

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialnachweis

BDH Chemicals, Ltd. Analar, Poole, UK: Carboxymethylcellulose (CMC)

Becton Dickinson, Heidelberg: CellWash-Lösung für die Durchflusszytometrie

Biochrom AG, Berlin: Biocoll Separating Solution (Ficoll Separating Solution)

Bioline, Luckenwalde: Agarosegel-Längenstandard (Hyperladder I 100 lanes)

Biomol, Hamburg: Albumin bovine Fraction V (BSA)

Boehringer, Mannheim: Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektionskit, Proteinase K

Braun, Melsungen: Aqua iniectionabilia

Dianova, Hamburg: anti-Spezies-IgG (H+L)-FITC

Difco, Michigan, USA: Trypsin

Enzo, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: Anti-Digoxigenin-AP-Fab fragments

Fluca, Neu-Ulm: Chemikalien (wenn nicht speziell aufgelistet)

Invitex, Berlin-Buch: RTP DNA/RNA Virus Mini Kit

Kodak, Stuttgart: FotofloLösung für die Zytocentrifugation

Life Technologies (gibco-BRL), Gaithersburg, USA:

EDM, FCS (foetal calf serum), NCS (newborn calf serum), DNA-Längenstandards  
( $\lambda$ /Hind III,  $\phi$ X 174 RF DNA/Hae III)

Meditrade, Kiefersfelden: Einmalhandschuhe

Merck, Darmstadt: Chemikalien (wenn nicht speziell aufgelistet)

Metabion, Planegg-Martinsried: Oligonucleotidsynthese nach Auftrag

New England Biolabs, Bad Schwalbach (Taunus): Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer

Nunc, Wiesbaden: steriles Plastik-Einmalmaterial

Oncor, Gaithersburg, USA: Sure Blot Hybridization Membrane

Perkin Elmer, Überlingen: dNTPs

Promega, Madison, USA: Nucleasefreies Wasser

Qiagen, Hilden: Taq DNA Polymerase, 10 x PCR-Reaktionspuffer

Roth, Karlsruhe:

Agarose (Ultra- Qualität), Xylol (Isomere), Chloroform/ Phenol/ TE (Roti<sup>®</sup>-Phenol, Fertigmischung), Formamid

Serotec, Oxford, UK: RBC Lysing Buffer, FITC- und RPE-konjugierte mAK

Serva, Heidelberg: Dodecylsulfat

Sigma, Deisenhofen:

Ammoniumacetat, Ampicillin, EDTA, N-Lauroyl-sarcosine, Tritox-X 100

TPP Tissue culture, Trasadingen, Schweiz: steriles Plastik-Einmalmaterial

### 3.2 Patientengut

In der hier vorliegenden Arbeit wurden natürlich infizierte und klinisch gesunde Pferde sowie frisch geschlachtete Pferde analysiert. Insgesamt wurden mehr als 250 verschiedene Proben von 134 Tieren untersucht. Die Tab. 2 gibt einen Überblick über die einzelnen Pferdegruppen.

Tab. 2 Übersicht der verschiedenen, unterschiedlich untersuchten Pferdegruppen

<p><b>1. Studie mit dem Labor Laboklin</b>          Untersuchung von <i>Blut- und Tupferproben auf EHV-2</i> sowie Erstellung eines <i>Immunstatus</i> bei:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pferden mit Augenerkrankung (Laboklin krank = LK)</li> <li>• Klinisch gesunden Pferden (Laboklin gesund = LG)</li> </ul>	<p>Nr. LK 1 – LK 10          Nr. LG 1 – LG 21</p>
<p><b>2. Diagnostikeinsendungen</b>          Untersuchung von <i>Blut- und Tupferproben auf EHV-2, EHV-5, EAdV-1</i> sowie <i>Chlamydien</i> und <i>Mykoplasmen</i> bei:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pferden mit Augenerkrankung (Testgruppe = T)</li> <li>• Klinisch gesunden Pferden (Kontrollgruppe = K)</li> </ul>	<p>Nr. T 1 – T 68          Nr. K 1 – K 32</p>
<p><b>3. Schlachthofproben</b>          Untersuchung diverser <i>Gewebe- und Tupferproben auf EHV-2 und EHV-5</i>:</p>	<p>Nr. S 1 – S 14</p>

#### 3.2.1 Studie mit dem Labor Laboklin

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum März bis Dezember 2004 zeitgleich im Institut für Virologie der FU Berlin und im Labor Laboklin in Bad Kissingen durchgeführt. Die Pferde wurden aufgrund ihres Vorberichtes in 2 Gruppen eingeteilt: die ausnahmslos an einer Konjunktivitis, Keratitis bzw. Keratokonjunktivitis erkrankte Tiere beinhaltende Gruppe bestand aus zehn Pferden (LK1-LK10), wohingegen der zweiten Gruppe 21 augengesunde und auch insgesamt klinisch unauffällige Pferde angehörten (LG1-LG21). Bei den augenkranken Pferden handelte es sich hauptsächlich um von dem Labor Laboklin rekrutierte Patienten unterschiedlichster Einsender, die Proben von vier Pferden entstammten den Diagnostikeinsendungen des Instituts für Virologie. Die augengesunden Pferde kamen fast ausschließlich aus einem mit dem Institut für Virologie kooperierenden Gestüt. Sechs gesunde Pferde aus unterschiedlichen Standorten wurden von befreundeten Pferdebesitzern bzw. von der Tierklinik für Fortpflanzung der FU Berlin zur Beprobung zur Verfügung gestellt.

#### 3.2.2 Diagnostikeinsendungen

Innerhalb des Zeitraums April 2003 bis April 2005 wurden 142 Augen- bzw. Cytobrush-tupferproben sowie 39 Blutproben von insgesamt 100 Pferden zur virologischen Untersu-

chung an das Institut für Virologie geschickt. Die Proben wurden von 68 augenkranken Test- (T1-T68) und 32 gesunden Kontrollpferden (K1-K32) gewonnen und von den unterschiedlichsten Tierarztpraxen bzw. -kliniken eingesandt.

Die Untersuchung von Augentupferproben auf EHV-2 erfolgte bei allen 68 augenkranken und bei 26 klinisch gesunden Pferden, während Tupfer von 30 der kranken und fünf der gesunden Pferde zusätzlich auf EHV-5 untersucht wurden. Außerdem wurden Tupfer von fünf der gesunden Pferde ausschließlich auf EHV-5 untersucht. Mittels Stichprobenkontrollen erfolgte schließlich die Untersuchung auf EAdV-1 bei 15 augenkranken sowie auf Chlamydien/Mykoplasmen bei zwölf (je sechs augenkranken/gesunden) Pferden.

Die insgesamt zur Verfügung stehenden 39 Blutproben (zwölf von den augenkranken und 27 von den augengesunden Pferden) wurden entweder auf EHV-2 (bei zwölf augenkranken respektive 26 augengesunden Pferden) oder auf EHV-5 (fünf respektive 13) untersucht.

### 3.2.3 Gewebe und Tupferproben von geschlachteten Pferden

Ein privater Pferdeschlachthof in Genthin ermöglichte die Probennahme bei insgesamt 14 frisch geschlachteten Pferden, die alle keine erkennbaren Krankheitsanzeichen aufwiesen und für schlachttauglich bewertet worden waren. Von den Pferden wurden die unterschiedlichsten Augengewebe, insbesondere Konjunktiven sowie zum Teil auch Cytobrush-tupferproben aus dem Auge mit sterilem Einmalmaterial gewonnen, kühl gelagert und auf dem schnellsten Wege im Institut für Virologie aufgearbeitet und untersucht.

## 3.3 Viren und Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Viren und Zelllinien wurden freundlicherweise aus der Institutssammlung bzw. von Frau Dr. Borchers zur Verfügung gestellt. Die Herkunft der Viren kann Tab. 3 entnommen werden. EHV-2 und -5 wurden in einer Kaninchennierenzelllinie (RK 13) vermehrt, während bei EAdV-1 TUW-Zellen (Trachealzellen Uta Wolfinger) verwendet wurden.

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Viren

Virus	Bezeichnung	Herkunft	Referenz
EHV-2	T 16 T 400 LK 4	Pferd, Keratokonjunktivitis, 1974 Fohlen, untere Atemwege, 1976 Pferd, Rhinopneumonitis, 1963	(Thein und Böhm, 1976) (Thein und Hartl, 1976a) (Plummer und Water- son, 1963)
EHV-5	P 48	Przewalski Pferd, PBMC, 1999	(Borchers <i>et al.</i> , 1999)
EAdV-1	RVC	Pferd, Newmarket	Institutssammlung

### 3.3.1 Zellkulturen

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Trypsinlösung (0,25%):*

Trypsin	2,5 g
EDTA- Dihydrat	2,0 mM (0,744g)
PBS	ad 1000 ml

##### *PBS (Phosphat buffered saline):*

NaCl	137,0 mM (8,0 g)
KCL	2,7 mM (0,2 g)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	8,0 mM (1,42 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM (0,24 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *Nährmedium: Eagle´s minimum essential medium, Dulbecco´s modification (EDM)*

EDM-Pulver	133 g
NaHCO <sub>3</sub>	37 g
Penicillin G	0,2 g
Streptomycinsulfat	0,2 g
Aqua bidest	ad 10000 ml

##### *Fetales Kälberserum (Fetal calf serum): FCS*

##### *Serum neugeborener Kälber (Newborn calf serum): NCS*

Alle verwendeten Zelllinien wurden in EDM unter Zusatz von 5% NCS bzw. FCS in Plastikpetrischalen (TTP Tissue culture, Schweiz) verschiedener Größen vermehrt und bei 37<sup>0</sup>C und 5% CO<sub>2</sub> in begasbaren Feuchtbrutschränken inkubiert. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Umsetzen (Passagieren) der Zellen im Verhältnis 1:10, indem das Medium von der Platte gesaugt und die Zellen mit Trypsinlösung für etwa 1 min überschichtet wurden. Nach Entfernen des Trypsins und dem Ablösen der Zellen von der Platte wurden diese in Nährmedium resuspendiert und auf neue Petrischalen verteilt.

### 3.3.2 Virusvermehrung

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### Trypsinlösung, PBS, EDM/5% FCS

Zunächst wurde das Nährmedium von den Zellkulturschalen, die einen semikonfluenten RK-13 (bzw. TUW bei EAdV-1)-Zellrasen enthielten, abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Infektionsmultiplizität von 0,1 im Feuchtbrutschrank bei 37<sup>0</sup>C und 5% CO<sub>2</sub> für 1 h inkubiert. Nach dem Absaugen des Inokulums und dreimaliger Waschung des Zellrasens mit Medium wurden die infizierten Zellen mit EDM/5% FCS bedeckt und erneut bei 37<sup>0</sup>C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Ausbildung von deutlich sichtbaren cytopathischen Effekten (Plaques) inkubiert. Nach Sichtbarwerden der Plaques wurde das Medium abgenommen und zur Abtrennung von Zelltrümmern für 10 min bei 3000 UpM zentrifugiert (Minifuge 2, Fa. Heraeus Christ, Osterode). Der gewonnene virushaltige Überstand wurde anschließend portioniert bei -70<sup>0</sup>C in Eppendorfgefäßen eingefroren und bei Bedarf verwendet.

Nach bis zu 3 Passagen (EAdV-1 ein bis zwei Passagen) war eine für die Isolation von Virus-DNA (3.3.3) ausreichende Anzahl an Viruspartikeln von EHV-2, EHV-5 bzw. EAdV-1 im Überstand enthalten.

### 3.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA aus Virionen

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Sucroselösung 30% (w/v)*

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer):

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                      10 mM (1,21 g)

EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat                              1 mM (3,72 g)

Aqua bidest    ad 1000 ml

pH 8,0 (eingestellt mit HCl)

RTP<sup>®</sup>DNA/RNA Virus Mini Kit, Fa. Invitex, Berlin

Der durch Zentrifugation bei 3000 UpM (Minifuge 2, Fa. Heraeus Christ, Osterode) von groben Zellresten befreite virushaltige Zellkulturüberstand (3.3.2) wurde zunächst in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig mit 5 ml einer 30%igen Sucroselösung in TE-Puffer unterschichtet. Anschließend erfolgte eine einstündige Ultrazentrifugation (L8-M Ultrazentrifuge, Fa. Beckmann, München) bei 27000 UpM in einem SW-27 Rotor (Fa. Beckmann, München). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Viruspellet für die DNA-Isolierung aus den Virionen mit dem RTP<sup>®</sup>DNA/RNA Virus Mini Kit (Fa. Invitex, Berlin) gemäß Herstellerangaben präpariert. Das Zellpellet von drei Ultrazentrifugenröhrchen wurde dabei zunächst in 400 µl nucleasefreiem Wasser resuspendiert, in ein Extraktions-Röhrchen überführt und anschließend für 15 min unter kontinuierlichem Schütteln im Wasserbad bei 65<sup>0</sup>C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Binding Solution (Fa. Invitex, Berlin) und vorsichtigem Vermischen wurde die Probe in den Spin-Filter eines Receiver-Röhrchens transferiert und für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurde ein erster Waschschriff durchgeführt, indem der Probe 500 µl Wash Buffer R1 (Fa. Invitex, Berlin) zugefügt und diese erneut bei 10000 g für 30 s zentrifugiert wurde. Nach Verwerfen des Filtrats schloss sich ein zweiter Waschschriff mit 800 µl Wash Buffer R2 (Fa. Invitex, Berlin) und einer Zentrifugation bei 10000 g für 30 s an. Daraufhin wurde das restliche Ethanol durch eine finale Zentrifugation der Probe bei 15000 g für 4 min entfernt. Schließlich wurde der Spin Filter in ein Elutions-Röhrchen platziert und die DNA durch Zugabe von 60 µl auf 80<sup>0</sup>C vortemperierten Elution Buffer R (Fa. Invitex, Berlin), 3 minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 10000 g eluiert. Am Ende wurde abweichend vom Protokoll des Herstellers noch eine zusätzliche Inkubation des erhaltenen Eluats bei 37<sup>0</sup>C im Wasserbad mit geöffnetem Röhrchendeckel durchgeführt, damit sich der darin möglicherweise noch enthaltene Restalkohol verflüchtigen konnte. Eine Überprüfung des Ergebnisses der Virus-DNA-Präparation samt Quantifizierung der isolierten Virus-DNA-Menge erfolgte mittels der analytischen Gel-

elektrophorese (3.6.2), indem die Bandenintensität mit einem DNA-Längenstandard (Hyperladder, Fa. Bioline, Luckenwalde) verglichen wurde.

### 3.3.4 Virustitration

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Carboxymethylcellulose (CMC)-Overlaymedium:*

Carboxymethylcellulose-Natriumsalz	8,0 g
EDM	500 ml
FCS	10 ml

##### *4% (v/v) Formaldehydlösung in PBS:*

Formaldehyd 37%	10,8 ml
PBS	ad 100 ml

EDM/ 5% FCS, Giemsalösung für die Mikroskopie

Virushaltiger Überstand wurde logarithmisch zur Basis 10 in EDM verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden dann je 200 µl in zwei Kavitäten einer 24-Lochplatte pipettiert und anschließend 10<sup>4</sup> RK13-Zellen in 200 µl EDM/5% FCS zugegeben. Nach erfolgter Inkubation für 1 h bei 37<sup>0</sup>C und 5% CO<sub>2</sub> im Feuchtbrutschrank wurden die Zellen mit 250 µl CMC-Overlaymedium pro Kavität überschichtet, um eine extrazelluläre Virusausbreitung zu verhindern. Der anschließenden erneuten Inkubation bei 37<sup>0</sup>C und 5% CO<sub>2</sub> für etwa 7 Tage (bis zur Ausbildung virusspezifischer Plaques) im Feuchtbrutschrank folgte die Fixation mit 4%igem Formalin/PBS mit darauf folgender Färbung mit Giemsalösung zur besseren Zeldarstellung. Durch Auszählung der Plaquezahl wurden die entsprechenden Titer der Virusüberstände ermittelt, diese wurden in PFU (plaque forming units) pro ml angegeben.

### 3.4 Gewinnung von Cytobrush- bzw. Augentupferproben

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Tupferisoliermedium:*

Penicillin G	5000 I.E.
Streptomycin	5 µg
EDM-Medium	50 ml

Die Tupferprobenentnahme aus dem Auge der Pferde erfolgte nicht einheitlich. Bei einigen Tieren wurden die Abstriche durch Einlegen eines sterilen, trockenen Wattetupfers in den Lidbindehautsack zwischen Unterlid und Nickhaut mit anschließendem vorsichtigem Drehen um die eigene Achse entnommen, wohingegen bei anderen Tieren Abstriche mittels eines sterilen Cytobrushes (Cytobrush<sup>®</sup> Plus GT, Fa. Medscand Medical, Schweden) genommen wurden. Auch das Verbringen der frisch gewonnenen Tupferproben in Transportröhrchen erfolgte nicht einheitlich, da manche Proben trocken und andere in 1 ml Tupferisoliermedium gelagert wurden. Bis zur Aufarbeitung der Tupferproben wurden diese bei 4<sup>0</sup>C ungeöffnet gelagert, wobei die Durchführung zügig, spätestens jedoch innerhalb von 48 h erfolgt ist.

### 3.4.1 DNA-Isolierung aus Cytobrush- und Augentupfern mit oder ohne Transportmedium

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Proteinase K-Verdaupuffer:*

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH 8,5)	50 mM (6,057 g)
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	1 mM (3,72 g)
Tween 20	0,5% (5 ml)
Aqua bidest	ad 1000 ml

Die DNA-Isolierung aus Tupfern wurde nach der von Kershaw *et al.* (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Proben die sich im Isolationsmedium befanden, wurden zunächst gründlich ausgeschüttelt und ausgedrückt, anschließend wurde der Tupper verworfen und das Medium in ein frisches 2 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt und bei 15000 UpM und 4<sup>0</sup>C für 30 min in einer Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge (Fa. Ole Dich, Dänemark) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig dekantiert und das verbliebene Zellpellet anschließend in 75 µl Proteinase-K-Verdaupuffer resuspendiert. Trockene Tupperproben wurden direkt in 150 µl Verdaupuffer ausgeschüttelt und nach kräftigem Ausdrücken wurde der Tupper ebenfalls verworfen. Der enzymatische Verdau zur Freisetzung der Viruspartikel erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 56<sup>0</sup>C unter Zugabe von Proteinase K (Boehringer, Mannheim) - Endkonzentration 0,15 mg/ml. Nach Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzung der Probe auf 95<sup>0</sup>C für 10 min wurden stets 10 µl der Probe in die PCR (3.6.1) eingesetzt.

### **3.5 Gewinnung von Blutproben und DNA-Präparation von postmortem Geweben**

Für die Erstellung des Immunstatus sowie für die serologische Untersuchung wurde den Pferden etwa 5 ml Blut aus der Jugularvene entnommen, in EDTA-Blutröhrchen aufgefangen und zur Untersuchung eingesandt. Vereinzelt gelangten zusätzlich Serum-Blutröhrchen zur Untersuchung. Da die Untersuchungen sowohl im Institut für Virologie in Berlin, als auch im Labor Laboklin in Bad Kissingen durchgeführt wurden und die Proben entweder bei der einen, oder der anderen Stelle zuerst eingingen, wurde die vorhandene Blutmenge zunächst unter einer sterilen Laminarbox aufgeteilt. Die Erstellung des Immunstatus bei Laboklin war dabei nur mit maximal 24 h alten Blutproben möglich.

Die untersuchten Gewebeproben vom Schlachthof wurden von frisch geschlachteten Pferden entnommen und in sterilen Einmalgefäßen transportiert. Die weitere Aufarbeitung der frischen Proben erfolgte dann unter einer sterilen Laminarbox. Proben die nicht unmittelbar aufgearbeitet werden konnten, wurden bei -20<sup>0</sup>C zwischengelagert. Bei Proben, die auch histologisch eingebettet werden sollten, wurde ein Teil des jeweiligen Gewebes in Röhrchen mit speziellem Zink-Formalin gegeben, während der andere Teil der DNA-Isolierung diente.

### 3.5.1 Isolierung von equinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBL)

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

*Biocoll Separating Solution*: Ficoll der Dichte 1,077  
steriles PBS

Das für die virologische Untersuchung verbliebene EDTA-Blut wurde zunächst wie von Borchers *et al.* (1997) beschrieben im Verhältnis 1:1 auf Ficoll der Dichte 1,077 (Fa. Biochrom AG, Berlin) aufgeschichtet und 10 min bei 1700 UpM (Minifuge 2, Fa. Heraeus Christ, Osterode) zur Abtrennung der PBL von den übrigen Blutzellen zentrifugiert. Anschließend wurde zunächst das Plasma für die serologische Untersuchung abgenommen und in einem sterilen 2 ml Eppendorfröhrchen gesammelt. Die gut abgegrenzte Lymphozytenbande wurde anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit sterilem PBS durch erneutes Zentrifugieren bei 1500 UpM (Minifuge 2, Fa. Heraeus Christ, Osterode) für 5 min gewaschen. Das so entstandene Zellpellet konnte dann in den enzymatischen Verdau für die DNA-Isolierung überführt werden (3.5.2).

### 3.5.2 DNA-Isolierung aus PBL

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer

Nach Isolierung der PBL aus der Blutprobe (3.5.1) erfolgte die weitere Aufarbeitung ebenfalls nach der von Borchers *et al.* beschriebenen Methode (1997). Zunächst wurden  $10^5$ - $10^6$  Zellen in Proteinase-K-Verdaupuffer aufgenommen und mit Proteinase K (Boehringer, Mannheim) - Endkonzentration 0,2 mg/ml - versetzt. Der Verdau erfolgte anschließend über Nacht im Wasserbad bei 56°C. Durch Erhitzung der Probe auf 95°C für 10 min wurde das Enzym wieder zerstört. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Probe schließlich bei 260 nm photometrisch vermessen (UV 1202 Spektrophotometer, Fa. Shimadzu, Duisburg) und 1-2 µg DNA in die PCR eingesetzt (3.6.1).

### 3.5.3 DNA-Isolierung aus Geweben

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer  
Proteinase K (Stocklösung: 10mg/ml)

Zunächst wurde unter einer Laminarbox in ein 2 ml-Zentrifugenröhrchen 500 µl Proteinase K-Verdaupuffer mit 5 µl Proteinase K (Fa. Boehringer, Ingelheim) - Endkonzentration 0,1 mg/ml - vorgelegt. Danach wurde mit Einmalskalpellklingen ein etwa erbsengroßes Stück aus dem Gewebe herausgeschnitten, möglichst fein zerkleinert und in die Röhrchen mit Verdaupuffer zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung des Ansatzes erfolgte eine Inkubation der Probe über Nacht im Wasserbad bei 56°C. Durch fünfminütiges Erhitzen der Probe



auf 95<sup>0</sup>C wurde das Enzym am nächsten Tag inaktiviert. Anschließend erfolgte analog zu Kap. 3.5.2 die Bestimmung der DNA-Konzentration der Probe und der Einsatz von 1-2 µg DNA in die PCR (3.6.1).

### 3.6 Virus-DNA-Nachweis in Tupfern bzw. Cytobrushproben, PBL, Geweben und Paraffinschnitten mittels Polymerasekettenreaktion

#### 3.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei dieser Arbeit kamen virusspezifische PCRs zum Einsatz, um die Genome von EHV-2 und EHV-5 sowie des equinen Adenovirus Typ 1 (EAdV-1) nachzuweisen. Weiterhin wurde stichprobenartig eine PCR zum Nachweis des Zellstrukturgens β-Aktin mit der β-Aktin-PCR durchgeführt, um die DNA-Qualität kontrollieren zu können (Ergebnisse nicht dargestellt). Das Protein β-Aktin kommt in allen eukaryontischen Zellen vor und sollte daher bei der Präparation von DNA aus Geweben, Tupfermaterial bzw. Blutzellen immer nachweisbar sein. Durch diese PCR ist demnach der Ausschluss falsch negativer Ergebnisse, die auf einer zu geringen Ausbeute von DNA bzw. einer DNA-Zerstörung beruhen, möglich. Außerdem lassen sich dadurch die PCR hemmende Faktoren in der Probe ermitteln (Shankar *et al.*, 1992). Die Primersequenzen der β-Aktin-PCR können der nachfolgenden Übersichtstabelle (Tab. 4) entnommen werden.

Tab. 4 β-Aktin-PCR: Sequenzen der eingesetzten Primer einschl. deren spezifischer „Annealing-Temperaturen“

PCR zum Nachweis von β- Aktin			
Primer	Primersequenz	„Annealing-Temperatur“	Fragmentgröße
A	5'- GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC- 3'	56 <sup>0</sup> C	248 bp
B	5'- GCGCTCGTCGTCGACAACGG- 3'	56 <sup>0</sup> C	

Die β-Aktin-PCR wurde auf einem Heizblockcycler (Fa. Biometra, Göttingen) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 94<sup>0</sup>C, 2 Minuten  
 Denaturierung: 94<sup>0</sup>C, 2 Minuten  
 Annealing: 56<sup>0</sup>C, 2 Minuten  
 Synthese: 72<sup>0</sup>C, 2 Minuten  
 Zyklusanzahl: 40

Die Polymerasekettenreaktionen zum Virusgenomnachweis von EHV-2, EHV-5 und EAdV-1 wurden als so genannte „nested“ PCR durchgeführt. Dabei laufen 2 Reaktionsrunden hintereinander ab, wodurch die Spezifität und Sensitivität der Methode deutlich erhöht werden

konnte. Die in beiden Runden eingesetzten Primerpaare wurden entsprechend so ausgewählt, dass zunächst in der ersten Runde ein Teilstück aus der Virus-DNA amplifiziert wurde, aus diesem Teilstück wiederum wurde ein etwas kleinerer Abschnitt in der zweiten Runde vervielfältigt. Ausgewählt wurden spezifische und hochkonservierte Genabschnitte für das jeweilige Virus, die bei den beiden Herpesviren auf dem Nachweis ihres jeweiligen Glykoprotein B (gB) beruhten, wohingegen die PCR zum Nachweis von EAdV Typ 1 einen Genabschnitt im Hexongen des Virus nachwies und im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde (4.3.3.1).

Die PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, wobei zu 1-2 µg Gesamt-DNA bzw. 20-40 pg gereinigter Virus-DNA zusätzlich 0,4 µM jedes Primers (Fa. Metabion, Martinsried), 0,2 mM dNTPs (Fa. Perkin Elmer, Überlingen), 1,5 U Taq-Polymerase und 1x Reaktionspuffer (Fa. Qiagen, Hilden) pipettiert wurden. Das fehlende Volumen wurde mit RNase und DNase freiem Wasser (Fa. Promega, USA) aufgefüllt, der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und die PCR in einem Heizblockcycler (MWG, Biotech, Fa. Hybaid omnigene, UK) nach folgendem Reaktionsschema durchgeführt:

Denaturierung:	94 <sup>0</sup> C, 30 Sekunden
Annealing:	Temperatur primerspezifisch (s.Tab. 5), 30 Sekunden
Synthese:	72 <sup>0</sup> C, 1 Minute
Zyklusanzahl:	35 (2. Runde EHV-2: 30)

Aus der ersten Runde der jeweiligen PCR wurde ein 1 µl Aliquot in die zweite Runde überführt. Zusätzlich wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt: als Positivkontrolle diente gereinigte Virus-DNA (Konzentration 20-40 pg), die Präparationskontrolle mit allen bei der DNA-Präparation verwendeten Substanzen diente als externe Negativkontrolle, wohingegen die Substanzenkontrolle, die alle PCR-Substanzen beinhaltet (Puffer, Primer, Nukleotide, Wasser) als interne Negativkontrolle eingesetzt wurde. Durch diese Maßnahmen konnten unerwünschte Kontaminationen unter Kontrolle gehalten werden.

Nach Beendigung beider PCR-Runden wurden aus dem Reaktionsansatz der „nested“-Runde 15 µl entnommen und zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente schließlich sichtbar gemacht (3.6.2).

Tab. 5 Virusspezifische Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen der Polymerase-Kettenreaktionen zum Nachweis von EHV-2, EHV-5 und EAdV-1

Primer	Primersequenz	Temp.	Genom Position	Fragmentgröße
<u>EHV-2:</u> PCR zum Nachweis von Glykoprotein B (Borchers <i>et al.</i> , 2002)				
1	5'-ATCAACCCCACCAGCGTCAT-3'	60°C	33677	1. Runde: 948 bp
2	5'-TTTTACTTCTTCCTCTCGTC-3'		34605	
3	5'-CCCAGGAACGAGATTGTGCT-3'	62°C	33899	2. Runde: 512 bp
4	5'-GCTATGATGAGGACTATGAG-3'		34391	
<u>EHV-5:</u> PCR zum Nachweis von Glykoprotein B (Agius <i>et al.</i> , 1994), optimiert für MWG-Heizblockcycler durch Borchers (1999), erweitert als „nested PCR“				
1	5'-CAGACTATGGTGTGGGG-3'	64°C	897	1. Runde: 1328 bp
2	5'-GCTGGCCACGTTCACTA-3'		2224	
3	5'-GGACCAAGAGAGCGTGTGGTGG-3'	64°C	1681	2. Runde: 492 bp
4	5'-TCCCCAAGAAGTGGATAAAGC-3'		2172	
<u>EAdV Typ 1:</u> PCR zum Nachweis von Hexon				
1	5'-CCCCAACC GCCCTAACTACATT-3'	52°C	1894	1. Runde: 1417 bp
2	5'-CATCCACCATCTGCCGACACAT-3'		3332	
3	5'-TATTGCTACCCGCTGAGTGG-3'	62°C	2171	2. Runde: 649 bp
4	5'-GAGTGGAGGCTGTGTTGTGC-3'		2800	

Die PCR zum Nachweis der bakteriellen Erreger (Chlamydien und Mykoplasmen) wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Lübke-Becker und ihren Mitarbeitern im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereiches durchgeführt.

### 3.6.2 Analytische Gelelektrophorese

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *TAE-Puffer (10x)*

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	48,5 g
Na-Acetat	4,13 g
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	3,7 g
Aqua bidest	ad 1000 ml
pH 7,9 (eingestellt mit HCl)	

##### *Probenpuffer (10x)*

0,25% Bromphenolblau (w/v)	250 mg
70% Sucrose (w/v)	70 g
Aqua bidest	ad 100 ml

1%ige Ethidiumbromid-Lösung, 1x TAE-Laufpuffer, 1x Probenpuffer, Ultrapure-Agarose

Mittels der analytischen Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach einer PCR, oder auch einer Restriktionsenzymanalyse aufgetrennt werden, da diese aufgrund ihrer Größe unterschiedlich schnell im elektrischen Feld wandern. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid können dann die einzelnen Fragmente unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera fotografiert werden. Abhängig von der

Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde hochreine Agarose (Fa. Roth, Karlsruhe) in Konzentrationen von 0,5-2% in Laufpuffer (w/v) eingesetzt. Die Agarose wurde dazu zunächst in 1x TAE-Puffer gelöst und vorsichtig in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen der flüssigen Agarose wurde diese in horizontale Gelkammern gegossen und abgewartet, bis sich die Agarose zu einem Gel verfestigte. Anschließend wurde das Gel mit Laufpuffer (versetzt mit Ethidiumbromid: 50 µl 1%ige Lösung pro 1000 ml) überschichtet.

Die gelelektrophoretisch aufzutrennenden Proben wurden zunächst mit Probenpuffer im Verhältnis 1:10 des Probenvolumens versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde dann bei 3 V/cm durchgeführt. Als Längenstandard zum Größenvergleich diente ein Marker der Fa. Boline, Luckenwalde (Hyperladder).

Die vollständig aufgetrennten Banden wurden schließlich auf einem Transluminator (FLX-10M, Fa. Biometra, Goettingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet und mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

### **3.7 Erstellung eines „Immunstatus“ bei Pferden**

Wie in der Einleitung beschrieben (1.5.2) machen die zellulären Bestandteile des Immunsystems den so genannten „Immunstatus“, das heißt den „Ist-Status“ der zellulären Abwehrleistung aus, durch den wesentliche Normveränderungen im Bereich der Leukozyten aufgezeigt werden können. Zur Erstellung des Immunstatus wurde einerseits die Methode der Durchflussszytometrie (3.7.1) und andererseits die Differentialblutbildanalyse (3.7.2) bei dieser Arbeit angewendet, deren genaue Durchführung im Folgenden beschrieben wird.

#### 3.7.1 Durchflussszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

##### Lösungen, Reagenzien, Medien:

RBC-Lysing Buffer (Erythrolyse-Puffer): Fa. Serotec  
CellWASH-Lösung: Fa. Becton Dickinson  
Monoklonale Antikörper: Fa. Serotec

##### *Markierung der Antigene:*

Die durchflussszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte im Labor Laboklin mittels der von Langbein *et al.* (2003) beschriebenen Methode, die jedoch für die Anwendung beim Pferd modifiziert wurde. Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)- und R. Phycoerythin (RPE)-konjugierte monoklonale Antikörper der Fa. Serotec (Oxford, UK) wurden zur spezifischen Identifizierung der Lymphozytensubpopulationen eingesetzt (Tab. 6). Zur Detektion von CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> wurde eine indirekte Methode verwendet, bei der ein nicht konjugierter primärer Antikörper mit einem FITC-konjugierten (CD5<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>) bzw. RPE-konjugierten (CD8<sup>+</sup>) anti-mouse-IgG-Sekundärantikörper markiert wurde. Die Antikörper zum Nachweis der Leukozyten und der B-Zellen hingegen waren direkt mit RPE- konjugiert.

Als Negativkontrolle wurde RPE- und FITC-konjugiertes Mäuse-IgG1 (Fa. Serotec, UK) eingesetzt.

Tab. 6 Verwendete Antikörper Pferd

Antikörper	Klon	Spezifität	Zellpopulation
MCA 1042 PE	YKIX 716.13	eCD45	Leukozyten
MCA 1781 PE	CA2.1D6	Evtl. CD21-Homolog	B- Zellen
MCA 1078	CVS4	eCD4	T-Helferzellen (Th-Zellen)
MCA 1079	CVS5	eCD5	T-Lymphozyten
MCA 1080	CVS21	eCD8	zytotoxische (CTL) und Suppressor T-Zellen

Zunächst wurden 100 µl EDTA-Blut bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 min mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mit RBC Lysing Buffer (Fa. Serotec, UK) entsprechend Herstelleranleitung für 10 min ebenfalls bei Raumtemperatur im Dunkeln mit anschließender Zentrifugation (Megafuge 1.0, Fa. Kendro, Langenselbold) bei 1500 UpM für 5 min. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Lymphozyten zweimal durch Zugabe von je 2 ml CellWash-Lösung (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) mit anschließender Zentrifugation bei 1500 UpM für 5 min gewaschen. Bei der indirekten Methode wurden die Zellen nach der Inkubation mit dem primären Antikörper zunächst ebenfalls mit CellWash-Lösung gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wie oben beschrieben.

#### *Messung und Auswertung*

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScalibur der Firma Becton Dickinson, wobei pro Messung 10000 Leukozyten erfasst und mittels der CELLQuest-Software Vers. 4.0.2 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet wurden. Das Auswertungs-fenster („gating“) wurde in Anlehnung an die von Langbein *et al.* (2003) bei Hunden und Katzen beschriebenen Methode festgesetzt. Im Gegensatz zum Hund, bei dem Leukozyten zunächst mit einem Panleukozyten Marker angefärbt, danach die Population der Lymphozyten markiert und anschließend im Vorwärts-/ Seitwärtsstreulichtfenster (FSC/SSC) angezeigt und übernommen werden (so genannte „backgating“ Methode), gibt es beim Pferd nämlich keinen solchen Panleukozyten-Marker. Im Pferdeblut - ähnlich wie im Humanblut - können Lymphozyten jedoch leicht anhand ihrer Größe und Granularität erkannt werden, weshalb man diese Population hier ohne „backgating“ identifiziert (Murakami *et al.*, 1999; Merant *et al.*, 2003; Chaffin *et al.*, 2004a). Diese letzte Variante wurde auch bei der hier vorgelegten Arbeit angewendet.

Zur Festsetzung der Referenzbereiche beprobten Tierärzte des Labors Laboklin selbst anamnestisch und adspektorisch gesunde Pferde in verschiedenen, mit dem Labor kooperierenden Beständen und erstellten zunächst ein ausführliches Blutbild. Sechzig Pferde, die keinerlei Normabweichungen aufwiesen, wurden anschließend einer durchflusszytometrischen Untersuchung unterzogen, deren Ergebnis zur Festlegung der Referenzbereiche herangezogen wurde. Eine spezielle ophthalmologische Untersuchung wurde bei den Pferden jedoch nicht durchgeführt, da die Methode im Vorfeld und unabhängig von der hier vorgelegten Arbeit etabliert wurde. Nach statistischer Berechnung der jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen standen die folgenden Referenzbereiche fest (Tab. 7):

Tab. 7 Referenzbereiche der Lymphozytensubpopulationen beim Pferd (Anteil der jeweiligen Subpopulationen in Prozent, bzw. als absolute Zahl in M/l)

	<b>CD21<sup>+</sup> Homolog</b>	<b>CD4<sup>+</sup></b>	<b>CD5<sup>+</sup></b>	<b>CD8<sup>+</sup></b>	<b>CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> Quotient</b>
<b>Wertebereich [%]</b>	6 – 17,5	37,5 – 55,5	54,5 – 78,5	15 – 26,5	1,67 – 3,37
<b>Absoluten Werte [M/l]</b>	150 – 406	832 – 1387	1235 – 2063	275 – 742	

### 3.7.2 Erstellung eines Differentialblutbildes

Das Labor Laboklin erstellte parallel zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen von den eingegangenen Proben der Studientiere auch ein Differentialblutbild. Die Untersuchung erfolgte mit standardisierten Zählautomaten der Hämatologie (ADVIA 120, Fa. Bayer, Leverkusen).

In Tab. 8 sind die Differentialblutbild-Referenzbereiche beim Pferd nach Kraft und Dürr (2005) aufgelistet.

Tab. 8 Differentialblutbild: Referenzbereiche beim Pferd (Anteil der jeweiligen Zellpopulation in Prozent, bzw. G/l bei Leukozytengesamtzahl)

	Leukos gesamt	Sgmtk. neutr.G.	Stabk. neutr.G.	Baso- phile G.	Eosino- phile G.	Mono- zyten	Lympho- zyten
Einheit	G/l	%	%	%	%	%	%
Werte- bereich	5 – 10	45 – 70	0 – 6	0 – 2	0 – 4	0 – 5	20 – 45

Leukos: Leukozyten  
 Sgmtk.: Segmentkernige  
 neutr.: neutrophile  
 G.: Granulozyten  
 Stabk.: Stabkernige

### 3.8 Serologische Methoden

Am Institut für Virologie der FU Berlin werden in der Routine-Diagnostik parallel zwei verschiedene serologische Methoden angewendet: der Serum-Neutralisationstest (NT) und der Immunfluoreszenztest (IFT), deren Ergebnisse als Titer angegeben werden. Eine Beurteilung der erhaltenen Titer kann jedoch nur durch die Untersuchung von Serumpaaren im Abstand von 3 bis 4 Wochen erfolgen. Als signifikant werden dabei Titerveränderungen um mindestens den Faktor 4 angesehen. Dennoch ist eine Beurteilung aufgrund laboreigener Erfahrungswerte selbst dann möglich, wenn nur eine einzelne Serumprobe vorhanden ist - dies war auch bei dieser Arbeit der Fall. Beide Tests wurden hierbei ausschließlich im Rahmen der EHV-2-Diagnostik durchgeführt, wobei EHV-2-Titer im NT von  $> 1:10$  bzw. im IFT von  $\geq 1:5120$  in Anlehnung an Borchers *et al.* (1998) als serologisch positiv beurteilt wurden.

#### 3.8.1 Neutralisationstest (NT)

##### Lösungen, Reagenzien, Medien:

EDM, EDM/ 5% FCS, CMC-Overlaymedium, 4% Formalin/PBS, Giemsalösung für die Mikroskopie

Dieser serologische Test dient dem Nachweis virusspezifischer Antikörper, die das jeweilige Virus neutralisieren können. Das bei der PBL-Isolierung aus dem EDTA-Blut gewonnene, bzw. das zusätzlich eingeschickte Serum, musste zunächst für 30 min im Wasserbad bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Anschließend wurde von jedem Serum eine logarithmische Verdünnungsreihe zur Basis 2 in EDM hergestellt, wovon jeweils 100  $\mu\text{l}$  in einer 24-Lochplatte vorgelegt wurden. Dann wurden pro Kavität 100  $\mu\text{l}$  einer in EDM-Medium auf  $10^3$  PFU/ml eingestellten Virussuspension zugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Feuchtbrutschrank bei 5%  $\text{CO}_2$  für 1 h inkubiert, um so eine ausreichende Bindung des möglicherweise im Serum vorhandenen Antikörpers mit dem Virus zu gewährleisten. Anschließend wurden pro Kavität noch  $10^4$  Zellen in 200  $\mu\text{l}$  EDM hinzugegeben und abermals im

Feuchtbrutschrank bei 37°C für 2 h inkubiert. Danach erfolgte eine Überschichtung der Ansätze mit etwa 400 µl CMC-Overlaymedium. Abschließend wurden die Platten bei EHV-2 nach 5 Tagen mit 4% Formalin in PBS fixiert und zum Sichtbarmachen der Plaques mit Giemsa-Lösung gefärbt. Der beim NT ermittelte Antikörper-Titer wurde als die Verdünnungsstufe des jeweiligen Serums angegeben, bei der eine 50%ige Plaquereduktion erfolgt ist. EHV-2 Titer von > 1:10 wurden als serologisch positiv beurteilt.

### 3.8.2 Immunfluoreszenztest (IFT)

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *1% Triton/ PBS:*

Triton x-100	10 ml
PBS	ad 1000 ml

##### 4% Formalin/PBS

anti-Spezies-IgG (H+L)-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)

##### 1% NCS/ PBS

Zunächst wurden virusabhängig Zellen (ED-, RK13- Zellen bei EHV-2 bzw. EHV-5, TUW-Zellen bei EAdV-1) auf einer 96-Lochplatte ausgesät und mit einer auf 10<sup>3</sup> PFU/ml eingestellten Suspension des entsprechenden Virus infiziert. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Feuchtbrutschrank bis zur Ausbildung von Plaques erfolgte die Fixierung mit 4% Formalin/PBS. Anschließend wurden die Platten bei 4°C im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für den eigentlichen Test mussten die Zellen zunächst durch Überschichtung mit 1% Triton/PBS aufgeschlossen, für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1% NCS/PBS gewaschen werden. Auf 96-Lochmikrotiterplatten wurden anschließend von dem zu untersuchenden Serum logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 2 mit 1% NCS/PBS hergestellt und jeweils 40 µl pro Kavität auf die vorbereitete 96-Lochplatte übertragen. Nach erfolgter 60minütiger Inkubation bei 37°C wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1% NCS/PBS entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden anschließend zur Darstellung mit 50 µl eines Ziege-Anti-Pferd-IgG (H+L)-FITC-Konjugates für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1% NCS/PBS sowie dem Aufpipettieren von 50 µl aqua bidest pro Kavität erfolgte die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Fa. Zeiss, Jena). Ausschlaggebend für die Bestimmung des jeweiligen Titers war die Verdünnungsstufe, bei der noch eine deutliche, antigenspezifische Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Als auffällig wurden Titergrenzwerte von  $\geq 1:5120$  im EHV-2-IFT angesehen.



### 3.9 Virus-DNA-Detektion mittels *In situ*-Hybridisierung

#### 3.9.1 Histologische Einbettung von Gewebeproben

##### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Zink-Formalin-Lösung (10%ige Stammlösung)*

Shandon Zinc Formal-Fixx™ Konzentrat	20 ml
Aqua bidest	80 ml

Die histologische Einbettung der in Zentrifugenröhrchen mit 4%igem Zink-Formalin (Shandon Zinc Formal Fixx, Fa. Thermo Electron Co., USA) gegebenen Gewebe wurde dankenswerter Weise von Frau Prof. Dr. A. Sterner-Kock und ihren Mitarbeitern im Institut für Veterinärpathologie der FU Berlin nach histologischen Standardmethoden durchgeführt. Dabei wurden ca. 5 µm dicke Paraffinschnitte der Konjunktivalgewebe von insgesamt 8 Augen der frisch geschlachteten Pferde (S 6, S 7, S 8, S 9 je rechts und links) angefertigt.

#### 3.9.2 DNA-Präparation aus Paraffinschnitten

##### Lösungen, Reagenzien, Medien:

Xylol, Ethanol absolut, Aqua bidest, Proteinase K-Verdaupuffer

Bei dieser Methode, die von Frau Dr. Borchers etabliert wurde (Smith und Borchers, 2001), wird die Qualität der histologischen Einbettung von Gewebeproben überprüft, da die Durchführung einer *In situ*-Hybridisierung nur dann sinnvoll ist, wenn auch genügend Zellmaterial auf den angefertigten Schnitten vorhanden ist. 3-4 ca. 5 µm dicke Paraffinschnitte von Geweben wurden zunächst in Küvetten mit Xylol für die Dauer von 10 min eingestellt und anschließend zweimal je 5 min in Ethanol absolut inkubiert. Nach dem Lufttrocknen der Objektträger wurden die Schnitte mit wenig Aqua bidest angefeuchtet, dann wurde das Zellmaterial mit einem sterilen Skalpell vorsichtig abgekratzt und in Zentrifugenröhrchen mit 100 µl Proteinase K-Verdaupuffer gegeben. Das weitere Vorgehen der DNA-Isolierung entsprach dem in Kap. 3.4.1 beschriebenen. 10 µl pro Probe wurden schließlich in die β-Aktin-PCR (3.6.1) zur Qualitätsüberprüfung eingesetzt (Ergebnisse nicht dargestellt).

### 3.9.3 Zytozentrifugation zur Herstellung von Positiv- und Negativkontrollen für die *In situ*-Hybridisierung

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Fotoflo-Lösung 1%ig:*

Fotoflolösung	2 ml
PBS	298 ml

##### *MgCl<sub>2</sub>-Waschpuffer:*

MgCl <sub>2</sub>	5 mM (1 ml 5M MgCl <sub>2</sub> )
PBS	ad 1000 ml

##### *Paraformaldehydlösung 4%ig:*

Paraformaldehyd	40 g
MgCl <sub>2</sub> -Waschpuffer	1000 ml

SDS-Lösung (10%ig), Aqua bidest, Ethanol 70%ig/absolut

Da für die *In situ*-Hybridisierung keine auf Objektträger (OT) aufgezogenen EHV-2 positiven Gewebe zur Verfügung standen die als Positivkontrollen hätten eingesetzt werden können, mussten EHV-2 infizierte Zellen mittels der Zytozentrifugation auf Objektträger gebracht werden. Nicht-infizierte RK13-Zellen wurden ebenfalls auf Objektträger zytozentrifugiert und dienten als Negativkontrolle.

Zunächst wurden die Objektträger in 10%iger SDS-Lösung sowie unter fließendem Leitungswasser und anschließend dreimal mit Aqua bidest gewaschen. Nach staub- und fettfreier Trocknung der OT im Brutschrank bei 37°C erfolgte das Einstellen in 1%ige Fotoflolösung (Fa. Kodak, Stuttgart) für 10 min mit anschließendem zweimaligen kurzen Waschen in PBS und staubfreier Trocknung bei Raumtemperatur.

Die mit einer Infektionsmultiplizität von 1 (m.o.i. = 1) mit den EHV-2-Stämmen LK4 bzw. T400 infizierten RK13-Zellen wurden am Tag 4 nach der Infektion von den Platten genommen (für die genaue Durchführung s. Kapitel 3.3.2), indem zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt wurde, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit einem Gummischaber von der Platte abgelöst und in 10 ml PBS aufgenommen wurden (mit den als Negativkontrolle dienenden nicht-infizierten RK13-Zellen wurde analog verfahren). Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 800 UpM. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml PBS resuspendiert und auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer Zählkammer wurde schließlich eine Zellsuspension mit  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eingestellt und auf Eis gelagert.

Anschließend erfolgte die Zytozentrifugation (Cytospin 3, Fa. Shandon, USA) indem zunächst die beschichteten Objektträger mit Filterpapier, in dem zwei Löcher perforiert waren, abgedeckt und mit einem Kunststofftrichter versehen wurden. In den Trichter wurden anschließend 200 µl einer eingestellten Zellsuspension (entspricht  $5 \times 10^5$  Zellen) gegeben und die Objektträger bei 200 UpM für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen der Trichter und

des Filterpapiers wurden die Objektträger getrocknet und durch Einstellen in 4%ige Paraformaldehydlösung für 10 min fixiert. Es folgte eine dreimalige Waschung in PBS-Waschpuffer und eine Dehydrierung in 70%igem und anschließend in Ethanol absolut für jeweils 10 min. Nach Lufttrocknung wurden die fixierten Objektträger in Alufolie eingewickelt und bis zu ihrem Gebrauch bei der *In situ*-Hybridisierung (3.9.6) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.9.4 Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUTP

##### Lösungen, Reagenzien, Medien:

###### *5M Ammoniumacetat*

Ammoniumacetat	5 M (35,04 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

0,2 M EDTA, absolutes Ethanol, Ethanol 80%ig, TE-Puffer  
Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit, Fa. Boehringer, Mannheim

Die Markierung von DNA wurde mit Gesamtvirusgenom-DNA von EHV-2 und EHV-5 sowie Genomfragmenten von EHV-2 (Stämme T16/T400, aus 2. Runde gB-PCR, 512 bp, 200 ng) durchgeführt. Die PCR-Amplifikate mussten hierfür zunächst mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Firma Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration der DNA über ein 2%iges Agarosegel bestimmt werden. Es wurden dann jeweils 150-200 ng der zu markierenden DNA in 15  $\mu\text{l}$  nucleasefreiem Wasser aufgenommen und für 10 min in ein  $95^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad zur Denaturierung gestellt und anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Die eigentliche Markierung der DNA wurde mit dem Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit (Fa. Boehringer, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt: jeder DNA-Ansatz wurde mit 2  $\mu\text{l}$  Hexanucleotid-Mix, 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Markierungsmix sowie 1  $\mu\text{l}$  Klenow-Enzym versetzt und das Volumen mit nucleasefreiem Wasser auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und gründlich gemischt. Die Inkubation erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht im Wasserbad. Durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  0,2M EDTA wurde die Enzymreaktion abgestoppt. Die Fällung der DNA wurde anschließend mit 40  $\mu\text{l}$  5 M Ammoniumacetat und 5  $\mu\text{l}$  Heringssperma-DNA (sspDNA, Stockkonzentration: 10 mg/ml), aufgefüllt mit nucleasefreiem Wasser bis auf 100  $\mu\text{l}$  sowie 300  $\mu\text{l}$  absolutem Alkohol durch Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 1 h durchgeführt. Nach erfolgter fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 20000 UpM in einer Hochgeschwindigkeitstischzentrifuge (Fa. Ole Dich, Dänemark) wurde das nach Abgießen des Überstandes erhaltene Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  80%igem Alkohol durch erneutes Zentrifugieren (15 min, 20000 UpM) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert. Der Erfolg der durchgeführten Markierung wurde im so genannten „Dot Blot“ (3.9.5) geprüft.

### 3.9.5 Dot Blot zur Überprüfung einer Digoxigenin-markierten Sonde

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *Puffer 1:*

Tris-HCl (pH 7,5)	0,1 M (50 ml 2 M Tris-HCl pH 7,5)
NaCl	0,1 M (20 ml 5 M NaCl)
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *Puffer 2:*

Blockierungsreagenz  
(Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit)  
0,5% (w/v) in Puffer 1

##### *Puffer 3:*

Tris-HCl (pH 9,5)	0,1 M (50 ml 2 M Tris-HCl pH 9,5)
NaCl	0,1 M (20 ml 5 M NaCl)
MgCl <sub>2</sub>	0,05 M (50 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> )
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *Puffer 4:*

Tris-HCl (pH 7,5)	0,01 M (5 ml 2 M Tris-HCl pH 7,5)
EDTA (pH 8,0)	1 mM (2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0)
Aqua bidest	ad 1000 ml

*Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT):* 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid (v/v)

##### *X-Phosphat:*

5-Bromo-4-chloro-2-indolylphosphat 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid (v/v)

##### *Färbelösung:*

NBT-Lösung	45 µl
X-Phosphat	35 µl
Puffer 3	ad 10 ml

Bei dieser Methode wurde ebenfalls das Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit (Fa. Boehringer, Mannheim) verwendet (3.9.4). Von der markierten Sonde wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  hergestellt und zusätzlich zu einer auf gleiche Weise verdünnten, markierten Kontrollsonde aus dem Kit (Konzentration: 5 µg/µl) auf eine Membran aus Nitrocellulose getropft. Nach vollständigem Lufttrocknen der Membran wurde diese zunächst kurz in Puffer 1 äquilibriert und anschließend 30 min mit Puffer 2 geblockt. Nach kurzem Waschen in Puffer 1 erfolgte die Inkubation der Membran mit 10-20 ml des 1:5000 in Puffer 1 verdünnten Anti-Digoxigenin-AP-Konjugates (Endkonzentration: 150 mU/ml) für 30 min bei Raumtemperatur. Ungebundenes Konjugat wurde durch Waschen mit Puffer 1 und anschließend mit Puffer 3 für jeweils 15 min entfernt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 10-20 ml Färbelösung (Membran sollte vollständig bedeckt sein) und anschließendem ruhigen Stehenlassen im Dunkeln erzielt. Nach Ausbildung einer deutlichen Färbung wurde die Reaktion durch Inkubation der Membran in Puffer 4 für mindestens 5 min gestoppt. Die Membran wurde anschließend luftgetrocknet und gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der Sonde wurde anhand der Verdünnungsreihe im Vergleich mit der Kontroll-DNA durchgeführt, indem die jeweils letzte sichtbare Verdünnungsstufe miteinander verglichen wurde.

### 3.9.6 *In situ*-Hybridisierung

#### Lösungen, Reagenzien, Medien:

##### *5 M MgCl<sub>2</sub> in PBS:*

MgCl <sub>2</sub>	47,6 g
PBS	ad 100 ml

##### *5 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS:*

5 M MgCl <sub>2</sub> in PBS	1 ml
PBS	ad 1000 ml

##### *2 mg/ml Glycin in PBS:*

Glycin	2 g
PBS	ad 1000 ml

##### *4% Paraformaldehyd in PBS/5 mM MgCl<sub>2</sub>:*

Paraformaldehyd	40 g
PBS/5 mM MgCl <sub>2</sub>	1000 ml

##### *20 x Standard Sodium Citrat (SSC):*

NaCl	3,0 M (175,3 g)
Natrium-Citrat	0,3 M (88,2 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *50 x Denhardt-Puffer:*

Ficoll	2 g
Polyvinylpyrrolidose	2 g
BSA	2 g
Aqua bidest	ad 200 ml

##### *400 ng/μl Lachssperma-DNA (ssp DNA)*

##### *100% Formamid (v/v) / 20% Dextransulfat (w/v)*

##### *Puffer 1:*

Tris-HCl (pH 7,5)	0,1 M (50 ml 2 M Tris-HCl pH 7,5)
NaCl	0,1 M (20 ml 5 M NaCl)
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *Puffer 3:*

Tris-HCl (pH 9,5)	0,1 M (50 ml 2 M Tris-HCl pH 9,5)
NaCl	0,1 M (20 ml 5 M NaCl)
MgCl <sub>2</sub>	0,05 M (50 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> )
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *Puffer 4:*

Tris-HCl (pH 7,5)	0,01 M (5 ml 2 M Tris-HCl pH 7,5)
EDTA (pH 8,0)	1 mM (2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0)
Aqua bidest	ad 1000 ml

##### *6% Bovine Serum Albumin (BSA)-Puffer:*

BSA	60 g
Puffer 1	ad 1000 ml

<i>Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT):</i>	50 mg/ml in 70% Dimethylformamid (v/v)
<i>X-Phosphat:</i>	
5-Bromo-4-chloro-indolylphosphat	50 mg/ml in 100% Dimethylformamid (v/v)
<i>Substrat:</i>	
NBT	4,5 µl
X-Phosphat	3,5 µl
Puffer 3	ad 1 ml

Xylol, Ethanol 70%/absolut, Fixo Gum (Abdichtkleber), Assistent Histokitt (zur Eindeckelung)

Diese Methode wurde in Anlehnung an die in der Arbeitsgruppe von Frau Borchers für EHV-1 und -4 etablierte Methode (Baxi *et al.*, 1996; Bartels *et al.*, 1998; Smith und Borchers, 2001) für den Nachweis von EHV-2 bei dieser Arbeit angewendet. Eingesetzt wurden die auf Objektträger aufgezogenen Gewebe der Schlachthofpferde sowie die durch Zytozentrifugation mit anschließender Fixierung erhaltenen Kontrollzellen (3.9.1, 3.9.3). Die Objektträger wurden zunächst durch zehnmütiges Einstellen in Xylol und anschließend zweimal fünfminütigem Inkubieren in absoluten Alkohol entparaffiniert. Danach wurden die Präparate 2 x 5 min in 5 mM MgCl<sub>2</sub>/PBS rehydriert. Zum Aufschluss der Membranen diente das Enzym Proteinase K (Fa. Boehringer, Mannheim), das mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml in PBS angesetzt und mit einer Glaspipette vorsichtig auf die Objektträger aufgetropft wurde. Nach erfolgter zehnmütiger (Kontrollzellen: 5 min) Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur wurde das Enzym durch dreimaliges Einstellen der OT in Glycin/PBS (2 mg/ml) für jeweils 5 min abgestoppt. Die Nachfixierung erfolgte durch fünfminütige Inkubation der OT in 4%iger Paraformaldehydlösung, deren überschüssige Reste zweimal mit 2 mg/ml Glycin/PBS abgelöst wurden. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert, indem die OT zunächst für je 5 min in 70%igem und absolutem Alkohol inkubiert und danach kurz (1-2 min) luftgetrocknet wurden.

Die eigentliche Hybridisierung wurde mit dem 50% Formamid/10% Dextransulfat, 2x Denhardt-Puffer, 2x SSC, 400 ng/µl ssp DNA und 100-200 ng/ml Sonde enthaltenden Hybridisierungsmix durchgeführt. Hierfür wurden pro Präparat 10 µl des Hybridisierungsmixes aufgetragen und in einer temperaturstabilen Schale im auf 120°C vorgewärmten Trockenschrank inkubiert, wodurch die DNA denaturiert wurde. Nach Farbumschlag des zusätzlich auf die OT aufgeklebten Hitzeindikators wurde die Schale mit den Schnitten sofort in eine mit Eiswasser gefüllte Styroporbox gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger mit Plastikdeckgläschen und Fixo Gum sorgfältig abgedichtet und 48 h in einer feuchten Kammer, getränkt mit 6 x SSC, bei 37°C inkubiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Deckgläschen mit einer Kanüle abgehoben und die OT zunächst zweimal kurz mit 2 x SSC abgespült und anschließend dreimal zehn Minuten in

2 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte im Wasserbad bei 55°C warmen 2 x SSC, danach kurz in 0,2 x SSC bei Raumtemperatur und anschließend in 42°C warmen 0,2 x SSC gewaschen. Nach dem Blocken für 20 min in 6% BSA-Puffer und dreimal zehnmütigem Waschen mit Puffer 1 erfolgte die Konjugation mit Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Fa. Enzo, Mannheim), die 1:5000 in Puffer 1 verdünnt wurden. Auf jeden OT wurden 100 µl des verdünnten Konjugats gegeben und 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer 1 (je 15 min) und zweiminütigem Äquilibrieren der OT in Puffer 3 folgte die Farbreaktion im Dunkeln mit 4,5 µl NBT/3,5 µl X-Phosphat/ml Puffer 3. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde die stetig zunehmende Farbreaktion kontrolliert und die Reaktion nach 20 min durch fünfminütige Waschung in Puffer 4 abgestoppt.

Als Vorbereitung für die Histokitt Einbettung wurden die OT über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, Xylol: je 5 min) dehydriert, anschließend mit dem Histokitt der Firma Assistent eingebettet und mit einem Deckglas zur dauerhaften Lagerung abgedeckt.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 100, Fa. Zeiss, Jena) zunächst in einer Übersichtsvergrößerung (16 x 10) und anschließend im Detail bei 40 x 10. Mittels der Kamera F3 von Nikon wurde die Fotodokumentation bei Blende 2 und mit Graufilter vorgenommen. Als Filmmaterial dienten Kodak Farblichtfilme mit 400 ASA.

### **3.10 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software MS Excel Version 2002, das Institut für Biometrie des Fachbereiches war dabei freundlicherweise beratend tätig. Eine Prüfung der Ergebnisse auf Signifikanz wurde sowohl bei der Studie mit dem Labor Laboklin (Kap. 4.2), als auch bei der diagnostischen Untersuchung von Blut- und Tupferproben auf EHV-2 bzw. EHV-5 (Kap. 4.3) durchgeführt. Bei der Studie mit dem Labor Laboklin sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen EHV-2 Tupfer- und/oder PBL-nPCR-positiven Pferden und Abweichungen beim Immunstatus besteht und ob bei augenkranken EHV-2-nPCR positiven Pferden möglicherweise häufiger Abweichungen festgestellt werden können, als bei EHV-2-nPCR negativen Kontrollpferden. Bei den diagnostischen Untersuchungen sollte hingegen untersucht werden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Merkmal „augenkrank“ und dem EHV-2 bzw. EHV-5 PCR-Nachweis in Tupfermaterial oder PBL besteht.

Da den Signifikanztests der hier vorgelegten Arbeit jedoch keine Stichprobenumfangsplanung vorausgegangen ist muss hierbei angemerkt werden, dass auch bei einem statistisch nicht gesicherten Unterschied keine Anteilsgleichheit in den miteinander verglichenen Populationen vorliegen muss, sondern durchaus gewisse Differenzen vorliegen können.

Die Analyse auf Signifikanz erfolgte mittels einer  $\chi^2$ -Vierfeldertafel und dem  $\chi^2$ -Test. Wenn bei der Vierfeldertafel der Prüfgrößenwert  $\chi^2$  bei 3,84 oder höher liegt und man eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  annimmt (entspricht einem kritischen Signifikanzniveau von 5%), dann kann man mit einer 95%igen Sicherheit von einem signifikanten Zusammenhang zwischen den betrachteten Parametern ausgehen. Bei der Studie mit dem Labor Laboklin wurde hingegen der so genannte „Fisher-Test“ durchgeführt, da der Fisher-Test auch bei geringen Stichprobengrößen noch das geforderte Niveau hält (als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde hier ebenfalls  $p < 0,05$  angenommen).

Eine Vierfeldertafel zum Beispiel zum Vergleich des Nachweises von EHV-2-Genom bei augenkranken und klinisch gesunden Pferden würde wie folgt aussehen:

	EHV-2-nPCR positiv	EHV-2-nPCR negativ	
Augenkranke Pferde	<b>a</b>	<b>b</b>	Anzahl der augenkranken Pferde <b>a + b</b>
Augengesunde Pferde	<b>c</b>	<b>d</b>	Anzahl der augengesunden Pferde <b>c + d</b>
	Anzahl aller Pferde mit nPCR-positivem EHV-2-Nachweis <b>a + c</b>	Anzahl aller Pferde mit nPCR-negativem EHV-2-Nachweis <b>b + d</b>	

Die dazugehörige Formel für den  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit lautet:

$$\frac{(ad - cb)^2 n}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)} = \chi^2$$