm 0,72$ Pi-DL, Vordergliedmaßen, Klauenbonitur II). Tiere im MS zeigen bei der Klauenbonitur II (Vordergliedmaßen) einen signifikant größeren Klauenwinkel als Tiere im AKS. Das Lahmheitsscoring steigt mit dem Alter an und wurde im Schnitt bei Tieren im MS höher eingestuft als bei Tieren im AKS.

Diskussion

Die Tierzahl ist in dieser Studie klein gewählt, für weitere Studien wäre es sinnvoll, eine größere Anzahl an Versuchstieren zu untersuchen, sodass auch Rasse-Stall-Interaktionen statistisch ausgewertet werden können. Der Beginn der Untersuchungen sollte für folgende Studien nach vorne verlegt werden (jüngere Tiere untersuchen), da die Tiere bereits mit 77 Tagen (Ende der Aufzucht) erste Klauenauffälligkeiten zeigten. Des Weiteren erscheint die Untersuchung reinrassiger Tiere notwendig, um eine bessere Aussage über bestimmte Rasse-Prädispositionen geben zu können. Im Rahmen der Studie hat sich gezeigt, dass in Bezug auf die Klauengesundheit keine Unterschiede zwischen der rechten und linken Körperhälfte festzustellen waren, somit dürfte die Untersuchung einer Gliedmaße bei weiteren Studien ausreichen. →

Persönliche Meinung

An diesem Projekt mitwirken zu dürfen, hat in vielerlei Hinsicht positive Auswirkungen gehabt. Für mich war es die erste Möglichkeit, an einer wissenschaftlichen Fragestellung zu arbeiten. Ich halte dies für sehr wichtig, da der Zweig der Wissenschaft im Bezug auf die spätere Berufswahl nicht außer Acht gelassen werden sollte. Mir hat das Projekt unheimlich viel Spaß gemacht, da ich sehr nah mit den Tieren zusammengearbeitet und die ganze Gruppe aufwachsen gesehen habe. Zusätzlich zum praktischen Teil konnte ich aber auch das erste Mal in die Welt der Statistik eintauchen, was ich als großen Vorteil auch im Bezug auf eine spätere Doktorarbeit sehe. Zum Schluss möchte ich außerdem noch die tolle Unterstützung und Betreuung aller Mitarbeiter des Lehr- und Versuchsgutes loben, die mir tatkräftig zur Seite standen und die ich immer um Hilfe bitten konnte. Ich würde mich sehr freuen, an einem weiterführenden Projekt arbeiten zu dürfen und so meine Erfahrungen im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens auszuweiten. ■

Body-Condition-Scoring bei Sauen mittels Ultraschall

Ulrike Gerster

Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

Betreuerin: Dr. Maren Bernau

Hintergrund der Studie:

Der Stoffwechsel der Sau ist während eines Produktionszyklus ständig wechselnden Einflüssen und teils massiven Veränderungen unterworfen. Dies spiegelt sich im Ernährungszustand der Sauen während dieses Prozesses wieder. Angestrebt wird ein gleichbleibend guter Ernährungszustand der Muttersau um optimale Bedingungen für die Ferkelaufzucht und die anschließende Wiederbelegung zu haben. Um den Ernährungszustand der Muttersauen zu beurteilen, wird die Kondition der Sauen im Rahmen eines Body Condition Scorings (BCS) von 1 (sehr mager) über 3 (optimal) bis zu 5 (sehr fett) eingestuft. Dies geschieht vor allem beim Umstallen in den Abferkelbereich und beim Absetzen der Ferkel, um etwaigen Abweichungen gezielt und effektiv entgegen steuern zu können. Dies ist jedoch ein rein subjektives Verfahren, bei dem vor allem die Kontur des Körpers von hinten und die Dornfortsätze der Brustwirbelsäule betrachtet werden.

Bei der Beurteilung der Körperkondition mittels Ultraschall hingegen wird die Rückenspeckdicke auf Höhe der Kniefalte gemessen. Aus der Höhe des Rückenspecks kann auf den Ernährungszustand der Sau geschlossen werden. Dies erfasst auftretende Schwankungen während des Reproduktionszyklus objektiv.

Versuchstiere und Methoden:

Es wurden drei Abferkel-Gruppen mit insgesamt 47 Tieren beurteilt. Die Rassenverteilung war wie folgt:

- 35 Sauen Deutsche Landrasse
- 8 Sauen Hybrid aus Deutschem Edelschwein und Deutscher Landrasse
- 2 Sauen Hybrid aus Piétrain und Schwäbisch-Hällischem Landschwein
- 1 Sau Duroc und
- 1 Sau Deutsches Edelschwein

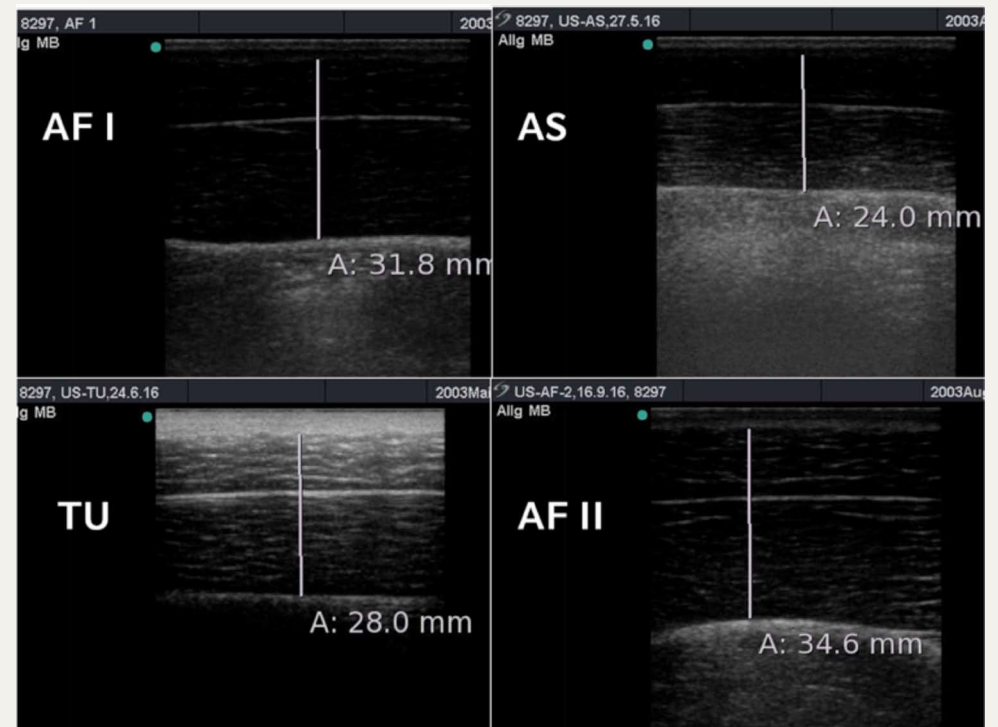
Die Messungen erfolgten am Tag nach dem Umstallen in den Abferkelbereich, fünf Wochen später nach dem Absetzen der Ferkel, weitere vier Wochen später bei der Trächtigkeitskontrolle und weitere zwölf Wochen später beim erneuten Einstallen in den Abferkelbereich.

Bei der Messung selbst wurde zuerst das betreffende Stück Haut am Rücken auf Höhe der Kniefalte rasiert und dann mit einem Linearschallkopf des MICROMAXX Ultraschallsystems ein Ultraschallbild des Rückenspecks angefertigt (Eindringtiefe 6,1 cm; siehe Abb. 1). Parallel dazu wurde die Körperkondition der Sauen mittels Body Condition Scoring per Adspektion beurteilt.



Abb. 1: Erfassung der Rückenspeckdicke mittels des MICROMAXX Ultraschallsystems unter Verwendung der Linearsonde bei einer Muttersau im Abferkelabteil vor dem Abferkeln.

Abb. 2: ausgewertete Ultraschallbilder zur Erfassung der Rückenspeckdicke. AF I = Messung vor dem Abferkeln; AS = Messung nach dem Absetzen der Ferkel; TU = Messung nach der Trächtigkeitskontrolle; AF II = Messung vor dem nächsten Abferkeln.



Die Ultraschallbilder wurden mit dem Synedra View Personal kalibriert und die Rückenspeckdicke ausgemessen (Abb. 2).



Ergebnisse:**1. Vergleich Body Condition Scoring (BCS) & Rückenspeckdickenmessung (RSD)**

Der Vergleich der beiden Methoden ergibt, dass man mit dem BCS die Abnahme der Körpermasse in etwa gleich gut darstellen kann, jedoch konnte die erst langsame Körpermassenzunahme während der Zeit im Deckzentrum und im Wartestall mit der Ultraschall-Rückenspeckdickenmessung objektiver und genauer als per Adspektion detektiert werden (Abb. 3).

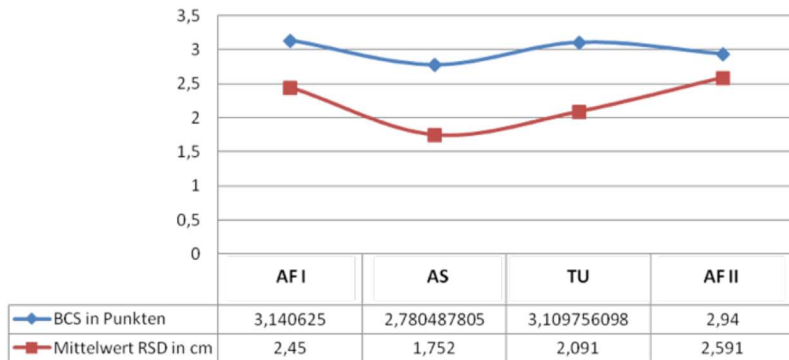


Abb. 3: Darstellung der Ergebnisse beider Methoden über den Untersuchungszeitraum.

2. Rückenspeckdicke

Die gewonnenen Daten zeigen (Abb. 3), dass die Sauen während der Laktation an Körpermasse abbauen und die Dicke des Rückenspeckes um bis zu einen Zentimeter reduziert wird. In allen drei Abferkelgruppen wird der Ausgangswert der Rückenspeckdicke über den Zeitraum der Trächtigkeit bis zum erneuten Abferkeln wieder erreicht bzw. übertroffen (Abb. 4).

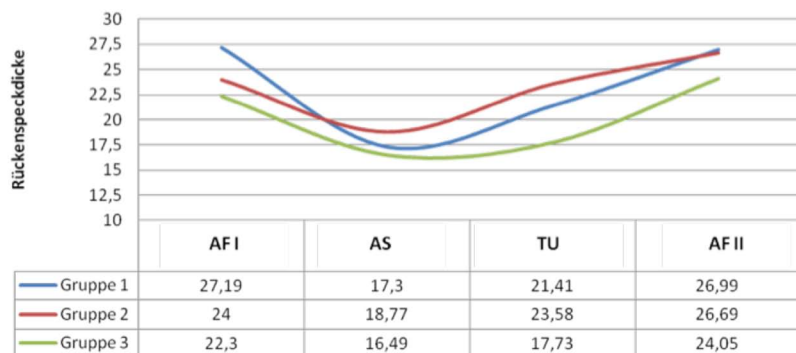


Abb. 4: Darstellung der Ergebnisse der Rückenspeckdickenmessung über den Untersuchungszeitraum, unterteilt in die drei Abferkel-Gruppen.

3. Rückenspeckdicke und Wurfdaten

Im Abgleich mit den Wurfdaten zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Rückenspeckdicke und Anzahl der geborenen Ferkel. Effekte zeigten sich jedoch in Bezug auf die Aufzuchtleistung. Dies soll durch weitere statistische Analysen geprüft werden.

Diskussion und Schlussfolgerung:

Die Methode der Rückenspeckdickenmessung via Ultraschall ist eine präzise und objektive Methode um die Körperkondition von Muttersauen während eines Reproduktionszyklus zu erfassen und zu beurteilen. Diese Methode eignet sich zum Beispiel bei der Beurteilung verschiedener Fütterungen. Um jedoch noch detailliertere Aussagen über die Zusammenhänge zwischen Rückenspeckdicke, Anzahl geborener Ferkel und Ferkelverluste machen zu können, sind noch weitere Studien, auch über einen längeren Zeitraum, nötig.

Persönliche Meinung:

Das Erarbeiten der wissenschaftlichen Fragestellung hat mir sehr viel Freude bereitet. Ich konnte selbstständig Ultraschallbilder erstellen und Daten erheben. Dass sich die Kondition der Muttersauen in den Daten so deutlich zeigt, hat mich beeindruckt und es wäre interessant, die Sauen über einen noch längeren Zeitraum weiter zu beurteilen.

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. ■

Die Bestimmung der Frische von Bachforellen mittels MALDI – TOF MS

Philipp-Michael Beindorf

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: Dr. Sebastian Ulrich

Hintergrund

Fisch und Meeresfrüchte haben einen Anteil von 15% an der Proteinaufnahme des Menschen. Unbehandelter frischer Fisch ist leicht verderblich und kann unter falschen Lagerbedingungen zu massiven gesundheitlichen Beschwerden führen. Ca. 40 % der jährlich vermarkteten Menge von rund 146 Millionen Tonnen (2014) aus Fischfang und Aquakultur wird gegenwärtig bis zum 10. Tag nach dem Fang als Frischfisch vermarktet, wobei eine genaue Kontrolle dieser Lagerungsdauer kaum möglich ist. Daher besteht auch die Gefahr der Verbrauchertäuschung. Nach den deutschen Leitsätzen für Fische, Krebs- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus bezeichnet der Begriff „Frischfisch“ Fische, die nach dem Fang unbehandelt bleiben oder nur gereinigt, ausgenommen, zerteilt oder so gekühlt werden, dass das Fischgewebe nicht gefriert. Gegenwärtig werden zur Überwachung der Qualität und des Frischezustand vor allem sensorische Methoden eingesetzt, was eine langjährige Erfahrung und Ausbildung voraussetzt, um eine entsprechende Bewertung vornehmen zu können.

Ziel des Forschungsprojekts

Im Rahmen des VetResearch-Projekts sollte eine MALDI-TOF Massenspektrometrie-basierte Methode zur Frischebestimmung von Fisch entwickelt werden. Bei der zu entwickelnden Methode sollten auch Aspekte der Wirtschaftlichkeit, Handhabung und Durchführbarkeit berücksichtigt werden.

Material und Methodik

In Deutschland ist die Forelle der beliebteste Süßwasserspeisefisch. Daher wurden 300 Bachforellen und 10 Regenbogenforellen von 2 Fischzuchten in der Nähe von München gekauft und in 3 Gruppen à 100 Fische aufgeteilt, die unabhängig voneinander zu verschiedenen Lagerzeitpunkten untersucht wurden. Gruppe 1 und 2 stammten aus der Fischzucht Berger und Grasse (Moosmühle) und Gruppe 3 aus der Fischzucht Mauka (Neufahrn). Die Regenbogenforellen (Berger und Grasse, Moosmühle) dienten zur Spezifitätskontrolle. Damit konnte zudem untersucht werden, ob mittels MALDI-TOF MS zwischen diesen nah verwandten Spezies unterschieden werden kann. Als Probenmaterial wurde die Augenflüssigkeit gewählt, da es sich dabei um einen abgeschlossenen und von äußeren Einflüssen (mikrobiologische Prozesse) weitgehend geschützten Raum handelt. Zur Identifikation der Proben anhand ihrer Massenspektren diente die Biotyper und ClinProTools-Software (Bruker Daltoniks GmbH, Bremen). Alle Fische wurden

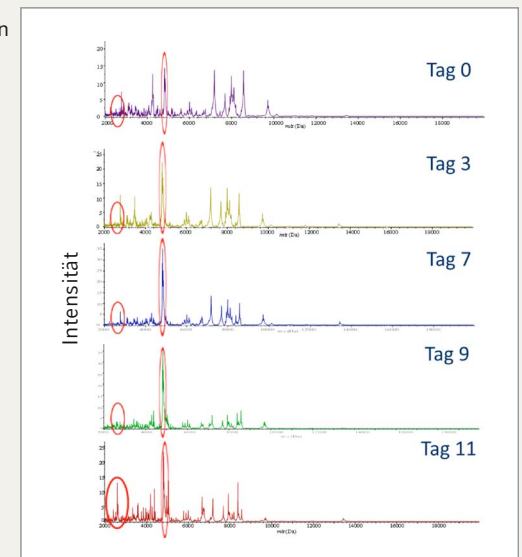
mittels Kopfschlag betäubt und anschließend geschlachtet. Während die Köpfe abgesetzt und bei +2°C gelagert wurden, diente der Rest vom Fisch als Lebensmittel. Messungen in jeder Gruppe sind an den Tagen 0, 3, 7, 9 und 11 nach der Schlachtung (jeweils 20 Fische pro Gruppe) durchgeführt worden. Zu der Gewinnung des Probenmaterials mittels einer Kanüle wurde von lateral nach medial in der Mitte des Auges ca. 2 mm tief gestochen. Die so gewonnene Probe wurde anschließend in ein Probengefäß überführt und bei 12,300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand abgenommen und in einem neuen Probengefäß 1:1 mit Ethanol (75%) vermischt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12,300 x g für 5 Minuten wurden 9 µl vom Überstand entnommen und 1:1 mit Hydroxy-Zimtsäure-Matrix vermischt. Die Lösung wurde nach der „dried droplet“-Methode auf einem polierten Stahl-Target mit 8 Spots à 1 µl aufgetragen. Nach der Trocknung erfolgte die Messung mittels MALDI-TOF MS (AutoFlex Speed II). Das Gerät wurde vor jeder Messung anhand eines Test-Standards (Massenbereich: 3,637.8-16,952.3) kalibriert. Zur Auswertung standen bei 300 Fischen (3 Gruppen, 20 Fische, pro Tag je 8 Spots) am Ende 2400 Spektren zur Verfügung.

Ergebnisse

Die Augenflüssigkeit hat sich als zur Spektrengenerierung gut geeignetes Probenmaterial herausgestellt und die Probennahme ist einfach und standardisierbar durchzuführen. Beim Analysieren der Massenspektren mittels ClinProTools Software konnten Massen bei m/z 2594, 4857, 4879 und 4899 Da (Abbildung 1) ermittelt werden, die signifikante Intensitätsunterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Lagerungstage aufwiesen. Anhand dieser Peaks kann eine Bestimmung des Todestages der Fische erfolgen. Mittels der erstellten MALDI Biotyper Referenzspektren war es zudem möglich zwischen den zwei sehr ähnlichen Forellen-Spezies zu unterscheiden (Abbildung 2, siehe Seite 18).

Aktuell befindet sich ein Manuskript zu diesem Forschungsprojekt im Review-Prozess eines international anerkannten Fachjournals.

*Abbildung 1:
Spektren einer Bachforelle an den
Tagen 0, 3, 7, 9 und 11 nach der
Tötung. Die Markierungen
stellen die zur Identifizierung
verwendeten Massenbereiche dar.*



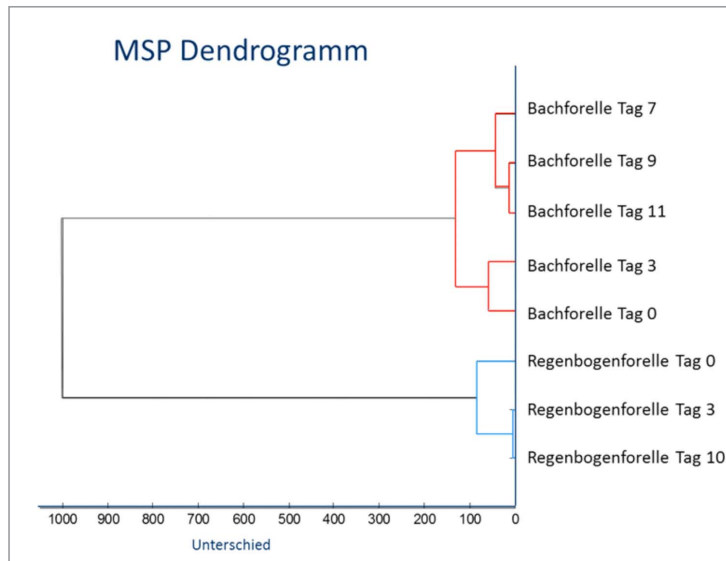


Abbildung 2:
Dendrogramm
von Bach- und
Regenbogenforellen

Persönliche Einschätzung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. habil Gareis und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit, einen Einblick in die Forschungsarbeiten am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit zu erhalten. Im Rahmen des VetResearch-Projektes war es mir möglich, Erfahrung mit der MALDI-TOF MS Technologie zu sammeln. Ich kann allen Studenten, die sich bereits während des Studiums für Forschung interessieren, die Durchführung eines VetResearch-Projekts sehr empfehlen! ■

Optimierung des Standardprotokolls der PMN Zellisolierung hinsichtlich Reinheit

Isabel Seiffert

Klinik für Wiederkäufer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Frank Weber

Aufgabenstellung

Ziel des Projektes ist eine kritische Überarbeitung des zur Zeit verwendeten Standardprotokolls mit dem Ziel eines höheren Reinheitsgrades bei der Isolation von polymorphkernigen neutrophile Granulozyten (PMN) aus bovinem Blut.

Hintergrund

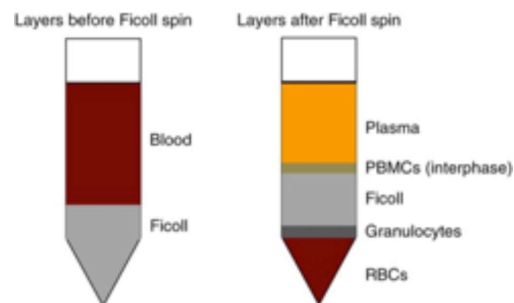
Neutrophile Granulozyten gehören zu den Haupteffektorzellen im Entzündungsgeschehen. Sie erreichen das Zielgewebe von der Blutbahn aus durch Chemotaxis innerhalb von Minuten. Aufgrund dessen sind sie für die Diagnostik subklinischer Entzündungsgeschehen sehr interessant. Die Rinderklinik arbeitet seit Jahren mit den PMNs im Rahmen der Immunitätsforschung bei Mastitis und Endometritis der Kuh. Isolierte bovine PMNs finden Eingang in Experimenten mit Transmigrationskammern, Immunofluoreszenzfärbung und in Genexpressionsstudien nach Kokultivierung. Das verwendete Standardprotokoll zur PMN Gewinnung soll nun grundsätzlich auf Verbesserungsmöglichkeiten überarbeitet werden, um eine höhere durchschnittliche Reinheit als ca. 70% gewährleisten zu können.

Einleitung

Das bisherige Standardprotokoll zur PMN Isolation besteht aus drei Abschnitten:

Zellseparation: 15ml Vollblut und 15ml PBS (geschwenkt) werden auf 15ml Bicol (1,077g/ml) geschichtet und bei 30min 10°C 1300xg ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend werden die oberen Phasen Bicol, Plasma und Interphase abgenommen, lediglich mit der Granulozytenphase und dem Erythrozytenpellet wird weiter gearbeitet.

Erythrozytenlyse: Das Zellpellet wird auf 10ml mit PBS aufgefüllt. Mittels zweimaliger hypotoner Lyse werden die Erythrozyten eliminiert. 20ml Aquadest wird auf das Pellet gegeben und vorsichtig geschwenkt nach 20 Sekunden wird 20ml einer doppeltkonzentrierten PBS Lösung hinzugegeben. Für 8 min bei 4°C und 220g wird nun zentrifugiert, der Überstand mit den Erythrozyten-Resten wird abgekippt und die Erythrozytenlyse wiederholt. Anschließend sollte ein klares Pellet im Falkontube zurück bleiben.



Aufreinigung des Pellet: Das Pellet wird in 20ml PBS resuspendiert und 8 min bei 4°C und 220g einmal zentrifugiert.

Welche Abschnitte könnten optimiert werden?

Das Separationsmedium trennt während der Zentrifugation die Zellen ihrer Dichte nach auf. Nur Zellen, die schwer genug sind, können mittels der Zentrifugalkraft durch das Separationsmedium gedrückt werden. Somit ist direkt von der Dichte des Separationsmediums abhängig, welche Zellen mit dem Überstand verworfen werden und mit welchen Zellen im Pellet weiter gearbeitet wird.

Neben dem Medium haben auch die Einstellungen an der Zentrifuge selbst einen Einfluss auf die Separation der Zellen. Daher werden Temperatur, RCF (Relative Centrifugal Force (g) und die Dauer der Zentrifugation verändert.

Außerdem wird die Reihenfolge der Arbeitsschritte variiert. Zuerst die Erythrozytenlyse mit anschließender Zellseparation, sowie eine Wiederholung der Separationsschritte.

Eingangsversuche

Im Folgenden wird das Standardprotokoll hinsichtlich drei Parameter untersucht: dem Separationsmedium, den Zentrifugationsbedingungen und die Abfolge der Arbeitsschritte. Hierfür wird vorerst nur eine Variable verändert, später werden die erfolgversprechenden Veränderungen kombiniert. Parallel zu den Versuchen wird immer auch ein unveränderter Ansatz nach dem Standardprotokoll durchgeführt, welcher als Kontrollwert dient.

Separationsmedium: Im ersten Schritt wurde in einer Versuchsreihe das bisher verwendete Separationsmedium Bicol (1.077 g/ml) mit Percoll (1.124g/ml) verglichen. Dafür ist eine Verdünnungsreihe von Percoll in 5 Stufen mit einer Dichtedifferenz von ca. 0.09 g/ml bis zum Dichtegrad von Bicol angelegt worden.

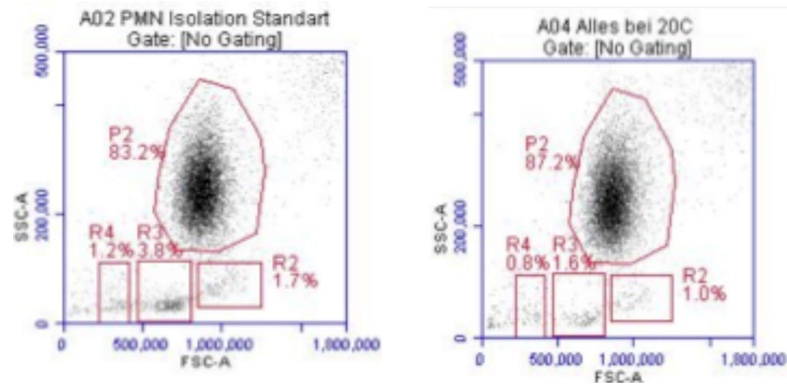
Percoll mit der Dichte von 1.007g/ml und 1.087g/ml zeigt eine höhere Reinheit von 5,5% bzw. 5,6% auf. Diese Verbesserung soll in den Folgeversuchen weiter untersucht werden.

Separationsmedium	Dichte	Ergebnis	
Bicol Standard	1.077 g/ml	78,9 %	Referenzwert
60,5% Percoll	1.077 g/ml	84,4 %	+5,5%
68,9% Percoll	1.087 g/ml	84,5%	+5,6%
76,5% Percoll	1.096 g/ml	80,8 %	+1,9%
84,0% Percoll	1.105 g/ml	63,2%	-15,7%
92,5% Percoll	1.114 g/ml	63,5%	-15,4%
100% Percoll	1.124 g/ml		bereits verworfen



Um den Einfluss der Zentrifugeneinstellungen zu untersuchen, wird erstens die Temperatureinstellung separat untersucht und zweitens die Geschwindigkeit der Zentrifuge in Abhängigkeit von der Zeit.

Temperatureffekt: Um den Stress der Zellen zu minimieren, soll die Temperaturveränderung so gering wie möglich gehalten werden. Die physiologische Temperatur der PMN liegt bei Körpertemperatur. Während dem Transport vom Stall zum Labor und den dortigen Vorbereitungsschritten, kühlen die PMN bereits von 37°C auf Raumtemperatur ab. Anstatt die PMN erst auf 10° in der Zentrifuge, dann auf 4°C herunter zu kühlen, werden diese nur bei 20°C zentrifugiert. Die Abbildung zeigt die Messung der Zellen im FACS, wobei die PMN mittig im Gate P2 zu finden sind. Im linken Bild ist die Standardisolation zu sehen mit einer Reinheit von 83,2%. Der Versuchsansatz bei 20°C (rechts) weist eine um 4% höhere Reinheit auf. Dies soll auch in Folgeversuchen genauer betrachtet werden.



RCF und Zeit: Da die RCF und Zeit für die Leistung einer Zentrifuge voneinander abhängig sind, werden diese beiden Variablen gemeinsam gemessen. Da die Geschwindigkeit im Standardprotokoll auf 1300xg festgelegt ist und dies das Maximum der in der Rinderklinik zur Verfügung stehenden Zentrifugen ist, kann hier nur eine Reduktion der RCF untersucht werden. Die Versuche hierzu zeigten allerdings deutlich negative Ergebnisse, weshalb im weiteren Verlauf der Versuche die Einstellungen bezüglich der RCF (1300xg) und Zeitdauer (30 min) beibehalten wurden.

Schließlich wird eine **Wiederholung der Arbeitsschritte** sowie die Reihenfolge untersucht. Sowohl eine wiederholte erneute Schichtung auf BicolI, als auch eine vorgezogene Erythrozytenlyse verschlechterten die Reinheit der PMN, diese Ansätze wurden verworfen.

Endversuche

Bisher konnte eine Verbesserung der Reinheit mit dem Alternativmedium Percoll in verschiedenen Dichtegraden erreicht werden, sowie bei einer Temperaturerhöhung auf 20°C. Diese Parameter sollen nun kombiniert und optimiert werden:

Dichte\ Kuh	20°C	Kuh 1- 124	Kuh 2-222	Kuh 3- 277
Standard 1.077g/ml		72,2%	76,3%	66,7%
Percoll 1.082		87,6%	89,3%	88,6%
	+ 16,7%	+ 15,4%	+ 13%	+ 21,9%

Dichte\ Kuh	10°C	Kuh 1- 156	Kuh 2 – 297	Kuh 3 -299
Standard 1.077g/ml		91,1%	87,2%	91,3%
Percoll 1.082 g/ml		92,3%	93,4%	94,4%
	+ 3,5%	+ 1,2%	+ 6,2%	+ 3,1%

Temperatur-Dichte: Innerhalb der zwei Temperaturgruppen von 10°C und 20°C wird BicolI mit Percoll in verschiedenen Dichtegraden verglichen. Als Ergebnis ist die Reinheit bei dem Standardprotokoll, sowie bei Percoll mit 1.082g/ml am Besten. Demnach wird BicolI im Standardansatz und Percoll mit einer Dichte von 1.082g/ml für beiden Temperaturbedingungen verglichen. **BicolI vs. Percoll (1.082 g/ml):** An 2 Tagen wird der Versuch mit PMN Präparationen von drei verschiedenen Kühen durchgeführt. Am Tag 1 läuft der Versuch unter den Standardtemperaturbedingungen, am Tag 2 wird die gesamte Isolation bei 20°C durchgeführt. In allen Ansätzen ließ sich eine höhere Reinheit der PMN mit dem neuen Separationsmedium Percoll (1.82g/ml) erzielen. Dies stellt im Durchschnitt eine Verbesserung der Reinheit um 10,1% dar, sowie ein Endergebnis von über 90% Reinheit der PMN bei einer Isolationstemperatur von 20°C. Auch bei der Isolation mit BicolI und 20°C zeigt sich ein positiver Effekt. Die Zellen werden weniger Stress ausgesetzt, welches einen vorzeitigen Zerfall mindert.

Fazit

Bei der Optimierung des Standardprotokolls wurden Schritt für Schritt die einzelnen Parameter zuerst separat, dann kombiniert betrachtet. Es empfiehlt sich im Standardprotokoll das Separationsmedium BicolI durch Percoll in einer Dichte von 1.082g/ml auszutauschen und die Temperatur auf 20°C bei der Isolation zu erhöhen. Diese Empfehlung hat die Rinderklinik für ihr Standardprotokoll erfolgreich übernommen.

Persönliche Erfahrung

An dem Vet-Research Projekt habe ich persönlich zum zweiten Mal unter der Leitung von Herrn Dr. Weber teilgenommen. Am Anfang des Projektes haben wir gemeinsam das Ziel des Projektes besprochen, im weiteren Verlauf konnte ich mein Vorgehen jedoch selbst bestimmen. Für Rücksprache über die angehenden Versuche stand Herr Dr. Weber immer zur Verfügung. Auch im Labor wurde ich unter persönlicher Betreuung eingewiesen. Ich durfte alle meine eigenen Ideen umsetzen und ausprobieren, auch wenn die Erfolgchancen als gering eingestuft worden sind. Diesen Freiraum habe ich sehr geschätzt. Die Projekte haben mir ein geschütztes Umfeld geboten, um erste Erfahrungen im Labor und in wissenschaftlichen

Arbeitsweisen zu sammeln, fernab von Leistungs- oder Erfolgsdruck. Ein Vet-Research Projekt ist natürlich nicht vergleichbar mit einer Doktorarbeit, dennoch bekam ich einen kleinen Einblick in die Herangehens- und Arbeitsweisen und konnte mich mit den Doktoranden der Klinik austauschen. Mich persönlich hat es noch einmal mehr darin bestärkt eine Doktorarbeit nach dem Studium zu schreiben.

Von Anfang an war ich persönlich für den Erfolg meines Projektes zuständig. Gleichzeitig wurde ich nie alleine gelassen, wenn ich Hilfe benötigt habe, sei es bei der weiteren Planung der Versuche, bei der Umsetzung im Labor oder Hilfe im Stall. Für mich persönlich war es eine sehr wertvolle Erfahrung und ich bin um die persönliche Betreuung dankbar. SE



Immunhistochemische Validierung einer Proteomanalyse im Verlauf der Epileptogenese (Fortführung des Projekts)

Ines Koska

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Prof. Dr. Heidrun Potschka, Dr. Vera Russmann, TA Michael Keck, TA Fabio Wolf

Meine Eindrücke und Erfahrungen

Durch das VETResearch-Projekt am Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU hatte ich die Möglichkeit, mich mit einem sehr interessanten Berufsfeld der Veterinärmedizin, der Forschung, auseinanderzusetzen.

Es hat mir besonders gut gefallen, mich problemorientiert mit der gegebenen Fragestellung zu befassen. Konkret in diesem Fall war das die Modifizierung eines Färbeprotokolls, wobei zum Beispiel mit verschiedenen Verdünnungen, Blocking-Systemen oder Färbemethoden gearbeitet wurde, um im Anschluss die Hauptfärbung durchzuführen.

Es war sehr interessant, am kompletten Prozess von der Fragestellung über die Durchführung bis zur Auswertung der Ergebnisse teilzuhaben. Das VETResearch-Projekt war für mich eine gelungene Verknüpfung von Theorie und Praxis.

Während des Studiums setzt man sich bereits theoretisch mit Labortechniken, wie zum Beispiel der Immunhistochemie, auseinander, aber die Möglichkeit direkt im Labor zu stehen und derartige Methoden praktisch durchzuführen, hat man leider nur bedingt. Dabei gehört es auch dazu, dass eventuell nicht alles auf Anhieb so funktioniert, wie es zu Beginn geplant war. Umso interessanter ist es, mögliche Fehlerquellen zu erkennen und eine Alternative zu finden.

Außerdem war es sehr interessant, tiefer in das Thema Epilepsiegrundlagenforschung einzusteigen. Ich bin sehr froh, dass ich die Möglichkeit hatte Erfahrungen in diesem Bereich zu sammeln und mich mit Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern auszutauschen.

Ich hoffe sehr, dass es weiterhin viele spannende VETResearch-Projekte für Studenten geben wird, sodass auch Andere Einblicke in die Forschung erlangen und möglicherweise genau so viel Freude und Interesse darin finden, wie ich es tat.

Das Studium der Tiermedizin eröffnet einem unglaublich viele Möglichkeiten für das spätere Berufsleben. Es lohnt sich also, die Chance zu nutzen und Neues auszuprobieren.

Ich möchte mich in diesem Zusammenhang auch noch einmal recht herzlich für die Betreuung und Unterstützung bedanken, die mir durch die Mitarbeiter des Lehrstuhls zugutekam.

LMU

LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Immunhistochemische Validierung einer Proteomanalyse im Verlauf der Epileptogenese: Regulation des Proteins Integrin Subunit Alpha 5

Ines Koska, Michael Keck, Vera Russmann, Eva-Lotta von Rüden und Heidrun Potschka

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Einleitung

Epilepsien werden gemäß der Definition der Internationalen Liga gegen Epilepsie (International League Against Epilepsy, ILAE) als Störung des Gehirns definiert. Sie sind charakterisiert durch eine gesteigerte synchronisierte neuronale Aktivität. Schätzungen zufolge leiden weltweit mehr als 70 Millionen Menschen an einer Epilepsieerkrankung.

Trotz der Vielzahl an zur Verfügung stehenden Antiepileptika kann bei rund 30 % der Patienten sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin keine zufriedenstellende Anfallskontrolle erreicht werden. Das Auftreten von Pharmakoresistenzen belastet die Patienten zusätzlich. Therapieresistente Haustiere werden häufig euthanasiiert.

Somit ist die Erforschung neuer Behandlungsstrategien unverzichtbar. Ein besseres Verständnis der molekularen und zellulären Veränderungen während der Epileptogenese (Epileptogenese) ist eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer präventiver, diagnostischer und therapeutischer Ansätze sowie für die Identifikation von Biomarkern. Das bisherige Verständnis der Pathomechanismen der Epileptogenese, das vor allem auf den Ergebnissen von Genom- und Transkriptomstudien beruht, ist immer noch lückenhaft und unvollständig. Differentielle Proteomanalysen könnten einen weiteren Erkenntnisgewinn liefern. Daher wurde durch die Arbeitsgruppe in einem chronischen Epilepsiemodell (Post-Status-Epilepticus (SE)-Modell) eine umfassende differentielle Proteomanalyse im Verlauf der Epileptogenese durchgeführt.

Material und Methoden

Im Rahmen des VETResearch-Projektes wurde eine immunhistochemische Validierung der Expressionsdaten der umfassenden Proteomanalyse im Verlauf der Epileptogenese durchgeführt. Hierzu wurde für das ausgewählte Protein *Integrin Subunit Alpha 5* (ITGA5) ein immunhistochemisches Färbeprotokoll etabliert. Dafür wurde ein Standardprotokoll für die Färbung von Paraffin-fixierten Schnitten zur Verwendung in einer feuchten Kammer modifiziert und für das Protein ITGA5 optimiert. Durch den Einsatz dieser Kammer kann eine konstante Luftfeuchtigkeit gewährleistet und das Färberegebnis verbessert werden. Nach Etablierung wurde die Färbung an je sieben Kontrolltieren und sieben Post-SE-Tieren zu zwei Zeitpunkten der zu validierenden Proteomstudie durchgeführt. Zeitpunkt 1 (2 Tage post SE) spiegelt die frühe Post-Insult-Phase wider. Zeitpunkt 2 (10 Tage post SE) entspricht der Latenzphase der Epileptogenese.

Versuchsdesign



Abbildung 1: Versuchsdesign der differentiellen Proteomanalyse

Ergebnisse

Hintergrund ITGA5:

Es gibt Hinweise dafür, dass unter anderem dem Protein ITGA5 eine besondere Rolle hinsichtlich des Prozesses der Epileptogenese zukommt. Integrine spielen bei der Morphogenese sowie der Versorgung der meisten Gewebe, zu dem auch das zentrale Nervensystem zählt, eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der Gehirnentwicklung sind Integrine insbesondere an der Ausbildung von Synapsen sowie der Reifung von Astrozyten und deren Migration beteiligt. Derzeit ist noch wenig über die Bedeutung der Integrine im adulten Gehirn bekannt. Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass sie eine Rolle in der Modifikation von Synapsen, der synaptischen Plastizität sowie der neuronalen Regeneration spielen. Es sind bisher lediglich unvollständige Datensätze hinsichtlich der regionalen, zellulären und subzellulären Verteilung der verschiedenen Integrine im adulten Gehirn verfügbar.

Ergebnisse:

Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnte ein immunhistochemischer Nachweis für das Protein ITGA5 etabliert werden. Die bisherige Auswertung deutet darauf hin, dass mithilfe der immunhistochemischen Färbung analog zu den Ergebnissen der Proteomanalyse eine Überexpression des Proteins ITGA5 bei den Post-SE-Tieren sowohl in der frühen Post-Insult-Phase als auch in der Latenzphase der Epileptogenese nachgewiesen werden kann. Das endgültige Ergebnis steht derzeit jedoch noch aus.

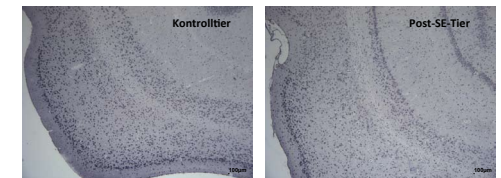


Abbildung 2: Färbung 1. Zeitpunkt

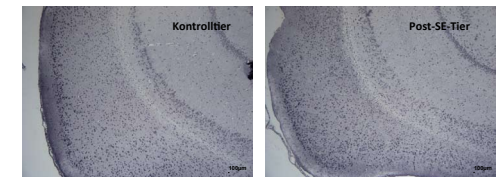


Abbildung 3: Färbung 2. Zeitpunkt

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

Email: ines.koska@web.de

Klonierung und Charakterisierung der κ - und μ -Opioidrezeptoren des Pferdes

Verena Stössel, Christian Zenner

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Prof. Dr. Hermann Ammer

Ziel/Aufgabenstellung

Opioide sind starke Analgetika und weisen zum Teil speziesspezifische Unterschiede in ihrer Wirkung auf. So wirkt z.B. Butorphanol beim Pferd sehr gut bei viszerale Schmerzen. Es gilt daher als Mittel der Wahl beim Kolikschmerz. Hier hat es in den letzten Jahren das Medikament Polamivet® mit dem Wirkstoff Levomethadon ersetzt. Beim Menschen kann Butorphanol dagegen nicht eingesetzt werden, da es bereits in geringen Dosierungen emetisch wirkt. Insgesamt stehen nur wenige Opioidanalgetika für die Schmerztherapie beim Pferd zur Verfügung. Neben *Butorphanol* sind noch *Buprenorphin* und *Levomethadon* zugelassen. Buprenorphin ist lediglich schwach analgetisch wirksam und kann daher nur in Kombination mit Romifidin oder Detomidin zur Sedation oder als Analgetikum zur Durchführung kleinerer operativer Eingriffe eingesetzt werden. Levomethadon schließlich wird zur Neuroleptanalgesie in Kombination mit einem Neuroleptikum verwendet. Neben diesen zugelassenen Opioidanalgetika werden noch andere Opioide wie *Fentanyl* im Rahmen der Umwidmung eingesetzt. Die klinische Wirksamkeit von Fentanyl scheint jedoch beim Pferd im Vergleich zu anderen Spezies eingeschränkt zu sein.

Im vorliegenden Projekt haben wir Herrn Muehlhaupt in seinem Dissertationsprojekt unterstützt, die molekularen Grundlagen für die speziesspezifischen Unterschiede in der Wirkung der Opioide beim Pferd zu untersuchen. Hierzu haben wir zunächst mitgeholfen, die equinen κ - (eOPRK1) und μ -Opioidrezeptoren (eOPRM1) aus einer cDNA-Bibliothek des Hypothalamus zu klonieren. Nach ihrer stabilen Expression in HEK293 Zellen haben wir schließlich bei der funktionellen Charakterisierung der Rezeptoren mit den verschiedenen Opioidanalgetika mitgearbeitet.

Experimentelles Vorgehen und Ergebnisse

Im ersten Schritt wurden die beiden Rezeptortypen mittels RT-PCR kloniert. Als Grundlage für die Ableitung spezifischer Primerpaare diente das Genom der Vollblutstute „Twilight“, das im Jahr 2009 an der Cornell University in Ithaka, U.S.A. sequenziert wurde. Die Klonierung orientierte sich zunächst an den annotierten mRNA-Sequenzen für den eOPRK1 und eOPRM1, die in der Nukleotid-Datenbank des National Centers for Biotechnology Information, Bethesda, U.S.A., hinterlegt sind. Doch bereits eine erste BLAST (Basic Locals Alignment Search Tool)-Analyse mit bekannten Sequenzen von Mensch, Hund, Maus und Ratte zeigte, dass die annotierten mRNA-Sequenzen beider Rezeptoren fehlerhaft sind. Es musste dann für jeden Opioidrezeptor eine individuelle Klonierungsstrategie entwickelt werden (Abbildung 1).

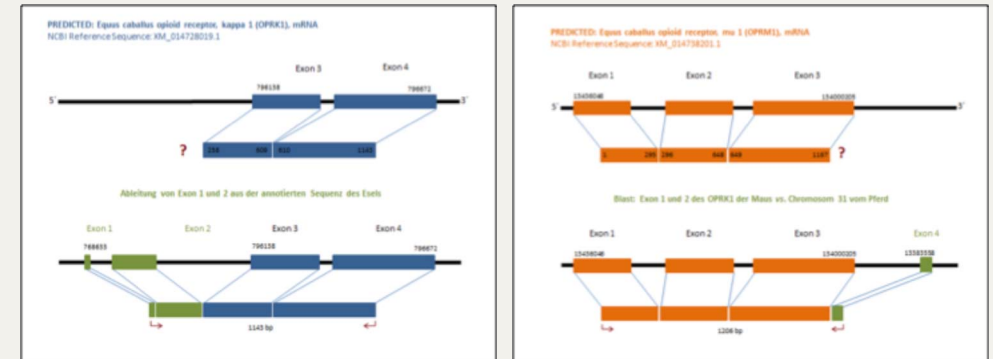


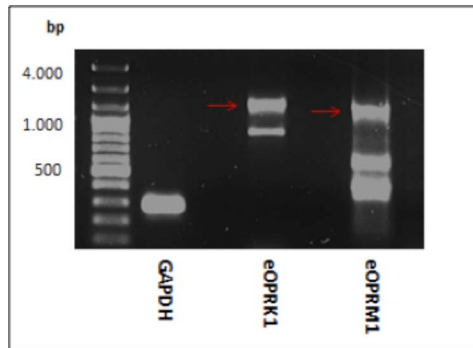
Abbildung 1: Klonierungsstrategien für den equinen OPRK1 (links) und OPRM1 (rechts).

κ -Opioidrezeptor: Nachdem wir bei einem Abgleich der hypothetischen mRNA-Sequenz des eOPRK1 mit den Rezeptoren von Mensch, Hund, Maus und Ratte keine Übereinstimmung mit dem 1. und 2. Exon fanden, versuchten wir zunächst die beiden fehlerhaften Exone auf der genomischen DNA des Pferdes zu lokalisieren. Doch selbst in der niedrigsten Homologiestufe konnten wir keine Übereinstimmung finden. Wir versuchten deshalb als nächstes die beiden unbekannten Exone aus der cDNA-Bibliothek des Hypothalamus mittels 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR zu amplifizieren. Nachdem auch dieser Versuch fehlschlug, haben wir schließlich die ebenfalls bekannte annotierte mRNA-Sequenz des OPRK1 des Esels mit dem Pferdegenom verglichen. Hierbei konnten wir dann das fehlende 1. und 2. Exon des OPRK1 auf Chromosom 9 des equinen Genoms lokalisieren. Die Klonierung stellte dann mit Hilfe hiervon abgeleiteter 5'-Primer kein Problem mehr dar, sodass wir auf Anhieb die 1143 bp (Basenpaare) lange cDNA des eOPRK1 vervielfältigen konnten.

μ -Opioidrezeptor: Die hypothetische mRNA des eOPRM1 enthielt ein fehlerhaftes 4. Exon. Dieses war auch nicht auf dem Genom des Pferdes zu finden. Wir haben daher die cDNA-Sequenzen der μ -Opioidrezeptoren anderer Spezies mit dem Genom des Pferdes abgeglichen und wurden mit der Sequenz der Maus fündig. Mit dieser Sequenz konnten wir das 4. Exon auf Chromosom 31 des Pferdes identifizieren. Durch Ableitung entsprechender 3'-Primer konnten wir schließlich die vollständige cDNA des eOPRM1 mit einer Länge von 1203 bp amplifizieren.



Abbildung 2: Auftrennung der cDNA Amplifikate des eOPRK1 und eOPRM1 auf dem Agarosegel. Linke Spur, Größenstandard. Als Kontrolle wurde aus der cDNA Bibliothek des Hypothalamus ein Fragment der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase amplifiziert (GAPDH). In der mittleren Spur wurde das PCR-Produkt des eOPRK1, in der rechten Spur des eOPRM1 aufgetragen. Die roten Pfeile weisen auf die beiden Rezeptoren hin.



Die Länge der beiden PCR-Produkte wurde in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 2) und anschließend in den Klonierungsvektor pJet1.2 der Fa. Thermo Fischer eingebracht. Die Plasmide wurden in *E. coli* hochgezogen, aufgereinigt und an die Fa. MWG Eurofins zur Sequenzierung weitergeleitet. Die überprüften Sequenzen wurden anschließend in GenBank unter den Zugangsnummern KX509996 (eOPRK1) und KX721505 (eOPRM1) veröffentlicht.

Im Anschluss wurden die Rezeptoren in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3.1 (Fa. Invitrogen) subkloniert, in der humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) stabil exprimiert und einer ersten pharmakologischen Charakterisierung unterzogen.

Bestimmung der inhibitorischen Konstante pK_i (Affinität) der einzelnen Opioide

Um tierartliche Unterschiede im Bindungsprofil der therapeutisch eingesetzten Analgetika Morphin, Fentanyl, Levomethadon, Buprenorphin und Butorphanol zu identifizieren, haben wir die Affinität der Opioide an den equinen κ - und μ -Opioidrezeptoren mit derjenigen an den Rezeptoren des Menschen bzw. der Ratte verglichen. Die Affinität stellt diejenige Wirkstoffkonzentration dar, bei der die Hälfte der Rezeptoren besetzt ist. Sie wird in heterologen Verdrängungsexperimenten bestimmt, in denen ein Radioligand mit bekannter Affinität durch steigende Konzentration der zu testenden Pharmaka verdrängt wird. Im vorliegenden Fall haben wir [3 H] Diprenorphin verwendet, das beide Rezeptortypen gleich gut erkennt und als Antagonist nicht zwischen verschiedenen Rezeptorzuständen unterscheiden kann. Aus dem Umschlagspunkt der Verdrängungskurven (IC_{50}) konnten wir schließlich die Affinität des Kompetitors berechnen. Diese wird als negativ dekadischer Logarithmus der inhibitorischen Konstante (pK_i) dargestellt.

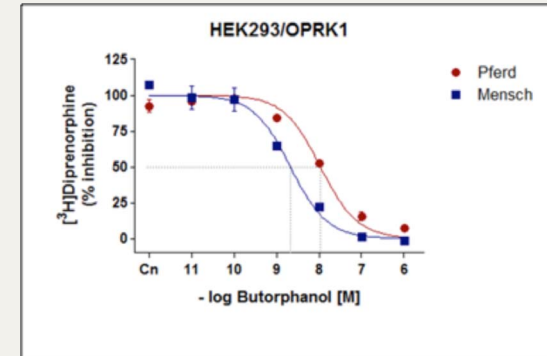


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der heterologen Verdrängung von [3 H]Diprenorphin am κ -Opioidrezeptor des Pferdes und des Menschen. In Anwesenheit steigender Konzentrationen von Butorphanol nimmt die spezifische Bindung des Radioliganden ab. Die halbmaximalen Wirkstoffkonzentrationen sind durch gepunktete Linien angedeutet.

Die Ableitung der Affinität kann man am besten am Beispiel des Butorphanols am κ -Opioidrezeptor erklären. In Abbildung 3 sind die Verdrängungskurven von Butorphanol am Rezeptor des Pferdes (rot) und des Menschen (blau) verglichen. Die Messwerte sind auf die maximale Bindung des Radioliganden in Abwesenheit eines Kompetitors normalisiert, also gleich 100 % gesetzt. Gibt man nun steigende Konzentrationen von Butorphanol in den Ansatz, so wird der Radioligand von seinem Rezeptor verdrängt und am Ende weniger Radioaktivität gemessen. Aus dem Kurvenverlauf kann dann die IC_{50} abgeleitet und die pK_i berechnet werden.

Wie wir in diesem Beispiel sehen, bindet Butorphanol wesentlich schwächer an den κ -Opioidrezeptor des Pferdes als an den des Menschen. Berechnet man die pK_i wie in Tabelle 1 zusammengefasst, so ist diese im Vergleich zum Menschen beim Pferd um den Faktor 10 geringer. Dennoch besitzt Butorphanol bei entsprechender Dosierung eine sehr gute Aktivität bei viszerale Schmerzen des Pferdes.

OPRK1		
Ligand	pK_i Pferd	pK_i Mensch
Diprenorphin	8,32 (pKd)	9,1
U50,488	7,7	9,11
Butorphanol	8,21	9,11
Buprenorphin	9,6	9,02
Morphin	6,3	6,23
Levomethadon	5,5	<6

Tabelle 1: Affinitäten verschiedener Opioidanalgetika am κ -Opioidrezeptor des Pferdes und des Menschen.



Aus *Tabelle 1* geht auch hervor, dass sich die einzelnen Opioidanalgetika durchaus unterschiedlich an den κ -Rezeptoren von Mensch und Pferd verhalten. Während Butorphanol den κ -Opioidrezeptor des Pferdes um den Faktor 10 schlechter bindet, weist der experimentelle κ -Agonist U50,488 eine um den Faktor 50 niedrigere Affinität auf. Keinen Unterschied kann man dagegen bei Buprenorphin, Morphin und Levomethadon erkennen. Interessant ist auch, dass Morphin und Levomethadon in den üblichen therapeutischen Dosierungen beim Pferd eigentlich keine κ -Aktivität aufweisen. Hierzu sind die Affinitäten im millimolaren Bereich zu gering. Sie eignen sich daher nicht zur Behandlung von Kolikschmerzen.

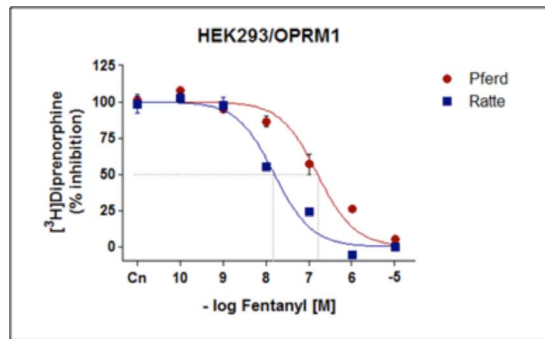


Abbildung 4: Heterologe Verdrängung von $[^3\text{H}]$ Diprenorphin am μ -Opioidrezeptor des Pferdes und der Ratte durch Fentanyl.

Am μ -Opioidrezeptor haben wir herausgefunden, dass Fentanyl den Rezeptor des Pferdes um den Faktor 1.000 schlechter bindet als denjenigen der Ratte. Hier haben wir die Ratte als Vergleich herangezogen, da es bis heute nicht möglich ist, den μ -Opioidrezeptor des Menschen stabil zu exprimieren. Die sehr niedrige Affinität kann die Beobachtung erklären, warum Fentanyl beim Pferd kaum analgetisch wirkt. Wie aus *Tabelle 2* zu entnehmen ist, weist Buprenorphin am μ -Rezeptor des Pferdes eine um den Faktor 10 niedrigere Affinität auf. Morphin, Levomethadon und Butorphanol zeigen dagegen keine tierartigen Unterschiede in der Bindung. Von den Affinitäten her könnten daher Buprenorphin und Levomethadon beim traumatischen Schmerz des Pferdes eingesetzt werden.

OPRM1		
Ligand	pKi Pferd	pKi Ratte
Diprenorphin	8,14 (pKd)	8,77
Fentanyl	6,01	9,4
Butorphanol	7,8	7,72
Buprenorphin	11,36	12,19
Morphin	7,14	7,99
Levomethadon	9,3	9,87

Tabelle 2: Affinitäten verschiedener Opioidanalgetika am μ -Opioidrezeptor des Pferdes und der Ratte.

Zusammenfassung und Ausblick

Die equinen κ - und μ -Opioidrezeptoren des Pferdes weisen strukturelle Besonderheiten im Vergleich zu anderen Spezies auf, die sich in einer unterschiedlichen Affinität gegenüber den einzelnen Wirkstoffen äußern:

- Butorphanol weist am κ -Opioidrezeptor des Pferdes eine im Vergleich zum Menschen um den Faktor 10 niedrigere Affinität auf
- Fentanyl weist am μ -Opioidrezeptor des Pferdes im Vergleich zur Ratte eine um den Faktor 1.000 niedrigere Affinität auf

Aus diesen Daten lässt sich die geringe klinische Wirksamkeit niedriger Dosierungen von Fentanyl und Morphin beim Pferd erklären. Um eine abschließende Aussage über die klinische Eignung der verschiedenen Opiode beim Pferd zu erlangen, müssen in einem nächsten Schritt die intrinsischen Aktivitäten untersucht werden. Erst dann kann eine Aussage über ihre Wirksamkeit bei den eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen erfolgen. Darüberhinaus sollen die Aminosäuren in den Rezeptoren bestimmt werden, die für die gefundenen Unterschiede im Bindungsverhalten verantwortlich sind. Hierzu werden von Herrn Muehlhaupt derzeit verschiedene Rezeptormutanten und Chimären hergestellt, mit deren Daten dann schließlich die Bindungsstellen der einzelnen Opiode mittels Molecular Modeling näher beschrieben werden können.

Danksagung

Wir danken Frau Sarah Koutnik für die technische Anleitung und dem Förderprogramm Lehre@VETResearch für die finanzielle Unterstützung und die wiederholte Möglichkeit, während des Studiums an Forschungsvorhaben der Fakultät teilzunehmen.

Charakterisierung lebensmittel- und futtermittelrelevanter Schimmelpilzisolates mittels molekularbiologischer und bioanalytischer Methoden

Johannes Köck

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuerin: Dr. Barbara Biermaier

Ziel des Projekts:

Schimmelpilze besitzen eine große Bedeutung für die Lebensmittelherstellung und die Nahrungsmittelsicherheit. *Aspergillus* und *Penicillium* zählen aufgrund ihres toxinogenen Potentials zu den besonders wichtigen Schimmelpilzgattungen, da die von ihnen gebildeten Mykotoxine als Kontaminanten in die Nahrungskette eingetragen werden. Da nur bestimmte Isolate in der Lage sind Toxine zu bilden, ist eine eindeutige Bestimmung auf Speziesebene unerlässlich. Ziel dieser Arbeit war es bisher rein phänotypisch differenzierte Spezies aus der Stammsammlung des Lehrstuhls durch molekularmikrobiologische und bioanalytische Verfahren weitergehend zu charakterisieren und in Folge die Pilz-Datenbank des am Lehrstuhl etablierten MALDI-TOF MS Systems zu erweitern.

Material und Methoden:

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 50 *Penicillium*- und *Aspergillus*-Isolate aus Lebensmittel- und Futtermittelproben ausgewählt. Nach Re-Suspension der gefriergetrockneten Proben wurden diese auf Malzextraktagar angezüchtet und Dreipunkt-Reinkulturen angelegt. Diese Reinkulturen werden zunächst anhand kultureller und mikroskopischer Verfahren (Licht-, Stereomikroskop) phänotypisch charakterisiert. Zur Durchführung einer Universal-PCR für Schimmelpilze wurde deren DNA unter Verwendung geeigneter Testkits extrahiert und gereinigt. Nach Kontrolle des Amplifikats mittels Gelelektrophorese wurden die Proben zur Sequenzierung geschickt. Gleichzeitig erfolgte eine Anzucht der Schimmelpilze in Flüssignährmedium zur Untersuchung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Ausgehend von den Ergebnissen der Sequenzierung wurden die erhaltenen Massenspektren der lehrstuhleigenen Referenzdatenbank hinzugefügt (Abbildung 1).

Ergebnisse:

Rein phänotypisch ist keine eindeutige Identifizierung auf Speziesebene möglich, da morphologische Gesichtspunkte hierfür zu ungenau sind. Die für die MALDI-TOF MS-Messung erfolgreich erstellten Referenzspektren können nun zur Diagnostik von potenziell schädlichen Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* verwendet werden, wodurch diese erheblich beschleunigt werden kann. Durch die MALDI-TOF MS Methodik unter Verwendung der Datenbank lassen sich die gesamten Arbeitsschritte der DNA-Analyse einsparen.

Erfahrungen:

Das Projekt lieferte mir einen sehr interessanten Einblick in die wissenschaftliche Arbeit des Lehrstuhls und zeigte mir, wie spannend Forschung sein kann. Besonders positiv war die sehr gute Einarbeitung in die mikrobiologischen Techniken und die Betreuung über den gesamten Zeitraum. Dass ich weitestgehend selbstständig am Lehrstuhl arbeiten durfte und trotzdem immer einen kompetenten Ansprechpartner hatte, empfand ich als besonders wertvoll.

Durch dieses studentische Forschungsprojekt habe ich nicht nur wertvolle Erfahrungen im Bereich Mikrobiologie und Molekularbiologie sammeln können, sondern auch mein bereits bestehendes Interesse im Bereich Lebensmittelsicherheit und Public Health bestärken können.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

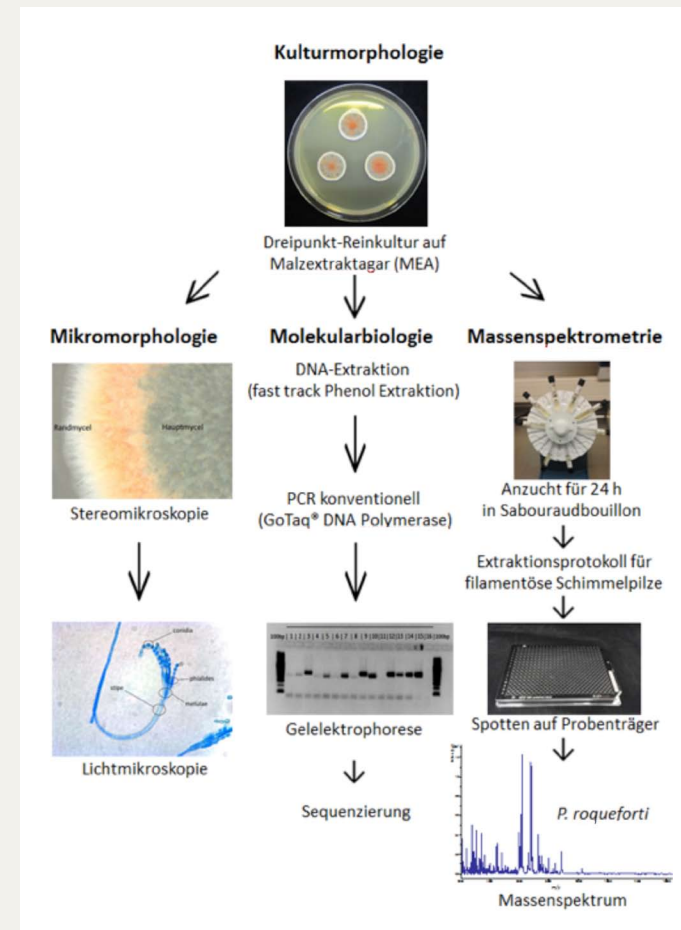


Abbildung 1:
Schematische Darstellung der Methodik des Projekts

Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen in Strohproben aus der amtlichen Überwachung – eine Statuserhebung

Eunike Bahlinger

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Betreuer: Dr. Christoph Gottschalk

Hintergrund:

Der Schwärzepilz *Stachybotrys* (S.) kommt als zellulolytischer Schimmelpilz unter anderem auf Heu und Stroh vor (Hintikka, 1977). *S. chartarum* Chemotyp S und *S. dichroa* sind in der Lage, hochtoxische Sekundärmetabolite wie makrozyklische Trichothecene zu bilden (Andersen et al. 2002). Phenylspirodrimane, eine weitere Klasse von Sekundärmetaboliten, können von verschiedenen weiteren *Stachybotrys*-Arten gebildet werden (Jarvis et al., 1995). Während makrozyklische Trichothecene hochgradig zytotoxisch und immunsupprimierend wirken (Hanelt et al. 1994), gelten Phenylspirodrimane als geringgradig zytotoxisch, immunsupprimierend sowie neurotoxisch (Jarvis et al., 1995; Nielsen, 2003).

Stroh wird unter anderem als Einstreu für Großtiere eingesetzt und dabei teilweise oral aufgenommen. Eine Kontamination des Strohs mit makrozyklischen Trichothecenen kann vor allem bei Pferden zu einer schwerwiegenden Erkrankung, der sog. Stachybotryotoxikose führen (Forgacs, 1972). Die Bedeutung von Phenylspirodrimanen für verschiedene Erkrankungen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Tiere und Menschen, die mit kontaminiertem Stroh physisch oder aerogen in Kontakt kommen, können gleichermaßen durch die Mykotoxine geschädigt werden.

Ziel dieser Studie war daher 149 amtlich gezogene Strohproben aus Deutschland auf ein Vorkommen der oben genannten Mykotoxine mittels Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) zu untersuchen, um ein mögliches Risiko besser einschätzen zu können.

Darstellung der Methodik (siehe Abbildung 1):

- 1) Extraktion der Toxine aus jeweils 5 g Stroh mittels organisch-wässrigem Lösungsmittelgemisch
- 2) Reinigung der Extrakte über Festphasenkartuschen
- 3) Detektion der Mykotoxine mittels Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)
- 4) Auswertung der erhaltenen Chromatogramme

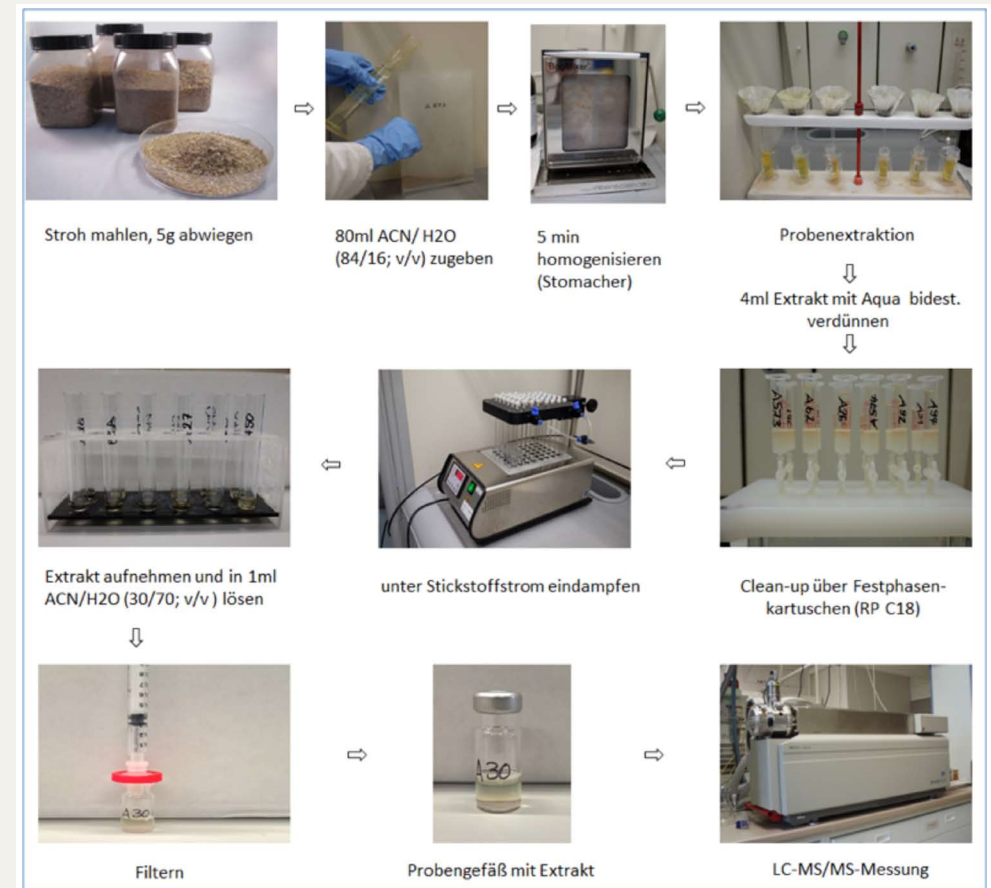


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenvorbereitungsschritte

Ergebnis und Schlussfolgerung:

In sieben von 149 Strohproben konnte das Phenylspirodriman Stachybotrylactam in geringen Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 2), makrozyklische Trichothecene jedoch in keiner der Proben. Damit kam es offenbar in knapp 5 % der Proben zu einem Wachstum von *Stachybotrys* spp., was auf ungünstige, d.h. sehr feuchte Lagerbedingungen hindeutet. Die Toxinproduktion von Schimmelpilzen hängt unter anderem von Klima, Jahreszeit und Lagerung ab. Es bedarf eines größeren Stichprobenumfangs und der Untersuchung von Proben aus weiteren Erntejahren, um belastbare Aussagen treffen zu können.



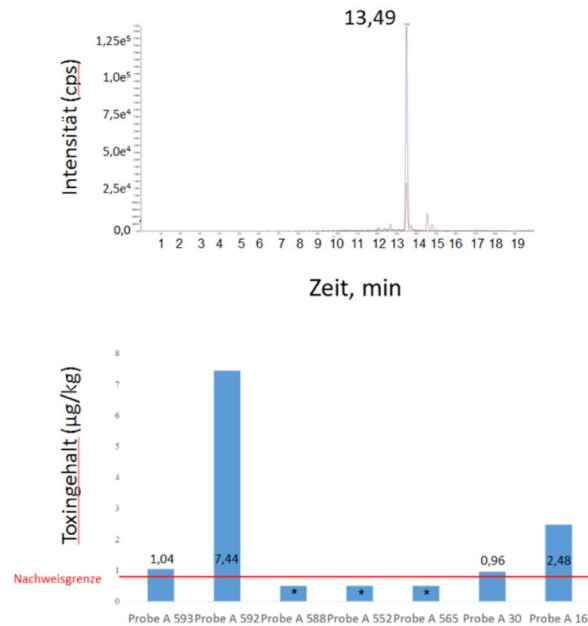


Abbildung 2:
Oben: LC-MS/MS Chromatogramm
von *Stachybotrylactam*.
Unten: Ergebnisse der *Stachybotrylactam*-haltigen Proben

Persönliche Meinung:

Das selbstständige Arbeiten in der Bioanalytik des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit, sowie die intensive Bearbeitung einer wissenschaftlichen These haben mir einen guten Einblick in die Arbeit im Bereich Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit gegeben. Ich wurde sehr gut in den Arbeitsalltag mit einbezogen und hatte die Gelegenheit auch in anderen Forschungsprojekten mitzuwirken. Zudem wurden alle meine Fragen bezüglich des wissenschaftlichen Arbeitens beantwortet.

Falls sich ein Student während des Studiums für Forschung interessiert und wissen möchte, wie sich das Arbeiten im Bereich der Forschung gestaltet, würde ich demjenigen ein VetResearch Projekt auf jeden Fall empfehlen!

Die Strohproben wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. habil. S. Dänicke zur Verfügung gestellt. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis für die Gelegenheit an einem solchen Forschungsprojekt teilhaben zu dürfen. Mein Dank gilt auch Dr. Christoph Gottschalk und Dr. Sebastian Ulrich, der immer all meine Fragen beantwortete und mich souverän durch das Projekt geleitet hat.

Literatur:

- Andersen, B. Nielsen, K. F. & Jarvis, B. B. (2002) Characterization of *Stachybotrys* from water- damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94, 392-403
- Hanelt M, Gareis M, Kollarczik B (1994) Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 128 (3):167-174
- Jarvis, B. B., Salemme, J. & Morais, A. (1995) *Stachybotrys* toxins. 1. *Nat. Toxins* 3 10-16
- Nielsen, K. F. (2003) Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol* 39, 103-117
- Hintikka, E.L. (1977) The genus *Stachybotrys*. In *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Eds T. D. Wyllie & L. G. Morehouse. New York, Basel, Marcel Dekker Inc. 91-98
- Forgacs, J. (1972) *Stachybotryotoxicosis*. In *Fungal Toxins*. Eds A. Kadis & A. J. L., Ciegler, New York, United States of America, Academic Press, 95-128

Regulation von Transkripten ausgewählter antimikrobieller Peptide in bovinen Euterzellen

Jan Hendrik Schwarz

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Wolfram Petzl



Untersuchung von Transkripten ausgewählter antimikrobieller Peptide

H. Schwarz, J. Krenitz, S. Kirsch, F. Weber, W. Petzl

Hintergrund

In bovinem Euter- und Zitzengewebe wurde bislang die Expression zahlreicher antimikrobieller Peptide nachgewiesen. Bisherige Studien zeigen, dass einige dieser Faktoren das Wachstum des Mastitisserregers *Escherichia coli* hemmen können, womit ihnen eine wichtige Rolle bei der Erregerabwehr im Euter zugeschrieben wird. Kühe erkranken um die Kalbung herum besonders schwer an einer *E.-coli*-Mastitis, weshalb eine Verhinderung der Erkrankung in diesem Zeitraum sehr erstrebenswert wäre.

Zielsetzung

Prüfung der Hypothese, ob sich die Expression der antimikrobiellen Peptide LAP (lingual antimicrobial peptide) und S100A9 (Calgranulin B) während einer *E.-coli*-Mastitis gezielt durch eine Vorbehandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) steigern lässt.

Methodik

Das zu untersuchende Gewebematerial (lobulo-alveoläres Euterparenchym) entstammte *In-vivo*-Infektionsversuchen mit Milchkühen. Die Aufarbeitung des Probenmaterials zur Messung der Transkriptabundanz für LAP und S100A9 wurde folgendermaßen durchgeführt:

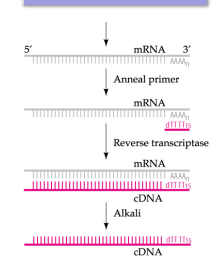
1. Isolation von RNA

- Gewebe wird lysiert und homogenisiert
- Ethanol haltige Reagenzien werden hinzugefügt und vermischt
- Phasen werden getrennt
- Ethanol wird zu wässriger Phase gegeben
- Gesamt-RNA wird gebunden
- Letzter Waschvorgang
- Eluieren
- Gesamt-RNA

2. Kontrolle RNA-Qualität

- Gelelektrophorese mittels RNA-Chip
- Die quantitative Auswertung zur Beurteilung der gewonnenen RNA-Qualität erfolgt durch die Bestimmung des RQI-Wertes

3. Aufbereitung zu cDNA

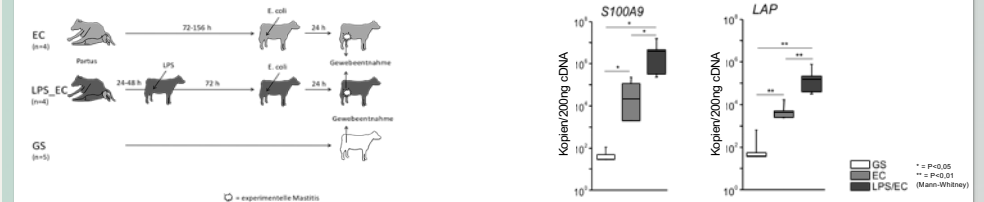


4. RT qPCR

- Trennung Doppelstrang cDNA
- Primer lagern an Einzelstränge
- DNA-Polymerase vervollständigt Stränge
- Farbstoff SYBR-Green lagert sich an dsDNA
- Je mehr dsDNA, desto stärker Fluoreszenz
- Nach jedem Zyklus Quantifizierung (real time)

Ergebnisse

Nach experimenteller *E. coli*-Infektion ohne Vorbehandlung (EC) konnte eine 37-fach höhere Expression für LAP und eine >1000-fach höhere Expression für S100A9 gemessen werden gegenüber der Basisexpression (GS). Waren die Versuchstiere 72 h vor der experimentellen Infektion intramammär mit LPS vorbehandelt worden (Gruppe LPS/EC), so ließ sich eine 32-fache Expressionssteigerung für LAP und eine 57-fache Expressionssteigerung für S100A9 gegenüber der Gruppe EC konstatieren. Dies entsprach einer >3000-fachen bzw. >50.000-fachen Expressionssteigerung gegenüber der Basisexpression.



Die Gruppe „EC“ (n=4) wurde auf dem Euterviertel mit dem niedrigsten Milchzeitgehalt mit 500 CFU *E. coli* infiziert. Die Gruppe „LPS_EC“ wurde 24-48 h nach der Kalbung auf jedem Euterviertel mit 1 µg LPS vorbehandelt. 72 h später wurde jeweils das Viertel mit dem niedrigsten Zeitgehalt mit 500 CFU *E. coli* infiziert. Die Tiere wurden 24 h nach experimenteller Infektion getötet und Gewebeproben aus dem Euterparenchym entnommen. Die Tiere der Gruppe „GS“ (Goldstandard) erhielten keinerlei Behandlung und dienten nur der Gewebegewinnung.

Schlussfolgerung

Eine intramammäre Vorbehandlung postpartaler Kühe mit LPS steigert die Expression von LAP und S100A9 bei einer nachfolgenden intramammären Infektion mit *E. coli*. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch gezielte Stimulation des angeborenen Immunsystems, die antimikrobielle Aktivität im Eutergewebe gegenüber eindringenden Pathogenen gesteigert werden kann.

Definition von Reinheitswerten der PMN-Isolation und Nachweis des Migrationsverhaltens

Sigena Junker

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Frank Weber

Da ich noch nie zuvor an einer wissenschaftlichen Fragestellung gearbeitet habe, war das gesamte Projekt mit Labor, Datenauswertung und Präsentation Neuland für mich. Ich wurde während des Projektes sehr gut angeleitet und unterstützt und konnte auch über mein Thema hinweg viel über Laborarbeit, speziell an der Klinik für Wiederkäuer, lernen.

VetResearch bietet Studierenden eine einmalige Gelegenheit in (Forschungs-)Gebiete hineinzu-schnuppern, die normalerweise während des Studiums außen vor bleiben. Ich kann jedem nur empfehlen, sich bei VetResearch auszuprobieren, mir persönlich hat es im Hinblick auf eine mögliche Promotion einige Möglichkeiten eröffnet, die ich vorher nicht in Betracht gezogen hätte.

Abschließend möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Weber und Sandra Kirsch für die umfassende Betreuung bedanken, außerdem bei allen Beteiligten, die VetResearch möglich machen.



Reinheitsgrenzwerten der PMN-Isolation und Nachweis des Migrationsverhaltens

S. Junker, S. Kirsch, F. Weber

Hintergrund

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Immunabwehr. Sie gelten als Haupteffektorzellen bei Entzündungsgeschehen, wie Mastitis oder Endometritis. PMN sind in der Lage aktiv und gezielt aus der peripheren Blutbahn zu einem Infektionsherd zu wandern. Diese Eigenschaft kann in einem Chemotaxisassay nachgestellt werden. Ziel dieses Projektes war, nach einem Standardprotokoll isolierte PMN bezüglich ihrer Reinheit und ihres Migrationsverhaltens einzuteilen und Grenzwerte zu definieren.

Standardprotokoll und Reinheitsgrenzwerte zur PMN-Isolation

1. Dichtegradientenzentrifugation zur Zellseparation:

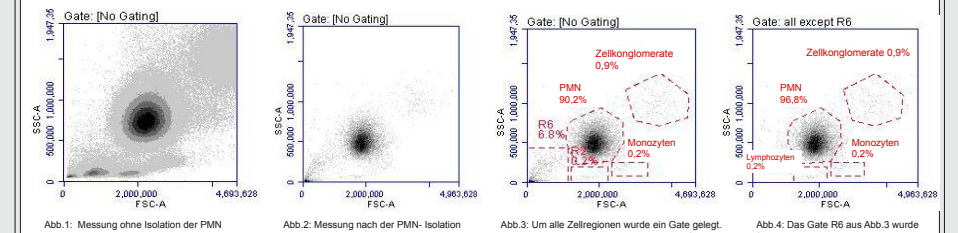
- 15 ml Vollblut mit PBS 1:2 verdünnen
- Blut/PBS-Gemisch vorsichtig über 15 ml Percoll (1,082g/ml) schichten
- 30 Min. bei 1300xg, 10°C ohne Bremse zentrifugieren
- Plasma und Interphase abpipettieren und verworfen
- Erythrozytensediment auf 10 ml mit PBS auffüllen



2. Hypotone Lyse:

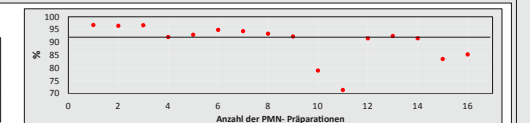
- Erythrozytensediment mit 20 ml Aqua dest auffüllen und 20 Sec. schwenken
- Reaktion mit 20ml 2xPBS stoppen und bei 220xg, 4°C, 8 Min. zentrifugieren
- Überstand verworfen, Pellet mit 10 ml PBS resuspendieren und Lyse wiederholen
- Pellet nach der letzten Lyse mit 20 ml PBS resuspendieren und erneut bei 200xg, 8 Min, 4°C zentrifugieren
- Überstand verworfen und Pellet in 3 ml DMEM/Ham's F-12 –Medium resuspendieren
- Messung im Durchflusszytometer zur Reinheitsbestimmung

3. Ergebnis einer Messung im Durchflusszytometer, als beispielhafte Darstellung für alle durchgeführten Messungen:



4. Reinheitsgrenzwerte:

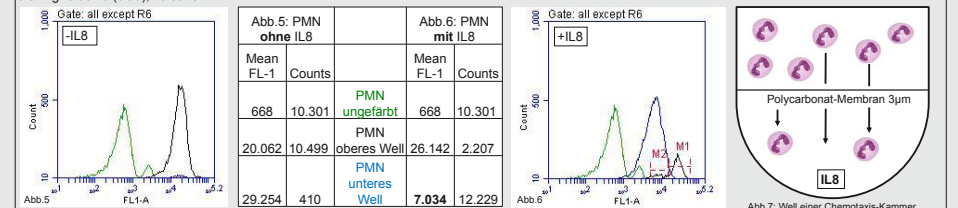
Basierend auf den besten 75% (n=12) aus 16 Präparationen	X	SD	X - SD
PMN	93,82 %	0,52 %	93,30 %
Lymphozyten/Monocyten	0,76%	0,30 %	1,06 %



Darstellung von Unterschieden im Migrationsverhalten

Für die Aktivierung der Zellen wurden diese in ein Chemotaxisassay eingesetzt. Anschließend wurden die migrierten (im unteren Well) und nicht migrierten Zellen (im oberen Well, Abb. 7) mit einem FITC-markierten Mouse-anti-bovine-CD62L-Antikörper gefärbt. Bei CD62L handelt es sich um ein Zell-Adhäsionsmolekül, das zur Selektin-Familie gehört. Aktivierte PMN verlieren den Oberflächenmarker CD62L und können aktiv durch die Polycarbonat-Membran wandern. Der Verlust des CD62L-Markers resultiert in einem geringeren Fluoreszenzsignal.

In den folgenden Darstellungen sind native PMN als Negativkontrolle (grün), Zellen die nicht durch die Polycarbonat-Membran migriert sind (schwarz) und PMN die migriert sind (blau), zu sehen.



Ein Unterschied im Migrationsverhalten der PMN ist durch die Reduktion der Fluoreszenz von den Zellen im oberen zu den Zellen im unteren Well zu sehen. Unter den gewählten Migrationsbedingungen zeigt sich eine Subpopulation nicht aktivierbarer PMN (Abb. 6 M1).

Kostenlose Betrachtungsprogramme (Freeware) für digitale medizinische Bilddaten (DICOM) zur Verbesserung der Ausbildung von Studierenden in klinischer Radiologie

Anne-Sophie Hoffmann

Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik

Betreuer: Dr. Andreas Brüschwein, TA Julius Klever

Einleitung

Röntgen, Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie sind in der modernen Tiermedizin allgegenwärtig geworden. Das Dateiformat aller digitaler bildgebender Verfahren ist DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine). Zum Betrachten und Auswerten braucht man ein medizinisches Bildbetrachtungsprogramm, einen DICOM-Viewer. In der tierärztlichen Praxis sind diese Programme heute unverzichtbar. Deshalb sollten Studenten bereits in der Ausbildung damit vertraut gemacht werden. Freeware aus dem Internet ermöglicht Tierärzten und Studenten einen einfachen und kostenlosen Einstieg. Doch welches Programm soll man empfehlen?

Ziel dieser Studie war die Identifizierung, Analyse und Bewertung von kostenlos im Internet erhältlichen DICOM-Viewer-Programmen.

Material und Methoden

Freeware und Anschlussmöglichkeit an ein digitales Bildarchiv waren die Einschlusskriterien für die Evaluierung der DICOM-Viewer. Funktionsumfang und Funktionalität aller Werkzeuge wurden vergleichend katalogisiert. Testpersonen evaluierten zentrale Kernfunktionen sowie modalitätenspezifische Werkzeuge in Bezug auf Röntgen, Ultraschall, Magnetresonanztomographie und Computertomographie mit Noten von eins (sehr schlecht) bis zehn (sehr gut). Bei den Testpersonen wurde der Einfluss von Geschlecht, Ausbildungsstand und Vorerfahrung mit der Software im Hinblick auf die Evaluierungsergebnisse, die statistisch mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ausgewertet.

Ergebnisse

Acht Viewer wurden identifiziert, analysiert und von 34 Testpersonen evaluiert (20 Studenten, 10 Tierärzte und 4 Tierradiologen). Gesamtsieger im Hinblick auf Funktionsumfang und Nutzerfreundlichkeit waren Horos und Osirix für das Apple Betriebssystem. Bei Windowsprogrammen belegten Radiant, Synedra und K-PACS die vorderen Plätze (Tab. 1 und Abb. 2 - siehe Seite 48). Die Unterschiede zwischen den Viewern waren statistisch signifikant.

Diskussion

Die Wahl eines guten Viewers ist von großer praktischer Bedeutung und bisher gab es zu diesen in der Veterinärmedizin wichtigen Computerprogrammen keine wissenschaftlichen Untersuchungen. Die kostenlos im Internet verfügbaren DICOM-Bildbetrachtungsprogramme weisen zum Teil einen großen Funktionsumfang und eine gute Bedienerfreundlichkeit auf, welche sich bei den einzelnen Viewern erheblich unterscheiden. Anders als erwartet muss bei gutem Design der Nutzeroberfläche ein großer Funktionsumfang nicht mit einem Verlust der Bedienerfreundlichkeit einhergehen. Freeware aus dem Internet ermöglicht einen kostenlosen Einstieg in die eigenständige Nutzung eines DICOM-Viewers. In einem digitalen Lehrarchiv könnten DICOM-Bilder zu Ausbildungszwecken zur Verfügung gestellt werden. Studenten sollen durch diese Studie motiviert werden, sich intensiver mit diesem für Tierärzte so wichtigem Werkzeug auseinander zu setzen.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie erleichtern die Wahl bei der Suche nach einem funktionsfähigen und kostenlosen medizinischen Bildbetrachtungsprogramm (DICOM-Viewer), das den eigenen individuellen Ansprüchen am Besten gerecht wird. Dies ist sowohl für Kliniken, als auch für selbstständige Tierärzte von Nutzen. Ebenso soll die Studie die Studenten dazu motivieren, auch zu Hause für die Prüfungsvorbereitung oder zur Erweiterung ihres radiologischen Verständnisses einen geeigneten DICOM-Viewer zu nutzen.

Quellen

- Hosch RE, Rivard AL. Evaluation of self-contained PACS viewers on CD-ROM. *J Digit Imaging.* 2014;27(4):470-3
- Wright MA, Ballance D, Robertson ID, Poteet B. INTRODUCTION TO DICOM FOR THE PRACTICING VETERINARIAN. *Vet Radiol Ultrasound.* 2008;49(s1):S14-S8
- Solomon RW. Free and open source software for the manipulation of digital images. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;192(6):W330-4

Evaluierung kostenloser medizinischer Bildbetrachtungsprogramme

Analyse und Vergleich von Benutzerfreundlichkeit und Funktionsumfang ausgewählter kostenloser DICOM-Bildbetrachtungsprogramme

A. Hoffmann, D. Huber, E. Kaufmann, J. Klever, A. Brüschwein, S. Reese, A. Meyer-Lindenberg

Einleitung

Röntgen (Abb.1), Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie sind in der modernen Tiermedizin allgegenwärtig geworden. Das Dateiformat aller digitaler bildgebender Verfahren ist DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine). Zum Betrachten und Auswerten braucht man ein medizinisches Bildbetrachtungsprogramm, einen DICOM-Viewer. In der tierärztlichen Praxis sind diese Programme heute unverzichtbar. Deshalb sollten Studenten bereits in der Ausbildung damit vertraut gemacht werden. Freeware aus dem Internet ermöglicht Tierärzten und Studenten einen einfachen und kostenlosen Einstieg. Doch welches Programm soll man am Besten benutzen?

Ziel dieser Studie war die Identifizierung, Analyse und Bewertung von kostenlos im Internet erhältlichen DICOM-Viewer-Programmen.



Material und Methoden

Freeware und Anschlussmöglichkeit an ein digitales Bildarchiv waren die Einschlusskriterien für die Evaluierung der DICOM-Viewer. Funktionsumfang und Funktionalität aller Werkzeuge wurden vergleichend katalogisiert. Testpersonen evaluierten zentrale Kernfunktionen sowie modalitätenspezifische Werkzeuge in Bezug auf Röntgen, Ultraschall, Magnetresonanztomographie und Computertomographie mit Noten von eins (sehr schlecht) bis zehn (sehr gut). Bei den Testpersonen wurde der Einfluss von Geschlecht, Ausbildungsstand und Vorerfahrung mit der Software im Hinblick auf die Evaluierungsergebnisse, die statistisch mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ausgewertet wurden.

Ergebnisse

Acht Viewer wurden identifiziert, analysiert und von 34 Testpersonen evaluiert (20 Studenten, 10 Tierärzte und 4 Tierradiologen). Gesamtsieger im Hinblick auf Funktionsumfang und Nutzerfreundlichkeit waren Horos und Osirix für das Apple Betriebssystem. Bei Windowsprogrammen belegten Radiant, Synedra und K-PACS die vorderen Plätze (Tab. 1 und Abb. 2). Die Unterschiede zwischen den Viewern waren statistisch signifikant.

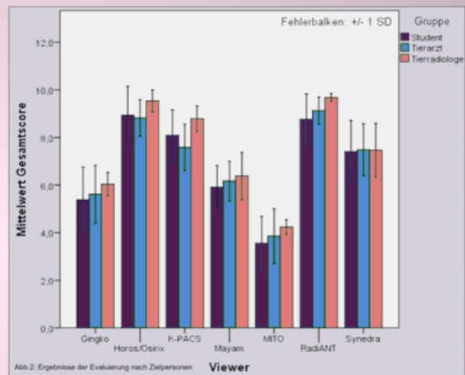


Abb. 2: Ergebnisse der Evaluierung nach Zielpersonen

Diskussion

Die Wahl eines guten Viewers ist von großer praktischer Bedeutung und bisher gab es zu diesen in der Veterinärmedizin wichtigen Computerprogrammen keine wissenschaftlichen Untersuchungen. Anders als erwartet muss bei gutem Design der Nutzoberfläche ein großer Funktionsumfang nicht mit einem Verlust der Bedienerfreundlichkeit einhergehen. Freeware aus dem Internet ermöglicht einen kostenlosen Einstieg in die eigenständige Nutzung eines DICOM-Viewers. In einem digitalen Lehrarchiv könnten DICOM-Bilder zu Ausbildungszwecken zur Verfügung gestellt werden. Studenten sollen durch diese Studie motiviert werden, sich intensiver mit diesem für Tierärzte so wichtigem Werkzeug auseinander zu setzen.

Tabelle 1: Ergebnisse Benutzerfreundlichkeit aufgeschlüsselt nach Einsatzbereich und Funktionsumfang

Viewer	Röntgen	Ultraschall	CT und MRT	Gesamtwertung	Gesamtplatzierung	Funktionsumfang
Horos/ Osirix	9,00	9,02	8,90	8,96	1.	44/47 (1.)
RadiAnt	8,96	9,01	8,79	8,90	2.	30/47 (3.)
K-Pacs	7,77	7,74	8,04	8,02	3.	25/47 (5.)
Synedra View Personal	8,38	8,43	7,34	7,43	4.	31/47 (2.)
Mayam	6,97	7,03	5,94	6,05	5.	20/47 (7.)
Ginkgo CADx	7,76	7,25	5,67	5,53	6.	29/47 (4.)
MITO	5,14	4,88	3,78	3,74	7.	24/47 (6.)

Schlussfolgerung

Mit den Ergebnissen dieser Studie finden Tierärzte und Studenten eine Übersicht geeigneter kostenloser DICOM-Viewer für eine bessere Patientenversorgung und tierärztliche Ausbildung.



Calf digest®

Probiotika – ein neuer Ansatz in der Therapie des Kälberdurchfalls

Marina Beisl, Julia Karbacher, Katharina Ratzke, Sara Steer
 Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
 Betreuer: Dr. Rainer Martin

Aufgabenstellung:

Ziel des Projekts war zu überprüfen, ob der Elektrolytbolus „Calf digest®“ (Sano Tiergesundheit, Grafenwald), der zusätzlich zu Natriumbicarbonat Probiotika enthält, das Durchfallgeschehen bei Kälbern mit Neugeborendurchfall positiver beeinflusst als reine Natriumbicarbonatboli.

Hintergrund:

Neugeborendurchfall bei Kälbern ist nach wie vor eine wichtige Erkrankung in der Rinderhaltung. Er führt zu wirtschaftlichen Schäden, da die Kälber in der Entwicklung zurückbleiben, häufig tierärztlich behandelt werden müssen und im schlimmsten Fall sogar aufgrund der Durchfallerkrankung sterben. Ziel der Therapie ist es, die Durchfallsymptome durch ausreichende Flüssigkeitszufuhr und Ausgleich von Elektrolytverlusten zu mindern. Mit der Gabe sogenannter „Elektrolytboli“ haben Landwirte die Möglichkeit bereits früh in das Krankheitsgeschehen einzugreifen. Wichtigster Bestandteil ist Natriumbicarbonat, mit dem einer Übersäuerung des Kalbes und den damit verbundenen Auswirkungen wie Trinkunlust, Verlust des Stehvermögens und Festliegen entgegengewirkt wird.

Als möglicher neuer Ansatz in der Therapie des Neugeborendurchfalls wird bereits seit längerem der Einsatz von „Probiotika“ diskutiert. Die gesunde Darmflora ist beim Neugeborendurchfall durch Erreger wie Viren (Rota, Corona), Bakterien (E. coli) und Einzeller (Kryptosporidien) aus dem Gleichgewicht gebracht. Calf digest® enthält neben Natriumbicarbonat das Milchsäurebakterium Enterococcus Faecium M74. Dieses Probiotikum soll die Bakterienflora im geschädigten Kälberdarm regenerieren, so dass die Kälber schneller zu einem normalen Trinkverhalten zurückkehren.

Versuchstiere und Methoden:

Im Zeitraum von Dezember 2015 bis März 2016 wurde dazu eine Anwendungsstudie auf 7 Milchbetrieben im Raum Freising durchgeführt.

Die Landwirte sollten bei den ersten Anzeichen von Trinkunlust und/oder Durchfall bei neugeborenen Kälbern insgesamt 5 Boli im Abstand von jeweils 12 Stunden oral verabreichen. Die Studie wurde doppelt verblindet durchgeführt – d.h. zufällig verteilt und für die Landwirte und die betreuenden Studierenden nicht ersichtlich bekam die eine Hälfte der Kälber Boli, die nur Elektrolyte (Kontrollgruppe), die andere Hälfte Boli, die neben den Elektrolyten zusätzlich Probiotika enthielten (Calf digest® Gruppe). Zudem füllten die Landwirte eine Tabelle aus (Abb. 1), die vor allem das Trinkverhalten der Kälber und die Entwicklung der Kotkonsistenz nachvollziehbar

macht. Zusätzlich wurden beim ersten Auftreten von Trinkunlust und/oder Durchfall Kotproben gesammelt und diese mit einem Antigen-Schnelltest BoDia der Firma Fassisi® auf Rotaviren, Coronaviren, E. coli K99 und Kryptosporidien untersucht.

1.	2.	3.	4.	5.	5<	Gut	OK	Nicht gut	1	2	3	4	Eisen	Selen	Kälber Fit																																																																																																																																																																																																						
Kalbrungen	der	Mutter	männlich	weiblich	Zwilling	Qualität des Kolostrom	Geburtsverlauf	nach	LKV				Datum	Datum	Datum																																																																																																																																																																																																						
Ohrmarkennummer Kalb: <u>DE095025858</u> Bilsternummer <u>600</u> 1. Mahlzeit <u>h min l</u> Ohrmarkennummer Kuh: <u>434 135/2</u> Geburtsdatum <u>14.12.15</u> 2. Mahlzeit <u>h min l</u>																																																																																																																																																																																																																					
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Tag 1</th> <th>Tag 2</th> <th>Tag 3</th> <th>Tag 4</th> <th>Tag 5</th> <th>Tag 6</th> <th>Tag 7</th> <th>Tag 8</th> <th>Tag 9</th> <th>Tag 10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Dat</td> <td>14.12.15</td> <td>15.12.15</td> <td>16.12.15</td> <td>17.12.15</td> <td>18.12.15</td> <td>19.12.15</td> <td>20.12.15</td> <td>21.12.15</td> <td>22.12.15</td> <td></td> </tr> <tr> <td>gM</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>1</td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>0,5</td> <td></td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> </tr> <tr> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>X</td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>b</td> <td></td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td>X</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>d</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>w</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>																	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Dat	14.12.15	15.12.15	16.12.15	17.12.15	18.12.15	19.12.15	20.12.15	21.12.15	22.12.15		gM											5											4,5											4											3,5											3	X			X	X	X	X	X			2,5											2			X								1,5				X	X	X	X				1		X	X								0,5			X	X				X	X		0									X		B		X	X	X	X						b		X	X	X	X						d											w										
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10																																																																																																																																																																																																											
Dat	14.12.15	15.12.15	16.12.15	17.12.15	18.12.15	19.12.15	20.12.15	21.12.15	22.12.15																																																																																																																																																																																																												
gM																																																																																																																																																																																																																					
5																																																																																																																																																																																																																					
4,5																																																																																																																																																																																																																					
4																																																																																																																																																																																																																					
3,5																																																																																																																																																																																																																					
3	X			X	X	X	X	X																																																																																																																																																																																																													
2,5																																																																																																																																																																																																																					
2			X																																																																																																																																																																																																																		
1,5				X	X	X	X																																																																																																																																																																																																														
1		X	X																																																																																																																																																																																																																		
0,5			X	X				X	X																																																																																																																																																																																																												
0									X																																																																																																																																																																																																												
B		X	X	X	X																																																																																																																																																																																																																
b		X	X	X	X																																																																																																																																																																																																																
d																																																																																																																																																																																																																					
w																																																																																																																																																																																																																					
Dat = Datum; gM = gesoffene Milchmenge; Tränkezeiten: M = morgens Z = Zwischentränke A = Abendtränke B = Bolusgabe; Kotkonsistenz sofern zu Beurteilen: b = dickbreig d = dünnbreig w = wässrig																																																																																																																																																																																																																					

Abb. 1: Ausgefüllte Tabelle zur Datenerfassung

Auswertungskriterien:

Von 82 Tieren, die an der Studie teilnahmen, konnten die Ergebnisse von 73 Tieren ausgewertet werden. Untersuchungskriterien waren dabei die Anzahl der Tage bis zur Normalisierung des Kots, sowie die „Schlechttrinkphase“ und die „Reduktion der Tränkeaufnahme“. Als „Schlechttrinkphase“ wurde dabei der Zeitraum vom ersten bis letzten Tag mit verminderter Tränkeaufnahme bezeichnet. Die Tränkeaufnahme wurde als normal bewertet, sobald die Kälber drei Mahlzeiten hintereinander eine stabile Milchmenge aufnahmen und sich somit ein Tränkeplateau einstellte. Die „Reduktion der Tränkeaufnahme“ wurde als relativer Wert festgesetzt. Dieser wurde berechnet als insgesamt tatsächlich aufgenommene Tränkemenge in der Schlechttrinkphase geteilt durch Menge an Milch, die die Kälber ohne Erkrankung getrunken hätten. Die Gruppen wurden mittels t-Test statistisch verglichen.

Ergebnisse:

In beiden Gruppen wurden bei jeweils etwa 20% der Kälber Rotaviren und Kryptosporidien nachgewiesen (Tab. 1).

Infektionserreger	Kontrolle	Calf Digest
keine Infektion	10% (n=10)	4% (n=4)
Rota	20% (n=19)	18% (n=17)
Corona	3% (n=3)	7% (n=7)
E.coli	0% (n=0)	1% (n=1)
Kryptosporidien	20% (n=19)	18% (n=17)
mind. eine Infektion, nicht Kryptosporidien	23% (n=22)	26% (n=25)

Tab. 1: Mittels Ag-Schnelltest nachgewiesene Erreger im Kot der Kälber mit Trinkunlust und/oder Durchfall

Die Anzahl der Tage mit verminderter Milchaufnahme lag bei beiden Gruppen annähernd im Mittel bei 2,2 Tagen. Bei der Dauer bis zur Kotnormalisierung unterschieden sich die Gruppen geringfügig. Hier zeigte die Kontrollgruppe eine Dauer von ca. 3,4 Tagen, während die Kälber, die Calf digest® erhalten hatten, im Durchschnitt 3,6 Tage brauchten, bis sie wieder normalen Kot absetzten (Abb. 2). Gegenüber der Milchmenge, die die Kälber getrunken hätten, wenn sie nicht krank gewesen wären, war die getrunkene Menge bei den Kälbern der Kontrollgruppe um 42% reduziert, bei den Kälbern der Calf digest® Gruppe um 39% (Abb. 3). Ein interessanter Aspekt der Studie ist, dass bei Kälbern, bei denen keine Erreger oder nur Rota-/Coronaviren gefunden wurden, jedoch keine Kryptosporidien im Kot nachgewiesen werden konnten. Kälber der Calf digest® Gruppe zeigten tendenziell kürzere Erkrankungsdauern als die Kälber der Kontrollgruppe. So normalisierte sich bei ihnen der Kot im Durchschnitt nach 3,4 Tagen (Kontrollgruppe 3,5 Tage) und die Tränkeaufnahme nach 2,3 Tagen (Kontrollgruppe 2,7 Tagen) (Abb. 4). Auch die Tränkeverminderung war bei den Kälbern der Calf digest® Gruppe mit 41% gegenüber 46% der Kontrollgruppe geringer (Abb. 5). Sämtliche Gruppenunterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Zusätzliche Behandlungen, wie z.B. Infusionen, waren bei keinem Kalb, weder in der Calf digest® Gruppe noch in der Kontrollgruppe, notwendig.

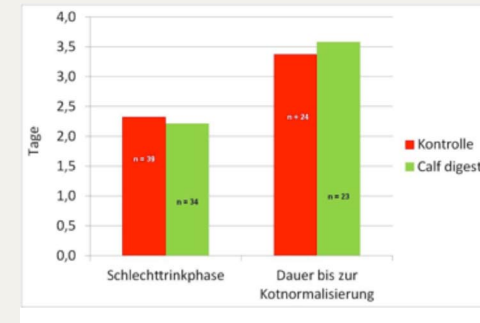


Abb. 2: Anzahl der Tage mit verminderter Milchaufnahme und Dauer bis zu Kotnormalisierung bei allen Kälbern

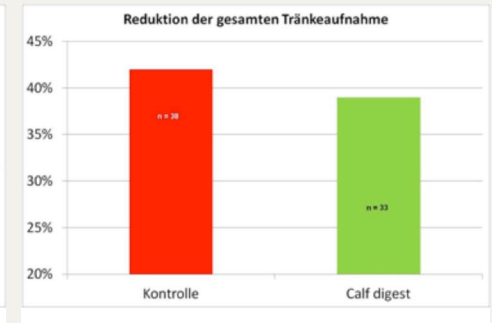


Abb. 3: Reduktion der aufgenommenen Milchmenge, die die Kälber getrunken hätten, wenn sie nicht krank gewesen wären, bei allen Kälbern

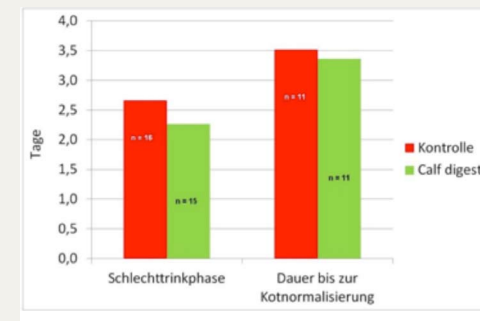


Abb. 4: Anzahl der Tage mit verminderter Milchaufnahme und Dauer bis zu Kotnormalisierung bei Kälbern, bei denen keine Erreger oder nur Rota-/Coronaviren, jedoch keine Kryptosporidien im Kot nachgewiesen werden konnten

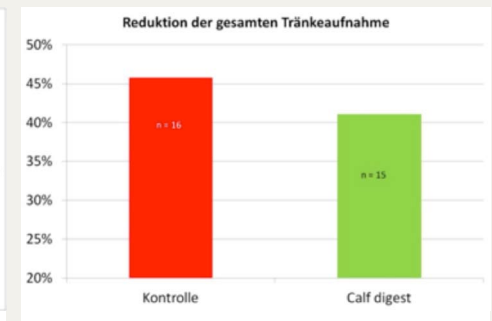


Abb. 5: Reduktion der aufgenommenen Milchmenge, die die Kälber getrunken hätten, wenn sie nicht krank gewesen wären, bei Kälbern, bei denen keine Erreger oder nur Rota-/Coronaviren, jedoch keine Kryptosporidien im Kot nachgewiesen werden konnten

Fazit:

Zeigen Kälber in den ersten Lebenswochen Anzeichen von Trinkunlust oder Durchfall, ist die Gabe von Natriumbicarbonat Boli äußerst wirksam. Die Ergebnisse der Anwendungsstudie zeigen, dass die im Calf-digest® enthaltenen Probiotika durchaus einen positiven Einfluss auf das Krankheitsgeschehen haben können. Dies ist besonders für die weitere Entwicklung der erkrankten Kälber wichtig, da somit Verluste begrenzt und Kümmerer vermieden werden können.

Vergleich verschiedener antikörperbasierter Nachweistechiken zum quantitativen Nachweis von IL-6 in bovinen Uterussekret

Anne Reus

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Dr. Frank Weber

Hintergrund

Den Anlass für das Projekt gab die Suche nach neuen Diagnostikmöglichkeiten der subklinischen Endometritis beim Rind. Dies geschieht momentan im Rahmen einer Doktorarbeit. Die subklinische Endometritis führt, vor allem durch den damit verbundenen verminderten Besamungserfolg, zu großen finanziellen Schäden. Bisher wurde die Erkrankung vor allem durch Biopsie und Zytologie diagnostiziert. Erstere hat vor allem den Nachteil, dass der damit verbundene Aufwand relativ hoch ist und letztere, dass das Entzündungszellaufkommen (Neutrophile Granulozyten) nicht notwendigerweise ausreichend mit dem Ausmaß der Entzündung korreliert. Eine auf Funktionalität und Praktikabilität zu untersuchende Möglichkeit der Diagnostik besteht darin, Entzündungsmarker (Zytokine) im Uterussekret nachzuweisen und die Ergebnisse mit denen bisher angewandter Methoden zu vergleichen.

Daraus ergibt sich die Fragestellung für das Projekt, welche antikörperbasierte Nachweistechnik sich hierfür am besten eignet und zwar im Hinblick auf den Aufwand, den technischen Möglichkeiten und Grenzen (hier gilt es vor allem die geringe Menge des Probenmaterials zu beachten) und unter finanziellen Gesichtspunkten.

Material und Methoden

Verglichen wurden ein fertiger „High Sensitive ELISA Kit für bovines IL-6“ (ELISA Kit, Firma Cloud Clone Corp), ein aus einzelnen Komponenten selbst zusammengestellter ELISA (Do It yourself, DIY ELISA) und ein „Bovine IL-6 AlphaLISA Immunoassay Kit“ (AlphaLISA, Firma Perkin Elmer). Für alle drei Nachweistechiken stand somit ein Ansatz mit Antikörpern gegen bovines IL-6 zur Verfügung.

Der ELISA Kit ist ein klassischer Sandwich ELISA. Die Platte ist vorgecoatet, alle benötigten Reagenzien sind in dem Kit enthalten und der komplette Testablauf ist vorgegeben.

Im DIY ELISA wurden sowohl ein Monoklonaler (Firma AbD Serotec) als auch ein Polyklonaler (Firma Kingfisher Biotec) Capture Antikörper (AK), ein IL-6 Standard (Firma Kingfisher Biotec), ein Polyklonaler Detection AK (Firma Kingfisher Biotec), und sowohl eine sich anreichernde Fluoreszenzmarkierung Streptavidin-Fluoresceinisothiocyanat (SA-FITC, Firma Bioquest) als auch eine Enzymmarkierung Streptavidin-Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase, SA-HRP, Firma Kingfisher) mit dem Substrat Amplite RED (Firma Bioquest) oder Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet.

Im AlphaLISA (Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay) wird, anstatt die Platte mit einem Detection AK vorzucoat, zum Standard bzw. zur Probe zunächst ein Mix von zwei IL-6 spezifischen Antikörpern gegeben. Einer der Antikörper ist hierbei an AlphaLISA Acceptor Beads gekoppelt, der andere Antikörper ist mit einer Biotinlabel versehen. Während der Inkubation bilden sich nun Antikörper-Analyt Brücken. Mit der Zugabe von mit Streptavidin gekoppelten Donor Beads bilden sich rasch stabile Streptavidin-Biotin Brücken und die beteiligten funktionellen Beads werden in unmittelbarer räumlicher Nähe gehalten. Eine Laseranregung der Donor Beads (bei einer Bestrahlung von 680 nm) führt zu einer Freisetzung eines Singlet Oxygen ($\frac{1}{2} O_2$), welches auf den Acceptor Bead übertragen wird. Im Acceptor Bead (funktionalisiert mit Thioxene- und Europiumchelaten) wird dadurch eine Energieübertragungskaskade ausgelöst, an deren Ende eine $^1\Delta$, Lichtemission von 615 nm steht, welche mit einem geeigneten Gerät gemessen werden kann.

Das Probenmaterial bestand aus Uterussekret fertiler (n=8) und subfertiler (n=7) Kühe, Zellkulturüberstand (ZKÜ) einer Uteruszellkultur (n=1), sowie Serum systemisch erkrankter Kühe (n=3).

Ergebnisse

Ausgehend von den Ergebnissen des AlphaLISAs wurden die Proben für die Durchführung des ELISA Kits teilweise verdünnt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der einzelnen Proben:

Subfertile Gruppe:	Konz. AlphaLISA pg/ml:	Konz. ELISA pg/ml:
Tier 9	11	35
Tier 12	184	63
Tier 21	< 40	100
Tier 32	4018	7241
Tier 37	< 40	8
Tier 38	< 40	19
Tier 39	> 1000000	103
fertile Gruppe:	Konz. AlphaLISA pg/ml:	Konz. ELISA pg/ml:
Tier 13	< 40	124
Tier 15	104	121
Tier 22	< 40	21
Tier 25	< 40	16
Tier 31	< 40	14
Tier 33	2170	54
Tier 35	< 40	14
Tier 36	657	15
Plasma	Konz. AlphaLISA pg/ml:	Konz. ELISA pg/ml:
Plasma 279	1155	0
Plasma 255	12773	1169
Plasma 271	338	25
Zellkulturüberstand	Konz. AlphaLISA pg/ml:	Konz. ELISA pg/ml:
ZKÜ	2108	187



Im AlphaLISA liegen in der subfertilen und fertilen Gruppe jeweils 3 Proben in der Detection Range. Plasma und ZKÜ liegen ebenfalls in der Detection Range. Im ELISA Kit liegen alle Proben in der Detection Range, bis auf eine Plasmaprobe, was allerdings einer zu starken Probenverdünnung geschuldet ist.

Im DIY ELISA zeigten die Kombinationen aus einem Monoklonalen Capture AK, einem Polyklonalen Detection AK und der SA-HRP Markierung mit TMB als Substrat, sowie aus einem Polyklonalen Capture AK, Polyklonalem Detection AK und SA-FITC als Markierung jeweils kein verwertbares Signal. Erst in der Kombination aus Polyklonalen Capture und Detection AK und SA-HRP Markierung mit dem Substrat Amplite RED gelang die Erstellung einer Standardkurve mit Werten zwischen 100 und 7800 pg/ml. An dem Punkt hätte man den DIY ELISA theoretisch mit den Proben durchführen können, allerdings wurde darauf verzichtet, da ein Großteil der Probenkonzentrationen deutlich darunter lag.

Vergleich

Folgende Tabelle zeigt die wichtigsten Vergleichsmerkmale:

Methode	Probenvolumen/ Punkt	Detection Range	Intraassay Varianz/ Interassay Varianz	Kosten / Punkt
AlphaLISA	10 µl (eventuell 2 µl)	0,04 – 37 ng/ml [10 ^{^5}]	CV 5 %/ CV 9 %	10,00 €
DIY ELISA	50 µl	0,1 -7,8 ng/ml [10 ^{^2}]	Keine Angabe möglich	2,87 €
ELISA-Kit	100 µl (evtl. verdünnbar)	0,002 – 0,1 ng/ml [10 ^{^2}]	CV < 10 %/ CV < 12 %	11,55 €

Mit der verwendeten Methode können pro Kuh jeweils ca. 700 µl Probenvolumen gewonnen werden. Da jede Probe im Doppelansatz gemessen wird und außer IL-6 noch weitere Entzündungsmarker gemessen werden sollen, ist das für die Bestimmung benötigte Probenvolumen ein kritischer Faktor. Im Prinzip gilt hier je weniger umso besser. Im AlphaLISA kann das Probenvolumen theoretisch noch auf 2 µl verkleinert werden, bei anderen Zytokinenassays mit AlphaLISA Technik werden bereits Ansätze mit diesem Volumen erfolgreich verwendet. Die benötigten Probenvolumina von 2x50 µl bzw. 2x100 µl für jede Bestimmung (Doppelansatz) schränken die Verwendung der beiden ELISAs von vornherein stark ein.

Die Detection Range erstreckt sich bei den beiden ELISAs über jeweils 2 Zehnerpotenzen, bei AlphaLISA über 5. Es ist weniger entscheidend wie weit die Detection Range ist, sondern viel mehr, ob die zu erwartenden Konzentrationen innerhalb dieser liegen. Darüber lässt sich auf Grund von 15 Proben keine verwertbare Aussage treffen. Im AlphaLISA lagen einige Probenkonzentrationen unterhalb der Detection Range. Diese kann man naturgemäß nicht durch Verdünnung in den erfassbaren Bereich bringen. Anders bei dem ELISA Kit, in der durch geeignete Verdünnungen die Proben innerhalb der Detection Range gebracht werden kann. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass sich daraus Messungenauigkeiten ergeben. Eventuell reicht jedoch die Aussage „unterhalb der Detection Range“, also < 40 pg/ml oder die darüber liegende genaue Konzentration im AlphaLISA bzw. „oberhalb der Detection

Range“, also >100 pg/ml oder die darunter liegende genaue Konzentration im ELISA Kit für eine Diagnose bereits aus. Dies kann die Durchführung der Tests mit einem geeigneten Probenumfang zeigen. Die Detection Range des DIY ist ungeeignet.

Die Intraassay und Interassay Varianzen, also die Abweichungen der einzelnen Messungen innerhalb des Tests sind vom Hersteller angegeben und als hinreichend genau zu bewerten. Es sei weiterhin darauf hingewiesen, dass die Proben zwischen den Ansätzen eingefroren und aufgetaut wurden, die beiden Tests nicht von der gleichen Person durchgeführt wurden (AlphaLISA von Sandra Kirsch, ELISA Kit von Anne Reus) und die ELISA Konzentration die Mittelwerte verschiedener Verdünnungen darstellen. Das erklärt möglicherweise die geringe Übereinstimmung der gemessenen Konzentration zwischen den beiden Nachweistechiken. In der Gegenüberstellung der gemessenen Konzentrationen lässt sich nicht erkennen, welche exakter ist. Für den DIY ELISA kann in diesem Kriterium keine Aussage getroffen werden. Finanziell betrachtet wäre der DIY ELISA deutlich am kostengünstigsten, AlphaLISA ist nächstgünstig verfügbar.

Vom Aufwand her vergleichbar sind der ELISA Kit und AlphaLISA. In beiden Verfahren wird nach einem Standardprotokoll gearbeitet. Durch die große Anzahl an Vorlauftests für den DIY ELISA stellt dieser den größten Arbeitsaufwand dar.

Fazit und Ausblick

Zwei in erster Linie limitierende Faktoren stellen auf der einen Seite das benötigte Probenvolumen, auf der anderen Seite die Detection Range und die Genauigkeit des Testes, also ob und wie genau die Konzentration nachweisbar ist, dar. Ein in zweiter Linie limitierender Faktor ist der Kostenpunkt. Nicht limitierend ist der jeweilige Aufwand.

Die für die Fragestellung am besten geeignete Methode ist AlphaLISA, im Hinblick auf das Probenvolumen als ersten limitierenden Faktor eventuell sogar die einzig mögliche. Nachteile sind im Vergleich zum ELISA Kit die in einer höheren Konzentration beginnende Detection Range und im Vergleich zum DIY ELISA die Kosten.

Eventuell denkbar wäre noch ein Multiplex Assay. Dieser funktioniert mit Beads und chromogener fluorogener Emission. Hier werden gleichzeitig die Konzentrationen mehrerer verschiedener Zytokine in einem Ansatz gemessen. Kritische Punkte hierbei sind allerdings die sehr limitierte Erfahrung, die hohe Empfindlichkeit gegenüber Einflüssen jeglicher Art sowie potentielle Interaktionen, zum Beispiel Kreuzreaktivitäten. Weiterhin ist die Dateninterpretation sehr herausfordernd und die Investition lohnt sich erst ab 4 oder mehr gleichzeitig zuverlässig messbaren Zytokinen.

Persönliche Erfahrung

Erst einmal möchte ich betonen, wie viel Freude die Bearbeitung der Fragestellung und das damit verbundene Kennenlernen wissenschaftlichen Arbeitens mir bereitet hat. Im Studium der Tiermedizin liegt die Zielsetzung eher in der Aneignung einer breiten Wissensgrundlage, welche notwendig ist, um sich intensiv in Fachgebiete einzuarbeiten. Ich sehe beide Herangehensweisen als sich ergänzende Methoden eines Hochschulstudiums. Leider bleibt im Rahmen der Prüfungsvorbereitung oft nur wenig Zeit, tief in bestimmte Themen einzusteigen, in den fünf Wochen des VetResearch war hierfür eine ausreichende Möglichkeit gegeben. →

Ich fände es hilfreich, wenn es noch mehr Gelegenheiten im Studium gäbe, ein abgegrenztes Thema in seinen Details zu erfassen.

Weiterhin habe ich aus der frustrierenden Erfahrung, dass in der Praxis nicht immer alles den eigenen theoretischen Überlegungen gemäß klappt, gelernt, nach alternativen Ansätzen zu suchen und diese umzusetzen.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei den Organisatoren des VetResearch Programms im Studiendekanat Herrn Prof. Goebel, Frau Dr. Beitz-Radzio und Frau Dr. Ramspot, sowie bei Herrn Dr. Frank Weber für die stets lehrreiche, geduldige und ermutigende Betreuung, welche durch Sandra Kirsch und Anika Helfrich ergänzt wurde.



Klonierung eines insulinabhängigen Glucose-transporters des Haushuhns

Antonina Schlickerrieder

Lehrstuhl für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München,

Reproductive Biotechnology der TU München, Weihenstephan

Betreuer: Prof. Dr. Bernd Kaspers, Prof. Dr. Benjamin Schusser

Hintergrund und Zielsetzung:

Da die meisten unserer menschlichen wie tierischen Zellen nicht selbstständig Glukose produzieren können, sind sie darauf angewiesen diese über Transportsysteme aufzunehmen. Diese sog. Glut (Glukosetransporter) sind transmembranöse Proteinkomplexe in der Zellmembran. Bei Säugetieren ist bekannt, dass für die Aufrechthaltung des Blutzuckerspiegels der Glut 4 eine zentrale Rolle spielt, da er insulinabhängig ist und vor allem im Muskel- und Fettgewebe vorkommt. Die anderen Glukosetransporter, von denen beim Menschen 12 bekannt sind, unterscheiden sich zum Glut 4 im Gewebe in welchem sie vorkommen, im Molekül, das sie transportieren und in der Affinität zu Glukose. Wie eingangs erwähnt ist der Glut 4 der bekannteste und scheinbar wichtigste Glukosetransporter im Organismus. Dennoch war lange Stand der Forschung, dass eben dieser beim Haushuhn fehlt. Eine im Juni 2015 erschienene Publikation einer Prager Forschungsgruppe postuliert, dass dieses Fehlen fälschlicherweise angenommen wurde, weil der Glut 4 beim Haushuhn sehr Guanin- und Cytosinreich ist. G- und C-reiche Sequenzen sind in der Molekulargenetik sehr schwierig zu erkennen und zu amplifizieren. Dies wird als Grund für das bisherige Fehlen des Transporters angeführt. Ziel des Projektes war es also die von den Prager Forschern als Glut 4 des Haushuhns benannte Sequenz zu amplifizieren und in funktionellen Experimenten mit Zellen zu testen.

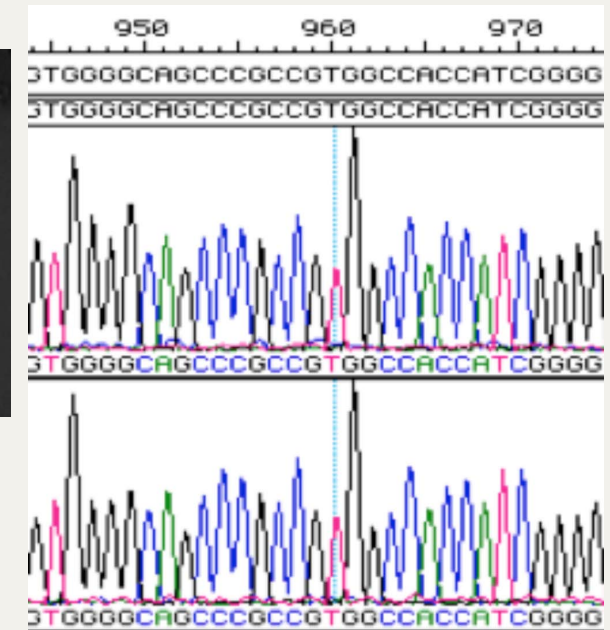
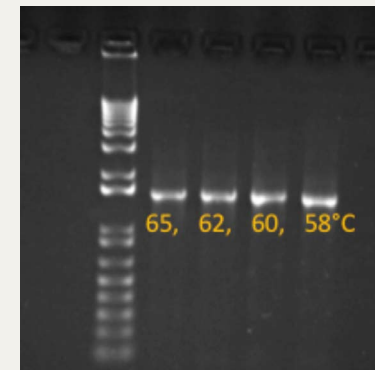
Material und Methoden:

Aus am Schlachtkörper entnommenen Proben von Muskel und Fettgewebe wurde zuerst die mRNA gewonnen und daraus eine cDNA erstellt. Diese diente als Matrize für einige PCR Versuche. Da die Sequenz möglichst genau amplifiziert werden sollte, nutzten wir anfangs eine Proofreading Polymerase. Ob die PCR erfolgreich verlief, wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Wenn durch die PCR etwas vervielfältigt worden ist, stellt sich auf dem Gel eine Bande dar, die durch einen mitgelaufenen Standard nach der ungefähren Größe des Amplifikats eingeordnet werden kann. Die Sequenz des Glut 4 enthält circa 1.500 Basenpaare. Danach folgte die Klonierung der amplifizierten Sequenz in Plasmiden durch Bakterien. Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, ob die Klonierung erfolgreich war, wurde ein Kontrollverdau angesetzt, das heißt die von den Bakterien vermehrte Sequenz wurde mittels passender Restriktionsenzyme ausgeschnitten und wiederum im Gel auf ihre Größe kontrolliert. Danach wurden sie maschinell sequenziert, sodass man die genaue Basenabfolge von Klon und Genomsequenz abgleichen konnte.

Der nächste Schritt war die Erstellung eines Expressionskonstrukts, bestehend aus der Glut 4 Sequenz, einem Promotor und einer Flag-tag, also einer Markierung. Mit diesem konnte man die Funktionalität des Glut 4 überprüfen, zum Beispiel indem man Zellen mit dem Expressionskonstrukt versetzt und mit markierter Glukose die Aufnahme dieser in die Zellen beobachtet.

Ergebnisse:

Die ersten Versuche mit der Proofreading Q5 Polymerase verliefen trotz einiger kleiner Veränderungen wiederholt ohne Ergebnis. Der Grund dafür ist vermutlich, dass das Annealing der Polymerase an die extrem G- und C-reiche Sequenz sehr schwierig ist, da diese oft verschachtelte Tertiärstrukturen formen. Die ersten positiven Ergebnisse brachte die Verwendung der Firepol Polymerase, die aber keine Proofreading Funktion besitzt und daher ungenauer



synthetisiert. Die oben beschriebenen Banden im Gel sieht man in Abb.1. Im weiteren Verlauf folgten Klonierung und Sequenzierung. In Abb. 2 sieht man einen Ausschnitt der Basenabfolge. Auch hier ist zu erkennen, dass ein hoher Gehalt an Guanin (schwarze Peaks) und Cytosin (blaue Peaks) vorliegt. Im Zuge der Sequenzierung konnte beobachtet werden, dass es zu einem Fehler in den einzelnen Klonen gab, was durch die Firepol Polymerase



und durch den hohen G-C-Gehalt erklärt werden kann, und zum anderen die Sequenzierung trotz Verwendung vielfältiger und zahlreicher Primer nicht über die ganze Länge erfolgen konnte. Auch hier ist als Grund der hohe absolute und relative Gehalt an Guanin und Cytosin anzuführen.

Während parallel weitere Verbesserungen am bisherigen Versuchsverlauf getestet wurden, begann die Erstellung des Expressionskonstrukts. Hier ergaben sich anfangs Schwierigkeiten bei der Zusammensetzung der einzelnen Komponenten, die passenden Versuchskonditionen konnten leider nicht mehr ermittelt werden.

Da dies ein zeitlich befristetes Projekt war, wurden die bisherigen Ergebnisse gesichert und die Proben zurückgestellt, um im Rahmen eines anderen Projekts weitergeführt zu werden.

Zusammenfassung und Ausblick:

Es war uns möglich die Sequenz, die Glut 4 determiniert so zu amplifizieren, zu klonen, zu überprüfen und mit der Erstellung der Produkte für funktionelle Tests zu beginnen. Der hohe Gehalt an Guanin und Cytosin brachte – wie erwartet – einige Hürden mit sich. Das von mir angewandte Verfahren muss noch in einigen Punkten angepasst und verbessert werden, aber die Vermutung liegt nahe, dass auch das Haushuhn einen aktiven Glukose Transporter 4 besitzt, der den Blutzuckerspiegel insulinabhängig regelt. Wie erwähnt war das Projekt zeitlich begrenzt, weshalb es leider so abrupt beendet wurde. Inzwischen wird es fortgeführt, über die neueren Ergebnisse ist noch nichts bekannt.

Persönliche Erfahrungen und Danksagung:

Das Projekt sollte für mich ein Einblick in den Bereich der Forschung sein, die auch ein mögliches Berufsfeld für Tierärzte ist. Ich habe allerdings sehr viel mehr Erfahrungen gemacht, als ich anfangs gedacht habe. Das VetResearch Programm bringt uns Studenten nicht nur das eigentliche wissenschaftliche Arbeiten im Labor näher, sondern durch die Literaturrecherche oder das Halten von Vorträgen und Erstellen von Artikeln wie diesem hier, lernt man viel mehr dazu als ich erwartet hätte. Man könnte es auch als eine Vorbereitung für eine Dissertation im kleinen Stil sehen und das ist mir sehr viel wert.

Deshalb möchte ich mich bei Prof. Dr. Benjamin Schusser und Prof. Dr. Kaspers für die gute Betreuung bedanken. Sie waren für mich auch bei kleineren Sachen immer verfügbare und sehr nette Ansprechpartner. Vielen Dank! Ein besonderer Dank geht an Kamila Dropkova, die mich geduldig an die Hand genommen und mir alle Methoden gezeigt hat und sogar mein Englisch wiederaufleben hat lassen. Es war eine schöne Zeit! ■