

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Probenmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie

Die verwendeten Proben stammen aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin und sind hier entweder als Sektionsmaterial (Tierkörper) oder als Hautproben (sog. „Einzeleinsendungen“) zur Untersuchung gelangt.

Im Rahmen dieser Studie wurden zunächst 200 Sarkoide, 32 Papillome, 30 Melanome, 29 Plattenepithelkarzinome und 27 Fibrosarkome nach H&E Färbung nachdiagnostiziert, wonach für weitere Untersuchungen 179 Sarkoide, 15 Papillome, 27 Melanome, 25 Plattenepithelkarzinome und 19 Fibrosarkome zur Verfügung standen. Tumore, die nur Teilexzidate mit fehlendem Umgebungsgewebe darstellten, wurden für dieser Untersuchung ausgeschlossen. Eine Subklassifizierung der einzelnen Tumoren wurde nicht vorgenommen.

3.1.2 Sammlung von Kontrollproben

Zu Kontrollzwecken wurden von 25 Pferden aus dem laufenden Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin je ca. 20 Proben aus verschiedenen Lokalisationen der Haut, der Lnn. mandibulares, der Lnn. mediastinales, der Tonsillen, der Milz sowie, falls vorhanden, des Thymus gesammelt und nach Feststellung der histologischen Unauffälligkeit weiter verwendet. Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme geteilt und einerseits schocktiefgefroren (Rickert and Maliniak 1989), andererseits mittels neutral gepuffertem Formalin (4%) fixiert. Hierbei wurde eine Fixationszeit von 24 Stunden nicht überschritten.

3.1.3 Einbettung der Gewebeproben für Paraffinschnitte

Die Einbettung aller formalinfixierten Gewebeproben erfolgte nach einer 15 stündigen Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe in einem vollautomatischen Unterdruckautomat Tissue-Tek[®] VIP der Fa. Sakura mittels Paraplast.

3.1.4 Gefrierproben

3.1.4.1 Gefrierschnitte

Die tiefgefrorenen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in luftdicht verschlossenen Kunststoffröhrchen im Tiefkühlschrank bei -80 °C aufbewahrt. Zur histologischen und immunhistochemischen Färbung wurden auf einem Gefriermikrotom (Cyrocut, Fa. Jung) ca. 5-10 μm dicke Schnitte hergestellt, die nach dem Lufttrocknen in Aceton (15 Minuten, 4 °C) fixiert und dann erneut luftgetrocknet wurden.

3.1.5 Schnittherstellung

Zur Schnittherstellung kam ein Mikrotom der Fa. Microm (HM325) zum Einsatz, wobei nach dem Trimmen Schnitte mit einer Dicke von 3-5 μm angefertigt wurden. Diese wurden auf silanisierte (3-Aminopropyltriethoxy-Silane, #A-3468; Fa. Sigma, Deisenhofen) Objektträger aufgezogen und für ca. 16 h in einem Wärmeschrank bei 40 °C getrocknet.

Für die Schnittherstellung der Gefrierschnitte kam ein Gefriermikrotom (Frigocut-Mod. 2700; Fa. Reichardt-Jung) zum Einsatz, wobei die gefrorenen Gewebeproben mit isotoner NaCl-Lösung auf der Schnitthalterung festgefroren wurden. Anschließend wurden ca. 3-5 μm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen, staubfrei luftgetrocknet (ca. 5 min.) und anschließend in Aceton (15 Minuten, 4 °C) fixiert.

3.1.6 Histologie

3.1.6.1 Melanin-Entfärbung / -Bleichung

Die Melanom-Schnitte wurden entparaffiniert und in destilliertes Wasser überführt. Nach anschließender 5-minütiger Inkubation in 0,25%-iger Kaliumpermanganatlösung wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült, danach für ca. 5 Sekunden (oder bis alle Schnitte klar waren) in 5%-iger Oxalsäure verbracht und vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült (Prophet et al. 1992).

3.1.6.2 H&E Auswertung

Alle H&E-gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit einem Standardmikroskop (Fa. Leitz/Leica) unter Verwendung von 3,2er, 10er, 20er und 40er Objektiven untersucht. Die Diagnose erfolgte in Anlehnung an die WHO-Klassifizierung (Goldschmidt et al. 1998). Mit einer Digitalkamera Nikon Coolpix 5000 wurden die Befunde dokumentiert.

Die in den nachfolgenden Bildlegenden angegebenen Vergrößerungsfaktoren sind das Produkt der Multiplikation des Okulars (10er) mit dem jeweils verwendeten Objektiv.

3.1.7 Immunhistochemie¹

Zur Anwendung der immunhistochemischen Färbungen kam die anti-Alkalische Phosphatase- (APAAP) und die Biotin-Strept-Avidin- (BSA-) Methode zum Einsatz.

3.1.7.1 APAAP

Die getrockneten Schnitte wurden entparaffiniert, in dem sie 15 Minuten in Xylol, 10 Minuten in Aceton, 10 Minuten in Aceton/TBS (1:1) und anschließend für mindestens 10 Minuten in TBS belassen wurden.

Als Vorbehandlungen kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz.

3.1.7.2 Pronase E

Hierbei wurden die entparaffinierten Schnitte in eine auf 37 °C vorgewärmte Küvette sortiert und bei 37 °C für 10 Minuten mit frisch angesetzter Pronase E inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder in TBS überführt.

3.1.7.4 Mikrowellenvorbehandlung

Die Schnitte wurden in Küvetteneinsätze sortiert, wobei die Küvetten immer vollständig mit Objekträgern aufgefüllt und anschließend in auf 37 °C vorgeheizten 0,01 M Citratpuffer gestellt wurden. Hier wurden sie für weitere 10 Minuten bei 600 W in der Mikrowelle behandelt. Nach einer 20 minütigen Abkühlung wurden die Schnitte in TBS überführt.

¹ Rezepturen siehe Anhang I

Um standardisierte Bedingungen zu erhalten, erfolgte die immunhistochemische Färbung in der halbautomatischen Immunfärbestation Sequenza[®] (Fa. Shandon), in der die Objektträger auf Coverplates[®] montiert wurden. Zwischen Objektträger und Coverplates[®] entstand ein standardisierter Kapillarspalt mit einem Volumen von 80 μ l, welcher als Reaktionsraum diente. Die Objektträger mit Coverplates[®] wurden senkrecht in spezielle Kassetten gestellt und mittels Halteklammern fixiert. Nach Zugabe eines weiteren Reagenz wurde das vorherige nach unten in die Kassette verdrängt und das neu eingebrachte verblieb für die vorgesehene Zeit (s. Färbeprotokoll) im Reaktionsraum.

Der primäre Antikörper wurde mit RPMI-Verdünnungspuffer 1 (APAAP) verdünnt und nach dem Ansetzen bei 1000 U/min 2 min. lang zentrifugiert.

Anschließend wurde der Brückenantikörper, ein gegen Maus-Immunglobulin gerichteter Kaninchen-Antikörper mit RPMI-Verdünnungspuffer 2 verdünnt und ebenfalls nach dem Ansetzen bei 1000U/min 2 min. lang zentrifugiert.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 30 Minuten mit einer anschließenden Waschung mit TBS für 10 Minuten. Um den alkalischen Phosphatase-Komplex (1:100) zu konjugieren, wurde zuerst ein Brückenantikörper (1:100) eingesetzt, wobei jeweils zwischen den Schritten 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen wurde. Nach der letzten TBS-Puffer-Waschung wurden die Schnitte in Küvetten überführt und in einem Substrat-Chromogen-Gemisch für 30 Minuten auf einen Schüttler gestellt.

3.1.7.5 BSA (Biotin-Streptavidin)-Methode

Nach der erfolgten Entparaffinierung und entsprechender Vorbehandlung (Mikrowelle oder Pronase E) wurden die Schnitte auf Coverplates[®] montiert und mit dem Primärantikörper für 1 Stunde inkubiert. Nach einer 10-minütigen TBS-Waschung folgte das LINK-Reagenz für 20 Minuten und wiederum nach einer 10minütigen TBS-Waschung das LABEL-Reagenz. Abschließend wurden die Objektträger erneut mit TBS für 10 Minuten gewaschen und schließlich in das Substrat-Chromogen-Gemisch

Material und Methoden

überführt. Hier inkubierten sie auf einem Schüttler für 30 Minuten. Diese Reaktion wurde mittels zweimaliger H₂O Spülung gestoppt.

Die Schnitte wurden mit Haematoxilin gegengefärbt und mit Kaiser´s Glyceringelatine eingedeckt.

Tab. 2. Verwendete Antikörper

verwendete Antikörper	Vorbehandlung	Färbemethode	Verdünnung	Inkubationszeit	Klon	Quelle
CD1a	Pronase E	BSA	1:50	60 min.	O10	M3571; Dako
CD3	Pronase E	BSA	1:500	60 min	o.A.	A0452; Dako
CD68	Pronase E	BSA	1:100	60 min	KP1	M0814; Dako
CD68	Pronase E	BSA	1:100	60 min	PG-M1	M0876; Dako
CD68	-	BSA	1:20	über Nacht	Ki-M6	MCA759T; Serotec
CD79 α cy	MW / CP	BSA	1:25	60 min	HM57	M7051; Dako
S100	MW / CP	BSA	1:800	60 min	o.A.	Z311; Dako
Macrophages/monocytes (MAC387)	Pronase E	BSA	1:4000	30 min	MCA874G	MCA874G; Serotec
Anti-bovines MHC II	-	APAAP	1:10	60 min	bo 131	H.J. Schubert; TiHo Hannover
Anti-bovines MHC II	-	APAAP	1:10	60 min	bo 191	H.J. Schubert; TiHo Hannover

3.1.7.6 Kontrollen

Als positive Kontrolle wurde jeweils Gewebe mitgefärbt, die das gesuchte Antigen für den speziellen Antikörper enthielten.

In ersten Vorversuchen wurden die Reaktivität der Antikörper an verschiedenen Organen verschiedener Spezies getestet:

CD1a	canine und feline Lymphknoten
CD3	canine und feline Lymphknoten
CD79a	feline Lymphknoten
S100	canines Mammagewebe
MAC387	canine und feline Lymphknoten und Lunge

CD68	canine und feline Lymphknoten
MHC II	canine, feline und bovine Lymphknoten

Im zweiten Vorversuch wurden diese Antikörper an equinen Lymphknoten, Tonsillen und Lunge getestet, um auch hier eine mögliche Kreuzreaktivität zu evaluieren.

Die positiven equinen Gewebe wurden in der Hauptstudie als Positivkontrolle für die jeweilige Färbung eingesetzt.

Gewebe, die kein Reaktionsmuster aufwiesen, wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

Als Kontrolle für die CD1a und CD68 Antikörper wurden in der Charité Campus Benjamin Franklin² humane Tonsillen gefärbt.

3.1.8 Molekularpathologischer Ansatz³

Durch die begrenzte Kreuzreaktivität der kommerziellen Antikörper wurde mit molekularpathologischen Methoden versucht, equines CD68 und CD1 in Immunzellen nachzuweisen.

Dazu mußten equine Monozyten isoliert und anschließend stimuliert werden; um Makrophagen und dendritische Zellen zu erhalten.

3.1.8.1 Isolierung von equinen mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Es wurde 500 ml Vollblut aus der Vena jugularis eines Pferdes⁴ mit einem Blutbeutel (Biotest, Dreieich) entnommen, welcher 70 ml Natriumcitrat als Gerinnungshemmer enthielt. Dieses Blut wurde auf sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und 15 Minuten bei Raumtemperatur und 1800 U/min (Minifuge 2; Heraeus) zentrifugiert. Nach Abnahme des Plasmas wurde das entnommene Volumen mit sterilem PBS wieder aufgefüllt. Das verdünnte Blut wurde vorsichtig auf ein Ficollkissen (FICOLL 1,090, Biochrom) aufgeschichtet (Blut:Ficoll 3:1) und für 15 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert. Der anschließend entstandene Gradient enthielt eine mittlere grau-weiße Bande aus Lymphozyten, Granulozyten sowie Monozyten. Eine weitere Bande enthielt die abgetrennten Erythrozyten. Die grau-weiße Bande wurde erneut in ein

² Dank an Prof. Dr. H. Stein; Inst. für Pathologie; Campus Charité Benjamin Franklin

³ Rezepturen s. Anhang II

⁴ Dank an das Pferd „Dr. Dolittle“

steriles Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS und EDTA aufgefüllt und nochmals auf ein Ficollkissen (FICOLL 1,077, Biochrom) geschichtet und für 15 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert, wobei die Granulozyten eliminiert wurden. Die entstandene weiße Bande aus Lymphozyten und Monozyten wurde in ein neues steriles Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 4 ml RPMI/10 % FCS gelöst, in eine 6-Loch-Platte überführt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.8.2 Zellaktivierung

Die PBMCs wurden mit Concanavalin A (2 µg/ml, ConA, Sigma), Phythämagglutinin (0,1 µg/ml, PHA, Sigma), PokeWeed Mitogen (4 µl, PWM, Sigma) oder Phorbom-12-Myrisat-13-Acetat (PMA, Sigma) mit Ca-Ionophor (2 µl, PMA/Ca-Ionophor) zur Proliferation stimuliert und nach 1 – 3 Tagen Inkubation bei 37 °C für die RNA-Extraktion gewonnen.

3.1.8.3 RNA – Extraktion

Die RNA Extraktion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Es wurde 1 ml TRIzol (einphasige Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat; Gibco BRL) zu $5-10 \times 10^6$ Zellen pipettiert, „gevortext“ und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 Sekunden kräftig geschüttelt, für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 4 °C und 1100 U/min (Eppendorf; Zentrifuge 5403) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein steriles RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol zugefügt. Dieses Gemisch wurde „gevortext“ und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 14000 U/min in 4 °C wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 1 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 1100 U/min und 4 °C zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets (Überstand wurde verworfen) unter einer Lampe, wurde es in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und die RNA für 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Zur anschließenden Konzentrationsbestimmung der RNA ($OD \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g/ml}$; OD=optical density) kam ein

Material und Methoden

Spektralphotometer (Shinadzu, UV 1202) mit einer Wellenlänge von 260 nm zum Einsatz.

3.1.8.4 Reverse Transkription (RT)

In 0,5 ml Perkin Elmer Tubes wurden 2 μ g der extrahierten RNA pipettiert und das Volumen ggf. mit Nukleasen-freiem Wasser auf 8 μ l aufgefüllt. Die RNA wurde für 5 Minuten bei 70 °C linearisiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 12 μ l des Standard RT-Ansatzes (4 μ l 5xRT-Puffer; 2 μ l 0,1M Dithiothreitol (DTT); 2 μ l 10mM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs); 2 μ l 20 mM Primer (T20); 1 μ l RNasin (RNase-Inhibitor, 40 U/ml); 1 μ l Reverse Transkriptase MMLV; MMLV/H- (200 U/ μ l)) inkubierte der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C, wonach die Reaktion 5 Minuten bei 95 °C gestoppt wurde.

Tab. 3: Übersicht über die in RT, PCR und zur Sequenzierung verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Gen-Position	annealing Temperatur
T20	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT		

pGEM-T Easy

CD1v	CTC GAG ATG TCA AGG CTC AGG CTG GTT G	7-29	53,3°C
CD1r	GCG GCC GCC TAG ACT GCT GTG CTT CAC	719-783	
CD1a v	ATC TCC GAA TGG TGG AAG TAA GG	331-354	56,1°C
CD1a r	TTT GGG TGG AAG CCA GAA GTG	553-574	
CD1b v	CAG GGA AAG CAG AAC TGA AGA GG	459- 482	58,1°C
CD1b r	CTG TTG CCA CAT CCA GGG TTA C	671-693	
CD 68 v1	CTC GAG ATG AGG CTG CCT GTG	16-41	55,2°C
CD 68 v2	CTC GAG ATG TTG CTG CCA TCC TTC ACG	1064-1081	
CD 68 r1	GCG GCC GCT CAG AGG GCC TGG TAG G		
CD 68 r2	TGG TGG TAG GAT TGT GAG TGG CTG		
β-Aktin v	GTG TGG TGC CAA ATC TTC TTC		248
β-Aktin r	GCG CTC GTC GTC GAC AAC GG	248	

Sequenzier-Primer

T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	TTC TAT AGT GTC ACC TAA AT

Gen-Position = Position des Primers im codierenden Bereich der Oberflächenmoleküle; r=Rückwärtsprimer; v =Vorwärtsprimer

3.1.8.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die zu verwendenden Primer (Tab. 3) wurden mit Hilfe der Software MacVector® (Genetics Computer Group, GCG) ausgesucht, wobei die Reaktionsbedingungen optimiert wurden. Die PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität basiert auf der codierenden Sequenz für das Zellstruktur-Protein β -Aktin (Zimmermann et al. 1994). In einem PCR-Ansatzvolumen (10 μ l Q-Solution; 5 μ l 10x PCR-Reaktionspuffer; 5 μ l 2 mM dNTPs; 1 μ l Primer A (vorwärts, 20 mM); 1 μ l Primer B (rückwärts, 20 mM); 0,3 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l) und ad. 50 μ l Aqua bidest.) von 50 μ l wurde die Amplifikationsreaktion durchgeführt, wobei 2 – 10 μ l cDNA eingesetzt wurde. Nach dem Pipettieren des Ansatzes in eine 0,5 ml Amp-Tube wurde die cDNA hinzugefügt und mit einem Tropfen Mineralöl abgedeckt, damit der Reaktionsansatz nicht verdampft. Im Biometra® Thermocycler lief die Reaktion nach folgendem Programm ab:

Initiale Denaturierung	95 °C, 3 min
Denaturierung	94 °C, 1 min
Annealing	primerspezifische Temperatur, 1 min
Synthese	72 °C, 1,5 min
Finale Extension	72 °C, 10 min
Anzahl der Zyklen	30 - 40

3.1.8.6 Agarosegelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese wurden die Nukleinsäuren in ihrer Größe fraktioniert. Die verwendete Agarose hat eine Konzentration von 1,2 % und wird im Laufpuffer (1xTAE) verwendet. Die feste Agarose wurde in einem Mikrowellenofen gelöst, auf ca. 60 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromidlösung (0,4 μ g/ml Endkonzentration) versetzt. Die Proben wurden in 1:5 Probenpuffer aufgenommen und auf das Agarosegel aufgetragen. Zur späteren Identifizierung der zu erwartenden DNA-Größe wurde zusätzlich ein DNA-Marker (100 bp Ladder-Marker; Promega) aufgetragen. Die Elektrophorese (Elektrophoresekammer, Stratagene) lief bei einer Spannung von 80 V (Power Supply Model 1000/500, BioRad). Am Ende des Bandenlaufs wurden die DNA-Banden mittels eines UV-Transluminators (Biometra,

FLX-20M) bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

3.1.8.7 Präparative Agarosegelelektrophorese mit DNA Isolierung

Die gewünschte DNA wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung mit einer Rasierklinge auf dem UV-Transilluminator aus dem Gel geschnitten. Mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits (Quiagen) wurde die DNA aus dem Gel isoliert, wobei die DNA an eine Silicon-Membran gebunden, mit Waschpuffer die Salze entfernt wurden und mit Tris-Puffer eluiert wurde. Eine abschließende Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA erfolgte wieder photometrisch.

3.1.8.8 Klonierung

3.1.8.8.1 Ligation

Die gewünschten PCR Fragmente wurden nach der Gelextraktion mit dem pGEM-Bakterienvektor (1 μ l pGEM[®]-T Easy Vector System (50 ng, Promega)) im Verhältnis 3:1 für die Ligation eingesetzt. Zusätzlich wurden für die Ligation 5 μ l 2x Rapid Ligation Puffer, 1 μ l T4 DNA Ligase (3 U/ μ l) und das Restvolumen mit Aqua bidest auf 10 μ l aufgefüllt. Die Ligation lief 1 h bei Raumtemperatur ab.

3.1.8.8.2 Präparation kompetenter *E. coli*

Zur Amplifizierung der rekombinanten Plasmide wurden kompetente Bakterien aus dem *E. coli*-Stamm JM109 (High Efficiency Competent Cells) unter sterilen Bedingungen hergestellt. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium gegeben und für 14 -16 h bei 37 °C geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml der Kultur in 50 ml LB-Medium. Diese Zellsuspension wurde bis zu einer OD₆₀₀=0,5 bei 37 °C geschüttelt, in ein gekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min auf Eis gestellt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 3500 U/min und 4 °C (Minifuge 2, Heraeus) wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet in 10 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Es wurde wie oben zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet in 2 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung gelöst und zu je 200 ml in 10 Eppendorfröhrchen verteilt. Die Zellen wurden umgehend in der Transformation

verwendet. Alternativ wurden für größere Plasmide kompetente *E.coli* XL-10 verwendet.

3.1.8.9 Transformation

Die Medienbestandteile wurden in Aqua bidest. gelöst, der pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt und die Lösung auf 1 l aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert und nachdem es auf 60°C abgekühlt war, wurden 12,5 ml 1 M MgCl₂-, 12,5 ml 1 M MgSO₄- und 10 ml 2 M Glucose als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben.

Vorbereitend wurden 200 ml LB-Agar zum Gießen der Kulturplatten aufgekocht und anschließend auf 50 °C temperiert. Dieser Agar wurde mit Ampicillin-Stock-Lösung (20 mg/ml; sterilfiltriert) versetzt, da das Vektorsystem pGEM-T Easy eine Resistenz gegenüber Ampicillin aufweist und in jede 10 cm Kulturplatte ca. 15 ml gegossen. Nach erstarrtem und vollständig abgekühltem Agar, wurden sie mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

Der Ligationsansatz wurde kurz zentrifugiert, 2 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend auf Eis gestellt. Die kompetenten *E.coli* Zellen (JM109 High Efficiency Competent Cells) wurden im Eisbad aufgetaut und durch leichtes Anstoßen durchmischt. 50 µl der Zellen wurden zum Ligationsmix gegeben und durchmischt. Das Eppendorfgefäß wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt, für 45-50 Sekunden einem „Hitzeschock“ von 42 °C ausgesetzt und anschließend wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. 950 µl NZY-Kulturmedium wurde hinzugegeben, diese Transformation inkubierte bei 37 °C unter Bewegung (150 rpm) für 1,5 Stunden. Die nun transformierten Bakterien wurden auf die LB-Agarplatten, die zuvor mit 35 µl X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galaktosid, 5 % in Dimethylformamid) und 15 µl IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid 20 % in dH₂O) behandelt und getrocknet wurden, aufgebracht (100 – 150 ml transformierte Bakterien / Agarplatte) und bei 37 °C angezüchtet.

3.1.8.10 Blau-Weiß-Selektion

Durch Blau-Weiß-Selektion wird das Vorhandensein von Fremd-DNA geprüft, indem IPTG die Herstellung von β -Galactosidase induziert und diese wiederum X-Gal umsetzt, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. War die Ligation erfolgreich, so ist das lacZ'-Gen im Vector durch das Insert zerstört und damit auch keine β -Galactosidase aktivierbar. Die positiven Kolonien (erfolgreiche Ligation) sind weiß.

3.1.8.11 Plasmid Präparation - Miniprep[®]

Die positiven weißen Einzelkolonien wurden gepickt und über Nacht in 5 ml ampicillinhaltigem (100 μ g/ml) LB-Medium bei 37 °C und 160 U/min inkubiert.

Von den Übernachtskulturen wurden ca. 2 x 1,5 ml in sterile 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und bei 1300 g für 5 min zentrifugiert (Ole Dich Microzentrifuge 154). Plasmid-DNA wurde mit QIAprep Spin Miniprep[®] Kit (Qiagen) gemäß den Arbeitsanweisungen des Herstellers präpariert. Wurden größere Mengen Plasmid-DNA benötigt, so wurden diese unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben aus transformierten Bakterienkulturen isoliert.

Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde nach photometrischer Messung durch folgende Formel bestimmt: $DNA = OD_{260} \times 0,05 \text{ mg/ml} \times \text{Verdünnung}$

3.1.8.12 Restriktionsenzym-Verdau

Das Plasmid wurde von der DNA mittels Restriktionsenzymverdau getrennt. Hierzu wurden 5 μ l Plasmid-DNA aus dem Miniprep[®] in einem Restriktionsansatz (2,5 μ l 10x Puffer; 1 μ l Restriktionsenzym I; 1 μ l Restriktionsenzym II; ad 25 μ l Aqua bidest.) 2 Stunden bei optimaler Enzymtemperatur (37 °C) inkubiert. Als Kontrolle kam ein Agarosegel zum Einsatz, wobei ein I-Hind III (100bp-ladder) als Marker verwendet wurde.

3.1.8.13 Glyceroldauerkulturen

Bakterien wurden zur dauerhaften Konservierung zunächst als „über-Nacht-Kulturen“ angesetzt und am nächsten Tag 200 ml davon in 4 ml ampicillinhaltiges (100 mg/ml) LB-Medium umgesetzt. Die Bakterien wurden bei 37 °C bis zu einer $OD_{600}=0,4$

inkubiert. 850 ml der Kultur wurden in ein steriles 2 ml-cryo-Röhrchen (Nunc) gegeben, 150 ml steriles Glycerol hinzugefügt und mittels Vortex durchmischt. Anschließend wurden die Bakterien bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zum erneuten Ausstreichen wurden mit einer sterilen Impföse Bakterien der Dauerkultur entnommen, auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 mg/ml) verstrichen und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert.

3.1.8.14 Sequenzierung und BLAST

Die Sequenzierung erfolgt durch die Firma AGOWA⁵, Berlin. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST[®] (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verifiziert.

3.1.9 In-situ Hybridisierung

Zur visuellen Darstellung der equinen Sequenzen in Langerhanszellen der Haut oder dendritischen Zellen sowie zur Darstellung von phagozytoseaktiven Zellen erfolgte eine in-situ Hybridisierung mit dem sequenzierten CD1a und CD68. Hierfür wurden spezielle radioaktiv markierte Sonden hergestellt.

3.1.9.1 Sondenherstellung

3.1.9.1.1 Transkription mit ³⁵S-UTP

³⁵S-UTPs (Fa. NEN) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und direkt zu je $5\text{ }\mu\text{l}$ in Sicherheitseppendorfgefäße aliquotiert und schließlich wieder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu deren Verwendung eingefroren.

Zur Transkription wurde die benötigte Menge ($5\text{ }\mu\text{l}$ ³⁵S-UTP pro Transkription) der aliquotierten ³⁵S-UTP Sicherheitseppendorfgefäße aufgetaut. Die folgenden Reagenzien wurden an den oberen, inneren Rand der Sicherheitseppendorfgefäße pipettiert, um eine radioaktive Kontamination der Arbeitsumgebung zu vermeiden:

⁵ www.agowa.com

Material und Methoden

2 μ l	5x Transkriptionspuffer (entsprechend für T7- oder SP6-RNA-Polymerase)
0,5 μ l	100 mM DTT
0,5 μ l	RNAsin I (Promega)
1 μ l	3x rNTP-Gemisch
1 μ l	Plasmid/Sonde

Diese Reagenzien wurden durch eine kurze Zentrifugation (Pikofuge) an den Boden der Eppendorfgefäße gedrängt. Anschließend wurde 1 μ l entsprechende RNA-Polymerase (T7- oder SP6-RNA-Polymerase) direkt auf den Boden der Eppendorfgefäße pipettiert und für 60 Minuten ins 37 °C Wasserbad gestellt.

Nach 60 Minuten wurde erneut 0,5 μ l entsprechende RNA-Polymerase (T7- oder SP6-RNA-Polymerase) hinzugegeben und die Eppendorfgefäße wieder für 30 Minuten bei 37 °C ins Wasserbad gebracht.

Schließlich wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

5 μ l	yeast-tRNA (50 mg/ml)
0,5 μ l	RNAsin I (Promega)
0,5 μ l	DNase I (RNase-frei; 25 mg/ml; Promega)

und für 8 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Zur folgenden Phenol-Extraktion wurde zuerst 10 μ l 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 74 μ l DEPC-Wasser und anschließend 100 μ l kaltes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und dieses wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert (13000 U/min). Dieser Schritt diente zur „Reinigung“ der Nukleinsäurelösung, da sich häufig unerwünschte Verschmutzungen, wie z.B. Proteine darin befinden.

Aus dem nun entstandenen Drei-Phasen-System wurde die obere, wässrige Phase (ca. 70 μ l), welche die RNA-Transkripte enthält, zur weiteren Bearbeitung entnommen und in ein neues Sicherheitseppendorfgefäß pipettiert.

Material und Methoden

Im folgenden Ethanol-Präzipitationsschritt wurden die Nukleinsäurelösungen mit 10 μl Natriumacetat und 250 μl absolutem Alkohol versetzt, mindestens 60 Minuten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen und anschließend bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten ein RNA-Pellet zentrifugiert (13000 U/min). Der Überstand wurde in ein neues Sicherheitseppendorfgefäß überführt und das Pellet erneut mit 500 μl Ethanol (70 %; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 13000 U/min). Der Überstand wurde in das vorherige Sicherheitseppendorfgefäß überführt und das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 10 Minuten unter dem Abzug getrocknet, danach mit 30 μl 10 mM DTT gut gemischt bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte.

Bis zur weiteren Verarbeitung resp. zur Szintillationsmessung wurde die erhaltene Nukleinsäurelösung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.9.1.2 Messung von [^{35}S] im Szintillationszähler (Beckman[®] LS5000 TD)

Für jede Transkriptionsprobe wurde ein Messröhrchen mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt und entsprechend der zu messenden Proben beschriftet. Anschließend wurden die Messröhrchen in einer spezifischen Anordnung in die spezielle Halterung des Beckman[®] Gerätes (Beckman[®] LS5000 TD) gestellt (siehe nachfolgende Abb. 2).

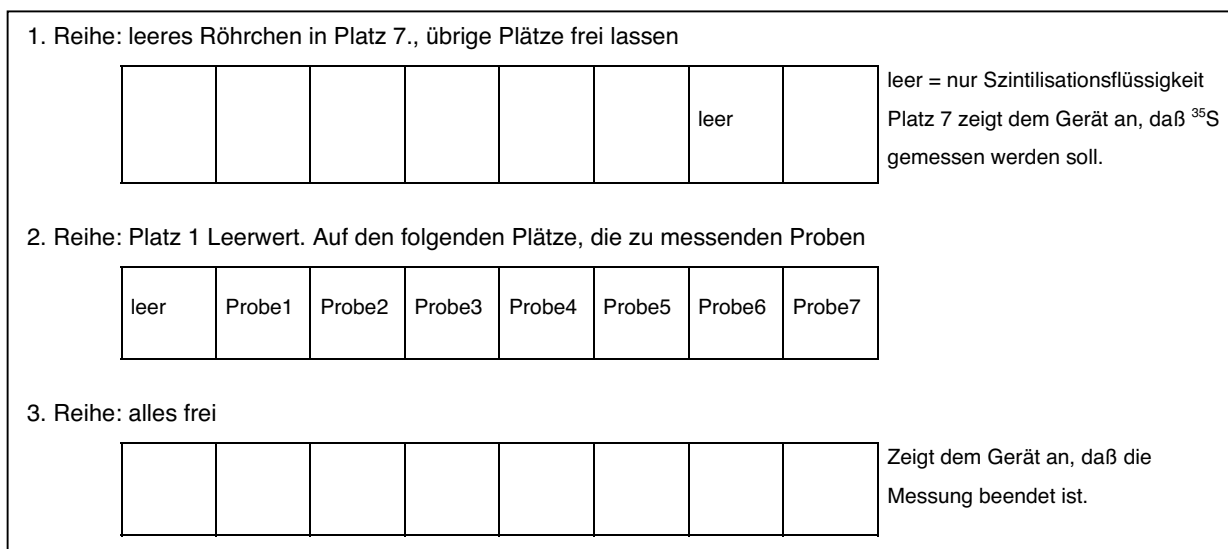


Abb. 2

In jedes Messröhrchen wurde 1 μl des Transkriptionsansatzes pipettiert, um die Inkorporation von ^{35}S -UTP in den Sonden zu messen.

Jeder gemessene Wert wurde auf einen angeschlossenen Nadeldrucker ausgegeben.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde vom Beckman[®] Gerät durchgeführt und in counts per minutes (cpm) ausgegeben.

3.1.9.2 In-situ-Hybridisierung (Paraffinschnitte)

Etwa 5 μm dünne Schnitte wurden auf APES-beschichtete Objektträger (s. Anhang) aufgezogen und über Nacht getrocknet.

Mindestens drei (oder ggf. mehr) Objektträger wurden mit gleicher [³⁵S]-antisense-Sonde und mindestens ein Objektträger mit der dazugehörigen [³⁵S]-sense-Sonde angesetzt, sodaß eine photographische Entwicklung nach mindestens drei unterschiedlichen Expositionszeiten (4, 6 und 8 Wochen) möglich war. Die sense-Hybridisierung wurde parallel zur optimalen antisense-Hybridisierung entwickelt.

Die Schnitte wurden in „gebackenen“ 50 ml Küvetten sortiert und mindestens 30 Minuten mit Xylol behandelt. Anschließend wurde das Xylol erneuert und für weitere 20 Minuten mit den Schnitten in der Küvette belassen. Danach folgte eine 10-minütige Aceton- Waschung, eine 10-minütige Aceton/PBS- Waschung (1:1) und eine 10-minütige PBS Waschung. Dann wurden die Schnitte für 20 Minuten mit 0,2 M HCl (in DEPC-H₂O) bei Raumtemperatur inkubiert, um basische Proteine zu denaturieren, wodurch mögliche „Fehlbindungen“ der später eingesetzten RNA verhindert wurden. Nach einer zweifachen Waschung mit PBS (30 Sekunden, dann erneut 2 Minuten) folgte die Verdauung mittels Pronase (0,5 mg/ml) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Mit 30-sekündiger 0,1 M Glycin/1x PBS Lösung wurde die Pronase gestoppt. Nach zweimaligem 30-sekündigen Spülen der Schnitte mit PBS erfolgte eine Nachfixierung mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS bei pH 7,0) bei 4 °C im Kühlschrank. Die anschließende PBS-Waschung (5 Minuten) stoppte die Nachfixierung.

Zur Verhinderung von Fehlbindungen der RNA-Sonde bzw. Brückenbindung wurden Aminogruppen acetyliert. Hierfür wurde 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) in einer

Material und Methoden

„gebackenen“ Flasche angesetzt und unmittelbar vor Gebrauch 0,25 % Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Diese Lösung wurde sehr kurz vermischt und direkt in die Küvetten gegeben. Die Küvetten mussten sofort manuell geschüttelt und anschließend auf einen Schüttler verbracht werden. Hier inkubierten sie für 10 Minuten. Die Reaktion stoppte man wieder durch PBS (5 Minuten). Nach der folgenden Dehydrierung (jeweils 2 Minuten bei 30 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol mit DEPC-H₂O) der Schnitte und anschließender Trocknung für 1 bis 2 Stunden wurden die Objektträger trocken in eine feuchte Kammer einsortiert, die zuvor mit 3 Lagen Zellstoff ausgelegt wurden.

Hybridisierung:

Auf jeden Objektträger kamen 25 µl einer Mischung aus „**Hybridisierungsmix**“ mit „**Sondenmix**“ im Verhältnis 4:1.

Aus der Anzahl der Schnitte errechnete sich das Gesamtvolumen des herzustellenden **Hybridisierungsmixes** (20 µl pro Objektträger) nach Tabelle 4.

Tab. 4 Hybridisierungsmix

für	400 µl	600 µl	1000 µl	1300 µl	1500 µl
Formamid	200 µl	300 µl	500 µl	650 µl	750 µl
10x Salze *	50 µl	75 µl	125 µl	162,5 µl	187,5 µl
0,1 M DTT	40 µl	60 µl	100 µl	130 µl	150 µl
Hefe-tRNA	10 µl	15 µl	25 µl	32,5 µl	37,5 µl
50 % DexSO4	100 µl	150 µl	250 µl	325 µl	375 µl

Dieser **Hybridisierungsmix** wurde auf 50 °C erhitzt, „gevortext“ und bis zum Gebrauch im Wasserbad belassen.

Der **Sondenmix** (5 µl pro Objektträger) bestand aus 50 % (2,5 µl) Formamid, 10 % (0,5 µl) DTT sowie X µl Sonde. Das Restvolumen füllte man mit DEPC-H₂O auf.

Das Sondenvolumen errechnete sich aus der gemessenen spezifischen Aktivität (Beckman® Gerät) wie folgt:

$$\frac{\text{Sollcpm} \times \text{OTAnzahl}}{\text{Istcpm}} = \mu\text{l Sonde} \quad (\text{Soll cpm} \approx 40000)$$

Nach Inkubation des Sondenmixes (30 Sekunden bei 80 °C; zur RNA-Streckung) wurde der Hybridisierungsmix 1:4 zugegeben. Das entstandene Gemisch wurde „gevortext“ und kurz zentrifugiert. Anschließend konnte das Gemisch bis zum Gebrauch in einem 50 °C warmen Wasserbad verbleiben.

Auf jeden Schnitt in der feuchten Kammer wurde luftblasenfrei 25 μl des Gemisches pipettiert, und mit einem RNase-freien Deckglas bedeckt. Anschließend wurden ca. 25 ml einer Mischung aus Formamid und DEPC-Wasser (1:1) auf die Zellstofflagen gegeben. Die Kammern wurden verschlossen, in einen Wärmeschrank überführt, in luftdichte Folie verpackt und über Nacht (16 - 18h) bei 48 °C inkubiert.

3.1.9.3 Waschung nach Hybridisierung

Die Posthybridisierungswaschlösung wurde auf 50 °C erhitzt und in die auf 50 °C vorgewärmten Küvetten gefüllt. Die hybridisierten Schnitte wurden in die Küvetten mit der warmen Posthybridisierungswaschlösung überführt und in ein 50 °C warmes Schüttlerwasserbad für 10 min. gestellt. Anschließend wurde ein zweiter vorgewärmter Satz Küvetten mit Posthybridisierungswaschlösung gefüllt und die Objektträger aus den ersten in die zweiten Küvetten gegeben. Hierbei lösten sich die Deckgläser von den Objektträgern. Die Objektträger blieben nun für 4 Stunden unter ständigem Schütteln im Wasserbad. Sowohl die erste Posthybridisierungswaschlösung als auch die Deckgläser wurden als radioaktiver Müll entsorgt.

Anschließend wurden die Schnitte in 37 °C warme 1x TES-Waschlösung überführt und das Schüttlerwasserbad mittels Eis auf 37 °C heruntergekühlt. Nach weiteren 15 Minuten im Schüttlerwasserbad wurden die Schnitte für 30 Minuten mit RNase (100 μl / 50 ml in 1x TES) inkubiert. Dieser Schritt wurde durch eine neue 1x TES-Lösung gestoppt, die Schnitte in horizontale Küvetten überführt und für weitere 30 Minuten bei 37 °C im Schüttlerbad belassen.

Die anschließende Waschung erfolgte in 2x SSC für 20 Minuten und in 0,1x SSC Lösung für 20 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte in eine aufsteigende

Alkoholreihe (70%, 90% und 100% mit je 0,3 M NH_4 -Acetat) für jeweils 20 Sekunden inkubiert. Nach der letzten 100% Ethanol Behandlung folgte eine staubfreie Lufttrocknung der Schnitte für mindestens 1-2 Stunden.

3.1.9.4 Beschichtung der Objektträger mit Fotoemulsion Ilford G 5

Küvetten (Plastikversandtaschen für 2 Objektträger) gefüllt mit je 10 ml 0,6 M NH_4 -Acetat (9,2 ml H_2O + 0,8 ml 7,5 M NH_4 -Acetat; pH-Wert 7,5) wurden im Wasserbad auf 43 °C vorgewärmt. In völliger Dunkelheit wurde die Fotoemulsion Ilford G 5 im Wasserbad bei 45 °C für ca. 30 Minuten verflüssigt. 10 ml der Emulsion wurden mit einer Spritze in die Küvette überführt, wobei NH_4 -Acetat auf 0,3 M verdünnt wurde. Dieses Gemisch wurde ca. 10 Minuten mit einem Objektträger vorsichtig luftblasenfrei umgerührt. Die Objektträger wurden 1 bis 2 Sekunden lang in die Fotoemulsion getaucht und senkrecht in Trocknungsständer gestellt. Nach einer Trocknungszeit von etwa 1 Stunde wurden die beschichteten Objektträger entsprechend der verschiedenen Expositionszeiten in vorbereitete Kartellboxen mit Trocknungsmittel sortiert. Die Boxen wurden mit drei Lagen dicker Aluminiumfolie lichtdicht verschlossen, beschriftet und entsprechend der Expositionszeiten im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.1.9.5 Entwicklung

Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die entsprechenden Kartellboxen für 20 Minuten an die Raumtemperatur adaptiert. Währenddessen wurden vier horizontale Küvetten vorbereitet. In der Dunkelkammer wurden die Kartellboxen geöffnet, die Schnitte in Küvetteneinsätze überführt und mittels Stoppuhr für 3 Minuten in Kodak D 19 entwickelt, wobei die Küvetteneinsätze alle 30 Sekunden geschüttelt wurden. Der Entwicklungsprozeß wurde 60 Sekunden in 1%-iger Essigsäure gestoppt und anschließend für 3 Minuten (alle 30 Sekunden schütteln) in 25%-igen Kodak Fixierer fixiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte in die Küvette mit H_2O gestellt und nach Verlassen der Dunkelkammer für ca. 45 Minuten unter fließendem Leitungswasser (kalt) gespült.

3.1.9.6 Kontrolle der molekularbiologischen Methoden

Sowohl equine Tonsillen für das CD68 und das CD1a Hybridisierungsprodukt als auch humane Tonsillen (Inst. f. Pathologie; Charité⁶) wurden als Hybridisierungskontrolle (MIP 3β) bei jedem Hybridisierungsansatz beigefügt und entsprechend ausgewertet.

Zusätzlich fand bei jedem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle der Sonden mittels „sense“-Hybridisierung statt.

3.1.10 Grading

Die Auswertung der Gewebeproben, der Immunhistochemie als auch der in-situ Hybridisierung erfolgte am Lichtmikroskop unter Verwendung eines semiquantitativen Grading-Schemas (nach Shackelford (Shackelford et al. 2002)):

Grade 1	minimal / sehr wenig	+	< 1%
Grade 2	wenig / leicht	++	1 – 25%
Grade 3	mäßig / mittlere Anzahl	+++	26 – 50%
Grade 4	massiv / viele	++++	51 – 75%
Grade 5	hochgradig / extensive Anzahl	+++++	76 – 100%

⁶ Dank an Prof. Dr. H. Stein, Institut für Pathologie; Campus Benjamin Franklin