

## Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Häufigkeit equiner Neoplasien im Sektionsbereich

Pferde im Sektionsbereich von 1995 – 2000

	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Σ	%
<b>Pferde gesamt:</b>	<b>81</b> (5,08%)	<b>108</b> (6,2%)	<b>102</b> (5,06%)	<b>93</b> (3,69%)	<b>103</b> (4,1%)	<b>87</b> (3,68%)	<b>574</b>	<b>(4,50%)</b>
<b>Sektionen gesamt (%):</b>	<b>1593</b>	<b>1741</b>	<b>2015</b>	<b>2521</b>	<b>2514</b>	<b>2362</b>	<b>12746</b>	
<b>Tumore gesamt (%):</b>	<b>3</b> (3,70%)	<b>4</b> (3,70%)	<b>1</b> (0,98%)	<b>3</b> (3,22%)	<b>2</b> (1,94%)	<b>3</b> (3,45%)	<b>16</b>	<b>(2,78%)</b>

Bei den equinen Tumoren im Sektionsgut des Institutes für Veterinär-Pathologie handelte es sich in keinem Fall um eine neoplastische Hautveränderung.

#### 4.2 Häufigkeit equiner Neoplasien im Biopstatbereich (1995-2000)

	1995	1996	1997	1998	1999	2000
<b>Pferde gesamt:</b>	<b>70</b>	<b>97</b>	<b>113</b>	<b>131</b>	<b>226</b>	<b>166</b>
<b>Einsendungen gesamt:</b>	<b>2861</b>	<b>3197</b>	<b>2936</b>	<b>3159</b>	<b>3644</b>	<b>3388</b>
<b>Pferdeanteil (%):</b>	<b>2,45</b>	<b>3,03</b>	<b>3,85</b>	<b>4,15</b>	<b>6,20</b>	<b>4,90</b>

davon	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	Σ	%
<b>Sarkoide</b>	<b>17</b>	<b>24,29</b>	<b>21</b>	<b>21,65</b>	<b>22</b>	<b>19,47</b>	<b>30</b>	<b>22,90</b>	<b>44</b>	<b>19,47</b>	<b>45</b>	<b>27,11</b>	<b>179</b>	<b>22,29</b>
<b>Papillome</b>	<b>3</b>	<b>4,29</b>	<b>1</b>	<b>1,03</b>	<b>3</b>	<b>2,65</b>	<b>2</b>	<b>1,53</b>	<b>5</b>	<b>2,21</b>	<b>1</b>	<b>0,60</b>	<b>15</b>	<b>1,87</b>
<b>Fibrosarkome</b>	<b>1</b>	<b>1,43</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>3</b>	<b>2,65</b>	<b>5</b>	<b>3,82</b>	<b>4</b>	<b>1,77</b>	<b>6</b>	<b>3,61</b>	<b>19</b>	<b>2,37</b>
<b>Melanome</b>	<b>1</b>	<b>1,43</b>	<b>5</b>	<b>5,15</b>	<b>4</b>	<b>3,54</b>	<b>5</b>	<b>18,52</b>	<b>8</b>	<b>3,54</b>	<b>4</b>	<b>2,41</b>	<b>27</b>	<b>3,36</b>
<b>Plattenepithelkarzinome</b>	<b>1</b>	<b>1,43</b>	<b>1</b>	<b>1,03</b>	<b>6</b>	<b>5,31</b>	<b>3</b>	<b>2,29</b>	<b>9</b>	<b>3,98</b>	<b>5</b>	<b>3,01</b>	<b>25</b>	<b>3,11</b>

In den 6 Jahren von 1995 bis 2000 betragen die Anzahlen der jährlichen Einsendungen der Veterinärpathologie der Freien Universität zu Berlin zwischen 2861 und 3644. Der prozentuale Anteil an Pferden variierte zwischen 2,45 % und 6,20 %.

Der Anteil der Sarkoide der Pferdeeinsendungen lag in diesen 6 Jahren im Durchschnitt bei 22,29% und war damit die am häufigsten auftretende neoplastische Hautveränderung dieser Spezies.

Der prozentuale Anteil an Papillomen betrug im Durchschnitt 1,87%.

Der Fibrosarkomanteil lag im Durchschnitt bei 2,37%, während der Anteil der Melanome durchschnittlich bei 3,36% lag.

Bei durchschnittlich 3,11% des Einsendungsguts von Pferden handelte es sich um Plattenepithelkarzinome.

### 4.3 Immunhistochemische Kontrollen

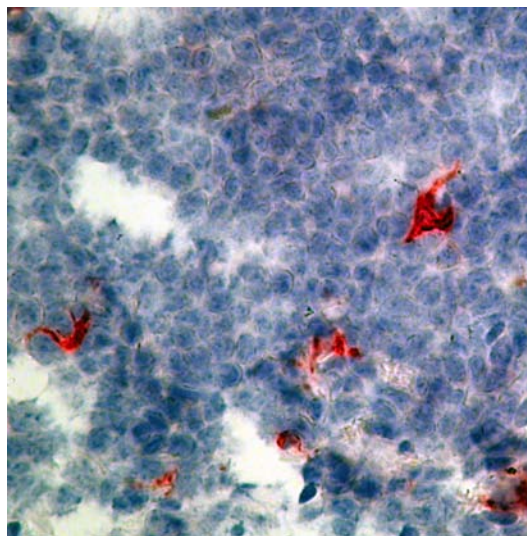
Die untersuchten Antikörper gegen S100, MAC387, CD3 und CD79a waren in den entsprechenden felines und caninen Kontrollgeweben positiv.

Obwohl sich der CD79a Antikörper zwar bei felinelem Kontrollgewebe als hochgradig antigenspezifisch darstellte, war er in equinem Gewebe eher als ein sehr unsicherer Antikörper mit heterogener und inhomogener Reaktivität.

Die gegen humanes CD1a und CD68 gerichteten Antikörper waren an humanen Tonsillen positiv und an allen equinen Proben negativ.

Sowohl der CD68-Klon KP1 als auch der CD68-Klon PG-M1 der Firma Dako zeigten am Pferdegewebe keine positiven Reaktionen, sodaß sich diese Antikörper als nicht bewertbar herausstellten.

Der CD68-Antikörper (Ki-M6; Dako) stellt sich lediglich im Gefrierschnitt an equinem Lymphknoten positiv dar (Abb. 3).



**Abb. 3** CD68-positive interdigitierende dendritische Zellen (IDC's) im equinen Lymphknoten am Cryoschnitt

### 4.3.2 Bovines MHCII

Die bovinen MHC-II-Antikörper bo191 und bo131 zeigten keine positiven Reaktionen im Kontrollgewebe oder in den zu untersuchenden Geweben.

Alle anderen Antikörper reagierten im Vergleich zu den Kontrollen spezifisch.

Im Folgenden wird die Immunreaktivität der tumorinfiltrierenden Immunzellen für verschiedene Tumorentitäten dargestellt:

### 4.4 Sarkoide

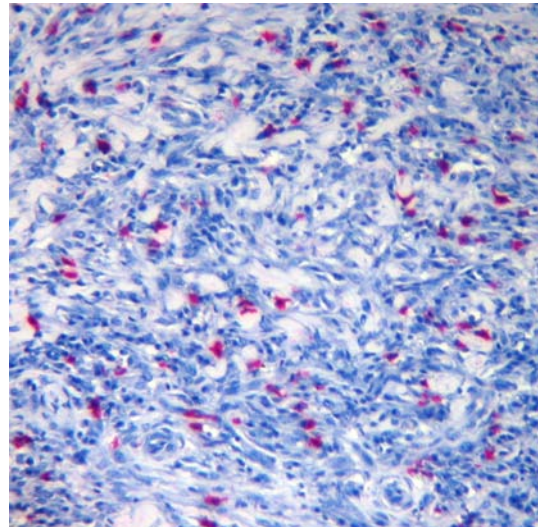
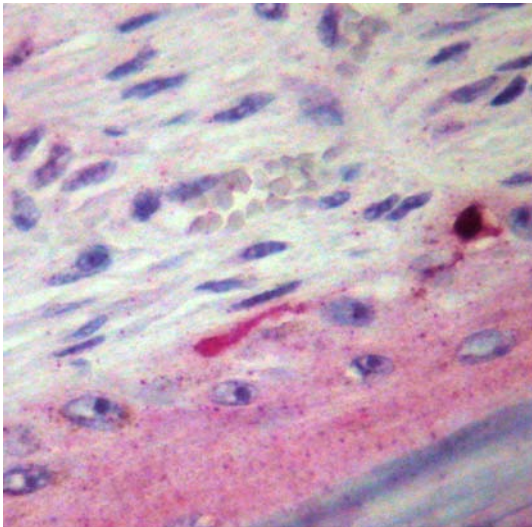
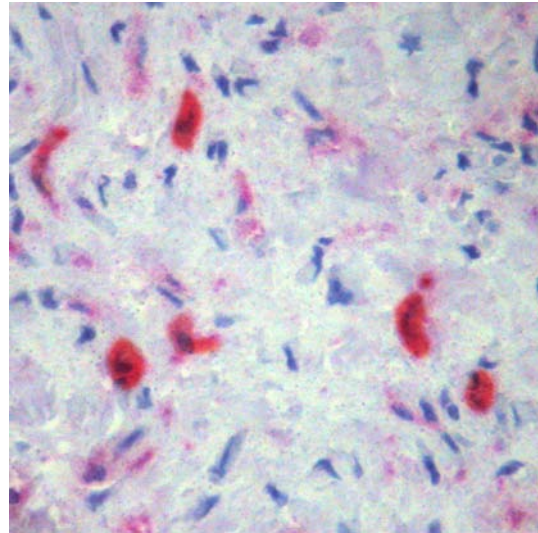
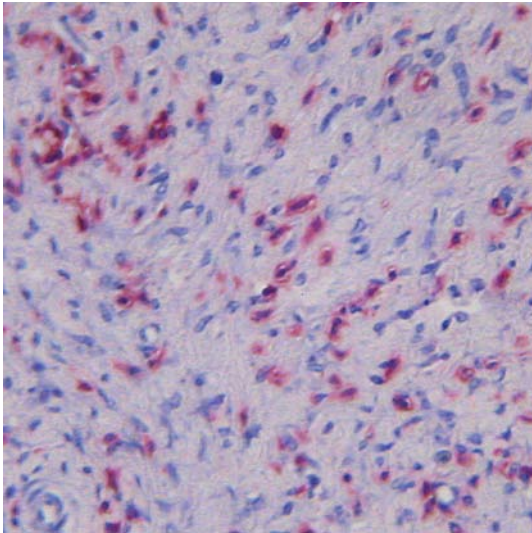
Ein Großteil der equinen Sarkoide zeigte histologisch eine moderate Rundzell-Infiltration, die immunhistochemisch wie folgt (Tab. 5) aussieht:

**Tab. 5** Immunhistochemisches Grading von equinen Sarkoiden (n=179)

n	115	52	9	3
T-Zellen (CD3)	++++	+++	++	+
B-Zellen (CD79a)	++	++	+	+
Makrophagen/Monozyten (MAC 387)	++++	+++	++++	++++
DCs (S100)	++	+	+	+

Histologisch stehen Makrophagen mit einer mäßig bis massiven Anzahl mit Infiltration im gesamten Tumorparenchym im Vordergrund. Zusätzlich bestimmen T-Zellen das Zellbild, wobei hier jedoch eine erhebliche Variation innerhalb der verschiedenen Tumorproben besteht. Letztlich sind auch wenige B-Zellen und z.T. sehr wenige DCs im Tumor als auch im peripheren Randgewebe nachweisbar.

## Ergebnisse



A | B  
C | D

- A. CD3-positive T-Zellpopulationen diffus im gesamten Sarkoidgewebe verteilt, 100-fache Vergr.
- B. CD79-positive B-Zellpopulationen diffus im gesamten Sarkoidgewebe verteilt, 400-fache Vergr.
- C. S100-positive basal lokalisierte Langerhanszellen der Epidermis, 400-fache Vergr.
- D. MAC387-positive Makrophagen- und Monozytenpopulationen diffus im Parenchym verteilt, 100-fache Vergr.

### 4.5 Melanome

Immunzellen beim Melanom stellen sich immunhistochemisch gleichartig wie bei den Papillomen dar (Tab. 6).

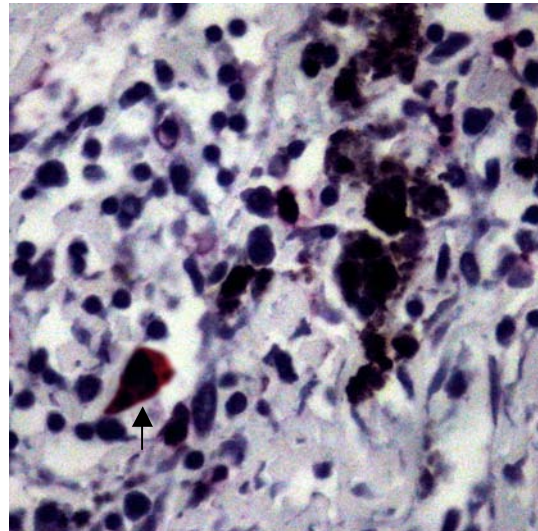
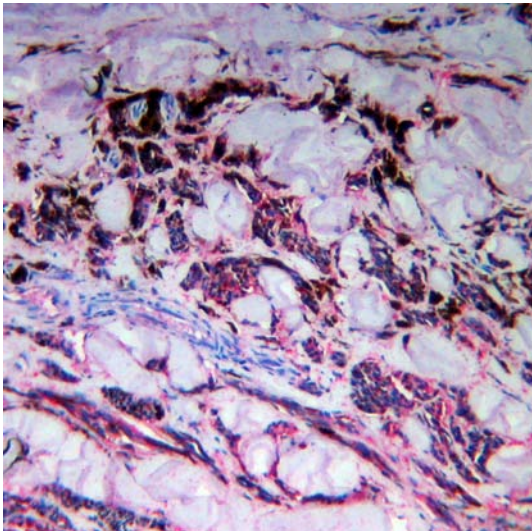
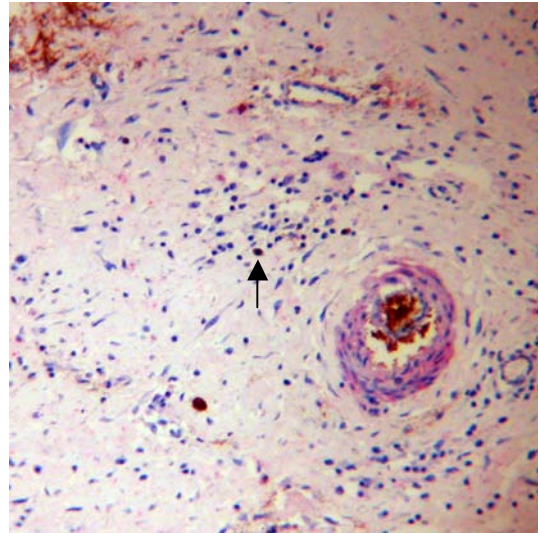
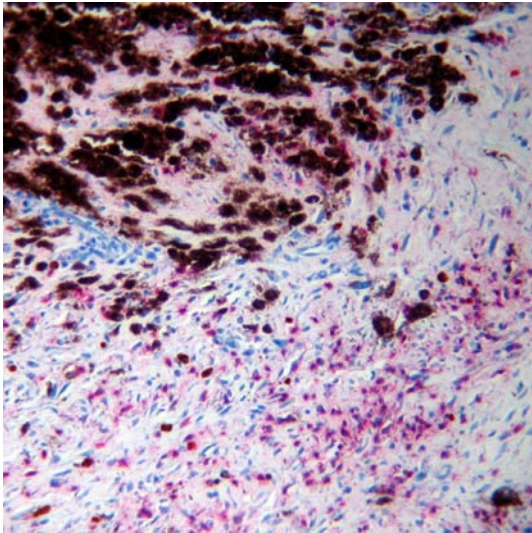
**Tab. 6** Grading der Melanome (n=27)

N	13	10	4
T-Zellen (CD3)	++	++	+
B-Zellen (CD79a)	+	+	+
Makrophagen/Monozyten (MAC387)	+	-	+
DCs (S100)	-*	-*	-*

\* nicht nachweisbar

In Melanomen sind wenige bis minimale T-Zellpopulationen vertreten, die allerdings die Hauptfraktion an Immunzellen darstellen. Zusätzlich waren CD79a-positive B-Zellen und vereinzelte (minimal) Makrophagen und Monozyten nachweisbar. Diese waren jedoch diffus im Tumorgewebe verteilt. S100-positive dendritische Zellen waren nicht nachweisbar, da sich diese von den Melanozyten färberisch nicht unterscheiden und so visuell nicht mehr zu trennen waren. Nach Bleichung war keine Immunreaktivität vorhanden.

## Ergebnisse



A | B  
C | D

- A. CD3-positive T-Zellpopulationen in der Peripherie eines Melanoms, 100-fache Vergr.
- B. CD79-positive B-Zellpopulationen (Pfeil) ebenfalls in der Peripherie, 100-fache Vergr.;
- C. S100-positive Melanozyten resp. Melanom-Tumorzellen, 100-fache Vergr.
- D. MAC387-positiver Makrophage (Pfeil) in der Peripherie eines Melanoms, 400-fache Vergr.

### 4.6 Papillome

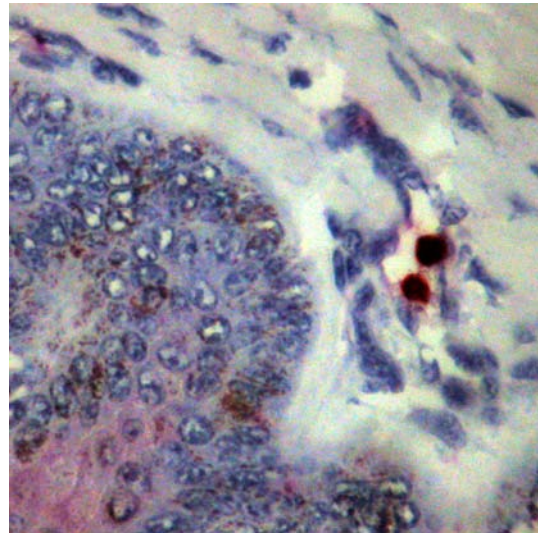
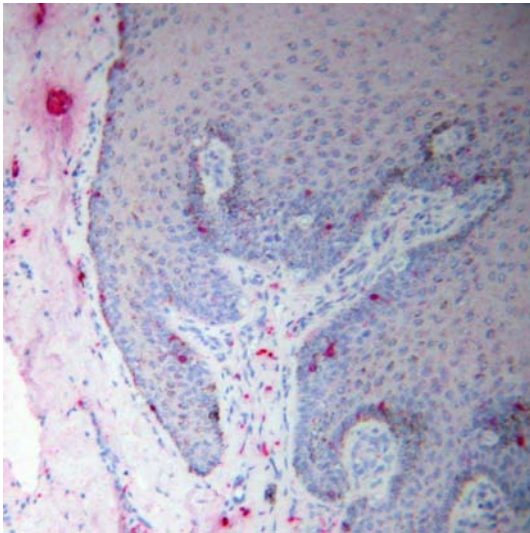
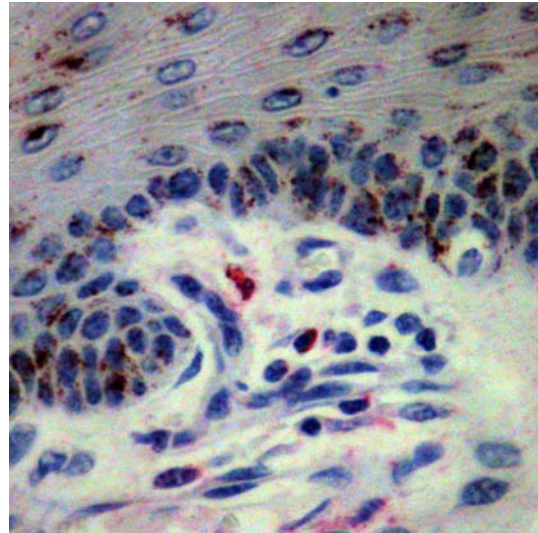
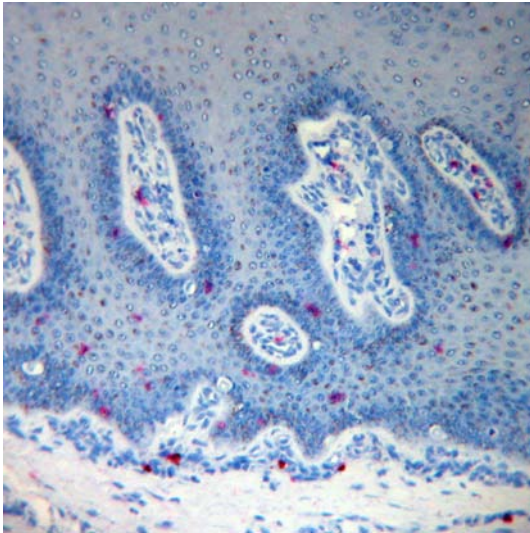
Die Immunhistochemie der Immunzellen im Papillom ergibt in allen untersuchten Tumoren (n=15) qualitativ und (semi-) quantitativ gleichartige Verteilungsmuster.

**Tab. 7** Grading der Papillome (n=15)

n	15
T-Zellen (CD3)	++
B-Zellen (CD79a)	+
Makrophagen/Monozyten (MAC387)	+
DCs (S100)	++

Im Vordergrund stehen eine minimale bis geringe Immunzellpopulation im Papillom. Hauptsächlich kommen DCs als auch T-Zell-Populationen vor, obgleich sie sich immunhistochemisch in nur geringer Menge (Grade 2) darstellen lassen. B-Zellen, Makrophagen und Monozyten sind lediglich in minimaler Menge (Grade 1) im Gewebe nachweisbar.

## Ergebnisse



A | B  
C | D

- A. CD3-positive T-Zellpopulationen vereinzelt im Stroma der Papillome, 100-fache Vergr.
- B. CD79-positive B-Zellpopulationen waren hier nur minimal nachweisbar, 400-fache Vergr.
- C. S100-positive basal lokalisierte Langerhanszellen in der Epidermis als auch im Stroma, 100-fache Vergr.
- D. MAC387-positive Monozytenpopulationen waren lediglich intravasal lokalisiert, keine gewebsständigen Populationen nachweisbar, 400-fache Vergr.



### 4.7 Plattenepithelkarzinome

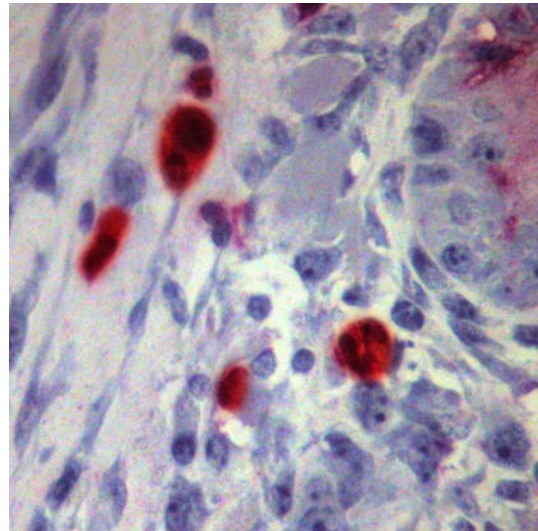
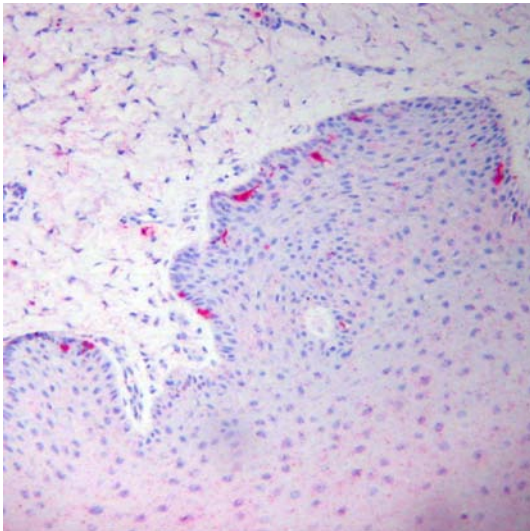
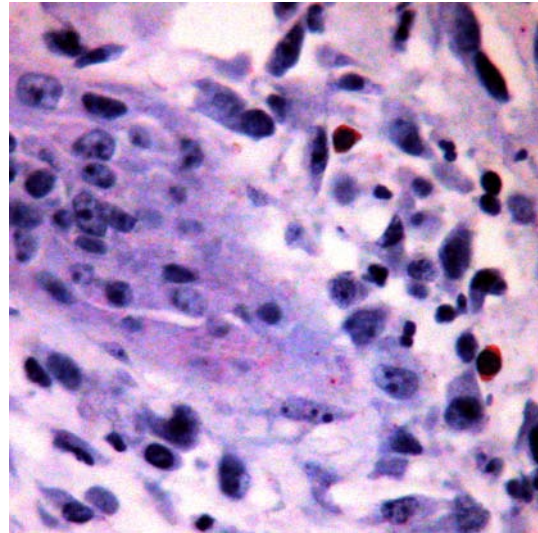
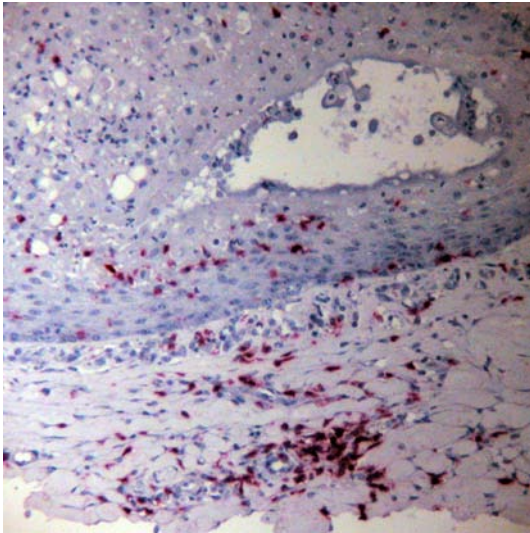
Das immunhistochemische Reaktionsmuster von Immunzellen im equinen Plattenepithelkarzinom ist qualitativ vergleichbar mit dem der equinen Sarkoide.

**Tab. 8** Grading der Plattenepithelkarzinome (n=25)

n	14	11
T-Zellen (CD3)	++++	++++
B-Zellen CD79a)	+	+
Makrophagen/Monozyten (MAC387)	++++	+++
DCs (S100)	+++	+++

Die hochgradige Immunzell-Infiltration (++++) besteht vorwiegend aus einer massiven Anzahl T-Zellen sowie aus mittlerer bis massiver Makrophagenpopulation. Der prozentuale Anteil der DCs liegt bei 26-50%, was einer mäßigen Infiltration entspricht. Die B-Zellen machen weniger als 1% (minimal) der Immunzellpopulation aus.

## Ergebnisse



A|B  
C|D

- A. CD3-positive T-Zellpopulationen diffus im gesamten Parenchym eines Plattenepithelkarzinoms verteilt, 100-fache Vergr.
- B. CD79-positive B-Zellpopulationen im Parenchym verteilt, 400-fache Vergr.
- C. S100-positive basal lokalisierte Langerhanszellen der Epidermis, 100-fache Vergr.
- D. MAC387-positive Makrophagen- und Monozytenpopulationen in der Peripherie eines entzündlich veränderten Plattenepithelkarzinoms, 400-fache Vergr.

### 4.8 Fibrosarkome

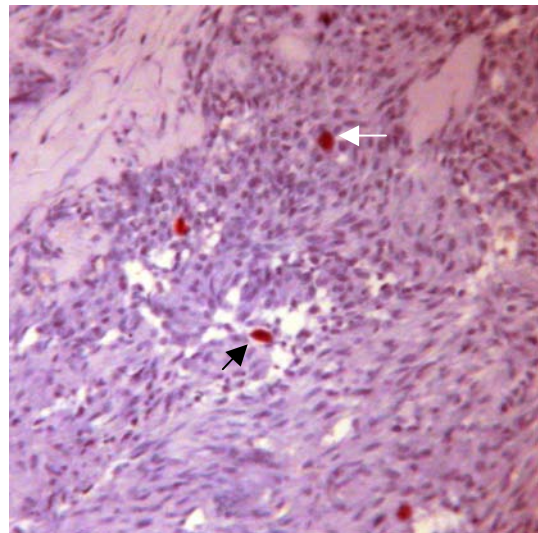
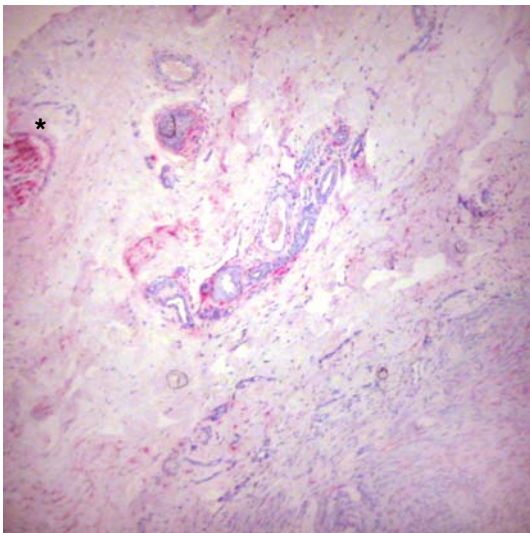
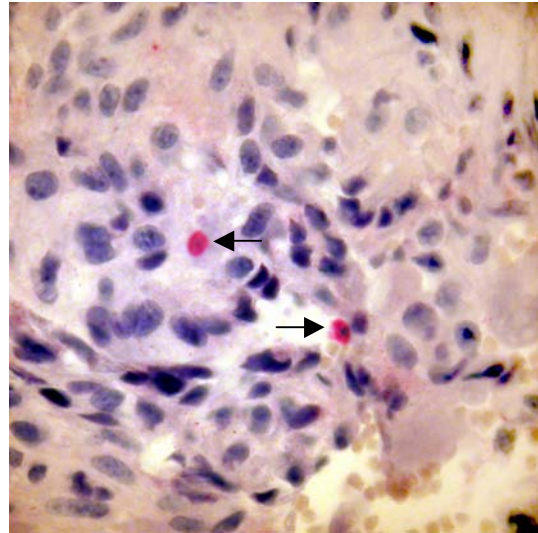
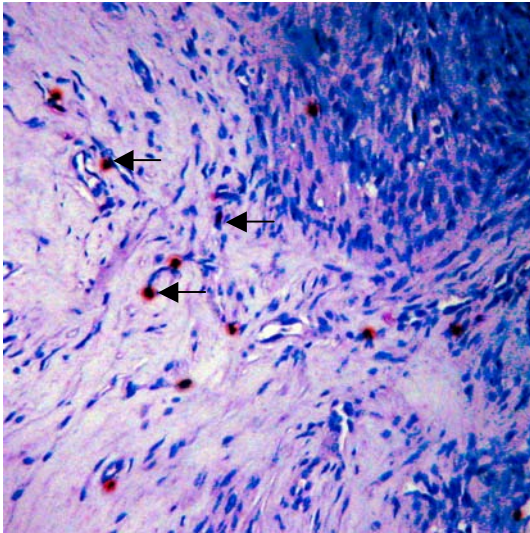
Histologisch besteht meist nur eine Grad 1 bis 2 (minimale bis schwache) Immunzell-Infiltration. Die vorkommenden Immunzellen zeigen eine mögliche Vergleichbarkeit zwischen dem Papillom und dem Fibrosarkom (Tab. 7, Seite 55 und Tab 9).

**Tab. 9** Grading der Fibrosarkome (n=19)

N	15	4
T-Zellen (CD3)	++	+
B-Zellen (CD79a)	+	++
Makrophagen/Monozyten (MAC387)	+	+
DCs (S100)	-	-

Hauptimmunzellpopulationen stellen die T-Zellen dar. Vereinzelt waren B-Zellen nachweisbar. Makrophagen als auch DCs spielen eine untergeordnete Rolle, sodaß insgesamt von einer minimalen bis schwachen Immunzellpopulation innerhalb der verschiedenen Fibrosarkome zu sprechen ist.

## Ergebnisse



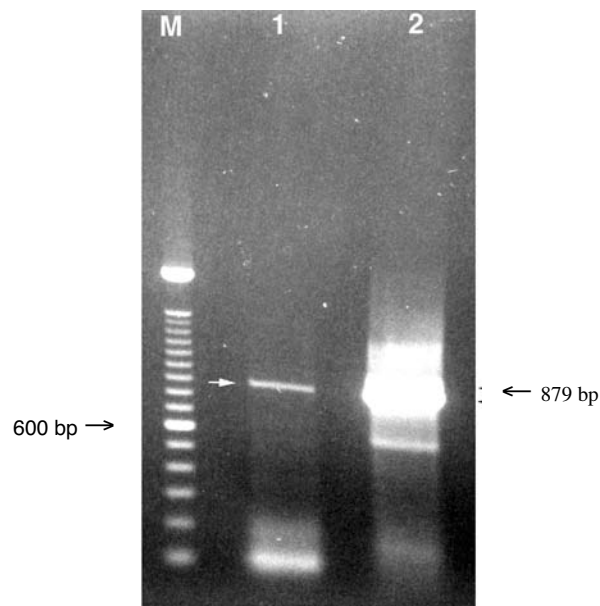
- |   |   |
|---|---|
| A | B |
| C | D |
- A. CD3-positive T-Zellpopulationen am Rand eines Fibrosarkoms (Pfeile), 100-fache Vergr.
  - B. CD79-positive B-Zellen in der Peripherie, 400-fache Vergr.
  - C. S100-positive Zellen waren nicht nachweisbar. Die hier rot dargestellten Areale (\*) stellen eine interne Positivkontrolle (Nervengewebe) dar; 32-fache Vergr.
  - D. Makrophagen und Monozyten (MAC387) im Parenchym verteilt, 100-fache Vergr.

### 4.9 Molekularbiologischer Nachweis von equinem CD68 und CD1

Die Isolierung und Aktivierung der PBMCs aus Pferdeblut gelang mittels der im Material und Methodenteil dieser Arbeit beschriebenen Verfahren.

#### 4.9.1 Equines CD68

Nach der RNA-Präparation aus aktivierten equinen Monozyten zeigte die RT-PCR Banden bei 879 bp (Abb. 4), die dem humanen CD68 entsprechen. Die verwendeten Primer sind in Tab. 3 (s. Seite 36) dargestellt.



**Abb. 4** CD68 RT-PCR aus ConA 48 h stimulierten Monozyten. cDNA zweier Pferde in einer Länge von 879 bp Spur 1 + 2;  
M = 100bp Leitermarker.

## Ergebnisse

Nach Sequenzierung der 879 bp-Banden und anschließendem BLAST® (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergab sich folgendes:

**Abb. 5** BLAST –Auswertung

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 46361277 gb AY373259.2  Equus caballus CD68 protein mRNA...	1043	0.0
gi 40804989 gb AY499346.1  Equus caballus CD68 mRNA, partia...	1043	0.0
gi 55646936 ref XM_523829.1  PREDICTED: Pan troglodytes LOC...	412	e-112
gi 33869409 gb BC015557.2  Homo sapiens CD68 antigen, mRNA ...	404	e-109
gi 32880188 gb BT009923.1  Homo sapiens CD68 antigen mRNA, ...	404	e-109
gi 30584566 gb BT007864.1  Synthetic construct Homo sapiens...	404	e-109
gi 50503811 emb CR623004.1  full-length cDNA clone CS0DI008...	404	e-109
gi 50487657 emb CR606850.1  full-length cDNA clone CS0DE008...	404	e-109
gi 50479340 emb CR598533.1  full-length cDNA clone CS0DI043...	404	e-109
gi 4557434 ref NM_001251.1  Homo sapiens CD68 antigen (CD68...	396	e-107
gi 298664 gb S57235.1 S57235 CD68=110kda transmembrane glyc...	396	e-107
gi 34366681 emb BX647524.1 HSM807670 Homo sapiens mRNA; cDN...	389	e-105
gi 34870965 ref XM_213372.2  Rattus norvegicus similar to m...	240	5e-60
gi 5788043 gb AC007421.12 AC007421 Homo sapiens chromosome ...	168	1e-38
gi 24431829 gb AC016876.10  Homo sapiens chromosome 17, clo...	168	1e-38
gi 3253158 gb AF005355.1 AF005355 Oryctolagus cuniculus tra...	167	6e-38
gi 18204915 gb BC021637.1  Mus musculus CD68 antigen, mRNA ...	149	1e-32
gi 52988 emb X68273.1 MMMACR M.musculus mRNA for macrosialin	149	1e-32
gi 12832122 dbj AK002264.1  Mus musculus adult male kidney ...	149	1e-32
gi 57086618 ref XM_546594.1  PREDICTED: Canis familiaris si...	131	3e-27

Score (bits) = Trefferhäufigkeit; „E Value“ beschreibt die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der gesuchten Sequenzen. Je kleiner der Wert, desto genauer das Suchergebnis.

Das nun folgende Alignment (Abb. 6) zeigt die Homologien zur humanen Sequenz:



## Ergebnisse

Um Kreuzreaktionen des sequenzierten CD68 zu überprüfen, wurde diese Sequenz mit der der Maus und des Menschen auf identische Sequenzabschnitte verglichen (Abb. 6). Dabei ergab sich, daß die Gemeinsamkeiten zwischen Pferd und Maus 80%, zwischen Pferd und Mensch 82% und zwischen Mensch und Maus 84% betragen.

### 4.9.1.1 CD68 Sondenherstellung mit <sup>35</sup>S-UTP

Die Messung von [<sup>35</sup>S] im Szintillationszähler erfolgt nach der Transkription mit <sup>35</sup>S-UTP und ergab folgende Werte:

USER: 2 ID:35S				COMMENTS:CPM			
PRESET TIME: 1.00		H#: NO		SAMPLE REPEATS: 2		DATA CALC: CPM	
PRNITER: STD		SCR: YES		REPLICATES: 1		COUNT BLANK: NO	
RS232: OFF		RCM: YES		MULTIPLIES: 1.000000		VIAL SIZE: MAXI	
ISOTOPE 1: 35S		%ERROR: 0.50		BKG. SUB.:		0 HALF LIFE: YES	
SAM	POS	TIME	SCR	<u>35S</u>		RCM	ELAPSED
NO		MIN		CPM	%ERROR		TIME
1	1-1	1.00	0.400	25.00	40.00	4.83	1.50
1	1-1	1.00	0.588	17.00	48.51	3.15	2.63
Repeat Average CPM for				35S	21.00	COEF. OF VAR:	0.269
2	1-2	0.25	0.336	700524.50	0.48	0.00	3.63
2	1-2	0.25	0.335	695887.38	0.48	0.00	4.31
Repeat Average CPM for				35S	698205.94	COEF. OF VAR:	0.005
3	1-3	0.30	0.329	581249.25	0.48	0.00	5.38
3	1-3	0.30	0.326	581178.44	0.48	0.00	6.06
Repeat Average CPM for				35S	581213.88	COEF. OF VAR:	0.000
4	1-4	0.15	0.306	1506872.8	0.42	0.00	7.63
4	1-4	0.15	0.307	1502933.6	0.42	0.00	8.50
Repeat Average CPM for				35S	1504903.3	COEF. OF VAR:	0.002

**Abb. 7** Nr. 1 = Leerwert; Nr. 2= CD68 sense; Nr. 3 = CD68 antisense; Nr. 4 = MIP3β antisense (Kontrolle)



## Ergebnisse

Der vom Szintillationszähler errechnete Wert der spezifischen Aktivität (z.B. CD68 antisense = 581213.88 CPM) geht in die Volumenberechnung des Sondenmixes ein, so daß sich für die Hybridisierung folgende Werte ergaben:

	für 1 Objektträger (OT)	50 OT CD68 as	20 OT CD68 s	10 OT MIP3 $\beta$
Hybridisierungsmix	20 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	400 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Sondenmix	5 $\mu$ l	250 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Formamid	2,5 $\mu$ l	125 $\mu$ l	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
DTT	0,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
$\mu$ l Sonde	X	8 $\mu$ l	4 $\mu$ l	2,7 $\mu$ l
$\mu$ l dH <sub>2</sub> O	Differenz Sondenmix	92 $\mu$ l	36 $\mu$ l	17,3 $\mu$ l

**Tab. 10**

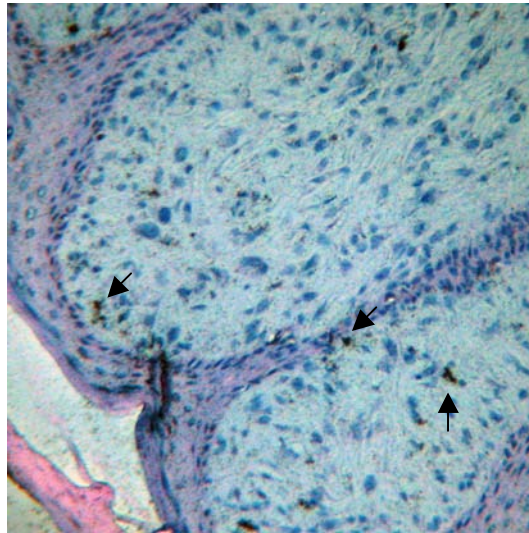
### 4.9.1.2 In-situ Hybridisierung

Nach Vorversuchen erwies sich eine Expositionszeit von 4 Wochen als ideal.

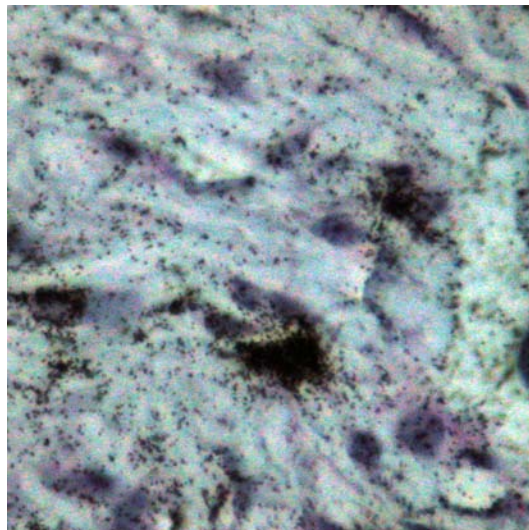
Alle CD68-positiven Zellen (z.B. Monozyten und Makrophagen usw.) waren in den einzelnen Gewebeproben, wie nachfolgend dargestellt, nachweisbar.

### 4.9.1.2.1 Sarkoid

Alle untersuchten Sarkoide (n=37) zeigen eine gleiche Verteilung von CD68 positiven Makrophagen innerhalb des Tumorgewebes, die weitgehend der der MAC387 immunhistochemisch positiven Zellen entsprechen (Abb. 8 und 9).



**Abb. 8** CD68-positive Makrophagen (s. Pfeile) im Parenchym verteilt; 100-fache Vergr.



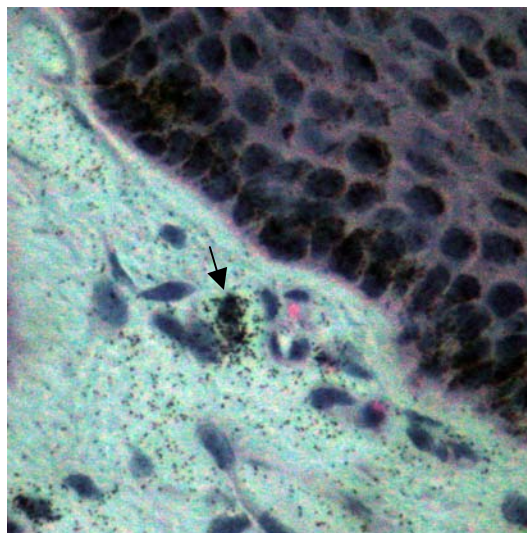
**Abb. 9** CD68-positive Makrophagen im Parenchym; 400-fache Vergr.

### 4.9.1.2.2 Melanom

Die Auswertung der Hybridisierungsprodukte der Melanome (n=25) war nicht möglich. Sowohl das Hybridisierungsprodukt als auch die Tumorzellen stellen sich histologisch als schwarze Punkte dar. Proben, die zuvor über eine Melanin-Bleichung vorbehandelt wurden, zeigen keine positiven RNA-Hybridisierungsprodukte.

### 4.9.1.2.3 Papillom

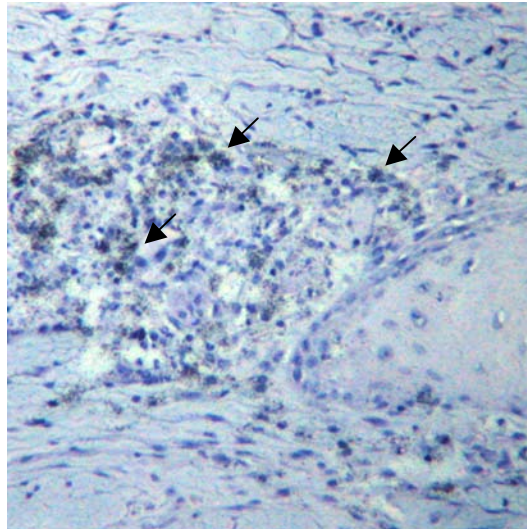
Die untersuchten Papillome (n=12) zeigen minimal CD68 positive Makrophagen. Nur im Randbereich der Papillome sind vereinzelte Makrophagen darstellbar (Abb. 10). Dies entspricht den Ergebnissen des MAC387 Antikörpers.



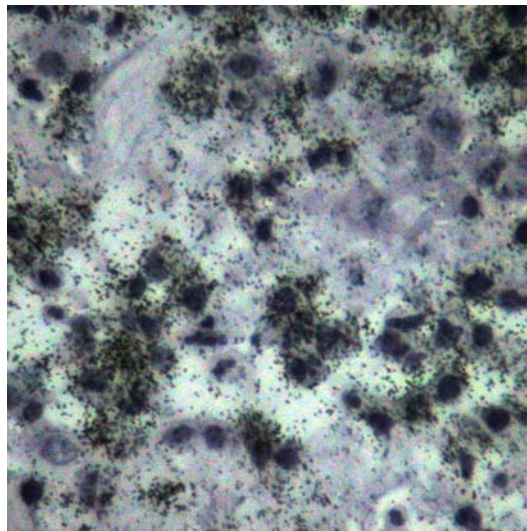
**Abb. 10** vereinzelte CD68-positive Makrophagen (s. Pfeil); 400-fache Vergr.

### 4.9.1.2.4 Plattenepithelkarzinom

In allen untersuchten Plattenepithelkarzinomen (n= 15) ist eine extensive Anzahl von CD68 positiven Zellen nachweisbar (Abb. 11 und 12).



**Abb. 11** massive Infiltration CD68-positiver Makrophagen (s. Pfeile); 100-fache Vergr.



**Abb. 12** massive Infiltration CD68-positiver Makrophagen; 400-fache Vergr.

## Ergebnisse

### 4.9.1.2.5 Fibrosarkom

Die Immunzellen der untersuchten Fibrosarkome (n=15) sind entgegen dem sehr wenigen (<1%) immunhistochemischen Makrophagennachweis in der in-situ Hybridisierung in mittelgradiger Anzahl (26-50%) positiv (Abb. 13).

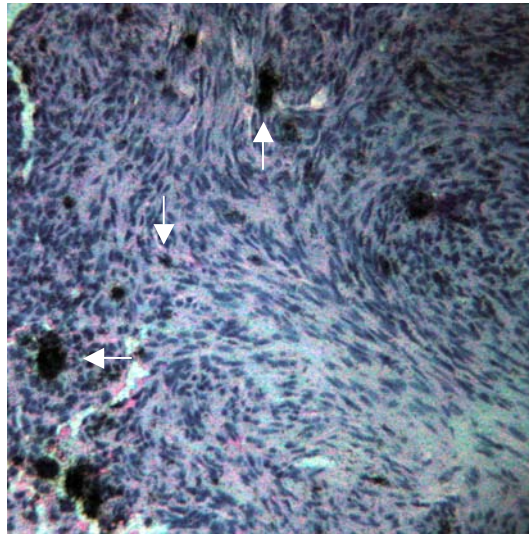


Abb. 13 mäßige Infiltration CD68-positiver Makrophagen (Pfeile) im Fibrosarkom; 100-fache Vergr.

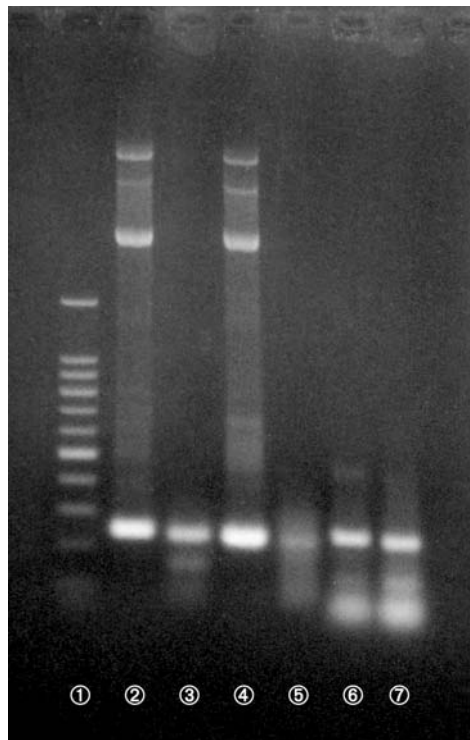
### 4.9.1.2.6 Zusammenfassendes Grading der CD68 RNA-Hybridisierung

	n	CD68
Sarkoide	37	++
Melanome	25	-*
Papillome	12	+
Plattenepithelkarzinome	15	++++
Fibrosarkome	15	+++

\* nicht auswertbar

### 4.9.2 Equines CD1

Nach der RNA-Präparation aus aktivierten Monozyten erfolgte eine RT-PCR mit einem spezifischen CD1 Primer, wobei die Banden bei 746 bp lagen (wird hier nicht gezeigt). Das BLAST®-Ergebnis (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergab sowohl bei CD1a als auch bei CD1b Übereinstimmungen, sodaß nach einem zweiten Primerdesign eine RT-PCR mit den spezifischen Primern (Tab. 3) von CD1a als auch CD1b durchgeführt wurde. Die Banden lagen bei 222 bp resp. 223 bp (Abb. 14).



**Abb. 14** 1. 100bp Leitermarker; 2. CD1a positive Zellen<sup>7</sup>; 3. CD1a Haut;  
4. CD1b positive Zellen; 5. CD1b Haut; 6. -Aktin; 7. -Aktin

Zusätzlich fand eine RT-PCR mit frischer equiner Haut statt, wobei auch hier CD1a und CD1b positive Zellen entsprechende Banden lieferten. Hiermit war der CD1a und CD1b Nachweis in equiner Haut erbracht.

<sup>7</sup> Dank an Frau Dr. Susanne Mauel für die zur Verfügung gestellten eq. DC's; Inst. für Virologie; FB Veterinärmedizin; FU Berlin

## Ergebnisse

Nach Sequenzierung der 222 bp- und 223 bp-Banden ergibt sich folgendes Ergebnis:

BLAST® (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) der 222 bp-Bande:

**Abb. 15** BLAST –Auswertung der 222bp-Bande

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 47523189 ref NM_213831.1  Sus scrofa CD1 antigen (CD1.1)...	307	2e-80
gi 4678983 gb AF059492.1 AF059492 Sus scrofa CD1 antigen (C...	307	2e-80
gi 6822269 gb AF056045.1 AF056045 Sus scrofa CD1 antigen (p...	167	4e-38
gi 32495 emb X04450.1 HSHTA1 Homo sapiens partial mRNA for ...	127	3e-26
gi 530883 gb M27735.1 HUMCD1AA Human epidermal dendritic ce...	127	3e-26
gi 27764864 ref NM_001763.1  Homo sapiens CD1A antigen, a p...	123	5e-25
gi 21594950 gb BC031645.1  Homo sapiens CD1A antigen, a pol...	123	5e-25
gi 50484074 emb CR603267.1  full-length cDNA clone CS0CAP00...	123	5e-25
gi 10443475 emb AL121986.12 HSBA101J8 Human DNA sequence fr...	123	5e-25
gi 180045 gb M14663.1 HUMCD1AA3A Human differentiation anti...	123	5e-25
gi 180040 gb M22165.1 HUMCD1A4 Human cortical thymocyte ant...	123	5e-25
gi 180035 gb M28825.1 HUMCD1A Human thymocyte antigen CD1a ...	123	5e-25
gi 8570521 dbj AP002532.1  Homo sapiens genomic DNA, chromo...	123	5e-25

Es ergibt sich eine Homologie zu CD1a von 76 % zwischen Pferd und Mensch, welche zusätzlich im folgenden Alignment (Abb. 16) dargestellt ist.





## Ergebnisse

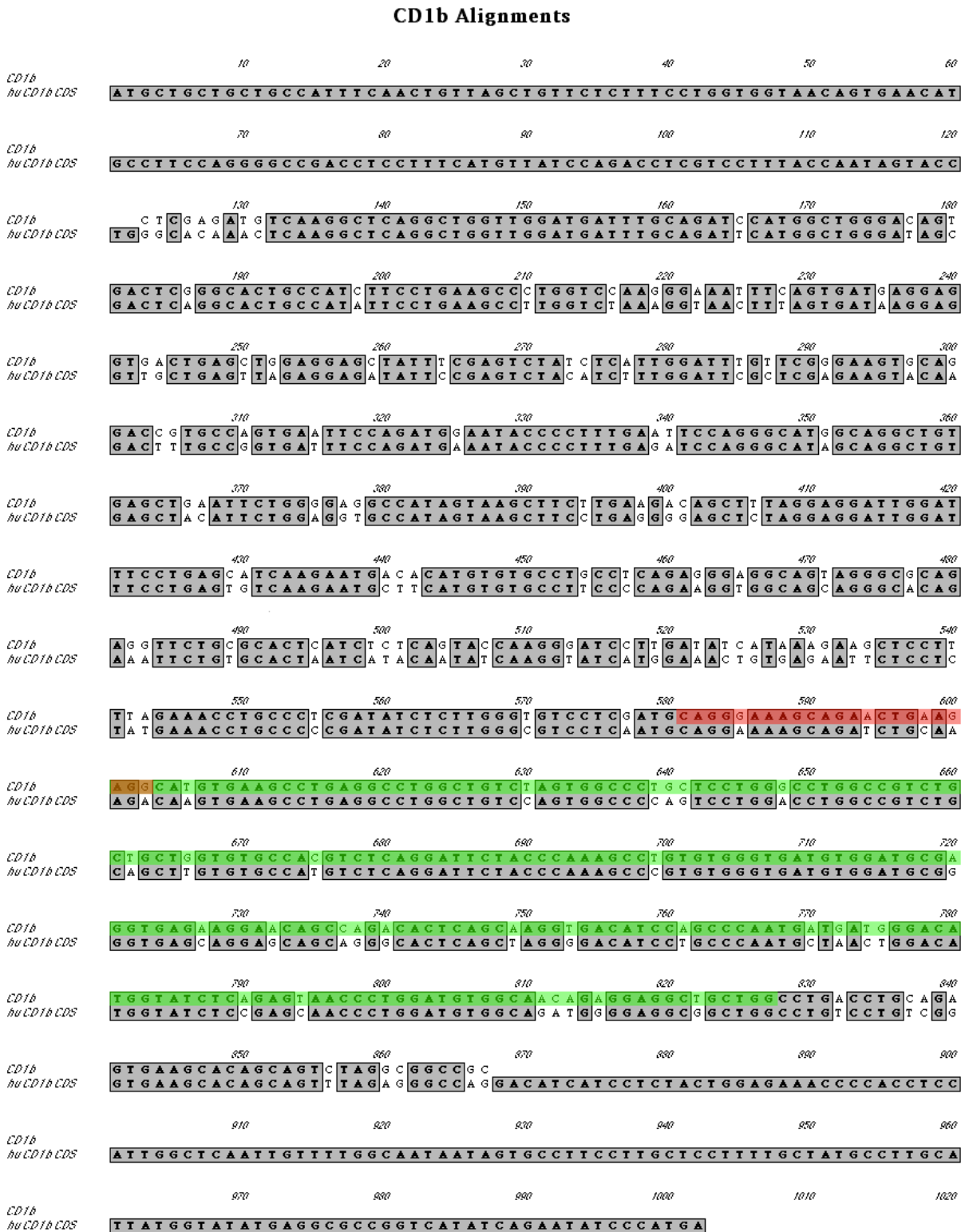
**Abb. 17** BLAST –Auswertung der 223bp-Bande

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 34923344 gb AY376270.1  Equus caballus CD1b antigen mRNA...	1477	0.0
gi 1296950 emb Z36890.1 OACD1A O.aries (scd1a25) CD1 mRNA	597	e-167
gi 945010 emb X90567.1 OATCRCD1B O.aries mRNA for T-cell re...	333	4e-88
gi 899346 emb Z36891.1 OACD1B O.aries (scd1b-42) CD1B mRNA	289	5e-75
gi 4502644 ref NM_001764.1  Homo sapiens CD1B antigen, b po...	285	8e-74
gi 47481187 gb BC069481.1  Homo sapiens CD1B antigen, b pol...	285	8e-74
gi 50959580 gb BC074747.2  Homo sapiens CD1B antigen, b pol...	285	8e-74
gi 180055 gb M28826.1 HUMCD1B Human thymocyte antigen CD1b ...	285	8e-74
gi 55588409 ref XM_513909.1  PREDICTED: Pan troglodytes LOC...	278	2e-71
gi 47681457 gb AY605931.1  Aotus nancymaae CD1b antigen mRN...	260	4e-66
gi 50482586 emb CR601779.1  full-length cDNA clone CS0CAP00...	260	4e-66
gi 55588535 ref XM_524907.1  PREDICTED: Pan troglodytes LOC...	246	6e-62
gi 34419629 ref NM_001766.2  Homo sapiens CD1D antigen, d p...	238	2e-59
gi 20381262 gb BC027926.1  Homo sapiens CD1D antigen, d pol...	238	2e-59
gi 50496594 emb CR615787.1  full-length cDNA clone CS0DL006...	238	2e-59
gi 619799 gb J04142.1 HUMMHCD1DZ Homo sapiens (lambda-gt11h...	238	2e-59
gi 10443475 emb AL121986.12 HSBA101J8 Human DNA sequence fr...	232	1e-57
gi 180060 gb M22171.1 HUMCD1B4 Human cortical thymocyte ant...	232	1e-57
gi 180049 gb M14665.1 HUMCD1AA3C Human differentiation anti...	232	1e-57
gi 8570521 dbj AP002532.1  Homo sapiens genomic DNA, chromo...	232	1e-57

Es ergibt sich eine Homologie zu CD1b von 86 % zwischen Pferd und Mensch, welche zusätzlich im folgenden Alignment (Abb. 18) dargestellt ist.

# Ergebnisse

**Abb. 18 CD1b Alignment**



Vergleich der cDNA von equinem CD1b (GenBank: AY376270.1) mit bereits veröffentlichter Sequenz des Menschen. Rot = Primer CD1/2v; Grün = CD1a Sequenz (223 bp aus obiger PCR)

## Ergebnisse

### 4.9.2.1 CD1a Sondenherstellung mit <sup>35</sup>S-UTP

Die Messung von [<sup>35</sup>S] im Szintillationszähler erfolgt nach der Transkription mit <sup>35</sup>S-UTP und ergibt folgende Werte:

USER: 2 ID:35S				COMMENTS:CPM			
PRESET TIME: 1.00		H#: NO		SAMPLE REPEATS: 2		DATA CALC: CPM	
PRNITER: STD		SCR: YES		REPLICATES: 1		COUNT BLANK: NO	
RS232: OFF		RCM: YES		MULTIPLIES: 1.000000		VIAL SIZE: MAXI	
ISOTOPE 1: 35S		%ERROR: 0.50		BKG. SUB.: 0		HALF LIFE: YES	
SAM	POS	TIME	SCR	<u>35S</u>		RCM	ELAPSED
NO		MIN		CPM	%ERROR		TIME
1	1-1	1.00	0.400	25.00	40.00	4.83	1.50
1	1-1	1.00	0.588	17.00	48.51	3.15	2.63
		Repeat Average CPM for		35S	21.00	COEF. OF VAR:	0.269
2	1-2	0.05	0.321	3835690.3	0.46	0.01	5.69
2	1-2	0.05	0.322	3822288.5	0.46	0.00	6.44
		Repeat Average CPM for		35S	3828989.5	COEF. OF VAR:	0.000
3	1-3	0.05	0.303	4052474.5	0.44	0.00	11.88
3	1-3	0.05	0.302	4041515.0	0.44	0.00	12.75
		Repeat Average CPM for		35S	4046944.8	COEF. OF VAR:	0.000
4	1-4	0.15	0.306	1506872.8	0.42	0.00	7.63
4	1-4	0.15	0.307	1502933.6	0.42	0.00	8.50
		Repeat Average CPM for		35S	1504903.3	COEF. OF VAR:	0.002

**Abb. 19** Nr. 1 = Leerwert; Nr. 2= CD1a sense; Nr. 3 = CD1a antisense; Nr. 4 = MIP3β antisense (Kontrolle)

## Ergebnisse

Der vom Szintillationszähler errechnete Wert der spezifischen Aktivität (z.B. CD1a antisense = 4046944.8 CPM) geht in die Volumenberechnung des Sondenmixes ein (Tab. 11), sodaß sich für die Hybridisierung folgende Werte ergeben:

	für 1 Objektträger (OT)	20 OT CD1a as	20 OT CD1a s	10 OT MIP3 $\beta$
Hybridisierungsmix	20 $\mu$ l	400 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Sondenmix	5 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Formamid	2,5 $\mu$ l	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
DTT	0,5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
$\mu$ l Sonde	X	10,6 $\mu$ l	4,4 $\mu$ l	2,7 $\mu$ l
$\mu$ l dH <sub>2</sub> O	Differenz Sondenmix	29,4 $\mu$ l	15,6 $\mu$ l	17,3 $\mu$ l

**Tab. 11**

### 4.9.2.2 In-situ Hybridisierung

Die Hybridisierung ist sowohl nach 4 und 6 als auch nach 8 Wochen Expositionszeit negativ, sodaß CD1a in equinem Gewebe nicht visuell nachweisbar ist, obwohl eine spezifische RT-PCR mit equiner Haut ein positives Ergebnis (Abb. 14, Seite 70) liefert.