

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien-, Gebrauchsmaterialien- und Gerätenachweis

3.1.1 Chemikaliennachweis

BDM Laboratory Supplies, Poole, UK: Carboxymethylcellulose-Natriumsalz

Biochrom AG, Berlin: Biocoll Separating Solution $\delta = 1,077$

Boehringer Ingelheim, Heidelberg: Sodium-Dodecylsulfat (SDS)

Dianova, Hamburg: Ziege-Anti-Pferd-IgG (H+L) FITC-Konjugat

Difco, Michigan, USA: Trypsin

Life Technologies (Gibco-BRL), Gaithersburg, USA: Agarose (ultrapure), DNA-Längenstandards (λ /Hind III, Φ X 174 RF DNA/Hae III, 100bp Leiter), Eagle's minimum essential medium, Dulbeccos's modification (EDM), Ethidiumbromid, Foetal Calf Serum (FCS), Newborn Calf Serum (NCS)

Merck, Darmstadt: Chemikalien, wenn nicht anders vermerkt

Metabion, Martinsried: Auftrags-Oligonukleotidsynthese

New England Biolabs, Frankfurt am Main: Restriktionsenzyme und dazugehörige Reaktionspuffer

Perkin Elmer, Überlingen: dNTP

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden: Ficoll 400

Promega, Madison, USA: nukleasefreies Wasser

Qiagen, Hilden: 10x PCR-Reaktionspuffer, Genomic-tip 20/G, Taq-Polymerase, Q-Puffer

Roche Diagnostics, Mannheim: DNase 1, Proteinase K, RNase A

Roth, Karlsruhe: GiemsaLösung

Sigma Chemical, St. Louis, USA: 3-(N-Morpholino) -Propansulfonsäure, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) -Dinatriumsalz Dihydrat, Penicillin G, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), Streptomycinsulfat

3.1.2 Gebrauchsmaterialien- und Gerätenachweis

Assistent, Sondheim: Neubauer-Zählkammer

Beckmann Coulter, Fullerton, USA: SW-27-Rotor, SW-50-Rotor

Biometra, Göttingen: FLX-20M (Transluminator), Personal-Cycler (PCR-Cycler)

Carl Zeiss, Oberkochen: Axiovert 100 (Fluoreszenzmikroskop), ICM 405 (Lichtmikroskop)

Heraeus Christ, Hanau: begasbarer Feuchtbrutschrank, Minifuge 2

Kendro Laboratory Products, Wien, Österreich: Clean Air (Sterilbank)

Medscand Medical, Malmö, Schweden: Cytobrush Plus GT

Ole Dich, Hvidovre, Dänemark: Microcentrifuge 154

OmniGene, Cambridge, USA: Hybaid limited (PCR-Cycler)

Ratiomed, Megro GmbH, Wesel: Einmalskalpelle

Shimadzu, Kyoto, Japan: UV-1202 (Photometer)

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

3.2 Testgruppen

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden Proben von insgesamt 74 natürlich gehaltenen Pferden und von einem abortierten Fötus untersucht. Sie wurden den Einsendern entsprechend in 2 Gruppen eingeteilt.

1. Die erste Gruppe setzt sich aus 28 augenkranken (T1-T28) und 28 gesunden (K1-K28) Equiden zusammen. Als gesund galten Tiere, bei denen sich weder in der ophthalmologischen- noch in der klinischen Allgemeinuntersuchung Hinweise auf eine Erkrankung zeigten. Sie wurden in Kooperation mit der Pferdeklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover (TiHoHa) 2mal im Abstand von 4-5 Wochen beprobt, wobei Augentupfer, Nasentupfer und Blutproben entnommen und intensiv molekularbiologisch, virologisch und serologisch untersucht wurden.

2. Im Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität (FU) -Berlin wurden - soweit dies aus organisatorischen Gründen möglich war - von 18 natürlich gehaltenen Pferden (P1-P3, P5-P16, P18-P20), die weder Anzeichen einer Augenerkrankung noch einer EHV-2-Infektion aufwiesen, und ferner von einem abortierten Fötus (P17) Proben folgender Gewebe entnommen und molekularbiologisch untersucht:

Konjunktiva	Tränendrüse
Sehnerv	Lunge

Teilweise untersucht wurden: Trigemininalganglion, Kammerwasser und Nasenschleimhaut. Bei dem Pferd T11 wurde zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung eine Extirpation des rechten Auges vorgenommen. Konjunktiva, Tränendrüse und Sehnerv erhielten die Nummer P4 und wurden wie die übrigen Proben dieser Gruppe behandelt.

3.3 Viren und Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Referenzstämme (Tabelle 2) wurden von PD Borchers (Berlin), Prof. Ludwig (Berlin) und Prof. Thein (München) zur Verfügung gestellt.

Dabei wurden für EHV-1: A IV; für EHV-2: LK4, T16, T400, Melissa; für EHV-4: T252 und für EHV-5: P48 als Referenzstämme verwendet.

Im Laufe der Arbeit gewonnene Isolate wurden nach der in dieser Arbeit vergebenen Nummer benannt und sind in Tabelle 16 aufgeführt. Alle Viren wurden auf equinen Dermalzellen (ED-Zellen) gezüchtet.

Tabelle 2 Verwendete Viren

Virus	Isolat	Herkunft	Referenz
EHV-1	A IV	Fohlen, Abort	Chowdhury et al., 1986
EHV-2	LK4	Pferd, Rhinopneumonitis	Plummer & Waterson, 1963
	T16	Fohlen, Keratokonjunktivitis	Thein & Böhm, 1976
	T400	Fohlen, untere Atemwege	Thein & Härtel, 1976
	Melissa	Pferd, PBMC	Kershaw et al., 2001
EHV-4	T252	Fohlen, Nasensekret	Thein & Härtel, 1976
EHV-5	P48	Przewalski-Pferd, PBMC	Borchers et al., 1999c

3.3.1 Zellkulturen

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Nährmedium: Eagle´s minimum essential medium, Dulbeccos´s modification (EDM)

EDM-Pulver für 10 l

NaHCO ₃	37,0 g
Penicillin G	0,2 g
Streptomycinsulfat	0,2 g
Aqua bidest.	ad 10,0 l
pH 7,2	

Phosphat Buffered Saline (PBS)

NaCl	137,0 mM (8,0 g)
KCl	2,7 mM (0,20 g)
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	8,0 mM (1,42 g)
KH ₂ PO ₄	1,8 mM (0,24 g)
Aqua bidest.	ad 1,0 l
pH 7,4	

Trypsinlösung (0,25%)

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

Serum neugeborener Kälber (Newborn Calf Serum [NCS]), Fötales Kälberserum (Foetal Calf Serum [FCS])

Die Zellen wurden in Plastikpetrischalen (TPP Tissue culture, Trasadingen, Schweiz) mit Dulbecco's Modifizierung von Eagle's Medium (Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modification - EDM [Life Technologies, Gaithersburg, USA]) unter Zusatz von 5% Foetal Calf Serum (FCS [Life Technologies, Gaithersburg, USA]) bzw. Newborn Calf Serum (NCS [Life Technologies, Gaithersburg, USA]) in begasbaren Feuchtbrutschränken (Heraeus Christ, Hanau) bei 37 Grad Celsius (°C) und 5% CO₂ gehalten. Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Kulturmedium abpipettiert und dann wurden die Zellen kurz mit Trypsin (Difco, Michigan, USA) überschichtet. Nach Entfernung des Trypsins erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten (Min.) bei Raumtemperatur, während der sich die Zell-zu-Zell-Verbindungen lösen konnten. Schließlich wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in einer neuen Petrischale ausgesät.

Die verwendete permanente ED-Zell-Linie entstammt der Institutssammlung.

3.3.2 Virusvermehrung

Lösungen, Reagenzien, Medien:

PBS, EDM, Trypsinlösung (0,25%)

Zur Virusvermehrung wurden ED-Zellen in Kulturmedium in einer Plastikpetrischale ausgesät und bis zur Ausbildung eines semikonfluenten Zellrasens für ca. 24 Stunden im Feuchtbrutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde entfernt und der Zellrasen mit einer Virussuspension infiziert, die auf eine Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection [m.o.i.]) von 0,1 eingestellt wurde und die durch vorsichtiges Schwenken über den Zellrasen verteilt wurde. Es folgte eine Inkubation im Feuchtbrutschrank bei 37 °C für eine Stunde, während der die Viren die Zellwände penetrieren konnten. Überschüssige Virussuspension wurde durch Waschen des Zellrasens mit Phosphatpuffer (Phosphat Buffered Saline [PBS]) entfernt und frisches EDM hinzugegeben. Nach jeweils 5-7 Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 umgesetzt, bis deutliche cytopathische Effekte (cpE) erkennbar waren. Das virushaltige Medium wurde dann abpipettiert und zur Entfernung grober Zellbestandteile bei 3000 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 10 Min. zentrifugiert (Minifuge 2 [Heraeus Christ, Hanau]). Der virushaltige Überstand wurde zur weiteren Verwendung bei -70 °C tiefgefroren.

3.3.3 Virustitration

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Carboxymethylcellulose-Overlaymedium (CMC)

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

4% (v/v) Formalinlösung in PBS

Formalin (37%)	10,8 ml
PBS	ad 100,0 ml

NCS, EDM, GiemsaLösung

Die Virussuspension wurde logarithmisch zur Basis 10 in EDM/NCS verdünnt, und es wurden je 200 µl der Verdünnungsstufen in jeweils zwei Kavitäten einer 24-Lochplatte (TPP Tissue culture, Trasadingen, Schweiz) gegeben. Dann wurden in jedes Loch 5×10^4 in 200 µl EDM/NCS gelöste, permissive Zellen hinzupipettiert, und die Platte wurde für eine Stunde bei 37 °C im Feuchtbrutschrank inkubiert. Damit keine extrazelluläre Infektionsausbreitung stattfinden konnte, wurde jeder Zellrasen mit 400 µl Carboxymethylcellulose-Overlaymedium (CMC [BDM Laboratory Supplies, Poole, UK]) überschichtet.

Der Ansatz wurde dann bis zum Auftreten deutlicher, virusspezifischer Plaques bei 37 °C im Feuchtbrutschrank inkubiert. Zur besseren Darstellung wurden die Zellen, um sie zu fixieren, für 20 Min. mit 4% Formalin/PBS inkubiert und anschließend für 15 Min. mit GiemsaLösung (Roth, Karlsruhe) gefärbt. Um den Virustiter zu bestimmen, wurden die Plaques unter einem Lichtmikroskop (ICM 405 [Carl Zeiss, Oberkochen]) ausgezählt und in Plaque-bildenden Einheiten (Plaque forming units [PFU]) /ml angegeben.

3.3.4 Isolierung und Reinigung von DNA aus VirionenLösungen, Reagenzien, Medien:**Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)**

Tris(Hydroxymethyl) -Aminomethan	10,0 mM (1,21 g)
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	1,0 mM (3,72 g)
Aqua dest.	ad 1,0 l
pH 8,0 mit HCl einstellen	

DNase-Puffer

MgCl ₂	10,0 mM (95,21 mg)
CaCl ₂	2,0 mM (22,2 mg)
Tris(Hydroxymethyl) -Aminomethan	20,0 mM (242,28 mg)
Aqua dest.	ad 100,0 ml
pH 7,4 mit HCl einstellen	

0,2 M EDTA

EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	0,2 M (74,4 g)
Aqua dest.	ad 1,0 l
pH 8,0	

Sodium-Dodecylsulfat-(SDS) -Lösung 10% (w/v)

SDS	10,0 g
Aqua dest.	ad 100,0 ml

QBT-Puffer

NaCl	750,0 mM (21,915 g)
3-(N-Morpholino) -Propansulfonsäure	50,0 mM (5,23 g)
Triton X-100	0,15% (15,0 ml 10%ige Lösung)
Ethanol absolut (abs.)	15% (75,0 ml)
Aqua dest.	ad 500,0 ml
pH 7,0	

QC-Puffer

NaCl	1,0 M (29,22g)
3-(N-Morpholino) -Propansulfonsäure	50,0 mM (5,23 g)
Ethanol abs.	15% (75,0 ml)
Aqua dest.	ad 500,0 ml
pH 7,0	

QF-Puffer

NaCl	1,25 M (36,525 g)
Tris(Hydroxymethyl) -Aminomethan	50,0 mM (3,028 g)
Ethanol abs.	15% (75,0 ml)
Aqua dest.	ad 500,0 ml
pH 8,5 mit HCl einstellen	

Sucroslösung 30% (w/v) in TE, DNase 1, RNase A, Proteinase K, Isopropanol, Ethanol 70%

Der - wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben - gewonnene virushaltige Überstand wurde mit 5 ml 30%iger Sucrose/Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) unterschichtet und bei 24000 UpM in einem SW-27-Rotor (Beckmann Coulter, Fullerton, USA) für 90 Min. ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml DNase-Puffer aufgenommen. Nach

Zugabe von je 5 µl DNase 1 (Endkonzentration 2U/ml [Roche Diagnostics, Mannheim]) und RNase A (Endkonzentration 5 µg/ml [Roche Diagnostics, Mannheim]) erfolgte eine Inkubation im Wasserbad für 30 Min. bei 37 °C, um zelluläre Nukleinsäuren zu verdauen. Um die Nukleasen zu inaktivieren, wurden 250 µl 0,2 M EDTA (Endkonzentration 50 mM [Sigma Chemical, St. Louis, USA]) dazugegeben und danach 10%ige Natriumdodecylsulfat (Sodium-Dodecylsulfat [SDS]) -Lösung (Endkonzentration 0,1% [Boehringer Ingelheim, Heidelberg]) und 100 µl Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml [Roche Diagnostics, Mannheim]) hinzupipettiert. Dann folgte über Nacht eine Inkubation im Wasserbad bei 56 °C, während der die Proteinase proteinhaltige Bestandteile wie Virushülle und Kapsid abbaute. Die Aufreinigung der viralen DNA erfolgte mittels Genomic-tip 20/G-Säulen (Qiagen, Hilden) über das Ionen-Austauscher-Prinzip. Zur Fällung der DNA wurden 0,7 Volumen absolutes Isopropanol hinzugegeben und für 15 Min. bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert (Microcentrifuge 154 [Ole Dich, Hvidovre, Dänemark]). Nach einer Waschung des Pellets mit 70%igem Ethanol und anschließender 15minütiger Zentrifugation bei 15000 g und 4 °C wurde das so gewonnene DNA-Pellet unter einer Sterilbank (Clean Air [Kendro Laboratory Products, Wien, Österreich]) luftgetrocknet und dann über Nacht in 50-100 µl TE-Puffer auf einem Rotationsschüttler resuspendiert.

3.4 Serologische Tests

Die Ermittlung von Antikörpertitern im Serum erfolgte durch Neutralisationstest (NT) und indirekten Immunfluoreszenztest (IFT). Ersterer dient dem Nachweis der das Virus neutralisierenden Antikörper, letzterer erfaßt auch andere Antikörper.

Klinisch auffällige Titer lassen sich am besten an Hand von Serumpaaren ermitteln. So sollte mit dem Einsetzen klinischer Symptome umgehend eine Blutprobe (Akutserum) genommen werden, die mit einer zweiten - 4-5 Wochen später entnommenen - Probe (Rekonvaleszenzserum) verglichen wird. Als klinisch relevant gilt ein Titeranstieg um mindestens den Faktor 4. Als Referenzstamm für EHV-2 wurde Melissa verwendet.

3.4.1 Neutralisationstest (NT)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

EDM/NCS, CMC, 4% Formalin/PBS, Giemsalösung

Das Serum wurde für 30 Min. im Wasserbad auf 56 °C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Es wurde dann logarithmisch zur Basis 2 in EDM/NCS verdünnt. Jeweils 100 µl davon wurden in eine Kavität einer 24-Lochplatte gegeben und dann noch 100 µl einer - mit 10³ PFU/ml eingestellten - Virussuspension hinzupipettiert. Während der folgenden Inkubationszeit von einer Stunde im Feuchtbrutschrank bei 37 °C konnten die

möglicherweise vorhandenen Antikörper an das Virus binden und es neutralisieren. Danach wurden in jede Kavität 10^4 ED-Zellen gegeben, die Platte wurde erneut für eine Stunde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend wurde jede Verdünnungsstufe mit $400\text{ }\mu\text{l}$ CMC überschichtet. Als Kontrollen wurden eine Zellkontrolle ohne Virus, eine Viruskontrolle ohne Serum und eine Positivkontrolle, in der ein Serum mit bekanntem Titer verwendet worden war, mitgeführt. Eine Fixierung in 4% Formalin/PBS mit anschließender Giemsa-Färbung erfolgte nach einer 10-tägigen Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Feuchtbrutschrank.

Der Titer ist die Verdünnungsstufe, bei der im Vergleich zur Viruskontrolle eine Plaquereduktion um 50% stattfand. Als auffällig galt ein Titer von $\geq 1:20$.

3.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

1% Triton/PBS

Triton x-100	10,0 ml
PBS	ad 1,0 l

4% Formalin/PBS, 1% NCS/PBS, Ziege-Anti-Pferd-IgG (H+L) FITC-Konjugat

Vorbereitend wurden ED-Zellen auf einer 96-Lochplatte (TPP Tissue culture, Trasadingen, Schweiz) ausgesät, mit einer m.o.i. von 0,1 mit EHV-2 infiziert und bis zur Ausprägung von cpE bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Dann wurden sie mit 4% Formalin/PBS fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Zu Beginn des eigentlichen Tests wurden die Zellen mit 1% Triton/PBS für 30 Min. bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um die Zellmembranen aufzuschließen und so auch intrazelluläre Antigene für die Antikörper erreichbar zu machen. Anschließend wurde 3mal mit 1% NCS/PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das zu untersuchende Serum logarithmisch zur Basis 2 verdünnt und danach wurden jeweils $40\text{ }\mu\text{l}$ der Verdünnungsstufen in eine Kavität gegeben. Während der anschließenden einstündigen Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ konnten möglicherweise vorhandene Antikörper an die viralen Antigene binden. Danach wurde, um ungebundene Antikörper zu entfernen, 3mal mit 1% NCS/PBS gewaschen. Um gebundene Pferdeantikörper darzustellen, wurden $40\text{ }\mu\text{l}$ Ziege-Anti-Pferd-Ig (Immunglobulin) G (H+L) -Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) -Konjugat ($1,5\text{ mg/ml}$ [Dianova, Hamburg]) aufgetragen und für eine Stunde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach wurde erneut 3mal mit 1% NCS/PBS gewaschen und abschließend wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ destillierten Wassers (aqua destilata [Aqua dest.]) in jede Kavität gegeben. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100 [Carl Zeiss, Oberkochen]), wobei der Titer als die letzte Serumverdünnung angegeben wurde, bei der noch deutliche, antigenspezifische Fluoreszenz sichtbar war. Als auffällig galt ein Titer von $\geq 1:5120$.

3.5 Gewinnung und Bearbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

3.5.1 Isolierung von equinen PBMC

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Biocoll Separating Solution $\delta = 1,077$ (Biocoll), PBS

Aus der Jugularvene gewonnenes Zitratblut wurde aufgemischt und in einem sterilen Röhrchen (TPP Tissue culture, Trasadingen, Schweiz) vorsichtig über 33% Volumen Biocoll Separating Solution $\delta = 1,077$ (Biocoll [Biochrom AG, Berlin]) geschichtet. Als Negativkontrolle wurde mit PBS überschichtetes Biocoll mitgeführt. Durch Zentrifugation für 15 Min. bei 1900 UpM entstand ein Dichtegradient. Die weißliche, dünne Lymphozytenbande lag zwischen einer Serum- und einer Biocoll-Phase. Unter letzterer befand sich ein Pellet aus kleineren Blutbestandteilen wie beispielsweise den Erythrozyten. Die Lymphozyten wurden in ein neues Röhrchen überführt, in PBS gewaschen und durch 5minütige Zentrifugation bei 1500 UpM pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert.

3.5.2 DNA-Isolierung aus PBMC

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer

Tris(hydroxymethyl) -Aminomethan	50,0 mM (6,057 g)
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	1,0 mM (3,72 g)
Tween 20	0,5% (5,0 ml)
Aqua dest.	ad 1,0 l

Proteinase K

Die mittels Biocoll-Zentrifugation gewonnene Lymphozytenlösung (Kapitel 3.5.1) wurde pelletiert, in 100 μ l Proteinase K-Verdaupuffer resuspendiert und nach Zugabe von 1 μ l Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) über Nacht im Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurden die Proben für 10 Min. auf 95 °C erwärmt. Anschließend wurden sie, zur Bestimmung der DNA-Konzentration, photometrisch bei 260 nm vermessen (UV-1202 [Shimadzu, Kyoto, Japan]).

3.6 Gewinnung und Bearbeitung von Tupferproben

3.6.1 Gewinnung von Tupferproben

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Tupferisoliermedium

Penicillin G	5000 I.E.
Streptomycinsulfat	5,0 µg
EDM-Medium	ad 50,0 ml

Bei der Beprobung der Test- und Kontrollgruppentiere, die in der Klinik für Pferde der TiHoHa durchgeführt wurde, erfolgte die Probennahme aus dem Auge mit sterilen, trockenen Wattetupfern (im folgenden Wattetupfer genannt) und mit Cytobrush Plus GT (im folgenden Cytobrush genannt; ein waschbürstenartiger Probenträger der Firma Medscand Medical, Malmö, Schweden; Bild 1) aus den Konjunktivalsäcken beider Augen, wobei pro Auge eine Wattetupferprobe und 2 Cytobrushproben genommen wurden. Die Beprobung der Nasenschleimhaut erfolgte mit nur einem Wattetupfer. Die Proben wurden umgehend in sterile 2 ml Eppendorfgefäße mit 1 ml Tupferisoliermedium gegeben und bei 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

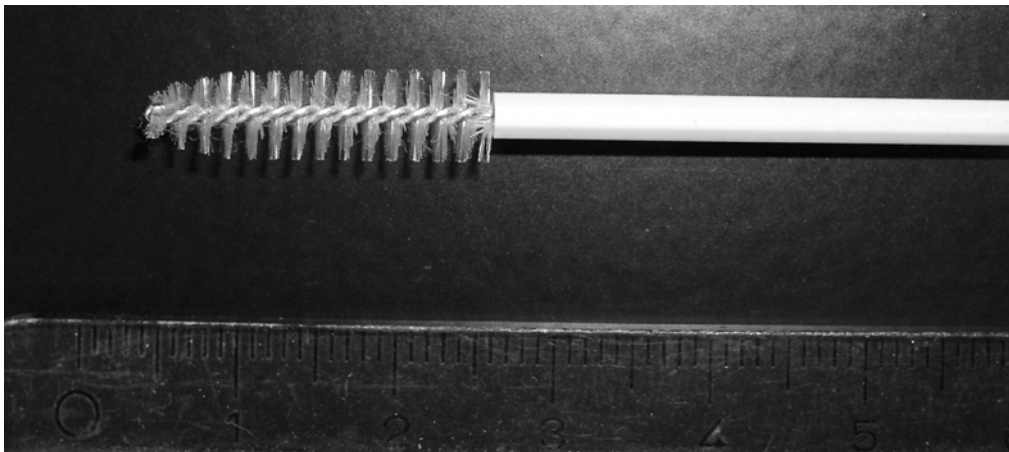


Bild 1 Cytobrush Plus GT der Firma Medscand Medical, Malmö

3.6.2 Isolierung von DNA aus Tupferproben

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer, Proteinase K

Die Proben wurden in dem Tupferisoliermedium kräftig aufgeschüttelt und der Probenträger wurde dann gründlich im Medium ausgedrückt. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g für 30 Min. wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in Proteinase K-Verdaupuffer

resuspendiert. Es wurde Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) hinzugegeben, das Ganze über Nacht bei 56 °C im Wasserbad inkubiert und dann für 10 Min. auf 95 °C erwärmt. Danach wurden 10 µl der so aufgearbeiteten Probe in die nPCR (Kapitel 3.8.2) eingesetzt.

Bei den Cytobrushproben wurde das Tupferisoliermedium der beiden aus ein und demselben Auge stammenden Proben nach dem Ausdrücken gepoolt, und es wurden 250 µl davon für die Kokultivierung (Kapitel 3.8.1) entnommen. Danach wurde, so wie weiter oben beschrieben, mit der Zentrifugation fortgefahren.

3.7 Gewinnung und Bearbeitung von *post-mortem*-Geweben

3.7.1 Gewinnung von *post-mortem*-Geweben

Mit autoklavierten Pinzetten und Scheren und mit Einmalskalpellen (Ratiomed, Megro GmbH, Wesel) wurden, soweit dies möglich war, beiderseits Konjunktivae, Tränendrüsen, Sehnerven und die Trigeminalganglien sowie ein Stück des rechten, mittleren Lungenlappens aus natürlich verstorbenen oder euthanasierten Pferden entnommen. In zwei Fällen erfolgte auch eine Beprobung der Nasenschleimhaut.

Unter Zuhilfenahme einer sterilen Kanüle wurde das Kammerwasser der vorderen Augenkammer entnommen und in Eppendorfgefäße überführt. Alle anderen Gewebe wurden in sterile Plastikgefäße getan und bis zur Verarbeitung auf Eis gekühlt.

3.7.2 Isolierung von DNA aus *post-mortem*-Geweben

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer, Proteinase K

Ein jeweils etwa linsengroßes Stück der verschiedenen Gewebe wurde mit Einmalskalpell-Klingen möglichst fein zerkleinert und ca. 50 mg davon wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben. Es wurden 500 µl Proteinase K-Verdaupuffer und Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) hinzupipettiert. Das Ganze wurde für 24-48 Stunden bei 56 °C inkubiert, dann für 10 Min. auf 95 °C erwärmt und schließlich der DNA-Gehalt photometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.7.3 Aufarbeitung von Kammerwasserproben

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer, Proteinase K

Das Kammerwasser wurde in einem SW-50-Rotor (Beckmann Coulter, Fullerton, USA) bei 24000 UpM für 60 Min. ultrazentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Proteinase K-Verdaupuffer resuspendiert und nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) über Nacht bei 56 °C inkubiert. Es folgten eine Erwärmung auf 95 °C für 10 Min. und eine photometrische Vermessung des DNA-Gehaltes bei 260 nm.

3.8 Virusnachweis in Tupferproben, PBMC und Geweben

3.8.1 Kokultivierung von PBMC und Cytobrushproben

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), EDM

Um einen direkten Virusnachweis mittels Anzucht zu führen, wurden Wirtszellen mit für EHV-2-permissiven Zellen kokultiviert (Stevens & Cook, 1971; Borchers et al., 1997; Kershaw et al., 2001). Mit dieser Methode läßt sich auch latent in den Zellen vorhandenes Virus isolieren. Durch Zugabe von Phorbolen, wie Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA [Sigma Chemicals, St. Louis, USA]), welche die DNA-Replikation und Expression der sehr frühen Gene induzieren und somit latentes Virus reaktivieren, läßt sich die Nachweishäufigkeit sogar noch steigern (Hausen et al., 1978; Tenney & Morahan, 1987).

Das vorrangige Ziel dieser Versuche war es, ein EHV-2-Isolat aus dem Auge zu gewinnen. Dazu wurden verschiedene Modifikationen der Methode vorgenommen, bis durch unten beschriebenes Vorgehen die Isolierung gelang. Von diesem Augenblick an wurde zusätzlich eine Kokultivierung von PBMC durchgeführt, um genetische Vergleiche zwischen Isolaten aus Augen und aus Lymphozyten durchzuführen.

Vorbereitend wurden in die Kavitäten einer 6-Lochplatte (TPP Tissue culture, Trasadingen, Schweiz) 10^6 ED-Zellen in 4 ml EDM gegeben und in jede Kavität wurden 20 ng/ml PMA hinzupipettiert (ca. 25% der Kokultivierungen wurden parallel mit- und ohne PMA-Zusatz durchgeführt). Als Negativkontrolle wurden ED-Zellen mit PMA-Zusatz mitgeführt. Dann wurde die Platte bis zur Ausbildung semikonfluenter Monolayer für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach dem Ausdrücken der Cytobrushproben - wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben - wurde das Tupferisoliermedium manuell durchmischt. Dann wurden 250 µl davon in ein steriles Eppendorfgesäß überführt und bis zur Beendigung der Probenpräparation auf 4 °C gekühlt.

Nach der wie in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Präparation der PBMC, wurde ein Aliquot davon 1:10 in PBS verdünnt und die Konzentration der PBMC-Lösung unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim) bestimmt. Von der unverdünnten Lymphozytenlösung wurde dann ein Volumen, das 5×10^5 PBMC enthielt in 400 μ l EDM aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß pipettiert und ebenfalls bei 4 °C kühlgestellt.

Um einen innigeren Kontakt zwischen ED-Zellen und den zu kokultivierenden Zellen herzustellen, wurden 2,5 ml Medium aus jeder Kavität entnommen, und jeweils die Hälfte der vorbereiteten Proben wurde nach kurzem Aufmischen in eine Kavität gegeben. Nach eintägiger Inkubation bei 37 °C im Feuchtbrutschrank wurden 2,5 ml EDM - mit PMA-Zusatz - hinzugegeben, um eine ausreichende Versorgung der Zellen zu sichern. Die Zellen wurden dann ohne Zusatz von PMA alle 5-7 Tage im Verhältnis 1:2 umgesetzt. Traten nach fünf Passagen keine cpE auf, galt die Probe als negativ. Die Virus-Charakterisierung erfolgte nach Wachstumsverhalten, Plaquemorphologie und nach zusätzlicher Virusanzucht mit anschließender Virus-DNA-Präparation (Kapitel 3.3.4) durch nPCR (Kapitel 3.8.2) und REA (Kapitel 3.9.1).

3.8.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Der direkte DNA-Nachweis erfolgte mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR). Zum Einsatz kamen eine PCR, die der Überprüfung der DNA-Qualität diente (β -Aktin-PCR) und 3 weitere PCR, um virales Genom zu detektieren. Mit einer weiteren in dieser Arbeit verwendeten PCR kann EHV-5 (gB-PCR) nachgewiesen werden. Für den EHV-2-Nachweis dienten sogenannte nested-PCR (nPCR), die Sequenzen aus dem IL-10- bzw. gB-Gen amplifizierten. Das heißt, mit dem PCR-Amplifikat wurde eine neue PCR, die sogenannte zweite Runde, durchgeführt. Hierbei wurden zwei neue Primer eingesetzt, die innerhalb des als Template dienenden Erstrunden-Amplifikates griffen. Durch eine solche nPCR lassen sich sowohl Spezifität als auch Sensitivität des Genom-Nachweises steigern. In den Reaktionsansatz der zweiten Runde wurde 1 μ l der ersten Runde eingesetzt.

Die PCR wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Reaktionsansätze bestanden aus jeweils 0,4 μ M der beiden Primer (Metabion, Martinsried), 0,2 μ M Desoxyribonukleinsäuretriphosphaten (dNTP [Perkin Elmer, Überlingen]), 1,5 Units (U) *Thermus aquaticus* (Taq) -Polymerase (Qiagen, Hilden) und 1x PCR-Reaktionspuffer (Qiagen, Hilden). Bei der zweiten Runde der EHV-2-gB-nPCR wurden 10 μ l Q-Puffer (Qiagen, Hilden) hinzupipettiert. Der Q-Puffer faltete das DNA-Molekül auf, wodurch sich die Polymerase leichter an den DNA-Strang anlagern kann. Als Template wurden 1-2 μ g Gesamt-DNA aus Geweben bzw. Zellmaterial und bei Tupferproben 10 μ l der - wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben - aufgearbeiteten Probe und bei isolierten Viren und bei der

Positivkontrolle 20-40 pg gereinigte Virus-DNA verwendet. Als Positivkontrolle für die β -Aktin-PCR dienten 1-2 μ g Gesamt-DNA einer Lymphozyten-DNA-Präparation. Das Gesamtvolumen von 50 μ l wurde durch Zugabe einer entsprechenden Menge nukleasefreien Wassers (Promega, Madison, USA) erreicht. Es wurde eine PCR-Negativkontrolle mitgeführt, in die lediglich der Reaktionsansatz gegeben wurde und ferner eine Präparationskontrolle, um zu überprüfen, ob bei der Probenpräparation eine Kontamination der verwendeten Substanzen vorlag. Beide EHV-2-nPCR wurden in einem Heizblockcycler (Hybaid limited [OmniGene, Cambridge, USA]) und die β -Aktin- und EHV-5-PCR in einem Wasserbadcycler (Personal Cycler [Biometra, Göttingen]) durchgeführt.

Jeder Amplifizierungszyklus setzte sich aus 3 Phasen zusammen:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 94 °C
 Annealing: 30 Sekunden bei primerspezifischer Temperatur
 Synthese: 60 Sekunden bei 72 °C

Nach Vollendung der Amplifizierungszyklen wurden 15 μ l des Reaktionsansatzes mit 1/10 Volumen Probenpuffer in die analytische Gelelektrophorese (Kapitel 3.9.2) eingesetzt.

3.8.2.1 β -Aktin-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität

β -Aktin ist ein hoch konserviertes Zellstrukturprotein, das von allen eukaryotischen Zellen gebildet wird. Somit müßte sich das kodierende Gen in allen DNA-Präparationen aus Eukaryotenzellen nachweisen lassen (Shankar et al., 1992). Gelingt der β -Aktin-Nachweis nicht, kann also davon ausgegangen werden, daß bei der durchgeführten DNA-Präparation keine DNA von ausreichender Qualität oder Quantität gewonnen wurde.

Um zu überprüfen, ob die DNA-Präparationen aus den unterschiedlichen Tupferproben, Geweben und Blutzellen erfolgreich waren, wurde stichprobenartig die β -Aktin-PCR durchgeführt. Die PCR-Bedingungen gibt Tabelle 3 wieder. Die für β -Aktin kodierende Gensequenz ließ sich bei allen Stichprobenkontrollen nachweisen.

Bei dieser PCR wurde eine 2minütige, initiale Denaturierung bei 94 °C vor den Amplifizierungszyklen durchgeführt.

Tabelle 3 Reaktionsbedingungen der β -Aktin-PCR

Pr.	Sequenz	Temp.	Zyklen	Fragmentgr.
Nachweis des β-Aktin-Gens				
A	5`-GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC-3`	56 °C	40	248 bp
B	5`-GCGCTCGTCGTCGACAACGG-3`	56 °C		
Pr.: Primer	Temp.: Temperatur	Fragmentgr.: Fragmentgröße		

3.8.2.2 IL-10-nPCR zum Nachweis von EHV-2

Mit dieser von Borchers et al. (1997) beschriebenen nPCR wurden zunächst sämtliche PCR-Untersuchungen auf EHV-2 durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Bei dieser nPCR werden eine extronische Repeatsequenz und ein Teil des darauffolgenden ORF E7 (der für ein IL-10 ähnliches Protein kodiert) amplifiziert. Das 19 bp große, repetitive Motiv (AGACAGGGGCCATGCTGGC) wiederholt sich bei verschiedenen EHV-2-Stämmen unterschiedlich oft. Somit entsteht ein stammabhängiger Amplifikatgrößenpolymorphismus (Borchers et al., 1997). Das Amplifikat variiert in seiner Größe je nach Anzahl der Wiederholungen zwischen 488 und 621 bp. Der Stamm LK4 weist mit 16 Repeatsequenzen das größte bisher bekannte Amplifikat auf. Diese nPCR könnte also als Indikator für verschiedene Stämme und vielleicht auch für Virulenz und Gewebetropismus dienen.

Ein weiterer Vorteil dieser nPCR ist, daß sich mit einer Nachweisgrenze von 0,9 fg DNA selbst geringste Mengen viraler DNA nachweisen lassen.

Tabelle 4 Reaktionsbedingungen der PCR zum Nachweis von EHV-2 und EHV-5

Pr.	Sequenz	Temp.	Genposition	Zyklen	Fragmentgr.
EHV-2: Nachweis des v-IL-10-Gens (Borchers et al., 1997)					
Nachweisgrenze der nPCR: 0,9 fg gereinigter Virus-DNA					
7	5`-GGCACTGAAACCCCATACTG-3`	64 °C	805-824	35	1. Runde
8	5`-AAAACCATGCTGTCCAACCA-3`	64 °C	2022-2041		maximal 1237 bp
9	5`-CCACTAACCCCAACCTT-3`	64 °C	1369-1386	35	2. Runde
10	5`-CCTCTATCCTCACAAACAG-3`	64 °C	1972-1989		maximal 621 bp
EHV-2: Nachweis des gB-Gens (Borchers et al., 2006b)					
1	5`-ATCAACCCCACCAGCGTCAT-3`	50 °C	1483-1502	35	1. Runde
2	5`-TTTTACTTCTTCCTCTCGTC-3`	50 °C	2411-2430		948 bp
3	5`-CCCAGGAACGAGATTGTGCT-3`	60 °C	1705-1724	35	2. Runde
4	5`-GCTATGATGAGGACTATGAG-3`	60 °C	2197-2216		512 bp
EHV-5: Nachweis des gB-Gens (Agius et al., 1994), optimiert für einen Heizblockcykler durch Borchers et al. (1999c)					
R	5`-CAGACTATGGTGTGGGG-3`	60 °C	897-913	38	1328 bp
F	5`-GCTGGCCACGTTCACTA-3`	60 °C	2208-2224		
Pr.:	Primer	Temp.:	Temperatur	Fragmentgr.:	Fragmentgröße

3.8.2.3 gB-nPCR und gB-PCR zum Nachweis von EHV-2 und EHV-5

Die zweite nPCR zur Detektion von EHV-2 wurde angewandt, wenn sich bei der IL-10-nPCR keine eindeutigen Resultate ergaben. Sie basiert, ebenso wie die EHV-5-PCR, auf dem Nachweis von einer für das jeweilige Virus spezifischen Gensequenz des für das gB kodierenden Gens. Die Reaktionsbedingungen sind ebenfalls aus der Tabelle 4 zu entnehmen.

3.9 Virus-Spezifikation

3.9.1 Restriktionsenzymanalyse (REA)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Probenpuffer (10x)

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Ficoll 400	15% (w/v)
in Aqua dest.	

Mittels Restriktionsenzymanalyse (REA) wurden isolierte Virus-DNA charakterisiert und PCR-Amplifikate spezifiziert. Zur Charakterisierung von gereinigter Virus-DNA wurden 100-200 ng DNA - bei einem Gesamtvolumen von 20-50 µl - in den Verdau eingesetzt.

Für die Spezifizierung von PCR-Amplifikaten wurden 15 µl der zweiten Runde in einen 20 µl umfassenden Verdauansatz gegeben. Der Verdau wurde je nach Enzym unter den vom Hersteller (New England Biolabs, Frankfurt am Main) genannten Bedingungen durchgeführt und nach einer entsprechenden Inkubationszeit durch Zugabe von 1/10 Volumen Probenpuffer abgestoppt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels analytischer Gelelektrophorese (Kapitel 3.9.2) in einem 1%igen Agarosegel.

3.9.2 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 dest.	ad 1,0 l
pH 7,9 mit HCl einstellen	

Probenpuffer

Probenpuffer (10x)	10% (w/v)
in Aqua dest.	

Laufpuffer

TAE-Puffer (10x) 10% (w/v)
in Aqua dest.

1%ige Ethidiumbromid-Lösung

Um eine Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten nach einer REA oder PCR durchzuführen, wurde die analytische Gelelektrophorese angewendet. Es kam Agarose (ultrapure [Life Technologies, Gaithersburg, USA]) - je nach zu erwartenden Fragmentgrößen in Konzentrationen von 0,5 bis 2% - in Laufpuffer zum Einsatz. Das Agarosegel wurde in einer Mikrowelle verflüssigt und nach Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung (0,4 µg/ml Endkonzentration [Life Technologies, Gaithersburg, USA]) in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde es mit Laufpuffer überschichtet und Ethidiumbromid-Lösung (0,4 µg/ml Endkonzentration) hinzupipettiert. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen gegeben und bei 3 Volt/cm elektrophoretisch getrennt. Als Längenstandards kamen - je nach Fragmentgröße - λ /Hind III, Φ X 174 RF DNA/Hae III oder 100 bp Leitern (Life Technologies, Gaithersburg, USA) zum Einsatz. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele auf einem Transluminator (FLX-20M [Biometra, Göttingen]) betrachtet und bei 312 nm mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

3.10 Statistische Methoden

Es wurden lediglich die Ergebnisse der nPCR und der serologischen Tests der Proben aus der TiHoHa (Kapitel 4.1.4 und 4.1.6) und die nPCR-Ergebnisse von Konjunktiva, Tränendrüse und Sehnerv der *post-mortem*-Gewebe (Kapitel 4.2.2) statistisch ausgewertet. Es wurden der χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit und der McNemar-Test angewendet.

3.10.1 χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit

Mit dem χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit läßt sich überprüfen, ob die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Ereignis (serologisch auffällig oder nPCR-positiv) auftritt, im Zusammenhang mit einem Merkmal (augenkrank oder gesund) steht. Beträgt der Wert für χ^2 dabei mindestens 3,84, so liegt die Wahrscheinlichkeit für eine Unabhängigkeit der Ergebnisse bei unter 5%. Dieses wurde als Grenze festgelegt, bei der die Unabhängigkeitsthese abgelehnt wurde.

Die Formel für den χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit lautet:

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

	Tupferproben oder PBMC nPCR-positiv/ serologisch auffällige Titer	Tupferproben oder PBMC nPCR-negativ/ serologisch unauffällige Titer	
Tiere der Testgruppe	a	b	Anzahl der Tiere der Testgruppe a + b
Tiere der Kontrollgruppe	c	d	Anzahl der Tiere der Kontrollgruppe c + d
	Anzahl aller Tiere mit positivem EHV-2- Nachweis a + c	Anzahl aller Tiere mit negativem EHV-2- Nachweis b + d	n = a + b + c + d

3.10.2 McNemar-Test

Mittels McNemar-Test läßt sich feststellen, ob bei der Betrachtung von zwei Merkmalen, die vorhanden sein oder fehlen können, eines der beiden Merkmale statistisch signifikant häufiger auftritt oder fehlt als das andere (EHV-2-Nachweis mittels nPCR aus Cytobrush/Wattetupfer bzw. bei Erst-/Zweituntersuchung bzw. in der Konjunktiva/Tränendrüse oder Sehnerv gelungen/nicht gelungen). Der Grenzwert, bei dem eine Zufälligkeit der Häufigkeitsverteilung abgelehnt wurde, lag - wie auch in Kapitel 3.10.1 - bei $\chi^2 \geq 3,84$.

Die Formel für den McNemar-Test lautet:

$$\frac{(|b - c| - 1)^2}{(a + d)} = \chi^2$$

		Cytobrush bzw. Erstuntersuchung bzw. Konjunktiva		
		positiv	negativ	
Wattetupfer bzw. Zweituntersuchung bzw. Tränendrüse oder Sehnerv	positiv	a	b	a + b
	negativ	c	d	c + d
		a + c	b + d	