

VETResearch 2014 Retreat



www.vetmed.uni-muenchen.de

LEHRE@VET
Research



Annelieke Bok, Lena van Buggenum, Dorothee Depka, Theresa Dölle, Benjamin Faller, Elena Feltl, Julia Gedon, Svenja Gerbig, Theresa Greimel, Catherine Gutfried, Katharina Häffelin, Florian Jaudas, Laura Kellermann, Alexander Lauda, Magdalena Lindner, Hannah Linington, Denise Messerer, Anke Moritz, Ursula Mutze, Andreas Öhm, Valentina Riehl, Vanessa Rufle, Daniela Schmidle, Marietta Seuß, Christopher Sommer, Joyce Stecklum, Verena Stössel, Katrin Törner, Anna Vincek, Katharina Winkler, Fabio Wolf, Christian Zenner

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

Stand: März 2015



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

Das Programm **VETResearch** kann bereits im dritten Jahr an unserer Fakultät angeboten werden. Dank der Verlängerung der Förderung „Lehre@LMU“ bis Ende September 2016 können auch in den kommenden beiden Jahren die studentischen Forschungsprojekte weitergeführt werden. Diese Entwicklung ist sehr zu begrüßen!

Ich erachte es für wichtig, dass Studierende die Möglichkeit haben, sich bereits während Ihrer Ausbildung gezielt mit dem Tätigkeitsfeld Forschung auseinanderzusetzen. Sie lernen ebenso, sich bei der Präsentation des eigenen Projekts einer wissenschaftlichen Diskussion zu stellen. Aus früheren Projekten haben sich in der Folge bereits Doktorarbeiten ergeben, weil in solchen Projekten Kontakte geknüpft werden und ein Einblick in die Forschungsarbeit im betreuenden Institut vermittelt wird.

Im Folgenden werden die Projekte von **VETResearch** 2014 kurz vorgestellt. Die Projekte demonstrieren die große Bandbreite der Forschungsgebiete unserer Fakultät und ich bin jetzt schon neugierig, welche Projekte im November 2015 vorgestellt werden.

Prof. Dr. Joachim Braun
Dekan

Evaluation eines Scoringystems von MRT-Bildern beim Schwein

Theresa Dölle
 am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
 Betreuer: Frau Dr. med. vet. Bernau

Ziel der Untersuchung:

Ziel der Untersuchung im Rahmen des VET Research Projektes war es, ein bereits entwickeltes Scoring an vorhandenen MRT-Bildern anzuwenden und damit die Wiederholbarkeit des Scorings zu erfassen.

Tiermaterial & Methode:

Die dieser Studie zugrunde liegenden Daten wurden im Rahmen eines durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF Projektnummer: 0316009B) geförderten Verbundprojektes erhoben. Insgesamt lagen 39.424 Bilder vor. Diese stammten aus 6 Versuchsgruppen á 16 Tieren, aufgeteilt in 3 Altersgruppen (Ferkel, Mastschweine, Jungsauen). Die Versuchstiere wurden mit einem für die Altersklasse entsprechend zugelassenem Impfstoff nach Packungsbeilage geimpft und anschließend mittels MRT an den Tagen 1, 3, 8, 15, 22 und 29 untersucht (siehe Abb. 1).

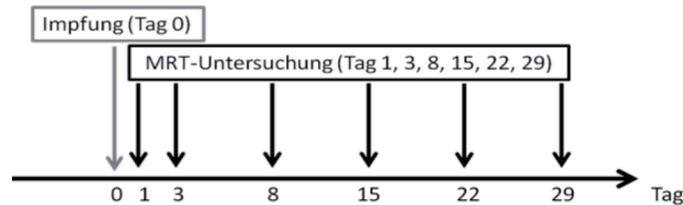


Abb. 1: Darstellung des Versuchsablaufs

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

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

Scoring:

Das Scoring beruhte auf der Signalintensivierung (SI), die sich in den verwendeten Sequenzen als Aufhellung im MRT-Bild darstellte. Die folgenden Variablen wurden erfasst:

- Anzahl Bilder total
- Anzahl Bilder mit SI



- Anzahl Bilder mit SI Score 3, 2 oder 1
- Ausdehnung SI lateral (1/3, 2/3, 3/3)
- Ausdehnung SI caudal (1/3, 2/3, 3/3)

Abbildung 2 stellt das Scoring anhand der Signalintensivierung (Score 0 bis 3) dar.

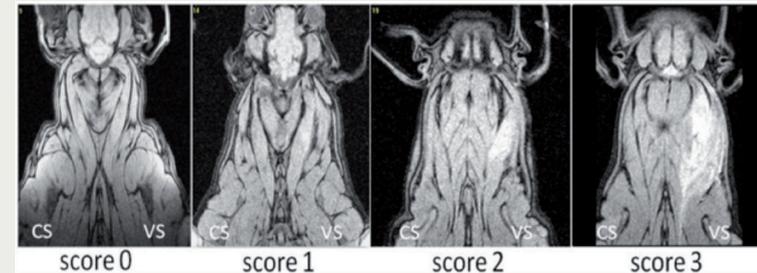


Abb. 2: Scoring anhand der Signalintensivierung

Abbildung 3 stellt das Scoring der Ausdehnung nach lateral dar.

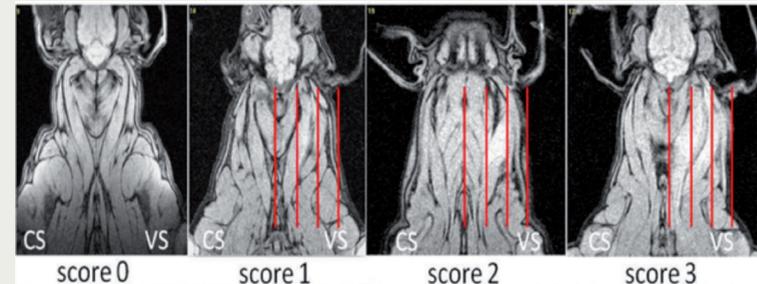


Abb. 3: Darstellung des Scorings für die Erfassung des Ausmaßes in laterale Richtung.

Ergebnisse:

Im Rahmen der Studie konnten die Daten aller 6 Versuchsgruppen gescored werden. Eine Wiederholbarkeitsprüfung zwischen zwei Scornern ergab ähnliche Tendenzen. Das Scoring muss für einen routinemäßigen Einsatz noch überarbeitet werden.

Persönliche Meinung:

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

Erfassung der Knorpelauflage beim Schwein mittels MRT

Katharina Winkler
 am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
 Betreuer: Frau Dr. med. vet. Bernau

Ziel der Untersuchung:

Ziel der Untersuchung im Rahmen des VET Research Projektes war es, vorhandene MRT-Bildern auf ihr Knorpelvolumen auszuwerten. Die grundlegende Fragestellung bezog sich auf die Möglichkeiten der MRT im Rahmen der leg weakness Forschung beim Schwein und die Erfassung des Einflusses der Genetik auf die Knorpelauflage beim Schwein.

Tiermaterial & Methode:

Die Daten stammten aus vorangegangenen Studien und umfassten 75 Schweine mit 4 unterschiedlichen Genotypen: Deutsche Landrasse, Large Black, Piétrain x Cerdo Iberico, Piétrain-Wildschwein-Duroc x Large Black. Die Mast dieser Tier erfolgte unter konventionellen Bedingungen. Die Tiere wurden 3x während der Mast untersucht (30 – 80 – 100 kg). Für die MRT-Untersuchung wurde ein Siemens Magnetom Open verwendet. Für die Untersuchung wurde T1-gewichtete coronare Sequenz mit einer Schnittbilddicke von 15 mm verwendet. Die MRT-Bilder wurden mittels der Able 3D Doctor Software auf das Knorpelvolumen ausgewertet. Hierzu wurde zunächst das Schnittbild definiert, auf dem beide Knieknorpel dargestellt werden konnten (siehe Abb 1; linkes Bild). Der Knorpel wurde für beide Knie sowie für lateral und medial manuell umrundet (siehe Abb. 1; rechtes Bild).

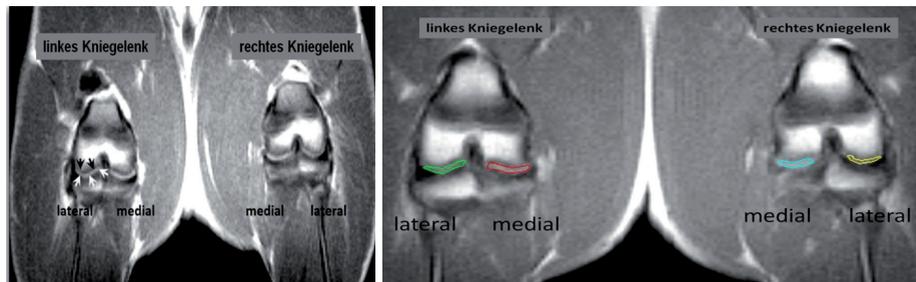


Abb. 1: Linkes Bild: Darstellung des Knieknorpels an beiden Kniegelenken (siehe Pfeile linkes Kniegelenk). Rechtes Bild: Darstellung des umrundeten Knieknorpels bei beiden Kniegelenken.

Diese Daten wurden mittels der Statistik Software SAS 9.3 anhand einer Mischmodellanalyse untersucht. Als fixer Effekt dienten die Genetik, die Scan-Nummer, das Geschlecht sowie deren

Interaktion (Genetik*Scan-Nummer*Geschlecht). Als Zufallseffekt wurden das Untersuchungsdatum und die Tiernummer eingesetzt.

Ergebnisse & Diskussion:

Die Ergebnisse zeigen Unterschiede im Knorpelvolumen bezogen auf die verschiedenen Rassen und Geschlechter (siehe Tab. 1)

Tab.1: Ergebnisse der statistischen Analyse der Knorpelvolumina (durchschnittliches Knorpelvolumen sowie Standardabweichung) aufgeteilt in die verschiedenen Genotypen und Scan-Terminen (I, II & III).

Durchschnittliches Knorpelvolumen + Standardabweichung [cm ³]			
Genetik	Scan I (30kg)	Scan II (80kg)	Scan III (100kg)
Deutsche Landrasse ♀	-	1.91 ± 0.33	0.79 ± 0.30
Large Black ♀	1.07 ± 0.43	1.44 ± 0.31	1.22 ± 0.31
Large Black ♂	2.48 ± 0.48	1.94 ± 0.41	1.40 ± 0.40
Pietrain x Cerdo iberico ♀	1.31 ± 0.53	0.88 ± 0.48	0.52 ± 0.60
Pietrain x Cerdo iberico ♂	1.52 ± 0.48	0.94 ± 0.46	1.23 ± 0.76
Pietrain_Wildschwein_Duroc x Large Black ♀	2.70 ± 0.33	1.20 ± 0.27	0.90 ± 0.43
Pietrain_Wildschwein_Duroc x Large Black ♂	4.32 ± 0.37	1.72 ± 0.28	1.03 ± 0.43

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Darstellung und Volumenberechnung der Gelenkknorpel im MRT-Schnittbild möglich ist. Zudem sind Unterschiede hinsichtlich der Effekte Genetik, Scan und Geschlecht feststellbar. Tendenziell zeigt sich eine Abnahme des Knorpelvolumens mit steigendem Gewicht. Männliche Tiere weisen in dieser Studie signifikant höhere Volumina auf als weibliche Tiere. Es muss jedoch stets berücksichtigt werden, dass es sich zum Teil um kleine Stichprobenumfänge handelt, so dass eine deutlich größere Tierzahl benötigt wird um die Ergebnisse dieser Studie zu verifizieren.

Persönliche Meinung:

Mein Projekt war in vieler Hinsicht sehr positiv. Ich hatte die Möglichkeit mich an wissenschaftliches Arbeiten heranzutasten. Das Ganze zum einen in einem sehr interessanten und lehrreichen Versuch, zum anderen in einer ausgewogenen Kombination aus einem praktischen Versuch und einem theoretischen Anteil. Außerdem unter sehr guter Anleitung und Unterstützung. Dies schon während dem Studium ausprobieren zu können ist eine super Erfahrung, die mich definitiv weitergebracht hat. Ich konnte einige Facetten kennenlernen, durfte selbst Initiative ergreifen und eigene (Berufs-) Ideen weiterentwickeln und reifen lassen. Neben dem Uni-Alltag ist es außerdem auch mal schön, sich in eine konkrete Sache rein zudenken, freiwillig, und diese zu gestalten.

Biomechanische Eigenschaften von Klauenhorn unter Einfluss versch. Protein-Mastrationen

Benjamin Faller

am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Betreuer: Herr PD Dr. med. vet. Maierl und Frau TÄ Lennermann

Ziel des gesamten Projekts ist es herauszufinden, ob und gegebenenfalls welchen Einfluss unterschiedliche Rohproteinanteile in der Mastration auf biomechanische Eigenschaften des Klauenhorns haben. Daraus wurde als Fragestellung für das studentische Forschungsprojekt der Teil herausgenommen, der die Probengewinnung und -prüfung betrifft.

Der umfassendste Teil meiner Arbeit bestand darin, zur Entwicklung der Verfahrenstechnik bzw. Analysemethodik beizutragen und diese zu optimieren.

Von 60 Mastbullen (Rasse Deutsches Fleckvieh) wurden zufallsverteilt je eine vordere und eine hintere Klaue verwendet und unter Berücksichtigung der unten genannten Punkte eingefroren. Diese Tiere waren in der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft bis zu einem Alter von durchschnittlich 500 Tagen gemästet worden. Hierbei waren verschiedene Mastrationen mit einem Rohproteinanteil von 9%, 11%, 13%, 15% und 17% verfüttert worden.

Zunächst musste das Problem gelöst werden, die Proben bei den einzelnen Schritten so schonend zu bearbeiten, dass die Belastung des Materials minimiert wurde. Dann wurde für eine reproduzierbare Probenentnahme in Anlehnung an die „Bestimmungen für die Verleihung und Führung des DLG-Qualitätssiegels für Mittel zur Klauenpflege und Klauenhygiene“ eine Schablone angefertigt, die es ermöglichte, die Hornproben aller Klauen an gleicher Lokalisation und mit gleicher Orientierung der Hornröhrchen zu entnehmen. Mithilfe dieser Schablone wurden aus den Klauen dorso-abaxial quadratische Hornproben mit einer Kantenlänge von ca. 2 cm gesägt. Nach Entfernen der noch anhaftenden Lederhautreste mussten die Proben (ausschließlich Kronhorn) in einem weiteren Schritt mithilfe eines Dickenhobels plan gehobelt werden. In Vorversuchen dazu stellte sich heraus, dass eine gute Zuführung des Präparates zum Hobelmesser unabdingbar war. Dazu wurden in Holzplatten mit einem Forstnerbohrer Vertiefungen gefräst, in die dann die Hornproben mit Epoxid-Klebstoff eingeklebt wurden. So wurde das Horn mit dem umgebenden Führholz abgehobelt und auf die gewünschte Dicke gebracht.

Zum Ausfräsen der eigentlichen Prüfkörperchen aus den Hornplättchen wurde eine computergesteuerte Portalfräse (CNC Portalfräse GoCNC Hobby A4 Basic, www.gocnc.de) verwendet. Diese wurde mit Hilfe einer Grafikdatei im für Plotter verwendbaren HPGL-Format (Corel Draw) gesteuert.

Der fischschwanzförmige Fräskopf wurde von einem Proxxon-Industrie-Bohrschleifer angetrieben. Auf einer zuvor angefertigten Matrize wurden immer 12 Proben zugleich mit doppelseitigem Klebeband aufgeklebt und in mehreren Durchgängen ausgefräst. Beim Aufkleben einer größeren →

Anzahl an Proben hatte es das Problem gegeben, dass das Klauenhorn geringgradig trocknete und sich deswegen zunehmend wölbte. Dies wirkte sich nachteilig auf die Haftung des Klebebandes aus.

Die fertigen Prüfkörperchen haben eine Größe von 5x10 mm². Eine mittige, sanduhrförmige Taillierung mit Materialbreite von 2 mm diente bei den anschließenden Zugversuchen als Sollbruchstelle. Da die Dicke der gehobelten Hornplättchen und damit auch die der Prüfkörperchen nicht standardisiert war, musste die Dicke mit einer Schiebelehre gemessen und im Steuerprogramm der Materialprüfmaschine eingegeben werden.

In diesem Versuch wurde in Anlehnung an die Prüfvorschrift der DLG („Qualitätssiegel für Mittel zur Klauenpflege und Klauenhygiene“) streng darauf geachtet, dass die Anordnung der Hornröhrchen senkrecht zur Längsachse des Prüfkörperchens ausgerichtet waren. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass aufgrund der Anisotropie des Materials, die Orientierung der Hornröhrchen in Längsrichtung des Prüfkörpers deutlich andere Werte ergibt.

Mit der Materialprüfmaschine Z 010 (Firma Zwick, Ulm) wurden anschließend die Zugversuche durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Enden der Prüfkörperchen jeweils in eine Klemmbake aus Edelstahl eingespannt. Zwei Führungsstifte dienten dazu, Dreh- und Scherkräften auf die Probe zu verhindern, so dass ausschließlich Zugkräfte in Längsrichtung auf das Prüfkörperchen einwirkten. Die Belastung der Probe erfolgte in einem Zugversuch mit der zeitabhängigen Kraftzunahme von 2 N/sec wurden die Klemmbaken von der Maschine auseinandergezogen. Im Idealfall rissen die Prüfkörper an der dafür vorgesehenen Taille quer durch. Die Parameter Kraft, Weg und Zeit wurden engmaschig aufgezeichnet.

Mit dem Ende der Probenbearbeitung und der Zugversuche ist das studentische Forschungsprojekt erfolgreich abgeschlossen. Derzeit findet die Auswertung der gewonnenen Daten im Rahmen der Dissertation von Frau Lennermann statt.

Aus den gemessenen Daten lässt sich das typische Weg-Kraft-Diagramm erstellen, anhand dessen der Bereich festgelegt werden kann, in dem die Belastung der Probe elastisch ist. Dieser Messbereich wird beispielsweise für die Bestimmung des Elastizitätsmoduls verwendet. Daneben wird die jeweilige Maximalkraft bei Bruch für die verschiedenen Proben verglichen.

Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen und entwickelten Methoden sollen zukünftig weitere Untersuchungen zur Hornqualität verschiedener Tierarten (z.B. kleiner Wiederkäuer, Pferd etc.) und zu unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt werden. ■

Akzeptanz, Durchführbarkeit und „Lehr-Wert“ der Transkription von radiologischen Befundberichten zur Ausbildung von Studierenden in klinischer Radiologie

Anna Vincek, Valentina Riehl
 an der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik
 Betreuer: Herr Dr. med. vet. Brühshwein

Hintergrund und Zielsetzung

Die Tiermedizinstudenten lernen während ihrer Studienzeit durch Schwerpunktsetzung auf Diagnostik und Therapie mit überwiegend theoretischen Studieninhalten nur wenig über die im späteren praktischen Berufsleben notwendige schriftliche Dokumentation. Die Idee des Projektes war, dass Studenten durch Transkription diktierter Befunde bereits während des Studiums lernen können, wie radiologische Befunde zu erheben sind, wie der Befundbericht bezüglich Beschreibung und Interpretation zu strukturieren ist, welche klinische Fachsprache und Terminologie verwendet wird und wie man mit gängiger Praxissoftware praktisch arbeiten kann. Das Ziel unseres Projekts war die Akzeptanz, Durchführbarkeit und den subjektiven Lerneffekt der Teilnahme bei der Transkription diktierter Radiologieberichte zu evaluieren.

Material und Methoden

Begonnen wurde die Transkription mit der Ausschreibung des Wahlpflichtfaches „Transkription von radiologischen Berichten“ für Studenten des 6. Semesters. Aufgrund der geringen Akzeptanz des Wahlpflichtfaches wurde die Zielgruppe des Projekts kurz darauf geändert und das Augenmerk nun hauptsächlich auf die Studenten der klinischen Rotation gerichtet. Die Studenten erhielten eine Einführung in das Transkriptionsprogramm *DDS Player Standard Transcription Module Version 2.0.0.0* der Firma *Olympus Imaging Corp.* mit dazugehöriger Hardware sowie in das Programm *Vetera.net Campus 48.4.133* der Firma *GP. Software* und *dicomPacs View Version: 6.0.2 – 413* der Firma *Oehm und Rehbein GmbH*. Es wurde hierzu eine Videoanleitung auf den Computern der Radiologie erstellt und gespeichert und an den beiden eingerichteten Arbeitsplätzen Anleitungen zu den Programmen ausgehängt. Über Kopfhörer konnten die Studenten die Diktate anhören und mit Hilfe eines Fußpedals anhalten sowie vor- und zurückspulen. Auch die Option, das Diktat langsamer oder lauter anzuhören, wurde mit der Hardware ermöglicht. Die diktieren Befunde wurden in das Kliniksystem *Vetera* transkribiert. Als Anreiz für diese Arbeit wurde das bereits bestehende System der 40 auszufüllenden Dokumente zum Erlangen der radiologischen Sachkunde am Ende der Studienzeit erweitert, wobei nun zwischen praktischer Durchführung einer Röntgenuntersuchung und Transkription unterschieden wurde. Ein Student besaß demnach während seiner Zeit in der Radiologie zwei Dokumente, auf denen er einmal Unterschriften für die praktische Beteiligung an radiologischen Aufnahmen und zum anderen →

Unterschriften für transkribierte radiologische Befunde sammeln konnte. Durch Bereitstellung von Doppelbildschirm-Computern bestand die Möglichkeit, die radiologischen Bilder des Patienten parallel zur Transkription des Diktats einzusehen und die Diagnose nachzuvollziehen. Im Anschluss an den Fallbericht widmete sich der den Befund diktierende Radiologe in einem Epilog noch einigen Zusatzpunkten, die nicht in die Patientenkartei einzutragen waren. Ziel des Epilogs war es, dem Studenten in einer kurzen persönlichen Ansprache weitere, für diesen speziellen Fall interessante Zusatzinformationen zu nennen, um den Lerneffekt über das Befunden des vorliegenden Bildes hinaus zu erweitern. Es handelte sich dabei um Informationen zu Lagerungstechniken, Hinweise auf Verwechslungsmöglichkeiten von verschiedenen Strukturen sowie Therapieansätze und Prognosen für die vorliegenden röntgenologischen Veränderungen. Mit Hilfe von eingezeichneten Pfeilen und Markierungen wurde es den Studenten zusätzlich erleichtert, die Befundung zu verstehen. Um ein Feedback über die Arbeit zu erhalten, wurde jeder Student dazu angehalten, einen mit dem Umfrage-Tool *Lime Survey* erstellten Online-Fragebogen bezüglich subjektiv empfundenem Lerneffekt, eventuell aufgetretenen Problemen während der Transkription und Spaß an der Arbeit zu beantworten. Da für die Evaluation des Transkriptionsprojekts allerdings nicht nur die Meinung der Studenten mit einbezogen werden sollten, wurde auch eine Umfrage unter den diktierenden Radiologen und dem Klinikpersonal, welches anschließend mit den transkribierten Berichten arbeitete, durchgeführt. Hierbei richteten sich die Fragen in erster Linie nach Umsetzbarkeit, Qualität der Berichte und zeitlichem Management gegenüber dem alten System, in welchem die Berichte noch von den Radiologen selbst in das Klinikprogramm eingetragen wurden.

Ergebnisse

Da die Teilnahme mit nur 25 vollständig ausgefüllten Fragebögen eher gering war, sind die Ergebnisse nicht vollständig repräsentativ und können nur eine Tendenz anzeigen. Über 60% der Studenten gaben an, sich die Röntgenbilder immer direkt beim Abtippen des Befundes anzusehen. Für die meisten unter ihnen bedeutete das gleichzeitige Transkribieren und Zuhören keinen zusätzlichen Stress. Insgesamt konnte mit 64% der Studenten ebenfalls eine große Mehrheit die diktieren Befunde im Zusammenhang mit den dargestellten Röntgenbildern nachvollziehen und hatte eher selten Probleme durch fehlende anatomische beziehungsweise röntgenanatomische Grundkenntnisse. Es stellte sich heraus, dass vor allem die Mitarbeiter der Radiologie sowie Mitstudenten und auch gerne das Internet bei Unklarheiten befragt wurden. Der Lerneffekt wurde bei über 50% der Studenten als gut bewertet. Es gab allerdings auch mit 32% einige Studenten, die ihn als mäßig empfanden. Hervorzuheben ist, dass der Lerneffekt gegenüber dem System in anderen Kliniken, in denen die Befunde von Röntgenbildern überwiegend mündlich mit den Studenten erhoben werden, als deutlich höher empfunden wurde. Bezüglich des Spaßfaktors drifteten die Antworten deutlich auseinander. Knapp 30% der Befragten bereitete die Transkription große Freude, die gleiche Anzahl an Studenten empfand sie allerdings als eher unangenehm. Die Umfrage unter den Radiologen ergab einige Vorteile, aber auch Nachteile. Als positiv gewertet wurde die Möglichkeit, die Lehre unabhängig und zeitversetzt stattfinden lassen zu können. Auch werteten sie den Lerneffekt als größer, da die Befunde genauer beschrieben werden, als es beim mündlichen Durchsprechen der Fall gewesen →

wäre. Zusätzlich konnte auch die Befundnomenklatur und -struktur vermittelt werden. Als nachteilig, da recht aufwendig, wurde die nötige Einarbeitung der Radiologen und das Erstellen der Anleitungen für die Studenten beurteilt.

Das Ergebnis der Umfrage unter den Klinikmitarbeitern ergab ein überwiegend positives Ergebnis. So sind die Berichte durch die studentische Transkription schneller und zuverlässiger verfügbar sowie ausführlicher als vorher. Als Kritikpunkte wurden vorkommende Rechtschreibfehler und Umgangssprache genannt.

Diskussion

Die Akzeptanz der Studie war bei dem initial geplanten Wahlpflichtfach eher schlecht. Nach Abänderung der Zielgruppe stellte sie sich als etwas besser heraus und ergab mit einem Umfrageergebnis von 56% an Studenten, denen die Transkription Spaß bereitete, ein zufriedenstellendes Ergebnis.

Die Durchführbarkeit war zu Beginn des Projektes nicht einfach, bedingt durch die Notwendigkeit einer Vielzahl technischen Equipments wie Computer und Monitore und einem großen Aufwand an Personaleinarbeitung sowie Erstellung von Anleitungen in Video-, Text- und Bildformat. Diese mussten kontinuierlich an Änderungen des Ablaufs angepasst werden. Nachdem das Projekt fortgeschritten und die anfänglichen Schwierigkeiten überwunden waren, erwies sich die Durchführbarkeit allerdings als äußerst einfach.

Der Fragebogen ergab bezüglich des Lerneffektes ein recht positives Ergebnis. Zusammengefasst wurde er durch die Studenten als überwiegend gut bewertet. Um den Lerneffekt unseres Projekts nicht nur subjektiv anhand des Fragebogens, sondern auch objektiv evaluieren zu können, wären Testate zur Prüfung des Wissensstandes der Studenten vor und nach Teilnahme am Projekt nötig. Zudem wurden Faktoren wie die unterschiedliche Qualität der Diktate durch verschiedene sprechende Personen und das bestehende Arbeitsklima in der Radiologie noch nicht erfasst.

Weitere Entwicklungen

Durch Gründung einer Facebook-Gruppe sowie einer Doodle-Gruppe wurde den Studenten ermöglicht, sich für Transkriptionstermine unabhängig von der klinischen Rotation einzutragen. Als eine Reaktion auf das Feedback der Studenten wurde begonnen, einen digitalen Röntgenatlas zu erstellen und in das digitale Röntgenbildarchiv einzubinden. Dieser enthält röntgenologisch unauffällige Aufnahmen verschiedener Körperregionen und kann im Bedarfsfall direkt am Computerbildschirm als Vergleichsbild zu pathologisch veränderten Aufnahmen herangezogen werden.

Schlussfolgerung

Aufgrund des Erfolges und der überwiegend positiven Bewertung der Transkription wird diese in der Radiologie der chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik München weitergeführt und auch weiterhin von den Studenten evaluiert.

Danksagung

Wir danken den Mitarbeitern der Radiologie und Dr. Andreas Brühshwein für die tatkräftige Unterstützung unseres Projekts. ■

Primerredesign für CCL5 Genexpressionsstudien mittels RT-PCR an bovinen Endometriumsepithelzellen

Marietta Seuß, Elena Feltl, Katrin Törner, Magdalena Lindner
 an der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
 Betreuer: Herr Dr. Dipl. Ing. Agr. Weber, Frau Hilmer, Frau Kirsch und
 Herr Prof. Dr. med. vet. Zerbe

Begriffserklärung CCL5:

Der Chemokin-Ligand-5 (CCL5) ist ein Gen, welches sich neben weiteren Chemokin-Genen auf dem Chromosom 19 beim Rind befindet. Chemokine bilden eine Superfamilie von sekretorischen Proteinen, welche an immunregulatorischen und entzündlichen Prozessen beteiligt sind und dann verstärkt exprimiert werden.

Die weitere Differenzierung dieser Superfamilie erfolgt in 4 Unterfamilien, jeweils auf ihre Anordnung der N-terminalen Cystein- Reste des reifen Peptids basierend.

CCL5 verursacht die Freisetzung von Histamin aus Basophilen und aktiviert Eosinophile Granulozyten.

Vorangegangene Forschungsarbeit:

Im vergangenen VetResearch Projekt von A. Helfrich (2013) wurde versucht eine Primeroptimierung bezüglich der RT-PCR für das Gen CCL5 durchzuführen. Bislang führte dieses bei der Forschung nach diagnostischen Markern zur zuverlässigen Erkennung subklinischer Endometritiden mittels RT-PCR an isolierten Endometriumsepithelzellen zu Unregelmäßigkeiten in der Schmelzkurve.

Bedauerlicherweise war das PCR Ergebnis auf Grund von Primerdimerbildung nicht brauchbar.

Ziel/Aufgabenstellung:

Weiterentwicklung des Primerdesigns, basierend auf den Forschungsergebnissen des Jahres 2013

Methoden zur Erreichung des Forschungszieles:

1) Erweiterung der Schmelzkurven

Das vorangegangene Projekt arbeitete mit Temperatur von 58-62°C. Dieser Gradient wurde in einen Bereich von 50-85°C erweitert und die Schmelzkurven für das alte Primerpaar neu aufgenommen, um mögliche Primerdimere zu erfassen. Jedoch brachte diese Varianz kein befriedigendes Ergebnis, weshalb sich dazu entschlossen wurde neue Primer mit spezifischen Eigenschaften auszuwählen.

2) Filterung und Auswahl geeigneter Primer

An Primer in der RT-PCR werden besondere Anforderungen gestellt, welche möglichst



einzuhalten sind, um optimale Ergebnisse im Versuch zu erzielen. Darunter zählen:

- Primer Länge
18- 25 Basenpaare (Optimal 20 Bp)
Je länger der Primer, desto spezifischer bindet er. Jedoch je länger er ist, desto geringer ist die Effizienz.
- Schmelztemperatur
Zwischen 58°C- 61°C
- Guanin/Cytosin Gehalt
Parameter für die Spezifität der Primer, optimal 50%
- 3'- Ende
Sollte aus der Base Guanin bzw. Cytosin sein, da diese mit 3 Wasserstoffbrückenbindungen aneinander liegen, wodurch die Spezifität der Bindung erhöht wird.
- Polypyrimidine und Polypurine
Ihre Vermeidung ist sehr wichtig, da sonst die Wahrscheinlichkeit des „Selbst Annealing“ somit der Schleifenbildung eines Primers erhöht wird.
Daher eine abwechselnde Reihenfolge aus Purin und Pyrimidinbasen beachten.
- PCR- Produkt-Größe
100-250 Basenpaare

Das „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ stellt einen Zugang zu wichtigen DNA-, RNA- und Proteindatenbanken zur Verfügung. Durch das hier zugängliche Programm Primer BLAST können zielspezifische Primer für die PCR entworfen bzw. ausgewählt werden. Hierbei stehen flexible Einstellungsmöglichkeiten zu Verfügung, wodurch es ermöglicht wird auf bestimmte Primer Eigenschaften einzugehen.

Somit konnten wir neue Primer für Bos Taurus CCL5 auswählen und mit diesen den Versuch in der RT-PCR durchzuführen.

3) Durchlauf der Primer

Durch die Eingabe bestimmter Voraussetzungen, welche unser Primer erfüllen sollte, wurden aus zehn Primerpaarvorschlägen der NCBI-Datenbank mit dem Programm Primer-BLAST sieben exonübergreifende Primerpaare getestet.

Nach deren Durchlauf konnten bestimmte Primer wie z.B. Primer 8 auf Grund unzufriedenstellender Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Allerdings zeigten die Resultate der RT-PCR bei unserem Primer 1, sowie dessen Schmelzkurven einen deutlichen Produkt-Peak in der Schmelzkurve bei 87°C. Dieser Primer führte zum gewünschten Ergebnis! (siehe Poster)





Primerdesign für CCL5- Genexpressionsstudien Feltl E, Lindner M, Seuß M, Törner K, Kirsch S, Weber F

Zielsetzung:

Das Primerdesign wurde, basierend auf den Forschungsergebnissen von A. Helfrich aus dem Jahr 2013, weiterentwickelt. Diese kam zu dem Ergebnis, dass ein Primerredesign erforderlich ist. Forschungsgrundlage bilden in beiden Projekten bovine Endometriumseithelzellen, bei denen die Genexpression von CCL5 mittels spezifischer Primer bestimmt wurde. Dieses Gen steht im Verdacht, an der Expression von Chemokinen (C-C motif) bei subklinischen Endometritiden des Rindes beteiligt zu sein.

Verfahren:

Aus zehn Primerpaarvorschlägen der NCBI-Datenbank mit dem Programm Primer-BLAST wurden sieben exonübergreifende Primerpaare getestet. Dargestellt sind das Primerpaar 1 und 8.

Ergebnisse:

Sequenz: **Projekt Helfrich vom 16.09.2013** Forward : 5'-cct gct ttg cct ata tat-3'
Reverse : 5'-agc act tgc tgc tgt at-3'

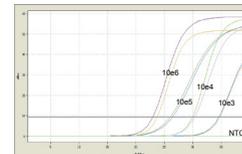


Abb. 1: RT-PCR mit Standardpunkten 1.000.000 copies/µl bis 1000 copies/µl

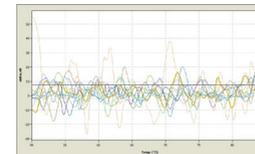


Abb. 2: Die Schmelzkurven für das alte Primerpaar wurden in einem erweiterten Bereich von 50 bis 85°C aufgenommen, um mögliche Primerdimere zu erfassen

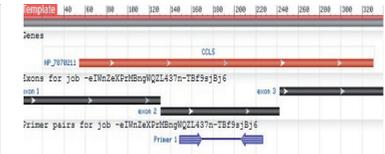


Abb. 3: Lage des alten Primerpaires in dem Gen CCL5 (Quelle: NCBI-PubMed)

Sequenz **Primerpaar 8:** Forward: 5'-cca tat gcc tgc gac acc ac-3'
Reverse: 5'-ctg gtg ata aag acc act gc-3'

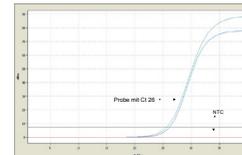


Abb. 4: RT-PCR Lauf mit einer Probe aus stimulierter boviner Endometriumseithelzellkultur

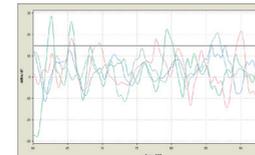


Abb. 5: Schmelzkurven zu RT-PCR Lauf

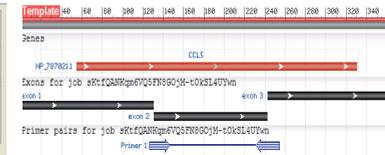


Abb. 6: Lage des Primerpaires 1 in dem Gen CCL5 (Quelle: NCBI-PubMed)

Sequenz **Primerpaar 1:** Forward: 5'-gct tat gcc tcc cca tat gc-3'
Reverse: 5'-cgc aag ttc agg ttc aag gc-3'

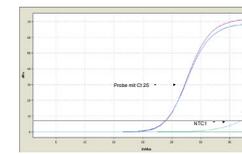


Abb. 7: RT-PCR Lauf mit einer Probe aus stimulierter boviner Endometriumseithelzellkultur. Bei sehr hoher Zykluszahl ist ein Anstieg der NTC akzeptabel.

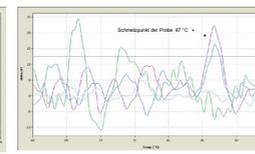


Abb. 8: Schmelzkurve zu RT-PCR Lauf. Die Schmelztemperatur der Probe liegt bei 87°C.

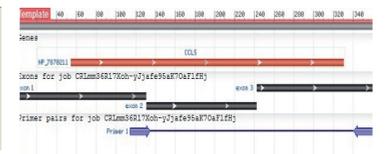


Abb. 9: Lage des Primerpaires 8 in dem Gen CCL5 (Quelle: NCBI-PubMed)

Fazit:

Es konnte eine deutliche Verbesserung durch das Primerredesign erzielt werden, da exonübergreifende Sequenzen verwendet wurden. Das Primerpaar 1 kristallisierte sich als bestes der getesteten heraus, obwohl auch dieser geringfügige Neigung zur Primerdimer-Bildung zeigte. Mit dem Primerpaar 1 könnten weitere Versuche zur Optimierung der Annealingtemperatur und Erstellung einer Standardkurve durchgeführt werden.

Ergebnisse:

Es konnte eine deutliche Verbesserung durch das Primerredesign erzielt werden, da exonübergreifende Sequenzen verwendet wurden.

Der Primer 1 kristallisierte sich als Bester der getesteten heraus, obwohl auch dieser geringfügige Neigung zur Primerdimer-Bildung zeigte.

Mit dem Primerpaar 1 könnten weitere Versuche zur Temperaturoptimierung von 58°C- 61°C mit Berücksichtigung einer Standardkurve durchgeführt werden.

Persönliche Meinung:

Im Rahmen unseres Forschungsprojektes für VetResearch wurde uns eine große Flexibilität von Herrn Dr. Weber entgegengebracht. Hier durch war es uns möglich neben den Verpflichtungen der Universität, der klinischen Rotation und Pflichtpraktikas, an dem Projekt teilzunehmen.

Ein besonderer Wert wurde auf eine gute Grundkenntnis gelegt, um den Einstieg in unser Forschungsthema zu erleichtern. In diesem Zusammenhang haben sich unsere Betreuer vorab dazu entschlossen, das Projekt durch eine interne Fortbildung für alle Beteiligten einzuleiten. Die Referentin Melanie Spornkraft vom Lehrstuhl für Physiologie der TU München/Weihenstephan vermittelte uns wichtige Informationen bezüglich der RNA Qualitätskontrolle und des Primerdesigns, welche die Basis für erfolgreiche qPCR Experimente sind. Wir waren uns einig, dass somit die besten Voraussetzungen geschaffen wurden, um mit unserem Projekt zu starten.

Darüber hinaus erhielten wir wichtige Information von Seiten unserer Betreuer bezüglich der Arbeit im Labor und Umgang mit Kulturproben um bereits vom ersten Schritt eines Versuches alles korrekt durchzuführen.

Während des Durchlaufes verschiedener Primer innerhalb unserer Forschungsarbeit führte dies oft zu nicht befriedigenden Ergebnissen, wodurch wir lernten auch mit diesen umzugehen und daraus gewisse Schlüsse zu ziehen, den kompletten Versuchsablauf zu überdenken und somit mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

Abschließend möchten wir uns bei Herrn Dr. Weber, Frau Kirsch und Frau Hilmer für die intensive Betreuung, Geduld und Flexibilität bedanken. Darüber hinaus, dass Sie uns ermöglicht haben, an diesem Projekt für VetResearch teilzunehmen, Erfahrungen zu sammeln und ein weiteres wichtiges Gebiet der Veterinärmedizin nicht nur in der Theorie sondern auch der Praxis kennenzulernen.



Immunhistochemische Untersuchungen des zellulären Expressionsmusters im Verlauf der Epileptogenese

Julia Gedon, Fabio Wolf, Annelieke Bok

am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

Julia Gedon

Abschlussbericht im Rahmen des VetResearch-Projektes von Julia Gedon

Titel: Etablierung einer immunhistochemischen Färbung zur Evaluierung der TSPO-Expression im Rahmen eines Post-Status-epilepticus-Modells

Dauer: 4 Monate

Betreuer: Dr. Vera Russmann, Prof. Dr. Heidrun Potschka

Ziele/Aufgabenstellung:

Der Begriff Epilepsie kommt aus dem Griechischen und ist unter anderem auf den Begriff „Epilambanein“ zurückzuführen, was erfassen, befallen oder überfallen bedeutet. Schon im Kernstück der traditionellen Literatur des Ayurveda, dem Charaka Samhita und in der Bibel wurden Anfälle in Form einer göttlichen Krankheit oder Besessenheit beschrieben.

Lukas 9,37 „ Da schrie ein Mann aus der Menge: Meister ich bitte dich, hilf meinem Sohn! Es ist mein einziger. Er ist von einem Geist besessen; plötzlich schreit er auf, wird hin und hergerzerrt, und Schaum tritt ihm vor den Mund, und der Geist quält ihn fast unaufhörlich.“

Erst Samuel-Auguste Tissot („Traité de l'épilepsie“, 1770) und Hughlings Jackson („A Study of Convulsions“, 1869) haben mit ihren Werken die Grundlagen für die moderne Epileptologie geschaffen, und insbesondere Hughlings Jacksons Erklärungen für neurophysiologische Vorgänge im Gehirn besitzen noch heute ihre Gültigkeit. Seitdem ist die Wissenschaft sehr weit fortgeschritten, das EEG sowie weitere bildgebende Verfahren wurden etabliert, um sichtbar zu machen, worunter ca. 1-2% der Bevölkerung unserer Erde leiden. Etliche Forscherteams arbeiten an der Entwicklung von Medikamenten, die diese Menschen von ihren Leiden befreien sollen. Aus neueren Studien geht jedoch hervor, dass fast ein Drittel aller Epileptiker an einer therapieresistenten Form leidet und daher darauf angewiesen ist, dass auf diesem Gebiet weiter geforscht wird.

Einer dieser Ansätze befasst sich mit Entzündungen und der Aktivierung von Glia-Zellen sowie der Hoffnung, dass man mit einer Modulation der Neuroinflammation Epilepsiepatienten helfen kann.

Als Glia bezeichnet man Zellen, die zum Bindegewebe des Nervensystems zählen und eine wichtige Rolle als Hülle der Nervenfasern spielen. Zudem besitzen diese Zellen eine gewisse Aufräum- und Reparaturfunktion, wenn es zu pathologischen Veränderungen im Gehirn kommt. So konnte nachgewiesen werden, dass selbst kleinste Traumata, degenerative Veränderungen



und veränderte neuronale Aktivität, wie ein epileptischer Anfall zu einer raschen Aktivierung der Gliazellen führen, welche dann unter anderem eine Entzündungsreaktion versuchen können. In der äußeren Mitochondrien-Membran dieser Gliazellen ist das Translocator Protein (TSPO), welches früher als peripherer Benzodiazepin-Rezeptor bezeichnet wurde, lokalisiert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass TSPO vor allem nach Verletzungen und Entzündungen des Gehirns übermäßig exprimiert wird, und damit nicht nur im Zusammenhang mit diversen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson von Bedeutung ist, sondern auch bei Epilepsien eine große Rolle spielt. Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurde eine immunhistochemische TSPO-Färbung etabliert, um die TSPO-Expression im Rahmen eines post-Status-epilepticus-Modells evaluieren zu können. Dabei zeichnete sich ein Unterschied zwischen epileptischen Tieren und Kontrolltieren ab, der jedoch im Rahmen zukünftiger Projekte verifiziert werden muss.

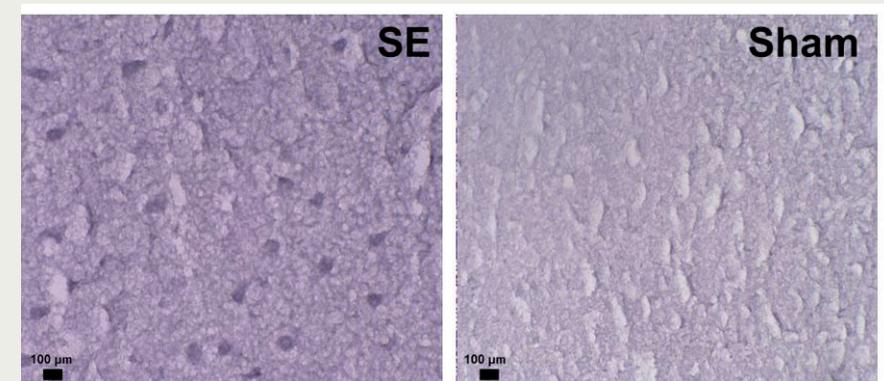


Abbildung 1: Im Rahmen der Etablierung der immunhistochemischen TSPO-Färbung zeichnete sich ein Unterschied zwischen epileptischen Tieren (SE) und Kontrolltieren (Sham) ab. →

Fabio Wolf

Abschlussbericht im Rahmen des VetResearch-Projektes von Fabio Wolf

Titel: Verifizierung der Implantatlokalisierung sowie Etablierung einer histologischen Färbung zur Evaluierung der Neurodegeneration im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells

Dauer: 4 Wochen

Betreuer: Dr. Vera Russmann, Prof. Dr. Heidrun Potschka

Ziele/Aufgabenstellung:

Weltweit zählen Epilepsien zu den bedeutendsten neurologisch bedingten chronischen Erkrankungen. Die Prävalenz liegt beim Mensch bei ca. 1%, das heißt ca. 800.000 Menschen alleine in Deutschland sind betroffen. In der Tiermedizin werden die Prävalenzen mit 0.5-5% beim Hund und etwas niedriger bei der Katze angegeben. Trotz der großen Zahl an Erkrankten können ein Drittel der Patienten nicht effektiv behandelt werden, da sie Resistenzen gegen die gängigsten Medikamente aufweisen. Somit wird deutlich, dass ein großer Bedarf an der Erforschung neuer Medikamente und innovativer Behandlungsmethoden besteht.

Den Forschungsgruppen stehen hierfür verschiedene Tiermodelle zur Verfügung, die sich durch intensive Forschung auf diesem Gebiet und ständige Weiterentwicklung etabliert haben. Durch natürlich bedingte große anatomische und physiologische Unterschiede ist es notwendig, dass Tiermodelle gewissen Anforderungen und Standards entsprechen, um spätere Ergebnisse valide interpretieren zu können. Grundlegend sind es drei Validitätsfaktoren, die ein gutes Tiermodell kennzeichnen. Von großer Bedeutung ist natürlich, dass sich die Symptome des ausgewählten Tieres mit denen der zu erforschenden Erkrankung ähneln, um plausible Rückschlüsse ziehen zu können (Augenscheinvalidität). Folglich sollte nicht nur die Art der Symptomatik ähnlich sein, sondern auch der vorangegangene Pathomechanismus, da es nur so möglich ist, die gewonnenen Ergebnisse auch auf andere Spezies zu übertragen (Konstruktvalidität). Als drittes wichtiges Kriterium wird die prädiktive Validität angesehen, die angibt, in wie fern mit den gewonnenen Ergebnissen mögliche Vorhersagen für die Zukunft gemacht werden können, z.B. die Wirksamkeit von Medikamenten betreffend. Speziell für die Epilepsie stehen zwei Tiermodellgruppen zur Verfügung, das akute und das chronische Modell. Um epileptische Anfälle auszulösen werden chemische oder elektrische Reize verwendet, ohne die kein Anfall stattfinden würde. Im Rahmen der elektrisch induzierten Tiermodelle unterscheidet man das Status-Epilepticus-Modell (SE-Modell) und das Amygdala-Kindling-Modell. Beim SE-Modell entwickeln die Tiere durch eine 25-minütige Stimulation der basolateralen Amygdala (BLA) einen sich selbst erhaltenden Status epilepticus. Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurde das Amygdala-Kindling-Modell verwendet. Dabei werden im Bereich der BLA zeitlich wiederholte immer stärker werdende elektrische Impulse gesetzt. Während dieses Prozesses („Aufkindeln“) reagiert die betroffene Gehirnregion immer sensibler auf die elektrischen Reize und es ent-



wickeln sich aus zunächst fokalen Anfällen sekundär generalisierte Anfälle (Beurteilung der Anfälle siehe Tabelle 1, modifiziert nach Racine, 1972). Dieser Prozess lässt sich nicht beliebig steigern. Die Tiere erreichen einen Punkt, ab dem die Empfindlichkeit für den elektrischen Reiz nicht weiter zunimmt. Dieser Zustand wird als „vollgekindelt“ bezeichnet.

Stadium	Symptome
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialtonus
Stadium II	Schwere Fazialklonien
Stadium III	Einseitiger Vorderextremitätenklonus
Stadium IV	Aufrichten und bilateraler Vorder-extremitätenklonus
Stadium (IV)	Siehe IV, ohne Aufrichten
Stadium V	Aufrichten, mit Verlust der Stellreflexe, generalisierte klonische Krämpfe
Stadium (V)	Siehe V, ohne nach hinten oder zur Seite überfallen.

Tabelle 1

Grundvoraussetzung für alle elektrischen Epilepsie-Modelle ist die exakte chirurgische Implantation einer Elektrode in die basolaterale Amygdala. Der korrekte Sitz der Elektrode ist ausschlaggebend für den späteren Versuchserfolg und die Belastbarkeit der gewonnen Daten. Ziel des vorliegenden Projektes war es, mittels einer histologischen Nachweismethode den korrekten Sitz der Elektroden in den Gehirnschnitten von Tieren eines vorangegangenen Versuches zu belegen. Zusätzlich wurde die Fluor Jade-Färbung zur Evaluierung der Neurodegeneration etabliert.

Beschreibung der Methoden:

1. Herstellung der Gefrierschnitte

Die gefrorenen Gehirne wurden mit Hilfe eines Kryostaten geschnitten. Die Schnittdicke betrug dabei 40 µm. Die Messertemperatur betrug durchgehend -18°C. Aufgefangen wurden die Schnitte in einer 0,1 M Phosphatpufferlösung. Vor dem erneuten Einfrieren wurden die Schnitte in ein Gefriermedium eingebettet. Nach 24 Stunden bei einer Temperatur von -20°C wurden die Schnitte zur weiteren Aufbewahrung in einen Gefrierschrank mit einer Temperatur von -80°C überbracht.

2. Aufziehen der Schnitte

Die gefrorenen Schnitte wurden aufgetaut und anschließend in 0.1 M Phosphatpuffer gegeben. Nachdem die Schnitte in der richtigen Schnittfolge sortiert worden waren, wurden sie auf einen mit Chromgelatine bedeckten Objektträger aufgezogen und anschließend luftgetrocknet.



3. Histologische Färbungen

Um die zu untersuchenden Strukturen unter dem Mikroskop sehen zu können, müssen diese zuerst mit Hilfe von Färbungen sichtbar gemacht werden. Die Darstellung der Präparate erfolgte mit Hilfe der Nissl-Färbung. Bei dieser Färbung werden mithilfe der basischen Substanz Thionin saure Strukturen der DNA und RNA in den Somata der Neuronen angefärbt. Da in den Neuronen besonders viel endoplasmatisches Retikulum vorliegt (Nissl-Schollen), in den Gliazellen dagegen sehr wenig, wird eine klare Identifizierung beider Zellgruppen deutlich. Der genaue Ablauf der Färbung wird in Abbildung 1 gezeigt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläsern bedeckt. Zusätzlich wurde im Rahmen des vorliegenden Projektes die FluoroJade-Färbung zur Evaluierung der Neurodegeneration etabliert.

Ergebnisse:

Die korrekte Elektrodenimplantation konnte bei 100% der im Rahmen dieses Projektes untersuchten Tiere bestätigt werden. Im Rahmen der Etablierung der FluoroJade-Färbung zeichnete sich ein Unterschied zwischen epileptischen Tieren und Kontrolltieren ab. Dieser muss jedoch im Rahmen zukünftiger Projekte verifiziert werden.

Abbildungen:

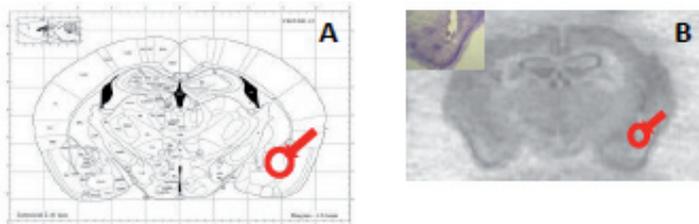
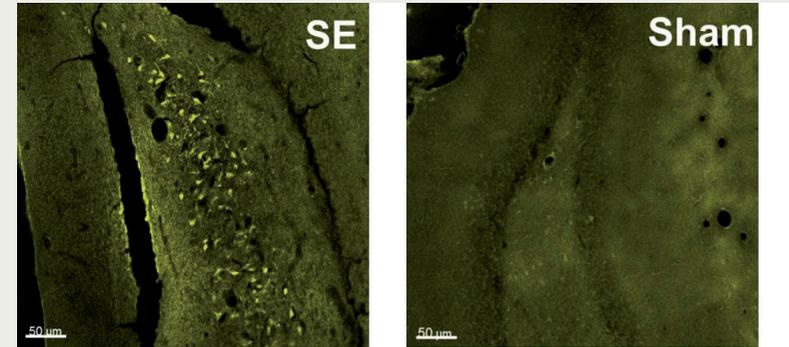


Abbildung A veranschaulicht die korrekte Implantationsstelle anhand des stereotaktischen Atlas von PAXINOS und WATSON (2005). Abbildung B zeigt die Photographie eines Nissl-gefärbten Gehirnschnitts. Der vergrößerte Bildausschnitt veranschaulicht die korrekte Lokalisation der implantierten Elektrode.

1. • 3 Min. 100% Ethanol
2. • 3 Min. 95% Ethanol
3. • 3 Min. 70% Ethanol
4. • 3 Min. 50% Ethanol
5. • 20 Sek. Thionin
6. • 3 Min. Aqua dest.
7. • 3 Min. 50% Ethanol
8. • 3 Min. 70% Ethanol
9. • 3 Min. 95% Ethanol
10. • 3 Min. 100% Ethanol
11. • 3 Min. Terpeneol/ Rotisol
12. • 3 Min. Rotisol I
13. • 3 Min. Rotisol II

Abbildung 1



Im Rahmen der FluoroJade-Färbung zeichnete sich ein Unterschied zwischen epileptischen Tieren (SE) und Kontrolltieren (Sham) ab. Dieser muss jedoch im Rahmen zukünftiger Projekte verifiziert werden. →

Annelieke Bok

Abschlussbericht im Rahmen des VetResearch-Projektes von Annelieke Bok

Titel: UPREGULATION OF CANNABINOID TYPE 1 RECEPTOR EXPRESSION IN A MOUSE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Final report VETResearch-projects: 31st of March 2014- 27th of June 2014

A.E. Bok

Rijksuniversiteit Groningen, Groningen the Netherlands;

Ludwig-Maximilians-Universität, Munich Germany

Supervisor/Institute: Dr. E.L. von Rüden, Prof. Dr. H. Potschka

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Germany

Introduction

With an estimated number of 50 million people diagnosed, epilepsy is a profound neurodegenerative disease (Banerjee et al., 2009). Recurrent seizures found in epilepsy result from uncontrolled electric brain activity and synchronously firing neurons (Ekenstedt et al., 2012). A broad range of cellular and molecular mechanisms are connected to this hyperexcitable neuronal network and consequently different types of epilepsy are known. The most common type is temporal lobe epilepsy (TLE) (Browne and Holmes, 2001; Pitkänen and Lukasiuk, 2009). Aside cognitive and behavioral impairments, molecular and cellular changes (e.g. neurodegeneration and neurogenesis) are features often linked to epilepsy (Chin and Scharfman, 2013; Reddy and Kuruba, 2013; von Rüden, 2012). Moreover, in 22.5% of the epileptic patients, drug resistance occurs (Picot et al., 2008). In those patients, consequences tend to be even more detrimental (Kwan et al., 2009). In order to develop new anti-epileptogenic strategies, understanding the underlying mechanisms of epilepsy and epileptogenesis is essential.

The endocannabinoid system (ECS) exerts a key regulating function in the central nervous system (CNS), as well as in the periphery (Micale et al., 2013). Activated by postsynaptically synthesized endocannabinoid ligands such as anandamide and 2-arachidonoylglycerol, it modulates synaptic transmission, neuronal activity and neuronal plasticity (Katona and Freund, 2008). The G-protein coupled cannabinoid type 1 receptor (CB1R) plays a major role in this regulation and is located presynaptically throughout the whole CNS in several neurotransmitter systems (Piomelli, 2003). Upon activation, adenylyl cyclase is inhibited, leading to a decrease in intracellular calcium and activation of inwardly rectifying potassium channels, eventually leading to a decrease in neurotransmitter release in both excitatory as well as in inhibitory synapses (Moreira et al., 2012). Thus, they suppress retrograde inhibitory and excitatory neurotransmission (Monory et al., 2006).



So far, detailed etiology of epileptogenesis remains unknown, and a potential role of the ECS in epileptogenesis and anti- or proconvulsant effects has been controversially discussed (Echegoyen et al., 2009; Dudek et al., 2010). In afore used kindling model of TLE with CB1R knock-out mice, seizure discharges resulted in an increase in behavioral and electrographic seizure response and led to an increased seizure susceptibility (von Rüden, non-published data; Monory et al., 2006). Kindling with electrically induced seizures via a localized depth electrode in the amygdala, forms a stable hyperexcitable network, resembling pathophysiological findings of temporal lobe epilepsy (Goddard et al., 1969). Previous studies show influences or alterations of the ECS in both human epileptic patients and animal models (Ludányi et al., 2008; Maglóczy et al., 2010; Wallace et al., 2003; Kow et al., 2014). However, the exact ways in which this regulation through CB1R of neurotransmitters is executed, remain unknown.

To consider CB1R as a putative target for anticonvulsant or anti-epileptogenic approaches, more detailed information about the system's mechanism and main targets is needed. Therefore, we investigated the influence of kindling epileptic seizures on the CB1R expression in CamK-CB1 WT mice.

Material & Methods

In order to see a difference in the expression pattern of CB1R after seizures, CamK-CB1 mice (n=17) were used. These mice have a well-described expression pattern of the CB1Rs in the analyzed brain areas, e.g. hippocampus. CamK-CB1 mice were purchased from Jackson Laboratory and bred at the Max-Planck Institute of Biochemistry (Martinsried, Germany) before transferred to the institute, weighing 21-25 g. Mice were held under controlled environmental conditions (24-25°C; humidity 50%-60%; 12 h light/dark cycle) with food and drink ad libitum. Electrode (diameter 280µm) was implanted into the right amygdala, with stereotaxic coordinates AP -1.2, L +3.5, DV -5.2.

Briefly, kindling was performed daily via electrical stimulation, 5 times per week. Seizure severity was scored according to the Racine scale (Racine 1972) and duration defined as visually determined time period of limbic and/or motor seizure (McNamara, 1980). In total, 10 electrical stimulations were applied. Animals were grouped in either a non-seizure (n=8) or seizure (n=9) group. Six days after the last kindled seizure, mice were sacrificed.

Immunohistochemistry

After perfusion, brains were cut in 40 µm thick coronal slices with a microtome (Frigomobil, Reichert-Jung; Heidelberg-Nußloch, Deutschland) and stored into cryoprotectant solution



(glycerol and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 1:1 in volume) at -80 °C. For immunostaining of CB1R, free-floating slices were washed with TBS, unmasked in Sodium Citrate (pH 9) at 90°C for 20 minutes, washed again and treated with a goat blocking solution. Slices were then treated with polyclonal rabbit anti-CB1 antibody (1:500; ABCAM, Cambridge, UK) for two days at 4°C. After washing with TBS + 0,05% Tween20, incubation for one hour at room temperature in biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (1:400; Jackson Immunoresearch Laboratories West Grove, Pennsylvania, USA) and washing (TBS + 0,05% Tween20) followed. Slices were put for 20 min in 3% H2O2, washed with TBS and Tween again. Additionally, incubation for 1 hour at room temperature in Streptavidin/HRP (1:4000; Dianova Hamburg, Germany), rinse in DAB-Kit and TBS washing and mounting in chrome-gelatin were performed. Slides were air-dried overnight and cover slipped with xylol and Entellan.

Image analysis & statistics

Positive cells in hippocampus were analyzed on a computer image analysis system. Hardware consisted of an Olympus BH2 microscope with Plan-Neofluar objective (Zeiss, Göttingen, Germany), CCD color camera (Axiocam; Zeiss, Göttingen, Germany) and AMD AthlonTM 64 processor-based computer with image capture interface card (Axiocam MR Interface Rev.A; Zeiss, Göttingen, Germany). Images were 1388x1040 and processed with KS400 image analysis software (Windows Release 3.0; Carl Zeiss Vision, Halbergmoos, Germany). In order to exclude background signal, spatial calibration was done and signal threshold value was set for each analyzed brain regions CA1, CA3 and DG. The polymorphic layer of the dentate gyrus was only analyzed qualitatively and descriptively due to very weak CB1R staining.

To compare the hippocampal regions of kindled and non-kindled animals, unpaired student's T-test was performed.

Results

The CB1R staining holds in the cell membrane, and leaves the neuronal somata unstained. In non-kindled CamK-CB1 WT mice, CB1Rs are densely expressed in the Ammon's horn, mostly in the stratum pyramidale in both CA1 and CA3 regions. Stratum radiatum expressed a lower density than the stratum oriens. The molecular layer in the dentate area, especially the inner third, is intensely lightened, in contrast to the granule cell layer, which appeared as a translucent band. The polymorphic layer of the DG showed weak staining. At the junction between the granule cell layer and the polymorphic layer many highly immunoreactive neurons were found.

In mice with seizures, the hippocampus showed a much stronger CB1R immunostaining. Especially the CA1- and CA3-region revealed an increase in CB1R expression of 316% ($p=0.0273$; Fig 1C, →

1D) and 371% ($p = 0.0231$; Fig 1E, 1F) respectively (Fig. 1A). In the DG CB1R expression in the molecular layer tended to be elevated with an average of 271% ($p=0.069$; Fig 1A, 1G, 1H), whereas CB1R expression in the polymorphic layer was not altered. Thus, seizures in mice seem to increase the amount of CB1Rs in the pyramidal cell layer of the hippocampus.

Discussion

Regions of the Ammon's horn are mainly filled with pyramidal neurons, with a mostly excitatory network in the pyramidal cell layer. The increase of the CB1R is thus found predominantly in glutamatergic cells. In The polymorphic layer, where GABA-ergic interneurons are located, no significant difference was found. Hence, seizures tend to increase CB1R density in the excitatory neurons. Similar findings have been reported in both mouse models and in human patients (Maglóczy et al., 2010; Karlocai et al., 2011; Bojnik et al., 2012). Upregulation of the CB1Rs at glutamatergic neurons may be a compensatory mechanism, in which activation and eventually neurotransmitter release gets downregulated due to a stronger negative feedback loop of the ECS. As stated earlier, this mechanism might serve as a protective endogenous mechanism (Marsicano et al., 2003; Wallace et al., 2003; Monory et al., 2006). However, Falenski et al. (2009) and Wyeth et al. (2010) found a reduced expression of CB1Rs in some neuronal subpopulations. The difference could be due to the differences in epilepsy models (electric versus chemical). →

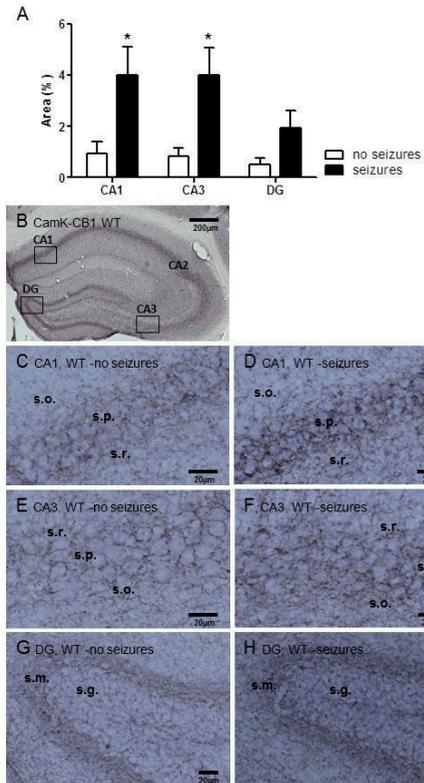


Figure 1. Differences in CB1R expression between CamK-CB1 WT with or without seizures.
A. Expression of immunostained CB1R in percentages in CA1, CA3 and Dentate Gyrus (DG) with or without seizures. Both CA1 and CA3 show a strong increase in expression density with 316% and 371% respectively, whereas DG showed a tendency towards an increase.
B. Overview of the hippocampus in CamK-CB1 WT mice. **C-H.** Expression of CB1 receptor in mice with (D,F,H) or without (C,E,G) seizures in CA1, CA3 and DG. Immunostaining is more intense in mice with seizures, indicating higher number of CB1R.

We showed upregulation of the CB1R at most likely glutamatergic synapses in the hippocampus after kindling-induced seizures. This mechanism might be a protective alteration. More insights in underlying processes and alterations may help to get a good understanding of the epileptic pathophysiology. This can lead to more specific and better medicinal and pharmacological approaches for epileptic patients.

References

■ Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy -- a review. *Epilepsy Res* 2009; 85:31-45



- Bojnik E, Turunc E, Armagan G, Kanit L, Benyhe S, Yalcin A, Borsodi A. Changes in the cannabinoid (CB1) receptor expression level and G-protein activation in kainic acid induced seizures. *Epilepsy Res* 2012; 99:64-68
- Browne TR, Holmes GL. *Epilepsy*. *N Engl J Med* 2001; 344:1145-1151
- Chin J, Scharman HE. Shared cognitive and behavioral impairments in epilepsy and Alzheimer's disease and potential underlying mechanisms. *Epilepsy Behav* 2013;26(3):343-51
- Echegoyen J, Armstrong C, Morgan RJ, Soltesz I. Single application of a CB1 receptor antagonist rapidly following head injury prevents long-term hyperexcitability in a rat model. *Epilepsy Res*, 2009; 85:123-127
- Ekenstedt KJ, Patterson EE, Mickelson JR. *Canine Epilepsy Genetics*. *Mamm Genome* 2012; 23:28-39
- Falenski KW, Carter DS, Harrison AJ, Martin BR, Blair RE, DeLorenzo RJ. Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB1 receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 2009; 25;64-72
- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25:295-330
- Karlocai MR, Toth K, Watanabe M, Ledent C, Juhasz G, Freund TF, Maglóczy Z. Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy. *PLoS One* 2011; 6:e27196
- Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*, 2008; 14:923-930
- Kow RL, Jiang K, Naydenov AV, Le JH, Stella N, Nathanson NM. Modulation of pilocarpine-induced seizure by cannabinoid receptor 1. *PLoS One* 2014;9:e95922
- Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. *Drug-Resistant Epilepsy*. *N Engl J Med* 2011; 365:919-926
- Ludányi A, Eröss L, Czirják S, Vajda J, Halász P, Watanabe M, Palkovits M, Maglóczy Z, Freund TF, Katona I. Downregulation of the CB1 Cannabinoid Receptor and Related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2008; 28:2976-2990
- Maglóczy Z, Tóth K, Korlócai R, Nagy S, Eross L, Czirják S, Vajda J, Rásonyi G, Kelemen A, Juhos V, Halász P, Mackie K, Freund TF. Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia* 2010; 51:115-120
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad C, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglerberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 2003; 302:84-88
- McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG. The kindling model of epilepsy: a review. *Progress in Neurobiology* 1980; 15:139-159



- Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F. Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, 2013; 138:18-37
- Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Doring M, Klugmann M, Wolfel B, Dodt HU, Zieglgansberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 2006; 51:455-466
- Moreira FA, Aguiar DC, Terzian ALB, Guimaraes FS, Wotjak CT. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety – two sides of the coin? *Neuroscience*, 2012; 204:186-192
- Picot MC, Baldy-Moulinier M, Daures JP, Dujols P, Crespel A. The prevalence of epilepsy and pharmacoresistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia* 2008; 49:1230-1238
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci*, 2003; 4:873-884
- Pitkänen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 2009; 14:16-25
- Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9):18284-318
- Rüdén EL, von, Avemary J, Zellinger C, Algermissen D, Bock P, Beineke A, Baumgärtner W, Stein VM, Tipold A, Potschka H. Distemper virus encephalitis exerts detrimental effects on hippocampal neurogenesis. *Neuropathology and applied Neurobiology* 2012; 38:426-442
- Wallace MJ, Blair Re, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol. Exp Ther.* 2003; 307:129-137
- Wyeth MS, Zhang N, Mody I, Houser CR. Selective reduction of cholecystokinin-positive basket cell innervation in a model of temporal lobe epilepsy. *J neurosci* 2010; 30:8993-9006



Pharmakologische Charakterisierung therapeutisch eingesetzter Opioide anhand der klonierten caninen Opioidrezeptoren

Verena Stössel, Christian Zenner

am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

Ziel/Aufgabenstellung

Opioidanalgetika können eingeteilt werden in natürliche oder halbsynthetische Opioide vom Morphin-Typ, in synthetische Opioide vom Piperidin-Typ und in gemischte Agonisten/Antagonisten. Vor allem letztere Gruppe weist zum Teil stark abweichende speziesspezifische Unterschiede in ihrer Wirkung auf. So wird BUTORPHANOL als Agonist am κ -Opioidrezeptor (OPRK1) und Antagonist am μ -Opioidrezeptor (OPRM1) beschrieben. Da κ -Agonisten beim Menschen eine Dysphorie auslösen und Butorphanol bei drogenabhängigen Patienten durch seine antagonistische Wirkung am OPRM1 Entzug auslöst, unterliegt es nicht den betäubungsmittelrechtlichen Bestimmungen. Es wird daher seit einigen Jahren vermehrt in der Tiermedizin eingesetzt. Die Verträglichkeit und Wirksamkeit von Butorphanol variiert dabei erheblich je nach Schmerzart und Spezies. So ist Butorphanol beim Pferd gut verträglich und aufgrund seiner ausgezeichneten Wirksamkeit bei viszeralen Schmerzen zur Linderung starker Kolikschmerzen geeignet. Diese Schmerzart wird durch OPRK1 an den viszeralen Afferenzen (Dehnungsrezeptoren an der glatten Muskulatur) vermittelt. Beim Hund dagegen besitzt Butorphanol lediglich eine sedative Komponente. Es ist weder bei viszeralen noch bei traumatischen Schmerzen ausreichend analgetisch wirksam. Beim Hund wird es daher zur Sedation und Narkoseprämedikation in Kombination mit sedativ-hypnotischen Analgetika (z.B. Medetomidin) eingesetzt. Bei der Katze wiederum ist Butorphanol gut verträglich, da ihm die exzitatorische Komponente der μ -Agonisten fehlt. Auch BUPRENORPHIN besitzt bei den einzelnen Spezies unterschiedliche Wirkeigenschaften. Obwohl es beim Menschen als partieller Agonist am OPRM1 und Antagonist am OPRK1 klassifiziert ist, weist es beim Hund eine gute analgetische Wirksamkeit bei Weichteiloperationen aus. Um eine Erklärung für die genannten speziesspezifischen Unterschiede der Opioidanalgetika zu finden, haben wir im letzten Jahr begonnen, die Opioidrezeptoren von Hund und Pferd zu klonieren und die verschiedenen therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika funktionell zu charakterisieren. Im abgelaufenen Jahr haben wir uns insbesondere mit dem OPRK1 des Hundes beschäftigt.

Experimenteller Ablauf und Ergebnisse

Wie im letzten Jahr vorgestellt, gestaltete sich die Klonierung der Rezeptoren als schwierig, da das Genom der beiden Spezies nicht vollständig annotiert ist. In diesem Sommer ist es uns jedoch gelungen, den OPRK1 des Hundes aus einer cDNA Präparation des Hypothalamus erfolgreich zu klonieren.

1. Klonierung des OPRK1 aus dem Gehirn:

Die besondere Schwierigkeit bei der Klonierung des OPRK1 lag darin, dass in der von einem Boxer stammenden genomischen Sequenz das 4. Exon des Rezeptorgens fehlt. Dieses wurde schließlich mit Hilfe von degenerierten Primer aus der 3'UTR vervielfältigt. Die Basenabfolge des erhaltenen Fragments wurde mittels Doppelstrangsequenzierung von der Fa. MWG Eurofins, Ebersberg, entschlüsselt. In Abbildung 1 ist die klonierte cDNA des OPRK1 dargestellt. Durch Vergleich des translatierten Proteins mit den Rezeptoren von Mensch und Maus fallen in der Tat deutliche Unterschiede auf. Die Aminosäurevariabilität im N-Terminus könnte auf Unterschiede in der Bindung von Peptidliganden, aber auch im intrazellulären Transport zur Zellmembran hindeuten. Unterschiede innerhalb der 7 transmembranen Domänen könnten die Affinität und intrinsische Aktivität von „small molecule“-Liganden beeinflussen, während die Unterschiede am C-Terminus Auswirkungen auf die Agonist-vermittelte Regulation des Rezeptors, also die Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit, besitzen könnten.

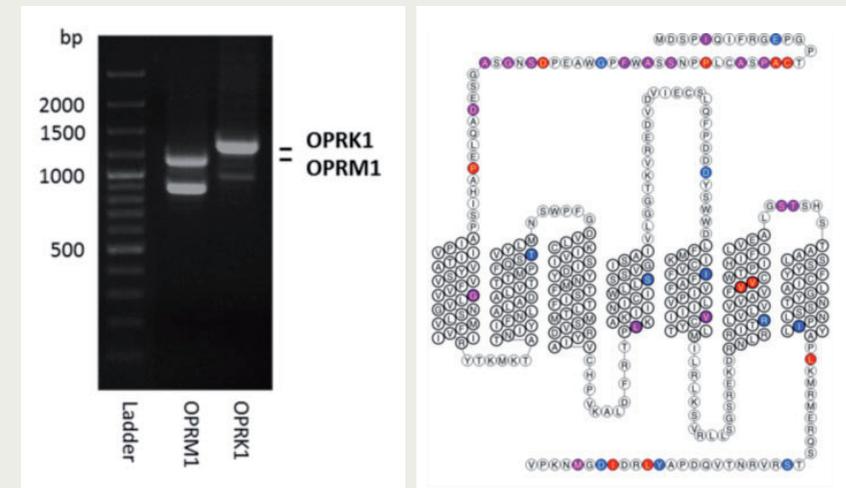


Abbildung 1: Links: Auf der rechten Spur des Agarosegels ist die klonierte cDNA des caninen OPRK1 dargestellt. Das Fragment besitzt eine Länge von 1323 bp. In der mittleren Spur wurde im Vergleich dazu ein noch unvollständiges Fragment des OPRM1 aufgetragen. Rechts: Hier ist die translatierte Primärsequenz des OPRK1 als Snake-Plot dargestellt. Aminosäureunterschiede zum Menschen sind in Rot, zur Maus in Blau und zu Mensch und Maus in Violett markiert.

2. Bestimmung der funktionellen Aktivität des OPRK1 nach transienter Expression in COS-7 Zellen:

Für die funktionellen Untersuchungen wurde der Rezeptor in COS-7 Zellen exprimiert. Hierzu wurde die cDNA des Rezeptors zunächst in den eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1 der Fa. Life Technologies, Darmstadt, in die beiden Schnittstellen Not1 und Xba1 der „multiple cloning site“ eingebaut. Die Plasmide wurden anschließend in *E. coli* vervielfältigt und für die Transfektion mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Bei den COS-7 Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze, die das T-Antigen für die extranukleäre Replikation von SV40-haltigen Plasmiden enthalten. Diese Zellen eignen sich hervorragend zur heterologen Expression größerer Proteinmengen. Weiterhin besitzen diese Zellen nur eine einzige definierte Isoform der Adenylatzyklase (AC9), die durch inhibitorische Rezeptoren regulierbar ist. Sie stellen deshalb ein ideales Werkzeug dar, die Regulation der intrazellulären cAMP Produktion durch Opioidrezeptoren zu untersuchen.

Für die eigentlichen Untersuchungen wurden COS-7 Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät und am nächsten Tag mit 10 µg Plasmid-DNA transfiziert. Als Transfektionsvermittler wurde Metafectene® der Fa. Biont, Martinsried, verwendet. Dieses baut Plasmid-DNA in Liposome ein, die mit der Plasmamembran verschmelzen und so die DNA in die Zellen einschleust. Die Zellen wurden für einen weiteren Tag inkubiert und dann auf 24-Well Mikrotiterplatten umgesetzt. Nach weiteren 2 Tagen wurde die durch Opiode vermittelte Regulation der Adenylatzyklase bestimmt. Hierfür wurden die Zellen zunächst 3 x mit Medium gewaschen und anschließend für 15 min bei 37°C in Gegenwart steigender Konzentrationen der verschiedenen Opiode inkubiert. Die Bestimmung der cAMP Produktion erfolgte in Anwesenheit von Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase. Durch die vermehrte Produktion von cAMP lässt sich der Opiodeffekt besser darstellen. Folgende Opiode wurden verwendet: U50,488, ein selektiver κ 1- und κ 2-Agonist, der als „Goldstandard“ für einen vollen Agonisten am OPRK1 gilt. Analog dazu hätte man auch den endogenen Liganden Dynorphin A verwenden können, der jedoch aufgrund seiner peptidergen Struktur weniger gut für in-vitro Untersuchungen geeignet ist. Weiter wurden Morphin und Butorphanol, beides Agonisten am OPRK1 und Buprenorphin, ein Antagonist am OPRK1 verwendet. Nach dem Abstoppen der Reaktionen mit 1 N HCl wurde das gebildete cAMP mit Essigsäureanhydrid acetyliert und anschließend im ELISA bestimmt. Dieser stand am Institut zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt: →

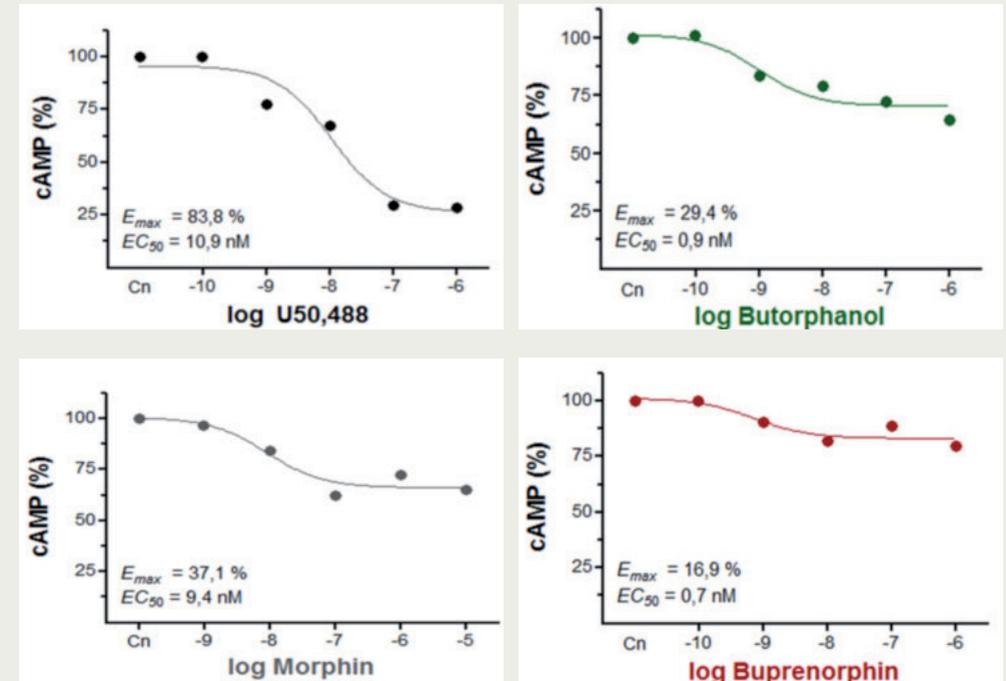


Abbildung 2: Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP Produktion durch U50,488, Morphin, Butorphanol und Buprenorphin. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism“ der Fa. Statcon, Witzenhausen, ausgewertet und als Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

Die Inkubation von COS-7 Zellen mit steigenden Konzentrationen von U50,488 führt zu einer dosis-abhängigen Hemmung der cAMP Produktion um ca. 83%. Dies stellt in diesem System die maximale Wirksamkeit (Efficacy) eines Opioids dar, die für einen vollen Agonisten charakteristisch ist. Die Wirkstärke aller anderen Opiode wird auf diesen Wert bezogen. Die Wirkstoffkonzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung der cAMP Produktion erreicht wird, ist ein Maß für die Wirkpotenz. Diese liegt für U50,488 bei ca. 10 nM. Im Vergleich dazu vermag Morphin die cAMP Produktion lediglich um ca. 37% zu hemmen. Morphin stellt daher einen partiellen Agonisten dar, der selbst in höchsten Konzentrationen nicht dieselbe Wirksamkeit am Rezeptor →

Verena Stössel, Christian Zenner

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie (AG Ammer)

Einleitung

Opiode weisen zum Teil stark abweichende speziesspezifische Unterschiede in ihrer Wirkung auf. So wird z.B. BUTORPHANOL beim Pferd zur Linderung starker Kolikschmerzen eingesetzt. Beim Hund dagegen ist es bei viszeralen Schmerzen nur schwach wirksam und wird bei dieser Spezies lediglich zur Sedation und Narkoseprämedikation in Kombination mit sedativen Analgetika (α_2 -Adrenergika) verwendet. Beim Menschen löst Butorphanol eine starke Dysphorie und Übelkeit aus. BUPRENORPHIN dagegen soll beim Menschen als Antagonist am OPRK1 wirken, besitzt beim Hund jedoch eine gute analgetische Wirkung bei Weichteiloperationen. Ziel des Projektes war es daher, speziesspezifische Unterschiede in der Wirkung von Opioiden anhand der klonierten Opioidrezeptoren zu beschreiben.

wie U50,488 ausbildet. Butorphanol weist eine dem Morphin vergleichbare Wirksamkeit auf. Es kann die cAMP Produktion um ca. 30% hemmen. Es stellt daher wie Morphin einen partiellen Agonisten am OPRK1 dar, was seine nur mäßige Wirksamkeit beim Eingeweideschmerz des Hundes erklärt. Buprenorphin dagegen besitzt kaum inhibitorische Wirkung, es besitzt aber die höchste Wirkpotenz, die bei ca. 0,7 nM liegt. Dies weist auf einen ausgeprägten Antagonismus am OPRK1 hin.

Zusammenfassung/Ausblick

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der klonierte OPRK1 des Hundes funktionell aktiv ist und sich das verwendete Zellsystem für die Expression der Rezeptoren eignet.

Mit den exprimierten Rezeptoren des Hundes steht nunmehr ein Testsystem zu Verfügung, das eine umfassende Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften der therapeutisch eingesetzten Opiode ermöglicht. Für die Zukunft haben wir daher noch viel Arbeit vor uns. Wir möchten unter Einbeziehung weiterer Opiode noch vergleichbare Dosis-Wirkungskurven für den OPRM1 des Hundes sowie für die beiden Rezeptoren des Menschen erstellen. Erst dann können wir eine Aussage über mögliche speziesspezifische Wirkunterschiede treffen. Die ersten Ergebnisse sind aber schon vielversprechend, so dass wir uns auf die weiteren Aufgaben freuen.

Danksagung

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



Experimenteller Ablauf und Ergebnisse

1. Klonierung des κ -Opioidrezeptors (OPRK1) aus dem Gehirn:

Strategie: RT-PCR mit Primern, abgeleitet von der genomischen Sequenz



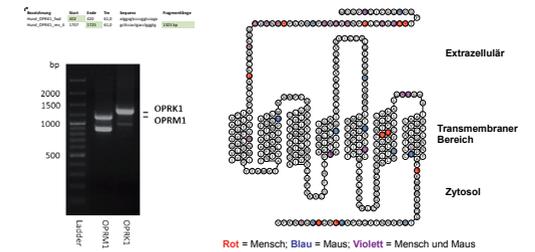
Probleme:

- Unvollständige Annotierung des Genoms
- 4. Exon fehlt
- Rassespezifische Unterschiede (SNPs)

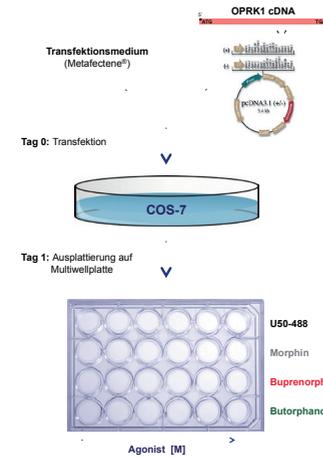
Lösung:

Bestimmung der Sequenz des 4. Exons durch Sequenzvergleich und Ableitung spezifischer Primer aus der 3' UTR.

Abbildung 1: Klonierung des caninen OPRK1 und speziesspezifische Unterschiede in der Primärsequenz

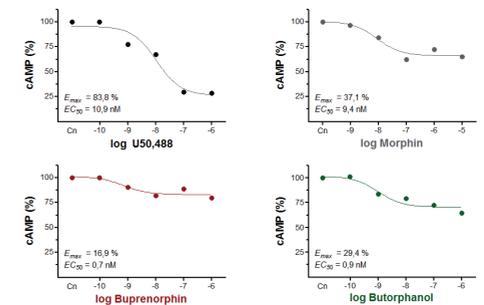


2. Bestimmung der funktionellen Aktivität des OPRK1 nach transienter Expression in COS-7 Zellen:



Tag 3: Stimulation der Zellen für 15 min. bei 37°C mit steigenden Konzentrationen verschiedener Opiode in Gegenwart von Forskolin und nachfolgende Bestimmung des gebildeten cAMP im ELISA.

Abbildung 2: Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP Produktion durch Opiode



Quellenverzeichnis

1. Receptor database of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR). <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamiliesForward?type=GPCR>.
2. Jørgen S. Mikkelsen et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature 438: 803-819
3. Zhu J et al. (1997) Activation of the cloned human kappa opioid receptor by agonists enhances [³⁵S]GTPγS binding to membranes: determination of potencies and efficacies of ligands. J Pharmacol Exp Ther. 1997; 282:676-84.
4. Ghazagouzou P et al. (2006) Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors. BMC Pharmacol. 25:3-10.

Danksagung

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

Generierung der vier ERBB4-Isoformen und ihre Klonierung in Expressionsvektoren für *in vitro* und *in vivo* Studien

Andreas Öhm

am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Betreuer: Herr Dr. Dahlhoff

Der ERBB4-Rezeptor, ein Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinase-Gruppe, wird in vielen verschiedenen Organen und Geweben exprimiert. Während die Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen, zellwandständige Rezeptoren mit intrazellulärer Tyrosinkinase-Domäne, die u.a. am Zellwachstum beteiligt sind, bereits seit längerer Zeit bekannt ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob es sich bei *ERBB4* um ein Onkogen oder einen Tumorsuppressor handelt.

Mittlerweile ist bekannt, dass ERBB4 durch alternatives *Splicing* gewebespezifisch in vier verschiedenen Isoformen exprimiert werden kann. Die Isoform JMa kann durch *tumor necrosis factor alpha converting enzyme* (TACE), im juxtamembranen Bereich des Rezeptors, in eine extrazelluläre Domäne (ECD) und durch γ -Sekretasen in eine intrazelluläre Domäne (ICD) gespalten werden.

Die Isoform JMb hat durch alternatives *Splicing* diese Schnittstellen verloren und kann nicht in die entsprechenden Domänen gespalten werden.

Die ICD kann in den Zellkern gelangen und selbst als Transkriptionsfaktor fungieren, oder mit solchen interagieren. Interessant für die Bedeutung des ERBB4-Rezeptors in der Tumorgenese ist, dass die ICD das Tumorsuppressorprotein TP53 durch Phosphorylierung stabilisieren kann. Die zwei möglichen ICDs, resultierend aus den Splice-Varianten JMa-CYT1 und JMa-CYT2, scheinen z.B. im Brustgewebe unterschiedliche Aufgaben wahrzunehmen: ICD-CYT1 reduziert die Proliferation und ICD-CYT2 steigert die Proliferationsrate. Die Isoform JMa-CYT2 ist bei Brusttumoren häufig überexprimiert. Die gewebespezifische, unterschiedliche Expression der einzelnen Splice-Varianten könnte die kontroversen Ergebnisse erklären, die ERBB4 mal als Tumorsuppressor und mal als Onkogen identifizieren.

In diesem Forschungsprojekt ging es darum, die vier möglichen Isoformen des ERBB4-Rezeptors zu isolieren und jeweils in einen ubiquitären Expressionsvektor (pEGFP-C1 bzw. pCAGGS), überzuexprimieren.

Dazu wurde zunächst die RNA einer humanen Kolonzellkarzinom-Zelllinie mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Aus der produzierten cDNA wurde mit Hilfe einer PCR versucht, die *ERBB4*-cDNA zu amplifizieren. Das PCR-Produkt wurde über ein Gel aufgereinigt und eluiert.

Nun sollte das PCR-Produkt (ca. 4000 bp) in einen geeigneten Vektor kloniert werden.

Als Vektor wurde das Plasmid pSC-B-amp/kan verwendet. Im Bereich der *Blunt PCR Product Insertion Site*, die das Gen *LacZ* beinhaltet, wurde das PCR Produkt ligiert, und das Plasmid



in einen genetisch modifizierten Stamm von *E. coli* transformiert.

Die Bakterien wurden dann auf einem mit X-Gal versetzten Nährmedium (mit Ampicillin) kultiviert.

LacZ codiert das Enzym β -Galaktosidase, das das farblose X-Gal in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol spaltet. Letzteres wird unter Sauerstoffeinfluss zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert, was dann tiefblau erscheint.

Diesen Mechanismus macht man sich zunutze, um bei Abwesenheit des blauen Farbstoffes von der Abwesenheit von β -Galaktosidase auszugehen und somit darauf zu schließen, dass entsprechend weiß/farblos gebliebene Kolonien das Plasmid mit dem PCR-Produkt aufgenommen haben. Im nächsten Schritt wurden farblose Kolonien gepickt und diese über Nacht in Nährmedium mit Ampicillin inkubiert, um dann deren DNA zu isolieren.

Die isolierten Plasmide wurden mit einem Restriktionsenzym verdaut, mit *EcoRI*, um festzustellen, ob das PCR-Produkt tatsächlich aufgenommen wurde. Dann erfolgte eine Gelelektrophorese. Bei Erfolg sollten 3 Banden erscheinen, bei 4000 bp (Plasmid), 3000 bp (1. Teil des PCR-Produktes), 1000 bp (2. Teil des PCR-Produktes), wie in den Reihen 8 und 10 zu erkennen, was auf die Aufnahme des PCR-Produktes in den entsprechenden Bakterienklonen hinweist.

Ein weiterer Verdau, diesmal mit *XhoI*, sollte klären, wie das PCR Produkt eingebaut wurde. Da *XhoI* im Plasmid kurz vor der Insertionsstelle schneidet und auch im Produkt selbst, stellte eine Bande von ca. 1000 bp Länge dieses herausgeschnittene Fragment dar.

Die beiden Klone wurden mittels PCR auf ihre Isoform hin überprüft.

Die erscheinenden Banden ließen erkennen, dass es sich um die Isoform JMa-CYT1 handelt. Das PCR Produkt wurde nun in den Expressionsvektor (pEGFP-C1) kloniert. Dafür wurden die Plasmide der beiden Klone mit *EcoRV*, *SacII* und *PvuI* verdaut und der Expressionsvektor mit *SacII* und *SmaI*.

Das PCR-Produkt wurde mit dem geöffneten Expressionsvektor ligiert und anschließend in *E. Colis* transformiert. Ein *XhoI*-Probeverdau sollte klären, ob das PCR-Produkt in den Expressionsvektor eingefügt wurde.

Bevor nun die Generierung der anderen Isoformen beginnen sollte, wurden die Plasmide sequenziert.

Beim Sequenzieren der Probe fielen ca. 85 Basenpaare in der Sequenz auf, die normalerweise nicht da sein sollten. Bei dieser cDNA handelt es sich wahrscheinlich um eine fehlerhafte mRNA, die hochwahrscheinlich noch vor der Translation abgebaut wird. Die zusätzlichen Basen führen zu einem Frameshift, was ein Nonsensprotein entstehen lässt. Eventuell liegt es auch in der Natur der Tumorzelllinie, dass eine fehlerhafte mRNA des *ERBB4*-Gens transkribiert wird, um so eine Expression von ERBB4 zu verhindern.

Dadurch könnte auch erklärt sein, dass das Gewinnen und Klonieren des Gens gewisse Schwierigkeiten bereitet hatte.

Da sich die Karzinom-Zelllinie als sehr hartnäckig herausgestellt hatte, sollen die Experimente zur Isolierung der 4 Isoformen des humanen ERBB4 mit neuer cDNA aus einer anderen Quelle wiederholt werden. ERBB4 wird sehr stark in Neuronen exprimiert, weshalb cDNA aus einer humanen Gehirnbioptie verwendet werden soll. Die entsprechende Probe sollte dabei nicht von einem erkrankten Individuum stammen.

Vergleichende osteometrische Analyse von Greifvogelmumien aus der unterirdischen Tiernekropole von Tuna el-Gebel, Mittelägypten

Ursula Mutze

am Institut für Paläoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin und am Institut für Ägyptologie

Betreuer: Herr Univ. Prof. Dr. med. vet. habil. Peters, Frau PD Dr. med. vet. Goebel, Frau Dr. med. vet. Schwarzenberger, Frau Dr. phil. Pöllath und Herr Kessler

Die Fundstelle

Im mittelägyptischen Tuna el-Gebel befindet sich der Friedhof der antiken Stadt Hermopolis magna. Zwischen dem 6. Jahrhundert v. Chr. und dem 3. Jahrhundert n. Chr., also während einer Nutzungsdauer von ca. 700 Jahren, wurden in unterirdischen Galerien über eine Million mumifizierte Tiere bestattet. Es handelt sich ganz überwiegend um Heilige Ibisse (*Threskiornis aethiopicus*), aber auch verschiedene Haus- und Wildsäugetiere, Reptilien, Fische und 90 Arten von Wildvögeln, darunter viele Tag- und Nachtgreifvögel, sind vertreten.

Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Geschlechterverhältnisse bei den verschiedenen Greifvogelarten im Fundgut. Der Sinn dieser Untersuchung liegt darin, möglicherweise zu erkennen, ob es sich bei den mumifizierten Tieren um einen zufälligen Querschnitt aus der Wildpopulation dieser Arten handelt, oder ob unter bestimmten Kriterien eine Auswahl getroffen wurde.

Methodik

Die Geschlechtsbestimmung basiert auf der Tatsache, dass bezüglich der Körpergröße bei Greifvögeln ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Geschlechtsdimorphismus besteht, dergestalt, dass die Weibchen größer sind, als die Männchen. Es wurden die bereits vorliegenden Maße der Greifvogelknochen aus dem Fundgut verwendet, sowie rezente Skelette aus der „Staatssammlung für Anthropologie und Paläoanatomie München“ vermessen (nach von den Driesch 1976). Zunächst wurden einfache Streudiagramme erzeugt, indem ein Breitenmaß mehrerer Exemplare eines Skelettelements, z.B. mehrerer Humeri, gegen deren jeweilige größte Länge aufgetragen wurde. Die Knochen, die von männlichen Tieren stammen, sind, weil sie kleiner sind, in einem solchen Diagramm unten links zu finden, während sich die größeren Knochen der weiblichen Tiere eher oben rechts darstellen. Im Idealfall ergeben sich zwei deutlich voneinander getrennte Punktwolken, die die männlichen und weiblichen Knochen darstellen, sodass das Geschlechterverhältnis sehr deutlich ersichtlich wird. Dies war beim Sperber (*Accipiter nisus*) der Fall, da dieser von den untersuchten Greifvogelarten bei weitem den ausgeprägtesten Sexualdimorphismus besitzt.



Bei den anderen Arten überschneiden sich die Punktwolken, sodass weitere Maßnahmen nötig waren.

Hier wurde der LSI (= Logarithm Size Index) verwendet (Simpson 1941). Der Hauptzweck dieser Methode besteht darin, die Maße verschiedener Skelettelemente miteinander vergleichbar zu machen, indem sie auf die Maße eines Referenzindividuums bezogen werden. Die Methode eignete sich daher auch besonders für die Arten, die im Fundgut nur in geringer Zahl vertreten sind. Ein weiterer Vorteil dieser Methode bestand darin, dass auch die Knochen miteinbezogen werden konnten, die zerbrochen waren und deren größte Länge daher nicht gemessen werden konnte, da für den LSI von jedem Knochen nur ein Breitenmaß verwendet wird.

Methodische Schwierigkeiten

- 1.) Da die Geschlechtsbestimmung auf dem Geschlechtsdimorphismus beruht, kann sie nur bei Vogelarten durchgeführt werden, bei denen dieser Dimorphismus einigermaßen deutlich ausgeprägt ist.
- 2.) Da die rezenten Vergleichskelette überwiegend aus Mitteleuropa stammen, sind sie bei vielen Arten durchschnittlich größer als die Skelette des ägyptischen Fundguts. Zum Teil handelt es sich sogar um unterschiedliche Unterarten, die sich nicht nur in der Größe, sondern auch in den Proportionen geringfügig unterscheiden können.
- 3.) Besonders erschwert wurde die Auswertung, wenn im Fundgut selbst unterschiedliche Unterarten vorhanden waren. Dies war beim Turmfalken (*Falco tinnunculus*) der Fall. Hier war aufgrund dieser Tatsache und aufgrund des geringen Geschlechtsdimorphismus keine Aussage über die Geschlechterverteilung möglich.
- 4.) Bei vielen Arten war aufgrund der äußerst geringen Stückzahl keine vernünftige Aussage über das Geschlechterverhältnis möglich.
- 5.) Von manchen Spezies waren keine oder deutlich zu wenige rezente Vergleichskelette vorhanden.

Ergebnisse

Von den 18 Greifvogelarten, die im Fundgut vertreten waren, wurden 9 nicht näher betrachtet, da sie offensichtlich in viel zu geringer Stückzahl vorlagen. Von den übrigen 9 Arten konnten bei 5 aufgrund der oben beschriebenen Probleme, besonders des zu geringen Geschlechtsdimorphismus, keine belastbaren Aussagen über die Geschlechterverteilung getroffen werden. Lediglich bei 4 Greifvogelarten konnten die Knochen mit ausreichender Sicherheit den Geschlechtern zugeordnet werden, sodass eine quantitative Aussage über das Geschlechterverhältnis möglich war.

Da die Knochen zum Zeitpunkt der Bergung großteils bereits nicht mehr als zusammengehörige →

Skelette vorlagen, sondern wild verstreut waren, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele weibliche und männliche Individuen vorliegen. Stattdessen wird angegeben, wie viele Knochen von männlichen und wie viele von weiblichen stammen:

	Knochen von männlichen Individuen	Knochen von weiblichen Individuen
Sperber (<i>Accipiter nisus</i>):	34	59
Rohrweihe (<i>Circus aeruginosus</i>):	33	11
Lannerfalke (<i>Falco biarmicus</i>):	25,5	14,5
Sakerfalke (<i>Falco cherrug</i>):	8	27

Bei Überschneidungen im LSI-Diagramm wurde die Schnittmenge auf die Geschlechter aufgeteilt. Dadurch entstanden die Kommazahlen.

Schlussfolgerung und Ausblick

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Geschlechterverhältnisse zum Teil sehr deutlich von dem vielleicht erwarteten 1:1-Verhältnis abweichen, und zwar in beide Richtungen. Im nächsten Schritt müssten nun die Geschlechterverhältnisse der einzelnen Spezies in freier Wildbahn ermittelt werden, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass dieses 1:1 beträgt. Erst dann könnte man darüber spekulieren, ob eine Auswahl bestimmter Individuen für die Mumifizierung stattgefunden hat.

Abschließend möchte ich mich beim gesamten Team des Instituts für Paläoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Alle hatten immer ein offenes Ohr und standen mir mit Rat und Tat zur Seite, was die Zeit am Institut für mich zu einer sehr schönen und wertvollen Erfahrung gemacht hat. ■

Rule outs für 20 Hauptsymptome (Buiatrik)

Theresa Greimel, Andreas Öhm, Lena van Buggenum, Catherine Gutfried, Svenja Gerbig, Dorothee Depka, Katharina Häffelin, Daniela Schmidle, Laura Kellermann, Hannah Linington, Denise Messerer

an der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Betreuer: Herr Dr. med. vet. Stadler und Frau Prof. Dr. med. vet. Knubben-Schweizer

Grundlage jeder Diagnostik und der daraus abgeleiteten Therapie ist die klinische Untersuchung. Für jeden der dabei erhobenen unphysiologischen Befunde gibt es verschiedene Ursachen, die zusammengenommen die Erstellung einer Differentialdiagnosenliste ermöglichen. Oft ist die Erstellung einer solchen Differentialdiagnosenliste in der Praxis insbesondere für Studierende und junge Assistierende jedoch schwierig. Der Umfang der aus der klinischen Untersuchung resultierenden Differentialdiagnosenliste, hängt wesentlich von der Erfahrung, aber auch dem Wissen des Untersuchenden ab. Ein wenig erfahrener Untersucher / eine wenig erfahrene Untersucherin wird nach der klinischen Untersuchung häufiger und ausführlicher die einschlägige Literatur heranziehen müssen als ein erfahrener Untersucher / eine erfahrene Untersucherin, um zur möglichst vollständigen Differentialdiagnosenliste zu kommen. Die Literatur schafft die Möglichkeit, sich Wissen anzueignen und Rat zu beziehen. Die überwiegende Anzahl der Lehrbücher ist jedoch so konzipiert, dass einzelne Krankheitsbilder behandelt werden und die im Rahmen der entsprechenden Krankheit auftretenden Symptome aufgeführt werden. Das bedeutet, dass das Lehrbuch de facto eine Diagnose schon vorlegt, also nicht ausgehend vom Symptom, sondern vielmehr von der Krankheit selbst.

Die Möglichkeit nach Symptomen zu einer Differentialdiagnosenliste zu kommen, ist im Praxisalltag von großem Wert, da damit viel Zeit gespart werden kann und die Wahrscheinlichkeit, eine Differentialdiagnose zu verpassen, auf ein Minimum reduziert wird.

Im Kleintierbereich sind seit einigen Jahren die „Rule-Outs für die Kleintiermedizin“ erhältlich und geben eine Übersicht wichtiger Differentialdiagnosen und ermöglichen eine systematische Aufarbeitung internistischer Fälle anhand klinischer Symptome. Somit wird den Studenten schon während des Studiums ein problemorientiertes Vorgehen an die Hand gegeben. Im Rahmen des Projektes „Rule-Outs in der Buiatrik“ soll nun derartiges auch für den Bereich der Inneren Medizin des Rindes (und auch der kleinen Wiederkäuer) geschaffen werden. Dabei geht die Hauptinitiative von einer studentischen Gruppe aus, die sich in Tandem verschiedener Leitsymptome annimmt, diese auf Grundlage der Standardliteratur ausarbeitet und dabei fachliche Betreuung durch klinisch tätige Oberärzte/-innen erhält.

Ganz bewusst wird Wert darauf gelegt, dass die Ausarbeitung der Rule-Outs aus studentischer Sicht erfolgt, um Studierenden und Berufsanfängern eine „Schritt-für-Schritt-Agenda“ zur Bearbeitung klinischer Befunde an die Hand zu geben.



Im vergangenen Jahr wurde ein Großteil der Leitsymptome bearbeitet (z. B. Ataxie, Abb. 1) bzw. befindet sich noch in Bearbeitung. Formal werden, in Anlehnung an die Rule-Outs im Kleintierbereich, Entscheidungsbäume erstellt, die eine visuell übersichtliche und logische Annäherung vom klinischen (Kardinal-)Symptom an mögliche Diagnosen erlauben.

Im Rahmen der Aufarbeitung wurde immer deutlicher, dass es wahrscheinlich nicht nur bei den ursprünglichen Leitsymptomen bleiben wird, sondern weitere in Betracht gezogen und aufgearbeitet werden müssen und auch so manches Symptom deutlich umfangreicher und mit mehr Aufwand verbunden war als erwartet.

Auch die Art und Weise der Veröffentlichung wurde mehrfach intensiv diskutiert.

Das Ganze sollte unkompliziert, übersichtlich und möglichst jederzeit verfügbar sein und die Kosten sollten sich so gering wie möglich halten. Nicht außer Acht gelassen werden darf dabei, dass eine gewisse Exklusivität für Veterinärmediziner auf jeden Fall zu bestehen hat.

Es ist in keinsten Weise beabsichtigt, Wissen in irgendeiner Form zurückzuhalten. In einer Zeit aber, in der Landwirte zunehmend informiert sind und auch zunehmend Kompetenzen an sie abgetreten werden, soll dem Tierarzt in Bezug auf Diagnose eine gewissen Monopolstellung zugestanden werden und vermieden werden, dass Landwirte mithilfe eines vorliegenden Rule-Outs-Buches in Eigeninitiative Diagnosen stellen und dem Tierarzt mehr oder weniger das Vorgehen diktieren bzw. den Tierarzt vielmehr als alleinigen Erfüller einer Dienstleistung sehen. Zum Zwecke der Veröffentlichung wurden verschiedene Formate in Erwägung gezogen, wobei eine eBook-Form von allen deutlich favorisiert wurde.

Leider war es vorerst nicht möglich, die Entscheidungsbäume in ein derartiges Format zu bringen, sodass nach momentanem Stand zunächst eine schrittweise Integration in das bereits bestehende Rinderskript (<http://www.rinderskript.net>), allerdings in einem passwortgeschützten Bereich, vorgenommen wird. Auch eine gebundene Herausgabe ähnlich wie die Kleintier-Rule-Outs wird in Erwägung gezogen.

Das Projekt soll auch im Rahmen einer Dissertation in Bezug auf Effizienz und Nachhaltigkeit in der Lehre evaluiert werden.

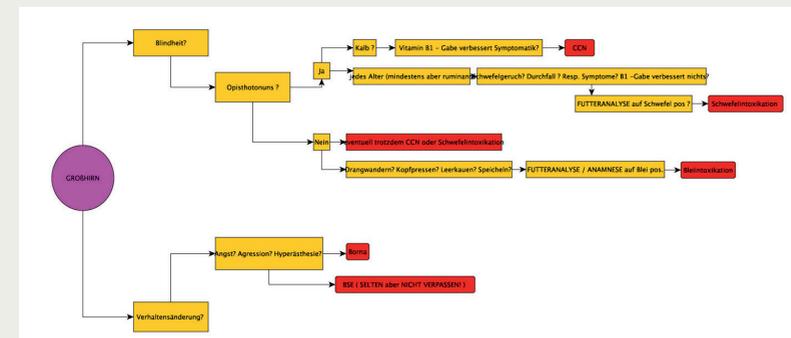


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Entscheidungsbaum Ataxie

Low-Fidelity-Simulator aus der Klinik für Schweine

Christopher Sommer
an der Klinik für Schweine
Betreuer: Frau Dr. med. vet. Übel und Frau Dr. med. vet. Zöls



Vom Tier zum Modell

Erstellen der Schweinemodelle

Schritt 1: Gipsabdruck vom Tierkörper

Der Tierkörper eines toten Schweines wurde vorbereitet und gelagert.



Abb. 1: Abformen der Körperpartien mit Gipsbinden

Schritt 2: Vorbereitung zum Ausgießen

Zur Erhöhung der Stabilität wurden weitere Gipsschichten aufgetragen bzw. die Ränder mit Plastilin verstärkt und Aussparungen mit Folie abgedichtet. Um Verklebungen zu verhindern wurde ein Trennmittel aufgesprüht.



Abb. 3: Verstärkung mit Plastilin

Schritt 3: Ausgießen mit Silikonmasse

Die aus zwei Komponenten bestehende, passend eingefärbte Silikonmasse wurde angerührt und in die Formen gegossen. Zur Steigerung der Stabilität der Modelle wurden Drahtverstreben in die Masse eingelegt.



Abb. 4: Ausgehärteter Silikonguss

Schritt 4: Lösen der Modelle aus der Form



Abb. 5: Aufbringen von Acryllack zur Stabilisierung der Gipsform vor dem Herauslösen des Modells

Schritt 5: Weiterer Ausbau der Modelle

Modell Venenpunktion:
Einbringen eines Schlauches zur Simulation der *V. jugularis externa* und Anschluss an ein Infusionsbesteck. „Blutfluss“ durch Infusionsbeutel mit rot gefärbter Flüssigkeit.



Abb. 6: Gefäßsimulation

Modell i.m. Injektion: Einbringen eines saugfähigen Materials.

Projekt 1

Konstruktion eines targeting Konstrukts zur Deletion von gamma/delta T Zellen im Haushuhn

Anke Moritz
am Institut für Tierphysiologie
Betreuer: Herr Dr. med. vet. Schusser

Projekt 2

Etablierung der Inkubation von Hühnerembryonen in surrogate Eischalen für die Injektion von genetisch modifizierten primordialen Keimzellen

Vanessa Rufle
am Institut für Tierphysiologie
Betreuer: Herr Dr. med. vet. Schusser



Projekt 1 – Schusser – Konstruktion eines targeting Konstrukts zur Deletion von gamma/delta T-Zellen im Haushuhn

Projekt 2 – Schusser – Etablierung der Inkubation von Hühnerembryonen in surrogate Eischalen für die Injektion von genetisch modifizierten primordialen Keimzellen

Das erlernte Immunsystem setzt sich aus der humoralen, antikörpervermittelten, und der zellvermittelten Immunantwort zusammen. Die zellvermittelte Immunantwort wird durch die T-Zellen vermittelt. Grundsätzlich lassen sich die T-Zellen in sogenannte alpha/beta und gamma/delta T-Zellen unterteilen. Während bei Mensch und Maus die gamma/delta T-Zellen nur eine kleine Population (5%) darstellen, finden sich in Huhn, Schwein und Wiederkäuer deutlich größere gamma/delta T-Zellpopulationen (bis zu 50% der Lymphozyten im Blut). Auch wenn bereits viele Funktionen unserer Lymphozyten entschlüsselt sind, ist bis heute noch immer wenig über die Bedeutung der gamma/delta T-Zellen bekannt. Im Mensch konnte gezeigt werden, dass bestimmte gamma/delta T-Zellen sich dem angeborenen Immunsystem und andere sich dem erlernten Immunsystem zuordnen lassen.

Wie zuvor erwähnt ist es jedoch außergewöhnlich, dass unsere landwirtschaftlichen Nutztierarten eine solch hohe Anzahl gamma/delta T-Zellen aufweisen. Die Bedeutung dieser hohen Anzahl gamma/delta T-Zellen ist bis heute ungeklärt. Bekannt ist nur, dass besonders im Rahmen von Infektionen ein Anstieg der gamma/delta T-Zellen zu beobachten ist und sich diese Zellen am Ort der Infektion finden.

Um die Bedeutung dieser Zellpopulation zu untersuchen würde es sich anbieten, die Zellen zu depletieren und die Reaktion von gamma/delta T-Zellen negativen Tieren auf die Infektion mit verschiedenen Pathogenen zu analysieren. In der Maus konnte durch einen knockout der gamma/delta T-Zellen im Vergleich zu einem knockout der alpha/beta T-Zellen gezeigt werden, dass diese Zellen eine wichtige Rolle in der Regulation der Darmintegrität im Rahmen von Infektionen übernehmen. Ob eine ähnliche Funktion in Huhn, Schwein und Rind vorliegt ist aufgrund fehlender Tiermodelle bisher unklar.

Durch die Möglichkeit genetisch veränderte Hühner mittels genetisch veränderten primordialen Keimzellen zu erzeugen, bietet sich nun die einmalige Gelegenheit einen knockout des gamma/delta T-Zellrezeptors zu erzeugen. In der Maus führte der Knockout desselben Rezeptors zu einer kompletten Deletion der gamma/delta T-Zellen.

Um den Rezeptor im Huhn auszuknocken bietet es sich an, das Gen der konstanten Region der gamma Kette zu deletieren, da diese im Gegensatz zur konstanten Region der delta Kette bisher nur einmal im Genom des Huhnes gefunden wurde. In Konsequenz kann es nicht zu einem vollständigen Rearrangement der gamma Kette des Rezeptors kommen und somit nicht zu einer Paarung mit der delta Kette. Damit der gamma/delta T-Zellrezeptor jedoch an die Zelloberfläche →

kommt, ist eine Paarung zwischen gamma und delta Kette unabdingbar. Tiere mit einem knockout der konstanten Region der gamma Kette des T-Zellerezeptors sollten demnach keine gamma/delta T-Zellen mehr aufweisen wenn dieser Rezeptor auch im Huhn für diese T-Zellpopulation essentiell ist.

Der Knockout der gamma Kette des T-Zellerezeptors wird auf dem Hintergrund der CB Inzucht-hühnerlinie erstellt. Dies hat mehrere Vorteile gegenüber einer Auszucht-hühnerlinie. Durch den extrem hohen Inzuchtgrad der CB Hühner sind diese Tiere überwiegend homozygot und das Klonieren eines targeting Konstruktes ist einfacher als in polymorphen Auszucht-hühnern. Weiterhin ist in CB Hühnern, durch den einheitlichen MHC, ein adoptiver Transfer von Zellen möglich. Dies bedeutet, dass zum Beispiel ein gamma/delta T-Zell knockout Huhn gezielt mit T-Zellen eines anderen Huhnes rekonstituiert werden kann. Dies ermöglicht eine noch detailliertere Charakterisierung der Bedeutung der gamma/delta T-Zellen im Huhn.

Im Rahmen dieses VetResearch Projektes wurde die Grundlage für den Knockout der konstanten Region der gamma Kette des T-Zellrezeptors gelegt. In einem ersten Schritt wurden Primer für die einzelnen Regionen des gamma T-Zell-Lokus des Huhnes anhand von publizierten Sequenzen designt und 11 Kilobasen des Lokus in mehreren PCR-Fragmenten amplifiziert, mittels TA-Klonierung kloniert und dann sequenziert. Auf diese Weise wurde die ganze, für den Knockout entscheidende, Region des gamma T-Zell-Lokus der CB Inzuchthühnerlinie kloniert und sequenziert. Nach einer detaillierten Analyse der erhaltenen Sequenzen konnte zum einen gezeigt werden, dass CB Hühner homozygot für diesen Lokus sind und zum anderen die Sequenz des gamma T-Zell-Lokus der CB Hühner charakterisiert werden.

Basierend auf der erhaltenen Sequenz wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt um ein targeting Konstrukt für die konstante Region der gamma Kette des T-Zellrezeptors zu erstellen. Zuerst wurde nun die 5' homologe Region (2kb) in den targeting Vektor kloniert. In weiteren Schritten wurde die 3' homologe Region (4kb) mittels overlap extension PCR zu einem Stück zusammengesetzt und dann mittels Gibson Assembly in den targeting Vektor kloniert. Der resultierende targeting Vektor beinhaltet eine selektierbare Markerkassette bestehend aus flankierenden LOXP Seiten, einem eGFP unter dem beta-actin Promoter und einer Puromycin-Resistenz unter dem CAG Promoter. Das resultierende Konstrukt wurde nochmals mittels Sequenzierung und Restriktionszymverdau auf seine Korrektheit überprüft und danach wurde die DNA für die Transfektion von primordiales Keimzellen präpariert und linearisiert.

In einem nächsten Schritt werden nun primordiales Keimzellen der CB Inzuchthühnerlinie mit dem im Rahmen dieses Projektes erstellten targeting Konstrukt transfiziert und nach Selektion mit Puromycin auf eine Deletion der konstanten Region der gamma Kette des T-Zellerezeptors hin überprüft.

Im Rahmen dieses Projektes war es dem Studenten möglich eine Vielzahl molekularbiologischer Techniken zu erlernen und vor allem auch eigenverantwortlich durchzuführen. Nach einer kurzen →

Einarbeitungsphase war es dem Studenten möglich selbständig an dem Projekt zu arbeiten. Dieses Projekt legt nun eine wichtige Grundlage für eine am Institut für Tierphysiologie in Bearbeitung befindliche Doktorarbeit.

Der nächste Schritt in der Erstellung von transgenen Hühnern und von knockout Hühnern ist die Kultivierung von sogenannten primordiales Keimzellen. Diese Zellen, welche die Eigenschaft besitzen in die Gonadenanlage zu wandern und sich dort zu Spermium oder Eizelle zu differenzieren, können nach einer genetischen Modifikation in der Zellkultur in Hühnerembryonen injiziert werden. Hierzu müssen die Embryo an Tag 3 der Inkubation aus dem Ei präpariert werden, die primordiales Keimzellen injiziert werden und im Anschluss die Embryonen zurück in die Ersatzschalen transferiert werden. Für die erfolgreiche Entwicklung des Embryos ist es von großer Bedeutung das Gewicht des Embryos auf die Größe der Ersatzschale abzustimmen. Weiterhin müssen die Inkubationsbedingungen für die sogenannten surrogates ermittelt werden. Im Rahmen dieses Projektes wurde die surrogate Technik in unserem Labor etabliert und Hühnerembryonen erfolgreich aus der Ersatzschale zum Schlupf gebracht.

Zur Realisierung dieses Projektes lag zunächst die Herausforderung darin, geeignete surrogate Eier zu finden. Die surrogate Eier müssen größer als die verwendeten Hühnerer sein, damit ein Transfer des Embryos und eine erfolgreiche Inkubation möglich sind. Da es sich als schwierig herausstellte große Doppel-Dotter-Eier zu beziehen wurde auf Puteneier ausgewichen. Die Puteneier wurden von einer Brüterei bezogen, welche die nicht befruchteten Puteneier zur Verfügung stellte. Nach Erhalt der Puteneier wurden diese gewogen und nach Größe geordnet. Ebenso wurden Bruteier der Hühnerlinie Lohmann selected leghorn (LSL) besorgt, gewogen und für drei Tage inkubiert. Zur Vorbereitung auf den Transfer des Hühnerembryos in das Putenei, wurde zunächst der spitze Pol des Puteneis mithilfe eines Dremels abgeschnitten und der Inhalt des Puteneis entfernt. Die surrogate Puteneier wurden stets frisch am Tag des Transfers präpariert und Verunreinigungen abgewaschen. Nach drei Tagen Inkubation wurden die LSL Eier für die Entnahme des Embryos vorbereitet. Hierzu wurde mithilfe des Dremels vorsichtig eine Sollbruchstelle in die Schale der bebrüteten LSL geschliffen. Unter Hilfe eines Skalpell konnte mittels leichten Hebelbewegungen das Hühnerer geöffnet werden und der Embryo inklusive Eigelb und Eiweiß in eine Wägeschale transferiert werden. Nach erfolgter Injektion der primordiales Keimzellen wurde nun der Embryo in die Puteneischale transferiert. Hierzu wurde eine aus Modelbauplastik gefertigte „Eierrutsche“ verwendet, um den Embryo ohne Verletzungen und Schädigung des Dotters in das surrogate Ei zu transferieren. Nach erfolgreichem Transfer wurde Penicillin/Streptomycin zugegeben um Kontaminationen vorzubeugen und das Putenei mit Frischhaltefolie verschlossen. Die Embryonen in Puteneier konnten nun in einen eigens gefertigten Inkubator überführt werden und bis Tag 21 inkubiert werden. Täglich wurden abgestorbene Embryonen aus dem Inkubator genommen, um einer Verunreinigung vorzubeugen. Ab Embryonaltag 21 →

wurden die Embryonen wiederholt kontrolliert und beim Schlupf unterstützt, da ein selbständiges Schlüpfen, aufgrund der verwendeten Frischaltefolie und der festen Puteneischale nicht möglich ist.

In den ersten Experimenten wurden noch recht niedrige Schlupfraten von ca. 30% der transferten Embryonen erreicht. Mit Zunahme der Erfahrung, der Verbesserung der „Eierrutsche“ und sorgfältigerer Präparation der surrogates konnten im weiteren Verlauf Schlupfraten von bis zu 60% der injizierten Embryonen erreicht werden.

Insgesamt gelang es in einem Zeitraum von 8 Wochen die Technik soweit zu etablieren, dass es möglich war routinemäßig Injektionen von primordiales Keimzellen vorzunehmen und Hühnerembryonen bis Embryonaltag 21 in surrogate Eischalen heranzuziehen.

Weiterhin wurde die surrogate Technologie genutzt, um Lymphozyten grünfluoreszierender Hühnerembryonen in nicht fluoreszierende Hühnerembryonen zu transplantieren.

Die Etablierung dieser Technologie ermöglicht nun zum einen die Herstellung genetisch veränderter Hühner und zum anderen die Transplantation von Zellen im Embryonalstadium. ■

Charakterisierung von Endothelaktivierung durch einen Calcium-Sensor im transgenen Schweinmodell

Florian Jaudas
 am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
 Betreuer: Frau Dr. med. vet. Wünsch und Herrn Dr. rer. nat. Klymiuk

Ziel/Aufgabenstellung

Im Rahmen dieses Projekts sollte gezeigt werden, dass in transgenen Endothelzellen vom Schwein, die einen Calcium-Sensor exprimieren, ein durch vasoaktive Substanzen ausgelöster Calciumeinstrom mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann. Calcium ist eine wichtige Signalsubstanz in der Zelle und die Endothelzellaktivierung, die mit einem intrazellulären Calcium-Anstieg einhergeht, ist Bestandteil einiger pathologischer Vorgänge, wie z.B. Arteriosklerose, Herzversagen und Transplantatabstoßung. Mittels eines Calcium-Sensors ist es grundsätzlich möglich die Aktivierung der Endothelzellen zu beobachten. Die beiden vasoaktiven Reagenzien Histamin und ATP führen rezeptorvermittelt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und wurden nachfolgend verwendet, um die endogene Situation der Endothelzellaktivierung zu simulieren, und um zu zeigen, dass das verwendete Calcium-sensitive Fluorophor Case12 geeignet ist, um die endogene Situation der Endothelzellaktivierung zu beobachten. Die stabile Integration und Expression von Case12, einem "genetically encoded calcium indicator", bietet grundsätzlich die Möglichkeit mittels geeigneter Promotoren und Signalsequenzen eine örtlich, sowie zeitlich definierte Calcium-Messung ohne weitere Zellbehandlung durchzuführen. Das grün fluoreszierende Protein Case12 reagiert auf Änderungen der Calciumkonzentration mit Intensitätsänderung der Fluoreszenz. Die Struktur des Proteins beinhaltet Calmodulin und M13, die in das „circularly permuted fluorescent protein“ integriert wurden. Calmodulin hat vier Ca²⁺-Bindungsstellen, zwei auf der C-terminalen Seite, die bereits bei geringer Calcium-Konzentration von unter 500nM besetzt werden und zwei auf der N-terminalen Seite, die erst bei einer höheren Konzentration besetzt werden. Die durch Calcium-Ionen vermittelte initiale Strukturänderung führt dazu, das Calmodulin das M13 Molekül bindet. Diese Bindung induziert eine Konformitätsänderung in der Chromophor-Gruppe, welche die Fluoreszenz bei einer Excitation von 488 nm, in einem Bereich von 500-540 nm um das 12-fache erhöht. Dies kann mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden.

Methode

Als Vorarbeit zu diesem Projekt wurden mit Hilfe des somatischen Zellkerntransfers 9 transgene Founder-Schweine erzeugt, die Case12 unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors exprimieren. Da es sich um Foundertiere handelt, kann die Expressionshöhe unterschiedlich sein. Von 5 Tieren konnten Fibroblasten aus dem Ohr (porcine ear fibroblasts = PEF) und Endothel-

zellen aus der Aorta (porcine aortic endothelial cells = PAEC) isoliert und kultiviert werden. Die Expression von Case12 wurde mittels Western Blot Analyse durch Dr. Elisabeth Kemter nachgewiesen (Abb.1), und die gut exprimierenden Zellen von Tier #9822 wurden für weitere Versuche ausgewählt.



Abb.1 Western Blot Analyse mit Case12-transgenen Endothelzellen und Ohr-fibroblasten.

Um das Verhalten von Case12-transgenen Zellen nach Inkubation mit ATP und Histamin zu untersuchen, wurden die Zellen auf speziellen Slides (μ -Slides V10,4 von Ibidi) kultiviert, um optimale optische Eigenschaften für die Untersuchung am Fluoreszenz-mikroskop zu erhalten. Diese Untersuchungen, sowie die Auswertungen wurden von Dr. Petra Kameritsch am Walter-Brendel-Zentrum durchgeführt. Das verwendete Mikroskop- und Kamerasystem erlaubt automatisiert Bilder mit einer Belichtungszeit im Millisekundenbereich aufzunehmen und somit eine rasche Änderung der Fluoreszenzintensität zu detektieren. Aufgrund der Signalstärke wurde 500ms als Belichtungszeit gewählt. Vor der Behandlung der Zellen mit Histamin oder ATP wurde zuerst das Nährmedium aus den Slides entfernt und anschließend wurden die Endothelzellen drei Mal mit HEPES-Puffer gewaschen. Nach 10 Minuten Inkubation mit HEPES, um störende Einfluss der Scherkräfte auf den Calciumspiegel auszuschließen, wurde ATP/Histamin auf die Zellen gegeben. Es wurden folgende Versuchse durchgeführt: (i) Inkubation von Ohrfibroblasten und Endothelzellen mit 100 μ M ATP; (ii) Untersuchung der Reaktion der Endothelzellen nach Inkubation mit steigender ATP-Konzentration zwischen 0 und 1000 μ M; (iii) Untersuchung der erneuten Reaktion der Endothelzellen auf 100 μ M ATP nach 10-minütiger Ruhezeit; (iv) Behandlung von Ohrfibroblasten und Endothelzellen mit 20 μ M und 2mM Histamin.

Ergebnisse

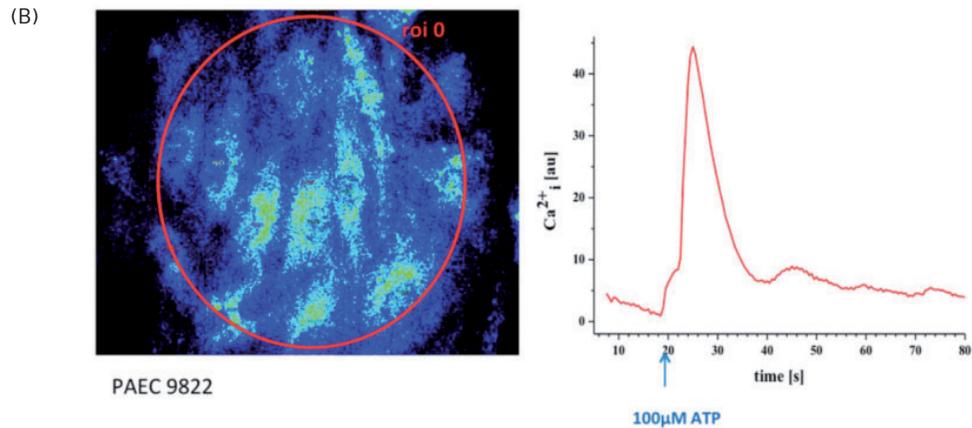
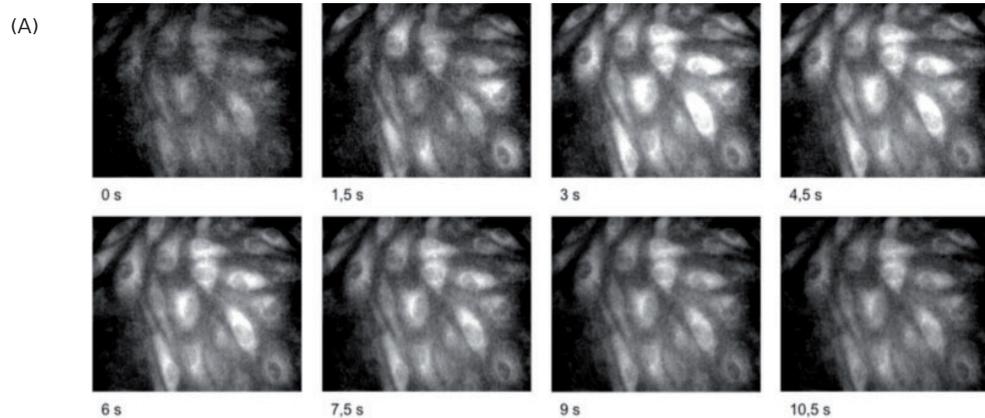


Abb.2 Behandlung von PAEC 9822 Endothelzellen mit 100 μ M ATP
 (A) Zeitlicher Verlauf der fluoreszierende Zellen dargestellt mit Einzelaufnahmen im 1,5-Sekunden-Abstand (B) Falschfarbendarstellung und zeitlicher Fluoreszenzintensitätsverlauf von Case 12 Endothelzellen

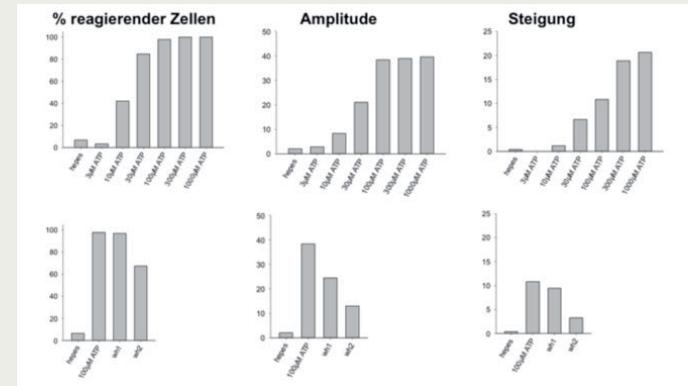


Abb.3 Behandlung von PAEC 9822 mit verschiedenen ATP-Konzentrationen sowie wiederholte Behandlung mit ATP.
 Amplitude: Differenz der Grauwerte von der basalen Fluoreszenzintensität und der maximalen Fluoreszenzintensität nach der ATP Behandlung. Steigung: spiegelt die Geschwindigkeit der Fluoreszenzintensitätsänderung wider.

Bei steigender ATP-Konzentration nahm die Anzahl der reagierenden Zellen, die Amplitude der Fluoreszenzintensität und die Steigung zu und deutete auf eine Sättigung bei einer Konzentration von 100 μ M ATP hin. Diese Konzentration sollte somit ausreichen, um ein gutes Signal zu bekommen (Abb. 3 oben). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Case12-transgenen Endothelzellen wiederholt auf ATP mit einem Fluoreszenzsignal reagieren (Abb. 3 unten). Mittels Histamin war es nicht möglich bei den Case12-transgenen Endothelzellen eine Zunahme des Fluoreszenzsignals zu detektieren. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die Endothelzellen nach der Isolierung keine Histaminrezeptoren aufweisen oder diese im Verlauf der Kultur verlieren. Die Versuche mit Case12-transgenen Ohrfibroblasten ergaben, dass diese sowohl auf Histamin, als auch auf ATP reagierten (Abb. 4).

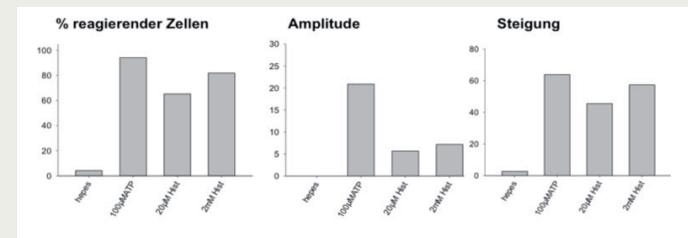


Abb.4 Behandlung von Ohrfibroblasten 9822 mit Histamin und ATP

Zusammenfassung und Ausblick

Wir konnten zeigen, dass in Case12-transgenen Endothelzellen und Ohrfibroblasten ein durch ATP hervorgerufener intrazellulärer Calciumanstieg mikroskopisch detektierbar ist. Im Gegensatz zu den Endothelzellen ist bei den Ohrfibroblasten ein Anstieg nach Behandlung mit Histamin detektierbar. Da in diesem Modell Case12 ubiquitär exprimiert wird, bietet es sich an weitere Zellarten zu untersuchen, denn Calcium spielt, als einer der wichtigsten zellulären Signalstoffe, bei einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle eine Schlüsselrolle.

In weiteren Versuchen soll gezeigt werden, dass dieses Modell geeignet ist, um biomedizinische Fragestellungen zu beantworten beispielsweise für den Forschungsbereich Xenotransplantation.

Persönliche Meinung

Das Forschungsprojekt war sehr interessant und hat erste wertvolle Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten und Denken ermöglicht. Diese Erfahrung hat mein Studium sehr bereichert, da es eine tolle Möglichkeit im Studium ist das wissenschaftliche Arbeitsfeld näher kennen zu lernen. ■

Untersuchung der Verteilung von Cronobacter sakazakii Serotypen 01-07 in klinischen Isolaten und Lebensmittelproben

Joyce Stecklum
 am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
 Betreuer: Frau Dr. Schauer

Cronobacter sakazakii ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium. Es kommt in der Natur ubiquitär vor und wurde bereits aus verschiedensten Quellen isoliert. Ebenso im Umfeld der Lebensmittelproduktion konnten *Cronobacter* spp. in einer Vielzahl roher und zubereiteter Lebensmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft nachgewiesen werden. Die Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion an sowie der Persistenz in verschiedenen Wirtszellen ermöglicht dem Pathogen über kontaminierte Lebensmittel vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen selten, aber schwer verlaufenden Meningitiden, Bakteriämien und nekrotisierende Enterocolitiden auszulösen. Zahlreiche Nachweismethoden mit unterschiedlich hoher Sensitivität ermöglichen heutzutage einen Nachweis von *Cronobacter* spp. in verschiedenen Lebensmitteln und Umweltproben. Weit weniger ist jedoch über die an der Pathogenität von *C. sakazakii* beteiligten Faktoren und ihre Aufgaben während der Infektion bekannt.

Ziel der Studie war es, die Verteilung von sieben beschriebenen Serotypen bei *C. sakazakii* in klinischen Isolaten als auch Lebensmittelproben zu bestimmen, um einen evtl. vorhandenen Zusammenhang zwischen Serotyp und Pathogenität bei *C. sakazakii* näher charakterisieren zu können. Dazu wurden *C. sakazakii*-Stämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch mittels eines hoch sensitiven, auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierenden Verfahrens zunächst auf Genus- und Speziesebenen verifiziert und anschließend der Serotyp bestimmt.

Die Anreicherung der Keime aus den Proben war für dieses Projekt nicht notwendig, da die Bakterienstämme bereits in Form von Dauerkulturen in der Stammsammlung vorhanden waren und ihre Anzucht auf Columbia-Blut-Agarplatten erfolgte. Die einfache Aufarbeitung der Nukleinsäure (DNA) mit hoher Qualität, als Target für die anschließende PCR, erfolgte mittels eines schonenden enzymatischen Verfahrens mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion. Dieses Verfahren ermöglicht einen schnellen und hohen Durchsatz von DNA-Präparationen. Die Bestätigung des Genus und der Spezies sowie die Ermittlung des Serotyps erfolgen über drei verschiedene Nachweis-PCRs.

Für eine aussagekräftige Statistik über die Vertretung einzelner *C. sakazakii*-Serotypen in klinischen Isolaten und Lebensmittelproben ist eine Untersuchung von mind. 50 Bakterienstämmen notwendig. In dieser Studie wurden insgesamt 77 *Cronobacter*-Stämme untersucht, →

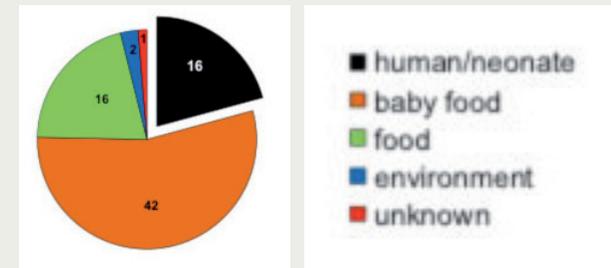


Abb.1: Herkunft der in dieser Studie untersuchten *Cronobacter*-Stämme.

die alle zum Genus *Cronobacter* und Spezies *sakazakii* gehörten. Basierend auf Unterschieden in der Zusammensetzung des Lipopolysaccharids (LPS) auf der Keimoberfläche wird *C. sakazakii* in 7 Serotypen (01-07) unterteilt. Die Serotypisierung der 77 *Cronobacter*-Stämme ergab, dass unabhängig von der Herkunft des Bakterienstamms (Abb.1) die Serotypen 01-03 am häufigsten auftraten. Weitere Differenzierung der Daten (Abb.2) und zwar zwischen klinischen Isolaten und Lebensmitteln-/Umweltproben ergab, dass in den klinischen Isolaten in 50% der Fälle *C. sakazakii* Serotyp 02 und in 37% *C. sakazakii* Serotyp 01 vertreten waren.

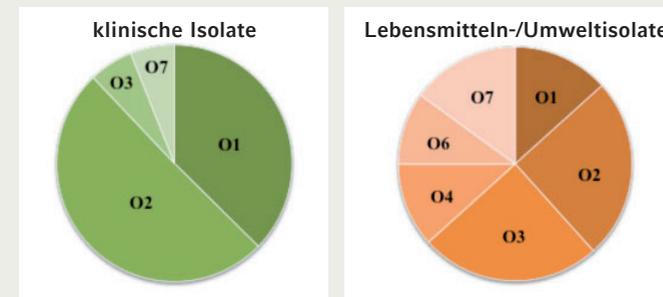


Abb.2: Verteilung von *C. sakazakii* Serotypen 01-07 in klinischen Isolaten sowie in Lebensmittel- und Umweltproben.

In den Lebensmittel-/Umweltproben waren dagegen mit 29 % die *C. sakazakii* Serotypen 02 und 03 am häufigsten zu finden, dafür war jedoch hier die Variabilität der Serotypen höher. Bis auf den *C. sakazakii* Serotyp 05 konnten alle anderen sechs Serotypen 01-04 und 06-07 nachgewiesen werden.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich somit eindeutig schließen, dass *C. sakazakii* Serotypen 01-03 am häufigsten sowohl in klinischen als auch in Lebensmittel-/Umweltisolaten vorzukommen scheinen. Allerdings sind die Daten noch nicht ausreichend, um einen Zusammenhang zwischen dem *C. sakazakii* Serotyp und seiner Pathogenität festlegen zu können. Dafür müssen weitere Verteilungsstatistiken erstellt und die einzelnen *C. sakazakii* Serotypen auf ihre Virulenz, z.B. in den *in vitro* Infektionsversuchen, näher charakterisiert werden. ■