

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material und Methoden

##### 3.1.1 Materialnachweis

**BDH Chemicals, Ltd.**, Poole, UK: Carboxymethylcellulose  
**Biochrom AG**, Berlin: DMEM/Ham's F 12, FCS, NCS, PBS (w/o Ca, Mg)  
**BioGenex DCS Innovative Diagnostik-Systeme**, Hamburg: Super Sensitive Detection Kit  
**Bio Whittaker (Clonetics)**, Verviers, Belgien: Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM), Small Airway Epithelial Cell Growth Medium (SAGM)  
**Cell-Lining GmbH**, Berlin: Dispase II  
**DAKO Diagnostika GmbH**, Hamburg: Anti-Cytokeratin Z0622, Anti-Vimentin Clone V9  
**Life Technologies (Gibco BRL)**, Gaithersburg, USA:  $\lambda$ -DNA-*Hind* III, TRIzol, EDM  
**MBI Fermentas**, St.Leon-Rot: dNTP Set; 50bp DNA-Ladder, 6xLoading Dye Solution  
**PAA Laboratories GmbH**, Linz, Österreich: Accutase, Collagenase Typ 2  
**Promega**, Madison, USA: Agarose LE Analytical Grade, Oligo(dT)15 Primer, Nuklease freies Wasser, Rnasin Ribonuklease Inhibitor  
**Roche Diagnostics GmbH**, Mannheim: Expand Reverse Transkriptase Kit, Dnase I, Pronase  
**Roth**, Karlsruhe: Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat  
**Sigma**, Deisenhofen:  $\beta$ -Mercaptoethanol, Chloroform, EDTA, Isopropanol, Levamisol, Naphthol-AS-BI-Phosphat  
**Qiagen GmbH**, Hilden: Hot Star Taq DNA Polymerase Kit, RNeasy Mini Kit, Sensiscript Reverse Transcriptase Kit

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von Merck (Darmstadt) bezogen. Es wurde steriles Einwegmaterial von Nunc (Wiesbaden) und TPP Tissue culture (Trasadingen, Schweiz) verwendet.

##### Geräte

Biometra Agagel Standard G45/1	Biometra, Göttingen
CO2-Brutschrank CB	Binder, Tuttlingen
Cycler: Biometra T personal Kombi Block	Biometra, Göttingen
Biometra UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Eppendorf Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator TI 3	Biometra, Göttingen
Zentrifugen: EBA 8	Hettich, Tuttlingen
Eppendorf Centrifuge 54 17R	Eppendorf, Hamburg
Labofuge 400R	Heraeus, Berlin
Minifuge T	Heraeus, Berlin

### 3.1.2 Equine Trachealzellen (ET Zellen)

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften von equinem Trachealepithel untersucht. Dafür wurde überwiegend mit den **Equinen Trachealzellen (ET Zellen)** gearbeitet.

Es handelt sich hierbei um eine anfangs primäre Trachealepithelkultur aus dem Institut für Veterinär-Pathologie, für deren Anfertigung die Trachea eines frisch-getöteten Pferdes verwendet wurde (Wolfinger et al., 2002). Der Epithelzellcharakter der Primärzellkultur konnte mittels immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Methoden bestätigt werden (Wolfinger et al., 2002). Zu Beginn dieser Arbeit befand sie sich in der 9. Passage, mittlerweile ist sie zu einer permanenten Zelllinie weit über der 200. Passage transformiert. Damit handelt es sich bei den ET Zellen um die zweite permanente equine Zelllinie überhaupt (Wolfinger et al., 2002).

### 3.1.3 Vermehrung von Zelllinien

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Nährmedium: EDM (Dulbeccos Modifizierung von Eagle Medium)

EDM-Pulver für 10 l	
NaHCO <sub>3</sub>	37 g
PH mit HCl auf 7,2 einstellen	
Aqua bidest.	ad 10 l
1% Penicillin / Streptomycin	10x

PBS (Phosphat Buffered Saline), pH 7,4

NaCl	137 mM (8,00 g)
KCl	2,7 mM (0,20 g)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <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 dest.	ad 1 l

Trypsinlösung (0,25%)

Trypsin	2,5 g
EDTA-Dihydrat	2,0 mM (0,744 g)
PBS	ad 1 l

Serum neugeborener Kälber, Newborn calf serum (NCS)

EDM-, PBS- und Trypsinlösung, NCS sowie 10x Penicillin / Streptomycin wurden mir freundlicherweise vom Institut für Virologie, FU Berlin zur Verfügung gestellt.

Die permanenten Zelllinien wurden in EDM unter Zusatz von 5% NCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem begasbaren Feuchtbrutschrank vermehrt. Als Kulturgefäße wurden Plastikpetrischalen (TPP Tissue culture, Schweiz) verschiedener Größen verwendet. Die Zelllinien ET, ED und Vero wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 umgesetzt. Dazu wurden das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit Trypsinlösung benetzt. Nach dem Abnehmen der Trypsinlösung und einer Inkubation von ca. 5 min wurden die abgelösten Zellen in frischem EDM aufgenommen und auf sterile Kulturgefäße verteilt.

### 3.1.4 Immunhistochemie

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Primärantikörper: Z0622 (Rabbit Anti-Cytokeratin)  
Anti-Vimentin Clone V9 (mouse antibody)

Super Sensitive Detection Kit:

Sekundärantikörper: Super Sensitive Multilink  
Streptavidin-Biotin-Komplex: Super Sensitive Label

Waschpuffer: Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) 0,05 M, pH 7,6  
6,1 g Tris in 50 ml Aqua dest. lösen  
37 ml HCl hinzufügen  
8,8 g NaCl  
Aqua dest. ad 1 l

Substratpuffer: TBS 0,05 M, pH 8,7 (bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt)  
6,1 g Tris in 900 ml Aqua dest. lösen  
mit HCl auf pH 8,7 einstellen  
Aqua dest. ad 1 l

Levamisol  
Neufuchsin 5%  
NaNO<sub>3</sub> 4%  
Naphthol-AS-BI-Phosphat  
Dimethylformamid

EDM, Trypsin, Aceton, Hämalan, Methylgrün, Ethanol absolut, Xylol

Zellen verschiedenen Ursprungs können aufgrund ihrer unterschiedlichen Intermediärfilamente immunhistochemisch charakterisiert werden.

Der Epithelzellcharakter der ET Zellen wurde in der 85. Passage nochmals mit Hilfe einer Zytokeratin-Färbung überprüft, außerdem wurde eine Vimentin-Färbung durchgeführt, da

auch Zellen nicht-bindegewebigen Ursprungs in Kultur anfangen können, zusätzlich Vimentin zu exprimieren (Franke et al., 1979).

Es wurde das Biotin-Streptavidin-System verwendet, welches auf der Fähigkeit des Glykoproteins Streptavidin basiert, mit 4 Molekülen des Vitamins Biotin zu reagieren. Es handelt sich hierbei um eine indirekte Methode, bei der ein Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert ist, an den Primärantikörper bindet. Das dritte Reagenz ist ein Alkalische Phosphatase-konjugierter Streptavidin-Biotin-Komplex, der mit den freien Stellen des Streptavidins an das Biotin des Sekundärantikörpers ansetzt. Das Enzym Alkalische Phosphatase -und damit das Antigen- wird mit einem geeigneten Substrat sichtbar gemacht. Das Biotin-Streptavidin-System reagiert sehr sensibel und spezifisch, da Streptavidin eine hohe Affinität zum Biotin besitzt und Kohlenhydrate -welche unspezifisch binden können- fehlen.

Die ET Zellen wurden am Vortag mit Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst und in 10 ml EDM aufgenommen. Mit der Pipette wurde je ein Tropfen auf Silan-beschichtete, sterile Objektträger aufgebracht und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dadurch hafteten die Zellen fest am Objektträger und wurden nicht durch das wiederholte Inkubieren und Waschen abgespült. Nach der Inkubation erfolgte eine Fixierung für 10 min in Aceton.

Der Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:1100 (Z0622) bzw. 1:20 (Vimentin) in Waschpuffer verdünnt. Einige Tropfen dieser Verdünnungslösung wurden auf die Zellen auf dem Objektträger aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für eine halbe Stunde in einer mit Aqua dest. befeuchteten Kammer. Daraufhin wurde der Objektträger in Waschpuffer gewaschen und die Zellen für 20 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach Behandlung mit Waschpuffer wurde der Enzym-Komplex aufgetragen und erneut für 20 min inkubiert.

In dieser Zeit wurde das Substrat angesetzt:

1. 100 µl Neufuchsin +250 µl Nitritlösung (0,1g NaNO<sub>3</sub> auf 2,5 ml Aqua dest.)
2. 0,025 g Naphthol-AS-BI-Phosphat +300 µl Dimethylformamid
3. 0,024 g Levamisol (Blockierung des Enzyms) +50 ml Substratpuffer

3.+1.+2. wurden in dieser Reihenfolge gemischt und die Lösung anschließend durch eine Küvette filtriert.

Nach dem Waschen des Objektträgers wurden die Zellen mit der Substratmischung für 30 min inkubiert. Danach wurde mehrmals mit Waschpuffer gespült, mit Hämalaun bzw.

Methylgrün gegengefärbt, zweimal in Ethanol absolut und einmal in Xylol entwässert und eingedeckt.

### 3.1.5 Elektronenmikroskopie

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Cacodylatpuffer 0,1 M, pH 7,24 (bei 4°C aufbewahrt)  
21,4 g Cacodylsäure-Natriumsalz in 50 ml Aqua dest. lösen  
mit HCl auf pH 7,4 einstellen  
ad 1 l mit Aqua dest. auffüllen

Osmiumtetroxid 2%  
1 g OsO<sub>4</sub>  
in 50 ml Aqua bidest. lösen

Ethanol absolut, Aqua dest., Propylenoxid, PBS

Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von den ET Zellen angefertigt, um die für Epithelzellen typischen Zellverbindungen nachzuweisen.

Mit einem Glasspatel wurden die Zellen vorsichtig von einer Zellkulturplatte abgeschabt, in PBS aufgenommen und auf mehrere Eppendorfgefäße verteilt. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 500 U/min (Hettich, EBA 8) wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in Cacodylatpuffer gewaschen (5 min, 500 U/min). Anschließend erfolgte eine Vorkontrastierung mit Osmiumtetroxid (mit Cacodylatpuffer 1:1 gemischt) für 3 h. Nach nochmaligem Waschen in Cacodylatpuffer (3x10min-jeweils 5 min stehenlassen, 5 min zentrifugieren-, 500 U/min) wurden die Zellpellets in einer aufsteigenden Alkohoreihe bis zu Propylenoxid entwässert.

Anschließend wurden die Zellen zur Agar-Einbettung und weiteren Bearbeitung in die Elektronenmikroskopie des Instituts für Veterinär-Pathologie übergeben.

### 3.1.6 Virusinfektion der ET Zellen im Vergleich mit Equinen Dermalzellen (ED Zellen)

Lösungen, Reagenzien, Medien: EDM / 5%NCS, PBS, Trypsinlösung

**Tab. 1** Verwendete Virusstämme

Virus	Stamm	Referenz
EHV-1	A IV	Chowdhury et al. 1986
EHV-2	LK4	Plummer & Waterson, 1963
EHV-4	T 252	P. Thein
VSV	Indiana	Virusbank, Insel Riems
EAV	BUC	P. Thein
Equine Rhinitisviren:	P 1436/73 (ERBV) Perv (ERAV) 350/72 (ERAV)	P. Thein

VSV: Vesikuläres Stomatitis Virus; EAV: Equines Arteriitis Virus

Die verwendeten Viren und Zelllinien (außer ET Zellen) wurden mir freundlicherweise vom Institut für Virologie, FU Berlin zur Verfügung gestellt.

Es wurde die Permissivität der **ET Zellen** für EHV-1, -2, -4, EAV, VSV und für die Equinen Rhinitisviren Perv, P 1436/73 und 350/72 getestet sowie Wachstumskurven für diese Viren erstellt. Als Vergleich dienten **Equine Dermalzellen** (ATCC –Nummer: CCL-57, v. P. Thein modifiziert; ATCC = American Type Culture Collection). EHV-1, -2 und -4 sowie die equinen Rhinitisviren wurden als primär respiratorische Erkrankungen auslösende Erreger für die Infektion der ET Zellen ausgewählt. EAV (RNA-Virus, Familie: Arteriviridae) als Erreger der equinen Virusarteriitis verursacht beim Pferd neben der Panvaskulitis ebenfalls eine respiratorische Symptomatik. Das RNA-Virus VSV gehört zur Familie der Rhabdoviridae und ist der Erreger der Vesikulären Stomatitis. Empfänglich sind außer den Klautieren auch Equiden und Primaten. VSV wird oft als Referenzvirus genutzt, um die Wirkung von antiviralen Substanzen zu testen. Es zeigt ein gutes Wachstum auf vielen Zellarten, deshalb sollte untersucht werden, ob VSV ebenfalls ET Zellen infiziert.

Die ET Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der 45. Passage.

Es wurde jeweils eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte Equiner Tracheal- bzw. Dermalzellen pro Virus verwendet. Der Zellrasen wurde mit einer Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection, m.o.i.) von 0,1 infiziert, ausgehend von einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  entsprach dies einem jeweiligen Virustiter von  $1 \times 10^5$  PFU (plaquebildende Einheiten) / ml.

Für die Infektion wurde das Nährmedium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Die eingestellte Virussuspension wurde aufgegeben und unter leichtem Schwenken auf den Zellen verteilt. Nach einer Stunde im Feuchtbrutschrank wurde das Inokulum abgenommen, nochmals mit PBS gespült und frisches Nährmedium zugegeben. Die Zellen wurden wieder im Brutschrank inkubiert und jeden Tag unter dem Lichtmikroskop nach Veränderungen durchmustert. Nach drei Tagen wurde der Überstand abgenommen und nach Zentrifugation für 5 s bei 8000 U/min (Heraeus, Labofuge 400R) in einem sterilen Eppendorfgefäß für die Titration aufgenommen. Die Zellen wurden nach Spülung mit PBS mit Trypsin benetzt und ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in 2 ml EDM (ohne NCS) aufgenommen. Davon wurde 1 ml passagiert, d.h. in eine Vertiefung einer neuen 6-Loch-Platte gegeben und frisches Nährmedium (mit 5% NCS) zugegeben.

Ein Teil der übrigen Zellsuspension wurde logarithmisch verdünnt und mit einer permissiven Zellkultur kokultiviert. Diese Methode diente dem Nachweis von evtl. vorhandenem latenten Virus in den Zellen und gleichzeitig dessen Titration.

Die restlichen Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen bei  $-80^\circ\text{C}$  lysiert und danach titriert, um vorher zellgebundenes und dadurch evtl. freigewordenes intaktes Virus zu erfassen.

Insgesamt wurden die infizierten Zellen nach Erstinfektion zweimal passagiert, wobei jeweils die Überstände, sowie die intakten und die lysierten Zellen titriert wurden. In Fällen, in denen eine fast vollständige Zerstörung der Zellen durch das Virus vorlag und somit keine Zellen passagiert werden konnten, wurden mit 200  $\mu\text{l}$  des Überstandes neue Zellen infiziert.

### 3.1.7 Virustitration

Lösungen, Reagenzien, Medien:

CMC-Overlaymedium (Carboxymethylcellulose):

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

4% Formaldehydlösung in PBS

37% Formaldehyd	10,8 ml
PBS	ad 100 ml

Giemsalösung, EDM mit NCS

CMC-Overlaymedium wurde mir freundlicherweise vom Institut für Virologie zur Verfügung gestellt.

EHV-1, -2 und -4 sowie VSV und Rhinitisvirus P 1436/73 wurden mit **ED** Zellen titriert. Für die Titration von Rhinitisvirus Perv und Rhinitisvirus 350/72 wurden **ET** Zellen und für EAV eine Zelllinie aus Nierenzellen von Grünen Meerkatzen (**Vero**) verwendet.

Ein Aliquot der virushaltigen Zellüberstände, lysierten Zellen bzw. abtrypsinierten Zellen zur Kokultivierung wurde logarithmisch zur Basis zehn in EDM verdünnt. Jeweils 0,2 ml jeder Verdünnungsstufe wurden in zwei Vertiefungen einer 24-Lochplatte aufgebracht. Danach wurden pro Vertiefung  $10^4$  Zellen in je 0,2 ml EDM mit NCS dazugegeben und die Platten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurde jede Vertiefung mit 0,4 ml CMC-Overlaymedium überschichtet, um die extrazelluläre Virusausbreitung zu verhindern. Nach der Ausbildung von Plaques wurden die Zellen mit 4% Formalin für eine Stunde fixiert und danach mit Giemsalösung gefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Plaques ausgezählt und die Virustiter in PFU / ml angegeben.

### **3.1.8 Stimulation / Infektion der ET Zellen für den Einsatz in die RNA-Präparation**

Lösungen, Reagenzien, Medien: EDM /5%NCS, Trypsinlösung, PBS

Um Aussagen über die Aktivierung oder Beeinflussung der Zytokin-mRNA-Expression nach viraler Infektion bzw. unspezifischer Stimulation zu erhalten, wurden die ET Zellen mit verschiedenen Viren infiziert bzw. mit unspezifischen Stimulantien behandelt und nach verschiedenen Zeiten für die RNA-Präparation eingefroren. Es wurde ultrazentrifugiertes und mit frischem Nährmedium verdünntes Virus verwendet, um Beeinflussung der Zellen durch lösliche Bestandteile in Zellkulturüberständen auszuschließen.

Als Negativkontrolle für jeden Zeitpunkt dienten nicht infizierte / stimulierte Zellen, die ansonsten der gleichen Behandlung unterworfen wurden. Es wurde pro Virus / Stimulanz jeweils eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte mit ET Zellen verwendet.

Das Nährmedium wurde abgenommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Dann wurde die eingestellte Suspension sowie je 500 µl EDM (ohne NCS) aufgetragen und unter leichtem Schwenken auf der Platte verteilt. Nach einer Stunde Inkubation wurde der Überstand abgenommen, mit PBS gespült und frisches Nährmedium (mit NCS) zugegeben. Nach festgelegten Zeiten Inkubation im Feuchtbrutschrank wurden das Nährmedium entfernt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin benetzt. Nach ca. 5 min wurden die abgelösten Zellen in je 1,5 ml PBS aufgenommen, in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und 5 s bei 8000 U/min zentrifugiert (Heraeus, Labofuge 400R). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet bei -80°C für die RNA-Präparation eingefroren.

#### **3.1.8.1 Unspezifische Stimulation**

Um das gesamte evtl. vorhandene Zytokinspektrum nachweisen zu können, sollten die ET Zellen unspezifisch stimuliert werden. Für diesen Zweck wurden Substanzen genutzt, die in der Lage sind, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu aktivieren. Sie wurden mir freundlicherweise vom Institut für Virologie zur Verfügung gestellt.

Dabei handelte es sich zum einen um mitogene Pflanzeninhaltsstoffe (Lektine) in Form von Phythämagglutinin (PHA-M) und *Pokeweed Mitogen* (PWM) sowie um Lipopolysaccharide (LPS). Weiterhin wurden Phorbol 12-Myristat 13-Acetat zusammen mit Ca-Ionophor (PMA-Ca) verwendet.

Für die Stimulation der ET Zellen in der 11. (PMA-Ca, PWM) bzw. in der 13. Passage (PHA-M, LPS) wurden jeweils 10 µl PHA-M (Endkonzentration 10 µg/ml), 10 µl PWM (10 µg/ml), 4 µl LPS (2 µg/ml) oder je 1 µl PMA (0,1µg/ml) + 1µl Ca-Ionophor (1 µg/ml) aufgegeben. Im Unterschied zur Virusinfektion wurde der Überstand nicht nach einer Stunde durch frisches Nährmedium ersetzt sondern verblieb auf dem Zellrasen. Da unspezifische Stimulanzien in Zellen sehr frühe Gene aktivieren können, wurden die ET Zellen nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h mit Trypsin abgelöst und eingefroren.

### **3.1.8.2 Virale Infektion**

Die ET Zellen wurden mit einer Infektionsmultiplizität von 2-5, d.h. einem Virustiter von  $2-5 \times 10^6$  PFU / ml infiziert.

Für die Infektionsversuche wurden eingefrorene Reserven der ET Zellen aufgetaut und in der 9. Passage mit EHV-1, -2 und -4 sowie Rhinitisvirus Perv und Rhinitisvirus 350/72 infiziert. Für diesen Infektionsversuch wurden die Epithelzellen 24 h vor der Infektion auf serumfreies EDM umgestellt, da schon geringe Mengen an Hydrokortison, welches im Serum enthalten ist, die Produktion von GM-CSF unterdrücken kann (Churchill et al., 1992). Die infizierten Zellen sowie je eine nichtinfizierte Zellkontrolle wurden nach 4 h und 24 h für die Weiterverwendung eingefroren.

In der 13. Passage wurden die ET Zellen nochmals mit EHV-2 sowie in der 25. Passage mit Rhinitisvirus Perv und 350/72 infiziert und infizierte Zellen sowie die Zellkontrollen nach 1 h, 4 h, 24 h, 30 h, 48 h und 72 h eingefroren.

Die späteste Infektion erfolgte in der 48. Passage mit EHV-1, -2, -4, EAV, VSV sowie Rhinitisvirus Perv und 350/72, die Epithelzellen (infizierte Zellen und Negativkontrollen) wurden nach 6 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h eingefroren.

### 3.1.9 Anfertigung weiterer primärer Trachealepithelkulturen

Lösungen, Reagenzien, Medien:

PBS (Ca/Mg-frei)  
DNase I (10 mg/ml)  
Pronase (20 mg/ml)  
Dulbecco's modified Eagle medium F-12  
Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM)  
Small Airway Epithelial Cell Growth Medium (SAGM)  
Accutase  
Dispase II  
Kollagenase Typ 2

PBS, 10x Penicillin / Streptomycin, Trypsin, NCS

Es wurde der Versuch unternommen, nach der modifizierten Methode von Schroth et al. (1999) und Wolfinger et al. (2002) von weiteren Pferden primäre Trachealepithelkulturen zu präparieren.

Dafür wurde die Trachea von insgesamt 25 frisch-getöteten Pferden verwendet. Die Luftröhren stammten entweder von Pferden, die in das Institut für Veterinär-Pathologie zur Sektion eingeliefert und nicht vor länger als 24 h getötet worden waren oder von gerade geschlachteten Pferden aus einem Schlachthof in Brandenburg. Dabei wurden Pferde gewählt, deren Lungen makroskopisch keine oder nur minimale pathologische Veränderungen aufwiesen.

Es wurde jeweils die Bifurkation der Trachea mit ca. 10 cm Stammbronchien entnommen und während des Transportes auf Eis gelagert. Die Schleimhautschicht der Trachea am Übergang in die Stammbronchien wurde in kleinen Stücken mit sterilen Instrumenten abgelöst und in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben. Die Proben wurden mehrmals mit PBS gewaschen, um Blut- und Schleimreste zu entfernen. Dann wurden 10 ml PBS (Ca/Mg-frei: verbesserte Ablösung der Zellen voneinander), 1 ml 10x Penicillin / Streptomycin, 1 mg/ml DNase I sowie 0,14% Pronase hinzugegeben. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen durch vorsichtiges Rühren für eine halbe Stunde mit einem Magnetrührer von ihrer Unterlage und voneinander getrennt. Der zellreiche Überstand wurde abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (Heraeus, Minifuge T, 1500 U/min, 5min). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in Dulbecco's modified Eagle medium F-12 mit 5% NCS und 1% Penicillin / Streptomycin aufgenommen, auf sterile Zellkulturplatten verteilt und im Brutschrank inkubiert. Dies diente der Abtrennung der Fibroblasten von den Epithelzellen. Nach einer Stunde wurde das Nährmedium mit den nicht

abgesetzten Zellen abgenommen und für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Ein Teil der Zellen wurde in EDM, der andere Teil entweder in SAGM oder BEGM aufgenommen, auf neue Zellkulturplatten verbracht und im Brutschrank inkubiert. Nach drei Tagen wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit PBS gespült und mit frischem Nährmedium versehen. Nach ca. einer Woche wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und mit 1 ml einer Dissoziationslösung benetzt. Nach Einwirken dieser Lösung zwischen 5-15 min wurden die Zellen in dem jeweiligen frischen Nährmedium aufgenommen und in neue Kulturgefäße verbracht. Zur Ablösung der Zellen kamen außer Trypsin auch Accutase, Dispase II und Kollagenase Typ 2 zur Anwendung.

### **3.1.10 Untersuchung von Trachealepithel von weiteren Pferden**

#### **3.1.10.1 ohne Kultivierung**

Lösungen, Reagenzien, Medien: PBS, EDM /5% NCS, 4% Formalin

Die oberste Zellschicht der Stammbronchien von frisch-toten Schlachthopferden wurde vorsichtig mit einem Skalpell abgenommen. Die gewonnenen Zellen wurden nach mehrmaligem Waschen mit PBS (zentrifugiert für 5 min bei 1500 U/min, Heraeus, Minifuge T) für die RNA-Präparation eingefroren. Insgesamt erfolgte dies bei 15 Pferden. Mit dieser Methode sollte eine Aussage über das Zytokinspektrum des Trachealepithels *ex vivo* gemacht werden können. Gleichzeitig erfolgte ein Ausstrich auf dem Objektträger mit anschließender Färbung nach Pappenheim, um eine mikroskopische Charakterisierung der Zellen vornehmen zu können.

Von zwei Pferden (Nr.14 und Nr.15) wurden je zwei ca. 1 cm breite Ringe aus der Trachea geschnitten. Das erste Gewebestück wurde vor dem Abschaben der obersten Zellschicht mit dem Skalpell entnommen. Der zweite Trachealring wurde aus der abgeschabten Trachea geschnitten, um die Tiefe der gewonnenen Zellschicht beurteilen zu können. Die Gewebeproben wurden in 4% Formalin fixiert und zur weiteren Bearbeitung in das Institut für Veterinär-Pathologie gegeben. Dort wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden wurde eine PAS (Perjodsäure-SCHIFF-Reaktion)-Färbung durchgeführt. Mit dieser Färbung werden Kohlenhydrate sichtbar gemacht, so daß eine Beurteilung der Basalmembran möglich ist.

### **3.1.10.2 mit Kultivierung und Infektion zum Einsatz in die RNA-Präparation**

Von vier Pferden (Nr.7, 13, 14 und 15) wurden die Zellen nach dem Waschen in 700 µl EDM (mit 5% NCS) aufgenommen, auf 7 Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturplatte verteilt und sofort mit einer Infektionsmultiplizität von 2-5 infiziert (plus eine nicht infizierte Zellkontrolle). Dies entspricht bei einer geschätzten Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung einem Virustiter von  $2-5 \times 10^5$  PFU / ml. Die eingestellten Virussuspensionen von EHV-1, -2, -4 und Rhinitisvirus Perv, 350/72 sowie P 1436/73 wurden zugegeben und die Zellen nach 4 h (Pferd Nr.7 und 13) bzw. 24 h (Pferd Nr.14 und 15, zusätzlich hier Zellkontrolle nach 4 h) für die RNA-Präparation eingefroren.

### 3.1.11 RNA-Präparation aus Zellen für den Einsatz in die RT-PCR

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der RNA-Präparation angewandt. In den meisten Fällen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gearbeitet.

Lösungen, Reagenzien, Medien:

RNeasy Mini Kit: RLT Puffer  
RW 1 Puffer  
RPE Puffer  
Nuklease freies Wasser

Ethanol absolut  
14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)  
70% Ethanol      verdünnt mit Nuklease freiem Wasser

Vor Benutzung eines neuen Kits wurden zu dem RPE Puffer vier Volumen Ethanol absolut dazugegeben.

Zu Beginn der Präparation wurde die erforderliche Menge an RLT Puffer in ein RNase freies Eppendorf-Röhrchen pipettiert und mit 10  $\mu$ l  $\beta$ -ME auf 1 ml RLT Puffer vermischt.

Ausgehend von einer Menge von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen wurde das Zellpellet in 350  $\mu$ l RLT Puffer (mit  $\beta$ -ME) lysiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. RLT Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, welches gleichzeitig RNasen deaktiviert. Anschließend wurde die gleiche Menge an 70% Ethanol dazugegeben, um die Voraussetzungen für die Bindung der RNA an die Silicon-Gel-Membran zu schaffen. Die gesamte Flüssigkeit wurde auf die im Kit enthaltene RNA-bindende Säule mit Silicon-Gel-Membran übertragen. Nach 20 sec Zentrifugieren mit 8600 U/min (Eppendorf Centrifuge 54 17R) wurde der Durchfluß verworfen. Auf die Säule wurden 700  $\mu$ l RW 1 Wasch-Puffer gegeben und wieder für 20 sec mit 8600 U/min zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen gestellt und zweimal mit 500  $\mu$ l RPE Wasch-Puffer zentrifugiert, einmal für 20 sec mit 8600 U/min, beim zweiten Mal für 2 min mit 14000 U/min, um die Membran zu trocknen und alle Ethanolreste zu entfernen.

Anschließend wurde die Säule in ein RNase freies Eppendorf-Röhrchen gegeben und die RNA durch Zentrifugieren für 1 min bei 8600 U/min mit 35  $\mu$ l Nuklease freiem Wasser eluiert.

Am Schluß erfolgte die Konzentrationsbestimmung im Photometer (Eppendorf Bio Photometer) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zusätzlich wurde als Reinheitskontrolle der

RNA der 260 nm/280 nm-Wert mit erfaßt, der regelmäßig im gewünschten Bereich zwischen 1,9-2,1 lag. Die gewonnene RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Von Zellen, die durch Abschaben mit dem Skalpell gewonnen wurden, konnte mit dem RNeasy Mini Kit nicht ausreichend RNA extrahiert werden. In diesen Fällen wurde daraufhin das modifizierte Protokoll zur RNA-Extraktion nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) genutzt.

Lösungen, Reagenzien, Medien:

TRIZol	einphasige Lösung von Phenol und Guanidinisothiocyanat
Chloroform	
Isopropanol	
75% Ethanol	verdünnt mit RNase freiem Wasser
Nuklease freies Wasser	

Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIzol aufgenommen und durch wiederholtes Pipettieren lysiert. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur, wurde es 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 12500 U/min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 54 17R). Der Überstand wurde in ein RNase freies Eppendorf-Gefäß überführt und mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform vermischt. Danach wurde das Gefäß für 15 sec kräftig geschüttelt. Nach erneuter Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur wurde es für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 12500 U/min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 12500 U/min. Daraufhin wurde der Überstand von dem entstandenen gelähnlichen Pellet abgegossen. Es wurden 1 ml 75% Ethanol hinzugegeben und das Röhrchen kurz auf den Vortexer gehalten. Danach wurde für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde unter einer Lampe getrocknet und in 35  $\mu\text{l}$  Nuklease freiem Wasser gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde die extrahierte RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.1.12 RT-PCR

#### 3.1.12.1 Reverse Transkription

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Expand Reverse Transcriptase Kit: Expand RT: MMLV/ H- (Moloney Mäuse  
(Roche Diagnostics GmbH) LeukämieVirus mit Punktmutationen der Rnase H-)  
5xExpand RT Puffer  
Dithiothreitollösung (DTT)

Oligo(dT)15 Primer 50  $\mu$ M

RNasin Ribonuclease Inhibitor

dNTP Set, bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, each 100 mM

Nuklease freies Wasser

Um eine gebrauchsfertige dNTP-Lösung zu erhalten, wurden je 4  $\mu$ l jedes dNTPs in insgesamt 100  $\mu$ l Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

In Silicon-beschichtete 0,6 ml Röhrchen wurden pro Ansatz 1  $\mu$ g RNA sowie 1  $\mu$ l Oligo(dT)15 Primer gegeben und ggf. das Volumen mit Nuklease freiem Wasser auf 10,5  $\mu$ l aufgefüllt. Dieses RNA-Primer-Gemisch wurde im Heizblock für 5 min bei 75°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Dann wurde das RT-Gemisch pipettiert:

RT-Gemisch pro Ansatz: 4  $\mu$ l RT Puffer (Endkonzentration 1x)  
2  $\mu$ l DTT (10mM)  
0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor (20 Einheiten)  
2  $\mu$ l dNTPs (400 $\mu$ M each)  
1  $\mu$ l Expand RT (50 Einheiten)  
9,5  $\mu$ l insgesamt

9,5  $\mu$ l des RT-Gemisches wurden je Ansatz zu dem RNA-Primer-Gemisch dazugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen für 45-60 min bei 42°C inkubiert, bevor daraufhin die Reverse Transkriptase bei 95°C für 5 min zerstört wurde. Die entstandene komplementäre DNA (cDNA) wurde bei -20°C gelagert.

In die darauffolgende Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden 2  $\mu$ l der cDNA eingesetzt.

Wenn bei RNA-Extraktionen weniger als 100  $\mu$ g RNA /ml pro Reaktion gewonnen werden konnten, wurde für die RT-Reaktion die Sensiscript Reverse Transcriptase (Quiagen) eingesetzt, um genügend cDNA für die nachfolgende PCR-Reaktion zu erhalten.

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Sensiscript Reverse Transcriptase Kit: Sensiscript Reverse Transcriptase: keine  
weiteren Angaben vom Hersteller  
10xRT Puffer  
dNTP Mix, 5 mM each  
Nuklease freies Wasser

Oligo(dT)15 Primer 50  $\mu$ M  
RNasin Ribonuclease Inhibitor

Zuerst wurde das RT-Gemisch hergestellt:

RT-Gemisch pro Ansatz: 2  $\mu$ l RT Puffer (Endkonzentration 1x)  
2  $\mu$ l dNTP Mix (500 $\mu$ M each)  
0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor (20 Einheiten)  
1  $\mu$ l Sensiscript RT  
5,5  $\mu$ l insgesamt

Das Gemisch wurde auf Eis aufbewahrt.

Dann wurden in Silicon-beschichtete 0,6 ml Röhrchen pro Ansatz 500 ng RNA sowie 2  $\mu$ l Oligo(dT)15 Primer gegeben und das Volumen ggf. mit Nuklease freiem Wasser auf 14,5  $\mu$ l aufgefüllt. Zu jedem Ansatz wurden je 5,5  $\mu$ l des RT-Gemisches pipettiert und daraufhin 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zerstörung der Sensiscript RT bei 93°C für 5 min wurde die cDNA bei -20°C gelagert. In die folgende PCR wurden 4  $\mu$ l der cDNA eingesetzt.

### **3.1.12.2 Polymerase Kettenreaktion**

Stichprobenartig wurde eine PCR zum Nachweis von evtl. DNA-Kontamination der extrahierten RNA durchgeführt. Dafür wurden statt cDNA pro Ansatz 1  $\mu$ l der extrahierten RNA mit Zytokin-Primern (siehe Tabelle 3) in die PCR eingesetzt. Ansonsten wurde wie in den PCR zum Nachweis der Zytokin-mRNA vorgegangen.

Ebenfalls stichprobenartig wurde eine  $\beta$ -Aktin-PCR (Zimmermann et al., 1994) zur Überprüfung der cDNA-Qualität durchgeführt. Bei  $\beta$ -Aktin handelt es sich um ein Strukturprotein, welches in allen eukaryonten Zellen anzutreffen ist. Deshalb dient die  $\beta$ -Aktin-PCR der Überprüfung der angewendeten Methode. Die Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen dieser PCR sind in Tabelle 2 angegeben.

**Tab. 2**  $\beta$ -Aktin-PCR: Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen

Primer	Sequenz 5'-3'	Temperatur	Produktgröße
$\beta$ -Aktin s	GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC	56°C	248 bp
$\beta$ -Aktin as	GCGCTCGTCGTCGACAACGG		

s: Strang (sense) as: Antistrang (antisense) bp: Basenpaare

Die Zytokin-Primer wurden mit Hilfe der Computersoftware MacVector (Oxford Molecular Group Sequence Analysis Software) ausgewählt. Dabei diente die GenBank als Quelle für die Sequenzen (außer IL-11 und IL-13, persönl. Mitteilung, Steinbach).

**Tab. 3** In der PCR verwendete Zytokin-Primer:

Equines IL	Primersequenz 5'-3'	Genposition	Produktlänge
IL-1 $\alpha$ s	ATGTCTCTGAGCACCTCTGAAACC	154	562 bp
as	GATGGGCAACCGATTTGAAGTAG	715	
IL-1 $\beta$ s	CAGCGGCAATGAGAATGACC	42	367 bp
as	GGACAGCACCCAGGGATTTATGG	408	
IL-2 s	TGCATCGCACTAACTCTTGACAG	25	338 bp
as	CATGTGAATCTTGTTCAGACCCC	362	
IL-4 s	CCAACTGATTCCAGCTCTGGTC	15	318 bp
as	ACAGTACAGCAGGTCCCGTTTG	332	
IL-5 s	CGATGGGAACCTGATGATTCCTAC	138	268 bp
as	TCAGCCTTCTATTGTCCACTCAGTG	381	
IL-6 s	TGGTGATGGCTACTGCTTTCCC	59	517 bp
as	CGAAGGATGAGGTGAGTTGTTGTG	575	
IL-8 s	TGTGTGAAGCTGCGGTTGTATC	56	217 bp
as	GCCTGCACAATAATCTGCACCC	251	
IL-10 s	CCTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC	207	252 bp
as	CCTTTCTCTTGGAGCTTACTGAAGG	458	
IL-11 s	GACAAATTCCCAGCCGACG	184	375 bp
as	GTCGAGCGTCAGGTGCAGTC	539	
IL-13 s	GGTCAACATCACCCAGAACCAG	108	161 bp
as	GGCAGAGTTTAGTCAGCATCTTCC	245	
IFN $\gamma$ s	CAGAGCCAAATCGTCTCCTTCTAC	205	256 bp
as	TCTTCCGCTTCCTCAGGTTAGC	439	
GM-CSF s	CTTCTTCTGGGCACTGTGGTTTAC	19	400 bp
as	TCCAGCAGTTAAACGGGATCTC	397	
TNF $\alpha$ s	CCAGAGGGAAGAGCAGTTACCG	174	349 bp
as	GTAGGCAGAGAGGAGGTTGACC	501	

s: Strang (sense) as: Antistrang (antisense) bp: Basenpaare

Es stellte sich heraus, daß mit den Primern für IL-10 auch EHV-2 nachgewiesen wurde. So konnten die Infektionsversuche mit EHV-2 für IL-10 nicht ausgewertet werden.

Für die PCR-Reaktionen wurde das Hot Star Taq DNA Polymerase Kit (Quiagen) verwendet.

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Hot Star Taq Polymerase Kit: Hot Star Taq DNA Polymerase 5 units/ $\mu$ l  
10xPCR Puffer  
5x Q-Solution

dNTPs, bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 mM each  
Nuklease freies Wasser

Die Amplifikation wurde in einem Volumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Als Matritze dienten 2  $\mu$ l (Expand RT) bzw. 4  $\mu$ l (Sensiscript RT) der cDNA.

Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung wurden je 10  $\mu$ l dNTP in 100  $\mu$ l Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

Pro PCR-Ansatz: 10  $\mu$ l Q-Solution (Endkonzentration 1x)  
5  $\mu$ l PCR Puffer (1x)  
1  $\mu$ l dNTPs (200 $\mu$ M each)  
1  $\mu$ l Primer sense 20 $\mu$ M (0,4 $\mu$ M)  
1  $\mu$ l Primer antisense 20 $\mu$ M (0,4 $\mu$ M)  
0,3  $\mu$ l Hot Star Taq DNA Polymerase (1,5 Einheiten)  
ad 48  $\mu$ l (Expand RT) bzw. 46  $\mu$ l (Sensiscript RT) mit Nuklease freiem Wasser

Der Ansatz wurde in 0,2 ml Rörchen gefüllt und die cDNA dazu pipettiert.

Für jede Reaktion wurde zusätzlich eine Positiv- und eine Negativ- (Substanzen-) kontrolle angesetzt. Die Positivkontrolle bestand aus PBMCs nach Stimulation mit Concanavalin A und wurde mir freundlicherweise von S. Mauel aus dem Institut für Virologie, FU Berlin zur Verfügung gestellt. Für IL-11 wurden RNA-Präparationen aus eigenen Versuchen genutzt.

Die Reaktion verlief nach folgendem Programm, es wurden Heizblockcycler mit beheizbarem Deckel (Biometra T personal Kombi Block, Biometra UNO-Thermoblock, Eppendorf Mastercycler personal) verwendet:

Initiale Denaturierung der DNA und Aktivierung der DNA-Polymerase	95°C, 15 min
Denaturierung	95°C, 30 sec
Annealing	primerspezifische Temperatur (siehe Tabelle 4), 30 sec
Synthese	72°C, 1 min
Finale Extension	72°C, 10 min
Anzahl der Zyklen	35-40 (siehe Tabelle 4)

**Tab. 4** Primerspezifische „Annealing“-Temperaturen und Zyklenanzahl

Interleukin	Annealing-Temperatur	Zyklen
1 $\beta$ , 2, 4, 6, 11,13, TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN $\gamma$	58°C	35
1 $\alpha$ , 8, 10	56°C	40
5	53,7°C	35

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben bis zum Auftragen auf Agarose-Gel bei 4°C aufbewahrt.

### 3.1.13 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen, Reagenzien, Medien:

TAE-Puffer 50x:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	121,25g
	Na-Acetat	10,33g
	EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	9,25g
	Mit HCl auf pH 8 einstellen	
	Aqua dest	ad 500ml

Ethidiumbromid-Lösung 1%

Laufpuffer: 1x TAE

Ladepuffer: 6x Loading Dye Solution

Die horizontale Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe. Dazu wurde Agarose in einer Konzentration von 1,5% in 1x Laufpuffer gelöst. Dann wurde die Lösung in einer Mikrowelle erhitzt und 100 ml Agaroselösung nach dem Abkühlen (auf ca.60°C) mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 2 ng/ml) versetzt. Das Gel wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Festwerden mit Laufpuffer überschichtet. Zusätzlich zu den Proben wurden DNA-Längenstandards aufgetragen, die der zu erwartenden Größe der DNA entsprachen (50 bp DNA-Leiter,  $\lambda$ -DNA-*Hind* III). Alle Proben wurden mit 1/6 Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand in dem

Biometra Agagel Standard bei ca.70 V statt. Nach Beendigung der Laufzeit wurden die Banden auf einem UV-Transilluminator (Biometra, TI 3) bei 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.