

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Klaus Osterrieder, wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. Kerstin Borchers)

***Ex vivo* und *in vitro* Studien zur Wirkung von Zylexis® auf die Immunantwort nach
Impfung mit Resequin® NN plus unter besonderer Berücksichtigung der EHV-1/-4
spezifischen Antikörperantwort, des Immunstatus und Zytokinmusters im Pferdeblut**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
DANIELA HEINEMANN
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008
Journal-Nr.: 3228

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Kerstin Borchers
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, equine herpesvirus, vaccination, cytokines, immunostimulation,
immune response, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 30.03.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-584-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	6
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1 Equine Herpesviren	11
1.1.1 Erreger	11
1.1.2 Epidemiologie	12
1.1.3 Pathogenese	12
1.1.4 Klinische Erscheinungsbilder	15
1.1.5 Prophylaxe	16
1.1.6 Diagnostik einer EHV-1/-4 Infektion	18
1.2 Immunologie	19
1.2.1 Grundlagen der Immunantwort	19
1.2.2 Zytokine	20
1.2.3 Immunantwort / -pathogenese bei Virusinfektion mit dem EHV-1/-4	22
1.2.4 Immunantwort auf Impfungen	24
1.2.5 Immunantwort auf Immunmodulatoren	27
1.2.6 Untersuchungsmethoden	29
1.2.7 Prinzip der TaqMan [®] -PCR	30
2. Zielsetzung	34
3. Material und Methoden	36
3.1 Materialnachweis	36
3.1.1 Chemikalien-, Gebrauchsmaterialien- und Gerätenachweis	36
3.1.2 Primer- und Sondensequenzen	39
3.1.3 Angewandte Medikamente	41
3.1.3.1 Immunmodulator	41
3.1.3.2 Placebo	42
3.1.3.3 Impfstoff	42
3.1.4 Tiere	42
3.2 Methoden	44
3.2.1 Darstellung Ablauf in der Methodik	44
3.2.2 Klinisch-diagnostische Methoden	45
3.2.2.1 Beobachtungen der Pferde	45

3.2.2.2 Blutentnahme	45
3.2.2.3 Immunstatus	45
3.2.3 Serologische Methoden	46
3.2.3.1 Viren und Zellen	46
3.2.3.2 Neutralisationstest (NT)	46
3.2.3.3 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)	48
3.2.4 Zellkultur-Methoden	49
3.2.4.1 Isolierung von equinen PBMC aus EDTA-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation	49
3.2.4.2 Ermittlung der Zellzahl	51
3.2.4.3 <i>In vitro</i> Stimulation der equinen PBMCs	51
3.2.5 Molekulargenetische Methoden	52
3.2.5.1 Extraktion der RNA	52
3.2.5.1.1 Vorbereitung von Materialien und Reagenzien für die Arbeit mit RNA	52
3.2.5.1.2 RNA-Extraktion aus Zellkulturen und PBMC (<i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i>)	53
3.2.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von RNA	54
3.2.5.1.4 RNA-Qualitätskontrolle mittels denaturierender Formaldehyd- Agarosegelelektrophorese	54
3.2.5.2 Reverse Transkription (RT)	56
3.2.5.3 Primerdesign zur Etablierung einer PCR und TaqMan [®] -PCR	57
3.2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	59
3.2.5.4.1 β -Aktin-PCR zur Überprüfung der cDNA-Qualität	60
3.2.5.4.2 Synthese definierter cDNA-Sequenzen für die Klonierung	61
3.2.5.5 Analytische Agarosegelelektrophorese der DNA-Fragmente	63
3.2.5.6 Klonierung und Sequenzierung	64
3.2.5.6.1 Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung	64
3.2.5.6.2 Ligation	65
3.2.5.6.3 Transformation	66
3.2.5.6.4 Blau/Weiß Selektion	67
3.2.5.6.5 Plasmid-Präparation	68
3.2.5.6.6 Restriktionsenzymanalyse	70
3.2.5.6.7 Glyceroldauerkulturen	71

3.2.5.6.8 Sequenzierung	71
3.2.5.7 „Real-Time“ TaqMan [®] -PCR	72
3.2.5.7.1 Primer- und Sondendesign für die TaqMan [®] -PCR	73
3.2.5.7.2 Housekeeping Gene (Referenzgene)	74
3.2.5.7.3 Erstellung von Standard-Verdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl	74
3.2.5.7.4 Durchführung der „Real-Time“ TaqMan [®] -PCR	75
3.2.5.7.5 Absolute Quantifizierung der mRNA-Menge von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10	77
3.2.6 Studiendurchführung	78
3.2.7 Statistik	79
4. Ergebnisse	81
4.1 Auswahl von deutschen Reitpferden für die Studiendurchführung	81
4.1.1 Einleitung	81
4.1.2 Zusammensetzung der Gruppen	82
4.1.3 Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere im Studienverlauf	82
4.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung des Zytokin-mRNA-Gehalts aus dem Pferdeblut	83
4.2.1 <i>In vitro</i> Stimulierung von equinen PBMC mit Concavalin A	83
4.2.2 Ergebnisse der RNA-Extraktion und Bestimmung der RNA-Qualität	83
4.2.3 Überprüfung der Spezifität der ausgewählten Primersequenzen	84
4.2.3.1 Auswahl eines geeigneten Primer- und SONDENSYSTEMS	84
4.2.3.2 Prüfung der Primersequenzen für die Klonierung mittels PCR und Agarosegelelektrophorese	88
4.2.4 Ergebnisse der Klonierung der ausgewählten equinen Zytokine	90
4.2.4.1 Konzentrations-Agarosegelelektrophorese und Restriktionsenzymanalyse	90
4.2.4.2 Überprüfung der klonierten DNA-Sequenzen mittels Sequenzierung	92
4.2.5 Etablierung der TaqMan [®] -PCR	92
4.2.5.1 Prüfung der Spezifität der ausgewählten Primer- und Sondensequenzen	92
4.2.5.2 Beurteilung der etablierten TaqMan [®] -PCR	93

4.3 Untersuchung der humoralen Immunantwort auf EHV-1 und EHV-4 Antikörper nach Zylexis[®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus	96
4.3.1 Verlaufsuntersuchungen der Antikörpertiter im Neutralisationstest (NT) und indirekten Immunfluoreszenztest (IFT)	96
4.3.2 Vergleich der Antikörpertiterverläufe getrennt nach Zylexis- und Placebo-Gruppe	100
4.3.3 Vergleich der Antikörpertiterverläufe getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung	101
4.3.4 Vergleich der Antikörpertiterverläufe getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht	101
4.4 Untersuchung der PBMC-Anzahl und des Immunstatus nach Zylexis[®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus	101
4.4.1 Bestimmung der Anzahl der equinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	101
4.4.2 Vergleich der PBMC-Anzahl in den Gruppen Zylexis und Placebo	102
4.4.3 Vergleich der PBMC-Anzahl getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung	103
4.4.4 Vergleich der PBMC-Anzahl getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht	104
4.4.5 Bestimmung des Immunstatus durch die Firma LABOKLIN bei Erstuntersuchung und nach Zylexis [®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin [®] NN plus	105
4.4.6 Vergleich des Immunstatus zwischen der Placebo- und Zylexis-Gruppe	108
4.4.7 Vergleich des Immunstatus getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung	109
4.4.8 Vergleich des Immunstatus getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht	110
4.5 Untersuchung der Zytokin-mRNA Expression nach Zylexis[®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus	112
4.5.1 Vergleich der Zytokinmesswerte zwischen den Housekeeping Genen	112
4.5.2 Bestimmung des absoluten mRNA-Gehaltes von IFN- γ , Interleukin-2, -4 und -10 in den equinen peripheren Blutleukozyten (<i>ex vivo</i>)	115
4.5.3 Vergleich der Zytokinmesswerte getrennt nach Placebo- und Zylexis-Gruppe	117
4.5.4 Vergleich der Zytokinmesswerte getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung	125
4.5.5 Vergleich der Zytokinmesswerte getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht	125

4.5.6 Untersuchung des absoluten mRNA-Gehaltes von IFN- γ , Interleukin-2, -4 und -10 in den equinen peripheren Blutleukozyten nach Stimulation mit Concavalin A (<i>in vitro</i>)	127
5. Diskussion	130
5.1 Auswirkung von Zylexis[®] im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus auf die Antikörperantwort	134
5.2 Auswirkung von Zylexis[®] im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus auf die Anzahl der peripheren mononukleären Blutzellen und den Immunstatus	136
5.3 Auswirkung von Zylexis[®] im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus auf die Expression von IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-10	138
5.4 Fazit	143
5.5 Ausblick	144
6. Zusammenfassung	146
7. Summary	148
8. Literaturverzeichnis	150
9. Anhang	165
9.1 Detaillierte Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse	165
9.2 Danksagung	180
9.3 Selbständigkeitserklärung	181

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc.	Accession
Ag	Antigen
APZ	Antigen präsentierende Zellen
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CMC	Carboxymethylcellulose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDM	Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modification
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
EHV	Equines Herpesvirus
et al.	und andere (Autoren)
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IFT	indirekter Immunfluoreszenstest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen

l	Liter
m	milli
μ	mikro
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minuten
MOPS	3-Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	boten (messenger) Ribonukleinsäure
Nr.	Nummer
NT	Neutralisationstest
OD	optische Dichte
PBMC	mononukleäre periphere Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFU	Plaque bildende Einheit (plaque forming unit)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit- (real-time) PCR
REA	Restriktionsenzymanalyse
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerasekettenreaktion
sek	Sekunden
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Eisessig-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc-Zelle	zytotoxische T-Zelle
Th-Zelle	T-Helferzelle
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Chemische Elemente und Verbindungen sind nach internationalem Standard abgekürzt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

- 1 Pathogenese Abort bei Erstinfektion
- 2 Pathogenese Parese-Paralyse-Syndrom
- 3 Schema der Zellregulation durch ausgewählte Zytokine
- 4 Angriffspunkte der Impfung
- 5 TaqMan[®]-Prinzip
- 6 Amplifikationsgraph
- 7 Übersicht immunologische und molekularbiologische Methoden
- 8 Schichtung Gradientenzentrifugation
- 9 Schichtung RNA-Präparation
- 10 Amplifikate der β -Aktin-PCR
- 11 Bakterienkulturen, Blau/Weiß Selektion
- 12 Zustandsformen der Plasmid-DNA
- 13 Applikationsschema und Blutentnahmen
- 14 PBMC in Zellkultur nach 24 Stunden
- 15 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der RNA-Qualität
- 16 Gensequenzen und Lager der Primer und der TaqMan[®]-Sonde
- 17 Sequenzvergleich zelluläres IL-10 und EHV-2-IL-10 und Primerbindungsstellen
- 18 Nachweis der IL-2 und IL-4 Amplifikate mit den Primern für die Klonierung
- 19 Nachweis des IL-10 Amplifikats mit den Primern für die Klonierung
- 20 Nachweis des IFN- γ Amplifikats mit den Primern für die Klonierung und TaqMan[®]-PCR
- 21 Restriktionsenzymanalysen mit *Eco* RI zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung
- 22 Schnittstelle von *Eco* RI im Klonierungsfragment vom equinen Interleukin-4
- 23 Amplifikationsgraph cDNA im Vergleich zur genomischen DNA für die equine IFN- γ Sequenz
- 24 Amplifikationsgraph am Beispiel von IL-2
- 25 Standardkurve am Beispiel von IL-2
- 26 EHV-1 Antikörpertiter im IFT
- 27 EHV-1 Antikörpertiter im NT
- 28 EHV-4 Antikörpertiter im IFT
- 29 EHV-4 Antikörpertiter im NT
- 30 Zeitlicher Verlauf der Anzahl der equinen PBMC/ml

- 31 Änderung der Anzahl der equinen PBMC/ml getrennt nach Zylexis- und Placebo-Gruppe
- 32 Verlauf der PBMC-Anzahl getrennt nach Resequin- und Influenza-Gruppe
- 33 Änderung der PBMC-Zahl/ml getrennt nach Resequin- und Influenza-Gruppe
- 34 Zeitlicher Verlauf der PBMC-Anzahl in den Gruppen bis / über 4 Jahre
- 35 Änderung der PBMC-Anzahl getrennt nach Altersgruppen
- 36 Einzeltierverläufe der Anzahl der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen
- 37 Änderung des Immunstatus getrennt nach Zylexis- und Placebo-Gruppe
- 38 Immunstatus zum Versuchstag -30 und 0 in den Gruppen Resequin und Influenza
- 39 Änderung und Verlauf der Anzahl der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen getrennt nach Altersgruppen
- 40 Regression nach Passing und Bablok für das Interferon- γ
- 41 Regression nach Passing und Bablok für das Interleukin-2
- 42 Regression nach Passing und Bablok für das Interleukin-4
- 43 Regression nach Passing und Bablok für das Interleukin-10
- 44 Einzeltierverläufe der Zytokinmesswerte *ex vivo*
- 45 Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IFN- γ in den Gruppen Zylexis und Placebo
- 46 Änderung der IFN- γ Expression zum Ausgangswert
- 47 Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IL-2 in den Gruppen Zylexis und Placebo
- 48 Änderung der IL-2 Expression im Vergleich zum Ausgangswert
- 49 Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IL-4 in den Gruppen Zylexis und Placebo
- 50 Änderung der IL-4 Expression im Vergleich zum Ausgangswert
- 51 Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IL-10 getrennt nach Gruppen
- 52 Änderung der IL-10 Expression im Vergleich zum Ausgangswert
- 53 Stimulierbarkeit von IFN- γ aus equinen PBMC getrennt nach Versuchsgruppen
- 54 Stimulierbarkeit von IL-4 aus equinen PBMC getrennt nach Versuchsgruppen
- 55 Stimulierbarkeit von IL-4 aus equinen PBMC getrennt nach Altersgruppen

Tabellen:

- 1 Beispiele für Immunmodulatoren
- 2 Primersequenzen für die Klonierung
- 3 Primer- und SONDENSEQUENZEN für die „Real-Time“ TaqMan[®]-PCR
- 4 Gruppenübersicht / Vorimmunisierung
- 5 Verwendete Viren
- 6 RNA-/Primer-Mix

- 7 Reaktions-Mix
- 8 Accession-Nummern
- 9 β -Aktin-Primersequenzen
- 10 PCR-Reaktionsbedingungen für die Klonierungsamplifikate
- 11 Primer Housekeeping Gene
- 12 Pipettierschema Ligationsansatz
- 13 Erwartete Fragmentgrößen
- 14 Ermittelte Plasmidkonzentrationen
- 15 Pipettierschema TaqMan[®]-PCR-Reaktionsansatz
- 16 Intra- und interassay Varianz der TaqMan[®]-PCR
- 17 Steigung der Standardkurven und PCR-Effizienzen
- 18 Plasmid-Verdünnungsstufen und durchschnittliche Ct-Werte
- 19 Häufigkeiten der EHV-1/-4 Antikörpertiter vor und nach der Impfung im Studienverlauf
- 20 Übersicht Immunstatus
- 21 Ergebnisse Methodenvergleich nach Passing und Bablok
- 22 Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert
- 23 Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung
- 24 Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert getrennt nach Altersgruppen
- 25 Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert getrennt nach Geschlecht

A 1 Pferde

- A 2 Ergebnisse der serologischen Untersuchung mittels Neutralisationstest und indirektem Immunfluoreszenztest
- A 3 Absolute Lymphozytenzahlen (PBMC) $\times 10^7$ /ml vor und nach Zylexis[®]-Applikation und Impfung
- A 4 Immunstatusbestimmung durch Fa. LABOKLIN
- A 5 Zytokinmesswerte – absolute Quantifizierung (β -Aktin) *ex vivo* Proben
- A 6 Zytokinmesswerte – absolute Quantifizierung (β -Aktin) *in vitro* Proben

1. Einleitung

1.1 Equine Herpesviren

1.1.1 Erreger

Beim Pferd haben die equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4 eine große Bedeutung, da sie klinisch relevante Erkrankungen verursachen. Sie sind in erster Linie verantwortlich für Stutenaborte sowie respiratorische und neurologische Erkrankungen (Allen und Bryans 1986). EHV-1 und EHV-4 sind Vertreter der equinen Alphaherpesviren und werden der Familie der Herpesviridae zugeordnet. Ihre Morphologie gleicht dem der anderen Herpesviren und ist gekennzeichnet durch eine lineare doppelsträngige DNA von 124-235 Kilobasenpaaren im Innenkörper (Core), umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 120 bis 300 nm. Die äußere Hülle enthält eingebaute Glykoproteine, die einerseits für die Virusreplikation wichtig sind und andererseits zur Ausbildung einer Immunität beitragen. Alle Herpesviren vermehren sich im Kern der infizierten Wirtszelle und führen bei der Produktion von infektiösem Virus zur Zerstörung der Wirtszelle. Die Eigenschaft die Wirtszelle latent zu infizieren, ist allen Herpesviren gemeinsam. Als Latenz wird der Zustand einer reversiblen, nichtproduktiven Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus bezeichnet (Garcia-Blanco und Cullen 1991). Die Latenz kann lebenslang im infizierten Wirt bestehen bleiben (Edington et al. 1985; Roizmann und Sears 1987; Welch et al. 1992). Während der Latenzphase ruht das virale Genom in Form eines Episoms und reguliert diesen Zustand vermutlich durch die Produktion von Latenz-assoziierten Transkripten (LAT). Endo- und exogene Stressoren, die eine Immunsuppression des Wirtes hervorrufen sowie eine experimentelle Verabreichung von Kortikosteroiden können eine Reaktivierung des Virus jederzeit ermöglichen und zu einer Virusausscheidung führen (Edington et al. 1985; Gibson et al. 1992).

Die Einteilung in zwei Virusarten EHV-1 und EHV-4 erfolgte nach Einführung molekularbiologischer Methoden in den 80er Jahren (Sabine et al. 1981; Studdert et al. 1981; Turtinen und Allen 1982) und wurde 1988 durch das „International Committee for Taxonomy of Viruses“ anerkannt. In den 90er Jahren wurden die Gensequenzen für beide Virusarten durch Telford et al. (1992; 1998) veröffentlicht. Sequenzanalysen zeigten eine Homologie von EHV-1 und EHV-4 zwischen 65% und 85% in der Nukleotidsequenz von konservierten Genen (Riggio et al. 1989; Telford et al. 1992). Diese enge Verwandtschaft führt einerseits zu serologischen Kreuzreaktionen der hauptimmunogenen Komponenten und andererseits zu

ähnlichen Krankheitskomplexen, wodurch die Zuordnung der einzelnen Viren zu den Symptomenkomplexen schwer möglich ist (Studdert 1983; Thein et al. 1987).

1.1.2 Epidemiologie

Die Infektionen mit dem EHV-1 und EHV-4 sind beim Pferd weltweit verbreitet und kommen vorwiegend in enzootischer Form vor. Die meisten Tiere infizieren sich schon während des ersten Lebensjahres. Es wird vermutet, dass bis zu 80% der Pferde weltweit latent mit EHV-1 oder EHV-4 infiziert sind (Borchers et al. 2006). Die wichtigste Art der Virusübertragung ist die intranasale Tröpfcheninfektion durch Aufnahme von virushaltigen Sekreten der Atemwege. Die Übertragung durch Aerosole hängt von der Infektiösität des Virus, den Klimabedingungen, der Viruskonzentration in der Luft (Weidehaltung, geschlossene Ställe) und dem Abstand zwischen den Tieren (van Maanen 2002) ab. Latent infizierte Pferde stellen das Virusreservoir dar. Als Latenzorgane konnten für das EHV-1 das Trigeminalganglion, periphere Lymphknoten und die Nasenschleimhaut nachgewiesen werden, während EHV-4 zusätzlich zum Ganglion wahrscheinlich auch in Bronchial- und Alveolarepithel latent ist (Welch et al. 1992; Slater et al. 1994; Baxi et al. 1995; Borchers et al. 1997; 1998; 1999).

Zwischen November und Mai kommt es zu einem gehäuften Auftreten von EHV-1 bedingten Aborten und respiratorischen Erkrankungen bei Fohlen durch eine EHV-4 Infektion (Borchers et al. 2006). In dieser Zeit kann es durch Reaktivierung oder Neuinfektion mit EHV-1 oder EHV-4, meist im Zusammenhang mit Stresssituationen, auch zum Ausbruch neurologischer Erkrankungen kommen (Meyer et al. 1987; Thein und Brown 1988; Thein et al. 1993; Benetka et al. 2002).

1.1.3 Pathogenese

Nach der Aufnahme des Virus kommt es bereits zu einer Vermehrung in den Zellen der Nasenschleimhaut. Anschließend breitet sich das Virus virämisch im Blut aus. Für die zellassoziierte Virämie benutzt EHV-1 Monozyten und Lymphozyten als Transportvehikel (Thein und Brown 1988; Smith et al. 1992; 1993) und gelangt auf diesem Wege in den Uterus sowie in das ZNS (Welch et al. 1992; Allen et al. 1999). Die Virämie endet meist nach ca. 10 Tagen.

Spätaborte bei der Stute können ursächlich nach Erstinfektion mit EHV-1 oder infolge Reaktivierung von latentem Virus auftreten (Allen et al. 1999). Für das Zustandekommen

eines Abortes gibt es zwei Theorien. Einerseits kann es im trächtigen Uterus durch den Endotheltropismus von EHV-1 zur Anlagerung von Immunkomplexen und Phagozyten an infizierte Endothelzellen kommen und die Thrombosierung von Gefäßen im Endometrium zur Folge haben (Thein 2005). Damit verbunden tritt eine ischämische Degeneration des Uterusgewebes ein, gefolgt von einer Unterversorgung des fetalen Anteils der Plazenta (Abb. 1) und dem Abort einer nicht infizierten Frucht (Smith et al. 1992). Smith und Borchers (2001) konnten durch In-situ-Hybridisierung die EHV-1-DNA im Gefäßendothel des Endometriums und in den Uterindrüsen nachweisen.

Andererseits kommt es zu einem Abort, indem die Frucht mit dem EHV-1 infiziert wird. Hierfür stellten Smith et al. (1997) zwei Möglichkeiten der fetalen Infektion vor. Durch die Schwächung des Immunsystems kann das Virus sich ungehindert im Organismus ausbreiten und im Falle einer Trächtigkeit die Plazentaschranke über die Nabelvene überwinden und die Frucht infizieren (Abb. 1). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass virushaltige Amnionflüssigkeit durch die Frucht inhaliert und über die Lunge aufgenommen wird. Je nach Viruslast kommt es zum Absterben der Frucht, gefolgt vom Abort oder zur Geburt eines lebensschwachen Fohlens, das dann bereits Virusträger ist.

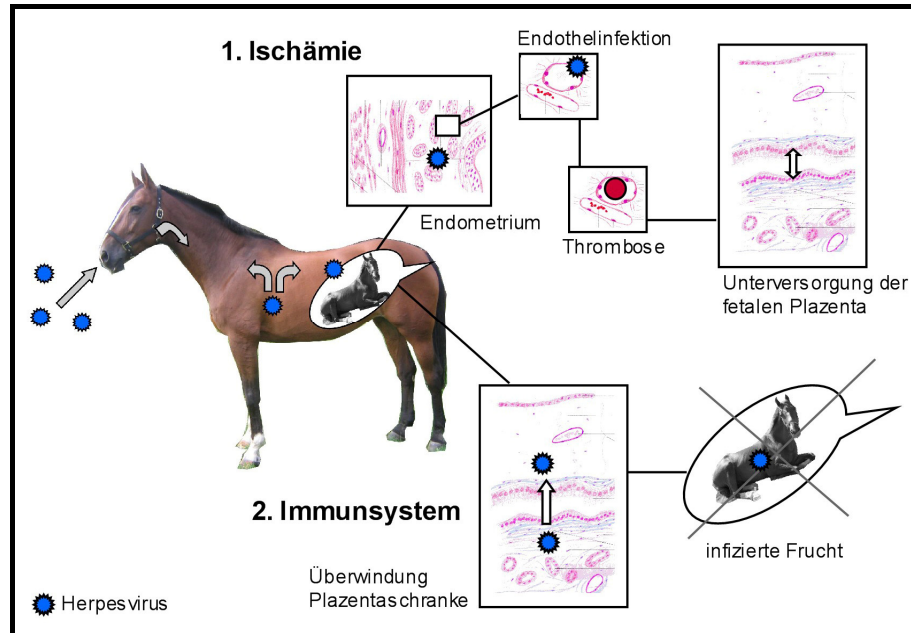


Abbildung 1: Pathogenese Abort bei Erstinfektion

Theorie 1: Infektion der Endothelzellen des Endometriums mit EHV-1 und Ablagerung von Immunkomplexen. Es bilden sich Thrombosen in den Gefäßen des Endometriums. Die Frucht stirbt durch die ischämische Degeneration des Uterusgewebes.

Theorie 2: Durch ein geschwächtes Immunsystem gelangt EHV-1 über die Nabelvene in die Frucht. Die Frucht stirbt oder wird lebensschwach als Virusträger geboren.

Bei der **neurologischen Verlaufsform** (Parese-Paralyse-Syndrom) handelt es sich um ein Problem des Rückenmarkes, resultierend aus einer Vaskulitis im Neuroparenchym.

Borchers et al. (2006) stellten folgende Hypothese für die Pathogenese der EHV assoziierten neurologischen Erkrankung auf: Der Nachweis von EHV-1 Antigen im Gefäßendothel von Arterien und Venen des ZNS steht im Zusammenhang mit einer immunvermittelten Vaskulitis und sekundären ischämischen Degeneration des Neuroparenchyms (Abb. 2). Beim Stutenabort zeigten sich ähnliche Veränderungen der Gefäße im Uterus (Edington et al. 1991; Thein 1996; Allen et al. 1999; Smith et al. 1992, 1993, 1996, 2003; Smith und Borchers 2001). Es wird vermutet, dass Infektion, Reinfektion oder Reaktivierung mit EHV-1 und/oder EHV-4 die Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen induzieren. Die Detektion solcher Immunkomplexe korreliert jedoch nicht mit der Höhe der Antikörpertiter oder dem Auftreten neurologischer Erkrankungen, sondern mit zunehmendem Alter der Tiere und der Anzahl der Impfungen (Borchers et al. 2006). Horohov et al. (2002) konnten zeigen, dass ältere Pferde (> 20 Jahre) im Vergleich zu jüngeren eine geringere mitogene Stimulierbarkeit der PBMCs *in vitro* aufwiesen, die mit einer verminderten Produktion von Interleukin-2 und höherem Plasmakortisol-Spiegel einherging. Sie stellten die Hypothese auf, dass die verminderte Funktion des Immunsystems bei älteren Tieren wahrscheinlich unter dem Einfluss eines höheren Plasmakortisol-Spiegels steht. Kortikosteroide unterdrücken die Produktion von Interleukin-2 und anderen Zytokinen (Baus et al. 1996).

Eine andere Hypothese beschreibt eine direkte Schädigung der infizierten Endothelzellen durch zytotoxische Lymphozyten (Hannant 1993, Allen et al. 1999).

Neuere Untersuchungen geben Anlass zu der Annahme, dass einige EHV-1 Stämme eine Neuropathogenität besitzen, die auf einer Punktmutation in dem viralen DNA-Polymerasegen beruht (Allen et al. 2006, Nugent et al. 2006). Eine Infektion mit diesem mutierten EHV-1 Stamm steht vermutlich in Verbindung mit einer verstärkten Replikation des Virus. Allen et al. (2006) konnten in einem kontrollierten EHV-1 Infektionsversuch beim Pferd feststellen, dass eine Infektion mit neurotrophen Viren im Vergleich zu abortogenen Stämmen ohne die genannte Mutation zu einem höheren Anstieg einer PBMC-assoziierten Virämie führte, die bis zu 20 Tagen mittels „Real-Time“ PCR nachweisbar war. Aus der längeren Virämiephase und der erhöhten Replikationsrate resultiert eine höhere Viruslast (Nugent et al. 2001; Allen 2006; Allen und Breathnach 2006). Zur Ausprägung von neurologischen Symptomen kam es nur in der Probandengruppe, die mit dem neurotrophen Virus infiziert wurde. Dieses Studienergebnis lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang

zwischen der Ausprägung der Virämie und der Entstehung von EHV-1 bedingten neurologischen Symptomen gibt (Allen et al. 2006).

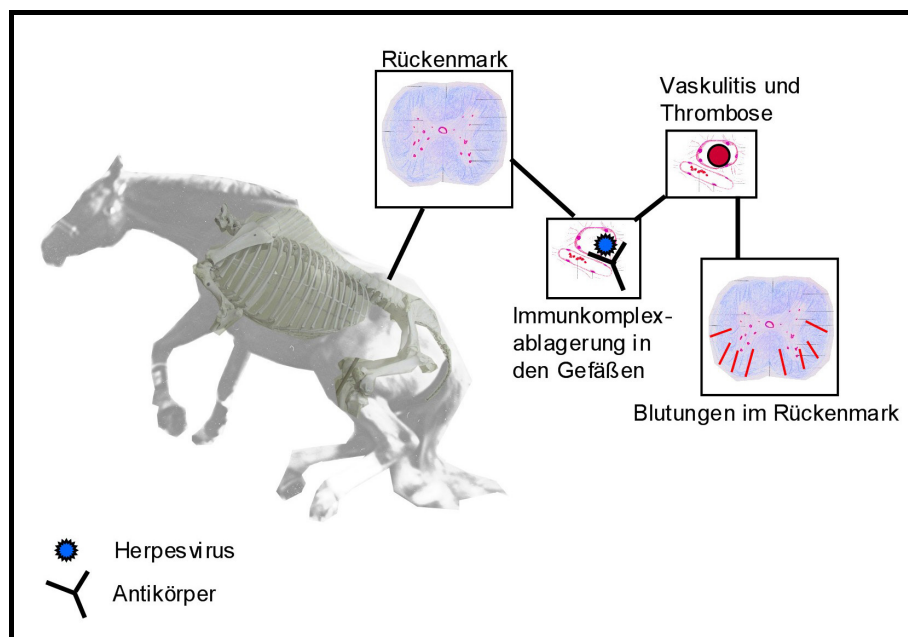


Abbildung 2: Pathogenese Parese-Paralyse-Syndrom

Hypothese: Endotheltropismus von EHV-1 im ZNS führt zur immunvermittelten Vaskulitis und sekundären ischämischen Degeneration des Neuroparenchyms. Die klinischen Symptome sind abhängig vom Ausmaß der Vaskulitis im Rückenmark.

1.1.4 Klinische Erscheinungsbilder

Akute **respiratorische Erkrankungen** werden vorwiegend durch EHV-4 verursacht (Crabb und Studdert 1995) und entstehen vor allem bei Saugfohlen, Absetzern und Jährlingen nach Erstinfektion. Die Inkubationszeit beträgt meist nur 2 bis 3 Tage. In der Regel betrifft die Infektion nur den oberen Respirationstrakt. Die Symptome, wie Fieber, geschwollene Lymphknoten, Inappetenz, Mattigkeit und ein seröser, später mukopurulenter Nasenausfluss (Studdert 1974) klingen innerhalb von 1 bis 2 Wochen wieder ab.

EHV-1 spielt weltweit eine entscheidende Rolle bei der Ursache von **Aborten**. Der Virusabort durch EHV-1 macht einen Anteil von 10 % aller Abortursachen in der deutschen Vollblutpopulation aus (Petzoldt et al. 1987) und ist zu 40 % Ursache aller infektiösen Aborte (van Maanen 2002). EHV-4 bedingte Aborte sind eher selten und treten sporadisch auf (Allen et al. 1983; Whitwell und Blunden 1992).

Die Inkubationszeit nach Erstinfektion variiert zwischen 9 Tagen und 3 Monaten (Mumford et al. 1987). Durch natürliche Infektion ereignet sich der Abbruch der Trächtigkeit

im letzten Drittel, zwischen dem 7. und 11. Monat (Doll und Bryans 1963). Die Infektion einer tragenden Stute verläuft meist ohne klinische Symptome, in seltenen Fällen treten Gliedmaßenödeme und Anorexie auf. Die Frucht wird komplikationslos und spontan abortiert. Frucht, Fruchtwasser und Fruchthüllen enthalten den Erreger in hohen Konzentrationen (Carrigan et al. 1991) und begünstigen eine seuchenhafte Ausbreitung, besonders in einem ungeimpften Bestand (Chowdhury et al. 1986). Bei einer sehr späten Infektion in der Trächtigkeit können lebensschwache Fohlen zur Welt gebracht werden, die aber meist innerhalb weniger Tage versterben (Murray et al. 1998; Perkins et al. 1999).

Die klinischen Symptome einer **neurologischen Erkrankung** werden nicht direkt durch die Virusinfektion von Neuronen verursacht, sondern durch eine Vaskulitis im Neuroparenchym (Jackson et al. 1977; Allen und Bryans 1986; Edington et al. 1986; Thein 1996).

Betroffen sind Pferde jeden Alters, insbesondere jedoch adulte, tragende Stuten und Stuten mit neugeborenen Fohlen (Guo et al. 1990; McCartan et al. 1995; Goehring und Oldruitenborgh-Oosterbaan 2001). Die Inkubationszeit bei natürlich und experimentell infizierten Tieren liegt bei 6-8 Tagen (Crabb und Studdert 1995). Die klinischen Symptome können sich von einer milden Ataxie bis hin zum Festliegen mit Paralyse in den Vorder- und Hintergliedmaßen äußern. Zusätzlich kann eine Schweif-, Anus- und Blasenlähmung mit Inkontinenz auftreten (Chowdhury et al. 1986; Ludwig et al. 1987; 1988). Die Schwere der Erkrankung hängt ab vom Ausmaß der neurodegenerativen Schädigung. Möglich sind milde Verlaufsformen bis hin zu perakuten Todesfällen (Thein et al. 1993). Festliegende Tiere müssen meist aufgrund von Sekundärkomplikationen euthanasiert werden (Goehring und Oldruitenborgh-Oosterbaan 2001). In den letzten Jahren wurde zunehmend über Ausbrüche der neurologischen Erkrankung natürlich infizierter Pferde berichtet (Friday et al. 2000; Goehring et al. 2006; Cardwell et al. 2003; van Maanen et al. 2001; Stierstorfer et al. 2002), die vermutlich auf lückenhaft gewordene Impf- und Managementmaßnahmen zurückzuführen sind (Rosas et al. 2006).

1.1.5 Prophylaxe

Im Rahmen der Prophylaxe wird den Impfungen gegen EHV-1 und EHV-4 sowie Managementmaßnahmen innerhalb eines (Zucht-) Bestandes eine besondere Rolle zugesprochen. Als Impfstoffe stehen heute in Deutschland monovalente und polyvalente Impfstoffe mit dem EHV-1 und EHV-4 Antigen zur Verfügung. Dabei wird zwischen attenuiertem Lebendimpfstoff gegen EHV-1 (Prevaccinol[®]) und inaktiviertem Totimpfstoff

gegen EHV-1 und EHV-4 (Duvaxyn[®]) bzw. kombiniertem Totimpfstoff gegen EHV-1/-4 und Influenza (Resequin[®] NN plus) unterschieden.

Die Protektivität von Antikörpern ist bis heute nicht geklärt. Die nach einer natürlichen Infektion gebildeten Antikörper bieten keine dauerhaft schützende Immunität (Doll et al. 1955; 1961; Doll und Bryans 1963). Die Höhe des Antikörpertiters korreliert nicht mit Schutz vor einer Infektion (Hannant et al. 1993; Dolby et al. 1995). Der Impfstoff vermindert jedoch die Ausprägung der klinischen Symptomatik und verringert die Virusausscheidung (Steinhagen 1986; Burki et al. 1990; Wood 1992; Hannant et al. 1993; van Maanen 2002). Heldens et al. (2001) zeigten in einem Infektionsversuch mit Fohlen und tragenden Stuten, dass die Virusausscheidung und die klinische Symptomatik sowie das Auftreten von Aborten durch die Vakzinierung mit Duvaxyn[®] EHV_{1,4} nach experimenteller Infektion mit EHV-1 und EHV-4 reduziert wurden. Obwohl die vakzinierten Stuten auch nach der dritten Impfung keine Serokonversion zeigten, fohten 4 von 5 Stuten erfolgreich. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die zelluläre Immunität eine entscheidende Rolle beim Schutz vor der diaplazentaren Infektion hat (Heldens et al. 2001).

Die serologischen Untersuchungsmethoden erfassen die zelluläre Immunantwort nicht, diese spielt aber vermutlich bei equinen Herpesvirusinfektionen eine große Rolle (Allen et al. 1992; Ostlund et al. 1992). Demzufolge sollte bei der Betrachtung des Impferfolges auch die Untersuchung der zellulären Immunantwort berücksichtigt werden.

Aus Infektionsversuchen mit EHV-1 ist bekannt, dass die zytotoxischen T-Zellen und die Anzahl der inaktiven T-Zellen eine entscheidende Bedeutung für eine verminderte Ausprägung der Virämie und klinischen Symptomatik, wie z.B. Fieber, Nasenausfluss und Aborte haben (O'Neill et al. 1999; Kydd et al. 2003).

In einem anderen EHV-1 Infektionsversuch korrelierte eine hohe Anzahl an EHV-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen mit dem Schutz vor Aborten (Kydd et al. 2003). Hierfür wurden bei tragenden Stuten EHV-1 spezifische zytotoxische T-Zellen über den Chromfreisetzungstest vor und nach experimenteller Infektion detektiert. Stuten mit einer hohen Anzahl an EHV-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen fohten erfolgreicher. Die lytische Eigenschaft der zytotoxischen T-Zellen führt vermutlich zu einer Reduktion der zell-assoziierten Virämie, vermindert dadurch die Besiedelung im Uterus und damit das Auftreten von Aborten (Kydd et al. 2003). In einer Gruppe mit 5 Stuten, die zuvor mit einer inaktivierten EHV-Vakzine geimpft wurden, fohten 4 Stuten nach der Infektion mit EHV-1 erfolgreich, während alle ungeimpften Kontroll-Stuten abortierten. Bisher gibt es keine genauen Aussagen, dass inaktivierte Vakzinen die zytotoxische T-Zellantwort stimulieren,

jedoch können sie das Abortrisiko nach Infektion mit dem equinen Herpesvirus vermindern (Kydd et al. 2003).

Einen Ansatz zur Stimulierung der zellvermittelten Immunantwort durch Vakzination bietet die Studie von Paillot et al. (2006). Hier wurde in einem EHV-1 Infektionsversuch die zytotoxische T-Zellantwort und IFN- γ Produktion vor und nach Vakzination mittels Chromfreisetzungstest und indirektem Immunfluoreszenztest gemessen. Als rekombinante Vakzine wurde ein Genprodukt, basierend auf Vaccinia-Virus (NYVAC), verwendet, welches das EHV-1 Gen 64 exprimiert. Dieses „immediate early gen“ wird als erstes bei dem viralen Replikationszyklus exprimiert (Gray et al. 1987) und kann die zellvermittelte Immunität stimulieren. Eine viermalige Vakzination im Abstand von 3 Wochen führte zu einer erhöhten zellvermittelten Immunität, die jedoch alleine gesehen nicht vor den Folgen einer experimentellen Infektion schützte. Die Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern wurde durch diese Art der Vakzinierung nicht induziert (Paillot et al. 2006).

Die Anwendung eines unspezifischen Immunmodulators (Zylexis[®]) hat sich im Zusammenhang mit der Prophylaxe und Behandlung von Infektionen und stressinduzierten Erkrankungen, insbesondere mit „Crowding-assoziierten“ Krankheiten, bereits bei einigen Tierarten bewährt (Ziebell et al. 1997). Beim Pferd konnte bei Infektion mit dem equinen Herpesvirus eine Reduktion der klinischen Symptomatik erzielt werden (Donecker und Holland 2005). Die Anwendung von Zylexis[®] (Pfizer GmbH) bei neugeborenen Fohlen (24 bis 48 Stunden nach der Geburt) verringert die Inzidenz von neonatalen Infektionskrankheiten (Böttcher 1994).

1.1.6 Diagnostik einer EHV-1/-4 Infektion

Eine Infektion mit dem equinen Herpesvirus kann einerseits durch einen direkten Virusnachweis aus Gewebe, Sekreten und „Buffy Coat“s“ (Leukozyten und Thrombozyten) erfolgen und andererseits indirekt über den Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern im Blut.

Durch Verwendung spezifischer ELISA-Tests können typ-spezifische Antikörper gegen die Glykoproteine (gD und gG), die in der Virushülle lokalisiert sind, detektiert und quantifiziert werden (Foote et al. 2002). Crabb und Studdert (1995) entwickelten einen gG typ-spezifischen ELISA-Test, der zwischen Antikörpern gegen EHV-1 und EHV-4 differenzieren konnte. Für die paretisch-paralytische Verlaufsform ist ein hoher Antikörperanstieg innerhalb

einer sehr kurzen Zeit (ca. 3 bis 7 Tage) typisch (van Maanen et al. 2001; Studdert et al. 2003).

Der direkte Nachweis von Virusantigen kann durch Virusisolierung und Virusanzucht in Zellkulturen erfolgen. Wesentlich schneller und sensitiver ist der Nachweis von EHV-1/-4 DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Virus-DNA von EHV-1/-4 kann mittels PCR in Gewebeproben, in den „Buffy Coat's“ während der zellassozierten Virämie, in Nasen- und Augentupferproben sowie Bronchialsekretproben nachgewiesen werden (Wilson 1997; Donaldson und Sweeney 1997; Borchers et al. 1999). Eine der modernsten Methoden ist der Nachweis von Virus-DNA mittels „Real-Time“ PCR. Elia et al. (2006) entwickelten eine „Real-Time“ PCR zur Detektion und Quantifizierung von EHV-1 in equinen Gewebeproben von abortierten Feten. Die Sensitivität dieser Methode war deutlich höher, als bei einer etablierten nested PCR.

Die „Real-Time“ PCR ist technisch anspruchsvoll und sehr kostenaufwendig in der Durchführung. Daher wird sie in der Regel nur von spezialisierten Laboren angewandt.

1.2 Immunologie

1.2.1 Grundlagen der Immunantwort

Die Abwehrmechanismen des Organismus gegen Krankheitserreger können in eine unspezifische (angeborene) und spezifische (erworbene) Immunreaktion eingeteilt werden, wobei beide Formen untrennbar miteinander verbunden sind und auf der Reaktion von weißen Blutzellen basieren. Die Immunantwort wird in eine zelluläre und humorale Abwehr eingeteilt. Für eine funktionierende Immunabwehr ist eine bestimmte Menge an Granulozyten und Monozyten (unspezifische Abwehr) sowie T- und B-Lymphozyten (spezifische Abwehr) notwendig. Lymphozyten werden anhand ihrer Oberflächeneigenschaften (CD = „Cluster of Differentiation“) in verschiedene Subpopulationen eingeteilt. Die Bekämpfung von intrazellulären Erregern erfolgt vorrangig durch T-Lymphozyten. Antigenpräsentierende Zellen (z.B. Dendritische Zellen, Makrophagen) interagieren mit den T-Lymphozyten über Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (MHC) der Klasse I oder II. Die T-Helferzellen (Th) besitzen auf ihrer Oberfläche CD4-Moleküle (Costimulatoren), die sich spezifisch an die MHC Klasse II Moleküle binden. Die zytotoxischen T-Zellen (Tc) binden spezifisch an MHC Klasse I Moleküle durch CD8-Oberflächenmoleküle. T-Helferzellen (Th) sind in den lymphatischen Organen beteiligt an der Verstärkung der antiviralen Aktivität und

Antikörperantwort durch Proliferation und Differenzierung der $CD8^+$ -Zellen zu den zytotoxischen T-Zellen (Tc) sowie der B-Zellen zu Plasmazellen. Th1-Zellen sind beteiligt an der Makrophagenaktivierung und Hypersensitivitätsreaktion. Th2-Zellen stimulieren die B-Zellproliferation und Immunglobulin (IgG) Sekretion. Zytotoxische T-Zellen (Tc) führen zur Zerstörung von virusinfizierten oder entarteten Zellen durch Perforine und Granzym oder durch Einleitung der Apoptose. Das Beenden der Aktivität anderer Immunzellen erfolgt durch die T-Suppressorzellen (Ts). Ts-Zellen besitzen auf ihrer Membran das CD8-Molekül.

Die Produktion spezifischer Antikörper (Immunglobuline) erfolgt durch die Differenzierung der aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen. Antikörper können virusneutralisierend wirken, aktivieren das Komplementsystem oder bewirken mit Hilfe der Natürlichen Killerzellen (NK) eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Es werden 5 verschiedene Klassen (Isotypen) von Immunglobulinen unterschieden. Die Isotypen kommen in verschiedenen Kompartimenten des Körpers vor und haben unterschiedliche Aufgaben. Folgende 3 Antikörperklassen werden von den B-Zell-Rezeptoren in die umgebende Körperflüssigkeit sezerniert: Immunglobulin M (IgM) in der frühen Phase einer Infektion, Immunglobulin G (IgG) als Hauptimmunglobulin, das sich an Antigen und Toxine im Blut und extravaskulär bindet und Immunglobulin A (IgA) in seromukösen Exkreten als Oberflächenschutz. Immunglobulin D (IgD) befindet sich membranständig als B-Zell-Rezeptor auf reifen, naiven B-Zellen und liegt nur in geringen Mengen in sezernierter Form in Blut und Lymphen vor. Immunglobulin E (IgE) ist ebenfalls nur in geringen Konzentrationen im Blut und membranständig auf Mastzellen und basophilen Granulozyten vorhanden. IgE ist bei der Abwehr von Parasiten beteiligt und verantwortlich für TypI Hypersensitivitätsreaktionen (Tizard 2004).

Die Interaktion und Regulation der Immunantwort erfolgt durch die Sekretion zellspezifischer Botenstoffe, den so genannten Zytokinen.

1.2.2 Zytokine

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Messung von Zytokinexpressionen als Parameter der zellulären und humoralen Immunantwort. Die hier ausgewählten Zytokine, Interferon- γ , Interleukin-2, -4 und -10 beeinflussen einerseits die zytotoxische T-Zellantwort und andererseits die Bildung von Antikörpern.

Zytokine sind Proteine, die von verschiedenen aktivierten Zellen des Immunsystems produziert werden. Jedes Zytokin verfügt über ein Spektrum von Funktionen und reguliert

viele biologische Prozesse, wie Zellwachstum, Zellaktivierung, Typ der Immunantwort und Gewebereparatur (Roitt et al. 2001).

Die Kommunikation der Zellen untereinander zur Regulation der Immunantwort ist in der Abbildung 3 schematisch mit der Auswahl einiger weniger Zytokine wiedergegeben.

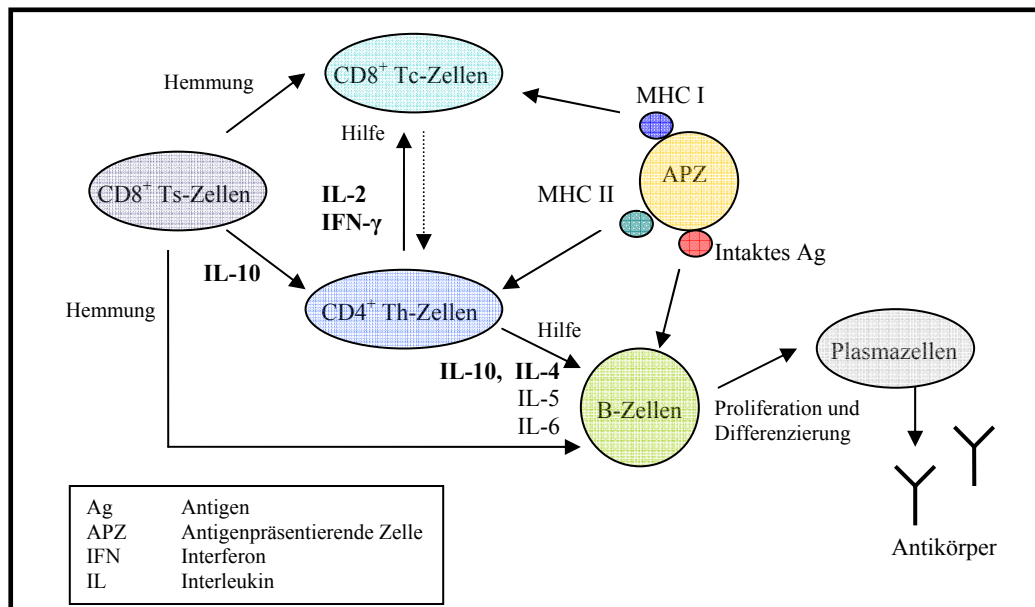


Abbildung 3: Schema der Zellregulation durch ausgewählte Zytokine

Zu den Zytokinen, die von den Th1-Zellen gebildet werden, zählen u.a. das Interleukin-2 und das Interferon- γ .

Interleukin-2 spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Immunantwort und ist vor allem an der zellvermittelten Immunreaktion beteiligt (Smith 1984). Die Funktion besteht hauptsächlich in der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch die Sekretion von Th1-Zellen und NK.

Interferone (IFN) sind antivirale Zytokine, die als Antwort auf eine Virusinfektion oder Immunstimulation gebildet werden (Tizard 2004). Sie werden von virusinfizierten Zellen, NK und T-Lymphozyten gebildet. Man unterscheidet zwei Gruppen der Interferone. Zu den Typ I-Interferonen gehören Interferon- α und Interferon- β . Diese Typ I-Interferone unterbrechen die Virusreplikation durch Induktion zellulärer Enzyme (Slater und Hannant 2000). Bei Interferon- γ handelt es sich um ein Typ II-Interferon. Die IFN- γ Produktion erfolgt durch aktivierte T-Lymphozyten (Th1) und NK (Degliantoni et al. 1985; Farrar und Schreiber 1993). IFN- γ induziert die Expression von MHC I und MHC II Molekülen auf der Zelloberfläche, fördert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Chen et al.

1987) und stimuliert die Synthese von Interleukin-1 und -2 (Pesteka et al. 1987; Nash 1996). Die Wirkung von IFN- γ besteht im Wesentlichen in der Modulation der Immunantwort durch Hemmung der Proliferation von Th2-Zellen und der Unterdrückung der Zytokinproduktion von Th2-Zellen (z.B. IL-10). Diese immunregulatorische Eigenschaft bewirkt eine Verstärkung der zellvermittelten Immunantwort. Die Produktion von IFN- γ durch Th1-Zellen und NK wird umgekehrt durch eine hohe Interleukin-10 Konzentration verhindert und somit die humorale Immunantwort verstärkt (Farrar und Schreiber 1993).

Zu den Zytokinen, die von den Th2-Zellen gebildet werden, zählen unter anderem das Interleukin-4 und das Interleukin-10.

Das **Interleukin-4** wird von aktivierten Th2-Zellen und Mastzellen gebildet (Mosmann et al. 1986; Brown et al. 1987) und induziert die humorale Immunantwort. Es führt zur Aktivierung der B-Zellen und beeinflusst das Wachstum von T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (Hu-Li et al. 1987; Brown et al. 1988; McInnes und Rennick 1988). Vorläuferzellen der zytotoxischen T-Zellen werden durch IL-4 zur Proliferation angeregt und in aktive Tc-Zellen differenziert (Widmer und Grabstein 1987). Das Wachstum der Makrophagen wird durch IL-4 gehemmt, jedoch die Expression von MHC II Molekülen auf der Makrophagenoberfläche induziert (Crawford et al. 1987; McInnes und Rennick 1988; Stuart et al. 1988). Die Wirkung von Interleukin-4 wird durch Interferon- γ neutralisiert.

Interleukin-10 wird als inhibitorisches Zytokin bezeichnet (Chung and Barnes 1999) und hauptsächlich von Th2-Zellen sowie von aktivierten Makrophagen produziert. Es wirkt immunsuppressiv durch Hemmung der Monozyten- und Makrophagenfunktion, indem es die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und IL-6 vermindert.

Durch Reduzierung der MHC II Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wird die T-Zellproliferation unterdrückt. IL-10 kann die Th1-Immunantwort vermindern und damit die Synthese von Zytokinen aus Th1-Zellen (Haig und Fleming 1999).

1.2.3 Immunantwort / -pathogenese bei Virusinfektion mit dem EHV-1/-4

Für die Immunabwehr spielen das respiratorische Epithel der Nase, das respirationstrakt-assoziierte lymphatische Gewebe und das Endothel des Endometriums eine wichtige Rolle (Allen et al. 1999). Eine lokale Abwehr erfolgt meist schon an der Eintrittspforte in der Nasenschleimhaut durch Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin G (IgG) (Allen et al. 1999). Hierbei werden die Immunglobuline aus dem Serum unter

Energieverbrauch durch die Epithelzellen hindurch befördert und auf der luminalen Seite sezerniert (Tizard 2004).

Bisher ist noch relativ wenig bekannt über die Bedeutung der zellulären Immunmechanismen, insbesondere bei Ausbruch der EHV-1 bedingten neurologischen Erkrankung. Die zytotoxischen T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von virusinfizierten Zellen und bei der Terminierung der Virämie (Allen et al. 1999; Slater und Hannant 2000; Kydd et al. 2006). Aus Pferdeblut isolierte zytotoxische T-Zellen, nach experimenteller Infektion der Pferde, töten EHV-1 infizierte Zellen in Zellkulturen (*in vitro*) bereits nach 2 Stunden ab und erreichen ihre maximale Sensitivität nach 6 Stunden (Allen et al. 1999). Für die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen ist die Antigenpräsentation über MHC I Moleküle an der Zelloberfläche ausschlaggebend (Allen et al. 1995; Soboll et al. 2003; Kydd et al. 2006). Die meisten virusspezifischen zytotoxischen T-Zellen sind klassische CD8⁺ MHC I restringierte T-Zellen (Allen et al. 1999). Eine Infektion mit EHV-1 führt zur Bildung von nicht-zytotoxischen Gedächtniszellen, die über mehrere Monate im Blut nachweisbar sind und wieder zu zytotoxischen Effektorzellen reaktiviert werden können (Allen et al. 1999).

Jüngere Ponys mit geringem oder keinem Kontakt zu EHV-1 zeigten in einer Studie eine niedrige Anzahl an EHV-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen (O'Neill et al. 1999). Nach experimenteller Infektion entwickelten sie klinische Symptome sowie nasale Virusausscheidung und eine zellassozierte Virämie. Im Gegensatz dazu zeigten Ponys, die zuvor durch mehrere Infektionsversuche bereits Kontakt zu EHV-1 hatten, eine höhere Anzahl an EHV-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen vor experimenteller Infektion und entwickelten danach keine klinischen Symptome, Virusausscheidung und Virämie. Diese Studie zeigt, dass es eine Verbindung gibt zwischen der Anzahl an EHV-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen im Blut vor Infektion und dem Auftreten von klinischen Anzeichen (O'Neill et al. 1999). Durch Infektionsversuche mit EHV-1 und EHV-4 bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass der zellvermittelten Immunität eine größere Protektivität zugesprochen wird als den Antikörpern (Azmi und Field 1993). Hierfür wurden Mäuse intranasal mit EHV-1 und EHV-4 (lebend und hitzeinaktiviert) infiziert und nach 4 Wochen mit EHV-1 reinfiziert. Die Detektion der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen erfolgte über monoklonale Antikörper. EHV-4 erwies sich als apathogen in Labormäusen, führte aber zu einer Kreuzreaktivität mit EHV-1. Darüber hinaus erhielten Empfänger-mäuse aus der Milz präparierte Immunzellen, insbesondere T-Zellen, wobei die Anzahl an transferierten Immunzellen mit der Protektivität gegenüber experimenteller Infektion mit EHV-1 korrelierte (Azmi und Field 1993).

1.2.4 Immunantwort auf Impfungen

Impfstoffe sind Arzneimittel, die Antigene (vermehrungsfähige, avirulente bzw. schwach virulente Erreger, inaktivierte Erreger, immunisierende Antigene oder Toxoide) enthalten und dazu bestimmt sind, beim Tier zur Erzeugung spezifischer Abwehr- und Schutzstoffe angewendet zu werden (Mayr 2003). Man unterscheidet eine aktive und passive Immunisierung. Bei der aktiven Immunisierung werden derzeit 8 Gruppen von Impfstoffen unterschieden: Lebendimpfstoffe, Totimpfstoffe, Toxoidimpfstoffe, Anti-Idiotyp-Antikörper-Impfstoffe, Vektorimpfstoffe, DNA-Vakzinen, synthetische Impfstoffe und Marker-Impfstoffe (Mayr 2003). Im Folgenden soll die Wirkungsweise von Lebendimpfstoffen und Totimpfstoffen erläutert werden.

Lebendimpfstoffe enthalten als immunisierendes Agens vermehrungsfähige avirulente oder schwach virulente, homologe oder heterologe Impfkeime. Der applizierte Impfkeim vermehrt sich im Impfling und löst die für ihn spezifischen Immunisierungsprozesse aus, ruft aber keine typischen Krankheitserscheinungen vor. Die aktive Immunisierung wirkt über die Stimulierung des spezifischen Teils des Immunsystems und führt zur Bildung spezifischer Serum-Antikörper (humorale Impfantwort), Immunzellbildung (zelluläre Impfantwort) und bei lokaler Applikation zur Sekretion von IgA und IgM (Mayr 2003). Jessett et al. (1999) untersuchten den Schutz vor Challenge-Infektion mit EHV-1 (Ab4-Stamm) nach intramuskulärer Impfung mit einer attenuierten Lebendvakzine gegen EHV-1. Die Impfung bewirkte in diesem Fall die Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern und reduzierte die klinische Symptomatik nach der Challenge-Infektion. Die durch die Lebendvakzine stimulierten zytotoxische T-Zellen führten zur Reduktion der zellassozierten Virämie. Weitere Untersuchungen beim Pferd zum Einsatz von Lebendvakzinen zeigten, dass auch nach intranasaler Verabreichung einer Lebendvakzine gegen EHV-1 (C147-Stamm) eine Serokonversion gegen EHV-1 und -4 stattfand (Patel et al. 2003). 6 Wochen nach der Impfung wurden die Tiere experimentell mit EHV-1/-4 infiziert. Die geimpften Tiere zeigten keine klinischen Symptome oder Antikörperreaktion, die ungeimpften Kontrolltiere hingegen aber Fieber, Nasenausfluss, Virämie und eine Serokonversion (Patel et al. 2003). Nachteil der Lebendimpfstoffe ist das Risiko der Reversion zur Virulenz. Neuere Untersuchungen zeigten, dass durch Identifikation der Virulenzgene bei EHV-1 Deletionsmutanten hergestellt werden konnten (Osterrieder et al. 2001) und die so entwickelten modifizierten Lebendvakzinen einen deutlich sicheren Umgang bei der intramuskulären und intranasalen Anwendung bieten. Goodman et al. (2006) untersuchten die Wirksamkeit einer inaktivierten Kombinations- und modifizierten Lebendvakzine gegen EHV-1 beim Pferd. Hierfür wurden jeweils 5 Pferde mit

der inaktivierten Vakzine und der modifizierten Lebendvakzine zweimal im Abstand von 30 Tagen geimpft. Weitere 5 Pferde dienten als Kontrolle. Nach experimenteller Infektion mit dem neuropathogenen EHV-1 (OH03) Stamm zeigten 3 Kontrollpferde und 3 mit inaktiviertem Impfstoff geimpfte Tiere neurologische Symptome. Die modifizierte Lebendvakzine induzierte signifikant niedrigere virusneutralisierende Antikörpertiter verglichen zu der inaktivierten Vakzine. Anhand der Ergebnisse von klinischen Parametern, Virusisolation und der Immunantwort in dieser Studie zeigte sich schließlich ein besserer Schutz durch die modifizierte Lebendvakzine als durch die inaktivierte Kombinationsvakzine (Goodman et al. 2006).

Die am meisten verwendete Gruppe bei den Impfstoffen aus nicht vermehrungsfähigen Antigenen sind die Impfstoffe aus inaktivierten Erregern (**Totimpfstoffe**). Hier liegen die für die Immunisierung verantwortlichen Mikroorganismen als Ganzes in inaktiver Form, d. h. nicht vermehrungsfähig, vor. Sie regen dadurch die Immunantwort schlechter an. Die immunisierende Eigenschaft der inaktivierten Keime wird durch Zusatzstoffe, wie Adjuvantien bzw. Adsorbentien, gefördert. Man unterscheidet 3 große Gruppen von Adjuvantien: Depot-Adjuvantien verhindern einen schnellen Abbau des Antigens und fördern eine länger anhaltende Immunantwort (z.B. Aluminiumhydroxid). Adjuvantien aus Partikeln (z.B. Liposomen, ISCOMS) begünstigen die Antigenpräsentation über Antigenpräsentierende Zellen und führen zu einer Produktion von Zytokinen. Immunstimulierende Adjuvantien (z.B. BCG, Saponin) führen zur Aktivierung von Dendritischen Zellen, Makrophagen und stimulieren die Sekretion von Zytokinen (Tizard 2004).

Heldens et al. (2001) zeigten mit dem inaktivierten Impfstoff Duvaxyn[®] EHV_{1,4} (Fort Dodge) nach Challenge-Infektion mit EHV-1 (Ab4-Stamm) einen Schutz vor Abort bei Pferden. Die zweimalige Impfung induzierte die humorale Immunantwort. Nach experimenteller Infektion abortierten alle 4 Kontrollpferde und 1 Pferd von 5 vakzinierten. Diese Studie zeigte, dass auch inaktivierte Vakzinen einen schützenden Effekt vor dem EHV-1 Abort haben. Darüber hinaus wird die Übertragung des Virus im Bestand durch Reduktion der Virusausscheidung infolge der Impfung verhindert (Heldens et al. 2001).

Die Abbildung 4 gibt schematisch die Angriffsorte verschiedener ausgewählter Impfstoffgruppen wieder.

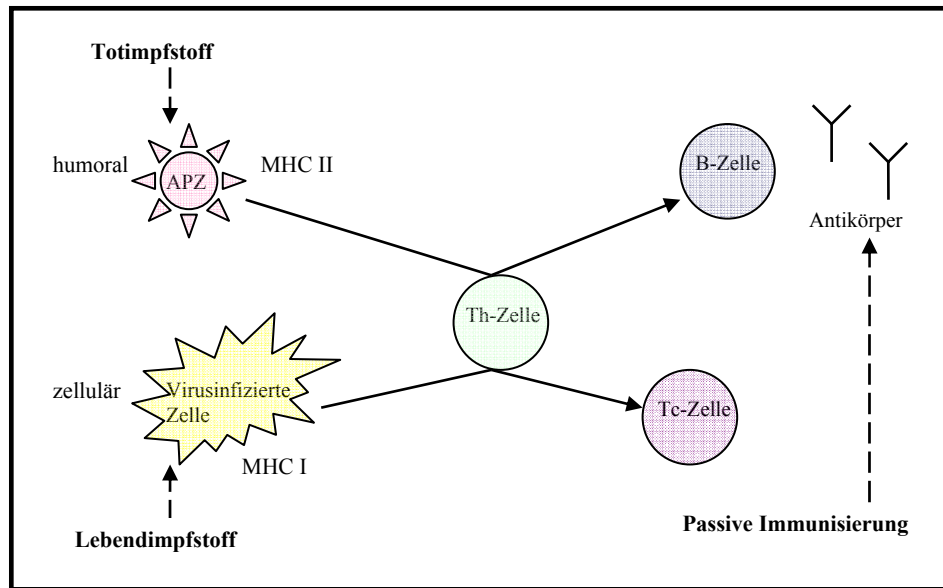


Abbildung 4: Angriffspunkte der Impfung

Die Antikörper erscheinen im Serum erst einige Tage nach der Impfung und erreichen ihren Höhepunkt 3 bis 5 Wochen post vaxinationem (Mayr 2003). Nach einer wiederholten Schutzimpfung mit dem gleichen Antigen kommt es zu einem immunologischen Booster-Effekt. Der Booster-Effekt führt zu einer qualitativen und quantitativen Verstärkung der immunologischen Prozesse und beruht auf der Bildung von so genannten Memory-Zellen. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten können zu Memory-Zellen transformieren. Die Intensität der sekundären Immunantwort hängt u. a. vom zeitlichen Abstand zwischen dem primären und sekundären Stimulus ab (Mayr 2003).

Bisher wurde eine große Varietät an Impfstoffen bei Pferden in verschiedenen Versuchen getestet. Inaktivierte Vakzinen induzieren gute komplementgebundene und virusneutralisierende Antikörpertiter und führen ebenfalls zu einer verminderten Virusausscheidung und Virämie (Heldens et al. 2001). Die Ausbildung einer mukosalen Immunität konnte mit den bisherigen Impfstoffen und der intramuskulären Applikationsart nicht erreicht werden. Weder eine intramuskulär inaktivierte EHV-1 Vakzine noch intranasal verabreichtes attenuiertes EHV-1 führte in einer Studie von Breathnach et al. (2001) zu einer detektierbaren mukosalen Antikörperantwort. Erst die experimentelle intranasale Infektion mit infektiösem EHV-1 (Stamm A183) führte zur nachweislichen Bildung von schützenden EHV-1 spezifischen IgA Antikörpern (Breathnach et al. 2001).

1.2.5 Immunantwort auf Immunmodulatoren

Unter Immunmodulation versteht man eine Veränderung der Immunantwort durch verschiedene Substanzen (Pschyrembel 2002). Die Immunantwort kann negativ (Immunsuppression) oder positiv (Immunistimulation) beeinflusst werden (Mulcahy und Quinn 1986). Um die nichtantigenspezifische Immunantwort gegen infektiöse und tumoröse Erkrankungen zu verstärken (van Kampen 1998), stehen in der Veterinärmedizin verschiedene Substanzen zur Verfügung. Man unterscheidet körpereigene und synthetische (chemische) Immunmodulatoren sowie Substanzen pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Herkunft (Mulcahy und Quinn 1986; Quinn 1990). In der Tabelle 1 sind einige Immunmodulatoren beispielhaft aufgelistet.

Tabelle 1: Beispiele für Immunmodulatoren

Pflanzliche Immunmodulatoren	
Acemannan (Aloe vera)	(Strey 2002)
Echinacea angustifolia	(Kühn 2000; Percival 2000)

Mikrobielle Immunmodulatoren	
BCG-Vakzine (<i>Mykobakterium bovis</i>)	(Mayr et al. 1986; Strey 2002)
Duphamun [®] (<i>Avipox gallinarum</i>)	(Büttner et al. 1987)
Immuno-Regulin TM (<i>Propionbacterium acnes</i>)	(Quinn 1990)
Zylexis [®] (<i>Parapox ovis</i>)	(Mayr et al. 1989)

Chemische Immunmodulatoren	
Levamisol	(Mayr et al. 1986; Quinn 1990)

Physiologische Immunmodulatoren	
Zytokine, z.B. IFN- ω	(De Mari et al. 2003)

Im Folgenden soll die Wirkungsweise von Zylexis[®] (Pfizer GmbH; ehemals: Baypamun[®]) näher erläutert werden. Das früher bezeichnete Präparat Baypamun[®] (Fa. Bayer) wird jetzt unter dem anderen Produktnamen Zylexis[®] der Firma Pfizer GmbH als identisches Produkt geführt. In den folgenden Zitaten wird daher unter Umständen der alte Produktname noch erwähnt.

Hauptbestandteil des Immunmodulators Zylexis[®] ist der inaktivierte Parapox-ovis Stamm D1701 (PPVO). Der Immunmodulator Zylexis[®] findet Anwendung bei vielen verschiedenen Tierarten und zeigt ein breites Wirkungsspektrum. Zur Messung der Aktivierung und Proliferation von Immunzellen wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

Beim Pferd konnte durch die Anwendung von Baypamun[®] eine Reduktion der klinischen Symptome bei respiratorischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Ziebell et al. 1997). Darüber hinaus vermindert eine immunmodulatorische Prophylaxe einen erhöhten Plasmakortisolgehalt, bedingt durch Stresssituationen wie Transport oder das Absetzen (Mayr und Siebert 1990; Lindner et al. 1993). Neueste Untersuchungen beim Pferd zeigten, dass eine dreimalige Applikation von Zylexis[®] (PPVO = Parapoxvirus ovis) nach dem Applikationsschema des Herstellers am Tag 0, 2 und 9 zu einer ansteigenden IFN- γ Genexpression *ex vivo* 24 Stunden nach der ersten Applikation kam (Horohov et al. 2008). Neben den *ex vivo* Untersuchungen zur Genexpression dieser Studie wurden *in vitro* Studien von equinen PBMCs durchgeführt. Die equinen PBMCs wurden mit PPVO allein und PPVO in Kombination mit Concavalin A stimuliert. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der IFN- γ Genexpression bei den PBMCs, die mit PPVO und Concavalin A stimuliert wurden. Diese Art der Costimulation *in vitro* konnte bereits mit dem gleichen Ergebnis bei humanen PBMCs gezeigt werden (Friebe et al. 2004). Das Ergebnis dieser Studie von Horohov et al. (2008) weist darauf hin, dass eine Behandlung mit Zylexis[®] zu einem systemisch immunologischen Effekt führen kann, der die Inzidenz von Erkrankungen beim Pferd zu reduzieren vermag. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in Mausmodellen berichtet werden (Weber et al. 2003).

Weber et al. (2003) untersuchten in einem Mausmodell nach Baypamun[®]-Applikation die Expression bestimmter Zytokine zu verschiedenen Zeitpunkten. Bereits 6 bis 12 Stunden nach der Applikation konnten die Zytokine Interleukin-12, -15, -18, IFN- γ und TNF- α nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden wurden IFN- γ und Interleukin-18 noch vermehrt exprimiert (Weber et al. 2003). Der Aktivierung von Zytokinen kommt bei der Wirkungsweise von Zylexis[®] eine große Bedeutung zu. Dabei spielt die antivirale Aktivität von IFN- γ eine wichtige Rolle. Weber et al. (2003) bestätigten in einem weiteren Mausmodell den schützenden Effekt von der Baypamun[®]-induzierten IFN- γ -Produktion, indem es durch Applikation gegen IFN- γ gerichteter monoklonaler Antikörper im HSV-Belastungsmodell zum Ausbruch der Krankheit kam.

In einem anderen Mäuseversuch konnte nach intraperitonealer Baypamun[®]-Applikation eine Erhöhung der Aktivität der Natürlichen Killerzellen, der Lymphozytenproliferation, der

Phagozytoserate und des Gehaltes an IFN- α in den Serum- oder Peritonelaspülproben gemessen werden (Mayr et al. 1986; Strube et al. 1989). Eine *in vitro* Stimulation der PBMCs mit dem Immunmodulator führte zu einer erhöhten Phagozytoserate bei Pferden, Rindern, Schweinen und Hunden (Mayr et al. 1997). Fachinger et al. (2000) konnten bei Baypamun[®]-Behandlung eine Proliferation von Th-Zellen sowie eine Induktion von Interleukin-2, IFN- α und IFN- γ feststellen.

In einer Studie über die Wirksamkeit von Zylexis[®] zur Prophylaxe und Behandlung von Lungenabszessen bei Fohlen konnte gezeigt werden, dass weder die prophylaktische Verabreichung noch der therapeutische Einsatz signifikante Unterschiede bezüglich der Inzidenz von Lungenabszessen im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwies (Baumann 2006). Hierbei wurde Zylexis[®] entgegen den Angaben des Herstellers intranasal und subkutan verabreicht. Die Fohlen mit der intranasalen Zylexis[®]-Applikation schnitten bezüglich der mittleren Erkrankungsdauer statistisch signifikant am schlechtesten ab. Die subkutane Anwendung hingegen zeigte keine Unterschiede in Bezug auf die Rückbildungszeit der Lungenabszesse im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In die Untersuchung einbezogen wurden klinische Befunde, Ergebnisse von Ultraschalluntersuchungen und Blutuntersuchungen mit Bestimmung der Leukozytenzahl als Parameter einer immunologischen Reaktion. Weitergehende immunologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

Beim Pferd liegen bisher über den Einsatz von Zylexis[®] nur Ergebnisse vor, die auf klinischen Parametern beruhen. Im Wesentlichen hat Zylexis[®] beim Pferd bisher Bedeutung im prophylaktischen Einsatz zur Stärkung des Immunsystems bei Stresssituationen (Mayr und Siebert 1990; Lindner et al. 1993), es wird aber auch zur Reduktion der klinischen Symptomatik bei respiratorischen Erkrankungen eingesetzt (Ziebell et al. 1997).

1.2.6 Untersuchungsmethoden

Die humorale Immunantwort lässt sich durch serologische Untersuchungsmethoden messen. Hierbei werden durch spezielle Testverfahren die Antikörpertiter im Blut bestimmt (siehe 1.1.6). Der zelluläre Immunstatus gibt Auskunft über die prozentualen Verhältnisse der Immunzellen im Blut. Die Immunphänotypisierung des Pferdeblutes beruht auf der selektiven Erkennung von Zelloberflächenantigenen durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper mittels Durchflusszytometrie (FACS). Zur Unterscheidung der

Lymphozytensubpopulationen werden monoklonale Antikörper gegen zelluläre Antigene eingesetzt, die relativ konstant exprimiert werden (www.laboklin.de).

Als weiterer Parameter für die zelluläre und humorale Immunantwort eignet sich der Nachweis von Zytokinexpressionsmustern. Die Untersuchung der Zytokinkonzentration im Blut gestaltet sich aufgrund der geringen Konzentration zirkulierender Zytokine als sehr schwierig und ist in der Form nur auf Proteinebene mittels ELISA nachweisbar. Der Nachweis von Zytokin-mRNA kann mit der sensitiven Detektionsmethode TaqMan[®]-PCR erfolgen. Hierfür muss zunächst die zelluläre Zytokin-mRNA aus PBMCs extrahiert und durch die Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die Bestimmung der Zytokin-mRNA kann im lebenden Organismus (*ex vivo*) erfolgen sowie *in vitro* beispielsweise durch Kulturen von Blutzellen, die durch Stimulation zu einer vermehrten Zytokinproduktion angeregt werden.

1.2.7 Prinzip der TaqMan[®]-PCR

Die Grundlagen für eine quantitative Echtzeit-PCR („Real-Time“ PCR) wurden durch Higuchi et al. (1992) geschaffen. Das Prinzip dieser modernen Methode besteht in der Messung eines Fluoreszenzsignals, welches proportional zum Anstieg der Konzentration eines Amplifikationsproduktes ist. Die heute gängige Methode beruht auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfers (Cardullo et al. 1988). Bei dem TaqMan[®]-Prinzip wird ein Fluoreszenzsignal einer fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonde (*probe*) gemessen und quantifiziert. Die TaqMan[®]-Sonde ist ein Oligonukleotid mit einem Reporterfarbstoff (z.B. 6-Carboxy-Fluoreszein, FAM) am 5'-Ende der Sonde und einem Quencherfarbstoff (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) am 3'-Ende. Das 3'-Ende der Sonde wird zusätzlich durch eine Phosphatgruppe blockiert, damit die Sonde bei der Elongation nicht als Primer fungieren kann (Cardullo et al. 1988). Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung des Reporterfarbstoffes mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fast die gesamte Lichtenergie aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher unterdrückt. Während der Elongationsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert (Lie und Petropoulos 1998) und der Reporter und Quencher freigesetzt (Abb. 5). Nach der Freisetzung des Reporters kann dessen Lichtsignal detektiert werden (Livak et al. 1995).

Der Anstieg der freien Reporterkonzentration verursacht ein wachsendes Fluoreszenzsignal, das proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes ist. Aufgrund dieser Proportionalität ist eine Quantifizierung der Ausgangs-(c)DNA möglich.

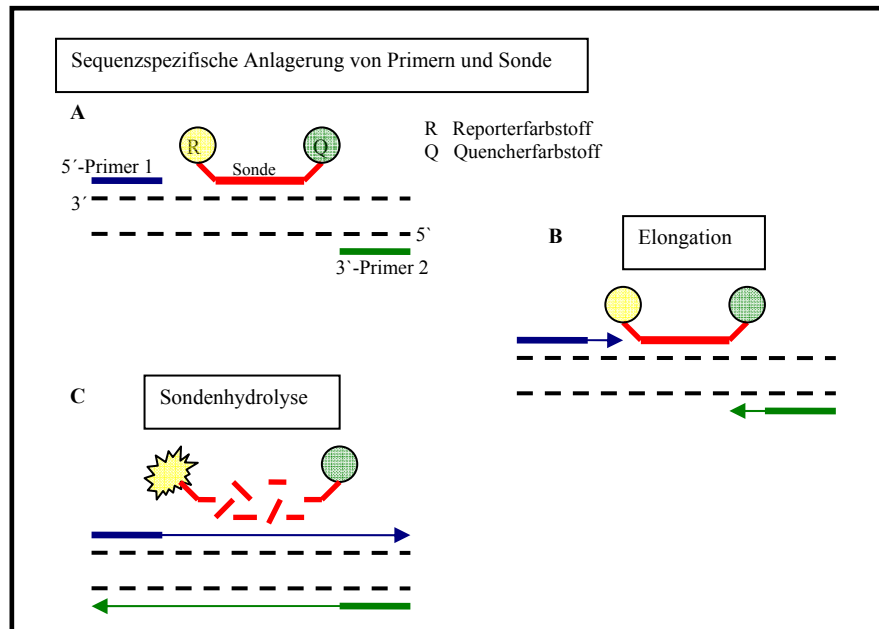


Abbildung 5: TaqMan[®]-Prinzip

- A: Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde an die Template-DNA.
- B: Der Quencherfarbstoff befindet sich noch in räumlicher Nähe des Reporterfarbstoffes und unterdrückt das Lichtsignal.
- C: Während der Elongation hydrolysiert die Taq-Polymerase die Sonde und setzt den Reporter- und Quencherfarbstoff frei. Das Lichtsignal des Reporters kann dann detektiert werden.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes, dem so genannten „Threshold Cycle“ (C_T -Wert). Der C_T -Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt und einen Schwellenwert überschreitet. Er verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an DNA und ist daher die Grundlage für die Quantifizierung einer Reaktion (Higuchi et al. 1992). Aus den ermittelten Fluoreszenzwerten wird eine Amplifikationsgraphik erstellt. Hierbei wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen (Abb. 6). Der Fluoreszenzwert ist beim Start der Reaktion nicht gleich Null, sondern setzt sich aus der Grundfluoreszenz der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe und der Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Materialien (z.B. Plastikreaktionsgefäße) zusammen.

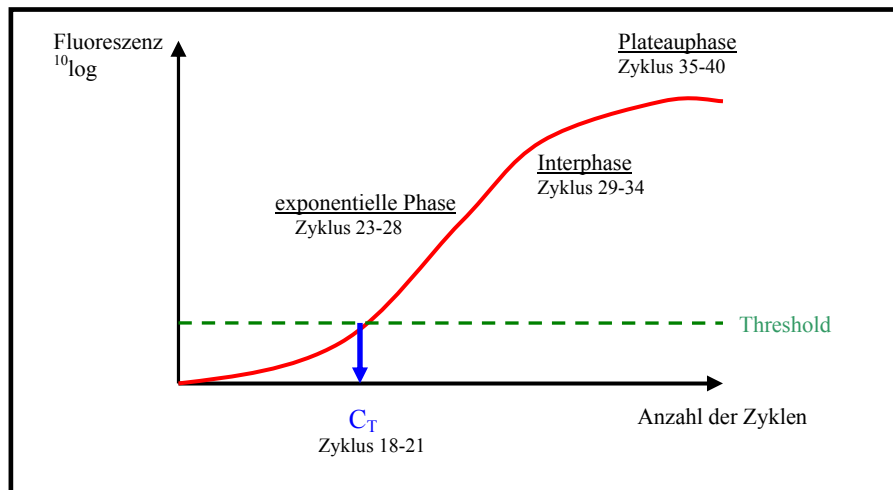


Abbildung 6: Amplifikationsgraph

Bei der **relativen Quantifizierung** wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Housekeeping Gen bezogen. Dieser Bezug wird auch als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet (Rasmussen 2001). Verschiedene Housekeeping Gene können als Referenzgen verwendet werden (z.B. GAPDH, β -Aktin, 18s rRNA). Bei den Housekeeping Genen handelt es sich um nicht regulierte, d.h. konstant exprimierte Zellproteine oder Stoffwechsellzyme, die von jeder eukaryotischen Zelle gebildet werden.

Für die relative Quantifizierung muss weder die Konzentration der Zielsequenz bekannt sein noch eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen erstellt werden, da nur das Verhältnis beider Proben zueinander berechnet wird (Bustin 2000; Livak und Schmittgen 2001).

Die **absolute Quantifizierung** wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt (Pfaffl und Hageleit 2001). Als Kalibrierungskurve kann Plasmid-DNA eingesetzt werden. Die Ermittlung der absoluten Menge einer Zielsequenz, meist ausgedrückt als Kopienzahl pro Reaktion, erfolgt ebenfalls unter Verwendung eines Referenzgens. Hierfür ist eine Standard-Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA mit bekannten Konzentrationen, sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen, notwendig. Aus dieser Verdünnungsreihe lässt sich eine sogenannte Standardkurve erstellen, indem der jeweilige Ct-Wert (auf der y-Achse) gegen die initiale Menge der Zielsequenz (als Kopienzahl auf der logarithmischen x-Achse) aufgetragen wird (Heid et al. 1996). Die absolute initiale Kopienzahl wird dadurch bestimmt, dass der Ct-Wert einer unbekannt Probe mit der Standardkurve verglichen wird. Dabei sollte die unbekannt Probe in den Bereich fallen, der mit der Standardkurve abgedeckt wird

(Bustin 2000). Voraussetzung hierfür ist die korrekte Bestimmung der Kopienzahl der Zielsequenz in den Standards, die über die Umrechnung mittels Molekulargewichtes nach der photometrischen Messung erfolgt. Für den Standard und für die Proben müssen identische Oligonukleotide zur Amplifizierung und Detektion verwendet werden. Außerdem sollten die Sequenzen möglichst ähnlich sein, um eine äquivalente Effizienz der Amplifizierung zu geben (Niesters 2004). Eine optimale PCR-Effizienz liegt bei 100%, die sich auch in der Steigung der Standardkurve von -3,322 widerspiegelt.

2. Zielsetzung

Die Immunantwort von Pferden sollte nach dreimaliger Applikation des Immunmodulators Zylexis[®] und einmaliger Impfung mit Resequin[®] NN plus durch immunologische Untersuchungsmethoden überprüft werden.

Über einen bestimmten Zeitraum wurden dafür einerseits virusspezifische Antikörpertiterverläufe gegen EHV-1 und EHV-4 im Neutralisationstest und Immunfluoreszenztest bestimmt. Die ermittelten Antikörpertiter können auf ein aktuelles Krankheitsgeschehen oder auf Reaktionen infolge einer Impfung hinweisen.

Andererseits sollte die Rolle der zellulären Immunantwort untersucht und in den Vordergrund gestellt werden. Als Parameter der zellulären Immunantwort wurden vier Zytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10), die in B-Zellen, T-Zellen bzw. Makrophagen exprimiert werden, ausgesucht.

Mittels quantitativer „Real-Time“ PCR erfolgte die Untersuchung der Zytokinexpression in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus dem Pferdeblut. Hierbei wurden Konzentrationsbestimmungen der Zytokin-mRNA direkt (*ex vivo*) aus den isolierten equinen PBMCs durchgeführt und nach Anregung der Zytokinproduktion durch eine unspezifische Stimulation der isolierten PBMCs mit Concavalin A in Zellkulturen (*in vitro*).

Es sollte überprüft werden, ob die Zytokinexpression mit der Antikörperantwort, der Anzahl an equinen PBMCs und der Anzahl an B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen korreliert.

Der Grundgedanke dieses Versuches war es festzustellen, ob die Gabe eines Immunmodulators zu einer messbaren zellulären und humoralen Immunantwort nach Impfung mit dem Totimpfstoff Resequin[®] NN plus führt bzw. ob diese in irgendeiner Form dadurch beeinflusst wird.

Eine Verbesserung der Impfantwort durch die Anwendung von Zylexis[®] wurde als Hauptthese aufgestellt und überprüft.

Dafür wurden folgende Zusammenhänge untersucht:

1. Was bewirkt Zylexis[®] im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus auf die Höhe der Antikörper-Antwort?
2. Wie wirkt sich die Anwendung von Zylexis[®] in Kombination mit der Impfung auf die Anzahl der peripheren mononukleären Blutzellen und Lymphozytensubpopulationen (B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen) aus?
3. Was bewirken Zylexis[®] und Impfstoff in Bezug auf die Zytokinexpression?

Die gestellten Fragen wurden jeweils nach folgenden Kriterien überprüft und bewertet:

- Placebo und Versuchsgruppe
- Unterschiedliche Vorimmunisierung (Impfhistorie)
- Alter und Geschlecht

3. Material und Methoden

3.1 Materialnachweis

3.1.1 Chemikalien-, Gebrauchsmaterialien- und Gerätenachweis

Chemikalien:

Applied Biosystems , Darmstadt:	BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, TaqMan® Universal PCR Master Mix
BDM Laboratory Supplies , Poole (UK):	Carboxymethylcellulose-Natriumsalz (CMC)
Biochrom AG , Berlin:	Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml), Foetal Calf Serum (FCS)
Bioline GmbH , Luckenwalde:	dNTP Mix (Konz. 2,5 mM), Hyperladder I (100 lanes)
Carl Roth GmbH + Co. , Karlsruhe:	Agarose, Formamid (deionisiert), Glycerol (Glycerin, > 98%), Giemsa-Lösung
Dianova , Hamburg:	Ziege-Anti-Pferd IgG (H+L) FITC-Konjugat
Difco , Michigan (USA):	Agar Noble, LB Broth, Miller (Luria-Bertani),
Fermentas GmbH , St. Leon-Rot:	RiboRuler™ RNA Ladder, High Range,
GE Healthcare Bio-Sciences AB , Uppsala (S):	Sephadex™ G-50 (Superfine)
Invitrogen GmbH , Karlsruhe:	Super Script™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Trizol® Reagent
Life Technologies (Gibco-BRL) , Gaithersburg (USA):	Eagle's minimum essential medium Dulbeccos's modification (EDM), RPMI Medium 1640
Merck GmbH , Darmstadt:	weitere Standardchemikalien, wenn nicht anders vermerkt
Metabion GmbH , Martinsried:	mi-Plasmid Miniprep Kit
New England Biolabs , Frankfurt am Main:	EcoRI Enzym (20.000 U/ml), NE Buffer EcoRI (10 x Konzentration)

Promega GmbH , Mannheim:	Nuclease-freies Wasser, pGEM [®] -T Easy Vector System I, Wizard [®] SV-Gel and PCR Clean-Up System
Qiagen GmbH , Hilden:	PCR-Reaktionspuffer, 10 x (inkl. 15 mM MgCl ₂), Taq DNA Polymerase (5 units / µl)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH , Steinheim:	Ampicillin, Chloroform, Concavalin A (Canavalia ensiformis) γ-Irradiated, Diethylpyrocarbonate (DEPC), Ethyldiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalz Dihydrat, Mineralöl für die PCR, MOPS, Penicillin G, Streptomycinsulfat
Stratagene , Amsterdam (NH):	Epicurian Coli [®] SoloPack [®] Gold Supercompetent Cells
TIB Molbiol , Berlin:	Auftrags-Oligonukleotidsynthese, TaqMan-Sonden-Synthese
<u>Geräte:</u>	
Applied Biosystems , Darmstadt:	TaqMan [®] PCR-Zykler 7700 SDS, GenAmp [®] PCR System 9700, Foundation Data Collection (Version 3.0) PrimerExpress [®] Software
Assistent , Sondheim:	Neubauer-Zählkammer
Beckman Coulter GmbH , Krefeld:	DU [®] 640 B Spectrophotometer
Bio-med GmbH , Theres:	Thermocycler 60
Biometra , Göttingen:	FLX-20M (Transluminator), UNO-Thermoblock [™] (PCR-Cycler)
Braun Biotech International , Melsungen:	Certomat [®] H /U (Schüttelinkubator)
Carl Zeiss , Oberkochen:	Axiovert 100 (Fluoreszenzmikroskop)

Eppendorf , Wesseling-Berzdorf:	Eppendorf Centrifuge 5403, Eppendorf Thermomixer 5436, Pipetten
Heraeus Christ , Osterode:	Begasbarer Feuchtbrutschrank, Biofuge 13, Minifuge 2
Kendro Laboratory Products , Wien (A):	Clean Air (Sterilbank)
Olympus , Hamburg:	Lichtmikroskop, Modell: CK2
Owl Separation Systems , Portsmouth (NH):	EasyCast™ Horizontal Electrophoresis System
Pharmacia , Freiburg:	Power Supply
Polaroid , Offenbach:	Kamera CU-5, 88-46, Polaroid Film 667 Black & White, ISO 3000
Schimadzu , Kyoto (Japan):	UV-1202 (UV-VIS Spectrophotometer)

Gebrauchsmaterialien:

Applied Biosystems , Darmstadt:	MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate
Becton Dickinson GmbH , Heidelberg:	BD Prescisionslide™ Kanüle 20 G, gelb, BD Vacutainer™ Röhren aus PET Kunststoff, EDTA, 4 ml / 10 ml, Vacutainer Holder
BSN medical GmbH & Co. KG , Hamburg:	Neolus® Kanülen, schwarz (0,7 x 30 mm)
Carl Roth GmbH + Co. , Karlsruhe:	Multi®-Reaktionsgefäße 1,7 ml & 0,65 ml
Nunc GmbH & Co. KG , Wiesbaden:	Cryo Tube™ Vials
Ratiomed, Megro GmbH , Wesel:	sterile Einmalskalpelle
Sorenson Bio Science, Inc. , Salt Lake City (USA):	MultiGuard®-Tips, RNase-/DNase-frei, 5-10 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl
Terumo Europe N.V. , Leuven (B):	Syringe, sterile Einmalspritzen, 2 ml
TPP Tissue culture , Trasadingen (CH):	steriles Plastik-Einmalmaterial (Zentrifugenröhrchen, Zellkultur-Platten)

3.1.2 Primer- und Sondensequenzen

Mit Hilfe von Gensequenzen aus der Datenbank des „National Center für Biotechnology Information“ (NCBI, 1998 [<http://www.ncbi.nih.gov/>]) wurden geeignete Primer- und Sondensequenzen über die PrimerExpress[®] Software (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewählt und über die Firma TIB Molbiol, Berlin bezogen (Tab. 2 und Tab. 3).

Die Primer wurden als entsalzte Lyophilisate bestellt. Die Sonden waren HPLC-gereinigt, am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) und am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporterfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) markiert.

Tabelle 2: Primersequenzen für die Klonierung

Equines Interferon- γ	
Primer	Sequenz
EqIFNg-228F	5'- TCT TGA AGA ACT GGA AAG AGG ATA GT -3'
EqIFNg-566R	5'- ACT ATT GCA ACG CTC TCC GG - 3'

Equines Interleukin-2	
Primer	Sequenz
EqIL-2-25F	5'- TGC ATC GCA CTA ACT CTT GCA G -3'
EqIL-2-362R	5'- CAT GTG AAT CTT GTT TCA GAC CCC- 3'

Equines Interleukin-4	
Primer	Sequenz
EqIL-4-15F	5'- CCA ACT GAT TCC AGC TCT GGT C -3'
EqIL-4-332R	5'- ACA GTA CAG CAG GTC CCG TTT G -3'

Equines Interleukin-10	
Primer	Sequenz
EqIL-10-217F	5'- GAC TTT AAG GGT TAC CTG GGT TG -3'
EqIL-10-519R	5'- TGC TTC AGT TTT TCA TCT TCG TT -3'

Fortsetzung Tabelle 2:

Equines β -Aktin	
Primer	Sequenz
Eq-betaAktin-F	5'- CCG GGA CCT GAC GGA CTA -3'
Eq-betaAktin-R	5'- CCT TGA TGT CAC GCA CGA TT -3'

Equines GAPDH	
Primer	Sequenz
Eq-GAPDH-F	5'- GGC AAG TTC CAT GGC ACA GT -3'
Eq-GAPDH-R	5'-CAC AAC ATA TTC AGC ACC AGC AT -3'

Tabelle 3: Primer- und Sondensequenzen für die „Real-Time“ TaqMan[®]-PCR

Equines Interferon- γ	
Primer / Sonde	Sequenz
EqIFNg-228F	5'- TCT TGA AGA ACT GGA AAG AGG ATA GT -3'
EqIFNg-388R	5'- GCT GCT GTT AAA GAA CTT AAC GAA CA -3'
EqIFNg-334TM	5'-6FAM-AAA GAG CAT GGA CAC CAT CAA GGA GGA CXT- PH-3'

Equines Interleukin-2	
Primer / Sonde	Sequenz
EqIL-2-25F	5'- TGC ATC GCA CTA ACT CTT GCA G -3'
EqIL-2-106R	5'- GCT TCA GTT GTT GCT GTG TTT CC -3'
Eq-IL-2-50T	5'- 6FAM-TTG CAA ACA GTG CAC CTA CTT CAA GCT CTA AGA-TMR -3'

Equines Interleukin-4	
Primer / Sonde	Sequenz
EqIL-4-69F	5'- GGG ATG CAA ATA CGA CAT CAC CTT -3'
EqIL-4-175R	5'- AGG CAT CCG CTA CAG TCA GCT -3'
Eq-IL-4-129T	5'- 6FAM-TGG AAA GGG CAA GAA TTC GTG CAT G – TMR -3'

Fortsetzung Tabelle 3:

Equines Interleukin-10	
Primer / Sonde	Sequenz
EqIL-10-370F	5'- CGG CGC TGT CAT CGA TTT -3'
EqIL-10-449R	5'- TGG AGC TTA CTG AAG GCA CTC TT -3'
Eq-IL-10-394T	5'- 6FAM-TGT GAA AAT AAG AGC AAG GCA GTG GAG CAG – TMR -3'

Equines β -Aktin	
Primer / Sonde	Sequenz
Eq-betaAktin-F	5'- CCG GGA CCT GAC GGA CTA -3'
Eq-betaAktin-R	5'- CCT TGA TGT CAC GCA CGA TT -3'
Eq-betaAktin-T	5'- 6FAM-TAC AGC TTC ACC ACC ACG GCC G – TMR -3'

Equines GAPDH	
Primer / Sonde	Sequenz
Eq-GAPDH-F	5'- GGC AAG TTC CAT GGC ACA GT -3'
Eq-GAPDH-R	5'-CAC AAC ATA TTC AGC ACC AGC AT -3'
Eq-GAPDH-T	5'- 6FAM-CAT CAA CGG AAA GGC CAT CAC CAT CT – TMR -3'

Die Primer- und Sondensequenzen für die Housekeeping Gene equines β -Aktin und GAPDH wurden in Anlehnung an Kolm et. al (2006) hergestellt.

3.1.3 Angewandte Medikamente

3.1.3.1 Immunmodulator

Zylexis[®] (Pfizer, Karlsruhe); Chargen-Nr.: L60994

Die Zylexis[®]-Charge L60994 enthält nach Angaben des Beipackzettels in 1 ml des resuspendierten Produktes inaktiviertes Parapox ovis-Virus (Stamm D 1701) mit mindestens 230 Einheiten Interferon sowie ca. 25 mg Polygeline als Stabilisator.

Das lyophilisierte Präparat wurde vor der Injektion mit 2 ml Wasser für Injektionszwecke resuspendiert. Zur intramuskulären Injektion wurde die Dosis von 2 ml des resuspendierten Produktes für Pferde, unabhängig vom Alter und Gewicht der Tiere, verabreicht.

3.1.3.2 Placebo

Isotonische Kochsalzlösung Fresenius; Chargen-Nr.: UB 3631

Als Placebo wurde 0,9%ige NaCl-Lösung analog zu der Zylexis[®]-Applikation in einer Dosis von 2 ml intramuskulär verabreicht.

3.1.3.3 Impfstoff

Resequin[®] NN plus (Intervet, Unterschleißheim); Chargen-Nr.: 75312A

Alle Pferde wurden mit dem inaktivierten Kombinationsimpfstoff Resequin[®] NN plus (Intervet, Unterschleißheim) nach Angaben des Herstellers intramuskulär geimpft.

Eine Dosis von 2 ml Resequin[®] NN plus enthält nach dem Beipackzettel:

Inaktiviertes equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1)	
Stamm RAC-H	mind. 10 ^{7.8} GKID ₅₀
Inaktiviertes equines Herpesvirus Typ 4 (EHV-4)	
Stamm 2252	mind. 10 ^{6.5} GKID ₅₀
Inaktivierte, equine Influenzavirus-Antigene der Stämme	
A/equi 1/Prag/1/56	50 µg Hämagglutinin
A/equi 2/Newmarket 1/93 (Amerikanischer Typ)	20 µg Hämagglutinin
A/equi 2/Newmarket/2/93 (Europäischer Typ)	20 µg Hämagglutinin

3.1.4 Tiere

Die im Rahmen dieser Impfstudie zur Verfügung gestellten 20 Pferde stammten aus einem Zuchtbestand in Pausin (Brandenburg). Die Tiere wurden überwiegend ganztägig auf der Weide gehalten. Für die Studie erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen zu je 11 und 9 Pferden. Die Gruppe 1 wurde als Zylexis-Gruppe definiert, während die Gruppe 2 als Placebo-Gruppe diente. Die Zylexis-Gruppe setzte sich aus 10 Warmblutpferden und einem Kaltblut (8 Stuten, 2 Hengste, 1 Wallach) im Alter zwischen 2 bis 17 Jahren zusammen. Das Durchschnittsalter betrug 6,9 Jahre. In der Placebo-Gruppe befanden sich 8 Warmblutpferde und ein Kaltblut (8 Stuten, 1 Wallach), die zwischen 2 und 16 Jahre alt waren. Das Durchschnittsalter betrug 6,5 Jahre.

Gruppe 1 und Gruppe 2 enthielten 5 bzw. 3 Pferde, die bereits in der Vergangenheit, in einem Zeitraum von 10 bis 6 Monaten vor Studienbeginn, mit einem kombinierten EHV- und Influenza-Impfstoff (Resequin[®] NN plus [Intervet, Unterschleißheim]) geimpft und je weitere 6 Pferde, die nur mit einem Influenza-Impfstoff (Equilis[®] Influenza [Intervet, Unterschleißheim]) vakziniert worden waren (Tab. 4). Alle Pferde beider Gruppen erhielten am definierten Versuchstag eine Impfung mit Resequin[®] NN plus (Intervet, Unterschleißheim). Zusätzlich bekamen die Tiere der Gruppe 1 Zylexis[®] (Pfizer, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers appliziert, während den Tieren der Gruppe 2 anstelle der Zylexis[®]-Applikation ein Placebo verabreicht wurde. Als Placebo-Medikament dienten 2 ml physiologische Kochsalzlösung.

Tabelle 4: Gruppenübersicht / Vorimmunisierung

Gruppe-Nr.:	Definition	Anzahl der Pferde	Anzahl der EHV-/Influenza geimpften Tiere	Anzahl der Influenza geimpften Tiere
1. Zylexis	Versuchsgruppe	11	5	6
2. Placebo	Kontrollgruppe	9	3	6

Darüber hinaus sollte im weiteren Verlauf zusätzlich untersucht werden, ob die unterschiedliche Vorimmunisierung oder das Alter bzw. das Geschlecht einen Einfluss auf die Immunantwort ausüben. Dafür wurden die Pferde in die Gruppen Influenza (n = 12) und Resequin (n = 8) sowie „bis 4 Jahre“ (n = 10) und „über 4 Jahre“ (n = 10) unterteilt.

Eine genaue Auflistung der Pferde und ihre Gruppenzugehörigkeit sind im Anhang (9.1; A1) enthalten.

3.2 Methoden

3.2.1 Darstellung Ablauf in der Methodik

Die Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die Anwendung der immunologischen und molekularbiologischen Methoden wieder.

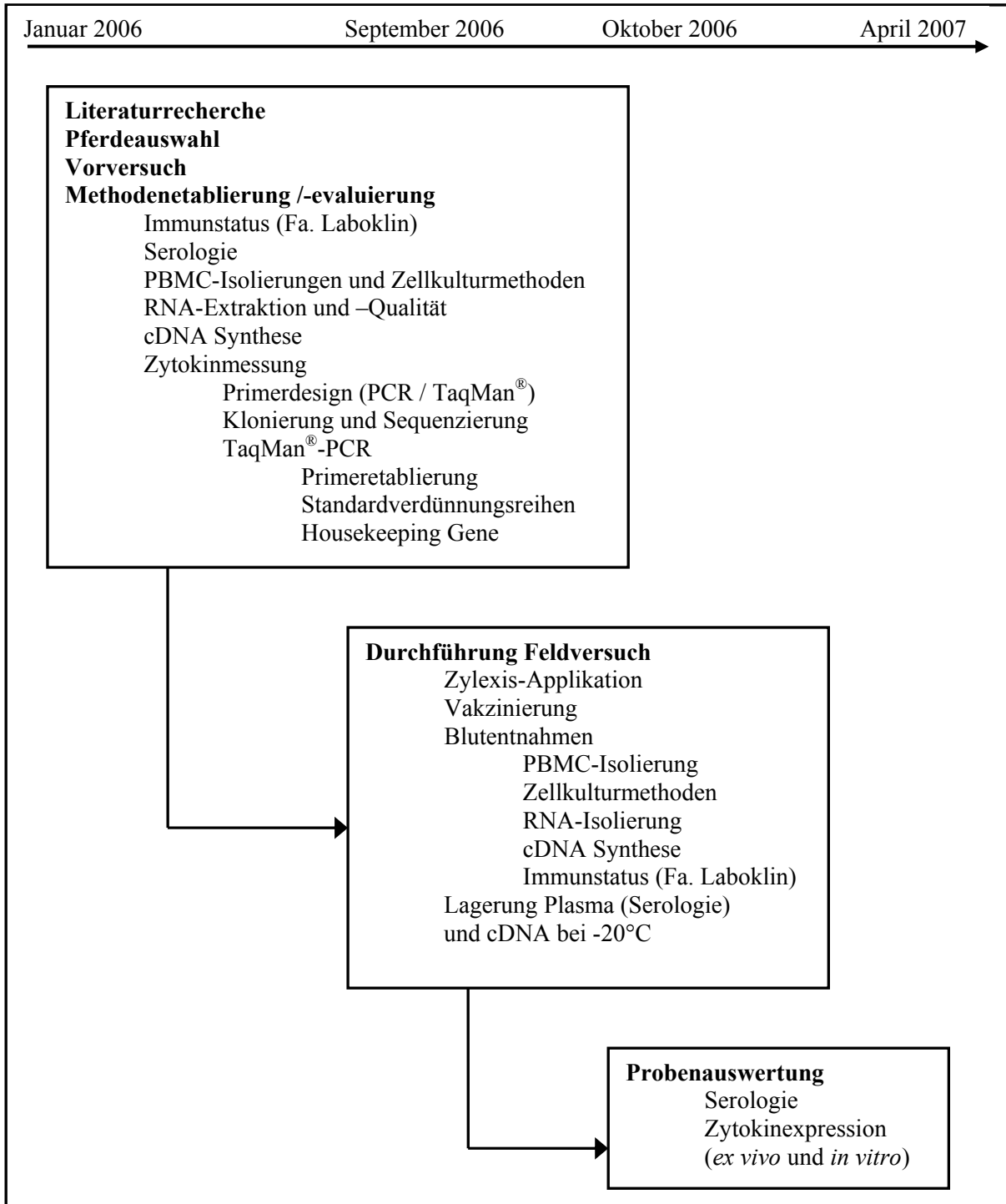


Abbildung 7: Übersicht immunologische und molekularbiologische Methoden

3.2.2 Klinisch-diagnostische Methoden

3.2.2.1 Beobachtungen der Pferde

Aufgrund der Haltungsbedingungen und fehlender Fixierungsmöglichkeiten wurden die Pferde täglich durch den Besitzer nach ihrem Allgemeinbefinden, Futteraufnahme und Körperhaltung kontrolliert. Des Weiteren erfolgte eine Kontrolle der Applikationsstellen.

3.2.2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis externa nach gründlicher Reinigung und Desinfektion der Punktionsstelle mithilfe von EDTA-Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) und entsprechenden sterilen Einmalkanülen (BD Prescisionglike Kanüle 20 G [Becton Dickinson, Heidelberg]).

3.2.2.3 Immunstatus

An zwei Blutentnahmetermenen erfolgte eine Immunstatusbestimmung der Pferde durch das Labor der Fa. LABOKLIN (Bad Kissingen). Hierbei wurden jeweils 4 ml EDTA-Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) direkt am Tag der Blutentnahme an das Labor versandt. Lymphozyten als Träger der spezifischen Immunantwort stellen sich morphologisch einheitlich dar, bestehen jedoch aus funktionell unterschiedlichen Zellen. Der zelluläre Immunstatus gibt Auskunft über die prozentualen Verhältnisse der Immunzellen im Blut. Die Bestimmung des Immunstatus umfasste ein Differentialblutbild und die Ermittlung der Lymphozytensubpopulationen (B-, T-, CD4⁺-, CD8⁺-Zellen) mittels Durchflusszytometrie. Bei der Durchflusszytometrie werden die B-, T-, CD4⁺-, CD8⁺-Zellen durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper quantifiziert. Im Gegensatz zum Differentialblutbild gibt es keine standardisierten Referenzbereiche für die Durchflusszytometrie. Durch die Bestimmung des Immunstatus besteht die Möglichkeit die ausgewählten Immunzellen zu quantifizieren und eine Zu- oder Abnahme der Zellzahl zu bestimmen, um die Aktivität der Immunreaktion wiederzuspiegeln.

3.2.3 Serologische Methoden

Die spezifisch gebildeten Antikörper wurden im Blutplasma mittels Neutralisationstest und indirektem Immunfluoreszenztest erfasst. Der Neutralisationstest weist alle virusneutralisierenden Antikörper nach, während der indirekte Immunfluoreszenztest auch andere Antikörper detektiert.

3.2.3.1 Viren und Zellen

Die hierbei verwendeten Viren wurden vom Institut für Virologie zur Verfügung gestellt und auf equinen Dermalzellen vermehrt. Folgende Referenzstämme wurden für die serologischen Tests verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Viren

Virus	Bezeichnung	Herkunft	Titer des Virusstock	Referenz
EHV-1	A IV	Fohlen, Abort	1×10^7 PFU/ml	Chowdhury et al. 1986
EHV-4	T252	Fohlen, Nasensekret	5×10^5 PFU/ml	Thein und Härtel 1976

Die equinen Dermalzellen stammten aus der Institutssammlung. Infektionen mit EHV-1 und -4 zeigen ein gutes Wachstum in den equinen Dermalzellen, wobei eine Lyse der Zellen nach einem Tag beobachtet werden kann.

3.2.3.2 Neutralisationstest (NT)

CMC-Overlaymedium (Carboxymethylcellulose):

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

EDM (Dulbecco's Modifizierung von Eagle's Medium):

EDM-Pulver	133 g
NaHCO ₃	37 g
Penicillin G	0,2 g

Streptomycinsulfat	0,2 g
Aqua bidest.	ad 10 l
EDM/5% FCS (Fötale Kälberserum)	
4% (v/v) Formalinlösung in PBS	
Formalin (37 %)	10,8 ml
PBS	ad 100 ml
Giemsalösung	

Für die Inaktivierung des Komplementsystems im Blutplasma mussten alle Proben bei 56 °C für 30 Minuten zunächst im Wasserbad inkubiert werden. Anschließend wurde in einer 24-Lochplatte jeweils 100 µl EDM/5% FCS-Medium in jede Kavität vorgelegt. In die erste Kavität wurden zu 160 µl EDM/5% FCS-Medium 40 µl von der Probe dazu pipettiert. Davon wurde eine logarithmische Verdünnung der Probe zur Basis 2 hergestellt, indem jeweils 100 µl aus der ersten in die zweite Kavität, usw., überführt und gemischt wurde. Zusätzlich wurden eine Positiv- und Negativkontrolle mit entsprechenden Pferdeseren aus dem Institut für Virologie sowie eine Virus- und Zellkontrolle mitgeführt. In jede Kavität wurden anschließend 100 µl einer, auf 10^3 PFU/ml eingestellten, Virussuspension hinzu pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ wurden in jede Kavität ca. 5×10^4 equine Dermalzellen pro ml in EDM/5% FCS-Medium dazugegeben, für eine weitere Stunde im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 400 µl CMC-Weichagar pro Kavität überschichtet, um eine extrazelluläre Virusausbreitung zu verhindern. Es folgte eine weitere Inkubation für drei Tage bei 37 °C und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank. Enthielt die Probe keine virusneutralisierenden Antikörper, so konnten sich jetzt die Viren in den Zellen vermehren und die typischen Plaques im Zellrasen verursachen. Nach der dreitägigen Inkubation wurden die 24-Lochplatten mit 4% Formalin/PBS fixiert und mit anschließender Giemsa-Färbung unter dem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg / Modell: CK2) ausgewertet. Die Verdünnungsstufe der Probe wird als Antikörpertiter angegeben, bei der im Vergleich zur Viruskontrolle eine Plaquereduktion um 50% stattfand. Ein Antikörpertiter > 1:10 wurde als auffällig bewertet.

3.2.3.3 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

1% Triton/PBS:

Triton 100	10 ml
PBS	ad 1000 ml

4% Formalin/PBS

PBS/1% FCS

Ziege-Anti-Pferd-IgG (H+L) -Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) -Konjugat

Hierfür mussten zunächst ca. 1×10^4 equine Dermalzellen in den Kavitäten einer 96-Lochplatte mit Flachboden angezüchtet und anschließend mit einer auf 10^3 PFU/ml EDM (0,1 MOI/Loch) eingestellten Virussuspension infiziert werden. Nach einer Inkubation im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für drei Tage wurden die infizierten equinen Dermalzellen mit 4% Formalin/PBS fixiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor der Nutzung musste der Formalin/PBS-Überstand abgegossen und die Zellen wurden anschließend mit 1% Triton/PBS für 30 min. bedeckt, um die Zellmembranen aufzuschließen und somit die Antigene für die Antikörper zugänglich zu machen. Anschließend wurde mit PBS/1% FCS gewaschen. Die Plasmaproben wurden zunächst separat in einer 96-Lochplatte logarithmisch zur Basis 2 verdünnt. Hierfür wurde in jede Kavität 100 µl PBS/1% FCS vorgelegt, wobei in der ersten Kavität 180 µl PBS/1% FCS mit 20 µl Probenplasma versetzt wurde und daraus mit jeweils 100 µl die Verdünnung in den folgenden Kavitäten hergestellt wurde. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurde mit bekannten Pferdeseren aus dem Institut für Virologie mitgeführt. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 40 µl in jede Kavität der vorbereiteten 96-Lochplatte pipettiert und anschließend für eine Stunde im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit haben möglicherweise vorhandene Antikörper an das Antigen binden können. Die ungebundenen Antikörper wurden nach der Inkubation durch dreimaliges Waschen mit PBS/1% FCS entfernt. Durch Zugabe von 40 µl Ziege-Anti-Pferd-Ig G (H+L)-FITC-Konjugat (Verdünnung 1:100 [Dianova, Hamburg]) und einer weiteren Inkubationsstunde im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ konnten gebundene Antikörper von der Probe durch die Bindung der Anti-Spezies-Antikörper detektiert werden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/1% FCS und Zugabe von 50 µl destillierten Wassers (Aqua bidest.) erfolgte die Auswertung der Platten unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100 [Carl Zeiss, Oberkochen]). Der Antikörpertiter wurde in der Verdünnungsstufe angegeben, bei der noch

ein deutlich fluoreszierendes Signal sichtbar war. Ein Antikörpertiter galt als auffällig bei einer Verdünnungsstufe $> 1: 2560$.

3.2.4 Zellkultur-Methoden

3.2.4.1 Isolierung von equinen PBMC aus EDTA-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077 g/ml (Biochrom AG, Berlin)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4 / DEPC behandelt

Na Cl	137 m Molar (8,00 g)
KCl	2,7 m Molar (0,20 g)
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	8,0 m Molar (1,42 g)
KH ₂ PO ₄	1,8 m Molar (0,24 g)
Aqua bidest.	ad 1 l
DEPC (0,1 %)	1 ml

Für die Gewinnung von ausreichend peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt 2 x 30 ml Pferdevollblut in 10 ml EDTA-Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) entnommen. Nach der Blutentnahme wurde das gerinnungsgehemmte Vollblut unmittelbar bis zur Verarbeitung, maximal 24 Stunden nach der Gewinnung, bei 4 °C kühl gelagert.

Da der Abbau der zellulären RNA bereits bei geringen physikalischen Einflüssen eintreten kann, wurden alle Arbeitsschritte möglichst schonend und zügig ausgeführt, um eine quantitative und qualitative RNA-Ausbeute zu gewährleisten.

Die Vollblutproben wurden zur Abtrennung des Blutplasmas für 15 Minuten bei 1900 UpM (Minifuge 2 [Heraeus Christ, Osterode]) und 4 °C zentrifugiert. Der „Buffy Coat“ ist die Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und dem Blutplasma, die entsteht, wenn man Blut mit einem Gerinnungshemmer versetzt und zentrifugiert. Der „Buffy Coat“ besteht hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten, er macht nur etwa ein Prozent der Blutprobe aus. Zunächst wurde das Blutplasma vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und für serologische Untersuchungsmethoden aufbewahrt. Anschließend wurde die „Buffy Coat“-Bande großzügig abpipettiert und in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die „Buffy Coat“s aus dem Vollblut wurden im Verhältnis 4 : 1 mit PBS (DEPC behandelt) verdünnt. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde das „Buffy Coat“/PBS-Gemisch

vorsichtig auf ein 15 ml Biocoll-Kissen (Dichte 1,077 g/ml [Biochrom AG, Berlin]) geschichtet und für 20 Minuten bei 2000 UpM (Minifuge 2 [Heraeus Christ, Osterode]) und 10 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden nach ihren Dichtegradienten getrennt. Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden von den sonstigen Blutzellen abgetrennt und waren als grau-weiße Bande zwischen dem gelblich-durchsichtigen Plasma und der farblosen Biocoll-Schicht sichtbar. Unterhalb der Biocoll-Schicht sammelten sich die Erythrozyten und Granulozyten (Abb. 8).

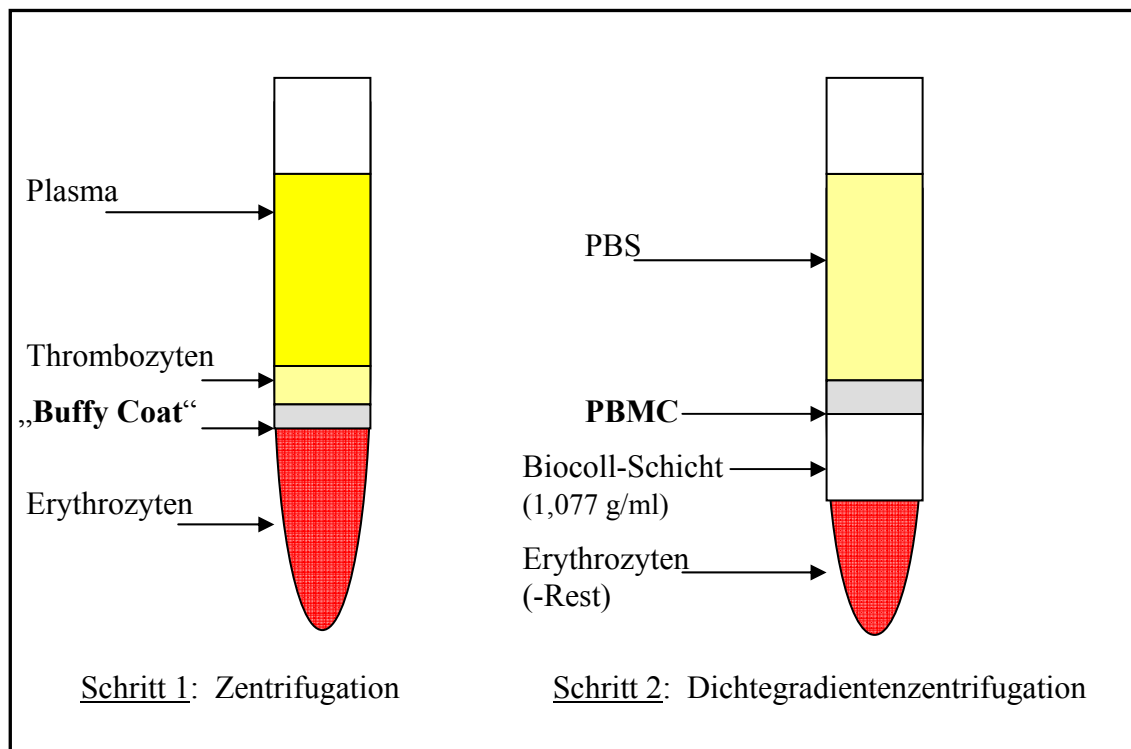


Abbildung 8: Schichtung Gradientenzentrifugation

Die PBMCs wurden großzügig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 10 ml PBS (DEPC) wurden die PBMCs gewaschen und für 10 Minuten bei 1600 UpM (Minifuge 2 [Heraeus Christ, Osterode]) und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml PBS (DEPC behandelt) resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.4.2 Ermittlung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu ermitteln wurde aus den resuspendierten PBMCs eine 1:10 Verdünnung mit PBS angelegt. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Modell: CK 2 [Fa. Olympus, Japan]) in einer Neubauer-Zählkammer. Die Vitalität der Zellen wurde an der glasigen, runden Struktur beurteilt. Es zeigte sich stets eine bis zu 100%ige Vitalität.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 4 Gruppenquadraten, die in 4 x 4 Kleinstquadrate mit je 0,05 mm Kantenlänge und mit je 0,0025 mm² Fläche eingeteilt sind. Für die Ermittlung der Zellzahl wurden je zwei Gruppenquadranten ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation dieses Wertes mit einem Multiplikationsfaktor (Kehrwert des Produktes aus Quadratfläche [1 mm²] und Kammerhöhe [0,1 mm]; konstanter Faktor = 10) und der eingesetzten Verdünnung erhält man die Zellzahl pro Volumeneinheit [ml].

3.2.4.3 *In vitro* Stimulation der equinen PBMCs

RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640):

RPMI 1640 Medium-Pulver für 1 Liter

NaHCO ₃	2 g
Penicillin G	0,02 g
Streptomycinsulfat	0,02 g
Aqua bidest	ad 1 l

pH 7,2

RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung):

NaCl	137 m Molar (8,00 g)
KCl	2,7 m Molar (0,20 g)
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	8,0 m Molar (1,42 g)
KH ₂ PO ₄	1,8 m Molar (0,24 g)
Aqua bidest.	ad 1 l

pH 7,4

Concavalin A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Eine unspezifische Stimulation der PBMCs mit dem Mitogen Concavalin A ermöglicht es, die Zellen zu einer vermehrten Zytokinproduktion anzuregen. Bei dem Mitogen Concavalin A

handelt es sich um ein Lektin der Jack-Bohne (*Canvalia ensiformis*), welches vor allem die Lymphozyten unspezifisch stimuliert. Lektine sind so genannte Phythämagglutinine, die das Wachstum und die Differenzierung bestimmter Zellen fördern können.

Nach der Isolation der PBMC (siehe 3.2.4.1) und Ermittlung der Zellzahl (siehe 3.2.4.2) wurden ca. 2×10^6 Zellen/ml und Kavität in einem Vierfachansatz auf einer 24-Lochplatte eingesetzt. Hierfür wurden die PBMCs in je 1 ml RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin pro Kavität in der Menge eines Vierfachansatzes zunächst in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 3 µg/ml Concavalin A. Die entsprechende Concavalin A Menge ist in einer 1:10 Verdünnung unter sofortigem vorsichtigem Schwenken dazu gegeben worden. Nach der Stimulation wurden die PBMCs zu je 1 ml RPMI-Medium als Vierfachansatz auf die 24-Lochplatte aufgetragen. Zusätzlich wurde eine nicht stimulierte PBMC-/ Mediumkontrolle als Vierfachansatz mitgeführt. Die PBMCs wurden schließlich im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und 24 Stunden nach der Stimulation geerntet. Für die Zellernte wurden alle PBMCs aus dem Vierfachansatz in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt, zentrifugiert bei 1600 UpM (Minifuge 2 [Heraeus-Christ, Osterode]) für 5 Minuten bei 10 °C, mit 10 ml PBS gewaschen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS gelöst, die Zellzahl wie unter Punkt 3.2.4.2 ermittelt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und bis zur Extraktion der RNA bei -70 °C gelagert.

3.2.5 Molekulargenetische Methoden

3.2.5.1 Extraktion der RNA

3.2.5.1.1 Vorbereitung von Materialien und Reagenzien für die Arbeit mit RNA

Die RNA ist sehr empfindlich gegenüber dem Verdau durch RNasen. RNasen sind Enzyme, die von jedem Organismus gebildet werden. Sie sind sehr stabil und benötigen, im Gegensatz zu den DNasen, keine Cofaktoren wie Mg²⁺ um aktiv zu sein. Aus diesem Grund wurden bevorzugt DNase-/RNase-freie, sterile Einmalmaterialien und Reagenzien verwendet. Glaswaren hingegen wurden über Nacht bei 180 °C gebacken (Sambrook et al. 1989). Andere Utensilien, die keine hohen Temperaturen vertragen, wurden mit DEPC-behandeltem Wasser inkubiert. Zur Herstellung von RNase-freiem destilliertem Wasser oder selbst angefertigten Puffern wurden diese mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC [Sidma-Aldrich, Saint-Louis]) versetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des DEPC für

15 Minuten autoklaviert. Das DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine, wodurch die Aktivität der RNasen zerstört wird (Sambrook et al. 1989).

3.2.5.1.2 RNA-Extraktion aus Zellkulturen und PBMC (*in vitro* und *ex vivo*)

Chloroform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

75% Ethanol (ad mit Aqua bidest. DEPC-behandelt)

Isopropanol

Nuklease-freies Wasser (Promega, Mannheim)

Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe)

Für die RNA-Gewinnung aus den isolierten PBMCs (siehe 3.2.3.1) wurden ca. 2×10^7 in 1 ml PBS (DEPC) verdünnte Zellen in RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße für 15 Sekunden bei 10.000 UpM (Centrifuge 5403 [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf]) und 20-25 °C pelletiert. Nach der Beschreibung des Herstellerprotokolls von Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) wurde das Zellpellet nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes in 1 ml Trizol[®] Reagent aufgenommen und lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde in jedes Reaktionsgefäß 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim) dazu gegeben, für 20 Sekunden kräftig von Hand geschüttelt und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 11.000 UpM und 4 °C (Centrifuge 5403 [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf]) ergab folgende Schichtung des Röhrchens:

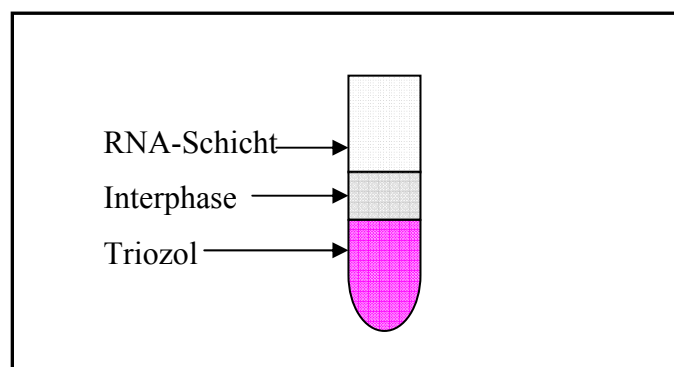


Abbildung 9: Schichtung RNA-Präparation

Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 500 µl Isopropanol wurden die

Reaktionsgefäße leicht geschwenkt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 11.000 UpM und 4 °C (Centrifuge 5403 [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf]) zentrifugiert. Die zelluläre Gesamt-RNA war als Pellet nun in der Regel sichtbar und wurde nach dem Dekantieren des Überstandes durch Zugabe von 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 11.000 UpM (Centrifuge 5403 [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf]) und 4 °C. Der Überstand wurde abgossen und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Die Gesamt-RNA wurde in 40 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert, für 10 Minuten bei 55-60 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend für 5 Minuten auf Eis gehalten und nach der Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA im Spectrophotometer (Schimadzu, Japan) bei -70 °C eingefroren.

3.2.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des UV-VIS Spectrophotometers (Schimadzu, Japan). Hiefür wurde zunächst aus der RNA-Probe eine 1:100 Verdünnung für die Vermessung angelegt. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als zusätzliche Qualitätskontrolle wurde parallel die Absorption bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm erhält man außerdem eine Aussage über die Reinheit der Präparation. Ist der Koeffizient kleiner als 1,8 bis 2 ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA oder aromatischen Substanzen kontaminiert.

Die Angabe der RNA-Konzentration erfolgte in µg RNA/ml und wurde berechnet durch Multiplikation mit dem Korrektur-Faktor 4000, unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung.

3.2.5.1.4 RNA-Qualitätskontrolle mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer (10 x konzentriert):

MOPS	0,2 Mol (21 g)
250 mM EDTA-Stocklösung	10 m Molar (20 ml)
Na-Acetat	0,1 Mol (3,4 g)
Aqua bidest. (DEPC behandelt)	ad 500 ml

pH 7 (mit Eisessig einstellen)

Probenpuffer I (Denaturierungspuffer):

10 x Laufpuffer	50 µl
Formaldehyd (37%)	50 µl
Formamid (deionisiert)	ad 250 µl

Probenpuffer II:

10 x Laufpuffer	4 ml
100% Glycerol	10 ml
Aqua dest. (DEPC behandelt)	ad 20 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze

Ethidiumbromid in Aqua bidest. (DEPC behandelt)

Formaldehyd (37%)

Aqua bidest. (DEPC behandelt)

Die RNA-Agarosegelelektrophorese wurde in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Owl Separation Systems, Portsmouth) durchgeführt. Die Elektrophoresekammer und alle dazugehörigen Utensilien wurden zunächst über Nacht mit DEPC behandeltem destilliertem Wasser inkubiert. Für die Herstellung des Agarosegels wurden 0,75 g Agarose mit 7,5 ml 10 x Laufpuffer und 49 ml destilliertem Wasser (DEPC behandelt) versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 70 °C erfolgte die Zugabe von 13,2 ml Formaldehyd (37%) unter einem Abzug. Es folgte das Auftragen des Gels in die horizontale Elektrophoresekammer. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde die Kammer mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt.

Maximal 9 µl der Gesamt-RNA wurden mit 9 µl Probenpuffer I und 2 µl Ethidiumbromid in Wasser versetzt. Dieses Reaktionsgemisch wurde für die Denaturierung der RNA für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 2 µl Probenpuffer II erfolgte das sofortige Auftragen der Probe auf das Gel. Zusätzlich wurde ein RNA-Leiter (RiboRuler™ RNA Ladder [Fermentas, St. Leon-Rot]) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde für 3 Stunden mit einer Spannung von 100 Volt durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem UV-Transluminator (Biometra, Göttingen). Das Vorhandensein von RNA wurde durch das charakteristische Bild der ribosomalen 18 S und 28 S RNA-Banden bestätigt. Die Qualitätsbestimmung erfolgte anhand der Intensität und Schärfe dieser Banden.

3.2.5.2 Reverse Transkription (RT)

SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe)

Die extrahierte Gesamt-RNA aus dem Pferdeblut bzw. aus den equinen PBMCs musste zunächst für die Verwendung in der quantitativen „Real-Time“-PCR in cDNA umgeschrieben werden. Für die reverse Transkription wurde das Reagenziensystem SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die mRNA ist charakterisiert durch das Vorhandensein von Poly-A⁺-Schwänzen und macht einen Anteil von ca. 1% an der Gesamt-RNA aus (Horohov et al. 1994). Um möglichst die mRNA aus der Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben, wurden Oligo(dT)-Primer, die selektiv an diese Poly-A⁺-Schwänze binden und in 5'-Richtung die cDNA synthetisieren, aus dem Reagenziensystem verwendet. Die in dem Reagenziensystem enthaltene SuperScript™ II Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem Moloney murine leukemia virus (M-MLV-RT) und besitzt eine reduzierte RNase H-Aktivität.

Folgender Reaktionsansatz (Tab. 6 und 7) wurde nach Herstellerangaben verwendet:

Tabelle 6: RNA-/Primer-Mix

Komponente	Volumen in µl
Gesamt-RNA (< 5 µg/ml)	<i>n</i> µl
10 m Molar dNTP mix	1 µl
Oligo(dT) (0,5 µg/µl)	1 µl
DEPC-Wasser	ad 10 µl

Tabelle 7: Reaktions-Mix

Komponente	Volumen pro Probe in µl
10 x RT Puffer	2 µl
25 m Molar MgCl ₂	4 µl
0,1 Mol DTT	2 µl
RNaseOUT	1 µl

Nach Zugabe der Gesamt-RNA mit äquivalenten Ausgangskonzentrationen (0,5 µg bzw. 1 µg Gesamt-RNA) in den RNA-/Primer-Mix erfolgte nach einer fünfminütigen Inkubation bei 65 °C und Abkühlung auf Eis die Zugabe von 9 µl aus dem Reaktions-Mix zu jeder Probe. Für die Annealing-Reaktion wurden die Proben bei 42 °C für zwei Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase zu jeder Probe. Die cDNA-Synthese wurde bei 42 °C für 50 Minuten durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation bei 70 °C. Anschließend wurden Reste der RNA entfernt, indem 1 µl RNase H dazu pipettiert und die Proben für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden.

Im Rahmen der Etablierung dieser Methode wurde der Erfolg der Reaktion überprüft, indem die cDNA und die extrahierte RNA derselben Probe in die PCR eingesetzt und verglichen wurden. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.5.3 Primerdesign zur Etablierung einer PCR und TaqMan®-PCR

Primer sind synthetisch hergestellte, einzelsträngige Oligonukleotide, die komplementär zu einer Zielgensequenz sind und für die Amplifizierung den Start- und Endpunkt vorgeben.

Mit Hilfe der Datenbank des „National Center für Biotechnology Information“ (NCBI, 1998 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) wurden für die Herstellung geeigneter Primer folgende veröffentlichte Gensequenzen von *Equus caballus* (Hauspferd) verwendet:

Tabelle 8: Accession-Nummern

Zytokin	Acc.-Nr.:	Referenz
IFN-γ	U04050	Grüning et. al (1994)
IL-2	L06009	Vandergriff und Horohov (1993)
IL-4	AF305617	Mauel und Steinbach (2000)
IL-10	U38200.1	Swiderski et. al (1999)
β -Aktin	AF035774	Swiderski et. al (1999)
GAPDH	AF157626	Boerboom et. al (2000)

Die Auswahl geeigneter Primersequenzen für die Zytokin-mRNA bzw. Zytokin-cDNA erfolgte mit dem Computerprogramm PrimerExpress® Software (Applied Biosystems, Darmstadt). Für die Herstellung entsprechender Klonierungsfragmente wurden die Primer so

konstruiert, dass sie zunächst ein größeres Fragment von ca. 300 bp amplifizierten. Die Primersequenzen für die TaqMan[®]-PCR lagen innerhalb dieser Fragmente. Bei der Auswahl von Primern für die Zytokin-mRNA wurden drei wesentliche Punkte berücksichtigt: Lage von Exon- und Intron-Grenzen auf der Zielsequenz, verschiedene Gensequenzen des gleichen Zytokins und Sequenzhomologien mit anderen Genen. Um eine mRNA-spezifische Amplifikation zu erreichen, sollte die Bindungsstelle der Primer möglichst an der Grenze zwischen Exon und Intron liegen. Somit wird verhindert, dass es zu einer unspezifischen Amplifikation von unerwünschten DNA-Sequenzen kommt. Des Weiteren ist zu beachten, dass es unter Umständen verschiedene Gensequenzen für das gleiche Zytokin gibt. Daher ist es wichtig, die Primer auf eine entsprechend homologe Sequenz zu generieren. Die Primersequenzen wurden über ein so genanntes „Alignment“ auf eine mögliche Sequenzhomologie mit anderen bekannten Gensequenzen überprüft, um auszuschließen, dass möglicherweise eine falsche Sequenz amplifiziert wird. Hierbei galt es insbesondere die teilweise vorhandene Sequenzhomologie zwischen dem equinen Interleukin-10 und dem EHV-2-IL-10 zu beachten.

Unter Berücksichtigung dieser wesentlichen Kriterien für das Primerdesign wurden darüber hinaus noch folgende Grundlagen bedacht: Die Länge der Primer sollte 20-30 Basen betragen. Mit der Länge des Primers wächst die Schmelztemperatur linear. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der sich die Primer von der Template-DNA lösen, d.h. unterhalb dieser Temperatur hybridisieren sie mit der Template-DNA durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen. Die Schmelztemperatur hängt allerdings auch von der Nukleotidzusammensetzung ab. Sie ist umso höher, je größer die Anzahl an Guanin (G) und Cytosin (C) ist, da G-C-Basenpaarungen durch drei Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Um ausreichend hohe Annealing-Temperaturen zu gewährleisten, sollte die Schmelztemperatur zwischen 55 und 60 °C liegen und für die Primerpaare ähnlich hoch sein. Der GC-Gehalt innerhalb eines Primers sollte höher sein als der Adenin (A)-, Thymin (T)-Gehalt, um eine festere Bindung an die Template-DNA durch Ausbildung von Dreifachwasserstoffbrückenbindungen zwischen G und C, anstelle von einer zweifachen zwischen A und T, zu gewährleisten. Das Primerpaar sollte keine komplementären Basensequenzen, vor allem an dem jeweiligen 3'-Ende zueinander aufweisen, um die Amplifikation von Primerdimeren zu vermeiden. Ebenfalls sind Bereiche zu vermeiden, die eine interne Sekundärstruktur, eine so genannte Haarnadelstruktur, zulassen.

Nicht nur das Primerdesign, sondern auch die Primereigenschaften, wie Haarnadelstrukturen, wurden mit dem Computerprogramm PrimerExpress (Applied Biosystems, Darmstadt) überprüft.

Für die Etablierung der PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 20 μ Molar eingesetzt und unter den nach 3.2.4.4 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die ausgewählten zytokinspezifischen Primerpaare wurden mit cDNA und genomischer DNA getestet. Die Primerpaare erwiesen sich als spezifisch, wenn sich bei der cDNA eine Bande in der zu erwartenden Fragmentgröße auf dem Agarosegel darstellte, während die genomische DNA nicht amplifiziert wurde und somit keine Bande auf dem Agarosegel sichtbar war.

Die Primer für die TaqMan[®]-PCR wurden in einer Konzentration von 10 μ Molar verwendet.

3.2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) kam im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz, um eine exponentielle Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen herzustellen, die zu einer Überprüfung der cDNA-Qualität (β -Aktin-PCR) diente und zum anderen zur Synthese von definierten DNA-Fragmenten für die Klonierung genutzt wurde.

Für die Synthese des komplementären DNA-Stranges wurde die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (5 units/ μ l [Quiagen, Hilden]) verwendet. Nach der Denaturierung bei 94 °C folgte das Anneling bei den primerspezifischen Temperaturen (siehe Tab. 10). Die Elongation fand im Temperaturoptimum der Taq-Polymerase bei 72 °C statt. Hierbei synthetisierte das DNA-abhängige Enzym von 5' in 3'-Richtung an der einzelsträngigen Template-DNA. Als weitere Substrate wurden Desoxyribonukleinsäure-Triphosphate (dNTPs, 2,5 m Molar [Bioline GmbH, Luckenwalde]) und 10 x PCR-Reaktionspuffer mit 15 m Molar MgCl₂ (Quiagen, Hilden) sowie Nuklease-freies Wasser (Promega, Mannheim) benötigt.

Mit jedem PCR-Ansatz wurden eine Negativ- (Substanz- und Präparationskontrolle) und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente das PCR-Produkt, das eine positive Amplifikation in der zu erwartenden Fragmentgröße mit den jeweiligen Primern aufwies. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Positivkontrolle kloniert und per Sequenzierung die korrekte Zytokin-mRNA Sequenz überprüft und bestätigt.

Nach Beendigung des PCR-Laufes erfolgte eine analytische Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.5.5). Hierbei wurde jedes Mal ein DNA-Leiter (Hyperladder I, 100 bp [Bioline, Luckenwalde]) mit aufgetragen, um Fragmentgröße und -konzentration abzuschätzen.

3.2.5.4.1 β -Aktin-PCR zur Überprüfung der cDNA-Qualität

Zur Präparationskontrolle der unter 3.2.5.1.2 beschriebenen RNA-Extraktion und der daraus resultierenden cDNA-Synthese (siehe 3.2.5.2) kann der Nachweis von β -Aktin dienen. Das β -Aktin-Gen ist in allen eukaryotischen Zellen enthalten und wird als hoch konserviertes Zellstrukturprotein von allen Zellen gebildet (Shankar et al. 1992). Es wird auch als Housekeeping Gen bezeichnet, da die Expression des Zellstrukturproteins nicht reguliert wird und somit konstant ist. Demzufolge ist ein positiver Nachweis von β -Aktin ein Indikator für die Qualität und Quantität der durchgeführten RNA- bzw. cDNA- Präparationen. Zur Kontrolle, ob erfolgreich RNA bzw. cDNA präpariert werden konnte, wurde stichprobenartig die β -Aktin-PCR durchgeführt. Das Gesamtvolumen des PCR-Reaktionsansatzes von 50 μ l wurde durch Substitution einer entsprechenden Menge Nuklease-freien Wassers erreicht.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 μ l	10 x Reaktionspuffer
5 μ l	dNTPs
1,5 μ l	Primer A
1,5 μ l	Primer B
0,3 μ l	Taq-Polymerase
2 μ l	cDNA

Die β -Aktin-PCR wurde mit 44 Amplifikationszyklen in einem Wasserbadcycler (Thermocycler 60 [Bio-med, Theres]) durchgeführt.

Die spezifischen Oligonukleotidprimer (Tab. 9) für die β -Aktin-PCR wurden bereits im Institut für Virologie erfolgreich etabliert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9: β -Aktin-Primersequenzen

Primer	Sequenz	Fragmentgröße
A	5` - GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC -3`	248 bp
B	5` - GCGCTCGTCGTCGACAACGG -3`	

Die Bedingungen für die PCR sind im Folgenden aufgelistet:

Initiale Denaturierung:	4 Minuten bei 94 °C
Denaturierung:	2 Minuten bei 94 °C
Annealing:	2 Minuten bei 56 °C
Elongation:	2 Minuten bei 72 °C
Finale Elongation:	10 Minuten bei 72 °C
Anzahl der Zyklen:	44

Der Nachweis von β -Aktin gelang in allen Stichproben.

In der Abbildung 10 sind exemplarisch die Amplifikate der β -Aktin-PCR abgebildet.

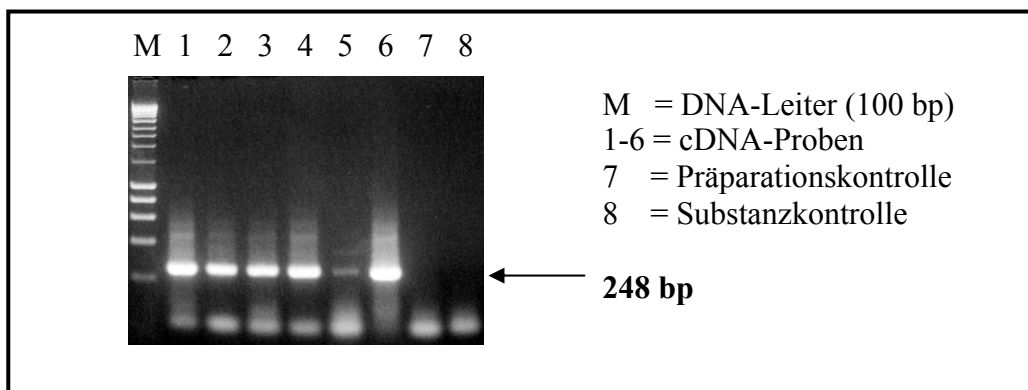


Abbildung 10: Amplifikate der β -Aktin-PCR

3.2.5.4.2 Synthese definierter cDNA-Sequenzen für die Klonierung

Mit Hilfe dieser PCR wurden Teilstücke der equinen Zytokin-DNA-Sequenzen amplifiziert und anschließend kloniert. Der Reaktionsansatz enthielt jeweils ca. 100 ng cDNA. Die entsprechenden Primerpaare sind so konstruiert, dass für die Klonierung ein größeres Fragment hergestellt wurde. Innerhalb dieses Fragmentes wurde dann mittels TaqMan[®]-PCR ein etwas kleinerer Bereich mit entsprechenden Primerpaaren nachgewiesen. Die Reaktionsansätze bestanden aus 20 μ Molar eines jeden Primers und wurden nach folgendem Schema pipettiert:

5 μ l	10 x Reaktionspuffer
5 μ l	dNTPs
1 μ l	Primer F

1 μ l	Primer R
0,3 μ l	Taq-Polymerase
2 μ l	cDNA

Die Primersequenzen wurden bereits unter dem Punkt 3.1.2 aufgeführt. Aus der Tabelle 10 können die entsprechenden Reaktionsbedingungen für die PCR in dem Heizblockcycler (UNO-Thermoblock™ [Biometra, Göttingen]) entnommen werden. Die PCR-Bedingungen bestanden aus einer initialen Denaturierung für 4 Minuten bei 94 °C. Es folgten 35 Amplifikationszyklen mit einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C, einem Annealing für 30 Sekunden bei primerspezifischen Temperaturen und einer Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C. Nach Beendigung der Zyklen schloss sich eine finale Elongation für 10 Minuten bei 72 °C an.

Tabelle 10: PCR-Reaktionsbedingungen für die Klonierungsamplifikate

Primer	Zytokin	Annealing-Temperatur	Zyklusanzahl	Fragmentgröße
EqIFNg-228F / EqIFNg-566R	Equines Interferon- γ	54 °C	35	293 bp
EqIL-2-25F / EqIL-2-362R	Equines Interleukin 2	59 °C	35	338 bp
EqIL-4-15F / EqIL-4-332R	Equines Interleukin 4	57 °C	35	318 bp
EqIL-10-217F / EqIL-10-519R	Equines Interleukin 10	56 °C	35	324 bp

Für die Herstellung der Amplifikate der Housekeeping Gene β -Aktin und GAPDH wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet:

Aktivierung der Polymerase:	2 Minuten bei 50 °C
Initiale Denaturierung:	10 Minuten bei 95 °C
Denaturierung:	15 Sekunden bei 95 °C
Annealing / Elongation:	1 Minute bei 60 °C
Anzahl der Zyklen:	40

Die verwendeten Primer sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Primersequenzen wurden bereits unter dem Punkt 3.1.2 aufgeführt.

Tabelle 11: Primer Housekeeping Gene

Primer	Zytokin	Fragmentgröße
Eq-betaAktin-F / Eq-betaAktin-R	Equines β -Aktin	94 bp
Eq-GAPDH-F / Eq-GAPDH-R	Equines GAPDH	128 bp

3.2.5.5 Analytische Agarosegelelektrophorese der DNA-Fragmente

TAE-Puffer (10x)

Tris	0,4 Mol (48,5 g)
Na-Acetat	0,06 Mol (4,13 g)
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat, pH 7,9	0,01 Mol (3,7 g)
Aqua bidest.	ad 1 l

Probenpuffer

0,25% Bromphenolblau (w/v)	250 mg
15% Biocoll (Dichte 1,077) (w/v)	15 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

TAE-Laufpuffer (1x)

10 x TAE-Puffer	200 ml
Ethidiumbromidlösung	80 μ l
Aqua bidest.	ad 2 l

Mit der horizontalen Agarosegelelektrophorese kann man einerseits die Größe von DNA-Fragmenten und andererseits die Konzentration von DNA bestimmen. Die DNA-Fragmente wandern unter Anlegen einer elektrischen Spannung, abhängig ihres Ladungszustandes und ihrer Größe, unterschiedlich weit von einem negativ geladenen Pol zu einem positiv geladenen Pol. Je nach Größe des zu erwartenden DNA-Fragments wurden

Standard-Agarosegele (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einer Konzentration von 0,7% bis 1,5% in 1 x TAE-Laufpuffer, versetzt mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,4 µg/ml), verwendet. Die Agarose wurde in einer Mikrowelle durch kurzes Aufkochen verflüssigt, anschließend leicht abgekühlt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem vollständigen Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x TAE-Laufpuffer aufgefüllt. Aus dem PCR-Ansatz wurden 15 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Probenpuffer versetzt und in die Gelslots aufgetragen. Zusätzlich wurde ein DNA-Längenstandard (Hyperladder I, 100 bp [Bioline, Luckenwalde]) zur Ermittlung der Fragmentgröße und -konzentration mitgeführt. Die Elektrophorese wurde ca. 1 Stunde mit einer Spannung von 100 V (Power Supply [Pharmacia, Freiburg]) durchgeführt, das Agarosegel anschließend auf einem UV-Transluminator (Biometra, Göttingen) ausgewertet und das Ergebnis mit einer Polaroid-Sofortbildkamera (Polaroid Film 667) dokumentiert.

3.2.5.6 Klonierung und Sequenzierung

3.2.5.6.1 Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung

1 x TAE-Laufpuffer

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

Probenpuffer

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim)

Die PCR-Amplifikate wurden wie unter dem Punkt 3.2.5.4.2 hergestellt und mittels der präparativen Agarosegelelektrophorese aus dem Agarosegel isoliert. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte, wie unter dem Punkt 3.2.5.5 beschrieben, unter Verwendung von 0,9%iger Standard-Agarose (Carl Roth, Karlsruhe), bei 100 V für 30 bis 45 Minuten. Der gesamte 50 µl Reaktionsansatz (3.2.5.4.2) des PCR-Produktes wurde mit 5 µl Probenpuffer versetzt und in entsprechend große Slots in dem Gel aufgetragen. Die Präparation des PCR-Produktes erfolgte auf dem UV-Transluminator (FLX-20M [Biometra, Göttingen]) mit 70%iger Leistung. Die PCR-Amplifikate wurden mittels steriler Einmalskalpelle (Ratiomed, Megro GmbH, Wesel) aus dem Gel herausgeschnitten und in DNase-/RNasefreie Reaktionsgefäße (Carl Roth, Karlsruhe) überführt.

Anschließend wurden die PCR-Amplifikate aus dem Gel mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) aufgereinigt und isoliert. Die Isolierung fand

entsprechend der Herstellerangaben statt. Durch Zugabe einer speziellen „Membran Binding Solution“ (salzhaltiger Puffer) konnten die Nukleinsäuren durch Entzug ihrer Hydrathüllen an eine spezielle Membran gebunden werden. Nach zweimaligem Waschen mit einer „Membran Wash Solution“ wurde das Salz der „Membran Binding Solution“ entfernt und anschließend wurde die DNA in Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Der Erfolg der DNA-Isolierung wurde mittels einer Kontroll-Agarosegelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden mindestens 50 ng DNA eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers werden bei DNA-Größen von ca. 100 bp bis 500 bp ca. 84% bis 89% der DNA aufgereinigt. Unter Berücksichtigung der DNA-Verluste wurden 15 µl aus der Gelaufreinigung mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Bedingungen für die Gelelektrophorese entsprachen den oben genannten. Durch Abschätzung der Leuchtstärke der gewünschten Bande erfolgte die Berechnung der DNA-Konzentration für den Ligationsansatz.

3.2.5.6.2 Ligation

pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Mannheim)

Bei der Ligation wird das zuvor extrahierte PCR-Fragment (Insert) in einen Plasmid-Vektor eingeschleust.

Die isolierte DNA (3.2.5.6.1) wurde in das pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers in die Ligation eingesetzt. Das optimale Insert-Vektor-Verhältnis liegt bei 3 : 1. Die Berechnung der einzusetzenden Insertmenge erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Insertmenge [ng]} = \frac{50 \text{ ng Vektor} \times \text{Fragmentgröße [bp]} \text{ des gewünschten Inserts}}{3,0 \text{ kb Vektor} \times 3}$$

Für jede isolierte DNA wurden zwei verschiedene Insertkonzentrationen in die Ligation eingesetzt. Zusätzlich wurden eine Positiv-Kontrolle mit einem Kontroll-Insert (542 bp) des Herstellers und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

Tabelle 12: Pipettierschema Ligationsansatz

Komponenten	Probe Konz. 1	Probe Konz. 2	Positiv- Kontrolle	Negativ- Kontrolle
2 x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Deionisiertes Wasser ad 10 µl	2 µl	--	1 µl	3 µl
Kontroll Insert DNA (4 ng / µl)	--	--	2 µl	--
PCR-Produkt (Probe)	1 µl	3 µl	--	--
pGEM-T Easy Vektor (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units / µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

3.2.5.6.3 Transformation

Epicurian Coli[®] SoloPack[®] Gold Supercompetent Cells (Stratagene, Amsterdam)

Ampicillin 20 mg/ml Stammlösung, sterilfiltriert

LB-Agarplatten

LB Broth, Miller (Luria-Bertani) 200 ml

Agar Noble 3 g

NZY-Medium, pH 7,5

NZ amine 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 5 g

Aqua bidest. ad 1 l

Zur Vorbereitung der Bakterienkulturschalen wurde zunächst das LB Broth, Miller Medium (Difco, Michigan) nach Herstellerangaben zubereitet und sofort autoklaviert. Durch Zugabe von 3 g Agar Noble in 200 ml LB Broth Lösung wurde ein 1,5%iges Agar hergestellt. Zum Gießen der Bakterienkulturschalen erfolgte ein Aufkochen von 200 ml LB-Agar, Abkühlen auf 50 °C und Zugabe von 1 ml Ampicillin-Stammlösung (20 mg/ml). In jede 10-cm-

Bakterienkulturschale wurden ca. 15 ml LB-Agar gegossen, nach dem Erstarren mit Parafilm verschlossen und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Bei der Transformation wird der Vektor mit gewünschtem Insert in Bakterienzellen eingeschleust. Hierfür wurden die Epicurian Coli[®] SoloPack[®] Gold Supercompetent Cells (Genotyp: Tet^rΔ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F'*proAB lac^qZΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r*]) verwendet. Zur Vorbereitung für die Transformation wurden zunächst die superkompetenten Zellen nach Angaben des Herstellers mit XL 10-Gold β-Mercaptoethanol versetzt, auf Eis inkubiert und jeweils in 15 ml sterilen Zentrifugenröhrchen zu je 25 µl portioniert. Von jedem Ligationsansatz wurden 5 µl (1-4 ng DNA) in die 15 ml Zentrifugenröhrchen zu den superkompetenten Zellen pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock der Bakterien für genau 60 Sekunden in einem 54 °C warmen Wasserbad. Nach zweiminütiger Abkühlung auf Eis wurden 150 µl NZY-Medium, das auf 42 °C vorgewärmt wurde, hinzu gegeben. Die Transformationsansätze wurden dann im Schüttelinkubator (Certomat[®] H/U [Braun Biotech International, Melsungen]) bei 150 UpM für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation im Schüttelinkubator wurden die transformierten Bakterien zu 50 µl und zu 100 µl auf die LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die LB-Agarplatten wurden zuvor mit 35 µl x-Gal und 15 µl IPTG versetzt, um eine Blau/Weiß Selektion der Bakterien zu ermöglichen.

3.2.5.6.4 Blau/Weiß Selektion

X-gal (4-Chlor-5-Brom-3-Indol-β-D-Galaktosid) 5% (w/v) in Dimethylformamid

IPTG (Isopropyl- β-D-Thiogalaktosid) 20% (w/v) in Aqua bidest.

Die Blau/Weiß Selektion beruht auf einer Hemmung des Enzyms β-Galactosidase, wodurch sich die Bakterienkulturen, die das Insert enthalten, weiß färben.

Dafür wurden ampicillinhaltige LB-Agarplatten (100 µg/ml) verwendet, die mit 35 µl X-Gal (5%) und 15 µl IPTG (20%) vor dem Ausplattieren versetzt wurden. IPTG induziert die Herstellung von β-Galactosidase. Dieses Enzym setzt X-Gal um, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Befindet sich das Insert in den transformierten Bakterien, unterbindet es die Herstellung der β-Galactosidase durch Inaktivierung des α-Peptids der β-Galactosidase

codierenden Region des lacZ'Gens. Dementsprechend färbten sich die Bakterienkolonien bei Vorhandensein eines Inserts weiß und bei fehlendem Insert blau (Abb. 11).

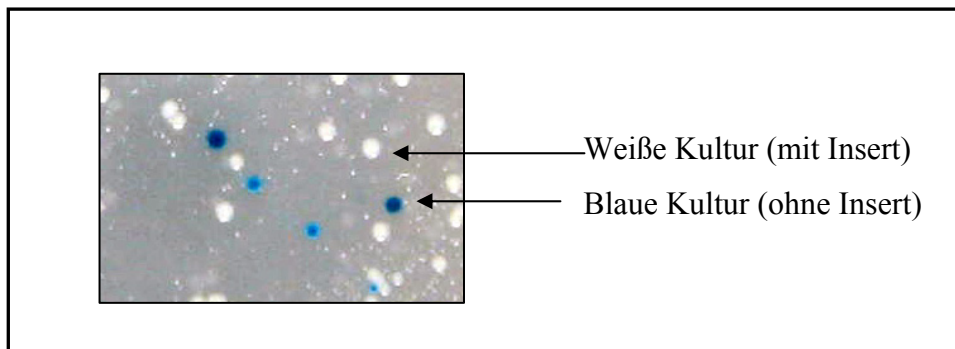


Abbildung 11: Bakterienkulturen, Blau/Weiß Selektion

Nach der Inkubation wurden die Bakterienkolonien ausgezählt und für jedes Insert die Transformationseffizienz, die Ligationseffizienz und die Religierungseffizienz bestimmt.

3.2.5.6.5 Plasmid-DNA-Präparation

LB-Medium

LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	25 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Ampicillin 20 mg/ml Stammlösung, sterilfiltriert
mi-Plasmid Miniprep Kit (Metabion, Martinsried)

Im Durchschnitt wurden 5 bis 6 weiße Bakterienkolonien pro Platte ausgewählt, als Einzelkolonie gepickt und in 5 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 150 UpM inkubiert (Certomat[®] H/U [Braun Biotech International, Melsungen]).

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem mi-Plasmid Miniprep Kit (Metabion, Martiensried) nach Angaben des Herstellers. Aus den Bakterienflüssigkulturen wurden 1,5 bis 2 ml in ein DNase-/RNase-freies Reaktionsgefäß (Carl Roth, Karlsruhe) überführt und für eine Minute bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf]). Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit der „Cell Resuspensions Solution“ resuspendiert. Durch Zugabe von „Cell Lysis Buffer“

wurde die Membran der Bakterienzellen zerstört und die Plasmid-DNA freigesetzt. Der „Binding Puffer“ bindet die freigesetzte Plasmid-DNA. Durch Zentrifugieren bei 13.000 U/min für 10 Minuten und Raumtemperatur (Eppendorf Centrifuge [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf]) setzten sich die Zellreste als Pellet unten ab. Die im flüssigen Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde über eine spezielle Membran gebunden, gewaschen und in 50 μ l Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Plasmid-Präparation und zur Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurden die Proben auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.5.5). Hierfür wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers können 30.000 ng Plasmid-DNA präpariert werden. Demzufolge wurde ein Volumen von 5 μ l Plasmid-DNA mit 10 μ l Aqua bidest. und 2 μ l Probenpuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Das Vorhandensein der zu erwartenden DNA-Banden wurde nach 30 bis 45 Minuten bei 100 V auf dem UV-Transluminator (FLX-20M [Biometra, Göttingen]) überprüft. In der Regel konnten drei Banden (Abb. 12) bei der Plasmid-DNA festgestellt werden, die aus den unterschiedlichen Zustandsformen der Plasmid-DNA resultierten. Dabei handelte es sich bei den größeren Fragmenten um die „super coiled“ Form, bei dem mittleren Fragment um die ringförmige Form und bei dem kleinsten Fragment um die linearisierte Form.

Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA rechnerisch bestimmt und lag durchschnittlich bei 20 ng/ μ l.

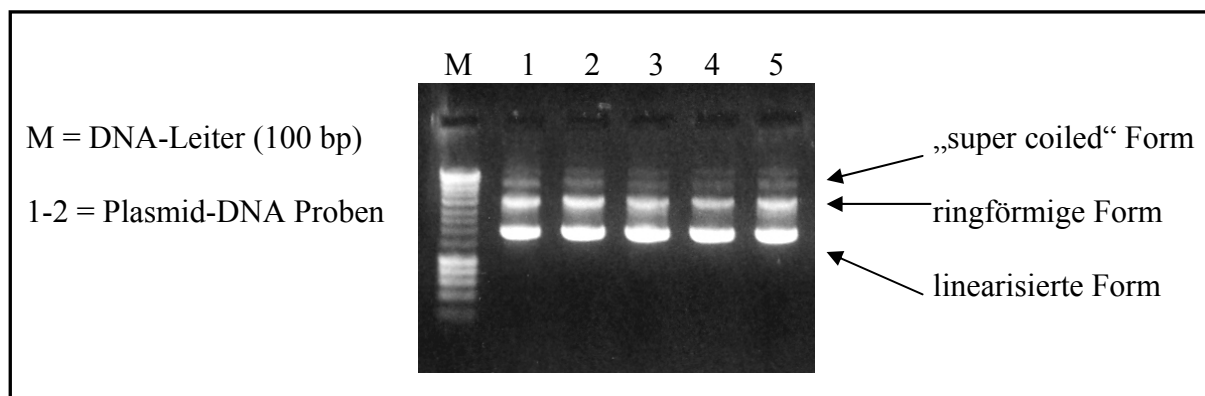


Abbildung 12: Zustandsformen der Plasmid-DNA

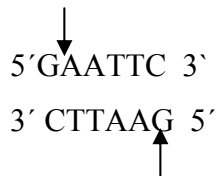
3.2.5.6.6 Restriktionsenzymanalyse

Eco RI Enzym (20.000 U/ml [New England Biolabs, Frankfurt am Main])

NE Buffer *Eco* RI, 10 x (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

Probenpuffer

Sequenz von *Eco* RI:



Die Restriktionsenzymanalyse gibt Hinweis darauf, dass das Fragmentstück erfolgreich in das Plasmid inkloniert wurde. Bestimmte Restriktionsenzyme schneiden das klonierte Fragment wieder aus dem Plasmid heraus. Der Vektor besitzt so genannte T-Überhänge, die die Bindungsstelle für die A-Überhänge des PCR-Produktes sind. Daher ist es wichtig eine geeignete Taq-Polymerase auszuwählen, die diese A-Überhänge im PCR-Fragment bildet. Die Schnittstelle des Enzyms muss also auf der Höhe der T-Überhänge liegen.

Des Weiteren muss bei der Auswahl des geeigneten Enzyms darauf geachtet werden, dass das eingeschleuste Fragment möglichst nicht von diesem Enzym geschnitten wird.

Für den Restriktionsenzymverdau wurde die Plasmid-DNA in einer durchschnittlichen Konzentration von 20 ng/μl eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und durch anschließende Zugabe von Probenpuffer wurde die Reaktion beendet. Die Ermittlung der geschnittenen Fragmentgrößen erfolgte über eine Agarosegelelektrophorese, die, wie unter 3.2.5.5 beschrieben, mit einem 0,7%igen Agarosegel durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Gensequenz der inklonierten Fragmentstücke in der Plasmid-DNA mittels Sequenzierung überprüft (siehe 3.2.5.6.8). Die zu erwartenden Fragmentgrößen sind in der Tabelle 13 aufgelistet.

Der Reaktionsansatz für den Restriktionsenzymverdau setzte sich wie folgt zusammen:

REA-Ansatz von 50 μl:

2 μl	NE Buffer <i>Eco</i> RI
1 μl	<i>Eco</i> RI Enzym
5 μl	Plasmid-DNA
Ad 50 μl	Aqua bidest. (42 μl)

Tabelle 13: Erwartete Fragmentgrößen

DNA-Sequenz	Fragmentgröße
pGEM-T Easy Vektor	3 kb
Kontroll-Insert	542 bp
IFN- γ	293 bp
Il-2	338 bp
Il-4	318 bp → 2 Fragmente: 141 bp und 177 bp
Il-10	324 bp

3.2.5.6.7 Glyceroldauerkulturen

NUNC Cryo Tube™ Vials (Nunc, Wiesbaden)

Glycerin (> 98%, Ph. Eur., wasserfrei [Carl Roth, Karlsruhe])

Die erfolgreich transformierten Bakterien aus den Flüssigkulturen wurden zur dauerhaften Lagerung in Glycerol konserviert und bei -70 °C gelagert.

Dafür musste 300 μ l Glycerol in ein 2 ml-Cryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) abgefüllt und sterilisiert werden. Anschließend wurden 500 μ l aus den Bakterienflüssigkulturen dazugegeben und die Cryo-Röhrchen bei -70 °C gelagert.

Aus dieser Dauerkultur konnten die Bakterien erneut mit einer sterilen Impföse auf eine LB-Agarplatte (mit Ampicillin [100 μ g/ml]) ausgestrichen werden oder in 5 ml LB-Flüssigkultur (mit Ampicillin [100 μ g/ml]) über Nacht bei 37 °C angezüchtet werden.

3.2.5.6.8 Sequenzierung

Zur Kontrolle, ob die gewünschten Zytokin-DNA-Sequenzen erfolgreich kloniert werden konnten, wurde jeweils die Plasmid-DNA sequenziert.

Die Sequenzierung fand im Robert-Koch-Institut (Nordufer 20, 13353 Berlin-Wedding) statt. Hierbei wurde in Anlehnung an Sanger et al. (1977) die Sequenzierung mittels ABI PRISM® 3130x Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Bei der automatischen Sequenzierung wird die DNA zuvor durch eine

Standard-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Didesoxynucleotiden (BigDye) markiert, die dann vom Gerät während der Kapillargelelektrophorese mittels Laser gemessen werden. Als Primer wurde der T7 Promoter Sequenzierungs-Primer (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' [TIB Molbiol, Berlin]) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde zuvor mit einem Spectrophotometer (DU[®] 640 B [Beckman Coulter, Krefeld]) vermessen und in einer Konzentration von ca. 16 ng/μl in die PCR eingesetzt.

Der Sequenzierungs-PCR-Ansatz erfolgte in einem Volumen von 10 μl:

2 μl	5-fach Puffer
1 μl	Big Dye
0,5 μl	T 7-Primer (10 μ Molar)
1 μl	Plasmid-DNA
ad 10 μl	H ₂ O (5,5 μl)

Die PCR wurde in einem Heizblockcycler (Gene Amp[®] PCR System 9700 [Applied Biosystems]) nach folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	2 Minuten bei 96 °C
Denaturierung:	10 Sekunden bei 96 °C
Annealing:	5 Sekunden bei 55 °C
Elongation:	4 Minuten bei 60 °C
Anzahl der Zyklen:	25

Um zu verhindern, dass Primerreste, BigDye und Salze durch die Kapillargelelektrophorese gelangen, wurden die Proben nach der PCR mit Sephadex[™] G-50 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) aufgereinigt, im Sequenziergerät ABI PRISM[®] 3130x sequenziert und mit Hilfe des Computerprogramms „Foundation Data Collection 3.0“ (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgewertet.

3.2.5.7 „Real-Time“ TaqMan[®] - PCR

Die „Real-Time“ TaqMan[®]- PCR ist eine sensitive Detektionsmethode, die zum Nachweis von Zytokinkonzentrationen gut geeignet ist. Mit Hilfe der „Real-Time“ TaqMan[®]- PCR kann durch Ausnutzung fluoreszierender Signale die Menge an PCR-Produkten im Reaktionsverlauf ermittelt werden und durch Erstellung einer Standardkurve, basierend auf

einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen von entsprechender Plasmid-DNA, kann auf die Kopienzahl der cDNA geschlossen werden. Die Anzahl der Kopien kann wiederum durch Bezug auf ein weiteres nicht reguliertes Housekeeping Gen normalisiert werden.

Die Durchführung der „Real-Time“ TaqMan[®]-PCR erfolgte nach freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. G. Pauli und unter Betreuung von Dr. H. Ellerbrok im Robert-Koch-Institut, Berlin.

3.2.5.7.1 Primer- und Sondendesign für die TaqMan[®]-PCR

Die Primer für die Real-Time“ TaqMan[®]-PCR wurden nach den Kriterien, wie unter 3.2.5.3 beschrieben, hergestellt. Die Auswahl geeigneter TaqMan[®]-PCR-Sonden erfolgte unter Berücksichtigung der Primersequenzen mit Hilfe der PrimerExpress[®] Software (Applied Biosystems, Darmstadt). Die TaqMan[®]-Sonde besitzt am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff. Als Reporterfarbstoff wurde FAM (6-Carboxy-Fluorescein) eingesetzt, während TAMRA (6-Carboxytetramethyl-rhodamin) als Quencher-Farbstoff verwendet wurde. Ein Phosphat-Anhang blockierte das 3'-Ende der Sonde, um eine Extension während der PCR zu vermeiden. Für die Auswahl einer geeigneten Sonde wurden folgende Punkte berücksichtigt: Das 5'-Ende der Sonde sollte möglichst nahe am 3'-Ende des PCR-Primers liegen. Der GC-Gehalt der Sonde betrug etwa 40-60%, während mehr als drei Nukleotide des gleichen Typs in Folge vermieden wurden. Die Hybridisierungstemperatur der Sonde sollte möglichst 5-10 °C höher liegen, als die der PCR-Primer. Bei der Länge der Sonde war zu berücksichtigen, dass diese zwischen 20 und 30 Basen liegen sollte, um einerseits ausreichende Spezifität zu gewährleisten und andererseits um Sekundärstrukturausbildungen zu verhindern.

Die TaqMan[®]-Sonden und die Primer wurden in einer Konzentration von 10 µ Molar in die PCR eingesetzt. Zur Etablierung der Primer und Sonden für die TaqMan[®]-PCR wurde cDNA und genomische DNA überprüft. Eindeutige Signale kamen dabei nur von den cDNA-Proben. Unterschiedliche Konzentrationen der Primer sowie unterschiedliche Annealing-Temperaturen hatten kaum Einfluss auf die Amplifikation, so dass mit einer Standardbedingung alle Zytokine amplifiziert werden konnten. Die PCR-Bedingungen sind dem Punkt 3.2.5.7.4 zu entnehmen.

3.2.5.7.2 Housekeeping Gene (Referenzgene)

Als Referenzgene wurden so genannte Housekeeping Gene verwendet. Bei den Housekeeping Genen handelt es sich um nicht regulierte, d.h. konstant exprimierte Zellproteine oder Stoffwechsellzyme, die von jeder eukaryotischen Zelle gebildet werden. Im vorliegenden Versuch wurden zwei Housekeeping Gene, β -Aktin und GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase), zur Standardisierung der Zytokinexpression bestimmt. Bei dem β -Aktin handelt es sich um ein Zellstrukturprotein (Shankar et al. 1992), während GAPDH ein Schlüsselenzym der Glykolyse ist. Die Expression der Housekeeping Gene kann teilweise intra- und interindividuelle Unterschiede aufweisen oder durch Hypoxie und Zellproliferation verändert werden, so dass eine Überprüfung von zwei Housekeeping Genen erforderlich war, um herauszufinden, welches der Gene als Referenzgen unter den spezifischen experimentellen Bedingungen besser geeignet ist.

3.2.5.7.3 Erstellung von Standard-Verdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl

Bei einer so genannten Standard-Verdünnungsreihe handelt es sich um eine Verdünnungsreihe mit bekannter Zytokin-DNA-Sequenz, wobei die Anzahl der DNA-Moleküle in jeder Verdünnungsstufe bekannt ist. Hierfür wurde die klonierte Plasmid-DNA (3.2.5.6) zuvor mit einem Spectrophotometer (DU[®] 640 B [Beckman Coulter, Krefeld]) bei 260 nm vermessen und dann mit Hilfe der Loschmidt'schen-Zahl (Avogadro-Zahl) die Anzahl der Moleküle ausgerechnet. Die Loschmidt-Zahl (Avogadro-Konstante) ist eine Konstante, die die Zahl der Moleküle in einem Mol (mol) angibt. Für die Avogadro-Konstante gilt: $N_A = 6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$. Unter Berücksichtigung der molaren Masse einer bekannten Probe, lässt sich die Stoffmenge auch in der Einheit g/mol angeben. Eine Base hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 330 g/mol, ein Basenpaar folglich 660 g/mol. Das Molekulargewicht eines DNA-Fragments errechnet sich aus der Anzahl der Basenpaare multipliziert mit 660. Mit Hilfe der molaren Masse lässt sich daraus die DNA-Menge ermitteln (Mülhardt 2006). Ein Genfragment von 1 kb enthält in 1 ng DNA $9,1 \times 10^8$ Kopien pro μl . Unter der Annahme, dass die verwendete Plasmid-DNA (Vektor: 3 kb, Insert: 300 bp) aus 3300 Basen besteht, kann die Anzahl der Kopien in der Plasmid-DNA-Probe aus dem Produkt der gemessenen Konzentration und den $9,1 \times 10^8$ Kopien pro ng DNA durch Bildung des Quotienten mit den 3,3 kb der Plasmid-DNA unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung bei der Konzentrationsbestimmung berechnet werden.

Die Plasmidzahl pro μl wurde folgendermaßen errechnet:

$$\text{Kopien}/\mu\text{l} = \frac{\text{DNA-Konzentration [ng}/\mu\text{l}] \times \text{DNA-Menge (9,1 x 10}^8 \text{ Moleküle/ng)}}{3,3 \text{ kb Plasmid-DNA}} \times \text{eingesetzte Verdünnung}$$

Die Tabelle 14 gibt die ermittelten Konzentrationen der Plasmid-DNA unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung und die daraus resultierenden Kopienzahl je μl wieder.

Tabelle 14: Ermittelte Plasmidkonzentrationen

Plasmid	DNA-Konz. (ng/ μl)	Kopien / μl
IFN- γ	340	$9,3 \times 10^{10}$
IL-2	316	$8,7 \times 10^{10}$
IL-4	154	$4,2 \times 10^{10}$
IL-10	156	$4,3 \times 10^{10}$
β -Aktin	425	$1,2 \times 10^{11}$
GAPDH	330	$9,0 \times 10^{10}$

Anhand dieser Daten der Tabelle wurden die Standard-Verdünnungsreihen von 1×10^0 bis 1×10^5 Kopien pro μl hergestellt. Für die PCR wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ aus der entsprechenden Verdünnungsstufe eingesetzt, so dass in der höchsten Verdünnung 10 Kopien enthalten waren und in der niedrigsten 1.000.000 Kopien.

3.2.5.7.4 Durchführung der „Real-Time“ TaqMan[®]-PCR

MicroAmp[®] Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems, Darmstadt)

TaqMan-Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt)

Die „Real-Time“ TaqMan[®]-PCR ermöglicht eine absolute Quantifizierung von Zytokin-mRNA bzw. cDNA-Kopien. Während eines PCR-Laufes wird die Ausgangsmenge der Zytokin-mRNA bzw. cDNA-Kopien in der Gesamt-RNA bzw. Gesamt-cDNA der *ex vivo* und *in vitro* isolierten equinen PBMCs bestimmt. Hierfür wurde das ABI PRISM[™] 7700

Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Der optisch modifizierte Heizdeckel ermöglicht es, die Fluoreszenzanregung in jedem Reaktionsgefäß durch einen Laser (488 nm) über einen Spiegel an einen Spektrographen weiterzuleiten. Die Fluoreszenzsignale werden dann mit Hilfe einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgewandelt.

Für jede *ex vivo* und *in vitro* Probe wurden die ausgewählten Zytokine sowie die ausgewählten Housekeeping Gene (β -Aktin und GAPDH) im Doppelansatz bestimmt und mit dem daraus resultierenden Mittelwert die anschließenden Berechnungen durchgeführt. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurde bei jedem PCR-Ansatz eine „No-Template“-Kontrolle mitgeführt. Zu jedem PCR-Lauf wurde die entsprechende Standard-Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Zytokins mitbestimmt. Die Reaktionsansätze wurden jeweils in einem Gesamt-Volumen von 25 μ l pro Reaktionsgefäß auf eine MicroAmp[®] Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgetragen und mit einer optischen Folie verschlossen.

Alle benötigten Komponenten wurden in einen Gesamtansatz von 15 μ l pro Probe ohne Zugabe des cDNA-Templates in entsprechender Menge als Komponenten-Mix nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 15: Pipettierschema TaqMan[®]-PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen pro Loch/Probe
TaqMan-Universal PCR Master Mix	7,5 μ l
Primer F	0,75 μ l
Primer R	0,75 μ l
TaqMan-Sonde	0,25 μ l
Nuklease-freies Wasser	5,75 μ l

Die Reaktionsgefäße der unbekannt Proben wurden mit 8 μ l Nuklease-freiem Wasser gefüllt und anschließend mit 15 μ l des Komponenten-Mixes versetzt. Als letztes erfolgte die Zugabe der cDNA-Proben in einem Volumen von 2 μ l pro Reaktionsgefäß.

Die Reaktionsgefäße der Standard-Verdünnungsreihe enthielten 15 μ l des Komponenten-Mixes sowie 10 μ l der entsprechenden Verdünnungsstufe des Standards.

Die „Real-Time“ TaqMan[®]-PCR im 7700 Sequence Detection System fand unter folgenden Bedingungen statt:

Inaktivierung der AmpErase [®] Uracil N-Glycosylase:	50 °C für 2 min
Aktivierung der AmpliTaq [®] Gold DNA-Polymerase:	95 °C für 10 min
40 Zyklen:	
Denaturierung:	95 °C für 15 sek
Annealing/Extension:	60 °C für 1 min

Das Annealing und die Extension wurden hierbei in einem gemeinsamen Schritt zusammengefasst, da die Aktivität der AmpliTaq[®] Gold DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt) bereits ab Temperaturen > 55 °C signifikant ist. Somit gewährleistet dieser kombinierte Schritt zu einem eine höhere Spezifität durch eine höhere Annealing-Temperatur und zum anderen wirkt sich die geringere Extensions-Temperatur positiv auf die Bindung der Sonde und der damit effizienteren Sondenhydrolyse aus.

3.2.5.7.5 Absolute Quantifizierung der mRNA-Menge von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10

Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge der Zielsequenz in einer unbekannt Probe, meist ausgedrückt als Kopienzahl pro Reaktion, bestimmt.

Die Ermittlung des Expressionsniveaus der gewünschten Zytokinsequenzen erfolgte unter Verwendung eines Referenzgens, dem so genannten Housekeeping Gen (3.2.5.7.2). Die Reaktionsansätze für die Housekeeping Gene sowie für die experimentellen Proben wurden jedes Mal mit einer Standard-Verdünnungsreihe durchgeführt, so dass jeweils die Kopienzahl pro Reaktion ermittelt wurde. Für die Standard-Verdünnungsreihe wurde eine so genannte Standardkurve erstellt, indem der jeweilige Ct-Wert (y-Achse) gegen die Menge der Zielsequenz (Kopienzahl, x-Achse, logarithmisch) aufgetragen wurde. Der Ct-Wert („threshold cycle“) markiert den Zyklus, bei dem das fluoreszierende Signal zum ersten Mal über einen Schwellenwert ansteigt. Die Anzahl der Kopien wird dadurch bestimmt, dass der Ct-Wert einer unbekannt Probe mit der Standardkurve verglichen wird. Der Ct-Wert ist umso kleiner, je mehr Zielsequenz in der Probe vorhanden ist.

Für die absolute Quantifizierung wurde die Verdünnungsstufe des Standards vom Referenzgen festgelegt, in der sich durchschnittlich die Anzahl der Kopien aller Reaktionsansätze befanden. Für die nachfolgende Berechnung wurde die Verdünnungsstufe mit 10^4 Kopien von dem entsprechenden Housekeeping Gen als Standard festgelegt.

Die absolute Quantifizierung wurde aus dem Quotienten der Kopienzahl des zu untersuchenden Zytokins und der Kopienzahl des Housekeeping Gens ermittelt und somit normalisiert. Die Normalisierung der gemessenen Kopienzahl durch das Verhältnis zum Referenzgen verhinderte Fehler, die auf gering veränderten PCR-Effektivitäten oder verschiedenen Ausgangskonzentrationen basierten.

Es folgte eine Berechnung der absoluten Kopienzahl in Angabe von 10^4 Kopien durch folgende Formel:

$$X = \frac{\text{Kopienzahl des Zytokins} \times 10^4}{\text{Kopienzahl des Housekeeping Gens}}$$

Je niedriger der berechnete Wert für die Kopienzahl, desto geringer war die Konzentration des zu ermittelnden Zytokins in der Ausgangssubstanz.

3.2.6 Studiendurchführung

In dem Zuchtbestand in Pausin wurden die 20 Pferde in zwei Gruppen eingeteilt (siehe 3.1.4). Die Durchführung der Impfstudie erfolgte in Kooperation mit der Tierärztlichen Klinik für Pferde Seeburg, insbesondere mit Herrn Dr. Dieter Schad.

Von allen Pferden wurde 30 Tage vor Studienbeginn eine Blutprobe entnommen, um einen Ausgangswert zu ermitteln. Zum Studienbeginn am Tag -4 wurden die Pferde entsprechend ihrer Gruppeneinteilung mit Zylexis[®] (Pfizer, Karlsruhe) bzw. Placebo nach Angaben des Herstellers behandelt. Die dreimalige intramuskuläre Applikation der Zylexis[®]-/Placebo-Dosis erfolgte im Abstand von zwei Tagen. Mit der letzten Applikation des Immunmodulators bzw. Placebos wurden zusätzlich alle Pferde beider Gruppen mit Resequin[®] NN plus (Intervet, Unterschleißheim) nach Herstellerangaben geimpft. Vor der Applikation des Impfstoffes wurden die Tiere einer kurzen klinischen Allgemeinuntersuchung (Größe und Empfindlichkeit der Mandibularlymphknoten, Überprüfung von Nasenausfluss, Veränderungen der Konjunktiven, Auslösbarkeit von Husten) unterzogen. Es folgten im Studienablauf definierte Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten, die der Abbildung 13 zu entnehmen sind.

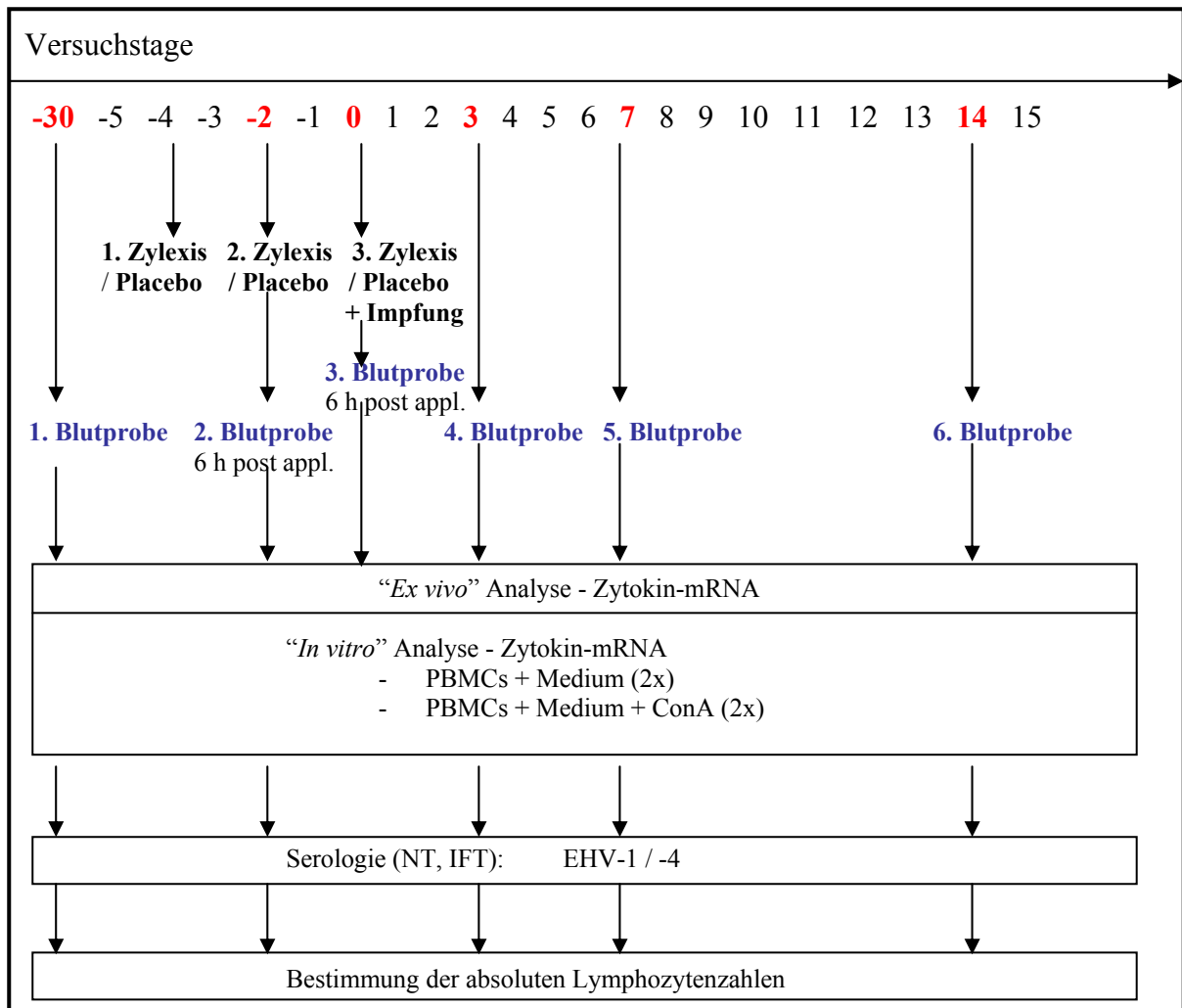


Abbildung 13: Applikationsschema und Blutentnahmen

An den Versuchstagen -30 und 0 erfolgte zusätzlich eine Immunstatusbestimmung durch das Labor der Fa. LABOKLIN (Bad Kissingen).

Die Applikation der Dosis Zylexis[®] (Pfizer, Karlsruhe) respektive Placebo erfolgte intramuskulär in die linke Brustmuskulatur. Der Impfstoff (Resequin[®] NN Plus [Intervet, Unterschleißheim]) wurde intramuskulär in die linke Halsmuskulatur appliziert.

3.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mit Hilfe der Computer-Programme SPSS 12.1 und STATISTICA (Fa. StatSoft., Inc., Tulsa, USA).

Die statistische Auswertung wurde unter Mithilfe von Herrn Dr. Wolfgang Reimers durchgeführt und vom Institut für Biometrie der Freien Universität Berlin betreut.

Im Rahmen dieser Auswertung erfolgte zunächst eine deskriptive Darstellung der Daten für die Serologie, des Immunstatus und der Zytokinexpression.

Für die Ermittlung von Zusammenhängen oder Unterschieden wird die Irrtumswahrscheinlichkeit p als Ergebnis jeden Tests angegeben. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht, wenn p kleiner als 0,05 (5%) ist.

Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Zielgrößen annähernd symmetrisch verteilt sind, wurden verteilungsfreie Verfahren verwendet.

Die Untersuchung von abhängigen Stichproben erfolgte unter Anwendung des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen. Für unabhängige Stichproben wurde der U-Test von Mann und Whitney angewandt.

Ein Methodenvergleich mit den beiden Housekeeping Genen bei der Zytokinexpression erfolgte durch Anwendung des linearen Regressionsverfahrens nach Passing und Bablok (Passing und Bablok 1983; Bablok et al. 1988).

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit beschreiben entsprechend der Zielsetzung die Ermittlung der humoralen und zellulären Immunantwort nach Zylexis[®]- / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus. Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden wurden bestehende Methoden optimiert und eine quantitative „Real-Time“ PCR etabliert. Die grundlegende Frage, ob die Anwendung von Zylexis[®] die Impfantwort verbessert, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gliedern sich in mehrere Teilbereiche:

1. Auswahl einer geeigneten Pferdegruppe
2. Optimierung und Etablierung der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden zur Detektion der zellulären Immunantwort
3. Ermittlung der humoralen Immunantwort
4. Ermittlung des Immunstatus
5. Ermittlung der humoralen und zellulären Immunantwort anhand von Zytokinexpressionsmustern

4.1 Auswahl von deutschen Reitpferden für die Studiendurchführung

4.1.1 Einleitung

Zur Überprüfung, ob eine Verbesserung der Impfantwort mit der Gabe des Immunmodulators Zylexis[®] korreliert, sollte eine unter Feldbedingungen möglichst geschlossene Gruppe von Pferden über den geplanten Zeitraum der Studie serologisch und immunologisch untersucht werden. Von besonderem Interesse war hierbei die Charakterisierung der zellulären Immunantwort durch Bestimmung von Expressionsmustern ausgewählter Zytokine.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb unter natürlichen Feldbedingungen eine zahlenmäßig möglichst große Gruppe von Pferden unterschiedlichen Alters ausgewählt, um mehrere Einflussfaktoren, wie Alter, Geschlecht und unterschiedlichen Kontakt mit dem EHV-Antigen in Form von Impfungen (Vorimmunisierungen) in der Vergangenheit zu berücksichtigen.

4.1.2 Zusammensetzung der Gruppen

Für die Durchführung der Studie standen insgesamt 20 Pferde zur Verfügung, die in zwei Gruppen zu je 11 und 9 Pferden aufgeteilt wurden. Die Gruppe 1 mit 11 Pferden wurde als Zylexis-Gruppe definiert, während die Gruppe 2 mit 9 Pferden als Placebo-Gruppe diente (siehe 3.1.4). Innerhalb der Gruppen unterschieden sich die Pferde anhand ihres Alters, Geschlechts, Rasse und ihrer unterschiedlichen Vorimmunisierung.

Die Tiere und die Zeitpunkte der Blutentnahmen wurden fortlaufend durchnummeriert. Die Haltung der Pferde erfolgte zum größten Teil in mehreren Gruppen ganztägig auf der Weide. Die Jungtiere bildeten getrennt nach Geschlecht eine Weidegruppe, während bei den älteren Tieren Stuten und Wallache in einer Gruppe zusammen gehalten wurden. Einige der Tiere standen über Nacht in herkömmlichen Pferdeboxen und hatten tagsüber einen separaten Weidegang. Detaillierte Angaben über Alter, Geschlecht, Rasse und Vorimmunisierung befinden sich im Anhang (9.1, A 1).

4.1.3 Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere im Studienverlauf

Das Allgemeinbefinden der Pferde wurde vor Studienbeginn und im Studienverlauf täglich durch den Besitzer überprüft. Es wurde beobachtet, ob die Tiere sich von der Gruppe absonderten, das Haarkleid glatt anliegend und glänzend ist und ob eine regelmäßige Futteraufnahme erfolgt ist. Lediglich „Lilly“ zeigte 6 Stunden nach Placebo-Applikation am Versuchstag -2 ein leichtes Nesselfieber in der Hals- und Rumpfregeion, das unbehandelt am nächsten Tag wieder abgeklungen war. Aufgrund fehlender Fixierungsmöglichkeiten auf der Weide für die jungen, noch nicht an Menschenkontakt gewöhnten Pferde und dem daraus resultierenden erhöhten gesundheitlichem Risiko für den Untersucher, wurden auf weitere klinische Untersuchungen verzichtet. Ansonsten konnte in keinem Fall eine Abweichung des Verhaltens, der Futteraufnahme oder Absonderungen von der Gruppe beobachtet werden, so dass die Pferde vor Studienbeginn und im Studienverlauf als gesund beurteilt wurden.

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung des Zytokin-mRNA-Gehalts aus dem Pferdeblut

4.2.1 *In vitro* Stimulierung von equinen PBMC mit Concavalin A

Die isolierten equinen PBMCs wurden *in vitro* mit Concavalin A für 24 Stunden stimuliert (siehe 3.2.4.3).

Die Vitalität der Zellen wurde nach 20 Stunden Inkubation stichprobenartig beurteilt. In den PBMC-Kulturen zeigten die unstimulierten Zellen nach 24 Stunden eine dichte, gleichmäßige Zellsuspension, während die stimulierten Zellen mehrere Zellhaufen ausbildeten. Diese Beobachtung weist auf eine Proliferation der Zellen hin (Abb. 14).

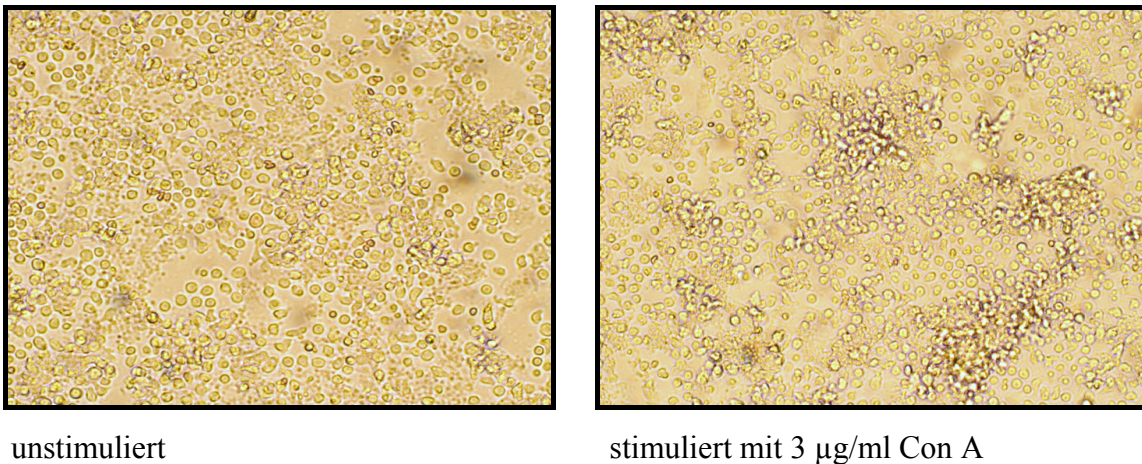


Abbildung 14: PBMC in Zellkultur nach 24 Stunden - Vergrößerung: Okular x 2,5; Objektiv x 20 (Axiovert 100 [Carl Zeiss, Oberkochen])

4.2.2 Ergebnisse der RNA-Extraktion und Bestimmung der RNA-Qualität

Für den Nachweis von Zytokin-mRNA aus den präparierten PBMCs vom Pferd wurden nach der Durchführung der RNA-Extraktion die RNA-Ausbeute und RNA-Qualität mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe 3.2.5.1.4). Aus 30 ml Blut konnten im Studienverlauf ca. 1 bis 5×10^7 Zellen (PBMC) isoliert werden. Die RNA-Präparation mittels Trizol[®] Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) erbrachte im Studienverlauf Gesamt-RNA-Konzentrationen von ca. 200 µg bis 2600 µg/ml RNA.

Die Ergebnisse in der Abbildung 15 zeigen, dass bei der extrahierten RNA mittels Trizol[®] Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) die 28 S und 18 S ribosomalen Untereinheiten der RNA

deutlich nachweisbar waren, was auf ein typisches Muster des Vorhandenseins von intakter RNA hinweist (Simms et al. 1999).

Die Gesamt-RNA-Ausbeute wurde photometrisch auf einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) gemessen. Im Rahmen der Etablierung der Gesamt-RNA-Präparation wurde zur weiteren Überprüfung der RNA-Qualität die OD bei 280 nm bestimmt, um den Quotienten aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm zu ermitteln. Idealerweise sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989), was bei den untersuchten Proben im Rahmen der Etablierung der Fall war. Ist der Koeffizient kleiner als 1,8 bis 2,0 ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA oder aromatischen Substanzen kontaminiert.

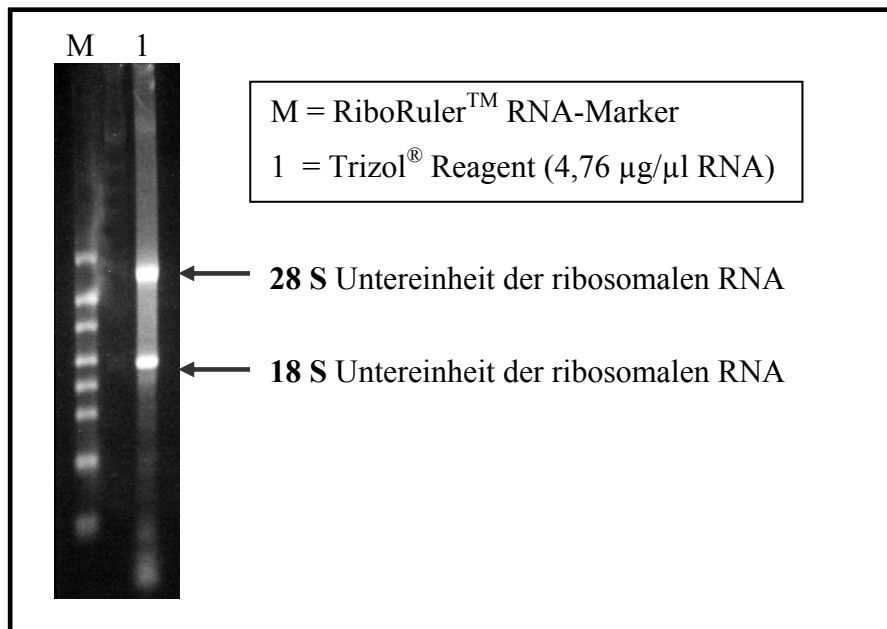


Abbildung 15: Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der RNA-Qualität

4.2.3 Überprüfung der Spezifität der ausgewählten Primer- und Sondensequenzen

4.2.3.1 Auswahl eines geeigneten Primer- und Sondensystems

Anhand der veröffentlichten Gensequenzen für das Hausferd (*Equus caballus*) aus der Datenbank des „National Center für Biotechnology Information“ (NCBI, 1998 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) wurden geeignete Primer- und Sondensequenzen für die ausgewählten equinen Zytokine mit Hilfe des Computerprogramms PrimerExpress® (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewählt. Die Primer- und Sondensequenzen für die Housekeeping Gene equines β -Aktin und GAPDH wurden in Anlehnung an Kolm et. al

(2006) hergestellt. Für die Auswahl geeigneter Primer wurde berücksichtigt, dass zunächst ein größeres Klonierungsfragment entsteht, in dem sich die Primer- und Sondensequenzen für die TaqMan[®]-PCR befinden. Die Lage der Klonierungs- und TaqMan[®]-Primer- und Sondensequenzen sind in Abbildung 16 dargestellt.

Equines Interferon- γ (GenBank Acc.-Nr.: U04050; Grüning et al. 1994)

```

1  acctgatcag cttagtacag aagtgactgc tttcaactac ttaggcctaa ctctctccga
61  aacaatgaat tatacaagtt ttatcttggc ttttcagctg tgtgcgattt tgggttcttc
121 tacctattac tgccaggccg cgttttttaa agaaatagaa aacctaaagg aatattttaa
181 cgcaagtaac ccagatgtag gggatggtgg gcctcttttc ctggatatct tgaagaactg
241 gaaagaggat agtgacaaaa aaataattca gagccaaatc gtctccttct acttcaaact
301 ctttgaaaac ttgaaagata accaggtcat tcaaaagagc atggacacca tcaaggagga
361 cctgttcggtt aagttcttta acagcagcac cagcaagctg gaagacttcc aaaagctgat
421 tcagattccg gtaaagtatc tgaaggtcca gcgcaaagca ataagtgaac tcatcaaagt
481 gatgaatgat ctgtcgccca aagctaacct gaggaagcgg aagaggagtc agaatccatt
541 tcgaggccgg agagcgttgc aatagtggtc a

```

Equines Interleukin-2 (GenBank Acc.-Nr.: L06009; Vandergrift und Horohov 1993)

```

1  atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaactc ttgcagtcct tgcaaacagt
61 gcacctactt caagctctaa gaggggaaaca cagcaacaac tgaagcaatt acagatggat
121 ttaaagttgc ttttgggaagg agttaataat aacaagaatc ccaaactctc caagattctc
181 acatttataaa ttaacatgcc caagaaggcc acagaattga aacatcttca gtgtctagaa
241 gaagaactca aacctctgga ggaaatgcta aaaaactttc tctcgaaaga tatcaaggaa
301 ttaatgagca atatcaatgt aacagttctg ggactaaagg ggtctgaaac aagattcaca
361 tgtgaatatg ataatgagac agaaacaatt gtagaatttc tgaacaaatg gattaccttt
421 tgtcaaagca tcatctcaac actgacg

```

Equines Interleukin-4 (GenBank Acc.-Nr.: AF305617; Mauel und Steinbach 2000)

```

1  atgggtctca cctaccaact gattccagct ctggtctgct tactagcatg taccagcaac
61 ttcattccagg gatgcaaata cgacatcacc ttacaagaga tcatcaaaac gctgaacaac
121 ctacagatg gaaagggcaa gaattcgtgc atgagactga ctgtagegga tgctttgct
181 ggcccgaaga acacagatgg aaaggaaatc tgcagggctg caaagggtgct tcaacagctc
241 tataaaagac atgacaggtc cttgatcaaa gaatgcctga gcggactgga caggaacctc
301 aagggcatgg caaacgggac ctgctgtact gtgaatgaag ccaagaagag cacattgaaa
361 gacttttttg aaaggctaaa gacgatcatg aaagagaaat actccaagtg ttga

```

Abbildung 16: Gensequenzen und Lage der Primer und der TaqMan[®]-Sonde

(blau [unterstrichen] = Klonierungs- und TaqMan[®]-Primer; *rot* [kursiv] = TaqMan[®]-Sonde)

Equines Interleukin-10 (GenBank Acc.-Nr.: U38200; Swiderski et al. 1999)

1 atgcacagct cagcactgct atgttacctg gtcttcctgg ccggggtggg agccagccga
 61 gaccggggca cccagtctga gaacagctgc acccacttcc caaccagcct gccccacatg
 121 ctccatgagc tccgagccgc cttcagcagg gtgaagactt tctttcaaat gaaggaccag
 181 ctggacaaca tgttgttgaa cgggtccctg ctggaggact ttaagggtta cctgggttg
 241 caagccttgt cggagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccc aagctgagaac
 301 cacggcccag acatcaagga gcacgtgaac tccctggggg aaaagctgaa gaccctccga
 361 gtgaggctgc ggcgctgtca tggatttctg ccc *tgtgaaa ataagagcaa ggcagtggag*
 421 *cagg*tgaaga gtgccttcag taagctocaa gagaaagggtg tctacaaagc catgagtgag
 481 tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tatatgacaa cgaagatgaa aactgaagc
 541 atcttaggga acgaagcacc caggacgggtg actctactag actctaggac ataaattgga
 601 gatctcccaa atcccatcca gggttctggg agagctgaat cagctccttg gaaaaccctg
 661 tggtagctct ctctgaata tttattaact ctgatacctc aactcctatt tctatttatt
 721 tactgagctt ctctgtgaa

Equines β -Aktin (GenBank Acc.-Nr.: AF035774; Swiderski et al. 1999)

1 atggatgatg atatcgccgc gctcgtggtc gacaacggct ccggcatgtg caaggccggc
 61 ttccggggcg acgacgctcc ccgcccgcgc ttcccccca tcgtggggcg cccccggcac
 121 cagggcgatg tgggtggcat gggccagaag gactcatacg tgggagcaga ggcccagagc
 181 aagaggggca tcctgaccct caagtacccc atcgagcacg gcacgcgcac caactgggac
 241 gacatggaga agatctggca ccacacctc tacaacgagc tgcgcgtggc ccccaggagc
 301 caccctgtgc tgctgaccga ggccccctg aacccccagg ccaaccgcga gaagatgacc
 361 cagatcatgt ttgagacctt caacaccccc gccatgtacg tggccatcca ggccgtgctg
 421 tccctgtacg cctctggccg caccactggc atcgtgatgg actccggtga cggggtcacc
 481 cacactgtgc ccacttacga ggggtacgcc ctccccacg ccactcctgc tctggacctg
 541 gctggccggg acctgacgga ctacctcatg aagatcctca cggagcgtgg *ctacagcttc*
 601 *accacc*acgg ccgagagggg aatcgtgcgt gacatcaagg agaagctctg ctatgtcgcc
 661 ctggacttcg agcaggagat ggccaccgcg gcctccagct cttccctgga gaagagctac
 721 gagctgcccg acggccaggc catcaccatc ggcaacgagc ggttccgctg ccccagggcc
 781 ctcttccagc cctccttctt gggcatggaa tctgtggca tccacgaaac taccttcaac
 841 tccatcatga agtgtgacgt cgacatccgt aaggacctgt acgccaacac agtgctgtcg
 901 ggtgggacca ccactgacct aggcacgcc gacaggatgc agaaggagat cacagccctg
 961 gctcccagca cgatgaagat caagatcatt gcgccccctg agcgcaagta ctccgtatgg
 1021 atcggcggct ccattctggc ctctattgtc accttccagc agatgtggat cagcaagcag
 1081 gactacgacg agtccggccc ctccatcgtc caccgcaaat gcttctag

Fortsetzung Abbildung 16: Gensequenzen und Lage der Primer und der TaqMan[®]-Sonde
 (blau [unterstrichen] = Klonierungs- und TaqMan[®]-Primer; *rot* [kursiv] = TaqMan[®]-Sonde)

Equines GAPDH (GenBank Acc.-Nr: AF157626; Boerboom et al. 2000)

```

1 ctacatgttt cagtatgatt ccacccatgg caagttccat ggcacagtca aggccgagca
61 cgggaagctt gtcatcaacg gaaaggccat caccatcttc caggagcgag atccccgcaa
121 catcaaatgg ggcgatgctg gtgctgaata tgttgtggag tccactggtg tcttactac
181 cttggagaag gctggggctc acttgaaggg tggagccaaa aggtcatca tctctgctcc
241 ttctgctgat gccccaatgt ttgtgatggg cgtgaaccac gagaaatatg acaattccct
301 gaagattgtc agcaatgcct cctgcaccac caattgcttg gccccctgg ccaaggtcat
361 ccatgaccac tttggcatcg tggagggact catgaccaca gtgcatgcca tcaactgccac
421 ccagaagacc gtggatggcc cctctgggaa gatgtggcgc gatggccgag gggctgcca
481 gaacatcadc cctgcttcta ctggctgctc caaggctgtg ggcaagggtca tccctgagct
541 gaatgggaag ctcaactggca tggccttcog tgtccccacc cctaactgtg cagtcgtgga
601 tctgacctgc cgctggaga aagctgcaa atacgatgag atcaagaagg tggatgaagca
661 ggcacgagag ggcctccctca agggcatcct gggctacact gaggaccagg ttgtctcctg
721 cgattttaac agtgacacc actcttcac cttegatgct ggggctggca ttgccctcaa
781 cgaccacttt gtcaagctca tttcctggta tgacaatgaa tttggcta

```

Fortsetzung Abbildung 16: Gensequenzen und Lage der Primer und der TaqMan[®]-Sonde (blau [unterstrichen] = Klonierungs- und TaqMan[®]-Primer; *rot* [kursiv] = TaqMan[®]-Sonde)

Um eine mRNA-spezifische Amplifikation zu ermöglichen, sollte die Bindungsstelle der Primer möglichst an der Grenze zwischen Exon und Intron liegen. Die Überprüfung von Exon- und Intronengrenzen gelang aufgrund des Datenmaterials in der GenBank nur bei dem equinen Interferon- γ . Die anderen Primer wurden in der GenBank über ein so genanntes „Alignment“ auf eine mögliche Sequenzhomologie mit bekannten anderen equinen Gensequenzen überprüft, um auszuschließen, dass möglicherweise eine falsche Gensequenz amplifiziert wird. Dabei wurden in der GenBank keine weiteren Bindungsstellen gefunden. Unter besonderer Berücksichtigung wurde die teilweise vorhandene Sequenzhomologie zwischen dem equinen zellulären Interleukin-10 und dem EHV-2-IL-10 überprüft. Die Primer wurden so ausgewählt, dass ihr Startpunkt genau auf einen „Mismatch“ der beiden Sequenzen fiel. Somit waren die ausgewählten Primerpaare annähernd sequenzspezifisch für das zelluläre Interleukin-10 und wiesen keine Bindungsstelle für das EHV-2-IL-10 auf (Abb. 17). Des Weiteren wurde berücksichtigt, dass unter Umständen verschiedene Gensequenzen für das gleiche equine Zytokin vorhanden sind. Die Daten in der GenBank zeigten beim equinen Interleukin-4 eine leichte Abweichung in der Gensequenz. Hierfür wurden die Primerpaare auf eine entsprechende homologe Sequenz generiert.

IL-10	103	ACCAGCCTGCCCCACATGCTCCATGAGCTCCGAGCCGCTTCAGCAGGGTGAAGACTTTC	162
EHV-2	222	ACCAGCCTGCCCCACATGCTCCACGAGCTCAGGGCCGCTTCAGCAGGGTAAAGACTTTC	281
IL-10	163	TTTCAAATGAAGGACCAGCTGGACAACATGTTGTTGAACGGGTCCCTGCTGGAG <u>GACTTT</u>	222
EHV-2	282	TTTCAAATGAAGGACCAGCTGGACAACATGTTGCTGGACGGTCCCTGCTGGAAGACTTT	341
IL-10	223	<u>AAGGGTTACCTGGGTTG</u> CCAAGCCTTGTCGGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTG	282
EHV-2	342	AAGGGTTACCTGGGCTGCCAGGCCCTGTCTGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTG	401
IL-10	283	ATGCCCCAGGCTGAGAACCACGGCCAGAC---ATCAAGGAGCACGTGAACTCCCTGGGG	339
EHV-2	402	ATGCCCCAGGCCGAGAACCACAGCACCGACCAGGAAAAGGATAAGGTGAACTCCCTGGGG	461
IL-10	340	GAAAAGCTGAAGACCCTCCGAGTGAGGCTG <u>CGGCGCTGTCATCGATTT</u> CTGCCCTGTGAA	399
EHV-2	462	GAAAAGCTCAAGACCCTCAGGGTGAGGCTGAGGCGCTGCCACAGATTCTGCCCTGCGAG	521
IL-10	400	<u>AATAAGAGCAAGGCAGTGGAGCAG</u> GTG <u>AAGAGTGCCTTCAGTAAGCTCCA</u> AGAGAAAGGT	459
EHV-2	522	AATAAGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAGCGCCTTCAGCAAGCTCCAGGAGAAAGGG	581
IL-10	460	GTCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCCTATATGACA	519
EHV-2	582	GTCTACAAGGCCATGAGCGAGTTTGACATCTTCATTAACTACATAGAGGCCTACATGACC	641
IL-10	520	<u>ACGAAGATGAAAACTGAAGCA</u>	541
EHV-2	642	ACAAAGATGAAAACTGAAGCA	663

Abbildung 17: Sequenzvergleich zelluläres IL-10 und EHV-2-IL-10 und Primerbindungsstellen (EHV-2-IL-10 Acc.-Nr.: S59624; Rode et al. 1993)

4.2.3.2 Prüfung der Primersequenzen für die Klonierung mittels PCR und Agarosegelelektrophorese

Die optimalen PCR-Bedingungen zur Herstellung der Amplifikate für die Klonierung wurden für die jeweiligen Primerpaare auf dem Heizblockcycler (UNO-Thermoblock™ [Biometra, Göttingen]) ermittelt (siehe 3.2.5.4.2). Nach einer initialen Denaturierung für 4 Minuten bei 94 °C auf dem Heizblockcycler, folgten jeweils 35 Amplifikationszyklen mit einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C, einem Annealing für 30 Sekunden bei primerspezifischen Temperaturen und einer Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C. Für die Housekeeping Gene, β-Aktin und GAPDH, wurden 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Annealingtemperaturen wurden durch den Primerhersteller vorgegeben. Darüber hinaus wurden die vorgegebenen Annealingtemperaturen für den jeweiligen Cycler in Schritten von 2 °C variiert und optimiert. Sie lagen zwischen 54 °C und 60 °C (siehe 3.2.5.4.2, Tab. 10). Nach Beendigung der Zyklen schloss sich eine finale Elongation für 10 Minuten bei 72 °C an.

Um zu überprüfen, ob die ausgewählten Zytokinsequenzen mit den ausgewählten Primern erfolgreich amplifiziert wurden, folgte eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate im Agarosegel (siehe 3.2.5.5). Die Ergebnisse zeigten, dass die PCR-Amplifikate für die ausgewählten Zytokine ohne Nebenprodukte nachgewiesen werden konnten. Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurde neben der Zytokin-cDNA auch genomische DNA und RNA aus equinen PBMCs eingesetzt. Hierbei zeigte stets nur die Zytokin-cDNA die zu erwartenden Fragmentgrößen (Abb. 18, 19, 20).

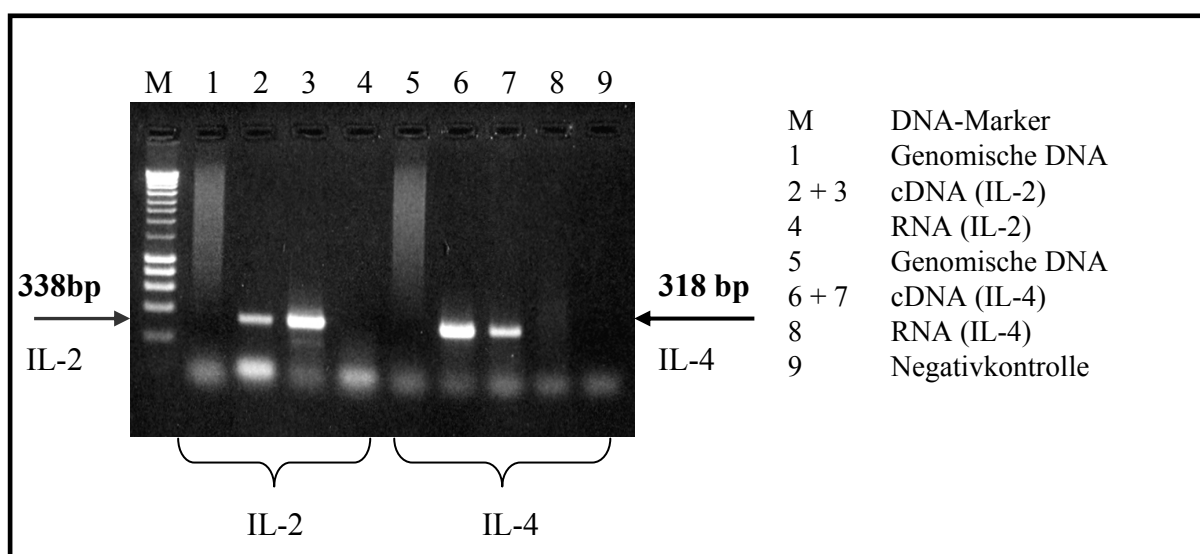


Abbildung 18: Nachweis der IL-2 und IL-4 Amplifikate mit den Primern für die Klonierung

Die Amplifikate von IL-2 und IL-4 der cDNA-Proben (Spur 2+3 und 6+7) wiesen die zu erwartenden Fragmentgrößen auf. Bei den RNA-Proben (Spur 4 und 8) fand keine Amplifikation mit den IL-2 und IL-4 Primern statt.

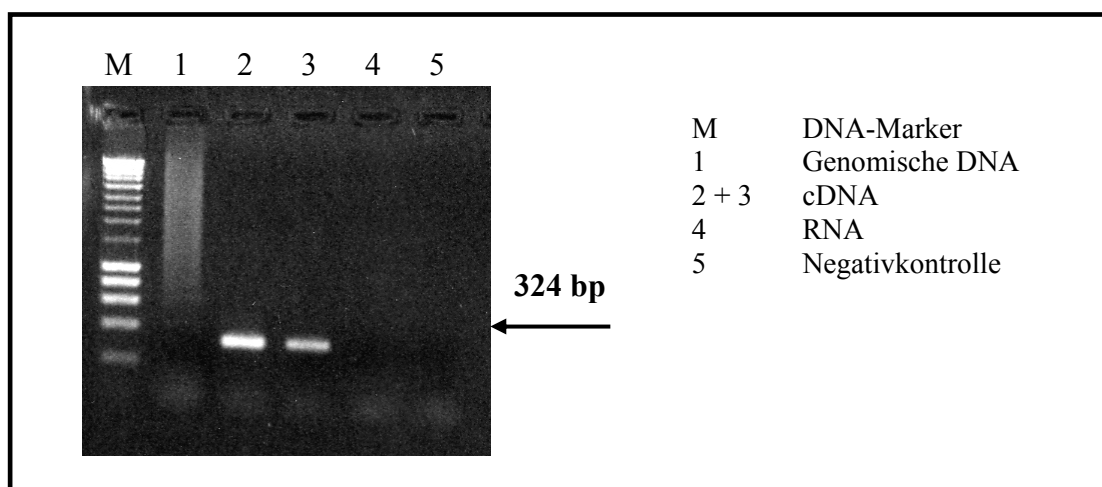


Abbildung 19: Nachweis des IL-10 Amplifikats mit den Primern für die Klonierung

Die cDNA-Proben (Spur 2+3) wiesen Amplifikate in der erwarteten Fragmentgröße von IL-10 auf. Die RNA-Probe zeigte keine Amplifikation.

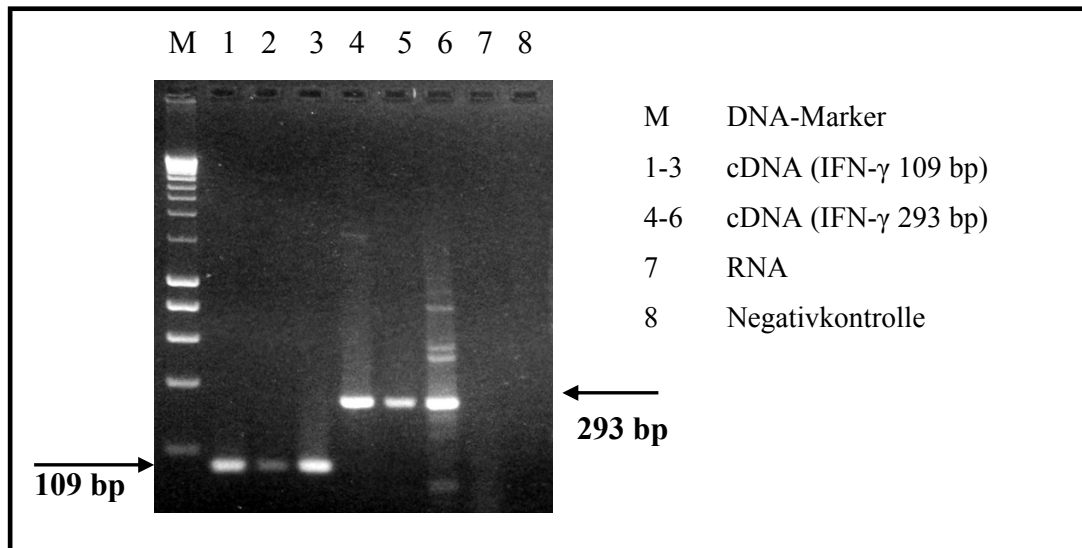


Abbildung 20: Nachweis des IFN- γ Amplifikats mit den Primern für die Klonierung und TaqMan[®]-PCR

Die cDNA-Proben zeigten eine Amplifikation mit den IFN- γ Primern in der erwarteten Fragmentgröße. Eine Amplifikation in der RNA-Probe fand nicht statt.

4.2.4 Ergebnisse der Klonierung der ausgewählten equinen Zytokingensequenzen

4.2.4.1 Konzentrations-Agarosegelelektrophorese und Restriktionsenzymanalyse

Nach erfolgreicher Etablierung der PCR-Primer für die Klonierung wurden die PCR-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und im pGEM-T Easy Vektor kloniert (siehe 3.2.5.6). Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde eine Agarosegelelektrophorese mit der präparierten Plasmid-DNA angefertigt (siehe 3.2.5.6.5). Hierfür wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Durch die unterschiedlichen Zustandsformen der Plasmid-DNA waren drei Banden im Agarosegel sichtbar (siehe 3.2.5.6.5, Abb. 12). Die Konzentration der Plasmid-DNA lag durchschnittlich bei 20 ng/ μ l. Die Klonierung war bei allen ausgewählten Zytokinsequenzen erfolgreich.

Durch Restriktionsenzymanalysen wurde das klonierte Fragment wieder aus der Plasmid-DNA herausgeschnitten (siehe 3.2.5.6.6). Die Schnittstelle des Enzyms sollte auf Höhe der T-Überhänge des Vektors liegen. Hierfür wurde das Restriktionsenzym *Eco* RI verwendet. Idealerweise schneidet *Eco* RI das eingeschleuste Fragment komplett heraus, so dass im Agarosegel zwei Banden, die des Vektors (3 kb) und die des klonierten Fragments, zu sehen sind (Abb. 21). Die herausgeschnittenen Fragmente von IFN- γ (293 bp), IL-2 (338 bp) und IL-10 (324 bp) entsprachen den zu erwartenden Fragmentgrößen. Das klonierte Fragment von

Interleukin-4 hingegen wurde von *Eco* RI ebenfalls geschnitten, so dass das Fragment von 318 bp in zwei Fragmente von 177 bp und 141 bp geteilt wurde (Abb. 22). Die Bande von IFN- γ ist in ihrer Intensität etwas schwächer im Agarosegel sichtbar, was möglicherweise auf einen unvollständigen Restriktionsenzymverdau hindeutet. Die Sequenzierung (4.2.4.2) bestätigte aber, dass das entsprechende Fragment korrekt kloniert wurde.

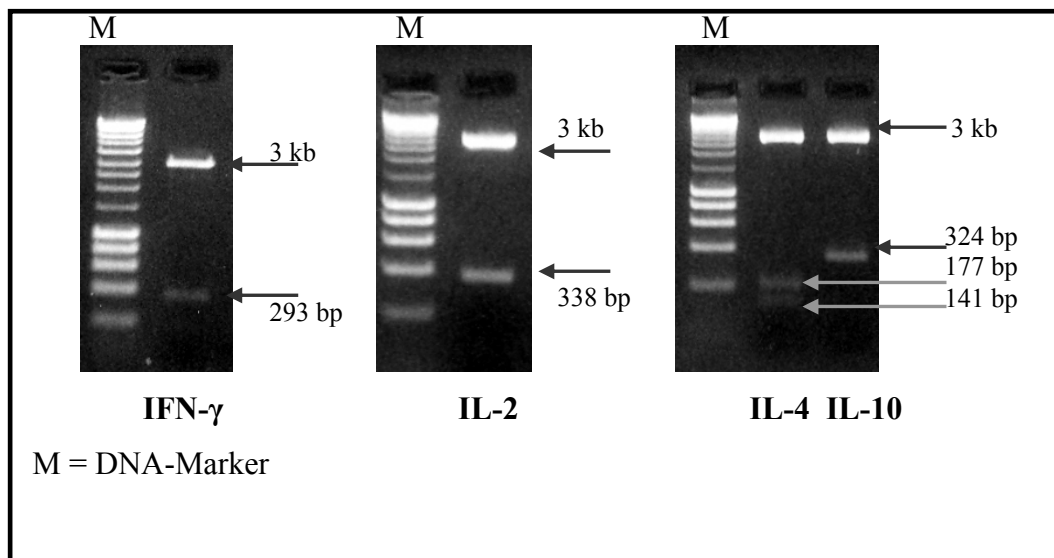


Abbildung 21: Restriktionsenzymanalysen mit *Eco* RI zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung (3 kb = Plasmid, 293 bp = IFN- γ , 338 bp = IL-2, 177 bp und 141 bp = IL-4, 324 bp = IL-10)

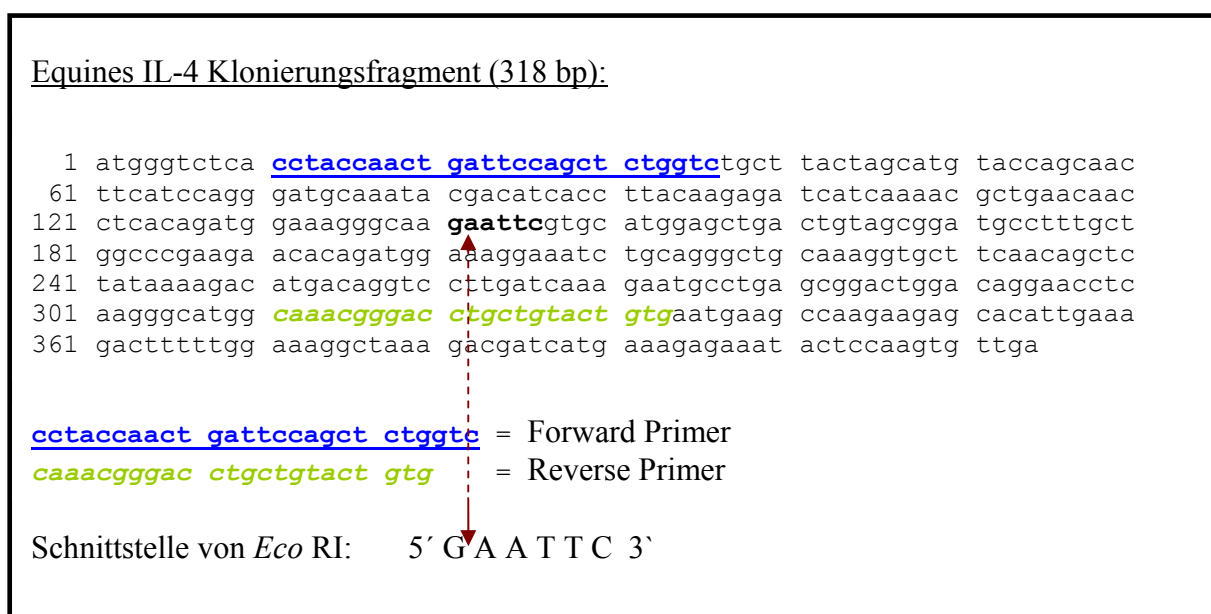


Abbildung 22: Schnittstelle von *Eco* RI im Klonierungsfragment vom equinen Interleukin-4 (GenBank Acc.-Nr.: AF305617; Mauel und Steinbach 2000)

4.2.4.2 Überprüfung der klonierten DNA-Sequenzen mittels Sequenzierung

Durch Klonierung wurden die ausgewählten equinen Zytokin-mRNA Sequenzen zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe für die TaqMan[®]-PCR vervielfältigt. Die klonierten Fragmente von Interferon- γ , Interleukin-2, -4 und -10 sowie β -Aktin und GAPDH wurden, wie unter dem Punkt 3.2.5.6.8 beschrieben, sequenziert. Das anschließende „Alignment“ der klonierten DNA-Sequenzen mit den equinen Zytokin-mRNA Sequenzen aus der Gendatenbank (NCBI, 1998 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) ergab in allen Fällen eine hundertprozentige Übereinstimmung.

4.2.5 Etablierung der TaqMan[®]-PCR

Für die Bestimmung der equinen Zytokin-mRNA-Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Applikation von Zylexis[®] bzw. Placebo sowie nach Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus, wurden Primer-Sonden-Systeme für die TaqMan[®]-PCR von IFN- γ , IL-2, -4, -10, β -Aktin und GAPDH des Pferdes etabliert.

4.2.5.1 Prüfung der Spezifität der ausgewählten Primer- und SONDENSEQUENZEN

Um zu überprüfen, ob das ausgewählte Primer-Sonden-System für die jeweilige Zytokin-mRNA Sequenz in der TaqMan[®]-PCR spezifisch nur die cDNA amplifiziert, wurden in die PCR cDNA und genomische DNA im Vergleich eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass nur eine Amplifikation von cDNA mit dem entsprechenden Primer-Sonden-System stattfand (Abb. 23).

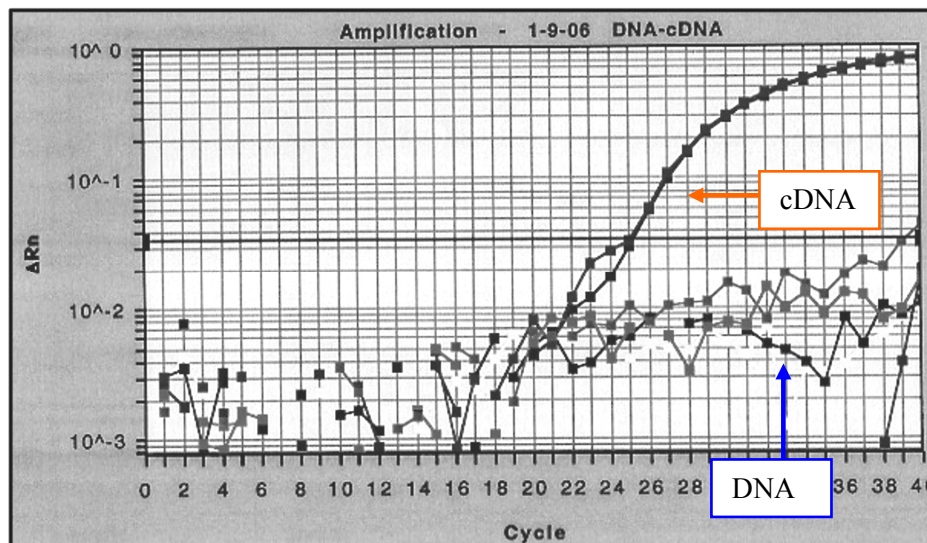


Abbildung 23: Amplifikationsgraph cDNA im Vergleich zur genomischen DNA für die equine IFN- γ -Sequenz

Darüber hinaus wurden die Amplifikationsbedingungen durch unterschiedliche Annealing-Temperaturen variiert. Dabei stellte sich heraus, dass ein Temperaturspektrum von $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ in den Annealing-Temperaturen keinen Einfluss auf die Amplifikation der cDNA hatte. Für jedes Zytokin konnte die TaqMan[®]-PCR unter den gleichen Bedingungen, mit einer Annealing-Temperatur von $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, durchgeführt werden (siehe 3.2.5.7.4).

Untersuchungen zum Einfluss der Primerkonzentration auf die PCR-Reaktion zeigten, dass Abweichungen nach oben und unten keine besondere Relevanz auf den Reaktionsverlauf ausübten. Hierbei wurden die beiden Primerpaare nach einer Kreuztabelle jeweils in einer Konzentration von $0,5\text{ }\mu\text{l}$, $1,5\text{ }\mu\text{l}$ und $4,5\text{ }\mu\text{l}$ miteinander kombiniert. Lediglich hohe Primerkonzentrationen führten dazu, dass der Schwellenwert (Ct-Wert) des Fluoreszenzsignals um einen Zyklus früher detektiert werden konnte.

In dem PCR-Reaktionsansatz erwies sich eine Primerkonzentration von jeweils $0,75\text{ }\mu\text{l}$ als geeignet.

4.2.5.2 Beurteilung der etablierten TaqMan[®]-PCR

Nach der erfolgreichen Etablierung der TaqMan[®]-PCR zur Messung equiner Zytokin-mRNA Sequenzen wurde das Nachweissystem zunächst validiert.

Zur Bestimmung der Varianz des Nachweissystems wurden die 6 Verdünnungsstufen der Plasmid-DNA (10^6 bis 10^1 Genomäquivalenten) als Doppelansatz in drei unabhängigen PCR-Läufen untersucht (interassay Varianz) sowie als Vierfachansatz in einem PCR-Lauf (intraassay Varianz). Die Darstellung der intra- und interassay Varianz erfolgte als Standardabweichung von den Ct-Werten der entsprechenden Plasmid-DNA Verdünnungsstufen (Tab. 16). Für alle untersuchten Proben zur Varianzbestimmung konnte eine Standardabweichung der Ct-Werte stets unter 1 festgestellt werden.

Aus der Steigung der Standardkurve der Plasmid-Verdünnungsstufen wurde die PCR-Effizienz ermittelt (Rasmussen 2001). Eine optimale „Real Time“-PCR Effizienz würde eine Verdopplung der Menge an PCR-Produkt pro Zyklus voraussetzen. Um zu verhindern, dass Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen und Referenzgen zu großen Expressionsunterschieden führen, werden die unterschiedlichen Effizienzen anhand von Berechnungsmodellen ermittelt. Die Effizienz berechnet sich nach folgender Formel: $E=10^{[-1/\text{Steigung}]}$ (Rasmussen 2001) und sollte Werte bis 2 annehmen. In Tabelle 17 sind die durchschnittlichen Steigungen der Standardkurven, ermittelt aus vier unabhängigen PCR-Läufen, und die daraus errechneten PCR-Effizienzen für jedes Zytokin aufgelistet.

Untersuchungen der Plasmid-Verdünnungsstufen ergaben für alle Zytokine eine lineare Standardkurve mit vergleichbaren Ermittlungsgrenzen (Abb. 24 und 25). Bei allen Reaktionsansätzen konnte bis zur letzten Verdünnungsstufe mit 10^1 Genomäquivalenten eine positive Amplifikation verzeichnet werden. Eine Auflistung der durchschnittlichen Ct-Werte in Verbindung mit der Plasmid-Konzentration gibt Tabelle 18 wieder.

Tabelle 16: Intra- und interassay Varianz der TaqMan[®]-PCR

Standardabweichung				
	Zytokin	10^6 GE	10^4 GE	10^2 GE
Intraassay	IFN- γ	0,17	0,76	0,96
	IL-2	0,06	0,09	0,3
	IL-4	0,07	0,44	0,29
	IL-10	0,09	0,64	0,73
Interassay	IFN- γ	0,41	0,50	0,83
	IL-2	0,37	0,66	0,81
	IL-4	0,16	0,42	0,74
	IL-10	0,32	0,97	0,24

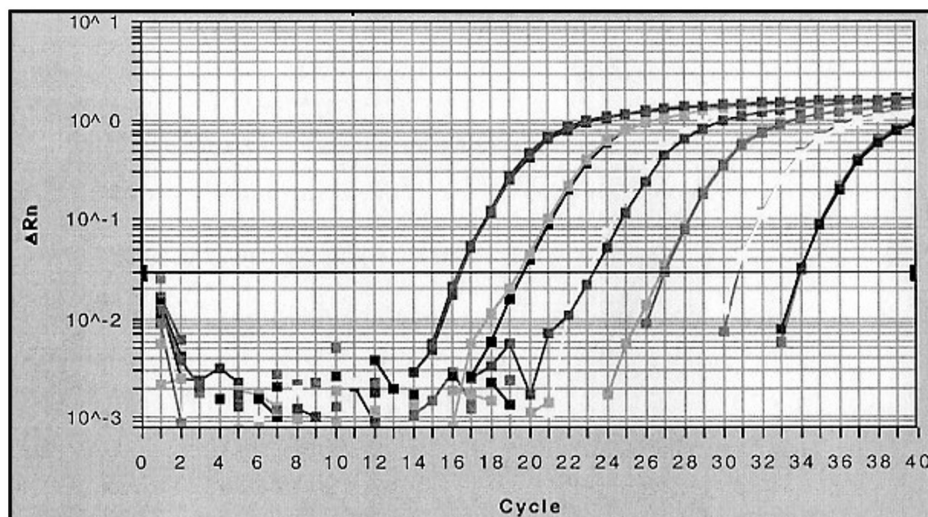
GE = Genomäquivalenten

Tabelle 17: Steigung der Standardkurven und PCR-Effizienzen

Zytokin	Steigung	Effizienz
IFN- γ	- 3,77	1,84
IL-2	- 3,56	1,90
IL-4	- 3,63	1,88
IL-10	- 3,63	1,88

Tabelle 18: Plasmid-Verdünnungsstufen und durchschnittliche Ct-Werte

Ct-Werte						
Plasmid-DNA Verdünnungsstufe	β -Aktin	GAPDH	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
10^6	18,23	15,25	18,23	15,75	15,54	15,34
10^4	24,90	21,80	27,07	22,44	22,93	22,72
10^2	31,39	29,35	34,42	29,15	31,17	29,61

**Abbildung 24:** Amplifikationsgraph am Beispiel von IL-2

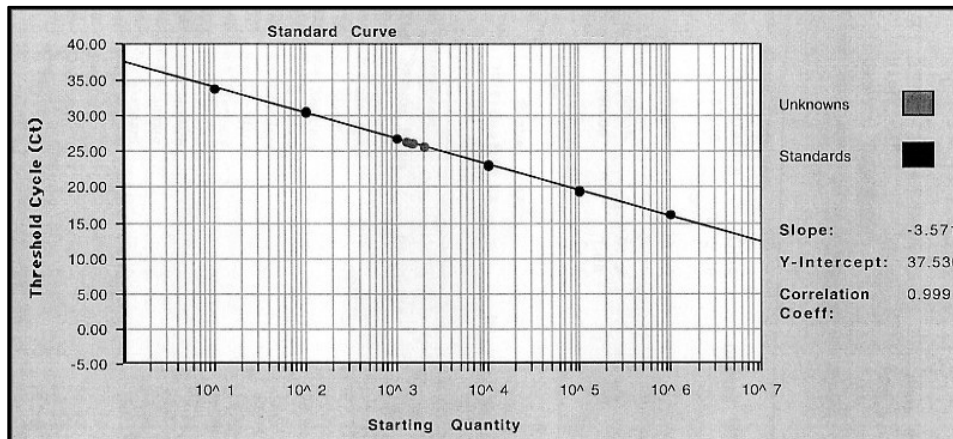


Abbildung 25: Standardkurve am Beispiel von IL-2

4.3 Untersuchung der humoralen Immunantwort auf EHV-1 und EHV-4 Antikörper nach Zylexis® - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin® NN plus

Von dem entnommenen Blut (siehe 3.2.2.2) wurde das Plasma im Verlauf der Studie serologisch mittels Neutralisationstest (siehe 3.2.3.2) und indirektem Immunfluoreszenztest (siehe 3.2.3.3) auf Antikörper gegen EHV -1 und EHV -4 untersucht. Eine tabellarische Auflistung der Untersuchungsergebnisse befindet sich im Anhang (9.1, A 2).

4.3.1 Verlaufsuntersuchungen der Antikörpertiter im Neutralisationstest (NT) und indirekten Immunfluoreszenztest (IFT)

Im Studienverlauf wurden insgesamt zu den 6 Untersuchungszeitpunkten 118 Blutproben serologisch mittels Neutralisationstest (NT) und indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) auf EHV-1 und EHV-4 Antikörper untersucht.

Im NT wurden insgesamt zu allen Untersuchungszeitpunkten bei 99 Blutproben (83,9%) der EHV-1 Antikörpertiter unter der Quantifizierungsgrenze von 1:10 nachgewiesen. Bei den EHV-4 Antikörpertitern lagen 104 Blutproben (88,2%) unter 1:10.

Ein EHV-1 Antikörpertiter von 1:10 konnte bei 18 Blutproben (15,3%) festgestellt werden und bei EHV-4 in 13 Fällen (11%). EHV-1 und -4 Antikörpertiter von 1:20 traten jeweils bei nur einer Blutprobe (0,8%) auf. Untersuchungen der Antikörpertiter im Studienverlauf mittels NT ergaben nach der Impfung am Versuchstag 0 einen Antikörpertiteranstieg um den

Faktor 2 bei vier Pferden gegen EHV-1, bei zwei Pferden gegen EHV-4 und bei einem Pferd gegen EHV-1 und -4.

Im IFT konnten bei allen untersuchten Pferden zu jedem Untersuchungszeitpunkt Antikörper gegen EHV-1 und EHV-4 nachgewiesen werden. Die Antikörpertiter lagen zwischen 1:320 und 1:20480. Auffällige EHV-1 Antikörpertiter von $> 1:2560$ im IFT wurden bei 41 Blutproben (34,8%) im gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen und bei den EHV-4 Antikörpertitern bei 39 Blutproben (33%). Nach der Impfung am Versuchstag 0 reagierten innerhalb von 14 Tagen 19 Pferde mit einem Titeranstieg gegen EHV-1 und EHV-4 um den Faktor 2 und mehr. Davon reagierte ein Pferd nur mit einem EHV-1 Antikörperanstieg und zwei Pferde nur mit einem EHV-4 Antikörperanstieg. Besonders auffällig war der EHV-1 und -4 Antikörperanstieg um den Faktor 4 am Versuchstag 7 bei „Ibiza“ sowie der EHV-1-Titeranstieg um den Faktor 4 bei „Goldfee“. „Genua“ zeigte am Versuchstag 14 einen EHV-1/-4 Titeranstieg um den Faktor 8. Titeranstiege können nur in Zusammenhang mit der Anamnese beurteilt werden. Die Pferde zeigten im Studienverlauf keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung. Der Anstieg der Antikörpertiter ist daher auf die Impfung zurückzuführen.

Im Folgenden sind die Verläufe der Antikörpertiter gegen EHV-1 und EHV-4 im NT und IFT für jedes Pferd graphisch dargestellt (Abb. 26 bis 29). Detaillierte Angaben befinden sich im Anhang (9.1, A2).

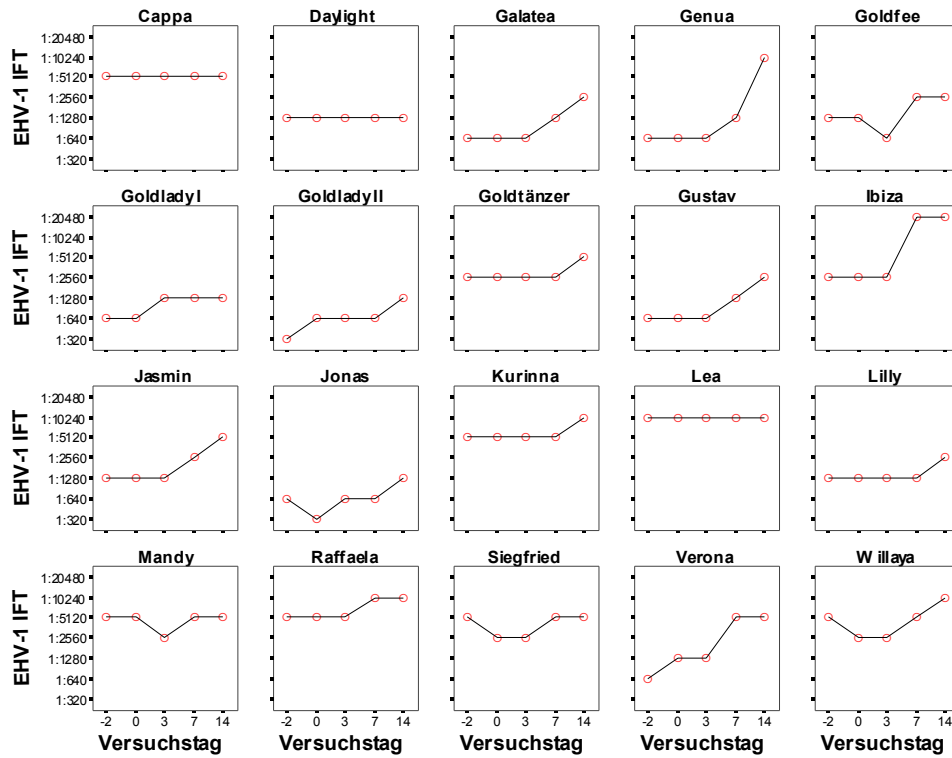


Abbildung 26: EHV-1 Antikörpertiter im IFT

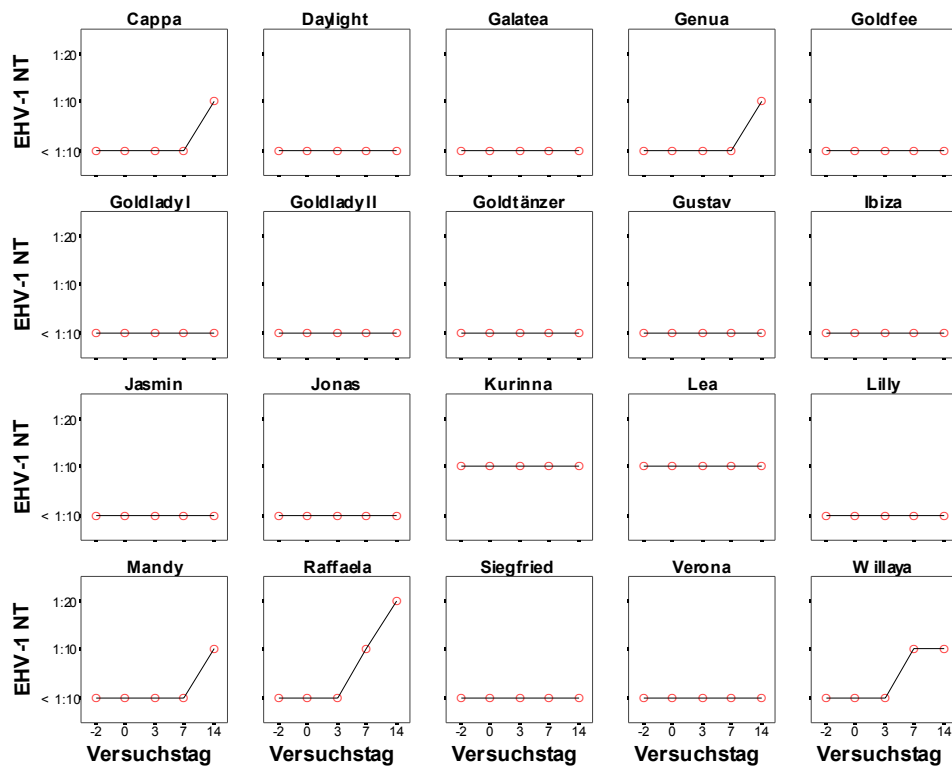


Abbildung 27: EHV-1 Antikörpertiter im NT

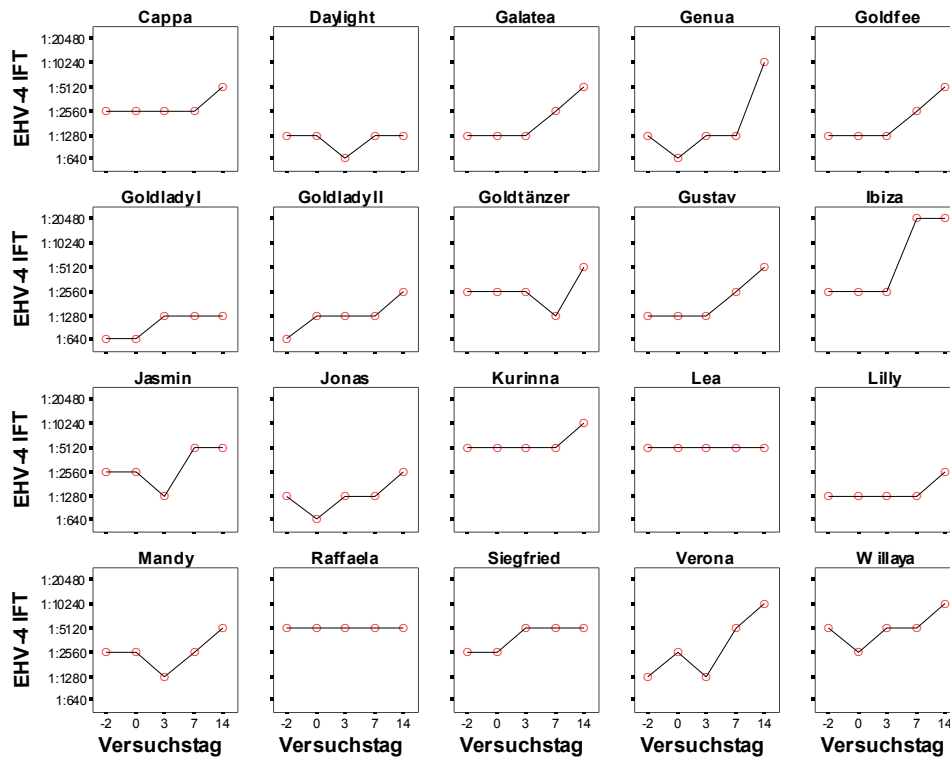


Abbildung 28: EHV-4 Antikörpertiter im IFT

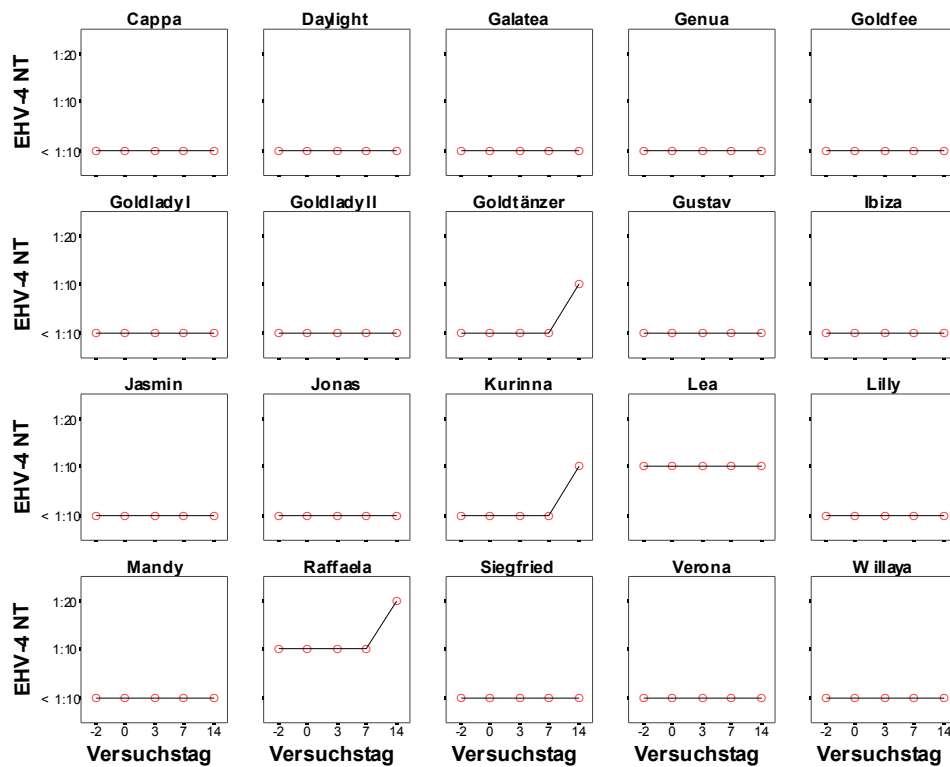


Abbildung 29: EHV-4 Antikörpertiter im NT

4.3.2 Vergleich der Antikörpertiterverläufe getrennt nach Zylexis- und Placebo-Gruppe

Von Interesse dabei war, ob eine humorale Immunantwort nach erfolgter Impfung messbar ist und ob ein Antikörperanstieg mit der Gabe von Zylexis® korreliert. Im Studienverlauf zeigten die Tiere keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung, so dass Veränderungen der Antikörpertiter als Reaktion auf die Impfung zu bewerten sind.

Innerhalb der Zylexis-Gruppe konnte beim EHV-1/-4 NT ein Antikörpertiteranstieg um den Faktor 2 bei 2 Pferden festgestellt werden. Ergebnisse der Antikörpertiter gegen EHV-1/-4 im IFT zeigten bei 10 Pferden der Zylexis-Gruppe einen Titeranstieg um den Faktor 2 und mehr. Davon konnte bei 2 Pferden ein Titeranstieg um den Faktor 4 am Versuchstag 7 verzeichnet werden.

In der Placebo-Gruppe kam es beim NT zu EHV-1/-4 Titererhöhungen um den Faktor 2 von 2 Pferden zum Versuchstag 14. Antikörperanstiege um mindestens den Faktor 2 gegen EHV-1/-4 im IFT konnten bei allen 9 Pferden der Placebo-Gruppe bis zum Versuchstag 14 verzeichnet werden. Davon zeigte ein Pferd einen Titeranstieg um den Faktor 8 (Tab. 19).

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Antikörpertiter gegen EHV -1 und EHV -4 in den beiden Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten sowie auf den maximalen Antikörperanstieg gegenüber dem Ausgangswert war nicht zu verzeichnen (U-Test, $p > 0,05$).

Tabelle 19: Häufigkeiten der EHV-1/-4 Antikörpertiter vor und nach der Impfung im Studienverlauf (Zylexis n = 11; Placebo n = 9)

		Anzahl der Pferde															
		2 d prä vac.*				3 d post vac.				7 d post vac.				14 d post vac.			
		Zylexis		Placebo		Zylexis		Placebo		Zylexis		Placebo		Zylexis		Placebo	
EHV		1	4	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4
NT	< 1:10	10	10	8	8	10	10	8	8	10	10	6	8	9	9	4	7
	1:10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	2	4	1
	1:20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
IFT	1:320	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:640	3	1	3	1	2	1	4	-	-	-	2	-	-	-	-	-
	1:1280	3	4	1	4	4	5	1	6	3	3	3	4	2	2	2	-
	1:2560	2	5	-	1	3	3	2	-	3	3	-	2	2	-	2	3
	1:5120	2	1	4	3	1	2	2	3	3	4	3	3	5	7	1	3
	1:10240	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	1	4	3
	1:20480	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-

* vac. = vaccinationem

4.3.3 Vergleich der Antikörpertiterverläufe getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung

Untersuchungen des Einflusses der unterschiedlichen Vorimmunisierung ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied (U-Test; $p > 0,05$) auf den maximalen Antikörperanstieg gegenüber dem Ausgangswert. Im NT konnte bis zum Versuchstag 14 eine Erhöhung der Antikörpertiter bei 4 Pferden aus der Resequin-Gruppe ($n = 8$) und bei 3 Pferden aus der Influenza-Gruppe ($n = 12$) festgestellt werden.

Aus der Gruppe Resequin zeigten im IFT insgesamt 7 Pferde eine Titererhöhung gegen EHV-1/-4 bis zum Versuchstag 14. Aus der Influenza-Gruppe reagierten 10 Pferde mit einer Erhöhung der Antikörpertiter.

4.3.4 Vergleich der Antikörpertiterverläufe getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht

Die Untersuchung des Einflusses von Alter und Geschlecht der Pferde auf den maximalen Antikörperanstieg gegenüber dem Ausgangswert erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied (U-Test; $p > 0,05$). Insgesamt konnte beim NT ein Anstieg der Antikörpertiter bei 2 Pferden „bis 4 Jahre“ ($n = 10$) verzeichnet werden und bei 5 Pferden „über 4 Jahre“ ($n = 10$). Beim IFT wurde insgesamt bis zum Versuchstag 14 bei 8 Pferden „bis 4 Jahre“ ein Antikörperanstieg gemessen und bei 7 Pferden aus der Gruppe „über 4 Jahre“.

4.4 Untersuchung der PBMC-Anzahl und des Immunstatus nach Zylexis[®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus

4.4.1 Bestimmung der Anzahl der equinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Im Verlauf der Studie wurde zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten nach der Präparation der peripheren mononukleären Blutzellen (siehe 3.2.4.1) aus 30 ml EDTA-Pferdeblut die absolute Anzahl der PBMC ermittelt (siehe 3.2.4.2).

In der Abbildung 30 sind die Einzelverläufe der PBMC-Anzahl im Studienverlauf für jedes Pferd wiedergegeben. Insgesamt war ersichtlich, dass das Niveau der PBMC-Anzahl individuell bedingt ist. Bei insgesamt 16 Pferden (80%) von 20 konnte ein Anstieg der PBMC-Anzahl im Studienverlauf verzeichnet werden (9.1; A3).

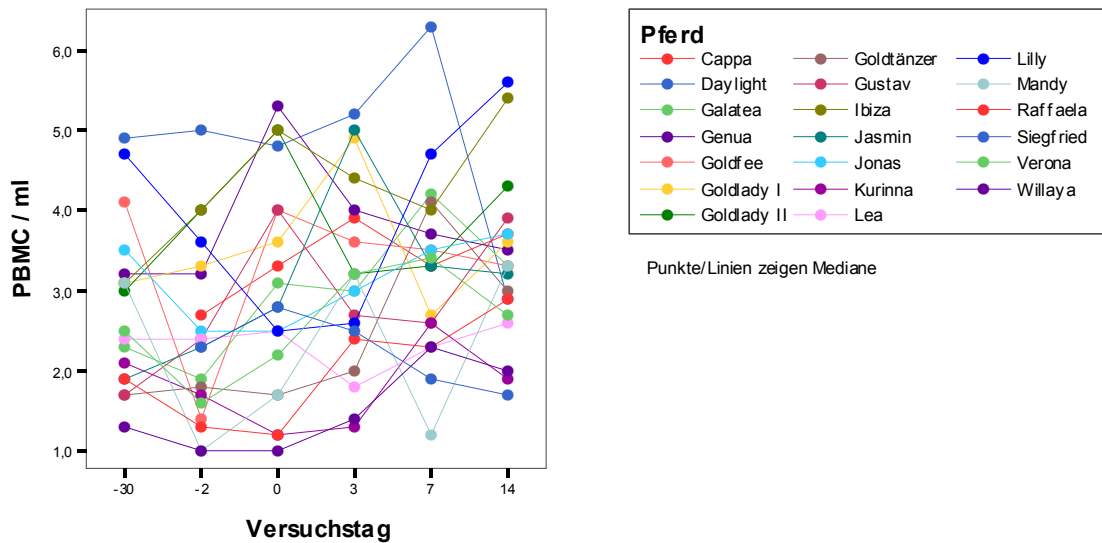


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Anzahl der equinen PBMC/ml (n = 20 Pferde)
 (PBMC / ml = Zellzahl x 10⁷ / ml)

4.4.2 Vergleich der PBMC-Anzahl in den Gruppen Zylexis und Placebo

Durch Bildung von Differenzen der gemessenen PBMC-Anzahl zum Ausgangswert (Versuchstag -30) zeigte sich, dass die Zylexis-Gruppe im Mittel über der Placebo-Gruppe lag (U-Test, p < 0,045). In der Placebo-Gruppe befanden sich ungefähr gleich viele Tiere unterhalb und oberhalb des Ausgangswertes im Verlauf der Studie, in der Zylexis-Gruppe lagen 78,1 % der Tiere nicht unterhalb des Ausgangswertes (Abb. 31).

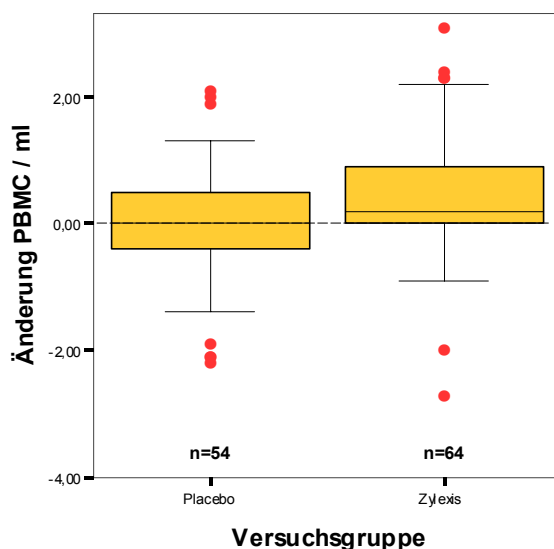


Abbildung 31: Änderung der Anzahl der equinen PBMC/ml getrennt nach Zylexis- und Placebo-Gruppe (PBMC / ml = Zellzahl x 10⁷ / ml)

4.4.3 Vergleich der PBMC-Anzahl getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung

Zur Überprüfung, ob die Art der Vorimmunisierung einen Einfluss auf die PBMC-Anzahl ausübt, wurde die Änderung der Zellzahl im Studienverlauf dahingehend getrennt nach Influenza- und Resequin-Impfung untersucht. Bei Betrachtung der Anzahl an equinen PBMCs zu den einzelnen Versuchstagen zeigten die Pferde der Influenza-Gruppe an den Tagen -2, 0, 7 und 14 stets statistisch signifikant höhere Zellzahlen als die Resequin-Gruppe (Abb. 32). Jedoch konnte für beide Arten der Vorimmunisierung keine statistisch signifikante Veränderung der Zellzahl im Vergleich zum Ausgangswert im gesamten Studienzeitraum beobachtet werden (U-Test, $p > 0,05$). In der Abbildung 33 sind die Änderungen der PBMC-Anzahl beschrieben. Hierbei fällt auf, dass die Tiere der Influenza-Gruppe eine größere Differenz in der PBMC-Anzahl zeigen.

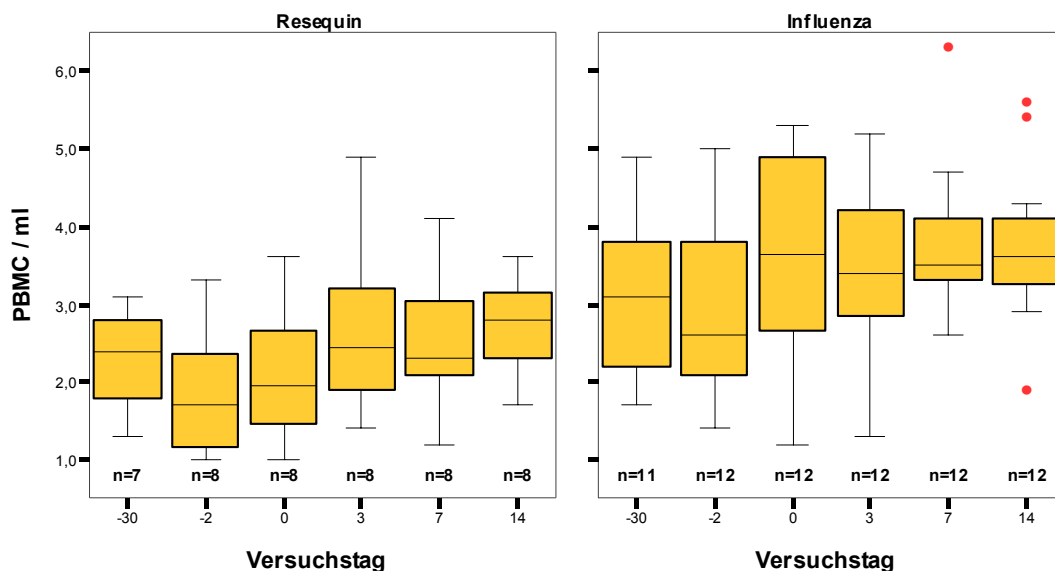


Abbildung 32: Verlauf der PBMC-Anzahl getrennt nach Resequin- und Influenza-Gruppe

(PBMC / ml = Zellzahl x 10^7 / ml)

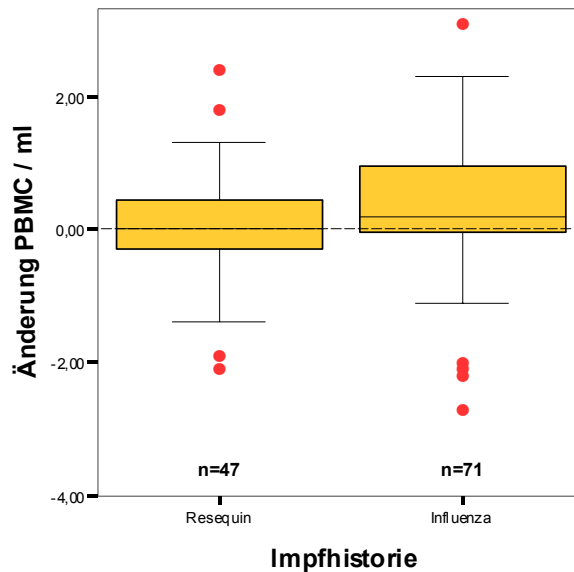


Abbildung 33: Änderung der PBMC-Zahl/ml getrennt nach Resequin- und Influenza-Gruppe (PBMC / ml = Zellzahl x 10^7 / ml)

4.4.4 Vergleich der PBMC-Anzahl getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht

Für die Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses des Alters auf die Anzahl der equinen PBMC wurden die Pferde in Alterskategorien „bis 4 Jahre“ und „über 4 Jahre“ eingeteilt.

Beim Vergleich der einzelnen Versuchstage untereinander ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der PBMC-Anzahl zwischen den beiden Altersgruppen zum Versuchstag 0 (U-Test; $p = 0,035$), Versuchstag 7 ($p = 0,005$) und zum Versuchstag 14 ($p = 0,028$). Aus der Abbildung 34 ist zu ersehen, dass bei den Tieren „bis 4 Jahre“ im Studienverlauf eine höhere Anzahl equiner PBMC nachgewiesen werden konnte.

Das Alter erbrachte hinsichtlich der Differenz zum Ausgangswert keinen statistisch signifikanten Unterschied (U-Test, $p > 0,05$). In der Abbildung 35 sind die Änderungen der PBMC-Anzahl beschrieben.

Das Geschlecht der Tiere zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl der peripheren Blutleukozyten.

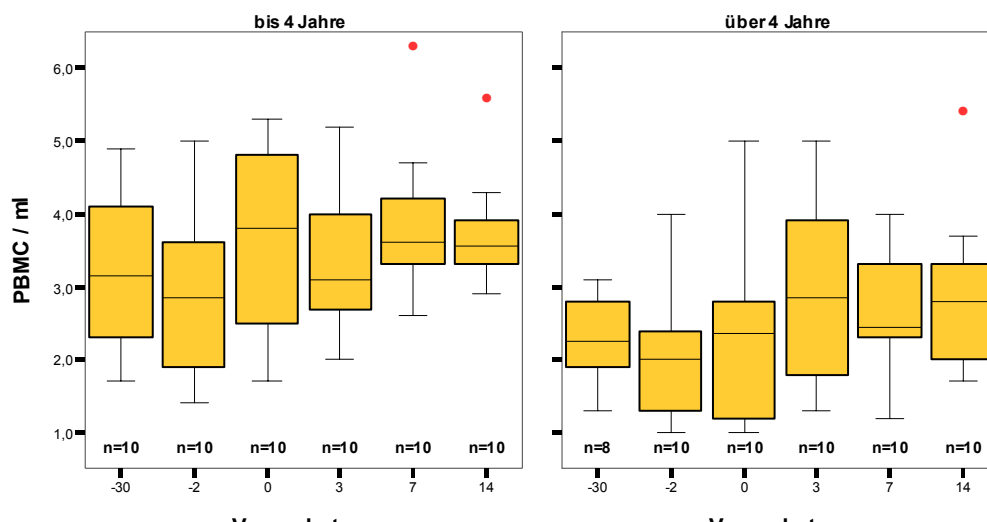


Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der PBMC-Anzahl in den Gruppen bis / über 4 Jahre
(n = 10) [PBMC/ml = Zellzahl x $10^7 / \text{ml}$]

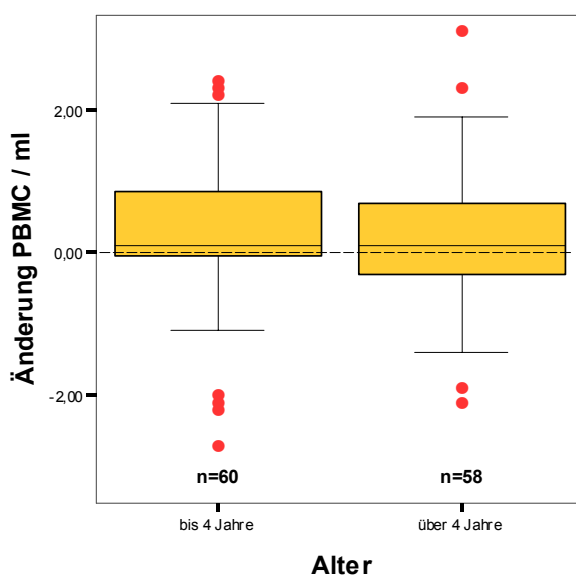


Abbildung 35: Änderung der PBMC-Anzahl getrennt nach Altersgruppen
(PBMC/ml = Zellzahl x $10^7 / \text{ml}$)

4.4.5 Bestimmung des Immunstatus durch die Firma LABOKLIN bei Erstuntersuchung und nach Zylexis[®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus

Für die Ermittlung des Immunstatus wurde die Anzahl der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen zu den Versuchstagen -30 und 0 durch das Labor LABOKLIN (Bad Kissingen) unter Verwendung der Durchflusszytometrie bestimmt. Ein genaue Auflistung der Daten befindet sich im Anhang (9.1; A4).

In der Tabelle 20 ist die Anzahl an B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen zu den Versuchstagen -30 und 0 aufgelistet. Besonders auffällig waren die Messwerte der CD8⁺-Zellen. Zum Versuchstag -30 lagen bei 15 Pferden die Werte unterhalb des Referenzbereichs und zum Versuchstag 0 zeigten 10 Pferde Werte oberhalb des Referenzbereichs. Abbildung 36 gibt die Anzahl der Zellen als Einzelverläufe pro Tier wieder. Dabei ist ersichtlich, dass die Zellzahlen zwischen den Tieren unterschiedliche Streuungen aufwiesen. Nur bei den CD8⁺-Zellen waren die Werte am Versuchstag -30 bei allen Tieren einheitlich niedrig und alle Tiere zeigten einen Anstieg der Zellzahl am Versuchstag 0. Für die Messwerte der Zellzahlen von den T-Zellen, B-Zellen und CD4⁺-Zellen der Versuchstage -30 und 0 konnte mittels Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben statistisch keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p > 0,5$). Hingegen dazu war der Anstieg der CD8⁺-Zellen von Versuchstag -30 zu Versuchstag 0 statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Tabelle 20: Übersicht Immunstatus (n = 18 Pferde)

Zellen (Versuchstag)	Anzahl der Pferde		
	im Referenz- bereich	unterhalb	oberhalb
T-Zellen (-30)	2	--	16
T-Zellen (0)	4	--	14
CD4 ⁺ -Zellen (-30)	5	2	11
CD4 ⁺ -Zellen (0)	5	--	13
CD8 ⁺ -Zellen (-30)	2	15	1
CD8 ⁺ -Zellen (0)	8	--	10
B-Zellen (-30)	4	--	14
B-Zellen (0)	8	1	9

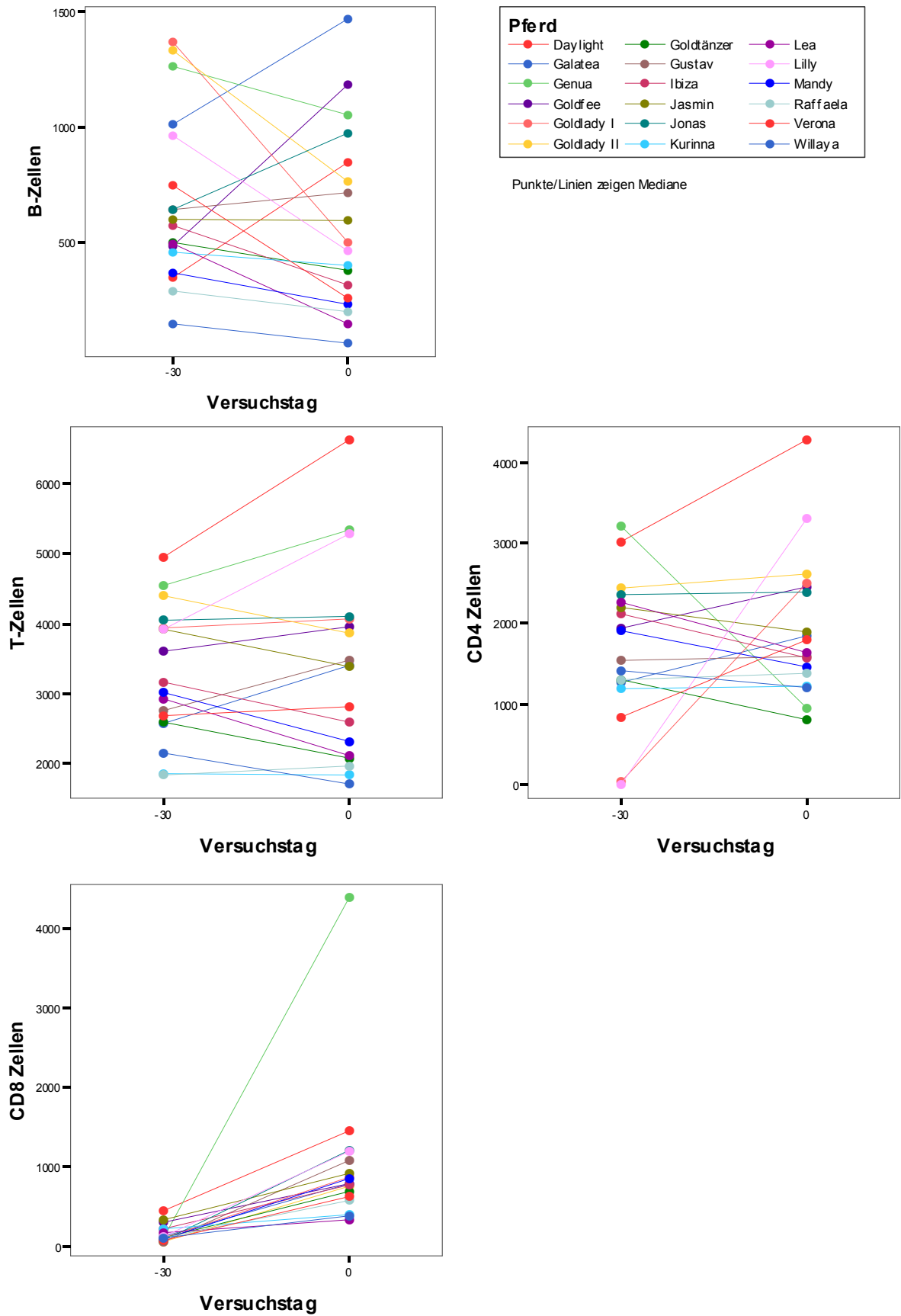


Abbildung 36: Einzeltierverläufe der Anzahl der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen
(Zellzahl in Mega/l = Zellzahl x 10⁶ / Liter)

4.4.6 Vergleich des Immunstatus zwischen der Placebo- und Zylexis-Gruppe

Bei der Überprüfung der Änderungen der Lymphozytenpopulationen (B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen) an den Versuchstagen -30 und 0 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (U-Test, $p > 0,05$).

Beide Gruppen zeigten bei den B-Zellen, T-Zellen und CD4⁺-Zellen nur geringe Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert. Der Median dieser Zellzahlen lag hier bei Null (Abb. 37). Deutliche Veränderungen waren dagegen in beiden Gruppen bei den CD8⁺-Zellen zu beobachten, da alle Werte angestiegen waren und eine positive Differenz aufwiesen.

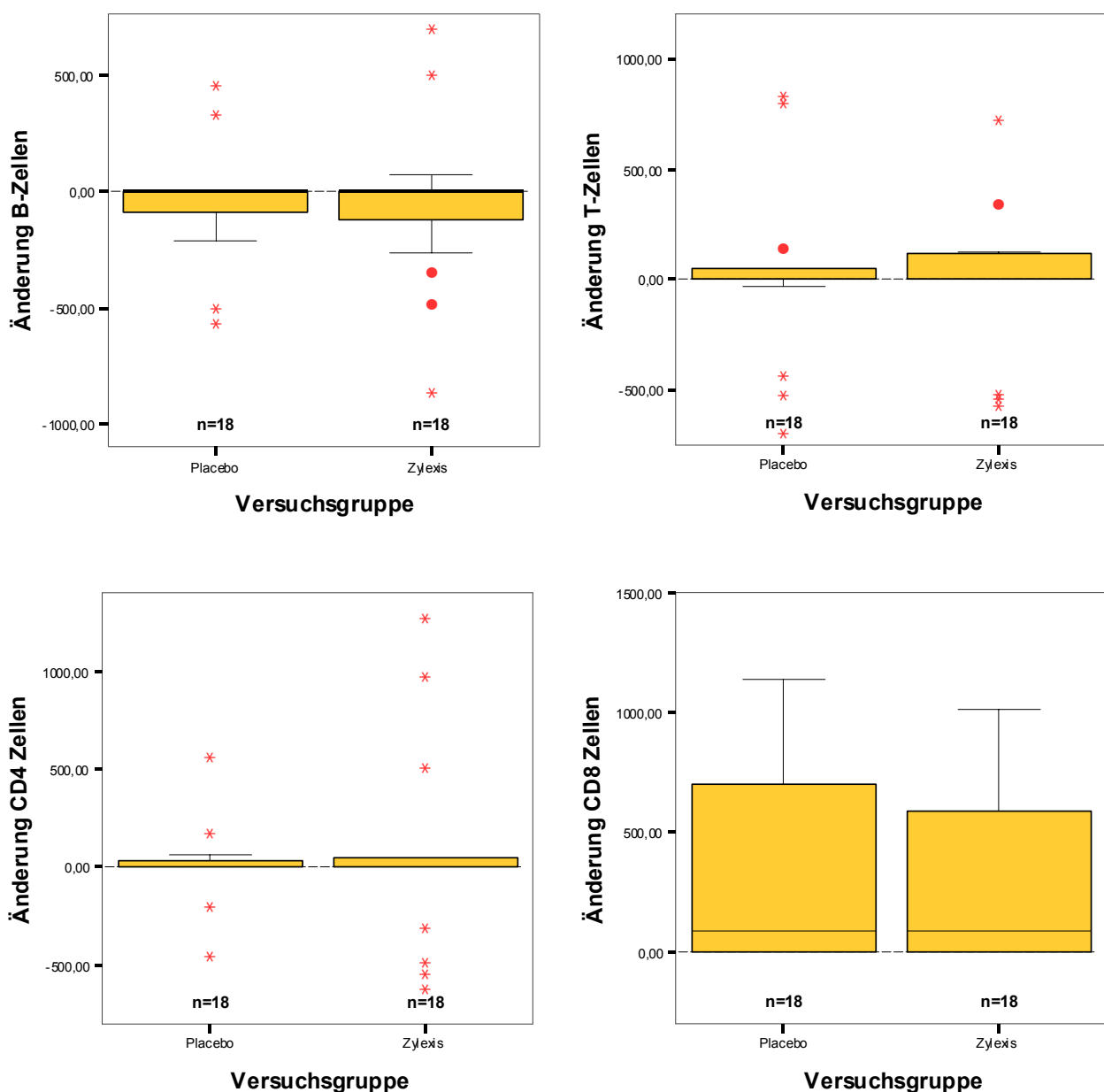


Abbildung 37: Änderung des Immunstatus getrennt nach Zylexis- und Placebo-Gruppe
(Zellzahlen in Mega/l = Zellzahl x 10⁶ / Liter)

4.4.7 Vergleich des Immunstatus getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung

Unter Berücksichtigung der einzelnen Versuchstage zeigte die Influenza-Gruppe höhere Zellzahlen der T-Zellen, CD8⁺-Zellen und B-Zellen am Versuchstag 0 im Vergleich zu der Resequin-Gruppe. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant (U-Test; $p = 0,02$; $p = 0,02$; $p < 0,001$) und sind im Folgenden graphisch dargestellt (Abb. 38).

Bei der Bildung der Differenz vom Versuchstag 0 zum Versuchstag -30 konnte keine statistisch signifikante Änderung der Zellzahlen festgestellt werden (U-Test, $p > 0,05$).

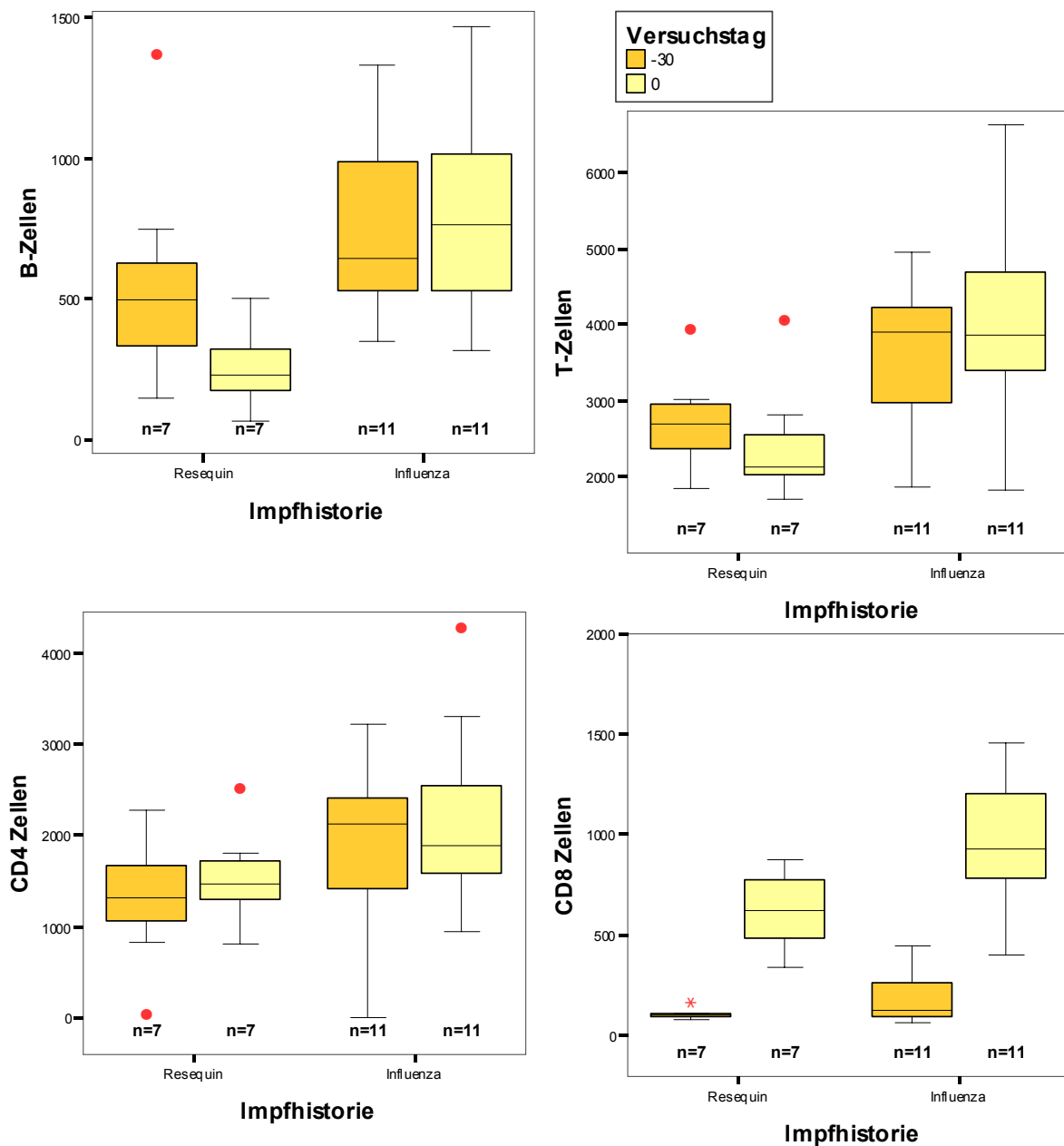


Abbildung 38: Immunstatus zum Versuchstag -30 und 0 in den Gruppen Resequin und Influenza (Zellzahlen in Mega/l = Zellzahl x 10⁶ / Liter)

4.4.8 Vergleich des Immunstatus getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht

Bei Betrachtung der einzelnen Versuchstage zeigte die Gruppe „bis 4 Jahre“ statistisch signifikant höhere Zellzahlen bei den T-Zellen am Versuchstag -30 und 0 (U-Test; $p = 0,034$; $p < 0,001$), bei den $CD8^+$ -Zellen am Versuchstag 0 ($p = 0,008$) und bei den B-Zellen am Versuchstag -30 und 0 ($p = 0,026$; $p < 0,001$). Darüber hinaus zeigte die Gruppe Pferde „bis 4 Jahre“ im Mittel höhere Werte bei den $CD4^+$ -Zellen.

In der Gruppe der Pferde „über 4 Jahre“ konnte eine Reduktion der T-Zellen, $CD4^+$ -Zellen und B-Zellen am Versuchstag 0 beobachtet werden.

Zusätzlich zeigten beide Altersgruppen eine Zunahme der $CD8^+$ -Zellen.

Die statistische Prüfung der Änderung der Zellzahl im Vergleich zum Ausgangswert ergab bei der Anzahl der T-Zellen zwischen den beiden Altersgruppen ein statistisch signifikanten Unterschied (U-Test, $p = 0,013$). Der Median beider Altersgruppen lag bei Null, jedoch wiesen die Tiere „bis 4 Jahre“ zu ca. 75% positive Differenzen auf, während die älteren Tiere zu etwa 75% negative Differenzen in der Zellzahl hatten (Abb. 39).

Unterschiede beim Geschlecht konnten nicht festgestellt werden.

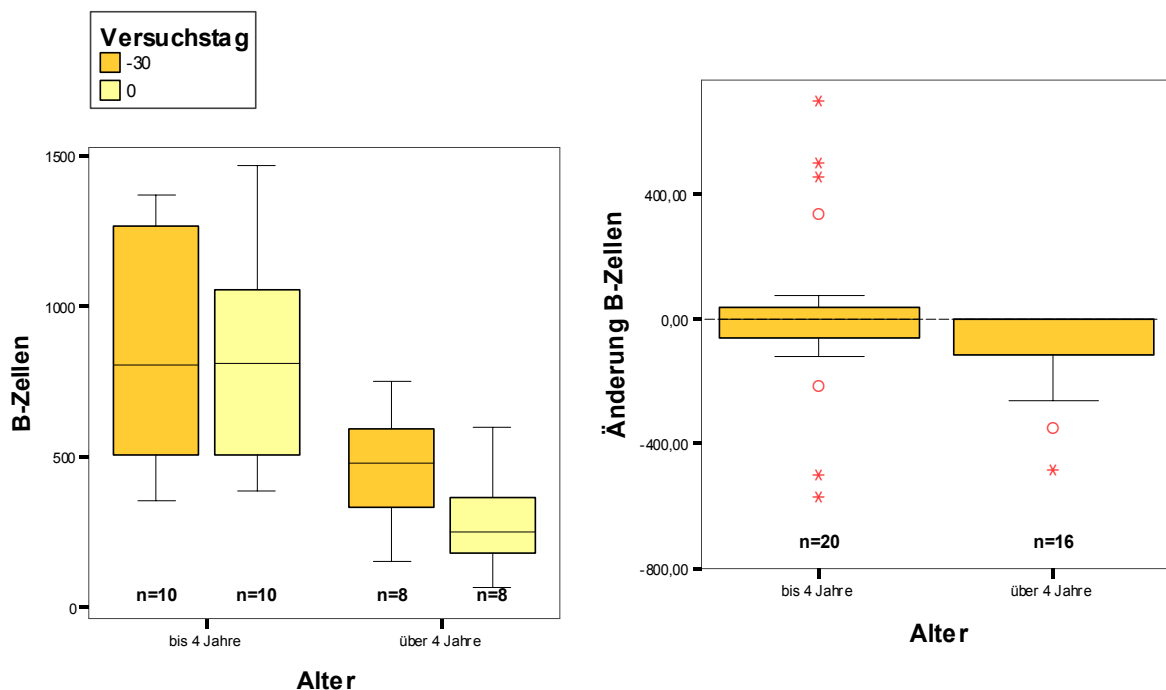
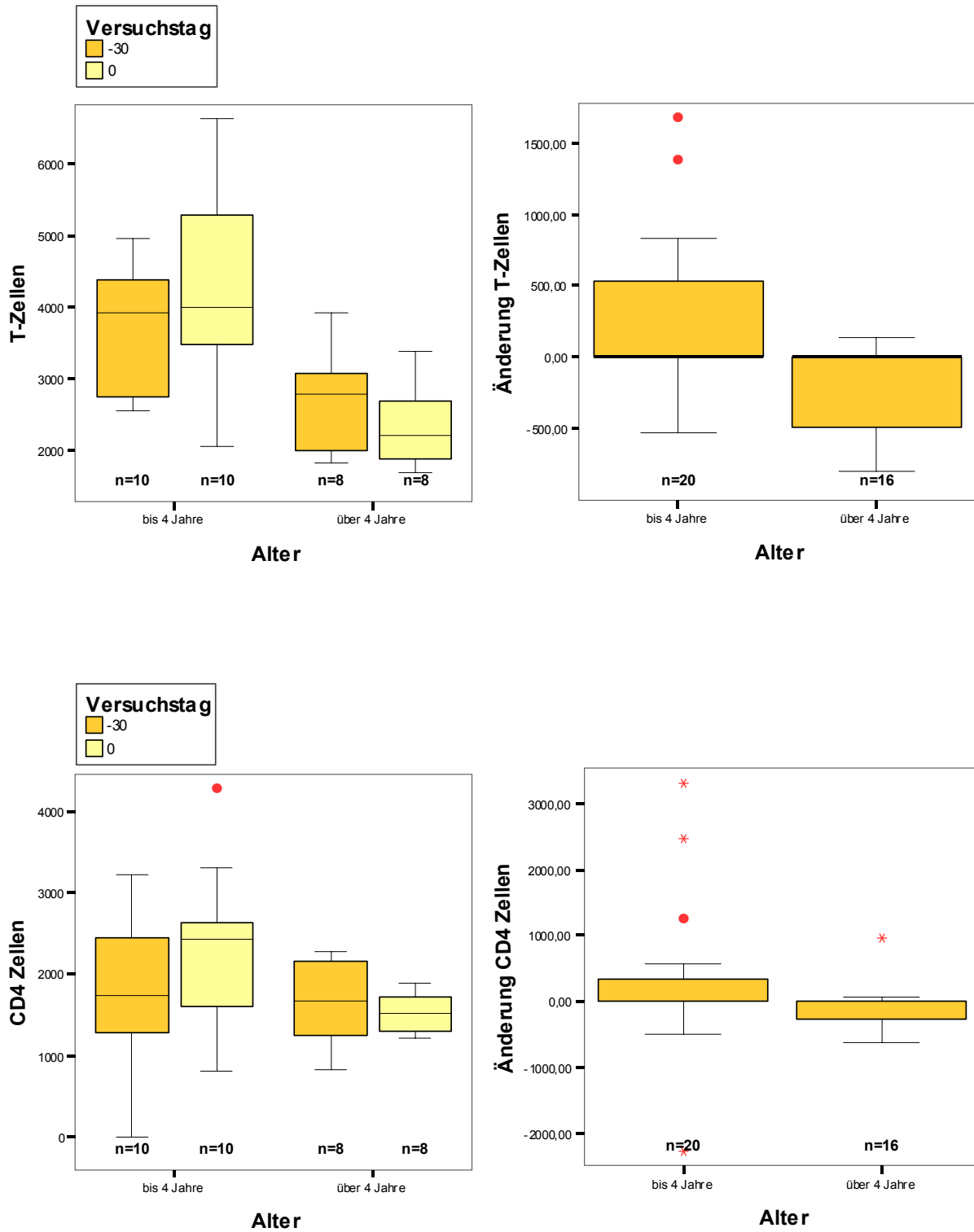
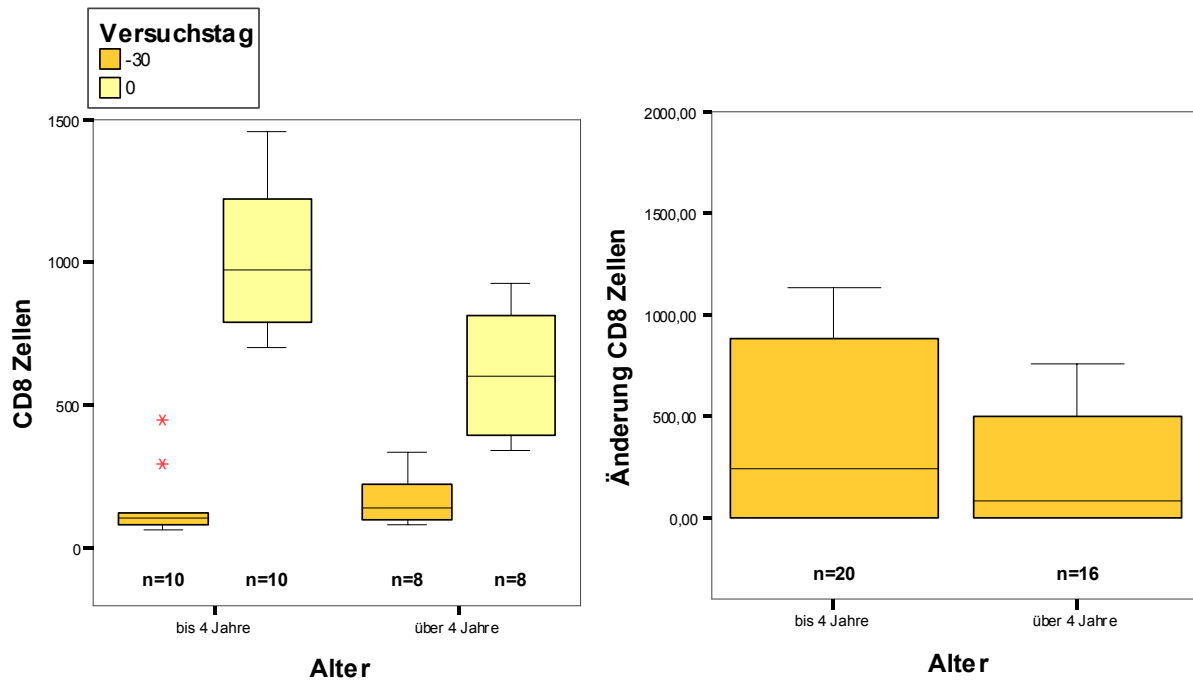


Abbildung 39: Änderung und Verlauf der Anzahl der B-, T-, $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen getrennt nach Altersgruppen (Zellzahlen in Mega/l = Zellzahl $\times 10^6$ / Liter)



Fortsetzung Abbildung 39: Änderung und Verlauf der Anzahl der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺- Zellen getrennt nach Altersgruppen
(Zellzahlen in Mega/l = Zellzahl x 10⁶ / Liter)



Fortsetzung Abbildung 39: Änderung und Verlauf der Anzahl der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen getrennt nach Altersgruppen
(Zellzahlen in Mega/l = Zellzahl x 10⁶ / Liter)

4.5 Untersuchung der Zytokin-mRNA Expression nach Zylexis[®] - / Placebo-Applikation und Vakzinierung mit Resequin[®] NN plus

4.5.1 Vergleich der Zytokinmesswerte zwischen den Housekeeping Genen

Die absoluten mRNA-Mengen wurden gegen die Housekeeping Gene equines β -Aktin und equines GAPDH normalisiert und mittels Regressionsanalyse nach Passing und Bablok verglichen (Passing und Bablok 1983; Bablok et al. 1988).

In den Abbildungen 40 bis 43 ist für jedes Zytokin die Passing und Bablok Regression wiedergegeben. Hierfür wurden die Zytokinmesswerte zur Basis 10 logarithmiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bei IFN- γ und IL-2 das 95%-Konfidenzintervall der Steigung der Geraden die 1 enthält, d.h. im Mittel von einer Verschiebung der Geraden um eine Konstante zur 45° Geraden ausgegangen werden kann. Hingegen zeigten die Geraden von IL-4 und IL-10 eine von 1 verschiedene Steigung der Geraden, was bedeutet, dass für eine Berechnung der Werte die Gerade mit berücksichtigt werden muss. Eine Auflistung der Ergebnisse ist in Tabelle 21 wiedergegeben.

Die positiven Spearman'schen Rang Korrelationskoeffizienten (R) deuten darauf hin, dass mit zunehmenden Werten der β -Aktin Proben auch tendenziell höhere GAPDH-Werte erwartet werden können. Diese Untersuchungen des Zusammenhanges zwischen der Zytokinexpression mit β -Aktin vs. GAPDH waren sämtlich deutlich und statistisch signifikant.

Anhand dieser Regressionen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, aus den Werten des einen Housekeeping Gens die Werte des anderen zu berechnen. Im Folgenden wurde aufgrund dieser Aussage die Auswertung der Zytokinexpression mit dem Housekeeping Gen β -Aktin durchgeführt.

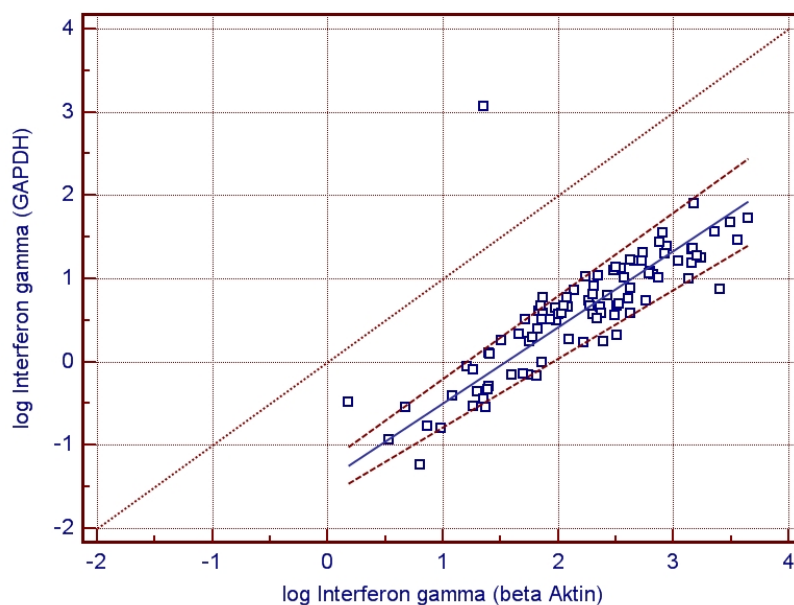


Abbildung 40: Regression nach Passing und Bablok für das Interferon- γ

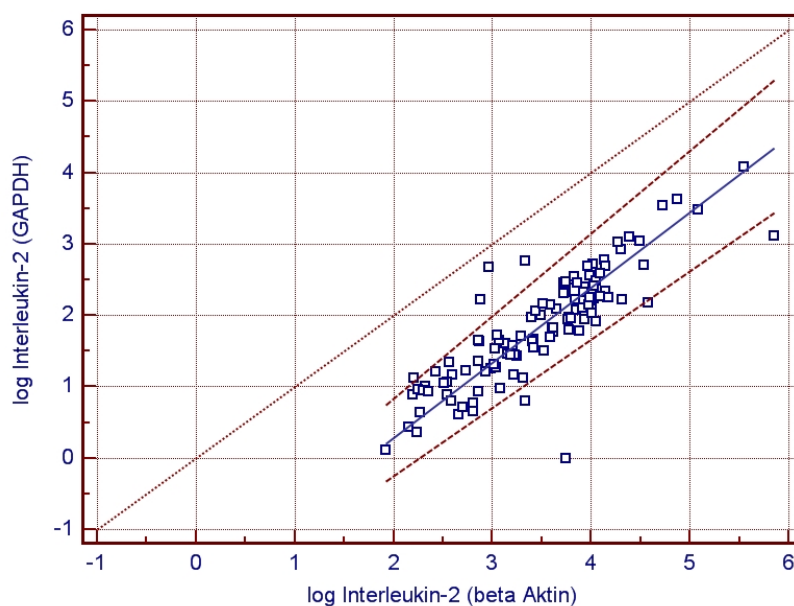


Abbildung 41: Regression nach Passing und Bablok für das Interleukin-2

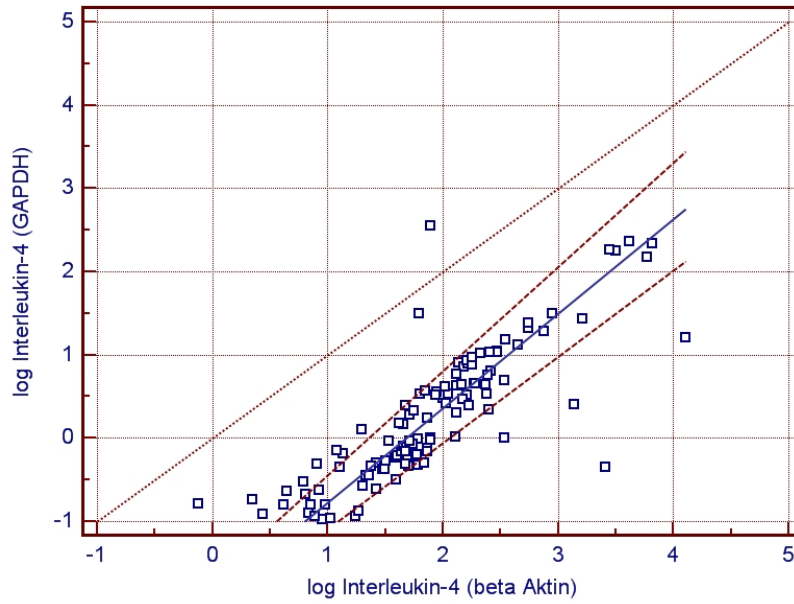


Abbildung 42: Regression nach Passing und Bablok für das Interleukin-4

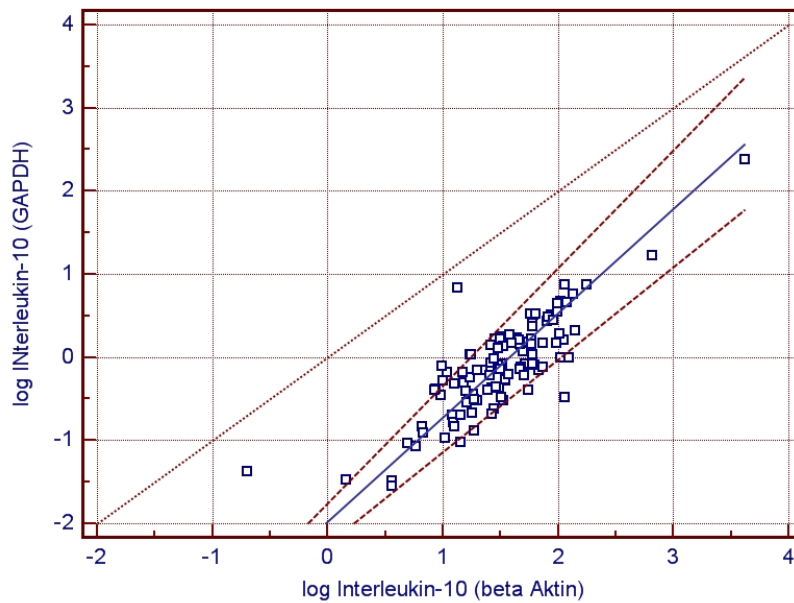


Abbildung 43: Regression nach Passing und Bablok für das Interleukin-10

Tabelle 21: Ergebnisse Methodenvergleich nach Passing und Bablok

	IFN- γ (GAPDH)/ IFN- γ (β -Aktin)	IL-2 (GAPDH) / IL-2 (β -Aktin)	IL-4 (GAPDH)/ IL-4 (β -Aktin)	IL-10 (GAPDH)/ IL-10 (β -Aktin)
Regressions- gleichung	$y = -1,407 + 0,912 x$	$y = -1,821 + 1,054 x$	$y = -1,910 + 1,134x$	$y = 1,976 + 1,254x$
Schnittpunkt (Intercept)	-1,4078	-1,8219	-1,9104	-1,9768
95% Konfidenz- intervall	-1,6132 - -1,2076	-2,1790 - -1,4861	-2,1243 - -1,6879	-2,2427 - -1,7570
Steigung (Slope)	0,9129	1,0540	1,1349	1,2544
95% Konfidenz- intervall	0,8266 - 1,0008	0,9601 - 1,1590	1,0333 - 1,2490	1,1106 - 1,4139
Spearman Korrelations- koeffizient (R)	0,9536	0,8126	0,8460	0,7591

4.5.2 Bestimmung des absoluten mRNA-Gehaltes von IFN- γ , Interleukin-2, -4 und -10 in den equinen peripheren mononukleären Blutzellen (*ex vivo*)

Im Studienverlauf wurde die absolute mRNA-Menge von IFN- γ , Interleukin-2, -4 und -10 in Blutproben von Pferden untersucht. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, ob die ausgewählten Zytokin-mRNA-Gehalte direkt aus den präparierten equinen peripheren mononukleären Blutzellen *ex vivo* überhaupt messbar sind und im Folgenden, ob der Immunmodulator Zylexis[®] und der Impfstoff in Kombination Einfluss auf die absolute Zytokin-mRNA-Menge haben.

Die ausgewählten Zytokine konnten mit Hilfe des TaqMan[®]-Detektionssystems direkt aus den präparierten peripheren Blutleukozyten (*ex vivo*) erfolgreich detektiert werden. Insgesamt stellte sich heraus, dass z. T. eine große Streuung der Zytokinmesswerte innerhalb und zwischen den Einzeltieren vorlag (Abb. 44). Bei Interferon- γ lagen bei 5 Pferden die Werte zu jedem Zeitpunkt der Studie jeweils unterhalb der Nachweisgrenze von 10^1 Kopien/ μ l. Interleukin-10 zeigte eine etwas geringere Streuung der Messwerte bei den Einzeltieren.

Die Beurteilung der statistischen Signifikanz der Zytokinmesswerte für die unterschiedlichen Gruppen erfolgte anhand der *ex vivo* Messwerte, die mit den Housekeeping Genen GAPDH und β -Aktin ermittelt wurden. Unterschiede in der statistischen Auswertung konnten

zwischen den beiden Housekeeping Genen nicht festgestellt werden. Aufgrund der Ergebnisse im Kapitel 4.5.1 erfolgte die weitere Darstellung der Zytokinexpression anhand der Werte für β -Aktin. Die statistischen Analysen erfolgten auf Basis der betragsmäßig größten Differenz eines jeden Tieres zu dem Ausgangswert, wobei das Vorzeichen wieder berücksichtigt wurde. Über die größte Auslenkung des Tieres wurden die Gruppen miteinander verglichen. Eine genaue Auflistung der Zytokinmesswerte *ex vivo* für β -Aktin befindet sich im Anhang (9.1; A5).

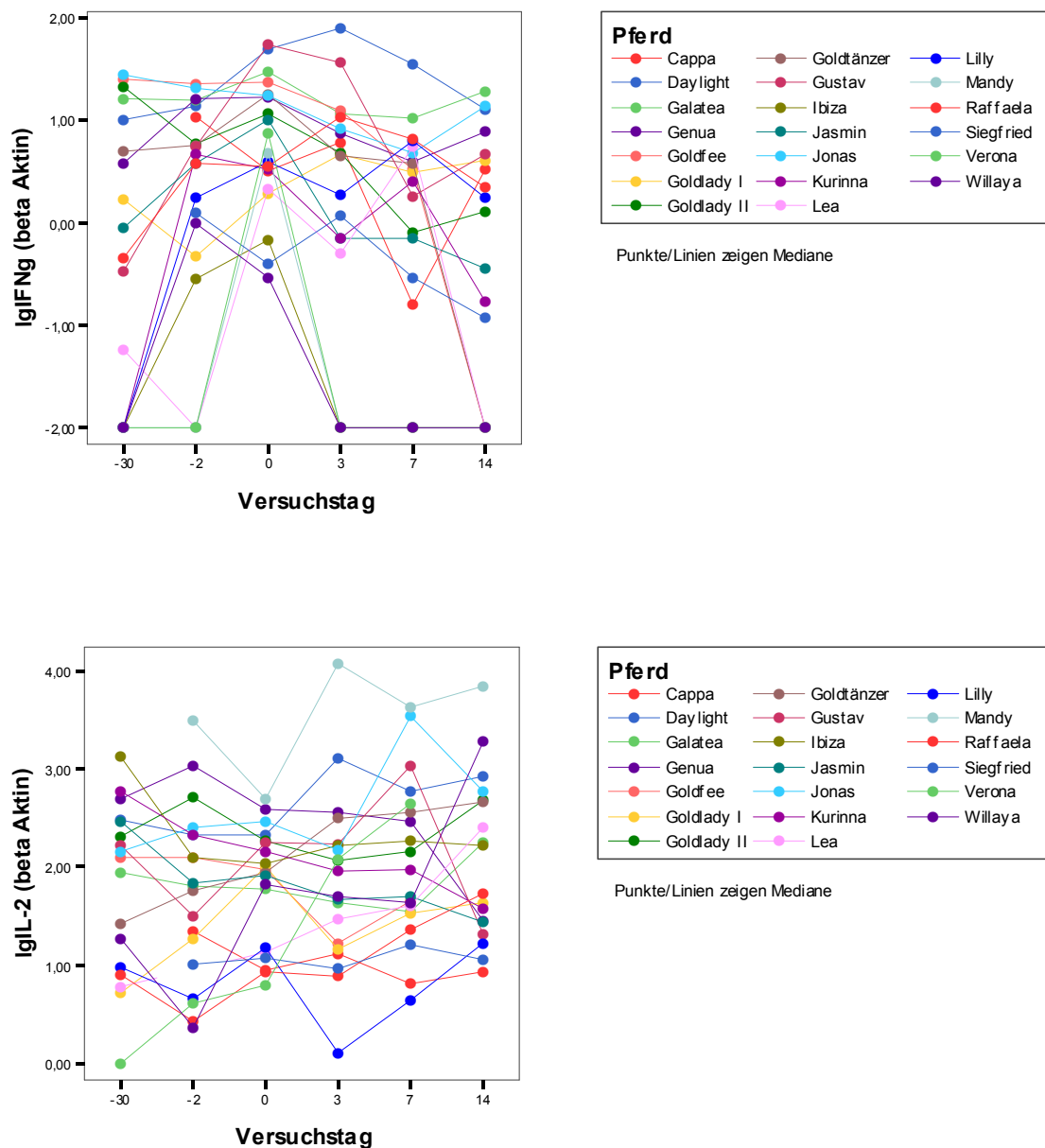
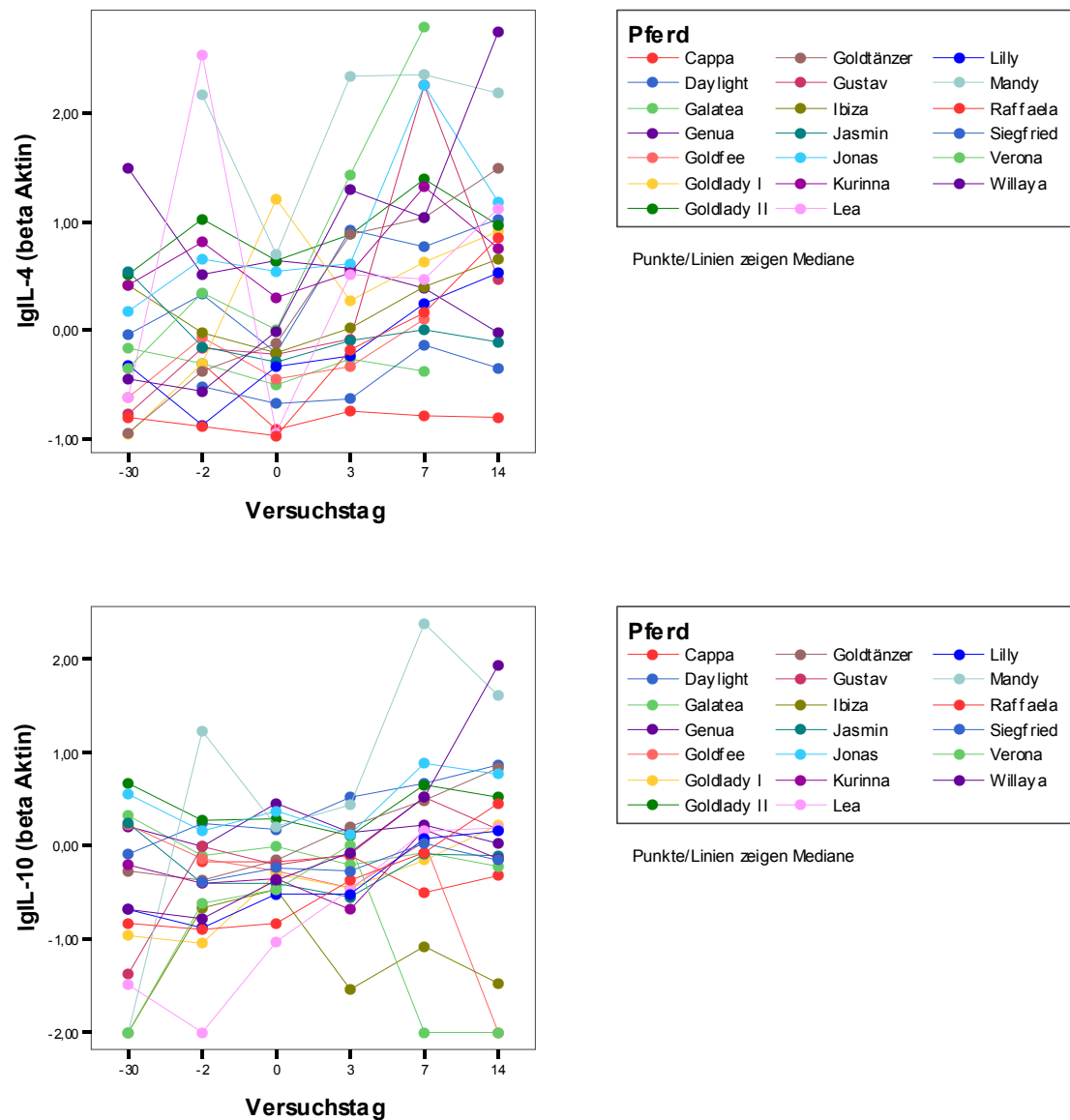


Abbildung 44: Einzeltierverläufe der Zytokinmesswerte *ex vivo*
(Messwerte zur Basis 10 logarithmiert)



Fortsetzung Abbildung 44: Einzeltierverläufe der Zytokinmesswerte *ex vivo*
(Messwerte zur Basis 10 logarithmiert)

4.5.3 Vergleich der Zytokinmesswerte getrennt nach Placebo- und Zylexis-Gruppe

Über die größte Auslenkung des Tieres wurden die Gruppen statistisch mittels U-Test miteinander verglichen.

In der Tabelle 22 sind die maximalen Auslenkungen der Zytokinmesswerte getrennt nach Versuchsgruppen aufgelistet.

Tabelle 22: Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: Placebo-Gruppe							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin, Diff MAX	9	3,40	4,761	-10,71	12,9	0,2970	10,35
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	9	1904,57	90,422	-441,99	12037,9	7,3170	1883,07
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	9	111,65	18,212	-27,25	565,9	2,9610	183,22
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	9	36,97	1,248	-1,09	239,1	0,8730	3,94

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: Zylexis-Gruppe							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin, Diff MAX	9	17,7	7,401	-2	69,08	2,852	12,884
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	9	193,5	247,314	-1135	973,29	-30,134	450,947
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	9	99,0	12,955	-2	640,61	1,938	30,922
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	9	2,1	1,484	-1	6,59	0,334	3,261

Aufgrund der schiefen Verteilung der Einzelwerte eignet sich der Median als geeignetes Maß für das „mittlere Verhalten“ der Messwerte. Hierbei fällt auf, dass die Mediane der maximalen Auslenkung für IFN- γ , IL-4 und IL-10 sich in beiden Gruppen nur geringfügig voneinander unterscheiden (Tab. 22). Auffällig erscheint der etwas höhere Median der maximalen Auslenkung von IL-2 in der Zylexis-Gruppe.

Bei der Untersuchung mittels U-Test getrennt nach beiden Gruppen auf die maximale Veränderung aller Zytokinmesswerte von Versuchstag -30 nach Versuchstag -2 bis 14, konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Dennoch ist für IFN- γ eine leichte Reaktion in der Expression im Studienverlauf zu beobachten gewesen. Unter Berücksichtigung der Einzeltiermesswerte zeigte sich eine leichte Zunahme der IFN- γ Werte um den Versuchstag 0 bei 4 Pferden (44,4%) aus der Placebo-Gruppe ($n = 9$) und bei 8 Pferden (72,7%) aus der Zylexis-Gruppe ($n = 11$). Zum Ende der Studie sanken die Werte wieder auf das Niveau der Ausgangskonzentration ab, teilweise sogar darunter (Abb. 45).

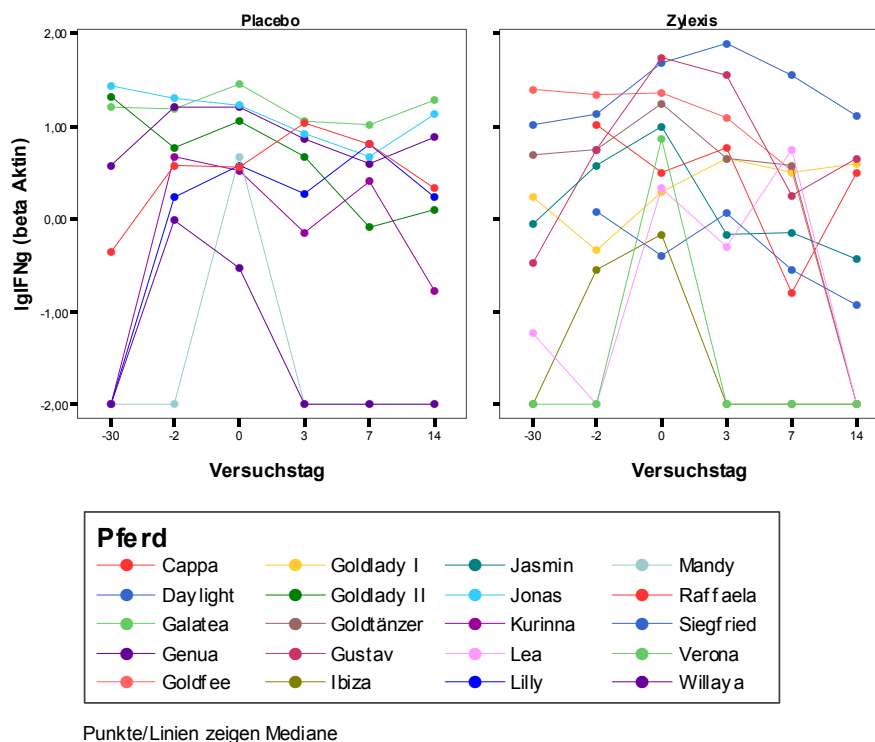


Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IFN- γ in den Gruppen Zylexis und Placebo (Messwerte zur Basis 10 logarithmiert)

In der Abbildung 46 sind die Änderungen der IFN- γ Expression im Vergleich zum Ausgangswert getrennt nach beiden Gruppen wiedergegeben. Die meisten Tiere in beiden Gruppen zeigten hierbei kaum eine Veränderung der IFN- γ Expression im Studienverlauf. Auffallend waren jeweils zwei Tiere in der Placebo- und Zylexis-Gruppe, die eine zunehmend negative Differenz zum Ausgangswert im Verlauf der Studie zeigten. In der Zylexis-Gruppe reagierten dagegen zwei Tiere mit einer positiven Differenz zum Ausgangswert.

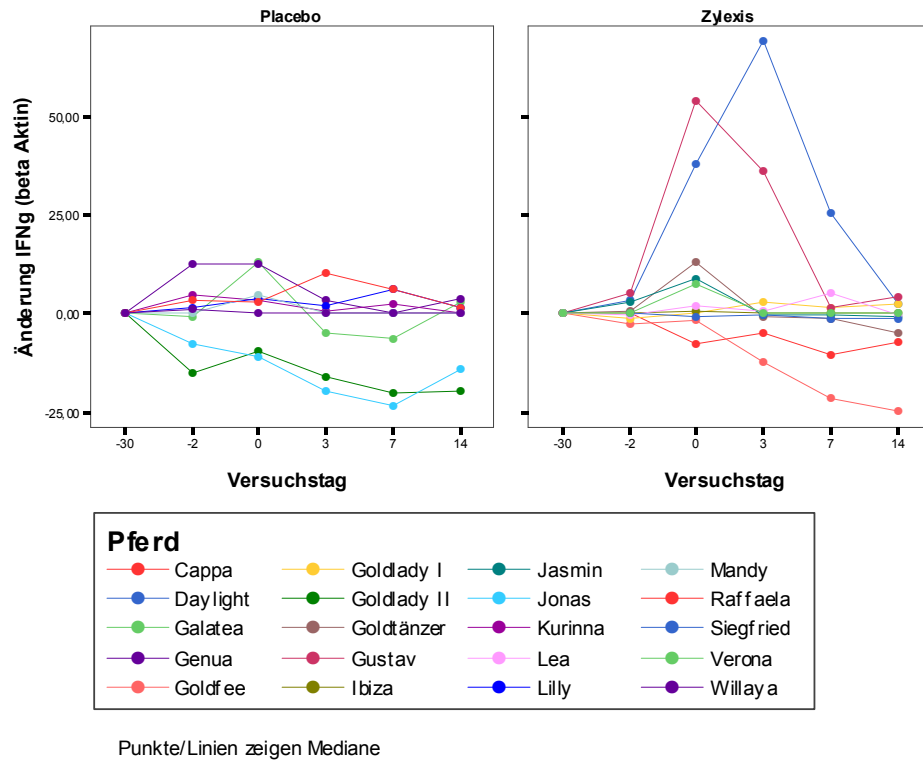
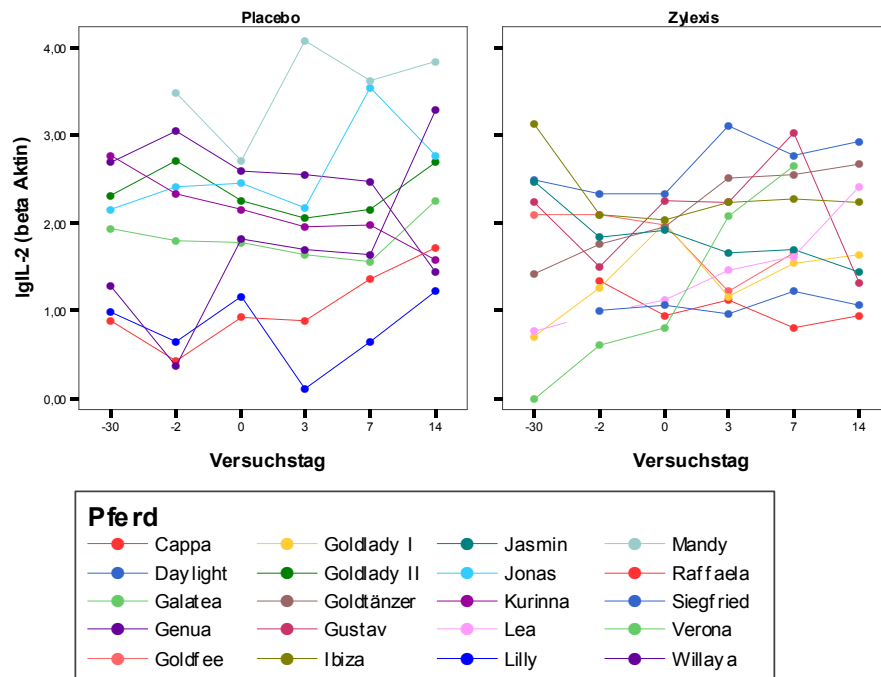


Abbildung 46: Änderung der IFN- γ Expression zum Ausgangswert

Bei den Messwerten für die Expression von IL-2 zeichnet sich eine ähnlich große Streuung der Einzeltiere auf. Besonders auffallend hierbei war, dass bei allen Tieren die Werte von Interleukin-2 höher lagen als bei den anderen Zytokinen. Die Abbildung 47 beschreibt die Einzeltierverläufe der Zytokinmesswerte von IL-2. In beiden Gruppen sind im Verlauf der Studie kaum Veränderungen in der IL-2 Expression zu beobachten gewesen.



Punkte/Linien zeigen Mediane

Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IL-2 in den Gruppen Zylexis und Placebo (Messwerte zur Basis 10 logarithmiert)

Auch in der Änderung der Zytokinmesswerte zum Ausgangswert waren für IL-2 insgesamt nur geringe Abweichungen feststellbar. In beiden Gruppen reagierten vereinzelte Tiere sowohl mit einer positiven als auch negativen Differenz (Abb. 48).

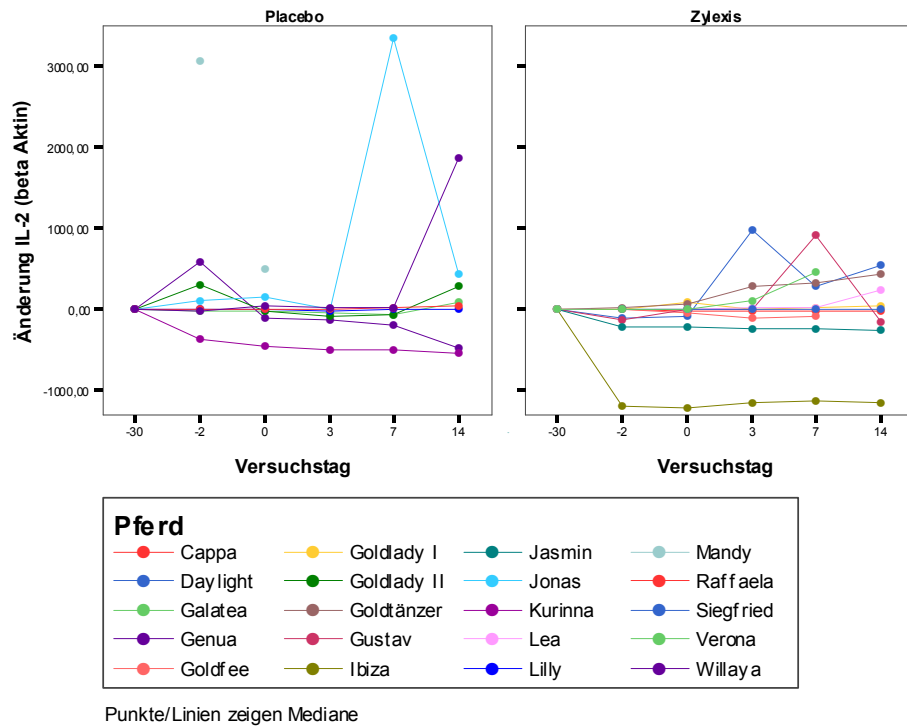


Abbildung 48: Änderung der IL-2 Expression im Vergleich zum Ausgangswert

Bei der Betrachtung der Einzeltierverläufe der Expression von Interleukin-4 konnte im Studienverlauf für einen großen Teil der Tiere in beiden Gruppen ein leichter Anstieg der Zytokinmesswerte beobachtet werden (Abb. 49). Die Änderung der Zytokinmesswerte im Vergleich zum Ausgangswert zeigte für IL-4 in beiden Gruppen vermehrt positive Differenzen (Abb. 50).

Der größte Teil der Tiere reagierte geringfügig mit einer zunehmenden Zytokinexpression.

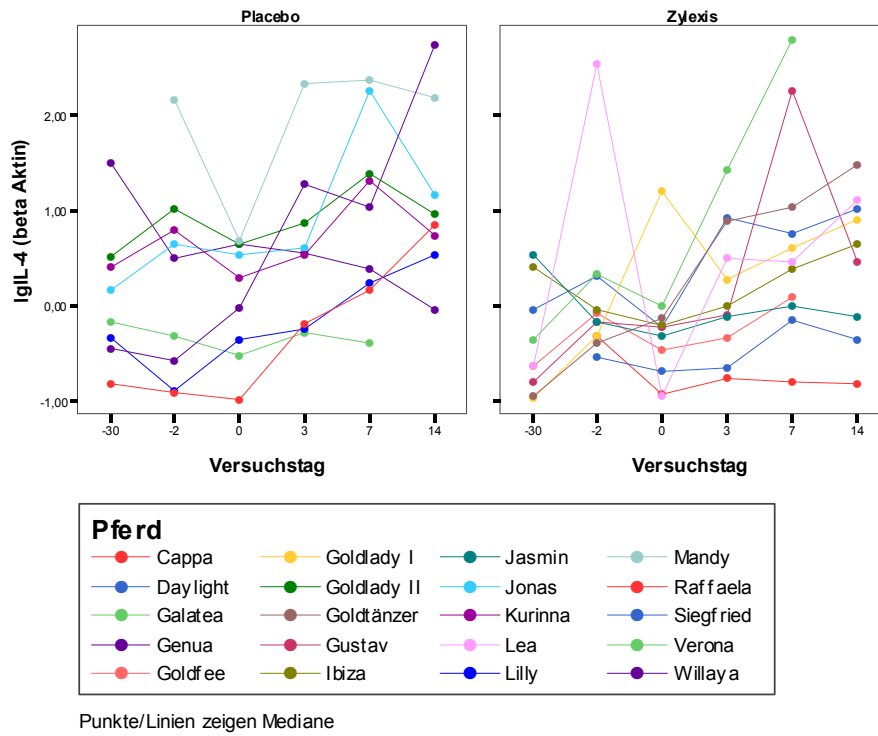


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IL-4 in den Gruppen Zylexis und Placebo (Messwerte zur Basis 10 logarithmiert)

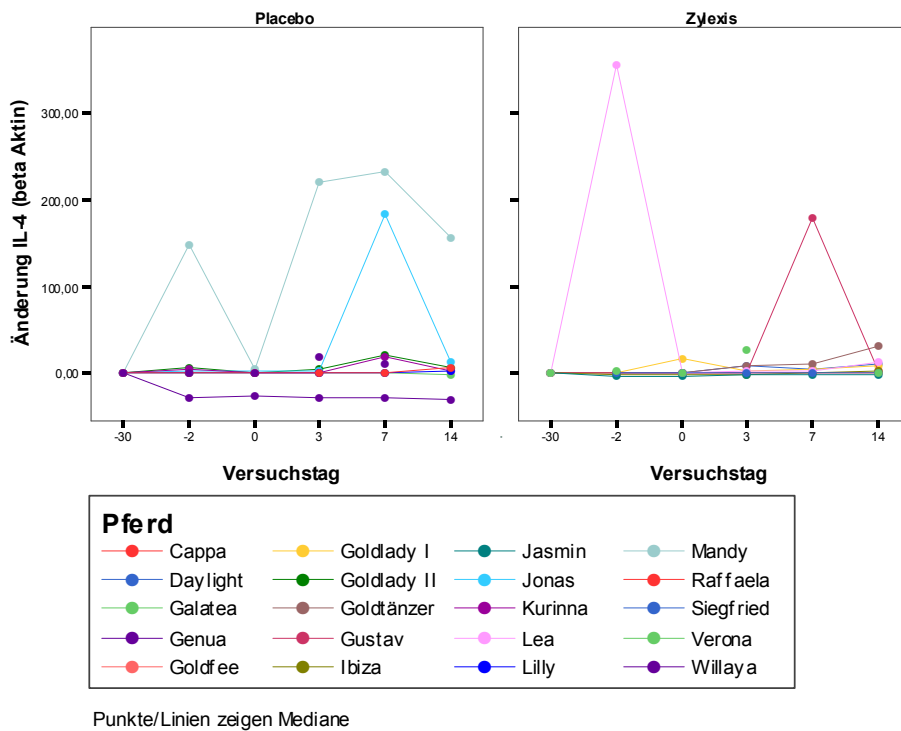
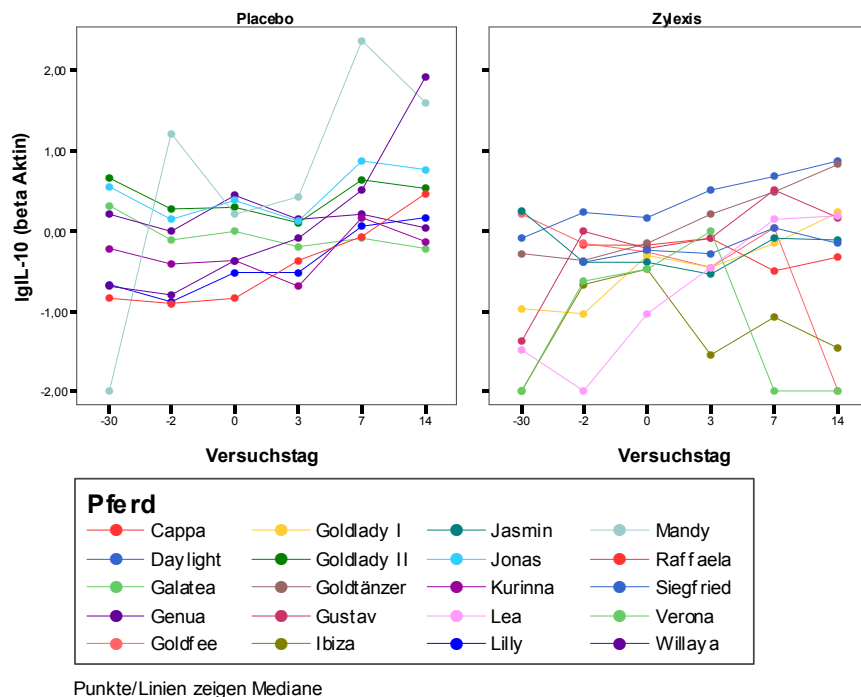


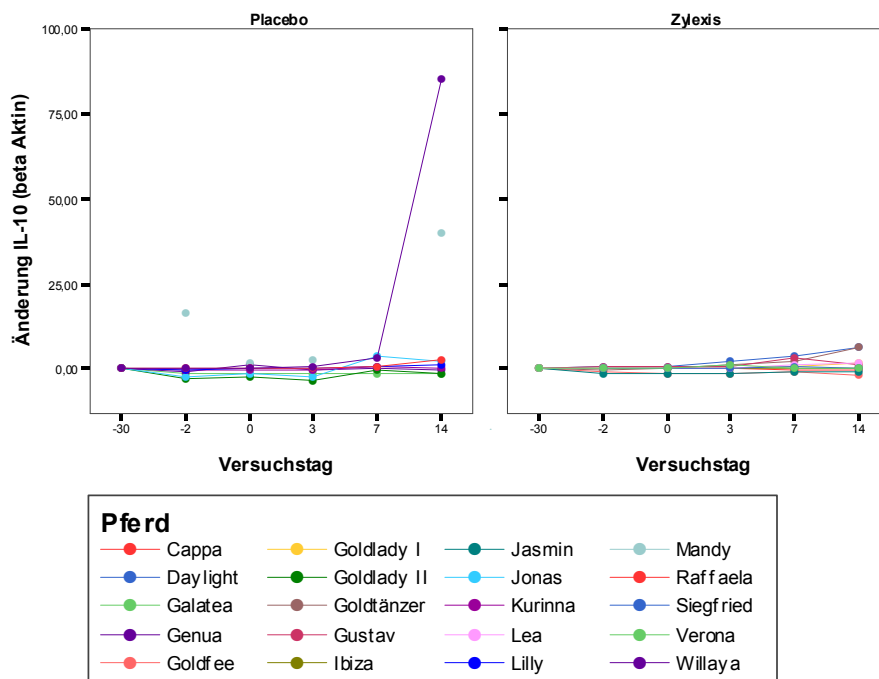
Abbildung 50: Änderung der IL-4 Expression im Vergleich zum Ausgangswert

Die Messwerte für die Zytokinexpression von Interleukin-10 zeigten unter Berücksichtigung der Einzeltierverläufe bei einigen Tieren beider Gruppen im Studienverlauf leicht ansteigende Werte (Abb. 51). Bei der Änderung der Zytokinexpression zum Ausgangswert ergaben sich jedoch kaum Veränderungen in beiden Gruppen (Abb. 52).



Punkte/Linien zeigen Mediane

Abbildung 51: Zeitlicher Verlauf der Zytokinmesswerte für IL-10 getrennt nach Gruppen (Messwerte zur Basis 10 logarithmiert)



Punkte/Linien zeigen Mediane

Abbildung 52: Änderung der IL-10 Expression im Vergleich zum Ausgangswert

4.5.4 Vergleich der Zytokinmesswerte getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung

Untersuchungen zum Einfluss der Vorimmunisierung auf die maximale Veränderung der Zytokinmesswerte von Versuchstag -30 nach Versuchstag -2 bis 14 ergaben einen statistisch signifikanten Unterschied bei den Werten für Interleukin-4 ($p = 0,034$) und für Interleukin-10 ($p = 0,034$) bei der Resequin-Gruppe. Die Influenza-Gruppe zeigte eine geringere maximale Auslenkung von Interleukin-4 und Interleukin-10.

In der Tabelle 23 sind die maximalen Auslenkungen der Zytokinmesswerte im Vergleich zum Ausgangswert aufgelistet.

Tabelle 23: Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert getrennt nach unterschiedlicher Vorimmunisierung

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: Resequin-Gruppe							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin Diff MAX	7	6,29	5,456	0,297	12,9	2,852	10,348
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	7	2171,47	441,066	45,353	12037,9	94,676	1883,066
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	7	215,32	30,922	7,134	640,6	12,955	565,947
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	7	48,14	2,732	1,008	239,1	1,484	84,897

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: Influenza-Gruppe							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin Diff MAX	11	13,3	6,350	-11	69,08	-1,655	12,91
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	11	334,8	7,317	-1135	3350,72	-207,098	906,97
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	11	35,4	2,961	-27	183,22	-0,155	21,29
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	11	1,3	0,873	-1	6,59	-0,577	3,26

4.5.5 Vergleich der Zytokinmesswerte getrennt nach Altersgruppen und Geschlecht

Untersuchungen des Einflusses von Alter und Geschlecht auf die maximale Veränderung der Zytokinmesswerte vom Versuchstag -30 zum Versuchstag -2 bis 14 erbrachten für die ausgewählten Zytokine sowohl beim Alter als auch beim Geschlecht keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,05$).

In den Tabellen 24 und 25 sind die maximalen Auslenkungen der Zytokinmesswerte zum Ausgangswert wiedergegeben.

Tabelle 24: Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert getrennt nach Altersgruppen

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: Altersgruppe "bis 4 Jahre"							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin Diff MAX	10	14,90	9,463	-10,71	69,08	-1,655	12,91
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	10	600,26	186,785	-110,58	3350,72	7,317	906,97
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	10	41,84	13,001	-27,25	183,22	1,018	30,92
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	10	2,22	1,407	-1,09	6,59	-0,131	3,94

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: Altersgruppe „über 4 Jahre“							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin Diff MAX	8	5,2	5,109	0	10,3	2,003	8,230
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	8	1610,0	146,333	-1135	12037,9	-324,543	1167,007
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	8	184,7	15,583	-2	640,6	4,536	399,709
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	8	41,2	1,246	-1	239,1	0,604	43,815

Tabelle 25: Deskriptive Statistik der Zytokinmesswerte durch Bildung der maximalen Differenz zum Ausgangswert getrennt nach Geschlecht

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: "Geschlecht" = "weiblich"							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN- γ , Beta-Aktin Diff MAX	15	8,9	5,456	-9	69,1	0,678	10,348
IL-2, Beta-Aktin Diff MAX	15	945,6	90,422	-1135	12037,9	-110,582	450,947
IL-4, Beta-Aktin Diff MAX	15	100,1	9,828	-27	640,6	1,018	21,285
IL-10, Beta-Aktin Diff MAX	15	22,5	1,162	-1	239,1	-0,131	2,732

Fortsetzung Tabelle 25:

Deskriptive Statistik Einschlussbedingung: "Geschlecht" = "männlich"							
	Gült. N	Mittelw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartile
IFN-γ, Beta-Aktin, Diff MAX	3	18,69	12,88	-10,712	53,90	-10,712	53,90
IL-2, Beta-Aktin, Diff MAX	3	1566,25	906,97	441,066	3350,72	441,066	3350,72
IL-4, Beta-Aktin, Diff MAX	3	131,52	180,40	30,922	183,22	30,922	183,22
IL-10, Beta-Aktin, Diff MAX	3	4,48	3,94	3,261	6,25	3,261	6,25

4.5.6 Untersuchung des absoluten mRNA-Gehaltes von IFN- γ , Interleukin-2, -4 und -10 in den equinen peripheren Blutleukozyten nach Stimulation mit Concavalin A (*in vitro*)

Im Verlauf der Studie sollte zusätzlich die Zytokinexpression nach Stimulation der equinen PBMC in Zellkultur ermittelt werden. Für diese *in vitro* Untersuchungen wurde zu den stimulierten PBMCs jeweils eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt (Anhang 9.1; A6). Zum Versuchstag -30 standen nur 6 Proben von 20 zur Verfügung. Für die Placebo-Gruppe waren 47 und für die Zylexis-Gruppe 59 Proben auswertbar. Eine statistische Auswertung über die Veränderung der Zytokinexpression im Vergleich zum Ausgangswert konnte aufgrund der niedrigen Anzahl und der daraus resultierenden Ungenauigkeit nicht durchgeführt werden.

Um die Frage zu klären, ob die Stimulation der equinen PBMC in Zellkultur mit einem unspezifischen Mitogen zu einer Veränderung der Zytokinexpression führt, wurde die Differenz zwischen den stimulierten Messwerten mit den unstimulierten Messwerten gebildet. Eine positive Differenz der Zytokinmesswerte gibt eine zunehmende Zytokinexpression durch die Stimulation wieder. Anhand der Differenzen von allen Versuchstagen wurde mittels U-Test untersucht, ob die unterschiedlichen Gruppen einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der equinen PBMC in Zellkultur ausüben.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der equinen PBMC eine Veränderung der Zytokinexpression hervorgerufen hat. Lediglich das equine Interleukin-2 wurde durch diese Art der Stimulation nur gering vermehrt exprimiert.

Statistische Untersuchungen der Differenz der stimulierten und unstimulierten Werte, getrennt nach den Versuchsgruppen Zylexis und Placebo, ergaben einen statistisch signifikanten Unterschied bei IFN- γ und IL-4 (U-Test; $p = 0,004$; $p < 0,001$). In beiden Fällen konnte in der

Placebo-Gruppe eine erhöhte Stimulierbarkeit der PBMC gemessen werden. Die folgenden Abbildungen geben die Stimulierbarkeit von IFN- γ und IL-4 getrennt nach Gruppen wieder.

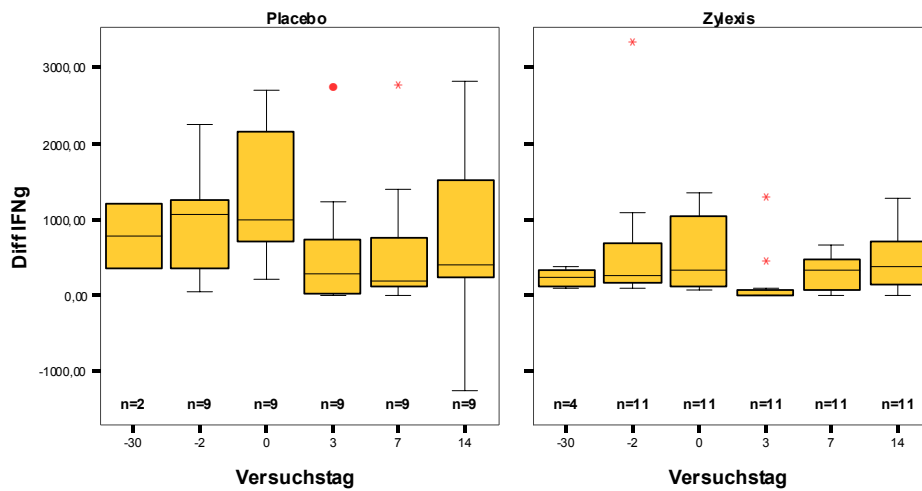


Abbildung 53: Stimulierbarkeit von IFN- γ aus equinen PBMC getrennt nach Versuchsgruppen

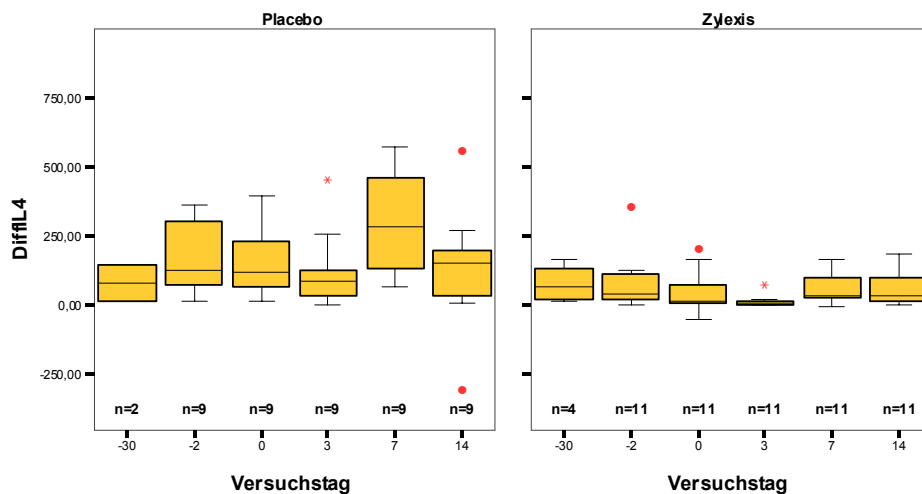


Abbildung 54: Stimulierbarkeit von IL-4 aus equinen PBMC getrennt nach Versuchsgruppen

Der Einfluss der unterschiedlichen Vorimmunisierung auf die Stimulierbarkeit der equinen PBMC wurde ebenfalls mit Hilfe des U-Tests überprüft. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

Untersuchungen des Einflusses vom Alter auf die Stimulierbarkeit der equinen PBMC erbrachten mittels U-Test einen statistisch signifikanten Unterschied bei der Stimulierbarkeit

für Interleukin-4 ($p = 0,012$). Aus der Abbildung 55 ist zu entnehmen, dass bei den Pferden „bis 4 Jahre“ eine erhöhte Stimulierbarkeit bei IL-4 nachgewiesen werden konnte.

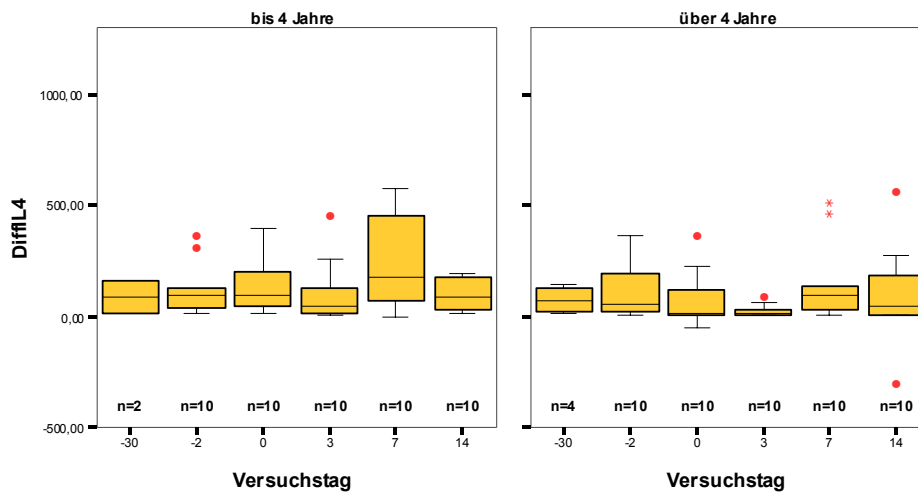


Abbildung 55: Stimulierbarkeit von IL-4 aus equinen PBMC getrennt nach Altersgruppen

5. Diskussion

Die equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4 haben beim Pferd eine große Bedeutung, da sie klinisch relevante Erkrankungen verursachen. EHV-1 stellt die wichtigste und auch wirtschaftlich bedeutendste virale Abortursache dar (Dongus 2003).

Zur Vorbeugung gegen wirtschaftliche Verluste durch eine Herpesvirusinfektion beim Pferd wird der Vakzinierung gegen EHV-1/-4 eine besondere Bedeutung zugesprochen. In Deutschland findet die Anwendung der inaktivierten Kombinationsvakzine Resequin[®] NN plus eine weite Verbreitung. Der Impfstoff enthält u. a. nicht vermehrungsfähige EHV-1/-4 Antigene, die die humorale Immunantwort durch die Antigenpräsentation über MHC Klasse II Moleküle (Tizard 2004) induzieren. Zur Steigerung der unspezifischen Immunantwort der inaktivierten Erreger sind zusätzlich Adjuvantien (Aluminiumhydroxid, Immunostim[®]) in der Kombinationsvakzine enthalten (Mayer 2003). Das Adjuvanz Carbapol in der inaktivierten EHV-1/-4 Vakzine Duvaxyn[®] EHV_{1/4} (Fort Dodge) soll darüber hinaus die zytotoxischen T-Zellen stimulieren. Untersuchungen von Kydd et al. (2003) zeigten, dass bei tragenden Stuten nach dreimaliger Applikation von Duvaxyn[®] EHV_{1,4} neben der Serokonversion auch die Häufigkeit von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen, ermittelt durch den Chromfreisetzungstest, zunahm. Nach experimenteller Infektion der tragenden Stuten fehlten 4 von 5 aus dieser Gruppe erfolgreich, während alle unbehandelten Kontrolltiere abortierten. Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl zytotoxischer T-Zellen im Blut und dem Schutz vor EHV-1 bedingten Aborten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die grundlegende Frage geklärt werden, ob durch die Kombination von Zylexis[®] mit der inaktivierten Kombinationsvakzine Resequin[®] NN plus die zelluläre Immunantwort stimuliert werden kann und somit eine Verbesserung der Impfantwort beim Pferd möglich ist.

Dafür wurden im Einzelnen die Auswirkungen von Zylexis[®] im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus auf die Antikörper-Antwort, auf die Anzahl peripherer mononukleärer Blutzellen und auf die Expression von ausgewählten Zytokinen (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) mit Hilfe der TaqMan[®]-PCR untersucht.

Ein Nachweis von Konzentrationsunterschieden der mRNA verschiedener Zytokine konnte bereits durch eine relative Quantifizierung mittels TaqMan[®]-PCR durch andere Arbeitsgruppen auch beim Pferd gezeigt werden (Mangold-Gehring 2005; Coombs et al. 2006; Pusterla et al. 2006; Horohov et al. 2008). Für die vorliegende Arbeit wurde die

TaqMan[®]-PCR genutzt, um Unterschiede in der mRNA-Konzentration der Zytokine durch eine absolute Quantifizierung darzustellen.

Die ausgewählten Zytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) sind wichtige Indikatoren zur Charakterisierung einer zellulären und humoralen Immunreaktion. Bei der zellulären Immunantwort wirkt die Induktion der IL-2-Synthese aus den Th1-Zellen zusätzlich stimulierend auf die IFN- γ Produktion aus den Th1-Zellen und den Natürlichen Killerzellen. Bei der humoralen Immunantwort kommt es zu einer Induktion der IL-4-Synthese hauptsächlich aus den aktivierten Th2-Zellen. Das IL-4 wirkt immunregulatorisch und fördert die Aktivierung und Proliferation der B-Zellen. Das IL-10 wird hauptsächlich von den Th2-Zellen gebildet und wirkt in erster Linie regulierend in der späten Phase der Immunantwort (Delves et al. 1998), indem es die Ausschüttung der Zytokine aus den Th1-Zellen hemmt und somit das Ausmaß einer zellulären Immunantwort beeinflusst. Eine Induktion der IL-10 Produktion kann zur Folge haben, dass virusinfizierte Zellen nicht mehr durch die zytotoxischen T-Zellen abgetötet werden und dadurch eine ungehinderte Virusvermehrung in den Zellen stattfinden kann. Andererseits verhindert das IL-10 eine überschießende Reaktion der zytotoxischen T-Zellantwort (Tizard 2004).

Für den Nachweis von Zytokin-mRNA aus den präparierten equinen peripheren Blutleukozyten musste zunächst die Gesamt-RNA präpariert werden. Hierfür wurden im Vorfeld verschiedene RNA-Extraktionsmethoden verglichen. Zum Vergleich standen das Trizol[®] Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe), das RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) und das Blutentnahmesystem PAXgene Blood RNA Tubes (Fa. PreAnalytix/Qiagen, Hilden) sowie das dazugehörige RNA Blood Kit (Fa. Qiagen, Hilden).

Im Studienverlauf konnten aus 30 ml Blut gesamt ca. 1 bis 5×10^7 Zellen (PBMC) isoliert werden. Daraus wurden mittels Trizol[®] Reagent 40 μ l RNA extrahiert und Konzentrationen von 200 μ g bis 2600 μ g/ml RNA erreicht. Im Vergleich dazu konnte mit dem RNeasy Mini Kit aus 30 ml Blut und einer Gesamtzellzahl von ca. 1×10^7 Zellen (PBMC) ein 40 μ l RNA-Eluat gewonnen werden mit einer durchschnittlichen Konzentration von 65 μ g/ml RNA. In einem PAXgene Probenröhrchen wird die RNA aus 2,5 ml Blut isoliert. Mit dem dazugehörigen PAXgene RNA Blood Kit konnte ein RNA-Eluat von 40 μ l und eine durchschnittliche Konzentration von 27,45 μ g/ml RNA gewonnen werden. D. h. es müssten mindestens 12-mal so viele PAXgene Blood RNA Tubes verwendet werden, um annähernd gleich große RNA-Konzentrationen im Eluat zu erhalten wie es bei den Trizol[®]-Präparationen

der Fall war. Darüber hinaus zeigte die denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese bei den Trizol[®]-Proben eine gute RNA-Qualität, die gleichzeitig für die PCR-Anwendungen geeignet war.

Der Einfluss von Zylexis[®] bzw. der Impfung auf die Zytokininduktion im Organismus sollte durch die Bestimmung von Konzentrationsunterschieden der ausgewählten Zytokine vor und nach Applikation der Medikamente überprüft werden. Hierfür erfolgte eine absolute Quantifizierung der Zytokin-mRNA aus den equinen peripheren Blutleukozyten mittels TaqMan[®]-PCR nach sofortiger Aufarbeitung der Blutproben und zusätzlich zur Absicherung der Ergebnisse nach einer *in vitro* Stimulation mit Concavalin A. Ein Nachweis von Zytokinen *ex vivo* wurde bereits in der Dissertation von Mangold-Gehring (2005) durchgeführt. Hierbei konnte die IFN- γ mRNA-Konzentration direkt aus dem Hundeblood durch die sensitive TaqMan[®]-PCR gemessen werden. In der bisherigen Literatur ist die Bestimmung von Zytokin-mRNA-Konzentrationen nach einer vorhergehenden Stimulation von Zellkulturen (*in vitro*) mit Antigenen oder Mitogenen beschrieben worden (Gustat 2003; Mangold-Gehring 2005; Coombs et al. 2006). Die Notwendigkeit für eine Stimulation *in vitro* liegt darin, dass niedrige Zytokin-mRNA-Konzentrationen im Blut vorhanden sind. Nach bisherigen Erkenntnissen erwiesen sich diese Konzentrationen als zu gering, um beispielsweise zwischen zwei Zeitpunkten Unterschiede messen zu können.

Die aus dem Pferdeblut präparierten PBMCs können in Zellkultur durch Mitogene unspezifisch stimuliert werden. Durch die unspezifische Stimulation werden die Zellen gleichermaßen zur Teilung angeregt. Folglich erhöht sich die Menge aller mRNA's. Zu den wichtigsten Mitogenen zählen die pflanzlichen Lektine. Die pflanzlichen Lektine binden an Glykoproteine der Zelloberfläche und fördern die Teilung der Zellen. Zu den pflanzlichen Lektinen gehören das Phytohemagglutinin (PHA), das Concavalin A (Con A) und das Pokeweed Mitogen (PWM). Die Lymphozyten reagieren unterschiedlich auf die verschiedenen Lektine. PHA stimuliert hauptsächlich die Teilung der T-Zellen, hat aber auch einen geringen Effekt auf B-Zellen. Con A führt zu einer T-Zell-Aktivierung, während PWM einen Effekt auf T- und B-Zellen ausübt.

Die PBMCs können alternativ spezifisch in Zellkultur durch EHV-1-Antigen oder Impfantigene stimuliert werden. Bei einer spezifischen Stimulation binden die Antigene an spezielle Rezeptoren und bewirken die Aktivierung bzw. die Anregung der Zellen zu einer vermehrten Zytokinproduktion. Folglich kann sich das Zytokinexpressionsmuster

verschieben. Im Gegensatz dazu fördern Mitogene durch unspezifische Stimulation die Teilung der jeweiligen Immunzellen. Eine Stimulation der PBMC in Zellkulturen durch das EHV-1 Antigen zeigte Unterschiede in der Expression von IFN- γ und IL-4 in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Antigenkontaktes (Coombs et al. 2006).

Der Effekt durch die Zylexis- und Impfapplikation im Organismus könnte durch die spezifische Stimulation möglicherweise überdeckt oder verändert werden. Eine unspezifische Stimulation wurde in der hier vorliegenden Arbeit daher zur besseren Darstellbarkeit von Konzentrationsunterschieden der mRNA's vorgezogen.

Nach der Festlegung der Methoden und der zu bestimmenden Parameter wurde mit dem Versuchsaufbau und der -durchführung begonnen. Im Rahmen eines Vorversuches wurden 10 Pferde mit Zylexis[®] behandelt und mit Resequin[®] NN plus vakziniert (Ergebnisse nicht präsentiert). Von allen 10 Tieren erfolgten Blutentnahmen 2 Tage vor der Impfung und 14 Tage sowie 35 Tage nach der Vakzination. Die Blutproben wurden serologisch auf EHV-1/-4 Antikörper untersucht und darüber hinaus erfolgte eine Bestimmung des Immunstatus durch die Fa. LABOKLIN (Bad Kissingen). Die Ergebnisse des Vorversuches demonstrierten eine Erhöhung der Zellzahlen und Antikörperanstiege innerhalb der ersten 14 Tage nach der Vakzination. Anhand dieser Beobachtungen war es angebracht, diesen Zeitraum detaillierter im Hauptversuch zu untersuchen.

Coombs et al. (2006) konnten Unterschiede in der Immunantwort und Zytokinexpression von IFN- γ und IL-4 durch relative Quantifizierung mit Hilfe der quantitativen „Real-Time“ PCR feststellen, wenn die Pferde in ihrer Vergangenheit bereits mit EHV-1 experimentell infiziert wurden. Diese Pferde zeigten keine klinische Symptomatik bei erneuter experimenteller Infektion mit EHV-1 sowie keine Serokonversion, dagegen aber eine deutliche Induktion von IFN- γ und Lymphozytenproliferation. Die Gruppe der Pferde, die in ihrer Vergangenheit noch keine experimentelle EHV-1 Infektion durchgemacht hatte, zeigte nach der experimentellen Infektion deutliche klinische Anzeichen, wie Fieber und Nasenausfluss, eine Serokonversion und geringere Induktion von IFN- γ und IL-4 sowie eine fehlende Lymphozytenproliferation.

Das Alter kann darüber hinaus einen Einfluss auf die Immunantwort ausüben. Paillot et al. (2005) zeigten dazu, dass die Synthese von IFN- γ aus den PBMC von Pferden nach experimenteller Infektion mit EHV-1 sowie nach *in vitro* Stimulation mit EHV-1 mit zunehmendem Alter ansteigt. Diese Beobachtung deutet auf eine Vermehrung der EHV-1 spezifischen Gedächtniszellen nach wiederholter Exposition mit dem EHV-1 Antigen im zunehmenden Alter hin (Paillot et al. 2005). Jedoch hat diese Vermehrung nicht unbedingt

immer etwas mit dem Alter zu tun, sondern vielmehr mit der Häufigkeit des Antigenkontaktes.

In Anlehnung an diese beiden Veröffentlichungen wurde für die vorliegende Studie berücksichtigt, dass sowohl das Alter, als auch die vorangegangenen Impfungen der Pferde, je nach Häufigkeit und Art der verwendeten Vakzine, einen Einfluss auf die Immunreaktion ausüben können.

5.1 Auswirkung von Zylexis® im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin® NN plus auf die Antikörperantwort

Eine immunologische Reaktion infolge der Impfung konnte im Studienverlauf bei 19 (95%) Pferden im indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) und im Neutralisationstest (NT) bei 7 (35%) Tieren beobachtet werden. Zwischen den Versuchsgruppen Zylexis und Placebo konnten keine Unterschiede bei den Antikörpertitern im NT und IFT festgestellt werden. Auch bei der Betrachtung der Altersgruppen sowie der Gruppen mit unterschiedlicher Vorimmunisierung wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der serologischen Reaktion im NT und IFT beobachtet. Besonders auffällig war der EHV-1 und -4 Titeranstieg im IFT um den Faktor 4 am Versuchstag 7 bei „Ibiza“ und der EHV-1-Titeranstieg um den Faktor 4 bei „Goldfee“ (beide Tiere aus der Zylexis-Gruppe). „Genua“ (Placebo-Gruppe) zeigte am Versuchstag 14 einen EHV-1/-4 Titeranstieg um den Faktor 8. Da zu jedem Untersuchungszeitpunkt keines der Pferde eine Störung des Allgemeinbefindens aufwies oder Anzeichen einer Erkrankung erkennbar waren, ist der deutliche Titeranstieg, insbesondere bei diesen drei Pferden (Ibiza, Goldfee, Genua), als Reaktion auf die Impfung zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte ein Anstieg der EHV-1/-4 Antikörper nach der Impfung mit Resequin® NN plus festgestellt werden, allerdings lassen sich die Antikörper aufgrund der Kreuzreaktivität von EHV-1 und EHV-4 durch den NT und IFT nicht genau differenzieren. Crabb und Studdert (1995) entwickelten hierfür einen EHV-1 spezifischen IgG-ELISA-Test zur Differenzierung zwischen Antikörpern gegen EHV-1 und EHV-4.

Sowohl in der Zylexis-Gruppe als auch in der Placebo-Gruppe kam es gleichermaßen zu einem Anstieg der Antikörper im Studienverlauf. Somit konnte ein Einfluss von Zylexis® auf die Antikörperantwort nicht gezeigt werden. Untersuchungen von Valpotić et al. (1998) zum Einfluss von Baypamun® (neuer Produktname: Zylexis®) in Kombination mit einer Tetanusvakzinierung beim Pferd zeigten einen höheren IgG-Serumwert bei der Pferdegruppe, die vor der Impfung mit Baypamun® behandelt wurde. Valpotić et al. (1998) konnten einen

Anstieg der IgG-Konzentration messen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde wiederum ein Anstieg der virusneutralisierenden Antikörper als Indiz für die humorale Immunantwort festgestellt. Der nachgewiesene IgG-Anstieg von Valpotić et al. (1998) passt mit der Antikörperreaktion der hier vorliegenden Arbeit zusammen. Allerdings konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede im Antikörperanstieg zwischen den Zylexis[®] und Placebo vorbehandelten Tieren nachgewiesen werden.

In der Dissertation von Schröder (2001) wurden Antikörpertiter gegen EHV-1/-4 mit einem Neutralisations- und indirekten Immunfluoreszenztest vor und nach Impfung mit Resequin[®] plus bei 6 Warmblutpferden eines geschlossenen Bestandes sowie bei 123 Zuchtstuten eines deutschen Vollblutgestütes bestimmt. Innerhalb des Warmblutbestandes wiesen keine der Stuten nachweisbare NT-Titer auf. Im IFT konnten nach der Impfung nur geringe Titerveränderungen beobachtet werden. Lediglich bei einer Stute stieg der IFT-Titer innerhalb der ersten 6 Tage um den Faktor 4 an. Die IFT-Titer sanken bis ca. zwei Monate nach der Impfung wieder auf den Ausgangswert oder darunter. Innerhalb des Vollblutbestandes wurde eine Gruppe von 16 Stuten im Alter von 5-20 Jahren über den Zeitraum eines halben Jahres regelmäßig auf EHV-1/-4 Antikörper vor und nach der Impfung untersucht. In dieser Gruppe zeigten innerhalb von vier Wochen nach der Impfung 11 Stuten keine serologische Reaktion gegen EHV-1. Bei 4 Stuten stiegen die Antikörpertiter im NT oder IFT nicht signifikant an. Grundsätzlich konnte eher bei älteren Stuten (> 10 Jahre) eine serologische Reaktion nach der Impfung festgestellt werden (Schröder 2001).

Erwartungsgemäß zeigten die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, dass die älteren Tiere (5 bis 17 Jahre) eine vermehrte Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern aufwiesen, die vermutlich mit einem häufigeren Kontakt zum Antigen durch regelmäßige Impfungen oder aber auch infolge häufiger Reaktivierung von latentem Virus zusammenhängt.

Foote et al. (2002) untersuchten die Antikörperantwort gegen EHV-1/-4 mittels ELISA von Stuten (4-17 Jahre) und Fohlen (3-6 Monate) nach Impfung mit einer inaktivierten EHV-1/-4 Vakzine (Duvaxyn[™], Fort Dodge). Dabei konnte festgestellt werden, dass Stuten im Alter von 4 bis 7 Jahren eine größere serologische Reaktion zeigten als ältere Tiere. Es ist also davon auszugehen, dass eine intensivere immunologische Reaktion nicht unbedingt immer vom Alter abhängt, sondern dass auch die Häufigkeit des Antigenkontaktes einen entscheidenden Einfluss auf die Intensität der Immunreaktion ausübt.

5.2 Auswirkung von Zylexis® im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin® NN plus auf die Anzahl der peripheren mononukleären Blutzellen und den Immunstatus

Zur Bestimmung der Anzahl equiner peripherer mononukleärer Blutzellen wurde nach der Isolierung aus dem Blut die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der PBMC-Anzahl im Vergleich zum Ausgangswert bei den Pferden der Zylexis-Gruppe signifikant war. Ein Unterschied in der Zunahme der PBMC-Anzahl verglichen zum Ausgangswert konnte zwischen den Altersgruppen „bis 4 Jahre“ und „über 4 Jahre“ und bei den Pferden, die getrennt nach ihrer unterschiedlichen Vorimmunisierung gruppiert wurden, nicht festgestellt werden.

Valpotić et al. (1998) untersuchten die humorale und zelluläre Immunantwort bei Pferden nach Vakzination mit Tetanus Toxoid und Toxin. Eine Gruppe der Pferde wurde zusätzlich mit dem Immunmodulator Baypamun® vor der Tetanusvakzination behandelt und zeigte u. a. eine größere Lymphozytenproliferation. Zur Überprüfung der Lymphozytenproliferation stimulierten Valpotić et al. (1998) die frisch isolierten equinen PBMC in Zellkulturen mit Mitogenen (PHA und PWM) und bildeten mit unstimulierten Kontrollen ein Stimulationsindex. In der vorliegenden Arbeit führte die Zylexis®-Applikation ebenfalls zu einer deutlichen signifikanten Zunahme der PBMC-Anzahl. Es können keine genauen Rückschlüsse gezogen werden, welche Zellsubpopulationen sich vermehrt haben, da die Anzahl der PBMC durch Auszählung unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

Bei Betrachtung der PBMC-Anzahl in den Gruppen der unterschiedlichen Vorimmunisierung und den Altersgruppen fällt auf, dass im Einzelnen statistisch signifikant höhere PBMC-Zahlen bei den Tieren der Influenza-Gruppe und der Pferde „bis 4 Jahre“ vorhanden waren. Man könnte daraus schlussfolgern, dass die in Vergangenheit mit Influenza geimpften Tiere sowie die Pferde in einem Alter bis 4 Jahren den signifikanten Unterschied in der Änderung der PBMC-Anzahl der Zylexis-Gruppe ausmachen. Da sich in der Zylexis- und Placebo-Gruppe jedoch gleich viele Influenza vorimmunisierte Tiere sowie Pferde im Alter bis 4 Jahre befinden, ist die Zunahme der Anzahl an PBMC im Vergleich zum Ausgangswert als Folge der Zylexis® Behandlung anzusehen oder individuell bedingt. Darüber hinaus war die Änderung der PBMC-Anzahl in der Gruppe der unterschiedlichen Vorimmunisierung und der Altersgruppe nicht statistisch signifikant gewesen.

In der vorliegenden Studie wurden die Lymphozytensubpopulationen an zwei Untersuchungszeitpunkten (Versuchstag -30 und 0) durch die Fa. LABOKLIN (Bad Kissingen) untersucht. Diese Art der Untersuchung ist jedoch mit einem vermehrten

Arbeitsaufwand (Probenversand, Entnahmezeitpunkt) und einem hohen Kostenaufwand verbunden und für umfassendes Probenmaterial nicht geeignet. Daher wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit nur in einem begrenzten Umfang durchgeführt.

Die Differenzierung der T-Lymphozyten in die Subpopulationen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen an den Versuchstagen -30 und 0 zeigte vor allem bei den CD8⁺-Zellen eine deutliche Zunahme am Versuchstag 0. Bei den CD4⁺-Zellen konnte eine leichte Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Eine Zunahme der B-Zellpopulation würde mit der serologischen Reaktion im Studienzeitraum zusammenpassen, da die B-Zellen nach Antigenkontakt zur antikörperproduzierenden Plasmazelle proliferieren (Tizard 2004). Allerdings wurde am Versuchstag 0 eine leichte Abnahme der B-Lymphozyten verzeichnet. Eine Verknüpfung der B-Lymphozytenanzahl mit der Antikörperantwort ist anhand des frühen Untersuchungszeitpunktes am Versuchstag 0 nicht möglich, da eine serologische Reaktion erst ab Versuchstag 7 bzw. 14 beobachtet wurde. Zu diesen Zeitpunkten erfolgte jedoch keine labortechnische Differenzierung der Lymphozytenpopulationen. Zwischen der Zylexis- und Placebo-Gruppe konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Auffällig war die statistisch signifikante Änderung der T-Zellzahl bei den jüngeren Pferden „bis 4 Jahre“. Die jüngeren Pferde zeigten eine deutliche Zunahme der T-Zellen, insbesondere der CD8⁺-Zellen, nach der Impfung, während die älteren Pferde mit einer Abnahme der T-Zellzahl reagierten.

Die insgesamt deutliche Proliferation der CD8⁺ T-Zellen am Versuchstag 0 konnte auch in der oben erwähnten Studie von Valpotić et al. (1998) beobachtet werden. Hier wurden die peripheren mononukleären Blutzellen zu jedem Untersuchungszeitpunkt mittels Durchflusszytometrie differenziert. Bei den Baypamun[®]-behandelten Pferden konnte eine größere Anzahl der CD8⁺-Zellen und B-Zellen und eine geringere Anzahl von CD4⁺-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Pferden festgestellt werden (Valpotić et al. 1998).

Die zytotoxischen T-Zellen besitzen die CD8-Oberflächenmoleküle und binden spezifisch an MHC-Moleküle der Klasse I von antigenpräsentierenden Zellen. Die Interaktion der MHC-Klasse I Moleküle mit den CD8⁺ T-Zellen spielt eine Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Erregern bzw. virusinfizierten Zellen (Tizard 2004). Da der Impfstoff nur inaktivierte Komponenten enthält, die über MHC-Klasse II Moleküle und Interaktion mit CD4⁺ T-Helferzellen dem Immunsystem zur Bildung von Antikörpern zugänglich gemacht werden, kann die Zunahme der CD8⁺ T-Zellen vermutlich nicht alleine auf den Impfstoff zurückzuführen sein, sondern vielmehr auf die im Impfstoff enthaltenen Adjuvantien oder das Zylexis[®]. Klinische Hinweise für ein virales Infektionsgeschehen in dem Studienzeitraum konnten anhand der täglichen Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere nicht gezeigt

werden. Nicht ganz auszuschließen ist eine durch die Impfung entstandene Stresssituation, die zur subklinischen Infektionskrankheit bis hin zu einer Reaktivierung von latentem EHV mit subklinischen Symptomen geführt haben kann.

5.3 Auswirkung von Zylexis[®] im Zusammenhang mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus auf die Expression von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10

Untersuchungen über die Änderung der Zytokin-mRNA Konzentration von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 *ex vivo* erfolgten auf Basis der betragsmäßig größten Differenz eines jeden Tieres zu dem Ausgangswert. Die Expression der mRNA von IFN- γ und IL-2 verzeichnete im Verlauf der Studie kaum eine Änderung. Die IFN- γ Genexpression war zum größten Teil bei den Zylexis[®]-behandelten Tieren, aber auch bei den Placebo-behandelten Pferden am Versuchstag 0 leicht erhöht, sank dann wieder auf das Niveau der Ausgangskonzentration, teilweise sogar darunter. Vermutlich ist die leichte Reaktion in der Expression von IFN- γ individuell bedingt. Nach der Studie von Horohov et al. (2008) besteht diesbezüglich aber auch der Grund zur Annahme, dass Zylexis[®] zu dieser Reaktion geführt haben kann. Horohov et al. (2008) konnten einen Anstieg der IFN- γ Genexpression *ex vivo* beim Pferd 24 Stunden nach der ersten Zylexis[®]-Applikation verzeichnen. Nicht auszuschließen ist aber auch die Reaktion auf die im Impfstoff enthaltenen Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Immunostim[®], da auch vereinzelt Pferde der Placebo-Gruppe einen Anstieg der IFN- γ Genexpression verzeichneten. Insgesamt konnte unabhängig der Gruppenzugehörigkeit ein leichter Anstieg in der mRNA-Expression bei IL-4 und IL-10 festgestellt werden. Zwischen der Zylexis- und Placebo-Gruppe bestanden hinsichtlich der Änderung in der Zytokinexpression keine Unterschiede. Die Pferde, die mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus bereits in der Vergangenheit vakziniert wurden, verzeichneten eine signifikant höhere maximale Auslenkung der IL-4 und IL-10 Expression als vergleichsweise die Tiere, die zuvor nur den Influenza-Impfstoff erhielten. Es ist bekannt, dass der wiederholte Kontakt des Impfantigens zu einem Booster-Effekt führt (Mayer 2003). Demnach könnte der Unterschied in der IL-4 und IL-10 Expression bei den zuvor mit Resequin[®] NN plus geimpften Tieren auf die wiederholte Exposition mit demselben Impfantigen zurückzuführen sein. Im Grunde müsste die Höhe der EHV-1/-4 Antikörpertiter dementsprechend bei den mit Resequin[®] NN plus vorimmunisierten Tieren ebenfalls einen Unterschied im Vergleich zu den Influenza vorgeimpften Pferden aufweisen. Dahingehend

zeigten die Antikörpertiter gegen EHV-1/-4 sowohl im NT als auch IFT keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Arten der Vorimmunisierung.

Der Einfluss des Alters auf die Zytokinexpression erbrachte statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen den jüngeren („bis 4 Jahre“) und älteren Tieren („über 4 Jahre“).

Die Ergebnisse der Zytokinexpressionsmuster in der vorliegenden Arbeit deuten im Allgemeinen auf eine Induktion der humoralen Immunantwort hin (ansteigende IL-4 und IL-10 Werte), ausgelöst durch die Impfung mit Resequin[®] NN plus. Ein Zusammenhang mit den Ergebnissen der Titeranstiege der EHV-1/-4 Antikörper lässt sich daher ableiten. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in der Studie von Coombs et al. (2006). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass eine zunehmende Expression von IL-4 mit der Bildung von Antikörpern einherging. Die Genexpression von IL-4 scheint somit als Parameter der humoralen Immunantwort geeignet zu sein. Coombs et al. (2006) wiesen dafür bei einem Infektionsversuch mit EHV-1 bei Ponys nach, dass bei den Tieren, die eine Serokonversion gegen EHV-1 zeigten, auch eine Induktion der IL-4 Expression vorkam.

Die nur kurzzeitig geringe Erhöhung der Genexpression von IFN- γ und der nicht nachweisbare Anstieg von IL-2 in der hier vorliegenden Arbeit könnte auf nicht ausreichende Stimulation der zellulären Immunantwort durch die Impfung bzw. durch Zylexis[®] zurückzuführen sein oder sie wurde durch die vermehrte Expression von IL-4 und IL-10 unterdrückt. Ein deutlicher Anstieg der IFN- γ Expression über den Studienzeitraum wäre zumindest bei den Zylexis[®]-behandelten Tieren zu erwarten gewesen, da nach bisherigen Untersuchungen Zylexis[®] zu einer Zunahme der IFN- γ Expression *in vitro* geführt hatte (Fachinger et al. 2000; Friebe et al. 2004). Auch neueste Untersuchungen von Horohov et al. (2008) über den Einfluss von Zylexis[®] (PPVO = Parapoxvirus ovis) in kombinierter Verabreichung mit einem Tetanus-Toxoid-Impfstoff beim Pferd *ex vivo* erbrachten keine signifikanten Unterschiede in den Profilen der Zytokinexpression zwischen den Tieren mit PPVO-Behandlung und denen, die PPVO und die Tetanusvakzine erhielten. PPVO wurde in dieser Studie dreimal am Tag 0, 2 und 9 intramuskulär verabreicht. Es folgten Blutentnahmen 0, 6, 24 und 48 Stunden nach jeder Behandlung. Mit Hilfe der TaqMan[®]-PCR wurde die *ex vivo* Genexpression von Typ I-Interferonen, IFN- γ , TNF- α und IL-12, -15, -18 untersucht. Lediglich die IFN- γ Expression erhöhte sich leicht 24 Stunden nach der ersten Applikation von PPVO, jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Horohov et al. 2008). Untersuchungen von Mangold-Gehring (2005) über die IFN- γ Expression nach Applikation von Baypamun[®] und Vakzinierung bei Hunden führte *ex vivo* zu keiner messbaren Zunahme der IFN- γ mRNA-Menge, jedoch war in Kombination mit einer

polyvalenten Vakzine ein signifikanter Effekt nachweisbar. 3 von 6 mit Baypamun[®] behandelte Hunde zeigten eine Reduktion der IFN- γ Expression nach der Impfung (Mangold-Gehring 2005). Vermutlich steht diese Beobachtung von Mangold-Gehring (2005) mit einer Induktion von anderen Zytokinen, die die IFN- γ Synthese beeinflussen, in Verbindung. Dazu wurden in der Dissertation von Mangold-Gehring (2005) keine weiteren Parameter, wie zusätzliche Zytokine oder Antikörper, bestimmt, um diese Beobachtung abzuklären. Ein ähnliches Ergebnis über die Untersuchung der Zytokinexpression von IFN- γ und IL-2 konnten Ellis et al. (1995) in einer Studie über die zelluläre und humorale Immunantwort bei Pferden nach Vakzinierung mit einem attenuierten EHV-1 Impfstoff und einem inaktivierten EHV-1/-4 Impfstoff zeigen. Nach *in vitro* Stimulation von Leukozytenkulturen mit jeweils Lebend-EHV-1 und -4 konnte keine Zunahme der IL-2 oder IFN- γ Aktivität, weder vor Vakzinierung noch danach in beiden Impfgruppen (attenuiert und inaktiviert) verzeichnet werden (Ellis et al. 1995). Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass IL-2 im Zellkulturüberstand mit Hilfe von Radioaktivität und IFN- γ im Serum und Zellkulturüberstand durch einen VSV- (vesicular stomatitis virus) Plaquereduktionstest ermittelt wurde. Sowohl attenuierte als auch inaktivierte Impfstoffe gegen EHV-1/-4 führten wahrscheinlich in dieser Untersuchung zur nicht ausreichend nachweisbaren Stimulation der zellulären Immunantwort. Im Gegensatz dazu entdeckten Holmes et al. (2006) bei Untersuchungen verschiedener kommerzieller Totimpfstoffe u. a. gegen EHV-1/-4, dass eine EHV-1 spezifische IFN- γ mRNA Produktion mittels „Real-Time“ PCR nach dreimaliger Applikation des Impfstoffes gemessen werden konnte und mit einer serologischen Reaktion nach Impfung mit dem Totimpfstoff einherging (Holmes et al. 2006). Für die Zukunft sollten in weiteren Studien die Anzahl der Impfungen und das Impfintervall näher berücksichtigt werden. In einer Untersuchung von Luce et al. (2007) über die EHV-1 spezifische IFN- γ Synthese als Parameter der zellvermittelten Immunität bei Vollblutpferden unter Berücksichtigung des Alters, des Geschlechts, der Impfhistorie und Feldinfektionen mit EHV-1 wurde IFN- γ mittels monoklonaler Antikörper im IFT bestimmt und die positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die IFN- γ Synthese in equinen PBMCs war signifikant höher bei Tieren über 5 Jahre sowie bei weiblichen Pferden und bei Pferden, die mit einer inaktivierten Vakzine geimpft wurden, im Vergleich zu den ungeimpften Tieren. Die Häufigkeit der IFN- γ positiven PBMCs variierte innerhalb der Vollblutpopulation, jedoch war sie im Vergleich immer bei jüngeren Pferden und unvakzinierten Pferden vermindert. In der hier vorliegenden Arbeit scheint das Alter keinen Einfluss auf die Zytokinantwort auszuüben. Dagegen wurden in Bezug auf die Impfhistorie ähnliche Beobachtungen festgestellt, wie sie bei Luce et al. (2007) beschrieben

sind. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Genexpression von IL-4 und IL-10 bei den Pferden beobachtet werden, die in ihrer Vergangenheit bereits mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus vakziniert wurden.

Untersuchungen über den Einfluss des Geschlechts sind in der vorliegenden Studie insgesamt schwierig zu beurteilen, da 80% der Pferde Stuten (16 Pferde) und 20% der Tiere (4 Pferde) männlich waren. Darüber hinaus muss bei den männlichen Tieren die Kastration als ein weiterer Faktor berücksichtigt werden. Neben den individuellen Unterschieden kann vermutlich die Pferderasse auch einen Einfluss auf die Zytokinexpression ausüben und sollte an anderer Stelle näher untersucht bzw. berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit deuten insgesamt darauf hin, dass Zylexis[®] unter Berücksichtigung der ausgewählten Zytokine keinen Effekt auf die Aktivierung der zellulären Immunantwort nach der Impfung ausgeübt hat.

Vergleich der Zytokinmesswerte *ex vivo* und *in vitro*:

In Anbetracht der geringen mRNA-Konzentrationen im Blut wurde zur Absicherung der *ex vivo* Untersuchungen eine *in vitro* Stimulation der präparierten equinen PBMC mit Con A durchgeführt. Jedoch konnte ein direkter Vergleich zwischen der Auswertung der *ex vivo* Daten und der *in vitro* Ergebnisse nicht erfolgen. Aufgrund methodischer Probleme lag eine zu geringe Anzahl der *in vitro* Messwerte vom Versuchstag -30 vor. Eine statistische Auswertung über die Veränderung der Zytokinexpression im Vergleich zum Ausgangswert konnte bei den *in vitro* Daten somit nicht durchgeführt werden. Die Auswertung der *in vitro* Daten beschränkte sich daher auf die Feststellung, ob eine Stimulation der equinen PBMC in Zellkultur mit einem unspezifischen Mitogen zu einer Veränderung der Zytokinexpression geführt hat. Die mRNA-Detektion *in vitro* zeigte eindeutig, dass das Lektin Conavalin A zu einer Induktion der Zytokinexpression, mit Ausnahme von Interleukin-2, aus den equinen PBMC geführt hat. Auffällig hierbei war, dass die Tiere der Placebo-Gruppe im Vergleich zur Zylexis-Gruppe eine bessere Stimulierbarkeit zeigten, die statistisch signifikant war bei IFN- γ und IL-4. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Horohov et al. (2008) zeigten einen signifikanten Anstieg der IFN- γ Expression von equinen PBMC *in vitro* durch die Stimulation mit Conavalin A in der Konzentration von 5 μ g/ml, ohne dass die Tiere zuvor mit Zylexis[®] behandelt wurden. Darüber hinaus verzeichnete die Expression von IFN- γ signifikante Unterschiede bei Kultivierung der equinen PBMCs mit PPVO und Conavalin A in

Kombination, als vergleichsweise Concavalin A und PPVO für sich genommen. Diese Art der Costimulation bei der IFN- γ Expression beobachteten bereits Friebe et al. (2004) *in vitro* mit humanen PBMCs.

Untersuchungen der IFN- γ Expression bei Hunden zeigten dagegen bei den *in vitro* stimulierten caninen PBMCs eine Zunahme der IFN- γ Menge relativ zum Ausgangswert. Die *in vitro* Stimulation erfolgte durch das pflanzliche Mitogen Phytohemagglutinin P. Unterschiede zwischen den Baypamun[®]-behandelten Hunden und den Kontrolltieren konnten nicht festgestellt werden (Mangold-Gehring 2005).

In Anbetracht der fehlenden Ausgangswerte vom Versuchstag -30 in der hier vorliegenden Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob eine Zunahme der Zytokin-mRNA Menge *in vitro* im Vergleich zum Ausgangswert stattgefunden hat. Es wurde aber festgestellt, dass Unterschiede in der Stimulation zwischen der Zylexis[®]- und Placebo-Gruppe bestanden, die von den Ergebnissen aus der Dissertation von Mangold-Gehring (2005) abweichen. Vermutlich erzeugt Zylexis[®] beim Pferd eine Stimulation verschiedener Zelltypen, die zur Folge hat, dass die präparierten PBMC außerhalb des Organismus in Zellkulturen weniger sensitiv auf einen Stimulus reagieren oder der Schwellenwert einer unspezifischen Stimulation höher wird als vergleichsweise bei den PBMC aus der Placebo-Gruppe. Hierfür sollten weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden, die einen möglichen Einfluss der Zylexis[®]-Applikation auf die *in vitro* Stimulation abklären.

Bei vergleichweiser Betrachtung der *ex vivo*- und der stimulierten *in vitro* Messwerte wurden für IFN- γ , IL-4 und IL-10 bei fast allen Pferden höhere mRNA-Konzentrationen bei den stimulierten Zellkulturproben nachgewiesen. Indessen ergab sich bei 12 Pferden (60%) eine höhere IL-2-Konzentration bei den *ex vivo* Proben.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit präsentieren, dass Konzentrationsunterschiede in der Zytokin-mRNA *ex vivo* mit Hilfe der TaqMan[®]-PCR darstellbar sind. Darüber hinaus konnte geklärt werden, dass erwartungsgemäß zur Detektion der Zytokin-mRNA Konzentration eine vorhergehende Stimulation der PBMC *in vitro* zu nachweislich höheren Messwerten führte, die mRNA-Konzentration der *ex vivo* Proben aber ausreichend waren, um Unterschiede in der Konzentration anzuzeigen.

5.4 Fazit

Um einen möglichen synergistischen Effekt bei der Immunantwort beim Pferd nach Impfung gegen EHV-1/-4 zu beobachten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die Antikörpertiter gegen EHV-1/-4, die Anzahl der equinen PBMC, der Immunstatus und die Zytokinexpression von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 im Zusammenhang untersucht.

Es wurde festgestellt, dass die leichte Konzentrationszunahme von IL-4 und IL-10 *ex vivo* eine Aktivität der humoralen Immunantwort widerspiegelt, die mit der serologischen Reaktion der Antikörpertiter gegen EHV-1/-4 nach der Impfung korreliert. Auch die Erhöhung der Anzahl an PBMC im Studienverlauf spricht für eine Reaktion des Immunsystems auf die Impfung. Auffällig hierbei war die deutliche Zunahme der Anzahl von PBMCs bei den Zylexis[®]-behandelten Pferden. Rückschlüsse auf die Lymphozytensubpopulationen konnten hierbei nur bedingt zu zwei Untersuchungszeitpunkten gezogen werden und ließen sich aufgrund fehlender zusätzlicher Untersuchungszeitpunkte nicht mit den anderen Ergebnissen in Zusammenhang bringen.

Die signifikante Zunahme der PBMC-Anzahl bei den Zylexis[®]-behandelten Pferden ist der einzige Parameter, der auf einen synergistischen Effekt von Zylexis[®] und der Impfung mit Resequin[®] NN plus hinweist. Die anderen Untersuchungsparameter zeigten diesen Effekt nicht. Um eine belastbare Immunität infolge der Impfung mit und ohne Gabe von Zylexis[®] zu überprüfen, müssten die Pferde anschließend mit dem equinen Herpesvirus experimentell infiziert werden. Anhand solcher Infektionsversuche lässt sich die ausgebildete Immunität nach Impfung und Zylexis[®]-Applikation überprüfen. Lunn und Rush (2004) konnten in einem Infektionsversuch mit dem equinen Influenzavirus zeigen, dass Baypamun[®]-behandelte Pferde nach einer Stresssituation (Transport) und anschließender experimenteller Infektion mit dem equinen Influenzavirus zwar klinische Symptome zeigten, jedoch eine deutlich signifikant höhere Antikörperantwort nachweisbar war als bei den unbehandelten Kontrolltieren.

Aus solchen Daten von Infektionsversuchen könnte sich auch eine praktische Relevanz der Anwendung von Zylexis[®] in Kombination mit der Impfung ableiten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Infektionsversuche mit einem erheblichen Aufwand verbunden sind und sich in Deutschland als nicht praktikabel darstellen. Der Schwerpunkt liegt daher auf den diagnostischen Parametern zur Beurteilung der Immunität und dem daraus resultierenden schützenden Effekt vor den Infektionskrankheiten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in Bezug auf die kombinierte Anwendung von Zylexis[®] mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus eine geringe Relevanz für die Praxis. Die Anwendung

von Zylexis[®] hat sich bei der Prophylaxe und Behandlung von Infektionen und stressinduzierten Erkrankungen bereits bei einigen Tierarten bewährt (Ziebell et al. 1997). Denkbar wäre ein Einsatz von Zylexis[®] in Kombination mit dem Impfstoff in Problembeständen mit beispielsweise „Crowding-assoziierten“ Krankheiten, um den Ausbruch von subklinischen Infektionen nach der Impfung zu minimieren. Die kombinierte Anwendung von Zylexis[®] mit der Impfung ist zudem an einen erhöhten Kostenaufwand und an ein erhöhtes Risiko von Komplikationen, wie Abszessbildungen oder anaphylaktischen Reaktionen, gebunden. Der Einsatz von Zylexis[®] zusammen mit der Impfung sollte daher unter Praxisbedingungen individuell entschieden werden.

5.5 Ausblick

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Anwendung von Zylexis[®] in Kombination mit der Impfung Resequin[®] NN plus zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an PBMC geführt hat. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse scheinen *ex vivo* Untersuchungen der Zytokin-mRNA mittels TaqMan[®]-PCR ausreichend, um Konzentrationsunterschiede darzustellen. Um festzustellen, ob die hier ausgewählten Zytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10) durch andere Zytokine (z.B. IL-12, IL-18) in ihrer Expression beeinflusst werden, können diese in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, die Lymphozytenpopulationen zu jedem Untersuchungszeitpunkt mittels Durchflusszytometrie zu separieren und aus den einzelnen Subpopulationen anschließend die Zytokin-mRNA Expression zu messen, um zu klären, welche Zellpopulationen verschiedenartige Zytokine exprimieren.

Der leichte Anstieg der Expression von IFN- γ als Parameter der zellulären Immunantwort konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig auf die Anwendung von Zylexis[®] zurückgeführt werden und beruht vermutlich auf individuellen Unterschieden. Auch die Impfung allein führte nicht zu einer deutlichen Induktion von IFN- γ und IL-2. Da die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle bei Infektionen mit dem equinen Herpesvirus einnimmt, wäre es für die Zukunft wünschenswert, eine Vakzine zu entwickeln, die zu einer Aktivierung der EHV-spezifischen zellulären Immunantwort führt und Schutz vor den klinischen Symptomen einer EHV-1/-4 Infektion bietet.

Paillot et al. (2006) konnten durch die Anwendung einer rekombinanten Vakzine, basierend auf Vaccinia-Virus (NYVAC), welches das EHV-1 Gen 64 exprimiert, eine Erhöhung der

zellvermittelten Immunität beim Pferd nachweisen. Diese führte jedoch nicht zum Schutz vor einer experimentellen EHV-1 Infektion (Paillot et al. 2006). Pan et al. (1999) fanden heraus, dass der Einsatz von GM-CSF- und IL-2-Genen in Kombination mit DNA-Vakzinen zu einer höheren Antikörper- und T-Zell-Immunantwort führte. Auch die Arbeitsgruppe von Schijns et al. (2002) konnte einen positiven Effekt in der Antikörperantwort beim Einsatz von rekombinanten feline IFN- γ als Adjuvant in einer inaktivierten Vakzine gegen Tollwut und Calicivirus bei Katzen nachweisen. Beim Pferd konnten erste Erfahrungen mit einem therapeutischen DNA-Impfstoff gegen die EAV- (Equine Arteritis Virus) Infektion gesammelt werden. Hierbei wurde der DNA-Vakzine das Gen von IL-2 zugefügt, um gezielt die zelluläre Immunantwort zu steigern. Nach mehrfacher Behandlung von EAV-positiven Hengsten waren 80% der Tiere nach der Impfung negativ getestet worden. Darüber hinaus konnte neben dem Anstieg von neutralisierenden Antikörpern auch eine starke zytotoxische T-Lymphozyten-Aktivität gemessen werden (Giese 2004).

Der Einsatz von rekombinanten Zytokin-Proteinen oder -Genen (z.B. IFN- γ und IL-2) als Adjuvantien in Vakzinen gegen EHV-1/-4 scheint eine Möglichkeit zu bieten, um zukünftig einen effektiven Schutz gegen die equine Herpesvirusinfektion zu erreichen.

6. Zusammenfassung

***Ex vivo* und *in vitro* Studien zur Wirkung von Zylexis® auf die Immunantwort nach Impfung mit Resequin® NN plus unter besonderer Berücksichtigung der EHV-1/-4 spezifischen Antikörperantwort, des Immunstatus und Zytokinmusters im Pferdeblut**

Eine Infektion mit dem EHV-1/-4 beim Pferd kann mit schweren Krankheitssymptomen einhergehen und zu wirtschaftlichen Verlusten führen. Eine entscheidende Rolle in der Prophylaxe gegen EHV-1/-4 Infektionen nehmen die Impfstoffe ein. Die zurzeit auf dem Markt erhältlichen Impfstoffe stimulieren allerdings in der Regel nur die humorale Immunantwort. Ziel der vorgelegten Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Verbesserung der humoralen und Stimulation der zellulären Immunantwort durch Kombination von Impfung und Immunstimulator Zylexis® möglich ist.

Dazu wurde eine Gruppe von 20 Pferden in eine Zylexis®- (n = 11) und Placebo-Gruppe (n = 9) aufgliedert. Die Tiere erhielten eine dreimalige Zylexis®- bzw. Placebo-Applikation im Abstand von 48 Stunden. Am Tag der dritten Zylexis®- bzw. Placebo-Injektion wurden die Pferde mit dem inaktivierten Kombinationsimpfstoff Resequin® NN plus vakziniert.

Die Untersuchung der Immunantwort erfolgte zu 6 verschiedenen Zeitpunkten. 30 Tage vor Studienbeginn wurde ein Ausgangswert ermittelt. Die Entnahmen der Blutproben erfolgten 6 Stunden nach der zweiten Zylexis®-/Placebo-Applikation sowie nach der Verabreichung der dritten Zylexis®-/Placebo-Dosis zusammen mit der Impfung. Weitere Blutentnahmen fanden am 3., 7. und 14. Tag nach der Vakzinierung statt.

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden die Antikörpertiter gegen EHV-1 und EHV-4 im Neutralisationstest (NT) und im indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) gemessen sowie die Anzahl der peripheren mononukleären Blutzellen und die Expression der Zytokingene von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 ermittelt. An zwei Untersuchungszeitpunkten (Tag -30 und 0) wurde der Immunstatus über die Firma LABOLKIN bestimmt.

Im Vordergrund stand die Detektion von ausgewählten Zytokinexpressionsmustern mittels quantitativer „Real-Time“ TaqMan®-PCR. Als Parameter der zellulären Immunantwort wurde die Expression von IFN- γ und IL-2 untersucht und als Parameter der humoralen

Immunantwort die von IL-4 und IL-10. Der Zytokin-mRNA-Nachweis mittels TaqMan[®]-PCR erfolgte direkt aus dem Pferdeblut (*ex vivo*) und vergleichend *in vitro* nach 24-stündiger Stimulation mit Concavalin A. Dabei wurde festgestellt, dass *ex vivo* Untersuchungen der Zytokin-mRNA mittels TaqMan[®]-PCR ausreichen, um Konzentrationsunterschiede darzustellen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwendung von Zylexis[®] in Kombination mit dem Impfstoff Resequin[®] NN plus zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl von equinen PBMCs geführt hat. Darüber hinaus spiegelt die Induktion der Genexpression von IL-4 und IL-10 nach der Impfung sowohl bei den Zylexis[®]-behandelten Tieren als auch bei den Placebo-behandelten Pferden eine Aktivität der humoralen Immunantwort wieder. Diese korreliert mit dem Anstieg der EHV-1/-4 Antikörpertiter. So konnte ein Antikörperanstieg bei 19 (95%) Pferden im IFT und bei 7 (35%) Pferden im NT gezeigt werden. Der Nachweis von Virus neutralisierenden Antikörpern gelang vor allem bei Pferden, die ein Alter von mindestens über 4 Jahren hatten. Zwischen den Versuchsgruppen Zylexis[®] und Placebo konnten keine Unterschiede bezüglich der Höhe der virusspezifischen Antikörpertiter und der Zytokinexpression ermittelt werden. Eine Induktion von IFN- γ und IL-2 konnte in der vorliegenden Arbeit weder durch den Einsatz von Zylexis[®], noch durch den Impfstoff allein festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach Impfung mit Resequin[®] NN plus die Induktion der humoralen Immunantwort mit Anstieg der EHV-1/-4 Antikörpertiter und Expressionszunahme von IL-4 und IL-10 nachweisbar war. Durch Zylexis[®] konnte hierbei kein synergistischer Effekt erzielt werden. Eine nachweisliche Induktion der zellulären Immunantwort gemessen an der Expression von IFN- γ und IL-2 konnte weder durch den Impfstoff allein, noch in Kombination mit Zylexis[®] festgestellt werden. Zylexis[®] bewirkte allerdings in Kombination mit der Impfung eine signifikante Erhöhung der Anzahl von equinen PBMCs.

7. Summary

***Ex vivo* and *in vitro* studies of the impact of Zylexis[®] on the immune response following vaccination with Resequin[®] NN plus with special consideration of the EHV-1/-4 specific antibody response, the immune status and the cytokine gene expression patterns in horse blood**

EHV-1/-4 infections in horses not only cause severe clinical symptoms, but also economical losses. Vaccination plays an important role in preventing EHV-1/-4 infections.

Vaccines currently available on market usually only stimulate the humoral immune response. The aim of the present study was to evaluate whether it is possible to improve the humoral immune response and whether the cellular immune response could be stimulated by the combination of the inactivated vaccine Resequin[®] NN plus and the immune modulator Zylexis[®].

A group of 20 horses were divided into a Zylexis-group (n = 11) and a Placebo-group (n = 9). The animals of both groups received three applications of Zylexis[®] or a Placebo respectively at 48 hour intervals. The horses were vaccinated with the inactivated combination vaccine Resequin[®] NN plus simultaneously to the third Zylexis[®]-/Placebo application.

The examination of the immune response was carried out at 6 different time points. Initial values were determined 30 days before the beginning of the study. Blood samples were collected 6 hours after the second and third combined application of Zylexis[®]-/Placebo and Resequin[®] NN plus. Further blood samples were collected on days 3, 7 and 14 after vaccination.

At every time point of investigation the antibody titer against EHV-1 and EHV-4 was measured with neutralization test and indirect immunofluorescence test, the number of peripheral mononuclear blood cells and the cytokine gene expression of IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 were examined. The immune status was determined at two time points (day -30 and day 0) by LABOKLIN.

Foremost we studied the gene expression of selected cytokines using quantitative “real-time” TaqMan[®]-PCR. For the cellular immune response the gene expression levels of IFN- γ and

IL-2 and for the humoral immune response the levels of gene expression of IL-4 and IL-10 were used as parameters. The cytokine mRNA was analyzed with TaqMan[®]-PCR directly from the horses' blood (*ex vivo*) and for comparison after stimulation with Concavalin A for a period of 24 hours (*in vitro*). We noticed that *in vivo* examinations of cytokine mRNA using TaqMan[®]-PCR is sufficient to detect differential gene expressions.

The results showed that the administration of Zylexis[®] in combination with the vaccine Resequin[®] NN plus resulted in significantly increased numbers of equine PBMCs. Further more the induction of the gene expression of IL-4 and IL-10 after vaccination equally mirrored an activity of the humoral immune response in the Zylexis[®]- and Placebo-treated horses. These findings correlate with the serological reactions of EHV-1/-4 antibodies. Thus the IFT and NT antibody titers increased in 19 (95%) animals and 7 (35%) horses respectively. The virus neutralizing antibodies could be detected especially in horses aged at least 4 years. No significant differences regarding the level of virus specific antibody titers and cytokine gene expression were noted between the Zylexis- and Placebo-groups.

An induction of the IFN- γ and IL-2 in the present study could neither be detected with Zylexis[®] nor using the vaccine alone.

In conclusion after vaccination with Resequin[®] NN plus an induction of the humoral immune response was detectable shown as increased EHV-1/-4 antibody titers and increased gene expressions of IL-4 and IL-10. No synergistical effect was achieved by Zylexis[®]. A detectable induction of the cellular immune response as measured by the gene expressions of IFN- γ and IL-2 was neither observed when applying Zylexis[®] alone, nor Resequin[®] NN plus nor using both in combination. However Zylexis[®] caused a statistically significant increase in equine PBMC number in combination with the vaccine.

8. Literaturverzeichnis

- Allen, G. P., M. R. Yeargan und J. T. Bryans (1983). "Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo virus passage." Infect Immun **40** (1): 436-9.
- Allen, G. P. und J. T. Bryans (1986). "Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections." Progr Vet Microbiol Immunol **2**: 78-144.
- Allen, G. P., L. D. Coogle, E. N. Ostlund und M. R. Yeargan (1992). "Molecular dissection of two major equine herpesvirus-1 glycoprotein antigens that elicit humoral immune response in the horse." Equine Inf Dis **VI**: 181-193.
- Allen, G., M. Yeargan, L. R. Costa und R. Cross (1995). "Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1." J Virol **69** (1): 606-12.
- Allen, G. P., J. H. Kydd, J. D. Slater und K. C. Smith (1999). "Advantages in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion." Equine Inf Dis **VIII**: 129-146.
- Allen, G. P. (2006). "Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses." Am J Vet Res **67** (8): 1401-5.
- Allen, G. P. und C. C. Breathnach (2006). "Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1." Equine Vet J **38** (3): 252-7.
- Azmi, M. und H. J. Field (1993). "Interactions between equine herpesvirus type 1 and equine herpesvirus type 4: T cell responses in a murine infection model." J Gen Virol **74** (11): 2339-45.
- Bablok, W., H. Passing, R. Bender und B. Schneider (1988). "A General Regression Procedure for Method Transformation." J Clin Chem Clin Biochem **26**: 783-790.
- Baumann, D. (2006). "Untersuchung der Wirksamkeit des Paramunitätsinducers Zylexis[®] zur Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen". Inaugural-Dissertation. Hannover.
- Baus, E., F. Andris, P. M. Dubois, J. Urbain und O. Leo (1996). "Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes." J Immunol **156**: 4555-61.
- Baxi, M. K., S. Efstathiou, G. Lawrence, J. M. Whalley, J. D. Slater und H. J. Field (1995). "The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons." J Gen Virol **76** (12): 3113-8.

- Benetka, V., M. Brandstätter, S. Högeler und K. Möstl (2002). "EHV-4 bedingter Abortus in einem österreichischen Pferdebestand mit respiratorischen und neurologischen Krankheitsfällen." Tierärztl Umschau **57**: 464-471.
- Boerboom, D., N. Pilon, R. Behdjani, D.W. Silversides und J. Sirois (2000). "Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process". Endocrinology **141**: 4647-4656.
- Borchers, K., U. Wolfinger, B. Lawrenz, A. Schellenbach und H. Ludwig (1997). "Equine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct in situ PCR." J Gen Virol **78** (5): 1109-14.
- Borchers, K., U. Wolfinger, A. Schellenbach, B. Lawrenz, F. Glitz und H. Ludwig (1998). "Equine herpesvirus type 1 and trigeminal ganglia of naturally infected horses: detection of DNA and latency associated transcripts." Equine Inf Dis **VII**: 147-152.
- Borchers, K., U. Wolfinger und H. Ludwig (1999). "Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses." J Gen Virol **80** (8): 2165-71.
- Borchers, K., P. Thein und A. Sterner-Kock (2006). "Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation." Equine Vet J **38** (3): 283-287.
- Böttcher, E. (1994). "Clinical trials and field experience with parapoxvirus-based immunostimulants in companion animals." Immunomodulator Symposium of the WAVMI and Specialists in Infectious Disease: 28-33.
- Breathnach, C. C., M. R. Yeargan, A. S. Sheoran und G. P. Allen (2001). "The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens." Equine Vet J **33** (7): 651-7.
- Brown, M. A., J. H. Pierce, C. J. Watson, J. Falco, J. N. Ihle und W. E. Paul (1987). "B cell stimulatory factor-1/interleukin-4mRNA is expressed by normal and transformed mast cells." Cell **50**: 809-818.
- Brown, M. A., J. Hu-Li und W. E. Paul (1988). "IL-4/B cell stimulatory factor 1 stimulates T cell growth by an IL-2 independent mechanism." J Immunol **141**: 504-511.
- Burki, F., W. Rossmanith, N. Nowotny, C. Pallan, K. Mostl und H. Lussy (1990). "Viraemia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses." Vet Q **12** (2): 80-6.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**: 169-193.

- Büttner, M., W. Strube, G. Wolf und M. Hoerstke (1987). "Parapox als Induktor unspezifischer Abwehrmechanismen." Tierärztl Umschau **42**: 14-21.
- Cardullo, R. A., S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik und D. E. Wolf (1988). "Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer." Proc Natl Acad Sci USA **85**: 8790-8794.
- Cardwell, J., K. Smith, R. Newton, T. Blunden, M. Bestbier und K. Whitwell (2003). "EHV paralytic disease in the south of England." Vet Rec **152** (14): 441-2.
- Carrigan, M., P. Cosgrove, P. Kirkland und M. Sabine (1991). "An outbreak of equid herpesvirus abortion in New South Wales." Equine Vet J **23** (2): 108-10.
- Chen, L., Y. Suzuki und E. F. Wheelock (1987). "Interferon-gamma synergizes with tumor necrosis factor and with interleukin 1 and requires the presence of both monokines to induce antitumor cytotoxic activity in macrophages." J Immunol **139**: 4096-4101.
- Chowdhury, S. I., G. Kubin und H. Ludwig (1986). "Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in a Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses." Arch Virol **90** (3-4): 273-88.
- Chung, K. F. und P. J. Barnes (1999). "Cytokines in asthma." Thorax **54**: 825-857.
- Coombs, D. K., T. Patton, A. K. Kohler, G. Soboll, C. Breathnach, H. G. Townsend und D. P. Lunn (2006). "Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies." Vet Immunol Immunopathol **111** (1-2): 109-16.
- Crabb, B. S. und M. J. Studdert (1995). "Equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus)." Adv Virus Res **45**: 153-190.
- Crawford, R. M., D. S. Finbloom, J. Ohara, W. E. Paul und M. S. Meltzer (1987). "B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens." J Immunol **139**: 135-141.
- De Mari, K., L. Maynard, H. M. Eun und B. Lebreux (2003). "Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial." Vet Rec **152**: 105-108.
- Degiantoni, G., M. Murphy, M. Kobayashi, M. K. Francis, B. Perussia und G. Trinchieri (1985). "Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon." J Exp Med **162**: 1512-1530.
- Delves, P., I. Roitt (1998). *Encyclopedia of Immunology*. 2nd Ed., San Diego: Academic Press.

- Dolby, C. A., D. Hannant und J. A. Mumford (1995). "Response of ponies to adjuvanted EHV-1 whole virus vaccine and challenge with virus of the homologous strain." Br Vet J **151** (1): 27-37.
- Doll, E. R., M. E. W. Crowe, J. T. Bryans und W. H. McCollum (1955). "Infection immunity in equine virus abortion." Cornell Vet **45**: 387-410.
- Doll, E. R. (1961). "Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters." J Am vet med Ass **139**: 1324-1330.
- Doll, E. R. und J. T. Bryans (1963). "A planned infection program for immunizing mares against viral rhinopneumonitis." Cornell Vet **53**: 249-262.
- Donaldson, M. T. und C. R. Sweeney (1997). "Herpesvirus myeloencephalopathy in horses: 11 cases (1982-1996)." J Am Vet Med Assoc **213**: 671-675.
- Donecker, J. M. und R. Holland (2005). "Efficacy of the immunomodulator Zylexis in horse challenged with equine herpesvirus." Pfizer Zylexis Technical Bulletin V3.
- Dongus, H. (2003). "Herpesviren beim Pferd - eine unterschätzte Gefahr." Pferdespiegel **2**: 25-29.
- Edington, N., C. G. Bridges und A. Huckle (1985). "Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids." Equine Vet J **17** (5): 369-72.
- Edington, N., C. G. Bridges und J. R. Patel (1986). "Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke." Arch Virol **90** (1-2): 111-24.
- Edington, N., B. Smyth und L. Griffiths (1991). "The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions." J Comp Pathol **104** (4): 379-87.
- Elia, G., N. Decaro, V. Martella, M. Campolo, C. Desario, E. Lorusso, F. Cirone und C. Buonavoglia (2006). "Detection of equine herpesvirus type 1 by real time PCR." J Virol Methods **133** (1): 70-5.
- Ellis, J. A., J. R. Bogdan, E. W. Kanara, P. S. Morley und D. M. Haines (1995). "Cellular and antibody responses to equine herpesviruses 1 and 4 following vaccination of horses with modified-live and inactivated viruses." J Am Vet Med Assoc **206**(6): 823-32.
- Fachinger, V. (2000). "Poxvirus-Induced Immunostimulating Effects on Porcine Leukocytes." J Virol **74** (17): 7943-7951.
- Farrar, M. A. und R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol **11**: 571-611.

- Foote, C. E., D. N. Love, J. R. Gilkerson und J. M. Whalley (2002). "Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine." Vet Microbiol **88** (1): 13-25.
- Friday, P. A., W. K. Scarratt, F. Elvinger, P. J. Timoney und A. Bonda (2000). "Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses." J Vet Intern Med **14** (2): 197-201.
- Friebe, A., A. Siegling, S. Friederichs, H.-D. Volk und O. Weber (2004). "Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis (Orf Virus) on Human Peripheral Immune Cells: Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-Like Cells." J Virol **78** (17): 9400-9411.
- Garcia-Blanco, M. A. und B. R. Cullen (1991). "Molecular basis of latency in pathogenic human viruses." Science **254**: 815-820.
- Gibson, J. S., T. O'Neill, A. Thackray, D. Hannant und H. J. Field (1992). "Serological responses of specific pathogen-free foals to equine herpesvirus-1: primary and secondary infection, and reactivation." Vet Microbiol **32** (3-4): 199-214.
- Giese, M. (2004). „Therapeutischer DNA-Impfstoff für das Pferd gegen die EAV-Infektion“. Vet-Med Report. Sonderausgabe V2. Berlin. **28**. Jahrgang: 6.
- Goehring, L. S. und M. M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan (2001). "The mystery of equine herpes myeloencephalopathy." Equine Vet Edu **13**: 36-42.
- Goehring, L. S., S. C. van Winden, C. van Maanen und M. M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan (2006). "Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in The Netherlands: a four-year retrospective study (1999-2003)." J Vet Intern Med **20** (3): 601-7.
- Gray, W. L., R. P. Baumann, A. T. Robertson, D. J. O'Callaghan und J. Staczek (1987). "Characterization and mapping of equine herpesvirus type 1 immediate early, early, and late transcripts." Virus Res **8** (3): 233-44.
- Grüning, G., A. Himmler und D. F. Antczak (1994). "Cloning and sequencing of horse interferon-gamma cDNA." Immunogenetics **39**: 448-449.
- Guo, P. X., S. Goebel, M. E. Perkus, J. Taylor, E. Norton, G. Allen, B. Languet, P. Desmettre und E. Paoletti (1990). "Coexpression by vaccinia virus recombinants of equine herpesvirus 1 glycoproteins gp13 and gp14 results in potentiated immunity." J Virol **64** (5): 2399-406.
- Gustat, S. (2003). "In vitro- und ex vivo- Untersuchungen zur Zytokinexpression im equinen Trachealepithel". Vet.med.Diss., Berlin, **Journal-Nr.: 2771**.

- Haig, D. M. und S. Fleming (1999). "Immunomodulation by virulence proteins of the parapoxvirus orf virus." Vet Immunol Immunopathol **72**: 81-86.
- Hannant, D., D. M. Jessett, T. O'Neill, C. A. Dolby, R. F. Cook und J. A. Mumford (1993). "Responses of ponies to equid herpesvirus-1 ISCOM vaccination and challenge with virus of the homologous strain." Res Vet Sci **54** (3): 299-305.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak und P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**: 986-994.
- Heldens, J. G., D. Hannant, A. A. Cullinane, M. J. Prendergast, J. A. Mumford, M. Nelly, J. H. Kydd, M. W. Weststrate und R. van den Hoven (2001). "Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares." Vaccine **19** (30): 4307-17.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh und R. Griffith (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (NY) **10** (4): 413-417.
- Holmes, M. A., H. G. Townsend, A. K. Kohler, S. Hussey, C. Breathnach, C. Barnett, R. Holland und D. P. Lunn (2006). "Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1, equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus." Vet Immunol Immunopathol **111** (1-2): 67-80.
- Horohov, D. W., E. Swiderski, W. Folsom und E. V. Vandergriff (1994). "Equine cytokines in the immune response: Preliminary results in the detection of cytokine mRNA in blood mononuclear cells." Equine Inf Dis **VII**: 127-131.
- Horohov, D. W., J. H. Kydd und D. Hannant (2002). "The effect of aging on T cell responses in the horse." Developmental and Comparative Immunology **26**: 121-128.
- Horohov, D. W., C. C. Breathnach, T. L. Sturgill, C. Rashid, J. L. Stiltner, D. Strong, N. Niemann und R. E. Holland (2008). "*In vitro* and *in vivo* modulation of the equine immune response by *parapoxvirus ovis*." Equine Vet J **40** (5): 468-472.
- Hu-Li, J., E. M. Schevach, J. Mizuguchi, J. Ohara, T. R. Mosmann und W. E. Paul (1987). "B cell stimulatory factor I (Interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes." J Exp Med **165**: 157-172.
- Jackson, T. A., B. I. Osburn, D. Cordy und J. W. Kendrick (1977). "Equine herpesvirus 1 infection of horses: Studies on the experimentally induced neurologic diseases." Am J Vet Res **38**: 709-719.

- Jessett, D. M., D. Schrag und J. A. Mumford (1999). "Protection provided by an attenuated EHV-1 vaccine against challenge with the virulent EHV-1 Ab4 isolate." Equine Inf Dis **VIII**: 414-415.
- Kolm, G., E. Knapp, R. Wagner und D. Klein (2006). "Increased interleukin-1 β mRNA expression in skin biopsies of horses with *Culicoides* hypersensitivity following challenge with *Culicoides nubeculosus* extract." Vet Immunol Immunopathol **113**: 90-98.
- Kühn, T. (2000). "Die Alternative zu "Einstallmischungen": Paraimmunisierung neugeborener Kälber mit einem nicht-mikrobiellen Inducer." Großtierpraxis **1** (4): 30-37.
- Kydd, J. H., E. Watrang und D. Hannant (2003). "Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares." Vet Immunol Immunopathol **96** (3-4): 207-17.
- Kydd, J. H., H. G. Townsend und D. Hannant (2006). "The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines." Vet Immunol Immunopathol **111** (1-2): 15-30.
- Lie, Y. S. und C. J. Petropoulos (1998). "Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assay." Curr Opin Biotechnol **9**: 43-48.
- Lindner, A., P. von Wittke, P. Thein und W. Strube (1993). "Einfluss eines Paramunitätsinducers auf die Inzidenz von Erkrankungen und die Plasmakortisolgehalte bei Vollblutfohlen vor und nach dem Absetzen." Tierärztl Praxis **21**: 47-50.
- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti und K. Deetz (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." PCR Methods Appl **4** (6): 357-62.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)} method." Methods **25** (4): 402-408.
- Luce, R., M. Shepherd, R. Paillot, B. Blacklawst, J. L. Wood und J. H. Kydd (2007). "Equine herpesvirus-1-specific interferon gamma (IFN γ) synthesis by peripheral blood mononuclear cells in thoroughbred horses." Equine Vet J **39** (3): 202-9.

- Ludwig, H., R. Rudolph, S. I. Chowdhury, G. van den Bossche, H. J. Wintzer und K. Krauser (1987). "Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) Infektion beim Pferd: Neurologische Symptomatik bei einer Warmblutstute mit akut tödlichem Verlauf. Molekulare Charakterisierung des Gehirnisolates und pathogenetische Korrelate." Berl Münch Tierärztl Wochenschr **100** (5): 147-52.
- Ludwig, H., P. Thein und S. I. Chowdhury (1988). Herpesvirus infections of equine animals. Virus diseases in laboratory and captive animals. G. Darai. Boston, Martin Nijhoff Publisher: 283-297.
- Lunn, D. P. und B. R. Rush (2004). "Immunomodulation: Principles and Mechanisms." AAEP Proceedings **50**: 447-453.
- Mangold-Gehring, S. (2005). Bestimmung der Interferon-gamma-Expression bei Baypamune behandelten Hunden mittels "Real Time PCR". Inaugural-Dissertation. Gießen.
- Mauel, S. und F. Steinbach (2000). "Expression cloning of equine interleukin-4 and equine interferon γ ". Immunobiology **203**: 155
- Mayr, A., M. Büttner, S. Pawlas, V. Erfle, B. Mayr, R. Brunner und K. Osterkorn (1986). "Vergleichende Untersuchungen über die immunstimulierende (paramunisierende) Wirksamkeit von BCG, Levamisol, Corynebacterium parvum und Präparaten aus Pockenviren in verschiedenen "in vivo"- und "in vitro"-Testen." J Vet Med **33**: 321-339.
- Mayr, A., M. Büttner, G. Wolf, H. Meyer und C. Czerny (1989). "Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses." Zentralbl Veterinärmed B **36**: 81-99.
- Mayr, A. und M. Siebert (1990). "Untersuchungen über die Wirksamkeit des Paramunitätsinducers PIND-ORF auf den durch Transportstress ausgelösten Kortisolanstieges beim Pferd." Tierärztl Umschau **45**: 677-682.
- Mayr, A., W. Ahne und B. Vilsmeier (1997). "Bewertung der Ergebnisse aus "In-vitro" und "Ex-vivo-in vitro"-Versuchen für die Beurteilung einer klinischen Wirksamkeit von Paramunitätsinducern aus Pockenviren." Tierärztl Umschau **52**: 3-11.
- Mayr, A. (2003). "Körpereigene Abwehr." TU Spezial **4**: 1-64.
- McCartan, C. G., M. M. Russell, J. L. Wood und J. A. Mumford (1995). "Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm." Vet Rec **136** (1): 7-12.
- McInnes, A. und D. M. Rennick (1988). "Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells." J Exp Med **167**: 598-611.

- Meyer, H., P. Thein und P. Hubert (1987). "Characterization of two equine herpesvirus (EHV) isolates associated with neurological disorders in horses." Zentralbl Veterinarmed B **34** (7): 545-8.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin und R. L. Coffmann (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**: 2348-2357.
- Mulcahy, G. und P. J. Quinn (1986). "A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine." J Vet Pharmacol Therap **9**: 119-139.
- Mülhardt, C. (2006). Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics, Elsevier.
- Mumford, J. A., P. D. Rosedale, D. M. Jessett, S. J. Gann, J. Ousey und R. F. Cook (1987). "Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985." J Reprod Fertil Suppl **35**: 509-18.
- Murray, M. J., F. del Piero, S. C. Jeffrey, M. S. Davis, M. O. Furr, E. J. Dubovi und J. A. Mayo (1998). "Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm." J Vet Intern Med **12** (1): 36-41.
- Nash, A. A. (1996). Immunity to Viruses. London, Mosby Verlag London.
- Niesters, H. G. M. (2004). "Molecular and diagnostic clinical virology in real time." Clinical Microbiology and Infection **10** (1): 5-11.
- Nugent, J., I. Birch-Machin und N. Davis-Poynter (2001). "Comparison between a paralytic and non-paralytic strain of EHV-1. Identification of field isolates". Proceedings of the 26th International Herpesvirus Workshop, Regensburg, Germany.
- Nugent, J., I. Birch-Machin, K. C. Smith, J. A. Mumford, Z. Swann, J. R. Newton, R. J. Bowden, G. P. Allen und N. Davis-Poynter (2006). "Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks." J Virol **80** (8): 4047-60.
- O'Neill, T., J. H. Kydd, G. Allen, E. Watrang, E. L. Mumford und D. Hannant (1999). "Determination of equid herpesvir 1-specific, CD8+, cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies in ponies." Vet Immunol Immunopathol **70**: 43-54.
- Osterrieder, N., C. Seyboldt und K. Elbers (2001). "Deletion of gene 52 encoding glycoprotein M of equine herpesvirus type 1 strain RacH results in increased immunogenicity." Vet Microbiol **81**: 219-226.

- Ostlund, E. N., G. P. Allen, M. R. Yeargan und L. D. Coogle (1992). "The antibody response of horse to specific antigenetic domains on equid herpesvirus-1 glycoproteins B und C." Equine Inf Dis **VI**: 272-282.
- Paillot, R., J. M. Daly, V. Juillard, J. M. Minke, D. Hannant und J. H. Kydd (2005). "Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1." Vaccine **23** (36): 4541-51.
- Paillot, R., S. A. Ellis, J. M. Daly, J. C. Audonnet, J. M. Minke, N. Davis-Poynter, D. Hannant und J. H. Kydd (2006). "Characterisation of CTL and IFN-gamma synthesis in ponies following vaccination with a NYVAC-based construct coding for EHV-1 immediate early gene, followed by challenge infection." Vaccine **24** (10): 1490-500.
- Pan, C. H., H. W. Chen und M. H. Tao (1999). "Modulation of immune response to DNA vaccines by codelivery of cytokine genes." J Formos Med Assoc **98** (11): 722-9.
- Passing, H. und W. Bablok (1983). "A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods." J Clin Chem Clin Biochem **21**: 709-720.
- Patel, J. R., J. Föld, H. Bateman, J. Williams, S. Didlick und R. Stark (2003). "Equid herpesvirus (EHV-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory diseases following EHV types 1 and 4 challenges." Vet Microbiol **92** (1-2): 1-17.
- Percival, S. S. (2000). "Use of Echinacea in medicine." Biochem Pharmacol **60** (2): 155-158.
- Perkins, G., D. M. Ainsworth, H. N. Erb, F. Del Piero, M. Miller, P. A. Wilkins, J. Palmer und M. Frazer (1999). "Clinical, haematological and biochemical findings in foals with neonatal Equine herpesvirus-1 infection compared with septic and premature foals." Equine Vet J **31** (5): 422-6.
- Pesteka, S., J. A. Langer, K. C. Zoon und C. E. Samuel (1987). "Interferons and their actions." Annu Rev Biochem **56**: 727-777.
- Petzoldt, K., H. Merkt, E. Müller und G. Kirpal (1987). "[New observations in the diagnosis of EHV (equine herpes virus) abortions]." Tierärztl Prax **15** (4): 393-7.
- Pfaffl, M. W. und M. Hageleit (2001). "Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR." Biotechnology Letters **23**: 275-282.
- Pschyrembel (2002). Klinisches Wörterbuch. Berlin, Walter de Gruyter.

- Pusterla, N., W. D. Wilson, P. A. Conrad, B. C. Barr, G. L. Ferraro, B. M. Daft und C. M. Leutenegger (2006). "Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy." Vet Rec **159** (11): 341-6.
- Quinn, P. J. (1990). "Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine." Advances in veterinary sciences and comparative medicine **35**: 43-99.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. S. Meurer, C. Wittwer and K. Nakagawara. Heidelberg, Springer Press.: 21-34.
- Riggio, M. P., A. A. Cullinane und D. E. Onions (1989). "Identification and nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of equine herpesvirus 4." J Virol **63** (3): 1123-33.
- Rode, H. J., W. Jansen, A. Rosen-Wolff, J. J. Bugert, P. Thein, Y. Becker und G. Darai (1993). "The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10) - like gene". Virus Genes **7** (1): 111-116.
- Roitt, I., J. Brostoff und D. Male (2001). Immunologie. Mosby, Edinburgh.
- Roizmann, B. und A. E. Sears (1987). "An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency." Ann Rev Microbiol **41**: 543-571.
- Rosas, C. T., L. B. Goodman, J. von Einem und N. Osterrieder (2006). "Equine herpesvirus type 1 modified live virus vaccines: quo vaditis?" Expert Rev Vaccines **5** (1): 119-31.
- Sabine, M., G. R. Robertson und J. M. Whalley (1981). "Differentiation of sub-types of equine herpesvirus by restriction endonuclease analysis." Austr Vet J **57**: 148-149.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangar, F., S. Nickler und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**: 5463-5467.
- Schijns, V. E., N. C. Scholtes, H. I. Zuilekom, L. F. Sanders, L. Nicolson und D. J. Argyle (2002). "Facilitation of antibody forming responses to viral vaccine antigens in young cats by recombinant baculovirus-expressed feline IFN-gamma." Vaccine **20** (13-14): 1718-24.
- Schröer, U. (2001). "Infektionen mit dem equinen Herpesviren des Typs 1 und 4 (EHV-1 und EHV-4) beim Pferd: Impfung, Abortgeschehen und Diagnostik." Vet. med. Diss., Berlin Journal Nr.: **2481**.

- Shankar, V., M. Kao, A.N. Hamir, H. Sheng, H. Koprowski und B. Dietzschold (1992).
"Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus." J Virol **5** (3): 285-9.
- Simms, D., P. E. Cizdziel und P. Chomczynski (1999). "Trizol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA." Lifetechnologies Focus **15**: 98-99.
- Slater, J. D., K. Borchers, A. M. Thackray und H. J. Field (1994). "The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse."
J Gen Virol **75** (Pt 8): 2007-16.
- Slater, J. und D. Hannant (2000). "Equine immunity to viruses."
Vet Clin North Am Equine Pract **16** (1): 49-68.
- Smith, K. A. (1984). "Interleukin 2." Annu Rev Immunol **2**: 319-333.
- Smith, K. C., K. E. Whitwell, M. M. Binns, C. A. Dolby, D. Hannant und J. A. Mumford (1992). "Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with equid herpesvirus 1." Equine Vet J **24** (4): 256-9.
- Smith, K. C., K. E. Whitwell, J. A. Mumford, S. M. Gower, D. Hannant und J. P. Tearle (1993). "An immunohistological study of the uterus of mares following experimental infection by equid herpesvirus 1." Equine Vet J **25** (1): 36-40.
- Smith, K. C., J. A. Mumford und K. Lakhani (1996). "A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus."
J Comp Pathol **114** (3): 231-47.
- Smith, K. C., A. J. McGladdery, M. M. Binns und J. A. Mumford (1997). "Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in utero." Am J Vet Res **58** (9): 997-1002.
- Smith, K. C. und K. Borchers (2001). "A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization." J Comp Pathol **125** (4): 304-10.
- Smith, K. C., A. S. Blunden, K. E. Whitwell, K. A. Dunn und A. D. Wales (2003). "A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997."
Equine Vet J **35** (5): 496-501.
- Soboll, G., J. M. Whalley, M. T. Koen, G. P. Allen, D. G. Fraser, M. D. Macklin, W. F. Swain und D. P. Lunn (2003). "Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes." J Gen Virol **84** (Pt 10): 2625-34.
- Steinhagen, P. (1986). "Zur Problematik der equinen Herpesvirus (EHV-1)-Infektion und ihrer Bekämpfung mit Hilfsstoffen." Tierärztl Umschau **41**: 260-266.

- Stierstorfer, B., W. Eichhorn, W. Schmahl, C. Brandmuller, O. R. Kaaden und A. Neubauer (2002). "Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy: a case report." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **49** (1): 37-41.
- Strey, A. (2002). Immunopharmaka. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. H.-H. Frey and W. Löscher. Stuttgart, Enke Verlag: 495-504.
- Strube, W., D. Kretzdorn, J. Grunmach, R. D. Bergle und P. Thein (1989). "The effectiveness of the paramunity inducer Baypamune (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle." Tierärztl Praxis **17**: 267-272.
- Stuart, P. M., A. Zlotnik und J. G. Woodward (1988). "Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4 (B cell stimulatory factor 1)." J Immunol **140**: 1542-7.
- Studdert, M. J. (1974). "Comparative aspects of equine herpesviruses." Cornell Vet **64**: 94-122.
- Studdert, M. J., T. Simpson und B. Roizmann (1981). "Differentiation of respiratory and abortogenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases." Science **214**: 562-564.
- Studdert, M. J. (1983). "Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1." Arch Virol **77** (2-4): 249-58.
- Studdert, M. J., C. A. Hartley, K. Dynon, J. R. Sandy, R. F. Slocombe, J. A. Charles, M. E. Milne, A. F. Clarke und C. El-Hage (2003). "Outbreak of equine herpesvirus type 1 myeloencephalitis: new insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1-specific antibody detection ELISA." Vet Rec **153** (14): 417-23.
- Swiderski, C. E., T. R. Klei und D. W. Horohov (1999). "Quantitative measurement of equine cytokine mRNA expression by polymerase chain reaction using target-specific standard curves." Journal of Immunological Methods **222**: 155-169.
- Telford, E. A. R., M. S. Watson, K. McBride und A. J. Davison (1992). "The DNA sequence of equine herpesvirus-1." Virology **189**: 304-316.
- Telford, E. A., M. S. Watson, J. Perry, A. A. Cullinane und A. J. Davison (1998). "The DNA sequence of equine herpesvirus-4." J Gen Virol **79** (Pt 5): 1197-203.
- Thein, P., H. Ludwig und H. Meyer (1987). "Beitrag zur molekularen Epizootiologie equiner Herpesviren." Tierärztl Umschau **42**: 23-27.
- Thein, P. und K. Brown (1988). "Infektionen mit den equinen Herpesviren und Manifestation am Zentralnervensystem". Tierärztl Praxis **16**: 295-301.

- Thein und Härtel (1976). "Untersuchungen zur Virusätiologie respiratorischer Erkrankungen des Pferdes". Prakt Tierarzt, Colleg Vet **57**: 24-29.
- Thein, P., G. Darai, W. Janssen, R. D. Bergle, W. Strube und G. Floss (1993). "Neuere Erkenntnisse zur Ätiopathogenese der paretisch-paralytischen Verlaufsform der Herpesvirusinfektion bei Pferden." Tierärztl Prax **21** (5): 445-50.
- Thein, P. (1996). Handlexikon der tierärztlichen Praxis. Herpesvirusinfektionen des Pferdes. E. Wiesner, Enke Verlag: 349-349ze.
- Thein, P. (2005). Handbuch Pferdepraxis. Infektionen mit den equinen Herpesviren Typ 1 (EHV 1) und equinen Herpesviren Typ 4 (EHV 4). In: O. Dietz and B. Huskamp (Hrsg.), Enke: 371-379.
- Tizard, I. R. (2004). Veterinary Immunology: An Introduction, Elsevier.
- Turtinen, L. W. und G. P. Allen (1982). "Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus type 1." J Gen Virol **63** (2): 481-5.
- Valpotić, I., N. Petrinc, L. Šver, M. Tomašković und D. Radeljević (1998). "Equine immune functions following in vivo exposure to Baypamune and the recall antigens tetanus toxoid and toxin." Periodicum Biologorum **100** (4): 495-500.
- van Kampen, K. R. (1998). "Immunotherapy and cytokines." Seminars in Vet Med and Surgery (Small Animal) **12** (3): 186-192.
- van Maanen, C., M. M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, E. A. Damen und A. G. Derksen (2001). "Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics." Equine Vet J **33** (2): 191-6.
- van Maanen, C. (2002). "Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update." Vet Q **24**: 58-78.
- Vandergriff, E. V. und D. W. Horohov (1993). "Molecular cloning and expression of equine interleukin 2." Vet Immunol Immunopathol **39**: 395-406.
- Weber, O., A. Siegling, A. Friebe, A. Limmer, T. Schlapp, P. Knolle, A. Mercer, H. Schaller und H.-D. Volk (2003). "Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus." J Gen Virol **84** (7): 1843-1853.
- Welch, H. M., C. G. Bridges, A. M. Lyon, L. Griffiths und N. Edington (1992). "Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues." J Gen Virol **73** (2): 261-8.
- Whitwell, K. E. und A. S. Blunden (1992). "Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection." Equine Vet J **24** (1): 13-9.

- Widmer, M. B. und K. H. Grabstein (1987). "Regulation of cytolytic T-lymphocyte generation by B-cell stimulatory factor." Nature **326**: 795-798.
- Wilson, W. D. (1997). "Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy." Vet Clin North Am Equine Pract **13** (1): 53-72.
- Wood, J. L. M. (1992). "Vaccination of mares against equine herpesvirus-1." Vet Rec **130**: 211-212.
- Ziebell, K. L., H. Steinmann, D. Kretzdorn, T. Schlapp, K. Failing und N. Schmeer (1997). "The use of Baypamune N in crowding associated infectious respiratory diseases: Efficacy of Baypamune N (freeze dried product) in 4-10 months old horses." J Vet Med **44**: 529-536.

9. Anhang

9.1 Detaillierte Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse

A 1: Pferde

Nr.:	Name	Rasse	Alter	Geschlecht	Letzte Impfung / Impfstoff	Gruppe
1	Lea	Warmblut	16 Jahre	Stute	Dez. '05 Resequin NN Plus	Zylexis
2	Verona	Kaltblut	7 Jahre	Stute	Dez. '05 Resequin NN Plus	Zylexis
3	Lilly	Warmblut	2 Jahre	Stute	Feb. '06 Equilis Influenza	Placebo
4	Goldlady B	Warmblut	3 Jahre	Stute	Dez. '05 Resequin NN Plus	Zylexis
5	Willaya	Warmblut	16 Jahre	Stute	April '06 Resequin NN Plus	Placebo
6	Raffaella B	Warmblut	7 Jahre	Stute	Dez. '05 Resequin NN Plus	Placebo
7	Mandy	Kaltblut	9 Jahre	Stute	Dez. '05 Resequin NN Plus	Placebo
8	Goldtänzer B	Warmblut	3 Jahre	Hengst	Dez. '05 Resequin NN Plus	Zylexis
9	Daylight B	Warmblut	2 Jahre	Stute	Feb. '06 Equilis Influenza	Zylexis
10	Gustav	Warmblut	2 Jahre	Hengst	Feb. '06 Equilis Influenza	Zylexis
11	Jasmin	Warmblut	5 Jahre	Stute	Feb. '06 Equilis Influenza	Zylexis
12	Ibiza	Warmblut	6 Jahre	Stute	Feb. '06 Equilis Influenza	Zylexis
13	Goldfee B	Warmblut	3 Jahre	Stute	Jan. '06 Equilis Influenza	Zylexis
14	Galatea B	Warmblut	2 Jahre	Stute	März '06 Equilis Influenza	Placebo
15	Genua B	Warmblut	2 Jahre	Stute	März '06 Equilis Influenza	Placebo
16	Jonas	Warmblut	4 Jahre	Wallach	Feb. '06 Equilis Influenza	Placebo
17	Kurinna	Warmblut	15 Jahre	Stute	Feb. '06 Equilis Influenza	Placebo
18	Goldlady B II	Warmblut	2 Jahre	Stute	März '06 Equilis Influenza	Placebo
19	Siegfried	Warmblut	17 Jahre	Wallach	März. '06 Resequin NN Plus	Zylexis
20	Cappa	Warmblut	12 Jahre	Stute	März '06 Equilis Influenza	Zylexis

A 2: Ergebnisse der serologischen Untersuchung mittels Neutralisationstest und indirekten Immunfluoreszenztest

Pferd-Nr. / Termin	Neutralisationstest		Immunfluoreszenztest	
	EHV-1	EHV-4	EHV-1	EHV-4
1.1	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
1.2	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
1.3	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
1.4	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
1.5	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
1.6	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
2.1	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
2.2	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
2.3	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
2.4	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
2.5	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
2.6	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 10240
3.1	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
3.2	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
3.3	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
3.4	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
3.5	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
3.6	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
4.1	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
4.2	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 640
4.3	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 640
4.4	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
4.5	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
4.6	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
5.1	< 1:10	< 1:10	1: 10240	1: 10240
5.2	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
5.3	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
5.4	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 5120
5.5	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
5.6	1:10	< 1:10	1: 10240	1: 10240
6.1	< 1:10	1:10	1: 5120	1: 5120
6.2	< 1:10	1:10	1: 5120	1: 5120
6.3	< 1:10	1:10	1: 5120	1: 5120
6.4	< 1:10	1:10	1: 5120	1: 5120
6.5	1:10	1:10	1: 10240	1: 5120
6.6	1:20	1:20	1: 10240	1: 5120

Fortsetzung A 2:

Pferd-Nr. / Termin	Neutralisationstest		Immunfluoreszenztest	
	EHV-1	EHV-4	EHV-1	EHV-4
7.1	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 1280
7.2	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
7.3	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
7.4	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 1280
7.5	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
7.6	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
8.1	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
8.2	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
8.3	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
8.4	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
8.5	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 1280
8.6	< 1:10	1:10	1: 5120	1: 5120
9.1	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
9.2	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
9.3	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
9.4	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 640
9.5	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
9.6	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
10.1	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
10.2	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
10.3	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
10.4	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
10.5	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
10.6	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 5120
11.1	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
11.2	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
11.3	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
11.4	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
11.5	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 5120
11.6	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
12.1	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
12.2	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
12.3	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
12.4	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
12.5	< 1:10	< 1:10	1: 20480	1: 20480
12.6	< 1:10	< 1:10	1: 20480	1: 20480

Fortsetzung A 2:

Pferd-Nr. / Termin	Neutralisationstest		Immunfluoreszenztest	
	EHV-1	EHV-4	EHV-1	EHV-4
13.1	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
13.2	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
13.3	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
13.4	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
13.5	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
13.6	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 5120
14.1	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
14.2	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
14.3	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
14.4	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
14.5	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
14.6	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 5120
15.1	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
15.2	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
15.3	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 640
15.4	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
15.5	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 1280
15.6	1:10	< 1:10	1: 10240	1: 10240
16.1	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 640
16.2	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
16.3	< 1:10	< 1:10	1: 320	1: 640
16.4	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
16.5	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
16.6	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560
17.1	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
17.2	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
17.3	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
17.4	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
17.5	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
17.6	1:10	1:10	1: 10240	1: 10240
18.1	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
18.2	< 1:10	< 1:10	1: 320	1: 640
18.3	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
18.4	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
18.5	< 1:10	< 1:10	1: 640	1: 1280
18.6	< 1:10	< 1:10	1: 1280	1: 2560

Fortsetzung A 2:

Pferd-Nr. / Termin	Neutralisationstest		Immunfluoreszenztest	
	EHV-1	EHV-4	EHV-1	EHV-4
19.2	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
19.3	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 2560
19.4	< 1:10	< 1:10	1: 2560	1: 5120
19.5	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
19.6	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120
20.2	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
20.3	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
20.4	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
20.5	< 1:10	< 1:10	1: 5120	1: 2560
20.6	1:10	< 1:10	1: 5120	1: 5120

A 3: Absolute Lymphozytenzahlen (PBMC) x 10⁷/ml vor und nach Zylexis®-Applikation und Impfung (*Kursiv: Zylexis-Gruppe*)

Nr./Pferd	Versuchstage					
	-30	-2	0	3	7	14
1. <i>Lea</i>	2,4	2,4	2,5	1,8	2,3	2,6
2. <i>Verona</i>	2,5	1,6	2,2	3,2	3,4	2,7
3. <i>Lilly</i>	4,7	3,6	2,5	2,6	4,7	5,6
4. <i>Goldlady I</i>	3,1	3,3	3,6	4,9	2,7	3,6
5. <i>Willaya</i>	1,3	1,0	1,0	1,4	2,3	2,0
6. <i>Raffaela</i>	1,9	1,3	1,2	2,4	2,3	2,9
7. <i>Mandy</i>	3,1	1,0	1,7	3,2	1,2	3,3
8. <i>Goldtänzer</i>	1,7	1,8	1,7	2,0	4,1	3,0
9. <i>Daylight</i>	4,9	5,0	4,8	5,2	6,3	2,9
10. <i>Gustav</i>	1,7	2,4	4,0	2,7	2,6	3,9
11. <i>Jasmin</i>	1,9	2,3	2,8	5,0	3,3	3,2
12. <i>Ibiza</i>	3,1	4,0	5,0	4,4	4,0	5,4
13. <i>Goldfee</i>	4,1	1,4	4,0	3,6	3,5	3,3
14. <i>Galatea</i>	2,3	1,9	3,1	3,0	4,2	3,3
15. <i>Genua</i>	3,2	3,2	5,3	4,0	3,7	3,5
16. <i>Jonas</i>	3,5	2,5	2,5	3,0	3,5	3,7
17. <i>Kurinna</i>	2,1	1,7	1,2	1,3	2,6	1,9
18. <i>Goldlady II</i>	3,0	4,0	5,0	3,2	3,3	4,3
19. <i>Siegfried</i>	--	2,3	2,8	2,5	1,9	1,7
20. <i>Cappa</i>	--	2,7	3,3	3,9	3,3	3,7

A 4: Immunstatusbestimmung durch Fa. LABOKLIN

Pferde Tag -30 Tag 0	T-Zellen (gesamt) M/l*	CD4+ Zellen (M/l*)	CD8+ Zellen (M/l*)	B-Zellen (M/l*)
01 Lea	2915	2269	166	497
	2119	1643	339	150
02 Verona	2681	827	81	746
	2804	1804	623	262
03 Lilly	3912	0	124	963
	5290	3306	1190	463
04 Goldlady I	3945	27	107	1369
	4066	2508	871	502
05 Willaya	2146	1411	103	149
	1708	1206	390	65
06 Raffaella	1831	1306	112	290
	1969	1373	573	203
07 Mandy	3009	1912	89	372
	2312	1459	853	231
08 Goldtänzer	2586	1293	101	504
	2066	807	698	383
09 Daylight	4953	3016	445	349
	6628	4284	1455	849
10 Gustav	2759	1540	64	642
	3478	1593	1077	718
11 Jasmin	3926	2202	335	599
	3388	1892	924	594
12 Ibiza	3169	2120	226	576
	2599	1575	772	315
13 Goldfee	3606	1938	296	484
	3948	2448	790	1184
14 Galatea	2567	1273	121	1010
	3397	1838	791	1466
15 Genua	4543	3211	102	1264
	5335	948	4388	1053
16 Jonas	4044	2357	80	643
	4096	2389	1219	975
17 Kurinna	1856	1186	223	458
	1826	1221	403	403
18 Goldlady II	4396	2446	62	1331
	3871	2621	762	762

* M/l = Mega / Liter = Zellzahl x 10⁶ / Liter

Referenzwerte Immunstatus (Fa. LABOKLIN, Bad Kissingen):

T-Zellen gesamt	M/l	1235 – 2063
CD4+ Zellen	M/l	832 – 1387
CD8+ Zellen	M/l	275 – 742
B-Zellen	M/l	150 – 406

A 5: Zytokinmesswerte – absolute Quantifizierung (β -Aktin) *ex vivo* Proben

Pferd / Termin	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
1.1 Lea	0,06	5,97	0,24	0,03
1.2 Lea	0	--	356,33	0
1.3 Lea	2,12	13,48	0,12	0,09
1.4 Lea	0,51	29,29	3,29	0,35
1.5 Lea	5,51	41,09	3,02	1,42
1.6 Lea	0	253,28	13,19	1,52
2.1 Verona	0	0,99	0,45	0
2.2 Verona	0	4,03	2,22	0,24
2.3 Verona	7,40	6,30	1,00	0,34
2.4 Verona	0	118,72	27,21	1,01
2.5 Verona	0	451,94	641,06	0
2.6 Verona	0	--	0	0
3.1 Lilly	0	9,46	0,48	0,21
3.2 Lilly	1,75	4,49	0,13	0,13
3.3 Lilly	3,85	14,84	0,46	0,30
3.4 Lilly	1,89	1,29	0,59	0,31
3.5 Lilly	6,35	4,43	1,75	1,17
3.6 Lilly	1,75	16,78	3,44	1,46
4.1 Goldlady I	1,70	5,19	0,11	0,11
4.2 Goldlady I	0,46	18,29	0,50	0,09
4.3 Goldlady I	1,96	99,87	16,28	0,49
4.4 Goldlady I	4,56	14,79	1,91	0,35
4.5 Goldlady I	3,12	34,29	4,23	0,71
4.6 Goldlady I	4,03	43,44	8,16	1,67
5.1 Willaya	0	18,71	0,36	0,21
5.2 Willaya	0,98	2,32	0,27	0,16
5.3 Willaya	0,29	66,88	0,99	0,43
5.4 Willaya	0	50,72	19,52	0,83
5.5 Willaya	0	44,01	11,13	3,28
5.6 Willaya	0	1901,78	566,31	85,10
6.1 Raffaella	0,45	7,85	0,16	0,15
6.2 Raffaella	3,79	2,69	0,13	0,13
6.3 Raffaella	3,59	8,48	0,11	0,15
6.4 Raffaella	10,79	7,63	0,66	0,42
6.5 Raffaella	6,43	23,14	1,47	0,85
6.6 Raffaella	2,18	53,20	7,29	2,88

Fortsetzung A 5:				
Pferd / Termin	IFNy	IL-2	IL-4	IL-10
7.1 Mandy	0	0	0	0
7.2 Mandy	0	3075,29	149,06	16,62
7.3 Mandy	4,76	501,10	4,99	1,62
7.4 Mandy	0	12037,89	221,18	2,72
7.5 Mandy	0	4202,06	233,47	239,06
7.6 Mandy	0	6879,15	156,54	40,08
8.1 Goldtänzer	5,01	26,89	0,11	0,53
8.2 Goldtänzer	5,70	58,33	0,42	0,43
8.3 Goldtänzer	17,89	89,06	0,76	0,71
8.4 Goldtänzer	4,51	315,49	7,79	1,61
8.5 Goldtänzer	3,77	357,19	10,95	3,01
8.6 Goldtänzer	0	467,96	31,04	6,78
9.1 Daylight	10,19	306,89	0,92	0,82
9.2 Daylight	13,48	210,80	2,13	1,69
9.3 Daylight	48,19	214,91	0,62	1,48
9.4 Daylight	79,28	1280,19	8,58	3,25
9.5 Daylight	35,45	595,89	5,85	4,69
9.6 Daylight	12,72	850,10	10,75	7,41
10.1 Gustav	0,33	167,69	0,17	0,04
10.2 Gustav	5,52	31,81	0,69	0,99
10.3 Gustav	54,23	176,75	0,60	0,62
10.4 Gustav	36,19	171,19	0,83	0,83
10.5 Gustav	1,83	1074,66	180,57	3,30
10.6 Gustav	4,59	20,82	2,95	1,46
11.1 Jasmin	0,89	289,31	3,45	1,76
11.2 Jasmin	3,84	67,45	0,70	0,40
11.3 Jasmin	9,95	82,21	0,50	0,40
11.4 Jasmin	0,69	45,98	0,80	0,28
11.5 Jasmin	0,71	49,83	1,00	0,80
11.6 Jasmin	0,36	27,46	0,78	0,77
12.1 Ibiza	0	1320,70	2,58	0
12.2 Ibiza	0,28	123,13	0,95	0,22
12.3 Ibiza	0,68	107,34	0,63	0,33
12.4 Ibiza	0	166,67	1,04	0,03
12.5 Ibiza	0	185,21	2,50	0,09
12.6 Ibiza	0	167,18	4,52	0,03

Fortsetzung A 5:				
Pferd / Termin	IFNy	IL-2	IL-4	IL-10
13.1 Goldfee	24,77	124,36	0,24	1,67
13.2 Goldfee	22,24	125,19	0,85	0,71
13.3 Goldfee	23,12	94,23	0,36	0,54
13.4 Goldfee	12,38	16,50	0,47	0,35
13.5 Goldfee	3,27	45,45	1,26	1,09
13.6 Goldfee	0	--	0	0
14.1 Galatea	16,25	86,37	0,69	2,08
14.2 Galatea	15,44	63,18	0,49	0,77
14.3 Galatea	29,16	60,55	0,31	0,99
14.4 Galatea	11,35	43,34	0,54	0,63
14.5 Galatea	10,25	35,64	0,42	0,83
14.6 Galatea	19,02	176,79	0	0,61
15.1 Genua	3,80	491,52	31,71	1,61
15.2 Genua	16,32	1088,11	3,28	0,97
15.3 Genua	16,38	380,94	4,47	2,77
15.4 Genua	7,34	355,12	3,73	1,38
15.5 Genua	3,90	295,11	2,47	1,66
15.6 Genua	7,66	27,95	0,94	1,07
16.1 Jonas	27,72	141,54	1,51	3,57
16.2 Jonas	20,07	254,49	4,55	1,42
16.3 Jonas	17,01	287,33	3,56	2,38
16.4 Jonas	8,19	151,64	4,18	1,35
16.5 Jonas	4,72	3492,26	184,73	7,51
16.6 Jonas	13,78	586,17	15,24	5,85
17.1 Kurinna	0	585,14	2,59	0,61
17.2 Kurinna	4,67	209,69	6,46	0,39
17.3 Kurinna	3,33	143,15	2,02	0,44
17.4 Kurinna	0,71	90,79	3,45	0,21
17.5 Kurinna	2,52	94,83	20,79	1,49
17.6 Kurinna	0,17	37,64	5,65	0,73
18.1 Goldlady II	20,84	205,05	3,32	4,54
18.2 Goldlady II	5,94	516,11	10,57	1,89
18.3 Goldlady II	11,62	181,28	4,46	1,95
18.4 Goldlady II	4,79	115,65	7,67	1,28
18.5 Goldlady II	0,81	144,83	24,60	4,41
18.6 Goldlady II	1,29	483,94	9,25	3,33
19.2 Siegfried	1,24	10,11	0,29	0,41
19.3 Siegfried	0,39	11,65	0,21	0,57
19.4 Siegfried	1,17	9,17	0,23	0,53
19.5 Siegfried	0,29	16,33	0,72	1,07
19.6 Siegfried	0,12	11,38	0,45	0,70

Fortsetzung A 5:				
Pferd / Termin	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
20.2 Cappa	10,60	22,05	0,49	0,66
20.3 Cappa	3,23	8,93	0,12	0,67
20.4 Cappa	5,99	13,07	0,18	0,79
20.5 Cappa	0,16	6,37	0,16	0,31
20.6 Cappa	3,25	8,65	0,16	0,48

A 6: Zytokinmesswerte – absolute Quantifizierung (β -Aktin) *in vitro* Proben

Probe	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
1.1 Lea unstim.	10,82	75,75	5,99	18,67
1.1 Lea stim.	310,26	787,02	112,26	129,03
1.2 Lea unstim.	8,52	56,22	2,65	3,84
1.2 Lea stim.	610,92	257,83	124,87	67,37
1.3 Lea unstim.	17,96	65,10	5,39	7,02
1.3 Lea stim.	93,08	49,49	11,26	11,43
1.4 Lea unstim.	0,81	32,41	0,48	4,78
1.4 Lea stim.	2,27	57,10	1,53	4,57
1.5 Lea unstim.	30,62	133,80	10,95	11,55
1.5 Lea stim.	461,82	714,45	123,77	156,83
1.6 Lea unstim.	123,57	727,04	82,35	97,03
1.6 Lea stim.	811,26	517,13	177,52	120,39
2.1 Verona unstim.	0,11	16,60	4,68	2,73
2.1 Verona stim.	163,71	39,49	33,35	11,42
2.2 Verona unstim.	0,23	20,80	1,42	1,17
2.2 Verona stim.	3337,54	210,31	357,32	46,84
2.3 Verona unstim.	1,98	30,44	4,25	2,25
2.3 Verona stim.	597,22	49,04	44,51	9,76
2.4 Verona unstim.	0	213,15	0,64	9,02
2.4 Verona stim.	0	252,08	2,36	6,87
2.5 Verona unstim.	0	67,49	4,62	5,01
2.5 Verona stim.	0,62	96,28	40,37	17,41
2.6 Verona unstim.	0	27,54	2,13	1,96
2.6 Verona stim.	0,87	130,79	55,36	12,81
3.2 Lilly unstim.	5,15	19,56	1,50	12,76
3.2 Lilly stim.	1100,08	255,85	362,18	60,51
3.3 Lilly unstim.	2,71	18,31	4,10	10,20
3.3 Lilly stim.	993,74	320,32	400,45	143,20
3.4 Lilly unstim.	1,86	47,66	0,30	5,40
3.4 Lilly stim.	10,74	109,95	4,20	10,38
3.5 Lilly unstim.	1,36	19,63	3,62	6,28
3.5 Lilly stim.	754,93	450,70	455,09	90,27
3.6 Lilly unstim.	3,56	18,43	2,40	12,62
3.6 Lilly stim.	615,24	241,18	198,42	82,04

Fortsetzung A 6:				
Probe	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
4.1 Goldlady I unstim.	18,97	59,19	5,41	13,94
4.1 Goldlady I stim.	401,03	28,85	168,85	17,53
4.2 Goldlady I unstim.	24,59	43,66	2,94	16,51
4.2 Goldlady I stim.	1121,87	45,40	102,64	15,91
4.3 Goldlady I unstim.	82,62	79,44	10,40	21,86
4.3 Goldlady I stim.	1335,04	63,95	174,39	43,26
4.4 Goldlady I unstim.	2,48	440,22	5,36	25,71
4.4 Goldlady I stim.	14,14	414,08	18,85	30,74
4.5 Goldlady I unstim.	13,54	156,62	14,53	11,45
4.5 Goldlady I stim.	354,96	82,13	178,88	37,09
4.6 Goldlady I unstim.	40,88	127,71	11,52	22,03
4.6 Goldlady I stim.	1226,37	130,45	196,90	52,03
5.1 Willaya unstim.	134,45	544,84	29,02	56,25
5.1 Willaya stim.	485,74	89,88	172,56	64,86
5.2 Willaya unstim.	174,44	551,60	36,62	47,26
5.2 Willaya stim.	2427,28	187,06	397,43	75,83
5.3 Willaya unstim.	407,52	741,53	74,69	36,61
5.3 Willaya stim.	2450,82	246,53	435,55	135,94
5.4 Willaya unstim.	0	1762,46	7,18	28,86
5.4 Willaya stim.	19,86	1390,06	70,43	102,58
5.5 Willaya unstim.	0	3878,83	102,72	109,96
5.5 Willaya stim.	184,15	807,00	613,73	106,02
5.6 Willaya unstim.	1,27	496,25	25,48	16,77
5.6 Willaya stim.	2820,80	668,27	583,50	160,98
6.2 Raffaella unstim.	52,14	284,89	5,46	108,77
6.2 Raffaella stim.	1520,33	1025,33	193,89	108,40
6.3 Raffaella unstim.	78,25	483,93	31,29	45,51
6.3 Raffaella stim.	2787,15	310,28	253,01	100,04
6.4 Raffaella unstim.	2,36	826,81	4,66	51,71
6.4 Raffaella stim.	60,50	2679,58	92,08	96,60
6.5 Raffaella unstim.	7,79	603,37	21,24	78,43
6.5 Raffaella stim.	348,65	1568,83	484,54	167,74
6.6 Raffaella unstim.	1306,76	834,30	331,13	116,89
6.6 Raffaella stim.	49,74	486,28	27,08	66,80
7.2 Mandy unstim.	0,05	0,32	1,50	1,22
7.2 Mandy stim.	61,46	0,42	77,85	9,84
7.3 Mandy unstim.	0	2,78	22,58	5,20
7.3 Mandy stim.	212,91	1,58	141,54	46,02
7.4 Mandy unstim.	0	0	0	0
7.4 Mandy stim.	0	25,15	14,11	7,18
7.5 Mandy unstim.	0	1,09	6,16	0
7.5 Mandy stim.	12,86	11,79	139,75	24,94
7.6 Mandy unstim.	0	0	0	0
7.6 Mandy stim.	64,20	3,81	271,95	47,23

Fortsetzung A 6:				
Probe	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
8.2 Goldtänzer unstim.	1,04	0,34	3,11	25,82
8.2 Goldtänzer stim.	118,98	0,73	42,21	20,24
8.3 Goldtänzer unstim.	0,94	0,68	10,98	38,47
8.3 Goldtänzer stim.	89,55	0,77	54,28	27,44
8.4 Goldtänzer unstim.	0,16	2,32	1,05	19,46
8.4 Goldtänzer stim.	2,74	1,76	22,79	31,79
8.5 Goldtänzer unstim.	0	1,61	15,31	13,12
8.5 Goldtänzer stim.	61,02	3,76	106,20	39,18
8.6 Goldtänzer unstim.	0	2,91	17,06	17,21
8.6 Goldtänzer stim.	72,05	1,25	51,24	34,85
9.2 Daylight unstim.	25,93	2,04	25,09	57,50
9.2 Daylight stim.	285,43	1,47	116,42	47,65
9.3 Daylight unstim.	26,92	8,74	68,43	48,95
9.3 Daylight stim.	349,33	4,42	178,29	139,10
9.4 Daylight unstim.	8,97	12,09	6,72	99,67
9.4 Daylight stim.	42,70	14,17	80,12	65,26
9.5 Daylight unstim.	45,11	15,04	209,46	49,05
9.5 Daylight stim.	702,75	54,73	1790,19	218,02
9.6 Daylight unstim.	73,22	14,87	179,40	64,37
9.6 Daylight stim.	681,64	4,77	288,06	201,08
10.2 Gustav unstim.	0	2,78	6,17	56,04
10.2 Gustav stim.	1070,17	3,12	135,27	100,31
10.3 Gustav unstim.	5,28	9,22	18,05	65,48
10.3 Gustav stim.	1045,35	9,93	221,07	227,38
10.4 Gustav unstim.	0	48,65	0	90,77
10.4 Gustav stim.	0	24,56	7,13	111,82
10.5 Gustav unstim.	0	12,72	29,13	208,84
10.5 Gustav stim.	140,52	2,24	26,84	30,07
10.6 Gustav unstim.	6,90	1,43	1,56	11,72
10.6 Gustav stim.	236,91	1,06	18,72	31,63
11.2 Jasmin unstim.	30,62	6,61	8,46	41,79
11.2 Jasmin stim.	305,64	1,07	39,74	32,23
11.3 Jasmin unstim.	44,41	26,01	72,58	134,02
11.3 Jasmin stim.	200,95	0,72	23,70	46,53
11.4 Jasmin unstim.	0	1,26	0,27	12,80
11.4 Jasmin stim.	2,12	0,92	3,51	23,05
11.5 Jasmin unstim.	40,22	5,84	10,71	23,35
11.5 Jasmin stim.	475,09	6,64	98,48	89,96
11.6 Jasmin unstim.	11,35	2,78	4,42	12,10
11.6 Jasmin stim.	403,33	2,43	38,07	46,50

Fortsetzung A 6:				
Probe	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
12.2 Ibiza unstim.	0,65	1,27	3,71	3,31
12.2 Ibiza stim.	174,36	1,41	33,33	39,15
12.3 Ibiza unstim.	4,60	1,80	12,58	25,53
12.3 Ibiza stim.	104,41	1,11	22,82	51,44
12.4 Ibiza unstim.	0	1,07	1,30	40,79
12.4 Ibiza stim.	0	7,30	24,61	48,36
12.5 Ibiza unstim.	5,47	2,44	13,74	9,04
12.5 Ibiza stim.	54,56	4,21	38,66	80,85
12.6 Ibiza unstim.	0	9,61	40,66	35,76
12.6 Ibiza stim.	750,33	16,31	223,31	208,35
13.1 Goldfee unstim.	4,47	0,29	0,82	13,12
13.1 Goldfee stim.	103,22	0,07	12,68	15,93
13.2 Goldfee unstim.	3,01	0,17	1,79	3,19
13.2 Goldfee stim.	157,49	0,12	17,17	28,89
13.3 Goldfee unstim.	6,82	0,36	4,40	11,21
13.3 Goldfee stim.	126,03	0,34	14,86	42,98
13.4 Goldfee unstim.	6,12	0,57	5,63	9,19
13.4 Goldfee stim.	111,31	0,28	19,52	32,94
13.5 Goldfee unstim.	2,88	1,34	4,98	14,19
13.5 Goldfee stim.	101,42	0,74	32,00	42,95
13.6 Goldfee unstim.	7,51	1,21	8,47	23,68
13.6 Goldfee stim.	70,24	0,27	17,40	43,82
14.2 Galatea unstim.	1,69	1,07	1,26	29,29
14.2 Galatea stim.	357,11	1,28	40,11	25,49
14.3 Galatea unstim.	6,13	1,72	3,03	72,86
14.3 Galatea stim.	213,01	1,78	27,26	34,47
14.4 Galatea unstim.	0	3,26	6,93	342,75
14.4 Galatea stim.	731,78	6,26	116,67	76,96
14.5 Galatea unstim.	0	4,58	5,56	76,80
14.5 Galatea stim.	114,01	8,98	72,01	45,77
14.6 Galatea unstim.	0	2,28	3,37	10,53
14.6 Galatea stim.	227,50	1,94	35,79	40,15
15.2 Genua unstim.	4,08	7,73	5,05	40,31
15.2 Genua stim.	348,35	2,25	129,87	76,40
15.3 Genua unstim.	5,65	6,72	11,45	32,86
15.3 Genua stim.	720,48	2,30	87,83	103,46
15.4 Genua unstim.	0	5,91	12,83	33,52
15.4 Genua stim.	277,31	6,99	268,31	133,29
15.5 Genua unstim.	17,23	12,30	21,99	90,42
15.5 Genua stim.	142,33	32,66	306,36	151,45
15.6 Genua unstim.	15,41	40,49	14,06	30,63
15.6 Genua stim.	417,85	2,55	76,49	91,80

Fortsetzung A 6:				
Probe	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
16.2 Jonas unstim.	75,12	9,64	9,79	365,73
16.2 Jonas stim.	794,88	1,90	93,50	83,03
16.3 Jonas unstim.	31,23	2,45	5,21	140,16
16.3 Jonas stim.	995,56	2,15	70,92	84,46
16.4 Jonas unstim.	61,25	10,60	21,01	183,46
16.4 Jonas stim.	1298,58	2,74	148,66	168,09
16.5 Jonas unstim.	28,27	16,32	30,43	346,02
16.5 Jonas stim.	1433,75	38,13	601,93	346,63
16.6 Jonas unstim.	68,23	7,83	19,61	87,36
16.6 Jonas stim.	1583,74	4,93	175,18	213,99
17.1 Kurinna unstim.	13,62	4,92	1,68	54,97
17.1 Kurinna stim.	1231,05	0,70	15,69	31,61
17.2 Kurinna unstim.	4,69	1,92	1,70	39,87
17.2 Kurinna stim.	1264,60	0,68	19,34	52,86
17.3 Kurinna unstim.	30,24	2,9	3,46	60,25
17.3 Kurinna stim.	2177,18	0,80	15,22	55,78
17.4 Kurinna unstim.	1,23	3,12	8,62	73,44
17.4 Kurinna stim.	2744,73	16,24	40,51	95,04
17.5 Kurinna unstim.	0,36	4,81	11,67	36,26
17.5 Kurinna stim.	2759,01	23,70	105,55	59,72
17.6 Kurinna unstim.	2,75	3,07	7,75	40,10
17.6 Kurinna stim.	286,84	0,71	14,65	78,72
18.2 Goldlady II unstim.	0,62	14,10	7,27	42,89
18.2 Goldlady II stim.	1060,01	9,74	313,30	107,16
18.3 Goldlady II unstim.	2,22	7,86	67,66	171,35
18.3 Goldlady II stim.	2211,60	9,92	300,85	227,21
18.4 Goldlady II unstim.	0	17,71	14,10	142,41
18.4 Goldlady II stim.	494,69	13,92	467,55	205,28
18.5 Goldlady II unstim.	1,40	18,34	61,43	81,72
18.5 Goldlady II stim.	127,58	20,18	253,47	92,19
18.6 Goldlady II unstim.	2,40	16,09	40,52	68,67
18.6 Goldlady II stim.	1677,72	8,01	219,29	168,58
19.2 Siegfried unstim.	14,57	82,59	0,55	3,61
19.2 Siegfried stim.	109,09	221,34	14,05	5,04
19.3 Siegfried unstim.	9,71	37,55	0,33	4,52
19.3 Siegfried stim.	1056,65	104,29	14,42	7,13
19.4 Siegfried unstim.	18,98	232,63	3,80	8,52
19.4 Siegfried stim.	467,05	38,90	15,31	7,64
19.5 Siegfried unstim.	8,97	36,11	0,66	7,54
19.4 Siegfried stim.	503,26	45,09	26,32	13,14
19.6 Siegfried unstim.	13,96	45,65	1,09	3,32
19.4 Siegfried stim.	293,07	54,22	17,96	9,25

Fortsetzung A 6:				
Probe	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-10
20.2 Cappa unstim.	9,50	25,17	0,10	6,71
20.2 Cappa stim.	273,43	149,71	4,72	7,17
20.3 Cappa unstim.	21,59	24,03	0,11	4,86
20.3 Cappa stim.	1360,83	260,05	5,21	5,45
20.4 Cappa unstim.	319,31	12,80	0,54	2,74
20.4 Cappa stim.	1618,99	18,89	3,09	7,28
20.5 Cappa unstim.	37,57	27,08	0,66	3,96
20.5 Cappa stim.	534,43	60,92	3,52	9,73
20.6 Cappa unstim.	523,32	22,42	0,67	2,92
20.6 Cappa stim.	1806,38	5,20	2,62	5,04

9.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie der Freien Universität Berlin angefertigt. Dem Leiter des Institutes, Herrn Prof. Dr. Klaus Osterrieder, danke ich für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Kerstin Borchers für die Überlassung dieses Themas und die unendlichen Mühen ihrerseits im Vorfeld der Dissertation und bei der Beschaffung von Drittmitteln. Ihr strukturiertes Vorgehen und Planen bei sämtlichen Laborabläufen sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft hat im Wesentlichen zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen und mir ein übersichtliches und effektives Arbeiten ermöglicht.

Mein besonderer Dank richtet sich außerdem an die Firma Pfizer Tiergesundheit GmbH für ihre großzügige Unterstützung im Rahmen des Drittmittelprojektes und für die Gewährung eines Stipendiums. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Luc Goossens für seine ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich beim ehemaligen Leiter der ZBS 1 im Robert-Koch-Institut, Prof. Dr. Georg Pauli, für die Möglichkeit der Nutzung des Arbeitsplatzes im RKI bei der Durchführung der TaqMan[®]-PCR. Herrn Dr. Heinz Ellerbrok möchte ich ganz herzlich für seine Geduld und enorme Hilfsbereitschaft danken.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Virologie möchte ich mich herzlich für die unermüdliche Hilfe bei der praktischen Umsetzung dieser Arbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt Frau Tine Leiskau und Frau Annelie Büchel für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Josephine Braun und Nadine Richter danke ich für ihre Unterstützung im Feld und für ihre hilfreichen Diskussionen.

Der Tierärztlichen Klinik für Pferde Seeburg, insbesondere Herrn Dr. Dieter Schad, möchte ich für die zur Verfügungstellung der Pferde und die flexible Hilfsbereitschaft bei Wind und Wetter ganz herzlich danken.

Bei Frau Dr. Gisela Arndt vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung der FU Berlin möchte ich mich herzlich für ihre geduldige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Simone und allen anderen Personen, die mir mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

Und zu guter Letzt eine große Möhre an „Siegfried“ und „Cappa“ für ihre unendliche Geduld.

9.3 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Berlin, 08.12.2008

Daniela Heinemann