

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialnachweis

BDH Chemicals Ltd., UK: Carboxymethylzellulose

Biochrom, Berlin: Ficoll 1,077 g, FCS, NCS

Biozym, Hess. Oldendorf: Nuklease-freie Einmal-Plastikgefäße und Pipettenspitzen

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

Difco, Mi, USA: Trypsin

Epicentre Technologies, Wi, USA: Gelase™ Agarose-Gel-Digesting-Preparation-Kit

Fluka, Neu-Ulm: Giemsa-Lösung für die Mikroskopie

ICN Biomedicals, CA, USA: Cycloheximid, Phosphonoessigsäure

Invitrogen, CA, USA: Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer, Zellkulturmedien, DNA-Längenstandards ( $\lambda$ -DNA / *Hind* III,  $\phi$ X 174-DNA / *Hae* III, 50 bp und 100 bp DNA-Leiter), Trizol™, L.M.P. Agarose

MBI Fermentas, St. Leon Roth: dNTPs (100 mM)

Merck, Darmstadt: Chemikalien, wenn nicht anders vermerkt

Metabion, Planegg-Martinsried: Auftrags-Oligonukleotidsynthese

New England Biolabs, Taunus, Schwalbach: Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer

Perkin Elmer, Überlingen: dNTPs

Promega, Wi, USA: Nuklease-freies Aqua dest, 100 bp DNA-Leiter

Quiagen, Hilden: Genomic-tip 20/G, Taq DNA-Polymerase, 10 x PCR Reaktionspuffer, Q-Solution

Roche Diagnostics, Mannheim: Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit, Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper, Proteinase K, Expand RT, 5 x RT-Puffer, Dithiothreitol, DNase I, Pronase, RNase A

Roth, Karlsruhe: deionisiertes Formamid, Agarose (ultrapure)

Sigma, Deisenhofen: Ammoniumacetat, Ethidiumbromid, TPA, DEPC, EDTA, MOPS, N-Lauroylsarkosin, Triton-X 100

Stratagene, CA, USA: RNase Block

TPP Tissue culture, Tradingen, Schweiz: steriles Plastik-Einmalmaterial für die Zellkultur

## **3.2 Testgruppen**

Für verschiedene Untersuchungen, die Teil dieser Arbeit sind, wurden auf natürlichem Wege mit EHV-2 infizierte Pferde eingesetzt.

### **3.2.1 Pferde aus der Klinik für Fortpflanzung der FU-Berlin**

Von Herrn Prof. Dr. P. S. Glatzel wurden dankenswerterweise 3 Warmblutstuten aus dem Bestand der Klinik für Fortpflanzung (FU-Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin) für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Diese werden im folgenden mit A bis C benannt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war Pferd A 5 Jahre, Pferd B 21 Jahre und Pferd C 12 Jahre alt.

Alle Tiere waren zu Beginn der Studien klinisch unauffällig und regelmäßig mit Resequin NN plus (Intervet) gegen equine Influenza- und EHV-1- und -4-Infektionen geimpft worden. Zur Feststellung des Infektionsstatus wurden alle Tiere blutserologisch auf das Vorhandensein EHV-2-spezifischer Antikörper (siehe 3.4) und ihre PBMC in einer EHV-2-spezifischen PCR (siehe 3.9) untersucht. Die Pferde wurden über einen Zeitraum von einem Jahr monatlich untersucht. Keines der Tiere zeigte während des Untersuchungszeitraums Krankheits-symptome außerhalb des Bewegungsapparates.

## **3.3 Viren und Zellen**

### **3.3.1 Viren**

Die für die Untersuchungen eingesetzten Viren sind in Tabelle 1 zusammengefasst worden. Alle Virusstämme befinden sich in der Institutssammlung und wurden mir dankenswerterweise von Prof. Dr. H. Ludwig, Prof. Dr. P. Thein und Dr. K. Borchers zur Verfügung gestellt. Die EHV-2-Isolate T13, T20 und T24 sowie K7a, K7b, K9, K13 und K15 entstammen der Arbeit von Kershaw et al. (2001). Die Vermehrung und Titration von EHV-1, -2, -4 und -5 erfolgte auf equinen Dermalzellen (ED-Zellen, Prof. Dr. P. Thein), für EHV-2 wurden zusätzlich primäre Kaninchen-Milz-Zellen (JKM) sowie permanente Kaninchen-Nieren-Zellen (RK13-Zellen) verwendet. Die permanent mit dem humanen, transformierenden Epstein-Barr-Virus-Isolat B95-8 infizierte, gleichnamige B-Zell-lymphomlinie wurde in den *in situ* Lsissgelen nach Gardella (Gardella et al., 1984) als Kontrolle eingesetzt (diese Zellen wurden der Arbeitsgruppe Equine Herpesviren, FU-Berlin, dankenswerterweise von Dr. J. Mankertz zur Verfügung gestellt).

**Tabelle 1 Virusstämme und -isolate**

Virus	Stamm	Isolat aus	Referenz
EHV-1	AIV	Fohlen, Abort, 1983	Chowdhury et al., 1986
EHV-2	LK-4	Pferd, Rhinopneumonitis	Plummer & Waterson, 1963
	T400	Fohlen, untere Atemwege, 1976	Thein & Härtl, 1976
	T16	Pferd, Keratokonjunktivitis, 1974	Thein & Böhm, 1976
	T13	PBMC, Pferd, Keratokonjunktivitis	Kershaw et al., 2001
	T24		
	K7-1		
	K7-2		
	K9		
	K13		
	K15		
	A1-A6b	PBMC, Pferd A	Isolate aus dieser Arbeit
	C1-C5	PBMC, Pferd C	
EHV-4	T252	Fohlen, Nasensekret, 1976	Thein & Härtl, 1976
EHV-5	KB-P48	Przewalskipferd, PBMC	Borchers et al., 1999a
EBV	B95-8	persistent infizierte und transformierte Affen B-Zellymphomlinie	Institutssammlung

### 3.3.2 Zellkulturen

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Nährmedien:

Dulbeccos Modifizierung des Medium nach Eagle (EDM, Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modification):

EDM-Pulver für 10 Liter	133 g
NaHCO <sub>3</sub>	37 g
Penicillin G	0,2 g
Streptomycinsulfat	0,2 g
Aqua bidest	ad 10 l
pH 7,2	

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

RPMI 1640 Medium-Pulver mit L-Glutamin ohne Natriumbikarbonat für 1 Liter	
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Penicillin G	0,02 g
Streptomycinsulfat	0,02 g
Aqua bidest	ad 1 l
pH 7,2	

Trypsinlösung (0,25 %):

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

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4:

NaCl	137 mM (8,00 g)
KCl	2,7 mM (0,20 g)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	8,0 mM (1,42 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM (0,24 g)
Aqua dest	ad 1 l

Serum von neugeborenen Kälbern (NCS, newborn calf serum)

Fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum)

Monolayer Zellkulturen wurden in Gewebekulturschalen unterschiedlicher Größe in EDM Medium mit 5 % NCS kultiviert. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch Trypsinlösung ersetzt, die jedoch sofort wieder entfernt wurde. Nach 5-10-minütiger Inkubation bei 37 °C hatten sich die Zellen abgelöst, konnten in Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf neue Zellkulturplatten umgesetzt werden. Suspensionszellkulturen wurden in RPMI 1640 Medium mit 5 % FCS in Zellkulturflaschen gehalten und umgesetzt. Sämtliche Zellkulturen wurden bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Feuchtbrutschrank inkubiert.

### 3.3.3 Zellzählung und Zellviabilitätstest mit Trypanblaufärbung

Die Zellzählungen wurden in einer Zählkammer nach Neubauer durchgeführt. Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit der PBMC wurden diese mit Trypanblau gefärbt. Dieser Farbstoff ist in der Lage, die Zellmembranen geschädigter oder toter Zellen zu durchdringen und diese dadurch blau zu färben, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und ungefärbt erscheinen.

Die Zellen wurden zunächst gezählt und anschließend in PBS verdünnt. Es wurde ein gleiches Volumen 0,2 % Trypanblau in PBS zugegeben, vorsichtig gemischt und unverzüglich eine Zählkammer nach Neubauer beschickt. Durch die mikroskopische Auszählung der gefärbten und der gesamten Zellen, konnte dann der Prozentsatz an lebenden Zellen ermittelt werden.

### 3.3.4 Virusvermehrung

Um größere Mengen virushaltiger Zellkulturüberstände herzustellen, wurden semikonfluente, am Vortag auf Gewebekulturschalen (Ø 15 cm) ausgesäte ED-Zellen infiziert. Die Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection, MOI) wurde dabei niedrig gehalten (0,01-0,001 plaque forming units (PFU) / Zelle), um die Bildung defekter Partikel zu verhindern (Uchida et al., 1966; Cole et al., 1971). Das Inokulum wurde unter gelegentlichem Schwenken für 1 Stunde auf dem Zellrasen belassen. Nach einmaligem Waschen mit PBS, wurde dieser dann mit frischem Zellkulturmedium versehen und weiter inkubiert. Nach 1-2 Passagen, als das Virus den Zellrasen zu mehr als 70 % durch zytopathogene Effekte (cpE) zerstört hatte, wurde der

Überstand gewonnen und durch eine Zentrifugation bei 3.000 UpM für 10 Minuten (Minifuge 2) von groben Zellresten befreit.

### 3.3.5 Isolierung und Reinigung von DNA aus Virionen

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) :

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	10 mM (1,21 g)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	1 mM (0,37 g)
Aqua dest	ad 1 l
pH 8,0 mit HCl einstellen	

DNase-Puffer:

MgCl <sub>2</sub>	10 mM (95,21 mg)
CaCl <sub>2</sub>	2 mM (22,2 mg)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	20 mM (242,28 mg)
Aqua dest	ad 100 ml
pH 7,4 mit HCl einstellen	

0,2 M EDTA:

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

Sodium-Dodecylsulfat-(SDS)-Lösung 20 % (w / v):

SDS	20 g
Aqua dest	ad 100 ml

QBT-Puffer:

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

QC-Puffer

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

QF-Puffer

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

Sucroselösung 30 % (w / v) in TE-Puffer

Isopropanol, 70 % Ethanol, Proteinase K (10 mg / ml Stocklösung), RNase A, DNase I

Der von groben Zellresten gereinigte Zellkulturüberstand (3.3.4) wurde mit 5 ml einer 30 %igen Sucroslösung in TE-Puffer unterschichtet und bei 27.000 UpM in einem SW-27 Rotor (Beckmann) für eine Stunde ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml DNase-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden RNase A (Endkonzentration 15 µg / ml) und DNase I (Endkonzentration 5 µg / ml) hinzu pipettiert und die Ansätze zunächst für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die zellulären Nukleinsäuren möglichst vollständig zu verdauen, wurde anschließend nochmals die gleiche Menge der Enzyme hinzugegeben und für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde 0,2 M EDTA-Lösung (Endkonzentration 50 mM) verwendet. Der Abbau der Virushüllen, Kapside und der Nukleasen erfolgte durch die Zugabe einer 20 %igen SDS-Lösung (Endkonzentration 0,1 %) und von Proteinase K (Endkonzentration 1-1,5 mg / ml) und anschließender Inkubation bei 37 °C über Nacht oder bei 56 °C für mindestens 2 Stunden im Wasserbad.

Die Aufreinigung der Virus-DNA wurde mit Quiagen-Genomic-tip 20 / G-Säulen (Quiagen, Hilden) über das Anionen-Austauscher-Prinzip, entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Säulen wurden zunächst mit QBT-Puffer äquilibriert und anschließend die Virus-DNA-haltige Lösung auf die Säulen pipettiert. Nach dem Waschen mit QC-Puffer wurde die DNA in QF-Puffer eluiert und mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation bei 15.000 g (Mikrozentrifuge 154, Ole Dich, Dänemark) für 15 Minuten bei 4 °C wurde das resultierende Pellet in 70 %igem Ethanol unter gleichen Bedingungen gewaschen, luftgetrocknet und in 50-100 µl Aqua dest auf einem Rotationsschüttler resuspendiert.

Die Überprüfung der Qualität und die Einschätzung der Ausbeute der gewonnenen Virus-DNA erfolgte durch den Vergleich der Bandenintensität in der Agarosegelelektrophorese (3.9.3) mit einem DNA-Längenstandard ( $\lambda$ -DNA / *Hind* III) bekannter Konzentration.

### 3.3.6 Virustitration

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Carboxymethylzellulose (CMC)-Overlaymedium:

CMC-Natriumsalz	8,0 g
NCS	10 ml
EDM	ad 500 ml

4 % Formalin in PBS, EDM, Giemsa-Lösung für die Mikroskopie, NCS

Durch den Einsatz von Verdünnungsreihen wird mit dieser Methode der Virusgehalt von Flüssigkeiten und Zellen bestimmt.

Zellgebundenes Virus wurde zuvor durch Zellyse mittels Ultraschall oder Frieren-Tauen freigesetzt. Die Virussuspensionen wurden logarithmisch zur Basis 10 in Zellkulturmedium verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 Kavitäten einer 24-Loch Zellkulturplatte mit

0,2 ml beschickt und je etwa  $1 \times 10^4$  Zellen in 0,2 ml Zellkulturmedium hinzu pipettiert. Um eine Virusausbreitung über das Medium zu unterbinden, wurde der Ansatz nach einstündiger Inkubation bei 37 °C mit 0,4 ml CMC-Overlaymedium überschichtet und weiter bis zum Erscheinen auswertbarer Plaques bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehydlösung in PBS für 30 Minuten und anschließender Färbung mit Giemsa-Lösung erfolgte die Virustiterbestimmung. Hierbei wurde die Plaquezahl in der ersten auszählbaren Kavität bestimmt, mit dem Kehrwert ihrer Verdünnung multipliziert und unter Berücksichtigung der eingesetzten Volumina in PFU pro ml umgerechnet.

### **3.3.7 Wachstumskinetik**

Zur Untersuchung der EHV-2-IL-10-Expression in der Zellkultur wurden ED-Zellen mit einer möglichst hohen Virusdosis infiziert (in der Regel 2 PFU pro Zelle). Dadurch wird die Synthese wirtsspezifischer Proteine unterbunden und die Virusreplikation in der Wirtszelle synchronisiert. Die Versuche wurden immer im Doppelansatz auf Zellkulturschalen ( $\varnothing$  3,5 cm,  $1 \times 10^5$  Zellen) durchgeführt. Von den am Vortag ausgesäten Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 100  $\mu$ l Virussuspension ersetzt. Die Adsorption des Virus an die Zellen erfolgte nun für eine Stunde bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Feuchtbrutschrank, das Inokulum wurde wieder abgenommen, die Zellen einmal mit Medium gewaschen und mit frischem Medium bis zur Zellernte bei 37° C im CO<sub>2</sub>-Feuchtbrutschrank inkubiert. Es wurden immer nicht-infizierte Zellen als Kontrollen mitgeführt.

### **3.3.8 Wachstumskinetik mit Inhibitoren der Virusreplikation**

Um bestimmte Stadien der Virusreplikation selektiv zu hemmen und dadurch die Expression der untersuchten EHV-2-Gene genauer definieren zu können, wurden 2 Substanzen eingesetzt, die in den Virusstoffwechsel eingreifen können. Zunächst wurden Versuche mit Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Proteinsynthese in eukaryonten Zellen, durchgeführt. CHX wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ g / ml Zellkulturmedium eingesetzt. Außerdem wurden die infizierten Zellen mit Phosphonoessigsäure (PAA, Phosphonoacetic Acid) in einer Konzentration von 200  $\mu$ g / ml Zellkulturmedium behandelt. Durch PAA wird die DNA-Replikation der Viren gehemmt und die Bildung von  $\gamma_2$ -Transkripten unterbunden.

Diese Versuche wurden wie die Versuche ohne Inhibitoren der Virusreplikation durchgeführt (siehe 3.3.7). Eine Stunde vor der Infektion wurden die Zellen mit Inhibitor-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Der Inhibitor wurde bis zur Zellernte im Medium belassen. Als Kontrollen wurden neben nicht-infizierten Zellen auch infizierte Zellen, die nicht mit Inhibitor behandelt worden waren, mitgeführt.

### 3.4 Serologische Tests

#### 3.4.1 Neutralisationstest (NT)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

EDM, NCS, CMC-Overlaymedium, 4 % Formalin in PBS, Giemsa-Lösung für die Mikroskopie

Bevor von dem zu untersuchenden Blutserum bzw. -plasma logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 2 in EDM hergestellt werden konnten, wurde das Komplementsystem durch eine Inkubation bei 56 °C für 30 Minuten inaktiviert. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 µl in die Kavitäten einer 24-Lochplatte pipettiert und je 100 µl einer auf 10<sup>3</sup> PFU / ml eingestellten Virussuspension zugegeben. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Feuchtbrutschrank wurden jeweils 1 x 10<sup>4</sup> Zellen ergänzt und die Inkubation für weitere 4 Stunden fortgesetzt. Anschließend wurden die Kavitäten mit jeweils 400 µl CMC-Overlaymedium überschichtet und weiter inkubiert. Die Fixierung mit 4 % Formaldehyd in PBS und die Färbung erfolgte nach einer Woche.

#### 3.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

4 % Formalin / PBS

1 % Triton / PBS:

Triton x-100	10 ml
PBS	ad 1 l

Anti-Spezies-IgG- (H+L) Fluoreszeinisothiocyanat- (FITC-) Konjugat

ED- bzw. JKM-Zellen wurden auf 96-Lochplatten ausgesät und mit EHV-2 infiziert. Die Zellen wurden im CO<sub>2</sub>-Feuchtbrutschrank bei 37 °C bis zur Ausbildung erster Plaques inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formalin / PBS fixiert und bei ca. 4 °C gelagert.

Vor ihrer Verwendung wurden die Zellen mit 1 % Triton / PBS für 30 Minuten bei 37 °C aufgeschlossen und mit 1 % NCS / PBS gewaschen. Von den zu testenden Seren wurden logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 2 hergestellt, diese in die Kavitäten der 96-Lochplatten pipettiert und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 % NCS / PBS entfernt. Die Darstellung der eventuell gebundenen EHV-2-spezifischen Antikörper erfolgte durch eine zweite Inkubation der Zellen mit 50 µl eines Ziege-Anti-Pferd-IgG(H+L)-FITC-konjugierten Antikörpers, wiederum für 60 Minuten bei 37 °C. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden pro Vertiefung 50 µl Aqua dest aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena), wobei der Titer des Serums der Verdünnung entsprach, bei der noch deutliche Antigen-spezifische Fluoreszenzen zu



erkennen waren. Der Grenzwert für die Beurteilung eines Titers als auffällig liegt für den EHV-2-IIFT bei 1:5120 (Borchers et al., 1999a).

### **3.5 Isolierung von equinen PBMC aus Citratblut mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Lösungen, Reagenzien, Medien:

DEPC-PBS (siehe 3.8), 3 % Natriumcitrat in PBS, Ficoll 1,077 g

Für die RNA-Präparation sollten die Blutzellen nicht älter als 1-3 Stunden sein, da in dieser Zeit die Degeneration der zellulären RNA beginnt. Aus diesem Grund wurden die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte zügig ausgeführt, um eine sowohl quantitativ als auch qualitativ zufriedenstellende RNA-Ausbeute zu gewährleisten.

Zur Blutentnahme beim Pferd wurden 5 ml einer 3 %igen Natriumcitratlösung in sterilen 50 ml Kunststoffröhrchen vorgelegt. Die Blutentnahme erfolgte nach gründlicher Alkoholdesinfektion der Punktionsstelle aus der Vena jugularis externa. Zur Abtrennung des Blutplasmas wurde das gerinnungsgehemmte Blut für 20 Minuten bei 1.900 UpM (Minifuge 2) zentrifugiert. Das Plasma wurde vorsichtig abgenommen und für die serologische Untersuchung aufbewahrt, das Volumen mit PBS wieder aufgefüllt und durch Schwenken gründlich gemischt. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde jeweils die Hälfte des Inhalts eines Blutröhrchens vorsichtig auf ein 15 ml Ficoll-Kissen geschichtet. Bei der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation (Minifuge 2, 1.500 UpM) wurden die PBMC von den sonstigen Blutzellen abgetrennt. Die PBMC-haltige Bande wurde großzügig abpipettiert, in 15 ml Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde erneut in 10 ml PBS resuspendiert, aliquotiert und die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt (siehe 3.3.3).

### **3.6 Verfahren zum direkten Virusnachweis aus equinen PBMC in der Zellkultur**

Die folgenden Methoden wurden verwendet, um in natürlich und experimentell infizierten Zellen vorhandenes Virus nachzuweisen. Dabei sollte außerdem die Differenzierung zwischen einer akuten und einer latenten Infektion ermöglicht werden.

#### **3.6.1 Nachweis infektiöser Viren in equinen PBMC nach Virusfreisetzung und Virusvermehrung im Plaquetest**

Durch die Zerstörung der PBMC werden infektiöse Viruspartikel freigesetzt, die dann in permissiven Zellen vermehrt werden können.

Ca.  $4 \times 10^5$  PBMC, aufgenommen in PBS, wurden durch dreimaliges Frieren und Tauen lysiert und auf eine gleiche Menge, 3 bis 4 Stunden zuvor auf 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesäte ED-Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im CO<sub>2</sub>-Feuchtbrutschrank bei 37 °C. Die Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch auf das Erscheinen von cpE untersucht und

nach 5-6 Tagen durch Abtrypsinieren 1:2 passagiert (vgl. 3.3.2). Wenn nach dreimaliger Passage der Zellen kein cpE nachgewiesen werden konnte, wurde die Probe als negativ beurteilt.

### **3.6.2 Nachweis von infektiösem und latentem Virus in equinen PBMC mit der Kokultivierung**

Mit Hilfe dieser Methode kann die Anwesenheit von infektiösem und latentem Virus in Geweben und Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen werden dabei nicht zerstört, sondern im intakten Zustand auf permissive Zellen gegeben. Die Detektion der Virusvermehrung erfolgt wiederum durch cpE-Bildung in den permissiven Zellen. Kombiniert man die Virusvermehrung aus lysierten Zellen (3.6.1) mit der Kokultivierung, so ist latentes Virus nur in der Kokultivierung und nicht im Plaquetest, infektiöses Virus jedoch in beiden Tests nachweisbar. Die Durchführung entsprach 3.6.1, allerdings wurden die in PBS aufgenommenen PBMC direkt auf die ED-Zellen gegeben. Die Passagierung und Beurteilung erfolgte wie in 3.6.1 beschrieben.

### **3.6.3 Nachweis von latentem Virus in equinen PBMC unter Verwendung von 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)**

Da für verschiedene Gammaherpesviren eine TPA-induzierte Reaktivierbarkeit von latentem Virus bekannt ist (siehe auch 1.2.4), wurden in der vorliegenden Arbeit die equinen PBMC während der Kokultivierung zum Teil mit TPA behandelt.

Diese Methode entspricht der Kokultivierung (3.6.2). Zusätzlich wurde das Zellkulturmedium der ED-Zellen jedoch eine Stunde vor Zugabe der PBMC mit 20 ng / ml TPA versetzt. Dieses verblieb auch nach Zugabe der PBMC bis zur ersten Passagierung, die auf Grund der Zytotoxizität des TPA schon nach 4-5 Tagen erfolgte, im Medium. Danach wurden die Zellen in frischem Medium ohne TPA kultiviert. Die Passagierung und Beurteilung erfolgte wie in 3.6.1 beschrieben.

## **3.7 DNA-Isolierung aus PBMC**

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Proteinase K-Verdaupuffer:

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

Proteinase K (10 mg / ml Stocklösung)

Zur DNA-Präparation dienten PBMC, die entsprechend Kapitel 3.5 aus Citratblut isoliert und gezählt worden waren. Anschließend wurden ca.  $1 \times 10^6$  PBMC in 100  $\mu$ l Proteinase K-Verdaupuffer mit 2  $\mu$ l Proteinase K (Endkonzentration: 0,2 mg / ml) aufgenommen. Der

Verdau erfolgte über Nacht bei 56 °C im Wasserbad, die sich daran anschließende Erhitzung für 5 Minuten auf 94 °C diente der Inaktivierung der Proteinase K. Im Spektrophotometer (UV-1202, Shimadzu) wurde die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und die DNA bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **3.8 RNA-Isolierung aus Zellkulturen und PBMC**

#### **3.8.1 Vorbereitung von Materialien und Reagenzien für die Arbeit mit RNA**

Um das Risiko der Degeneration der RNA durch RNasen gering zu halten, wurden bevorzugt Materialien und Reagenzien verwendet, die kommerziell hergestellt und als Nuklease-frei zertifiziert waren.

Mehrwegmaterial aus Glas wurde über Nacht bei 180 °C gebacken. Selbst hergestellte Puffer bzw. das zu ihrer Herstellung benötigte destillierte Wasser wurden, um die RNasen zu zerstören, mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und zur Inaktivierung des DEPC 15 Minuten autoklaviert.

#### **3.8.2 Herstellung von Trizol™-Lysaten aus Zellkulturen und PBMC**

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Trizol™, DEPC-PBS

Von den entsprechend 3.3.7 infizierten Zellkulturen (ca.  $1 \times 10^5$  Zellen pro Zellkulturschale) wurde an den Erntezeitpunkten das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen einmal mit DEPC-PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml Trizol™ direkt auf den Zellrasen pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Während der 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Lysierung der Zellen. Das Lysat wurde in RNase-freie 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Für die RNA-Gewinnung aus PBMC wurden ca.  $1 \times 10^7$  in DEPC-PBS verdünnte Zellen (siehe 3.5) in RNase-freien 1,5 ml Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 1.000 UpM pelletiert (Sepatech, Haereus, Osterode) und nach Abgießen des Überstandes sofort in 1 ml Trizol™ aufgenommen und lysiert. Die Trizol™-Lysate wurden entweder direkt weiterverarbeitet (3.8.3) oder bis zu einen Monat lang bei -70 °C gelagert.

#### **3.8.3 Gesamt-RNA-Präparation aus Trizol™-Lysaten**

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Chloroform, Isopropanol, 70 % Ethanol, Nuklease-freies Wasser

Zu den Trizol™-Lysaten aus 3.8.2 wurden pro ml Trizol™ 200 µl Chloroform gegeben und anschließend 15 Sekunden kräftig von Hand geschüttelt. Es folgte eine 2-3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12.000 g (Centrifuge

5403, Eppendorf, Hamburg) bei 4 °C für 15 Minuten. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in neue Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und leichtem Schütteln folgte wiederum eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation bei 12.000 g (Centrifuge 5403) und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das RNA-Pellet einmal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 g (Centrifuge 5403) und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet luftgetrocknet. Die Gesamt-RNA wurde in 50 bis 200 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert, bei 55 °C für 10 Minuten inkubiert und anschließend entweder bis zur sofortigen Weiterbearbeitung auf Eis gehalten oder direkt bei -70 °C eingefroren.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte analog zur DNA-Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer bei 260 nm Wellenlänge. Parallel wurde als zusätzliche Qualitätskontrolle die Absorption bei 280 nm mitbestimmt, wobei hier der Quotient aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, dividiert durch die OD bei 280 nm, zwischen 1,7 und 2,1 liegen sollte. Durch Multiplikation mit dem Faktor 4000, unter Einbeziehung der in der Vermessung eingesetzten Verdünnung, wurde die bei 260 nm gemessene OD in µg RNA / ml umgerechnet.

### 3.8.4 RNA-Qualitätskontrolle mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Laufpuffer (10 x konzentriert):

MOPS	0,2 M (21 g)
250 mM EDTA-Stocklösung	10 mM (20 ml)
Na-Acetat	0,1 M (3,4 g)
Aqua dest (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 dest (DEPC-behandelt) 500 µg / ml

Formaldehyd (37 %), Aqua dest (DEPC-behandelt)

0,75 g Agarose wurden mit 7,5 ml 10 x Laufpuffer und 49 ml Aqua dest (DEPC-behandelt) versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 70 °C wurden unter

einem Abzug 13,2 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben. Das Gel wurde in einer horizontalen Elektrophoresekammer, die sich unter einem Abzug befand, gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Kammer mit 1 x Laufpuffer gefüllt.

Die von jeder Probe eingesetzten 8 µg Gesamt-RNA wurden gegebenenfalls mit Nuklease-freiem Wasser auf 9 µl aufgefüllt und mit 9 µl Probenpuffer I und 2 µl Ethidiumbromid in Wasser versetzt. In diesem Gemisch wurde die RNA für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gehalten. Das Auftragen der Proben erfolgte direkt nach der Zugabe von 2 µl Probenpuffer II. Die Elektrophorese wurde für 3 Stunden mit einer Spannung von 100 Volt durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der RNA wurde das Gel auf einem UV-Illuminator (FLX-20M, Biometra, Göttingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet und zur Dokumentation mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert. Die RNA-Qualität wurde anhand der Intensität und Schärfe der ribosomalen 18 S und 28 S RNA-Banden beurteilt.

### **3.9 Polymerasekettenreaktion (PCR) und PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) zum Nachweis viraler DNA und viraler Transkripte**

#### **3.9.1 Reverse Transkription**

Lösungen, Reagenzien, Medien:

10 x DNase-Puffer:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan HCl	100 mM (1,21 g)
MnCl <sub>2</sub>	50 mM (0,63 g)
Aqua dest (DEPC-behandelt)	ad 100 ml
pH 7 (mit HCl einstellen)	

Um virale RNA in der PCR nachweisen zu können, musste diese zunächst in DNA umgeschrieben werden (reverse Transkription, RT). Dieses ist mit Hilfe der reversen Transkriptase, einem Enzym, das von Retroviren gebildet wird, möglich. In dieser Arbeit wurde eine genetisch veränderte Variante der reversen Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukämie Virus (M-MuLV-RT) verwendet (Expand RT, Roche Diagnostics, Mannheim). Da dieses Enzym durch eine Punktmutation seine RNase H Aktivität verloren hat, ist es für die Synthese komplementärer DNA (first strand complementary DNA, cDNA) besonders geeignet.

Um falsch-positiven Ergebnissen in der RT-PCR-Reaktion durch kontaminierende Reste viraler DNA in den RNA-Präparationen vorzubeugen, wurde der RT-Reaktion ein DNase I-Verdau vorangestellt. Dieser Verdau wurde in einem 50 µl Ansatz mit 10 µg Gesamt-RNA (3.8.3), die je nach Ausgangskonzentration mit Nuklease-freiem Wasser auf 42 µl aufgefüllt wurde, durchgeführt. Es wurden 5 µl 10 x DNase-Puffer, 1 µl RNase-Block (40 U / µl, Stratagene, CA, USA) und 2 µl DNase I (10 U / µl, Roche Diagnostics, Mannheim)

zupipettiert und dieses Reaktionsgemisch für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Um den Erfolg des Verdauens zu überprüfen wurden die RNA-Präparationen anschließend ohne RT direkt in der jeweiligen PCR (siehe Tabelle 2 und 3) untersucht.

War die RNA in der PCR negativ, so wurden anschließend 9,5 µl in Nuklease-freie 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen, in denen zuvor 2 µl eines T20 random-hexamer Primers (50 µM, Metabion, Martinsried) vorgelegt worden waren, überführt. Dieser Primer, der aus 20 Thymin-tragenden und 6 weiteren, zufällig ausgewählten Desoxyribonukleotiden besteht, bindet an den Poly-A-Schwanz der Messenger-RNA (mRNA).

Zur Denaturierung der RNA wurde dieses Gemisch für 5 Minuten bei 75 °C inkubiert und für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Für die nun folgende RT-Reaktion wurden 8,5 µl eines Mastermixes zupipettiert, der folgendermaßen zusammengesetzt war:

5 x RT-Puffer	4 µl
Dithiothreitol (DTT, 100 mM)	2 µl
RNase-Block (40 U / µl)	0,5 µl
Desoxyribonukleosid-Triphosphat Gemisch (dNTPs, 100 mM)	1 µl
Expand RT (50 U / µl)	1 µl

Einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Extension für 60 Minuten bei 42 °C. Die cDNA wurde entweder sofort in der PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Vor ihrem Einsatz in der PCR wurde die cDNA für 5 Minuten auf 94 °C erhitzt.

### 3.9.2 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich von einem einzigen Molekül der Erbsubstanz innerhalb kürzester Zeit eine große Zahl Kopien (Amplifikate) eines gesuchten DNA-Abschnitts zu erzeugen (Mullis, 1990).

Man benötigt 2, für den gesuchten DNA-Abschnitt spezifische Sonden, die als sogenannte Primer an die Enden der beiden Stränge des passenden DNA-Stücks (Template), das durch Erhitzung aufgeschmolzen wurde, binden (Annealing). Die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* kann, am Primer ansetzend, einen, dem Template komplementären, neuen DNA-Strang bilden (Extension). Durch die etwa 20- bis 40-malige Wiederholung dieses Zyklus werden exponentiell ansteigend immer mehr Kopien des gesuchten DNA-Abschnitts produziert, die in der Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung im ultravioletten Licht (UV-Licht) sichtbar gemacht werden können.

Um die Spezifität und Sensitivität der PCR zu erhöhen, können 2 PCR-Reaktionen miteinander kombiniert werden. Es wird ein Primerpaar eingesetzt, das dazu in der Lage ist, das Amplifikat der bereits durchgeführten PCR (1. Runde) als Template zu verwenden und

aus diesem heraus in einer 2. PCR (2. Runde) wiederum spezifische Amplifikate zu produzieren. Dieses Verfahren wird als nested PCR (nPCR) bezeichnet. Eine Modifikation stellt die seminested PCR (snPCR) dar, bei der in der 2. Runde ein Primerpaar aus einem Primer der 1. Runde und einem neuen „internen“ Primer verwendet wird.

Für die verschiedenen PCRs, die in dieser Arbeit eingesetzt bzw. zum Teil auch entwickelt wurden, standen Thermocycler verschiedener Hersteller zur Verfügung, die bei der Beschreibung der einzelnen PCRs erwähnt werden. Das Design der Primer erfolgte anhand der bekannten Sequenz des EHV-2-Stamms 86 / 67 (Telford et al., 1995, GenBank accession number U20824) mit Hilfe des Computerprogramms „MacVector“ (Accelrys, Cambridge, UK).

Alle PCRs wurden nach dem nun folgenden Schema durchgeführt, wobei die Annealingtemperatur (Atemp) von den verwendeten Primern abhing (siehe Tabelle 2 und 3).

Denaturierung:	30''	94 °C	←
Annealing:	30''	Atemp	↑34 x (Anzahl der Wiederholungszyklen)
Extension:	1'	72 °C	→

Die Reaktionen wurden in einem 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten beide Primer (jeweils 4 µM), dNTPs (0,2 mM, Perkin Elmer, Überlingen), 1,5 U Taq-Polymerase (Quiagen, Hilden) und 1 x Reaktionspuffer (Quiagen, Hilden). In einigen PCRs wurde außerdem 1 x Q-Puffer (Quiagen, Hilden) zugesetzt (siehe Tabelle 2 und 3). Als Template-DNA wurden in der 1. Runde 1-2 µg Gesamt-DNA aus Zellen, 2 µl cDNA aus der RT-Reaktion oder 20-40 pg gereinigte Virus-DNA und im Falle der 2. Runde der nPCR bzw. snPCR stets 1 µl der 1. Runde eingesetzt. Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze wurde anschließend mit Nuklease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Nach der Amplifikation wurden 10-15 µl der Reaktionsansätze in der analytischen Agarosegelelektrophorese eingesetzt (3.9.3).

Die in dieser Arbeit eingesetzten PCRs sind in den nachfolgenden Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Die PCRs, die als RT-PCR zum Transkriptnachweis eingesetzt wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

**Tabelle 2 Primersequenzen, Amplifikatgrößen und Annealingtemperaturen der PCRs, die bereits am Institut für Virologie etabliert waren**

<b>EHV-2-gB-nPCR</b> (als nRT-PCR verwendet; Borchers et al., 2002)					
Thermocycler: „Personalcyclus“, Biometra					
Primer	Sequenz	Genom-Position	Amplifikate	Atemp.	NG*
1	5' ATCAACCCACCAGCGTCAT 3'	33677	1. Runde 948 bp	50 °C	5 pg
2	5' TTTTACTTCTTCCTCTCGTC 3'	34605			
3	5' CCCAGGAACGAGATTGTGCT 3'	33899	2. Runde 512 bp	50 °C	1 fg
4	5' GCTATGATGAGGACTATGAG 3'	34391			
2. Runde mit Q-Puffer					

<b>EHV-2 („repetitives Motiv“, stromauf vom IL-10-ORF gelegen) nPCR</b> (Borchers et al., 1997)					
Thermocycler: „Omnigene“, Hybaid, Middlesex, GB					
Primer	Sequenz	Genom-Position	Amplifikate	Atemp.	NG*
7	5' GGCCTGAAACCCCATACTG 3'	139807	1. Runde 1196 bp**	64 °C	50 fg
8	5' AAAACCATGCTGTCCAACCA 3'	138631			
9	5' CCACTAACCCCAACCTT 3'	139245	2. Runde 580 bp**	64 °C	0,9 fg
10	5' CCTCTATCCTCACAACAG 3'	138683			
** Die Amplifikatgröße entspricht dem EHV-2-Prototypstamm 86 / 67 (Telford et al., 1995). Sie variiert bei verschiedenen EHV-2-Isolaten. Die Amplifikate besitzen eine definierte Spaltstelle für das Restriktionsenzym DRA I und werden so gespalten, dass ein konstanter und ein variabler Teil entsteht.					

<b>EHV-1-ICP0-nPCR</b> (Borchers et al., 1999c)					
Thermocycler: „Omnigene“, Hybaid, Middlesex, GB					
Primer	Sequenz	Genom-Position	Amplifikate	Atemp.	NG*
1	5' TCTATGGGATTATGCTATGC 3'	109881	1. Runde 388 bp	56 °C	
2	5' CCTATTACAAAACCTATGC 3'	110269			
3	5' ACACAGTTCCGTTTGAGA 3'	110162	2. Runde 128 bp	59 °C	0,8 fg
4	5' AAGGCGATTATTACAGCA 3'	110034			

<b>EHV-4-gB-nPCR</b> (Borchers & Slater, 1993)					
Thermocycler: „Omnigene“, Hybaid, Middlesex, GB					
Primer	Sequenz	Genom-Position	Amplifikate	Atemp.	NG*
1	5' TCTATTGAGTTTGCTATGCT 3'	1974	1. Runde 930 bp	56 °C	
2	5' TCCTGGTTGTTATTGGGTAT 3'	2906			
3	5' TGTTTCCGCCACTCTTGACG 3'	2126	2. Runde 580 bp	68 °C	1 fg
4	5' ACTGCCTCTCCACCTTACC 3'	2706			

\*NG ist die Nachweisgrenze der PCR, die durch den Einsatz von Verdünnungsreihen aufgereinigter viraler DNA (entsprechend 3.3.5 hergestellt) in der jeweiligen PCR ermittelt wurde.



**Tabelle 3 Primersequenzen, Amplifikatgrößen und Annealingtemperaturen der PCRs, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden**

<b>EHV-2-IL-10-snPCR (als snRT-PCR verwendet)</b>					
Thermocycler: „Omnigene“, Hybaid, Middlesex, GB					
Primer	Sequenz	Genom-Position	Amplifikate	Atemp.	NG*
18	5' CCCTCAGTTTTTCATCTTTG 3'	137910	1. Runde 404 bp	55 °C	50 fg
13	5' CCTTCAGCAGGGTAAAGACC 3'	138294			
14	5' CCAGGGAGTTCACCTTATCC 3'	138113	2. Runde 202 bp	55 °C	0,5 fg
13	5' CCTTCAGCAGGGTAAAGACC 3'	138294			
<b>EHV-2-ORF-50-nPCR (als nRT-PCR verwendet)</b>					
Thermocycler: „PCR sprint“, Hybaid, Middlesex, GB					
Primer	Sequenz	Genom-Position	Amplifikate	Atemp.	NG*
1	5' GCACTCCAGGCAGTTCTTTTCAG 3'	102315	1. Runde 813 bp	60 °C	500 fg
2	5' GCATTCCCTTAGAGCAGTCACACAAG 3'	103217			
3	5' CCTACCAGCAACAGCAGTTTC 3'	102647	2. Runde 359 bp	56 °C	1 fg
4	5' AAAGAGAGACTTCCTGAGGTGC 3'	102984			
2. Runde mit Q-Puffer					

\*NG ist die Nachweisgrenze der PCR, die durch den Einsatz von Verdünnungsreihen aufgereinigter viraler DNA (entsprechend 3.3.5 hergestellt) in der jeweiligen PCR ermittelt wurde.

### 3.9.3 Analytische Agarosegelelektrophorese

Lösungen, Reagenzien, Medien:

TAE-Puffer (10 x):

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,4 M (48,5 g)
Na-Acetat	0,06 M (4,13 g)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	0,01 M (3,7 g)
pH 7,9 mit HCl einstellen	
Aqua dest	ad 1 l

Probenpuffer

0,25 % (w / v) Bromphenolblau	250 mg
70 % (w / v) Sucrose	70 g
Aqua dest	ad 100 ml

Ethidiumbromidlösung (10 mg / ml)

Die horizontale Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder einer Restriktionsenzymanalyse (3.10).

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde hochreine Standardagarose 0,5-2 %ig (w / v) in 1 x TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen in einer Mikrowelle geschmolzen. Nachdem das Gel etwas abgekühlt war, wurde es in die, mit einem Kamm bestückte, horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Das erstarrte Gel wurde mit

1 x TAE-Puffer, dem zuvor Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration: 0,4 mg / Liter) zugesetzt worden war, überschichtet.

Die zu trennenden Proben wurden mit 1 / 10 Volumen Probenpuffer versetzt, in die Taschen des Gels pipettiert und bei einer Spannung von 3 V / cm aufgetrennt. Zur Ermittlung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden 50 bp oder 100 bp DNA-Leitern bzw. die Längenstandards  $\lambda$ -DNA / *Hind* III und / oder  $\phi$ X 174-DNA / *Hae* III auf jedem Gel mitgeführt. Nach vollständiger Auftrennung der DNA-Banden wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator (FLX-20M, Biometra, Göttingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet und zur Dokumentation mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

### 3.10 Restriktionsenzymanalyse (REA)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Probenpuffer (siehe 3.9.3)

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) wurde unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 100-200 ng virale DNA in einem 50  $\mu$ l Ansatz mit den vorgegebenen Mengen Enzym und Puffer vermischt und für 12-16 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Auf die gleiche Weise wurden für die REA von PCR-Amplifikaten 10-15  $\mu$ l aus der zu untersuchenden PCR-Reaktion in einem 20  $\mu$ l Ansatz eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 15  $\mu$ l Probenpuffer beendet.

Die Analyse der REA erfolgte in der analytischen Agarosegelelektrophorese (3.9.3) und gegebenenfalls mittels Southernhybridisierung (3.11).

### 3.11 Nukleinsäurenachweis durch Southernhybridisierung (Southern Blot)

#### 3.11.1 DNA-Transfer

Lösungen, Reagenzien, Medien:

Denaturierungspuffer:

NaCl	0,6 M (35,06 g)
NaOH	0,4 M (16 g)
Aqua dest	ad 1 l

Neutralisationspuffer:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,5 M (60,55 g)
NaCl	1,5 M (87,65 g)
pH 7,5 mit HCl einstellen	
Aqua dest	ad 1 l

20 x Standard Natrium-Citrat (SSC), pH 7,2:

NaCl	3,0 M (175,3 g)
Natrium-Citrat	0,3 M (88,2 g)
Aqua dest	ad 1 l

**Tris / SSC-Puffer**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,2 M (24,22 g)
2 x SSC	100 ml 20 x SSC
pH 7,5 mit HCl einstellen	
Aqua dest	ad 1 l

0,25 N HCl, 0,4 N NaOH

Diese Methode zum Transfer von DNA auf Membranen (Nylon- oder Nitrozellulosemembranen) wurde ursprünglich von Southern (1975, siehe auch Sambrook et al., 1989) beschrieben und in der vorliegenden Arbeit zur Spezifizierung der in den REAs erhaltenen DNA-Banden, sowie zur Detektion von viraler DNA in Gardella-Gelen verwendet. Das Agarosegel (aus 3.9.3 bzw. 3.12) wurde zunächst zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert (vgl. 3.9.3) und anschließend für 20 Minuten auf einem Schütteltisch in Aqua dest entfärbt. Zur Abspaltung von Purinresten, wodurch Strangbrüche in 1-2 kb große DNA-Fragmente entstehen, die einen effektiveren Transfer auf die Membran ermöglichen, wurde es dann für 30 Minuten in 0,25 M HCl inkubiert. Daran schloss sich eine 30-minütige Denaturierung in Denaturierungspuffer an. Während der danach durchgeführten Inkubation in Neutralisationspuffer (30 Minuten) wurde die Nylonmembran (Gene screen plus, Dupont, Boston, USA), auf die die DNA transferiert werden sollte, auf Gel-Größe zugeschnitten, in Aqua dest gewässert und für mindestens 15 Minuten in 10 x SSC äquilibriert.

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte im Kapillar-Blot-Verfahren, bei dem ein Strom von 10 x SSC den Übergang der DNA auf die Membran ermöglicht. Der Sog wurde durch einen etwa 10 cm hohen und beschwerten Turm aus saugfähigen Papiertüchern hergestellt und über 14-16 Stunden aufrecht erhalten. Anschließend wurde die Nylonmembran für 30-60 Sekunden in 0,4 N NaOH inkubiert, in Tris / SSC-Puffer gewaschen, staubfrei getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken gelagert.

Zur Überprüfung des erfolgreichen DNA-Transfers wurde das Gel für 15 Minuten in 1 x TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,4 mg / Liter) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator betrachtet. Die DNA-Banden sollten dabei fast vollständig aus dem Gel verschwunden sein. Die Nylonmembran wurde anschließend in der Southernhybridisierung (3.11.3) eingesetzt.

### 3.11.2 Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUTP

Lösungen, Reagenzien, Medien:

#### 5 M Ammoniumacetat

Ammoniumacetat	5 M (35,04 g)
Aqua dest	ad 100 ml

0,2 M EDTA, Ethanol abs., Ethanol 80 %, TE-Puffer, Heringssperma-DNA

Zur Markierung wurden Gesamtvirus-DNA (EHV-2) bzw. Genomfragmente (für EBV das Plasmid p135.16, welches die EBV-ORFs EBNA2 / BYRF1, BHLF1 und BHRF1 enthält und

der Arbeitsgruppe Equine Herpesviren dankenswerterweise von Dr. J. Mankertz zur Verfügung gestellt wurde) verwendet. Dabei kam das Digoxigenin-DNA-Markierungs-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers zum Einsatz. In einem Volumen von 15 µl Aqua dest wurden zunächst 50-150 ng der zu markierenden DNA aufgenommen, für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt (Denaturierung) und sofort in einem Eisbad abgekühlt. 2 µl Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP-Markierungsmix und 1 µl Klenow-Enzym (2 U / µl) (Digoxigenin-DNA-Markierungs-Kit) wurden zu der DNA pipettiert und anschließend im Wasserbad bei 37 °C über Nacht inkubiert. Durch die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Danach wurde die DNA unter Zugabe von 40 µl 5 M Ammoniumacetat, 5 µl Heringssperma-DNA und 33 µl Aqua dest mit 300 µl eiskaltem Ethanol abs. bei -20 °C für 2 Stunden gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation für 15 Minuten bei 15.000 g (Mikrozentrifuge 154, Ole Dich) wurde das Pellet in 200 µl 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Auf einer Nylonmembran wurde mittels Dot Blot der Gehalt an markierter DNA überprüft. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser DNA und der Kontroll-DNA aus dem Markierungs-Kit mit bekannter Konzentration (5 ng / µl) hergestellt und parallel auf die Membran getropft. Nach der Visualisierung (siehe Kapitel 3.11.4) konnte die Konzentration der markierten DNA durch den Vergleich mit der Kontroll-DNA bestimmt werden.

### 3.11.3 Southernhybridisierung und Farbreaktion

Lösungen, Reagenzien, Medien:

20 x SSC (siehe 3.11.1)

Prähybridisierungsmix:

50 % (v / v) Formamid, deionisiert	250 ml
20 x SSC	125 ml
2 % (w / v) Blockierungsreagenz (Digoxigenin-DNA-Markierungs-Kit)	1 g
0,1 % (w / v) N-Lauroylsarcosin	500 mg
0,02 % SDS	500 µl 20 %iges SDS
50 µg / ml Hefe RNA	25 mg
Aqua dest	ad 500 ml

Waschpuffer 1 (2 x SSC / 0,1 % SDS):

20 x SSC	100 ml
10 % SDS (w / v)	10 ml
Aqua dest	ad 1 l

Waschpuffer 2 (0,1 x SSC / 0,1 % SDS):

20 x SSC	5 ml
10 % SDS (w / v)	10 ml
Aqua dest	ad 1 l

Puffer 1:	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	100 mM (12,11 g)
NaCl	150 mM (8,77 g)
pH 7,5 mit HCl einstellen	
Aqua dest	ad 1 l
Puffer 2:	
Blockierungsreagenz (Digoxigenin-DNA-Markierungs-Kit) in Puffer 1	0,5 % (w / v)
Puffer 3:	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	100 mM (12,11 g)
NaCl	100 mM (5,84 g)
MgCl <sub>2</sub>	50 mM (4,76 g)
pH 9,5 mit HCl einstellen	
Aqua dest	ad 1 l
Puffer 4:	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	10 mM (1,21 g)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	1 mM (3,72 g)
pH 8,0 mit HCl einstellen	
Aqua dest	ad 1 l
Nitroblau-Tetrazoliumsals (NBT)	50 mg / ml in 70 % Dimethylformamid (v / v)
X-Phosphat:	
5-Bromo-4-chloro-indolylphosphat	50 mg / ml in 100 % Dimethylformamid
Färbelösung:	
NBT-Lösung	45 µl
X-Phosphat	35 µl
Puffer 3	ad 10 ml

Die Southernhybridisierung wurde zur Detektion viraler DNA auf Nylonmembranen (3.11.1) unter Verwendung der entsprechend 3.11.2 hergestellten Digoxigenin-markierten Sonden eingesetzt. Da in den Gardella-Gelen (3.12) gleichzeitig EBV- und EHV-2-infizierte Zellen auf einem Gel eingesetzt wurden, mussten die Membranen vor der Southernhybridisierung mit den virusspezifischen Sonden mit einer sterilen Skalpellklinge durchgeschnitten werden.

Die Nylonmembran wurde unter Vermeidung von Luftblasen in ein 250 ml Glasrohr überführt und zunächst mit 10 ml Prähybridisierungsmix zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen in einem Hybridisierungssofen für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Unterdessen wurde die Digoxigenin-markierte Sonde für 5 Minuten bei 95 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend sofort in einem Eiswasserbad abgekühlt.

Der Hybridisierungsmix bestand aus 5-10 ml frischem Prähybridisierungsmix, der pro ml mit 5-10 ng der markierten DNA-Sonde versetzt worden war. Damit wurde die prähybridisierte Membran bei 42 °C für 14-16 Stunden inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die

Membran zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer 1 und zweimal für 15 Minuten bei 68 °C in Waschpuffer 2 gewaschen.

Zur Visualisierung wurde die Membran zunächst kurz in Puffer 1 äquilibriert und dann für 30 Minuten in Puffer 2 geblockt. Nach kurzem Waschen in Puffer 1 (1 Minute) wurde der Blot mit 10-20 ml 1:5000 in Puffer 1 verdünntem Antikörper-Konjugat (Anti-Digoxigenin-Antikörper, mit alkalischer Phosphatase konjugiert, Endkonzentration: 150 mU / ml, Roche Diagnostics, Mannheim) für 30 Minuten inkubiert und ungebundenes Konjugat durch 15-minütiges Waschen in Puffer 1 entfernt.

Für die Farbreaktion wurde die Membran zunächst für 15 Minuten in Puffer 3 äquilibriert, anschließend mit 10-20 ml Färbelösung bedeckt und unter Licht-Ausschluss inkubiert (1-16 Stunden). Die Farbreaktion wurde durch eine Inkubation in Puffer 4 (mindestens 5 Minuten) beendet. Zur Dokumentation wurde die Membran mit einem Scanner abgelichtet und digital gespeichert.

### 3.12 Horizontale *in situ* Lysisgele nach Gardella (Gardella-Gel)

Lösungen, Reagenzien, Medien:

10 mM Natrium-Phosphat:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,14 g
Aqua dest	ad 3 l

10 x TBE:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,9 M (109 g)
Borsäure	0,9 M (55,6 g)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	0,03 M (11,15 g)
Aqua dest	ad 1 l
pH 8,3 mit Borsäure einstellen	

Probenpuffer A:

Ficoll (Typ 400)	1,5 g
Bromphenolblau	Spatelspitze
1 x TBE	ad 10 ml

Trenngel:

0,75 % Agarose in 1 x TBE  
(low melting point (L.M.P.) Agarose, wenn das Gel für die DNA-Extraktion verwendet werden sollte)

Lysisgel:

0,8 % Standardagarose in 1 x TBE  
2 % SDS  
1 mg / ml Pronase

Die Gardella-Gel-Technik erlaubt durch den Nachweis von linearen und zirkulären Herpesvirusgenomen eine Differenzierung zwischen latentem und infektiösem Virus (Gardella et al., 1984). Durch die vorsichtige Lysierung suspendierter Zellen in den Taschen eines Agarosegels und der anschließenden Hochspannungs-Elektrophorese wird extra-

chromosomale DNA von der zellulären DNA getrennt. Die lineare Virus-DNA wandert dabei schneller im Agarosegel als die zirkuläre. Die Detektion der viralen DNA erfolgte durch Southernhybridisierung des Gels oder mittels PCR an aus dem Gel extrahierter DNA.

Das Trenngel (0,75 % mit Standard- oder L.M.P. Agarose, s. o.) und das Lysigel (0,8 % Standardagarose, ohne Pronase) wurden zunächst wie unter 3.9.3 beschrieben aufgekocht. Das Lysigel wurde anschließend in einem Wasserbad auf 50 °C abgekühlt. Das Trenngel wurde in einer 23 x 12 cm großen Elektrophoresekammer in einer Dicke von etwa 0,8 cm gegossen, wobei an einem Ende der Kammer ein etwa 2 cm langer Streifen ausgespart wurde. Nach dem Erstarren des Trenngels wurde in dieser Aussparung ein ca. 0,6 cm dicker Kamm mit acht 1,1 cm breiten Zinken an die Kante des Trenngels gestellt. Nachdem die Pronase zum Lysigel pipettiert worden war, wurde die Aussparung damit ausgegossen.

Die in 100-150 µl Probenpuffer A aufgenommenen Zellen wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei 4 °C zunächst für 3 Stunden mit einer Spannung von 28 V (0,8 V / cm) und anschließend für etwa 18 Stunden bei 162 V (4,5 V / cm) durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen des Gels für 30 Minuten in jeweils einem Liter 10 mM Natriumphosphat wurde das Gel für 15 Minuten in 1 x TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,4 mg / Liter) gefärbt und auf einem UV-Illuminator (FLX-20M, Biometra, Göttingen) mit angelegtem Lineal fotografiert. Anschließend wurde es in der Southernhybridisierung (3.11) oder in der PCR (3.9.2) untersucht.

Zur Vorbereitung der PCR-Untersuchung wurden die Spuren des Gels mit sterilen Einmal-skalpellklingen in etwa 1 x 1 cm große Blöcke zerteilt, um daraus die DNA zu extrahieren (siehe folgendes Kapitel 3.12.1).

### 3.12.1 DNA-Extraktion aus Gardella-Gelen

Lösungen, Reagenzien, Medien:

5 M Ammoniumacetat, Ethanol abs., Ethanol 70 %, 50 x Gelase-Puffer (Gelase™ Agarose-Gel-Digesting-Preparation-Kit)

Zur Extraktion von DNA aus Gardella-Gelen wurde das „Gelase™ Agarose-Gel-Digesting-Preparation-Kit“ (Epicentre Technologies, WI, USA) eingesetzt.

Den Angaben des Herstellers folgend wurden Blöcke (ca. 500 mg) aus dem mit L.M.P. Agarose gegossenen Gardella-Gel (3.12) in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, und mit 1 ml 1 x Gelase-Puffer versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Puffer abpipettiert, die Agarose bei 70 °C im Wasserbad geschmolzen und auf 45 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1,2 µl Gelase™ (1 U / µl) pro Gramm Gel zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 45 °C inkubiert.

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen 5 M Ammoniumacetat, pH 7, und 4 Volumen Ethanol abs. bei Raumtemperatur über Nacht. Nach einer

30-minütigen Zentrifugation bei 20.000 g (Mikrozentrifuge 154) wurde der Überstand mit einer Pipette entfernt und 1 ml 70 % Ethanol zugeben. Auf eine erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 20.000 g und Entfernung des Überstands folgte die Lufttrocknung des DNA-Pellets und die Aufnahme des Pellets in 50-200 µl Nuklease-freiem destilliertem Wasser. Die DNA-Gehaltsbestimmung und die Lagerung der DNA wurden wie unter 3.7 beschrieben, durchgeführt.

### **3.13 Sequenzierung der IL-10-Gene verschiedener EHV-2-Isolate und computer-gestützte Sequenzanalysen**

Die hier beschriebenen Sequenzierarbeiten wurden im Labor von Dr. N. Davis-Poynter (Animal Health Trust, UK) durchgeführt. Es wurden die IL-10-Gene von 6 EHV-2-Isolaten, die aus der Arbeit von Kershaw et al. (2001) stammen (siehe Tabelle 1), sequenziert.

Zunächst wurden die IL-10-Gene unter Verwendung von aufgereingter viraler DNA (3.3.5) mit den Primern E7Ef (5' ttcgaattcaccATGTTTCAGGGCATCG-CTG 3') und E7Er (5' ttcgaattc-AGTTTTTCATCTTTGTGG-TCA 3') in der PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden entweder direkt aufgereinigt und sequenziert oder zunächst kloniert. Die Sequenzierung erfolgte im Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) unter Verwendung des "Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit" (Applied Biosystems / Perkin-Elmer, Überlingen). Zunächst wurde die Extension in einem TETRAD-Thermocycler (MJ Research, MA, USA) unter Verwendung der Primer E7seq1 (5' CAGGTAACCCTTAAAGTCT 3') und E7seq2 (5' AGCAGGGTAA-AGACCTTC 3') durchgeführt. Nach der Fällung der Extensionsprodukte folgte die Sequenzierung in einem ABI 3700™ Sequenzierer (Applied Biosystems / Perkin-Elmer).

Die Nukleinsäure- (NS-) Sequenzen der EHV-2-Stämme T400 und 86 / 67 sowie der anderen, in dieser Arbeit verwendeten, cIL-10- und vIL-10-Gene wurden der Gen-Bank entnommen (*Entrez* database, NCBI, USA, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Zur Untersuchung der Aminosäure- (AS-) Sequenzen der verschiedenen vIL-10- und cIL-10-Proteine, wurden die NS-Sequenzen zunächst in die entsprechenden AS-Sequenzen translatiert. Die Translation und die vergleichenden Untersuchungen der IL-10-NS- und AS-Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm „MacVector“ (Accelrys, Cambridge, UK) durchgeführt. Um die Homologien der verwendeten IL-10-Sequenzen zu ermitteln und diese graphisch darzustellen, wurde mit Hilfe des Clustal W Algorithmus (Thompson et al., 1994) ein AS-Sequenzalignments erstellt. Das Programm ermöglichte weiterhin die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes aus den AS-Sequenzen der verschiedenen IL-10-Proteine (UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) Methode im "Best Tree" Modus).