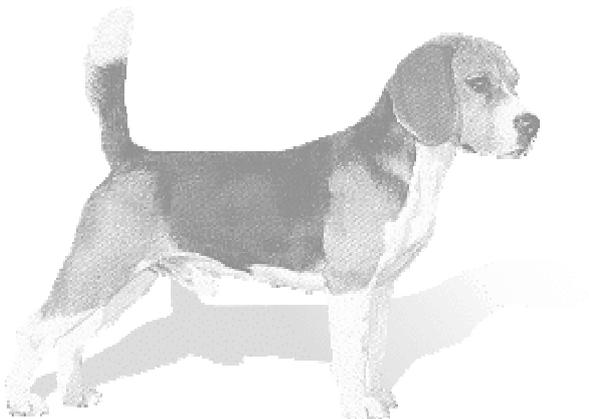


**Bestimmung der Interferon-gamma-Expression
bei Baypamune® behandelten Hunden
mittels „Real Time PCR“**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



SANDRA MANGOLD-GEHRING

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

und

der Abteilung Biologie/Forschung & Entwicklung der Bayer AG
Geschäftsbereich Tiergesundheit, Monheim
Betreuer: Prof. Dr. N. Schmeer

**Bestimmung der Interferon-gamma-Expression
bei Baypamune[®] behandelten Hunden
mittels „Real Time PCR“**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
SANDRA MANGOLD-GEHRING
Tierärztin aus Leverkusen

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. N. Schmeer

Tag der Disputation: 20.04.2005

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	1
I. Einleitung	5
II. Literaturübersicht	7
2.1 Immunmodulatoren	7
2.1.1 <i>Pockenviren als Immunmodulatoren</i>	11
2.1.2 <i>Baypamune[®]</i>	12
2.2 Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Immunmodulatoren im Hund	16
2.3 Untersuchung von Zytokinen	18
2.3.1 <i>In-vivo-Nachweis von Zytokinen im Blut</i>	19
2.4 “Real Time TaqMan[®]“-PCR	21
III. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 <i>Primer/Sonde</i>	25
3.1.2 <i>Immunmodulator/Kontrollsubstanz</i>	26
3.1.2.1 <i>Baypamune[®]</i>	26
3.1.2.2 <i>Kontrollsubstanz</i>	27
3.1.3 <i>Impfstoff</i>	27
3.1.4 <i>Versuchstiere</i>	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 <i>Klinische und diagnostische Methoden</i>	27
3.2.1.1 <i>Klinische Überwachung der Versuchstiere</i>	27
3.2.1.2 <i>Blutentnahme</i>	28
3.2.1.2.1 <i>RNA-Extraktion</i>	28
3.2.1.2.2 <i>Blutanalyse</i>	28

3.2.1.2.3	PBMC-Gewinnung	28
3.2.1.3	Blutanalyse im Hämatologiesystem Technicon H*1	28
3.2.2	<i>Zellkultur-Methoden</i>	29
3.2.2.1	Isolierung von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)	29
3.2.2.2	Ermittlung der Zellzahl	30
3.2.2.3	Weiterverarbeitung der PBMCs für die RNA-Extraktion	31
3.2.2.4	Stimulation der PBMCs	31
3.2.3	<i>Molekulargenetische Methoden</i>	32
3.2.3.1	Extraktion der RNA	32
3.2.3.1.1	RNA-Extraktion aus Hundevollblut	32
3.2.3.1.2	RNA-Extraktion aus PBMCs	32
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von RNA bzw. DNA	32
3.2.3.3	Reverse Transkription (RT)	33
3.2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.2.3.5	Agarosegelelektrophorese	35
3.2.3.5.1	Auftrennung von DNA-Fragmenten	35
3.2.3.5.2	Auftrennung von RNA-Fragmenten	35
3.2.3.6	Klonierung und Sequenzierung	35
3.2.3.6.1	Klonierung	35
3.2.3.6.2	Plasmidpräparation	36
3.2.3.6.3	Sequenzierung	36
3.2.3.7	“Real Time TaqMan [®] “-PCR	37
3.2.3.7.1	Bestimmung der relativen IFN γ -mRNA-Menge	38
3.2.4	<i>Tierversuchsdurchführung</i>	41
3.2.4.1	Experiment I: Subkutane Applikation von Baypamune [®]	41
3.2.4.2	Experiment II: Subkutane Applikation der 60fachen Baypamune [®] -Dosis	42
3.2.4.3	Experiment III: Intramuskuläre Applikation von Baypamune [®]	43
3.2.4.4	Experiment IV: Wiederholte Baypamune [®] -Applikation und Impfung	43
3.2.5	<i>Statistik</i>	45
3.2.5.1	Korrelations- und Regressionsanalyse	45
3.2.5.2	t-Test	45

IV. Ergebnisse	46
4.1 „Real Time TaqMan®“-PCR zum Nachweis caniner IFNγ-mRNA aus Hundeblood	46
4.1.1 <i>Optimierung der RNA-Extraktion aus Hundeblood</i>	46
4.1.1.1 Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese	46
4.1.2 <i>Auswahl eines geeigneten Primer-Sonden-Systems</i>	47
4.1.2.1 Sequenzvergleich zum Auffinden der Exon-Intron-Grenzen von <i>IFNγ</i>	47
4.1.2.2 Sequenzvergleich zum Auffinden der Exon-Intron-Grenzen von <i>GAPDH</i>	49
4.1.2.3 Spezifität der ausgewählten Primer	51
4.1.2.3.1 Prüfung mittels PCR und Agarosegelelektrophorese	51
4.1.2.3.2 Prüfung mittels Klonierung und Sequenzierung	53
4.1.2.4 Produktion ausreichender Mengen IFN γ -mRNA aus PBMCs mittels Concanavalin-A-Stimulation	53
4.1.2.5 Vergleich der Effizienzen von IFN γ -Systemen und Referenzreaktionen	54
4.1.2.5.1 Effizienzvergleich der IFN γ -Primer-Sonden-Systeme und 18S rRNA	55
4.1.2.5.2 Effizienzvergleich des ausgewählten IFN γ -Primer-Sonden-Systems und des GAPDH-Primer-Sonden-Systems	60
4.2 Untersuchung des IFNγ-mRNA-Gehalts in Blutlymphozyten von Hunden	61
4.2.1 <i>Validierung der quantitativen „TaqMan®“-PCR</i>	61
4.2.1.1 Bestimmung der „Intra-assay-Varianz“	61
4.2.1.2 Bestimmung der „Inter-assay-Varianz“	63
4.2.1.3 Vergleich der Basislevel des IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutlymphozyten aller Hunde	64
4.2.1.4 Ermittlung der Tagesschwankungen des IFN γ -mRNA-Gehalts in caninen Blutlymphozyten	65
4.2.2 <i>Untersuchung des IFNγ-mRNA-Gehalts nach Stimulation caniner PBMCs mit Baypamune®</i>	66

4.2.3	<i>Untersuchung des relativen IFNγ-mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach Baypamune[®]- Applikation</i>	68
4.2.3.1	Experiment I: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts nach subkutaner Applikation von Baypamune [®]	68
4.2.3.2	Experiment II: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach subkutaner Applikation der 60fachen Baypamune [®] -Dosis	70
4.2.3.3	Experiment III: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach intramuskulärer Applikation der zweifachen Baypamune [®] -Dosis	71
4.2.3.4	Experiment IV: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach wiederholter Baypamune [®] -Applikation und Impfung	72
4.2.3.4.1	Nachweis der absoluten Lymphozytenzahl nach zweimaliger Baypamune [®] -Applikation und Impfung	76
4.2.3.4.2	Mitogene Stimulierbarkeit der caninen Lymphozyten mit Phytohemagglutinin P	78
V.	Diskussion	82
VI.	Zusammenfassung	93
VII.	Summary	95
VIII.	Literaturverzeichnis	97
IX.	Anhang	112
8.1	Materialienlisten	112
8.1.1	<i>Geräte, Klinik- und Laborbedarf</i>	112
8.1.1.1	Geräte	112
8.1.1.2	Klinikbedarf	114
8.1.1.3	Laborbedarf	114
8.1.2	<i>Reagenzien</i>	116
8.1.3	<i>Kits</i>	118

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
$A_{260/230}$	Absorption bei 260, 230 nm
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
Appl.	Applikation
AST	Aspartat-Aminotransferase
b	Achsenabschnitt
BEI	binäres Ehylenimin
BHK-21	Hamsterembryozellen (<i>baby hamster kidney</i>)
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
bp	Basenpaare
BPN	Baypamune
°C	Grad Celsius
CD	Differenzierungseinheit (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	Kopie-DNA (copy DNA)
CHV-1	Canines Herpesvirus 1
CO ₂	Kohlendioxid
Con A	Concanavalin A
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
CPV	Canines Parvovirus
Ct	<i>threshold cycle</i> ; Zyklus, bei dem der Schwellenwert überschritten wird
D1701	veroadaptierter Parapox-ovis-Virusstamm D1701 (interne Abkürzung)
Δ Ct	delta Ct-Wert
$\Delta\Delta$ Ct	delta delta Ct-Wert
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dT	Desoxy-Thymidin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethayldiaminetetraessigsäure (<i>ethyl diamine tetra acetate</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
Fa.	Firma
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)

FAM	6-Carboxyfluorescein
FeLV	Felines Leukämievirus
FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
FRET	<i>Förster-type-energy-transfer</i>
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GKID ₅₀	Gewebekulturinfektiöse Dosis 50%
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
h	Stunde
HBBS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
Hd	Hund
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSV-1	<i>Herpes-Simplex-Virus 1</i>
I.E.	internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
L-MTP-PE	Liposom-encapsuliertes Muramyltripeptid- Phosphatidylethanolamine
LPS	Lipopolysaccharid
log	logarithmisch
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
m	Steigung
M	molar
mM	Millimolar

MDP	Muramyldiphosphat
MGB	Oligonukleotid, das in der kleinen Kurve der DNA bindet (<i>minor groove binder</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min.	minimal
max.	maximal
ml	Milliliter
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktie
MW	Mittelwert
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Zellen mit natürlicher Killeraktivität (<i>natural killer cells</i>)
nm	Nanometer
p	prozentuale Signifikanzgrenze
p.A.	für die Analyse (<i>pro analysis</i>)
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCV-2	Porcines Circovirus 2
Pfu	Pyrococcus furiosus
pmol	Picomol
PMWS	<i>post weaning multisystemic wasting syndrome</i>
PWDS	<i>post weaning diarrhoe syndrome</i>
Q	Quencher-Farbstoff
Q-PCR	Quantitative Polymearsekettenreaktion
R	Reporter-Farbstoff
R ²	Bestimmtheitsmass
rFeIFN- ω	rekombinantes felines Interferon-omega
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
Rnase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription (<i>reverse transcription</i>)
S	Sedimentationskoeffizient
s	Sekunde
s.c.	subkutan

SHA2PPi/LT	Schutzimpfung gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis (Adenovirus Typ 2), Parvovirose, Parainfluenza canis, Leptospirose und Tollwut
3TC	„Nucleosid Reverse Transkriptase Inhibitor“, antiretroviral
7TDI	murine Hybridoma-Zelllinie
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBIL	Gesamtbilirubin (<i>total bilirubin</i>)
TCID ₅₀	infektiöse Dosis, die zu einer 50%igen Infektion einer Gewebekultur führt (50% <i>tissue culture infectious dose</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
U	Unit, Enzymeinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
WEHI-164	murine Fibrosarkomzellen
WPS	<i>wasting pig syndrome</i>

I. Einleitung

Bei der wirksamen Komponente des Produkts Baypamune[®] handelt es sich um ein inaktiviertes Virus aus der Familie der Pockenviren: *Parapoxvirus ovis*, Stamm D1701. Aufgrund seiner immunstimulierenden Wirkung wird Baypamune[®] seit 1990 in der Tiermedizin zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten eingesetzt. Der Immunmodulator induziert einen unspezifischen Schutz gegenüber vielen Arten von Krankheitserregern. Dieser Schutz wird durch diverse Mechanismen des körpereigenen Abwehrsystems vermittelt.

Die Wirksamkeit von Baypamune[®] wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien bei Groß- und Kleintieren untersucht. Dabei bewährte sich bei Rindern, Schweinen und Pferden vor allem die prophylaktische Baypamune[®]-Applikation vor zu erwartenden Situationen erhöhter Infektanfälligkeit, z. B. beim Absetzen oder bei der Zusammenstellung von Tieren verschiedener Herkunftsbetriebe. Klinische Studien zur Therapie von Virusinfektionen der Katzen lieferten bisher kontroverse Ergebnisse (Hartmann *et al.*, 1998). Dagegen verhinderte die Applikation von Baypamune[®] als begleitende Therapie bei der Mammatumorbehandlung der Hündin eine Metastasen- und Rezidivbildung (Berg & Rüsse 1994; Lallo *et al.*, 2002). In Belastungsmodellen reduzierte die prophylaktische Injektion von Baypamune[®] die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Erregern, denen Mäuse *in vivo* ausgesetzt wurden. Der Wirkungsmechanismus in diesen Modellen wird unter anderem erklärt durch die Induktion von Zytokinen, ein Mechanismus der in verschiedenen Spezies bereits untersucht worden ist. Dabei wurde festgestellt, dass Baypamune[®] ein breites Spektrum von Zytokinen induziert. Auffällig war bei Maus, Mensch und Schwein eine erhöhte Konzentration von Interferon-gamma (IFN γ). Die entscheidende Rolle von IFN γ bei der Wirkung von Baypamune[®] wurde in einem Mausversuch von Weber *et al.* (1999, 2003) bestätigt. Dabei blockierte die Applikation eines monoklonalen Antikörpers gegen IFN γ im *Herpes-simplex-Virus* (HSV)-Belastungsmodell den Baypamune[®]-induzierten schützenden Effekt (Weber *et al.*, 1999, 2003).

Für die Zulassung des lyophilisierten Baypamune[®] beim Paul-Ehrlich-Institut sollte untersucht werden, ob auch im Hund der Wirkungsmechanismus durch die Induktion von IFN γ erklärt werden kann. Der Nachweis einer IFN γ -Induktion könnte neue

Indikationen für die Anwendung im Hund eröffnen und damit alternative Behandlungsmethoden gegen z.B. virale oder neoplastische Erkrankungen bieten. Das Ziel der Arbeit war der Nachweis einer möglichen IFN γ -Induktion durch die Applikation von Baypamune[®] *in vitro* und *in vivo*. Mit Hilfe einer quantitativen „TaqMan[®]“-PCR zum Nachweis von IFN γ -mRNA sollte der Verlauf der IFN γ -Expression in caninen PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) vor und nach Stimulation mit Baypamune[®] und der Verlauf der IFN γ -Expression im Blut von Hunden, denen Baypamune[®] appliziert wurde, untersucht werden.

II. Literaturübersicht

2.1 Immunmodulatoren

Der Begriff „Immunmodulation“ bezeichnet eine Veränderung der Immunantwort durch verschiedene Substanzen (Pschyrembel 1998). Durch Anwendung von Immunmodulatoren kann die Immunantwort im Sinne einer negativen Beeinflussung (Immunsuppression) oder positiven Beeinflussung (Immunstimulation) verändert werden (Mulcahy & Quinn, 1986).

Der Einsatz von Immunmodulatoren zur Immunsuppression wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Sowohl in der Transplantationsmedizin, als auch bei Autoimmunerkrankungen sollen unerwünschte Reaktionen des Immunsystems verhindert werden. Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der Ratten konnte gezeigt werden, dass es nach Verabreichung von CpG-Oligodesoxynukleotiden (vgl. Tabelle 1), als Adjuvants einer DNA-Vakzine, zur Unterdrückung klinischer Symptome durch die lokale Induktion von T_H1 -Zytokinen kam (Lobell *et al.*, 1999). Auch bei immunvermittelter hämolytischer (Miller 1997) und aplastischer Anämie (Young 2002) wurde der therapeutische Nutzen einer Immunsuppression im Hund bzw. Menschen untersucht. Eine allergenspezifische Immuntherapie diente bei allergischen Erkrankungen, wie der caninen atopischen Dermatitis, zur Unterdrückung krankheitsauslösender Immunreaktionen (Rees 2001; Zur 2002).

Durch Applikation von Immunmodulatoren wird auch versucht, die nichtantigenspezifische Immunantwort gegen tumoröse und infektiöse Erkrankungen zu verstärken (van Kampen 1997). Dazu werden in der Veterinärmedizin verschiedene Substanzen eingesetzt. Diese immunmodulierenden Substanzen werden entsprechend ihrer Herkunft klassifiziert (vgl. Tabelle 1). Dabei werden körpereigene und synthetische Immunmodulatoren sowie Substanzen pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Herkunft unterschieden (Mulcahy & Quinn 1986; Quinn 1990).

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über einige bekannte Immunmodulatoren.

Tabelle 1

Beispiele für Immunmodulatoren

Immunmodulatoren mikrobieller Herkunft	
<i>Avipox gallinarum</i> (Bsp.: Duphamun [®] , Duphapind [®])	Büttner et al., 1987
<i>Parapox ovis</i> (Bsp.: Baypamune [®])	Mayr et al., 1989
<i>Bovines Herpesvirus-1</i> (Bsp.: Bayferon [®])	Büttner et al., 1987
<i>Mycobacterium bovis</i> (Bsp.: BCG)	Mayr et al., 1986; Strey 1996
<i>Propionibacterium acnes</i> (Bsp.: Immuno – Regulin TM)	Quinn 1990
<i>Bordetella bronchisepticum</i>	Wieler et al., 1990
<i>Escherichia coli</i> Serotyp O101:K99	Wieler et al., 1990

Synthetische Immunmodulatoren		
Synthetische Polynukleotide	CpG-Oligodesoxynukleotide	Krieg 2002; Wernette <i>et al.</i> , 2002
	Polyinosinpolycytidylsäure	Mulcahy & Quinn 1986; Quinn 1990
	Polyribonukleotide	Mulcahy & Quinn 1986; Quinn 1990
Imidazole	Levamisol (Bsp.: Citarin [®])	Quinn 1990; Mayr <i>et al.</i> , 1986

Pflanzliche Immunmodulatoren	
<i>Aloe</i>	Strey 1996
<i>Aristolochia</i>	Strey 1996
<i>Arnika</i>	Strey 1996
<i>Baptisia</i>	Lange & Masihi 1991
<i>Echinacea</i> (Bsp.: Echinacin [®] , PlantaMun [®] , Viruvetsan [®])	Percival 2000; Kühn 2000

Zytokine	
Interleukin-1 (IL-1 α , IL-1 β)	Quinn 1990; Hadziyannis 2000
Interleukin-2	Quinn 1990; Maini <i>et al.</i> , 1997
Interleukin-12	Clinton <i>et al.</i> , 2000; ; Maini <i>et al.</i> , 1997
Interleukin-18	Golab 2000
Interferon α , β , γ ,	Quinn 1990; Mulcahy & Quinn 1986
Interferon ω (Bsp.: Virbagen [®] Omega)	de Mari <i>et al.</i> , 2003

Andere Immunmodulatoren tierischer Herkunft	
Milcheiweiß	Strey 1996
T-Activin (Polypeptid aus Kalbsthymus)	Lange & Masihi 1991

Bei den immunmodulierenden Substanzen mikrobieller Herkunft handelt es sich hauptsächlich um Bakterienlysate, inaktivierte Viren oder Bestandteile von Hefen (Büttner *et al.*, 1987; Mayr *et al.*, 1989; Wieler *et al.*, 1990; Quinn 1990; Strey 1996; Lange & Masihi 1991). Zu den synthetischen Immunmodulatoren gehören vor allem die CpG-Oligodesoxynukleotide, die zu einer Proliferation caniner und feliner Lymphozyten *in vitro* führen (Wernette *et al.*, 2002), aber auch andere synthetische Polynukleotide oder Imidazole (Mulcahy & Quinn 1986; Quinn 1990; Mayr *et al.*, 1986). So findet der Immunmodulator Imiquimod – ein Imidazoquinolinderivat – Anwendung bei der Behandlung von viralen Infektionen des Menschen mit z.B. dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Goldstein *et al.*, 1998), dem humanen Papillomvirus (HPV) oder *Herpes-simplex-Virus* (HSV), aber auch bei tumorösen Erkrankungen (Hengge *et al.*, 2001). Die Beeinflussung des Immunsystems mit Hilfe dieses Medikaments basiert auf der Induktion von Zytokinen wie $\text{IFN}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, IL-1 -Rezeptor Antagonist, IL-12 und $\text{IFN}\gamma$ (Hengge *et al.*, 2001). Die In-vivo-Induktion von $\text{IFN}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$ konnte in Mäusen, Ratten und Affen nachgewiesen werden (Tomai *et al.*, 1995).

Pflanzliche Extrakte aus Echinacea, Aloe oder Arnika werden zur Stärkung der unspezifischen Immunabwehr verabreicht, während Mistelpräparate häufig bei malignen Tumoren eingesetzt werden (Mansky 2002). Auch der direkte Einsatz von rekombinanten Zytokinen bietet eine Möglichkeit zur Immuntherapie, z.B. bei der Behandlung von Leishmaniose, tumorösen Erkrankungen, sowie mykobakteriellen Infektionen (Holland 2000). Häufig in diesem Zusammenhang eingesetzte Zytokine sind $\text{IFN}\gamma$ (Haas *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Lygidakis *et al.*, 1995; Sundar *et al.*, 1995), $\text{IFN}\alpha$ (Ferrantini & Belardelli 2000; Hadziyannis 2000), IL-2 und IL-12 (Maini *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass die Therapie Leishmaniose-infizierter Patienten mit IL-18 vor einer Reinfektion schützt (Ohkusu *et al.*, 2000). Bei chronischer Hepatitis C bewirkte die Applikation von $\text{IFN}\alpha$ eine Reduktion von HCV-RNA (Hadziyannis *et al.*, 2001). Auch bei der begleitenden Therapie neoplastischer Erkrankungen hat sich der Einsatz von Zytokinen bewährt (Ferrantini & Belardelli 2000; Clinton *et al.*, 2000). Verschiedene Studien konnten belegen, dass für die Behandlung der caninen Parvovirose rekombinantes felines $\text{IFN}\omega$ wirksam ist (Ishiwata *et al.*, 1998; Leopold-Temmler 2002; de Mari *et al.*, 2003). Um einen ausreichenden Wirkstoffspiegel am Zielort zu erreichen, müssen Zytokine jedoch,

aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit *in vivo*, in hohen Dosen eingesetzt werden. Die exogene Gabe führt zum Teil zu erheblichen Nebenwirkungen (Tagawa 2000). Neben Zytokinen werden deshalb auch zahlreiche körperfremde Substanzen, mit immunmodulierenden Eigenschaften, erforscht. Immunmodulatoren tierischen Ursprungs sind vor allem das Milcheiweiß (Strey 1996) und ein Polypeptid des Kalbsthymus (Lange & Masihi 1991).

Der prophylaktische und therapeutische Effekt einer Aktivierung der unspezifischen, initialen Immunantwort wurde bereits für unterschiedliche Indikationen untersucht. So dienten verschiedene Maus-Modelle der Untersuchung einer prophylaktischen Applikation von Immunmodulatoren bei anschließender Infektion. Die Stimulierung des Immunsystems verhinderte in diesen Modellen die Infektion mit Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* (Krieg *et al.*, 1998; Elkins *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1999) und parasitären Erregern wie *Plasmodien* (Gramzinski *et al.*, 2001) und *Leishmanien* (Zimmermann *et al.*, 1998).

In der Veterinärmedizin wurden klinische Studien zur prophylaktischen Anwendung von Immunmodulatoren erfolgreich durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass z.B. infektionsbedingte Jungtierverluste minimiert wurden (Kühn 2000; Kyriakis *et al.*, 1998; Mayr-Bibrack 1982). Die Ansteckungsgefahr durch verschiedene Infektionskrankheiten, die bei der Konzentration von Tieren aus verschiedenen Ställen („Crowding“, z.B. auf Auktionen oder Tunieren) besonders groß ist, konnte durch den prophylaktischen Einsatz von Immunmodulatoren reduziert werden (Castrucci *et al.*, 2000; Ziebell *et al.*, 1997a, 1997b).

2.1.1 Pockenviren als Immunmodulatoren

Infektionen mit Viren der Familie *Poxviridae* können den Verlauf von Begleitinfektionen positiv beeinflussen. So wurde seit Einführung der Pockenschutzimpfungen immer wieder festgestellt, dass chronische Erkrankungen nach einer Pockenschutzimpfung schneller abheilen bzw. komplikationsloser verlaufen (Mayr & Mayr 1995). Diese Beobachtung veranlasste A. Mayr zur Erforschung der immunmodulatorischen Wirkung von Pockenimpfstoffen (Mayr 2001). Dabei entdeckte er im Jahr 1956 das sogenannte „Ringzonen-Phänomen“ der Pockenvirus-infizierten Zellen (Mayr & Mayr 2002). Diese Entdeckung veranlasste zu weiteren Untersuchungen, mit denen bewiesen werden konnte, dass Pockenvirus-infizierte Zellen Interferon produzieren, das nicht infizierte Nachbarzellen vor einer Infektion schützt. Bei unterschiedlichen Tierspezies konnte gezeigt werden, dass Pockenviren Einfluss auf zelluläre Komponenten und vor allem auf die Induktion von Zytokinen haben (Glitz 2002). In verschiedenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Immunmodulatoren aus Pockenviren eine Lymphozytenproliferation, die Erhöhung der Phagozytoseaktivität, die Aktivierung von NK-Zellen und die Bildung und Freisetzung von Zytokinen bewirken, sowie die „Kolonie-stimulierende-Aktivität“ und die Freisetzung von TNF steigern (Büttner & Mayr 1986; Büttner 1993; Strube *et al.*, 1994; Mayr & Mayr 1995).

Die großen und sehr immunogenen Pockenviren erhalten ihre immunmodulatorischen Eigenschaften durch die Expression einer Vielzahl immunmodulatorisch wirksamer Proteine. Diese Faktoren ermöglichen es ihnen, sich trotz der Immunantwort im Organismus replizieren zu können. Bei den sezernierten Proteinen handelt es sich vor allem um Homologe von Zytokinen und Zytokinrezeptoren (Haig 1998). Die Zytokinrezeptoren können Chemokine, TNF α , IL-1 β , IFN γ , IFN α/β und GM-CSF binden und damit neutralisieren, während die Zytokinhomologa die Immunantwort in eine für das Virus förderliche Richtung lenken. Damit sind Pockenviren in der Lage, die Immunantwort des Wirtes effektiv zu inhibieren (Fachinger *et al.*, 2000; Turner & Moyer 2002). Werden die genannten Proteine nicht sezerniert, z.B. nach Inaktivierung der Pockenviren, kommt es neben der Viruselimination zu einem stimulierenden Effekt auf das Immunsystem des Wirtes (Nash *et al.*, 1999; Fachinger *et al.*, 2000). Mayr *et al.* (1978) zeigten, dass die

prophylaktische Applikation von inaktiviertem *Parapoxvirus ovis* die Mortalitätsrate von *Pseudomonas-aeruginosa*-infizierten Mäusen verringert.

In der Tiermedizin finden z.B. *Avipoxvirus gallinarum* (Duphamun[®]; Duphapind[®]) und *Parapoxvirus ovis* (Baypamune[®]) nach Inaktivierung als Immunmodulatoren Verwendung. Die Inaktivierung der Virusstämme führt zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit, wovon der immunmodulatorische Effekt der Pockenviren nicht negativ beeinflusst wird (Mayr *et al.*, 1989; Mayr *et al.*, 1997).

2.1.2 Baypamune[®]

Hauptbestandteil des Immunmodulators ist der stark attenuierte *Parapoxvirus-ovis*-Stamm D1701. Für die Produktion wird der Virusstamm auf Rindernierenzellen vermehrt und nach Lyse der Zellen geerntet. Durch Partikelfiltration werden die Zellreste abgetrennt und anschließend die löslichen Bestandteile durch Mikrofiltration entfernt. Nach Bestimmung des Titers der Virussuspension werden die Viren mittels BEI (binärem Ehylenimin) chemisch inaktiviert. Schließlich wird das *Parapoxvirus ovis* D1701 mit Medium auf ein Titeräquivalent von mindestens $10^{6,75}$ TCID/ml eingestellt, mit dem Stabilisator Polygeline versetzt und lyophilisiert.

Das Produkt Baypamune[®] wird in der Tiermedizin zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten bei Groß- und Kleintieren eingesetzt. In verschiedenen klinischen Studien konnte die Wirksamkeit des Immunmodulators bereits gezeigt werden. So wurde bei Rindern die Baypamune[®]-Applikation zur Prophylaxe der Infektion mit bovinem Herpesvirus 1 (BHV-1) in placebokontrollierten Studien untersucht und dabei eine Reduktion der klinischen Symptomatik erreicht (Strube *et al.*, 1989; Castrucci *et al.*, 1996, 1998, 2000). Das häufige Auftreten von Infektionen mit BHV-1 bei Kälbern, gefördert durch Transport und „Crowding“, konnte ebenfalls durch die prophylaktische Behandlung mit Baypamune[®] verringert (Frerking *et al.*, 1995) und die Anzahl der notwendigen Antibiotikabehandlungen um die Hälfte reduziert werden (Ziebell *et al.*, 1997a; Metzner *et al.*, 1999).

Auch bei jungen Pferden, die einem hohen Infektionsdruck durch „Crowding“ ausgesetzt wurden, konnte die prophylaktische Baypamune[®]-Behandlung klinische Symptome einer respiratorischen Infektion signifikant gegenüber einer Kontrollgruppe reduzieren (Ziebell *et al.*, 1997b). Der bei Pferden im Zusammenhang

mit Stress durch Transport oder Absetzen auftretende erhöhte Plasmakortisolgehalt wurde durch die immunmodulatorische Prophylaxe vermindert (Mayr & Siebert 1990; Lindner *et al.*, 1993).

Bei Schweinen fand Baypamune[®] präventive Anwendung gegen das Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom (MMA-Syndrom) und gegen die Aujeszky'sche Krankheit. Zudem steigert die Applikation des Immunmodulators die Reproduktion (Mayr 1986, Hammerl *et al.*, 1995, Kyriakis *et al.*, 1996). Die prophylaktische Baypamune[®]-Applikation zur Bekämpfung des „Post Weaning Diarrhoe Syndrome“ (PWDS) und „Wasting Pig Syndrome“ (WPS) der Ferkel nach dem frühen Absetzen senkte die Durchfallhäufigkeit und Mortalität und erhöhte die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme (Kyriakis *et al.*, 1998). Bei der immunmodulatorischen Behandlung von natürlich mit Porcinem-Circovirus-Typ 2 (PCV-2)-infizierten Ferkeln in einem Betrieb mit „Post-weaning multisystemic wasting syndrome“ (PMWS)-Ausbruch kam es zur Verstärkung der klinischen Symptomatik (Kyriakis *et al.*, 2002).

Untersuchungen über die Wirksamkeit von Baypamune[®] bei Infektionskrankheiten der Katze lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Die Applikation des Immunmodulators zur Therapie mit Felinem-Leukämie-Virus (FeLV)-infizierter Katzen führte nach Hörber & Mayr zur Heilung von 80-100% der untersuchten Tiere (Hörber *et al.*, 1992; Mayr & Hörber 1992). Andere Studien konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen Baypamune[®] und Placebo ermitteln und widerlegen dieses Ergebnis (Hartmann *et al.*, 1998; Block *et al.*, 1997). Auch Feldversuche zur Bekämpfung des Katzenschnupfens durch Applikation des Immunmodulators zeigten keinen Einfluss auf serologische und klinische Parameter (Klimentkowski *et al.*, 1992).

In ersten Untersuchungen zur Behandlung FIP (Feline Infektiöse Peritonitis)-verdächtiger Katzen verlängerte die therapeutische Baypamune[®]-Behandlung die Überlebenszeit der Tiere (Bölcskei & Bilkei 1995). Ebenso erwies sich Baypamune[®] wirksam bei lokaler Applikation zur Bekämpfung der chronischen Stomatitis (Mayr *et al.*, 1991).

Bei Hunden zeigte Baypamune[®] eine antikancerogene Aktivität, indem es bei der Mammatumorthherapie der Hündin das Wachstum des eigentlichen Tumors und zum Teil auch das vorhandener Lungenmetastasen verminderte (Berg & Rüsse 1994). Als

unterstützendes Therapeutikum bei operativen Maßnahmen senkte das Präparat die Rezidivrate und verringerte die Metastasenbildung. Gleichzeitig kam es zu einer deutlichen Revitalisierung der Tiere (Berg & Rüsse 1994).

Auch in verschiedenen Tiermodellen wurde die Wirksamkeit von Baypamune® untersucht. Die prophylaktische Applikation erzielte einen erhöhten Schutz gegenüber verschiedenen Erregern, denen Mäuse in In-vivo-Belastungsmodellen ausgesetzt wurden, z.B. bei viralen Infektionen mit dem Aujeszky-Virus (Büttner & Mayr 1986; Mayr *et al.*, 1986; Mayr & Mayr 1995), dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (Büttner & Mayr 1986; Mayr *et al.*, 1986; Mayr & Mayr 1995), dem HSV-1 (Weber *et al.*, 2003) und bakteriellen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (Mayr *et al.*, 1978; Wieler *et al.*, 1990), *Escherichia coli* (Hammerl *et al.*, 1995; Kyriakis *et al.*, 1996, 1998) und *Pasteurella multocida* (Kyriakis *et al.*, 1998).

In einem transgenen Hepatitis B Virus (HBV) Maus-Modell wurde die Baypamune® - Behandlung mit der Verabreichung von 3TC verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Therapie mit dem Immunmodulator die Virämie in HBV-transgenen Mäusen stärker gesenkt wird als durch die Therapie mit 3TC (Weber *et al.*, 1999; 2003).

Auch gegen Leberfibrose erwies sich Baypamune® in Ratten-Modellen als wirksam. In diesen Modellen wurde entweder durch orale Applikation von Tetrachlorkohlenstoff oder durch i.p.-Applikation von heterologem Schweineserum über einen Zeitraum von sieben Wochen eine Leberfibrose in Ratten induziert. Die gleichzeitige Verabreichung von Baypamune® verminderte in beiden Modellen signifikant das Ausmaß der fibrotischen Degeneration. Untersuchungen ergaben eine Reduktion des Kollagengehalts und eine Normalisierung des Gehalts an ALT, AP, AST, GGT, GLDH und TBIL im Serum (Hirth-Dietrich *et al.*, 2000).

Wirkungsmechanismus

Die experimentellen Ergebnisse der Untersuchungen im Tier zeigen das breite Wirkungsspektrum des Immunmodulators Baypamune®. Mit Hilfe verschiedener In-vitro- und Ex-vivo-Modellsysteme wurde deshalb versucht, den molekularen Wirkungsmechanismus aufzuklären. Zur Messung der Aktivierung und Proliferation

von Immunzellen wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse bei den meisten Spezies gleich waren.

So wurde in Mäusen nach intraperitonealer Applikation von Baypamune® eine Erhöhung der NK-Zellaktivität, der Lymphozytenproliferation, der Phagozytoserate und des Gehalts an IFN α in Serum oder Peritonealspülproben gemessen. Die im Plaque-Reduktions-Test entdeckte antivirale Wirksamkeit war auf einen erhöhten Interferongehalt in den Serum- oder Peritonealspülproben der Tiere zurückzuführen (Mayr *et al.*, 1986; 1997; Strube *et al.*, 1989). Unter Zuhilfenahme monoklonaler Antikörper ließ sich das Interferon als IFN α charakterisieren (Mayr *et al.*, 1997).

In-vitro-Stimulationen von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten von Rind, Schwein, Pferd und Hund mit dem Immunmodulator führten zu einer erhöhten Phagozytoserate (Mayr *et al.*, 1997). Für die vermehrte Phagozytose fanden Fachinger *et al.* bei der In-vitro-Untersuchung porciner Blutproben allerdings keine Belege. Hier führte die Baypamune®-Behandlung zu einer Proliferation von T-Helferzellen und zu einer Induktion der Zytokine IL-2, IFN α und IFN γ (Fachinger *et al.*, 2000; Fachinger 2000). Eine Baypamune®-induzierte Produktion von IFN γ konnte auch nach Stimulation humaner PBMCs gemessen werden (Prof. Dr. Dr. Volk, Charité, Berlin, persönliche Mitteilung).

Weber, Siegling und Schlapp untersuchten die In-vivo-induzierte Zytokin-Expression in Mäusen. Für dieses Experiment wurde Mäusen intraperitoneal Baypamune® appliziert und nach 6, 12 und 24 Stunden Peritonealzellen, Milz und Lymphknoten entnommen. Mit Hilfe kompetitiver PCR wurde die Expression verschiedener Zytokine (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ und TNF α) ermittelt. Bereits 6 bis 12 Stunden nach Baypamune®-Applikation konnte die Expression der Zytokine IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ und TNF α nachgewiesen werden und nach 24 Stunden wurden IFN γ - und IL-18, ein IFN γ -induzierendes Zytokin, noch vermehrt exprimiert. Dieses Ergebnis deutet auf eine Lenkung der adaptiven Immunantwort in Richtung T_H1-Immunantwort hin (Weber *et al.*, 1999, 2003), da IL-2 und IFN γ diese Immunantwort und damit eine zelluläre Immunantwort fördern (Janeway & Travers 1997; Mayr *et al.*, 1997).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aller Untersuchungen zur Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus von Baypamune® verdeutlicht, dass die Aktivierung von Zytokinen von großer Bedeutung ist. Dabei spielt neben IFN α für die

antivirale Aktivität des Immunmodulators IFN γ eine wichtige Rolle. Dies konnte Weber *et al.* in einem weiteren In-vivo-Maus-Modell bestätigen. Durch Applikation eines monoklonalen Antikörpers gegen IFN γ im HSV-Belastungsmodell kam es zu einer Aufhebung des Baypamune[®]-induzierten schützenden Effekts (Weber *et al.*, 2003). Die Förderung der selektiven Aktivierung von T_H1-Zellen führt zu einer zellvermittelten Immunität, die *in vivo* die Elimination von Viren und intrazellulären Erregern, wie z. B. bei der in Human- und Veterinärmedizin vorkommenden Leishmaniose, ermöglicht (Weber *et al.*, 1999).

2.2 Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Immunmodulatoren im Hund

Im Rahmen der Forschung über die therapeutische Rolle von Immunmodulatoren im Hund konnte vor allem bei der Behandlung von Tumorerkrankungen der große Nutzen der Immuntherapie gezeigt werden. Dabei hatte die Kombination von Chemotherapie und Immuntherapie eine größere Wirkung auf die Tumoreradikation als die ausschließliche Behandlung mit Chemotherapeutika (Kurzman *et al.*, 1999). Neben den positiven Ergebnissen bei der Mammatumorbildung der Hündin mit Baypamune[®] (Berg & Rüsse 1994; Lallo *et al.*, 2002), zeigte auch aus der Bakterienwand von Mycobakterien extrahiertes Muramylpeptid eine antikancerogene Wirkung. Bei der Therapie von Hämangiosarkomen der Milz, Osteosarkomen der Gliedmaßen und oralen Melanomen verlängerte die Injektion eines Muramyltripeptid-Phosphatidylethanolamins (L-MTP-PE), im Vergleich zur Injektion eines Placebos, in Kombination mit Chemotherapie und operativen Maßnahmen die Überlebenszeit der erkrankten Hunde (MacEwen *et al.*, 1989, 1994, 1996, 1999; Vail *et al.*, 1995). Dabei wurde eine antimetastatische Aktivität von L-MTP-PE ermittelt (Kurzman *et al.*, 1995; Mac Ewen *et al.*, 1994). Die Untersuchungen des Wirkungsmechanismus ergaben eine Induktion der Zytokine TNF α und IL-6 *in vivo* und *in vitro* (Kurzman *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1995).

Immunmodulatorische Eigenschaften wurden auch dem Anthelmintikum Levamisol zugesprochen. Die adjuvante Therapie bei caninen Mammatumoren oder Lymphosarkomen zeigte allerdings keine Wirkung auf Überlebenszeit oder Tumoreradikation (MacEwen *et al.*, 1985a, 1985b).

Auch bei der Behandlung von Hunden mit chronischer Pyodermie konnte die gute Wirksamkeit der Immuntherapie nachgewiesen werden. Dabei kam es nach

Applikation von inaktiviertem *Propionibacterium acnes* und antibiotischer Therapie bei 80 % der Tiere zu einer kompletten Abheilung oder signifikanten Verbesserung des klinischen Bildes im Vergleich zu Tieren mit ausschließlicher Antibiotika-Applikation (Becker *et al.*, 1989; van Kampen 1997). Bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Injektion des Immunmodulators eine schnelle Aktivierung von Makrophagen bewirkt, die in einer Produktion eines breiten Spektrums an Zytokinen resultiert (van Kampen 1997).

In verschiedenen Experimenten wurde auch die direkte Anwendung von einzelnen Zytokinen zur Therapie infektiöser und tumoröser Erkrankungen untersucht. Neueste Untersuchungen bescheinigten rekombinantem feline IFN ω (rFeIFN- ω) einen signifikanten therapeutischen Effekt bei der Behandlung von mit dem Caninen Parvovirus (CPV) infizierten Hunden (Leopold-Temmler 2002). Bei Untersuchungen an natürlich und experimentell infizierten Hunden reduzierte die Applikation des Interferons die Mortalitätsrate und milderte die klinische Symptomatik der parvoviralen Enteritis (De Mari *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2002; Ishiwata *et al.*, 1998). In In-vitro-Experimenten wurde die grundsätzliche Wirkung von rekombinantem IFN ω gegen ein breites Spektrum von RNA- und DNA-Viren von Hund und Katze nachgewiesen (Truyen *et al.*, 2002).

Im Rahmen der Zytokinforschung beim Hund fanden außerdem das Zytokin IFN γ und die IFN γ -induzierenden Zytokine IL-12 (Büttner *et al.*, 1998) und IL-18 (Argyle *et al.*, 1999) Beachtung. Untersuchungen *in vitro* ermittelten den antitumoralen Effekt von IL-12 und IL-18 (Okano *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1999; Okano & Yamada 1997). Die Behandlung einer caninen Mammatumorzelllinie mit rekombinantem caninem IL-18 induzierte eine Apoptose der Zellen (Okano & Yamada 1997), während die Behandlung mit caninem IFN γ bei einer caninen Melanomzelllinie die Expression von MHC Antigenen steigerte (Whitley *et al.*, 1995). Dies spricht für einen potentiellen Nutzen der IFN γ -Therapie bei der Tumorzellerkennung und Abwehr durch das Immunsystem (Whitley *et al.*, 1995) und damit für einen Einsatz dieses Interferons in der Kleintieronkologie (Leopold-Temmler 2002). Die Messung der reduzierten IFN γ -mRNA-Menge in PBMCs von Hunden mit atopischer Dermatitis zeigt, dass auch bei dieser Erkrankung die Applikation von IFN γ als Therapie angewendet werden könnte (Hayahiya *et al.*, 2002).

In verschiedenen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass IFN γ eine bedeutende Rolle bei der Infektion mit Leishmanien spielt. Es wurde nachgewiesen, dass PBMCs von Leishmaniose-infizierten Hunden ohne klinische Symptomatik nach spezifischer Stimulation mit Parasiten-Antigen IFN γ produzierten. Im Gegensatz dazu, konnte nach spezifischer Stimulation von PBMCs erkrankter Tiere keine vermehrte IFN γ -Produktion ermittelt werden (Strauss-Ayali & Baneth 2000). Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Selbstheilung einer *Leishmania-major*-Infektion in Mäusen durch TH1-Zellen vermittelt wird und neben TNF α , IL-2, IL-3, IL-12 und IgG2 durch die Produktion von IFN γ charakterisiert ist (Strauss-Ayali & Baneth 2000).

So führte die Aktivierung caniner Makrophagen mit IFN γ zu einer erhöhten Stickstoffoxid-Produktion, die verantwortlich ist für die Elimination intrazellulärer Parasiten (Pinelli *et al.*, 1999a, 1999b, 2000). Jedoch konnte in Knochenmarkbiopaten *Leishmania-chagasi*-infizierter Hunde ein Anstieg der IFN γ -Produktion gleichermaßen bei asymptomatischer und symptomatischer Infektion festgestellt werden (Quinnell *et al.*, 2001).

2.3 Untersuchung von Zytokinen

In der Human- und der Veterinärmedizin wurden in den letzten Jahren bereits viele Zytokine in Körperflüssigkeiten und Organgeweben untersucht. Die Gründe für dieses Interesse liegen in der Beteiligung von Zytokinen an vielen pathophysiologischen Prozessen und dem schnellen und bedeutenden Anstieg der Zytokinkonzentrationen bei verschiedenen Infektionskrankheiten (Bienvenu *et al.*, 1998).

Während der Nachweis von Zytokinen des Menschen und der Maus durch etablierte Systeme keine Schwierigkeit mehr darstellt, sind der Untersuchung von Zytokinen in der Veterinärimmunologie Grenzen gesetzt (Jungi 1999). Aufgrund der Spezies-spezifischen Besonderheiten der Zytokinfunktionen lassen sich Untersuchungsergebnisse an Mäusen nicht unbedenklich auf Haustierspezies übertragen (Jungi 1999). Durch die Entwicklung einer Vielzahl von Reagenzien und Techniken und aufgrund der konservierten Natur genetischer Information ist es jedoch möglich, auf zellulärer und molekularer Ebene viele Zytokine verschiedener

Spezies zu untersuchen. So wurde beispielsweise unter Zuhilfenahme übereinstimmender Nukleinsäuresequenzen von Mensch und Maus Oligonukleotidprimer für die Bestimmung von feliner Zytokin-mRNA durch RT-PCR (Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion) hergestellt (Rottman *et al.*, 1996). Diese Technik, mit der geringe Mengen zirkulierender mRNA entdeckt werden können, nutzten Wissenschaftler zur Untersuchung von Zytokinen bei Nutztieren, wie Schaf (Anderson *et al.*, 2001) und Rind (Collins *et al.*, 1999; Waldvogel *et al.*, 2000; Leutenegger *et al.*, 2000) und Haustieren, wie Hund (Gröne *et al.*, 1999; Aihara *et al.*, 2000; Chamizo *et al.*, 2001) und Katze (Leutenegger *et al.*, 1999, 2001; Kipar *et al.*, 2001).

Die Zytokinforschung beim Hund dient beispielsweise zur Aufklärung von Immunitätsmechanismen:

- bei viralen und bakteriellen Erkrankungen wie Staupe (Gröne *et al.*, 1998, 2000, 2002; Markus *et al.*, 2002) und Borreliose (Straubinger *et al.*, 1998)
- bei parasitären Infektionen wie Leishmaniose (Chamizo *et al.*, 2001; Pinelli *et al.*, 1999a, 1999b; Quinnell *et al.*, 2001) und Demodikose (Tani *et al.*, 2002)
- bei immunvermittelten Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis (Olivry *et al.*, 1999; Nuttall *et al.*, 2002, Hayahiya *et al.*, 2002)

Weitere Schwerpunkte der Erforschung caniner Zytokine bilden Tumorerkrankungen (Whitley *et al.*, 1995; Okano & Yamada 1997, 2000; Helfand *et al.*, 1999) und Transplantationsmodelle (Fuller *et al.*, 1994; Serrick *et al.*, 1995). Da einige Erkrankungen (z.B. Leishmaniose) sowohl bei Hunden als auch bei Menschen vorkommen, führen veterinärmedizinische klinische Studien auf diesen Gebieten auch zu Erkenntnissen über neue Behandlungsmethoden in der Humanmedizin (Chamizo *et al.*, 2001).

2.3.1 In-vivo-Nachweis von Zytokinen im Blut

Aufgrund geringer Konzentrationen zirkulierender Zytokine, löslicher Zytokin- oder Rezeptorantagonisten und dem Vorkommen biologisch aktiver und inaktiver Formen ist die Untersuchung des Zytokinexpressionsmusters im Blut sehr schwierig. Vor

allem der Nachweis von Veränderungen der Zytokinkonzentration im Blut eines Individuums benötigt sensitive Detektionsmethoden. Auf Proteinebene konnten Kurzman *et al.* (1993) und Shi *et al.* (1995) eine Zunahme der Aktivität von TNF α und IL-6 in Hundeblood mittels eines WEHI-164 Zellzytotoxizitäts-Assays ermitteln. Nach intravenöser Injektion eines in Liposom verkapselten Muramylpeptids (L-MTP-PE) stieg die TNF α -Aktivität in den Serumproben 2 – 3 Stunden nach Injektion an, um schließlich nach 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückzufallen (Kurzman *et al.*, 1993). Die In-vivo-Applikation des Muramylpeptids steigerte außerdem die Aktivität von IL-6 3 – 4 Stunden nach Injektion in einem 7TDI Bioassay (Shi *et al.*, 1995).

Eine sehr sensitive Technik für den Nachweis von Zytokinen ist die Detektion ihrer mRNA, die durch Reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben wird, um anschließend mittels PCR vervielfältigt zu werden (Chamizo *et al.*, 2001). Die RT-PCR ermöglicht neben der Detektion von mRNA auch deren relative oder absolute Quantifizierung (Bustin 2000, Freeman *et al.*, 1999). Bei der relativen Quantifizierung wird die unbekannte Menge der Zielsequenz auf die Menge einer zweiten, nicht verwandten Sequenz (interne Kontrolle) bezogen und abgeschätzt. Als Standards dienen sogenannte Housekeeping Gene wie die für 18S rRNA oder GAPDH.

Die absolute Quantifizierung benutzt als Standard eine DNA mit der gleichen Sequenz wie die zu quantifizierende Zielsequenz. Damit kann dem gemessenen Signal eine bestimmte Startkopienzahl oder Konzentration zugeordnet werden.

Herkömmliche PCR-Methoden (wie z.B. die kompetitive PCR) beruhen auf der Bestimmung des PCR-Endprodukts und stellen nur eine Näherung an den tatsächlichen Reaktionsverlauf dar. Mit Hilfe der "Real Time"-PCR-Systeme ist dagegen die kontinuierliche Erfassung eines PCR-Laufs möglich, womit ein detaillierter Einblick in die Effizienz der ablaufenden Reaktion gegeben wird. Dies ermöglicht eine genaue Quantifizierung des eingesetzten Startmaterials.

Mit Hilfe dieser Methode konnten beim Menschen bereits Konzentrationsunterschiede von Zytokin-mRNAs im peripheren Blut gemessen werden. So zeigten Härtel *et al.* (2001), dass unterschiedliche Blutentnahmetechniken die Zytokin-Expression beeinflussen. Die fünffache Beschleunigung des Blutflusses bei der Entnahme in ein Sammelgefäß gegenüber der moderaten Blutentnahme führte zu einer signifikanten Zunahme der IL-2-, IL-4- und TNF α -mRNA-Menge, während die Veränderung des IFN γ -mRNA-Gehalts nicht

signifikant war. Stordeur et al. (2003) injizierte fünf Probanden Lipopolysaccharid (LPS), um anschließend die mRNA-Menge von IL-1 β und IL1-RA im Blut mittels „Real Time“-PCR zu bestimmen. Dabei konnte bei den einzelnen Probanden bereits nach 30 Minuten bis 6 Stunden nach Injektion eine bis zu 47fache bzw. 22fache Zunahme der Kopienzahl nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung des Zytokin-Expressionmusters in Hunden wurden bisher nur in PBMCs unterschiedliche Konzentrationen von Zytokin-mRNAs gemessen. Dabei zeigten Hayashiya et al. (2002) und Tani et al. (2002) mittels semi-quantitativer RT-PCR und anschließender Densitometrie, dass der Gehalt an IFN γ -mRNA relativ zur GAPDH-mRNA-Konzentration in PBMCs von Hunden mit atopischer Dermatitis oder Demodikose signifikant geringer war als in den gesunden Tieren der Kontrollgruppe. Auch Fujiwara et al. (2003) konnten mit Hilfe der „Real Time“-PCR unterschiedliche Mengen an IL-8-, TNF α - und IFN γ -mRNA in PBMCs von Hunden, denen ein Zedernpollenantigen injiziert wurde, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachweisen.

2.4 „Real Time TaqMan[®]“-PCR

Mit Hilfe der „Real Time TaqMan[®]“-PCR kann die Ausgangsmenge der mRNA- bzw. cDNA-Kopien während eines PCR-Laufs bestimmt werden (vgl. Heid *et al.*, 1996). Die „Real Time“-Systeme beruhen auf der Detektion und Quantifizierung mittels eines fluoreszierenden Reporters, dessen Signal exponentiell mit der Menge an PCR-Produkt während der Amplifikation ansteigt. Die Entwicklung der „Real Time“-PCR begann mit dem Zusatz des Interkalators Ethidiumbromid, der an zunehmende Mengen doppelsträngige DNA bindet. Dies zeigt sich in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals (Higuchi *et al.*, 1992). Diese Methode findet heute noch Verwendung mit dem Farbstoff SYBR[®] Green (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt). Eine Verbesserung geschah durch die Einführung von fluoreszierenden genspezifischen Sonden (Provenzano *et al.*, 2001).

In einer „Real Time“-PCR werden – wie bei einer konventionellen PCR-Reaktion – genspezifische Primer, die an die cDNA binden, eingesetzt. Zusätzlich hybridisiert zwischen den beiden Primern ein fluoreszierendes genspezifisches Oligonukleotid (Sonde oder Probe) an die cDNA. Diese Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff – z.B. FAM (Fluoreszein-Derivat) – und am 3'-Ende

mit einem Quencher-Farbstoff – z.B. TAMRA (Rhodamin-Derivat) – markiert, der bei intaktem Zustand der Sonde die Fluoreszenz des Reporters durch FRET (Förster-type energy transfer) unterdrückt (vgl. Abb.1).

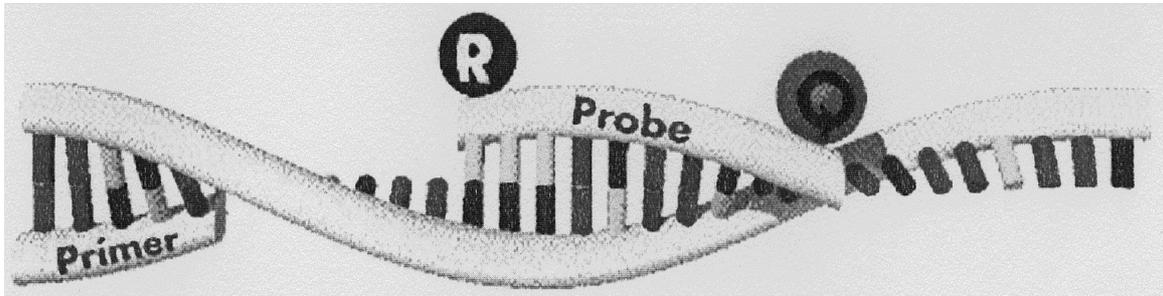


Abb.1: Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer

Quelle: Applied Biosystems

Im Verlauf der PCR-Reaktion hybridisieren Primer und Sonde an den DNA-Matrizenstrang. In der Extensionsphase wird der Primer am 3'-Ende von der im Reaktionsgemisch enthaltenen Taq-Polymerase verlängert, trifft auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Durch die entstehende DNA-Gabelung wird die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde in Nukleotide gespalten (Lyamichev *et al.*, 1993).

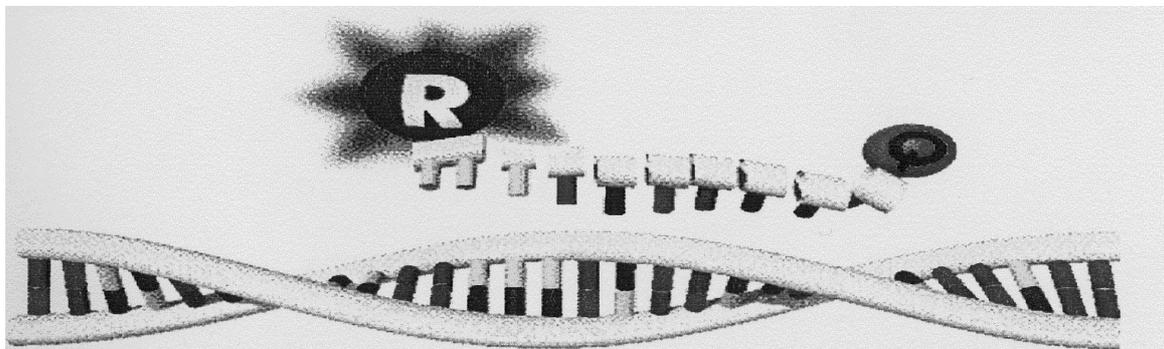


Abb.2: Fluoreszenzemission des Reportermoleküls

Quelle: Applied Biosystems

Durch diese Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Sonde zur Fluoreszenz angeregt (vgl. Abb 2). Da die Amplifikatmenge mit jedem PCR-Zyklus zunimmt, steigt auch die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus an (Giulietti *et al.*, 2001). Diese ansteigende Fluoreszenzemission wird durch einen Sequenzdetektor „real time“, d.h. während des PCR-Laufs gemessen. Dabei ist das Fluoreszenzsignal strikt sequenzspezifisch, da nicht korrekt bindende Sondenmoleküle verdrängt werden noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird.

Im Verlauf einer effektiven PCR wird die Menge des Startmaterials mit jedem Zyklus verdoppelt, was sich bei der „Real Time“-PCR in einem exponentiellen Verlauf des Fluoreszenzsignals darstellt. Bei höheren Zyklenzahlen ist allerdings die Menge an Primern und aktivem Enzym limitierend, so dass die Reaktion in eine Plateauphase übergeht (Abb. 3).

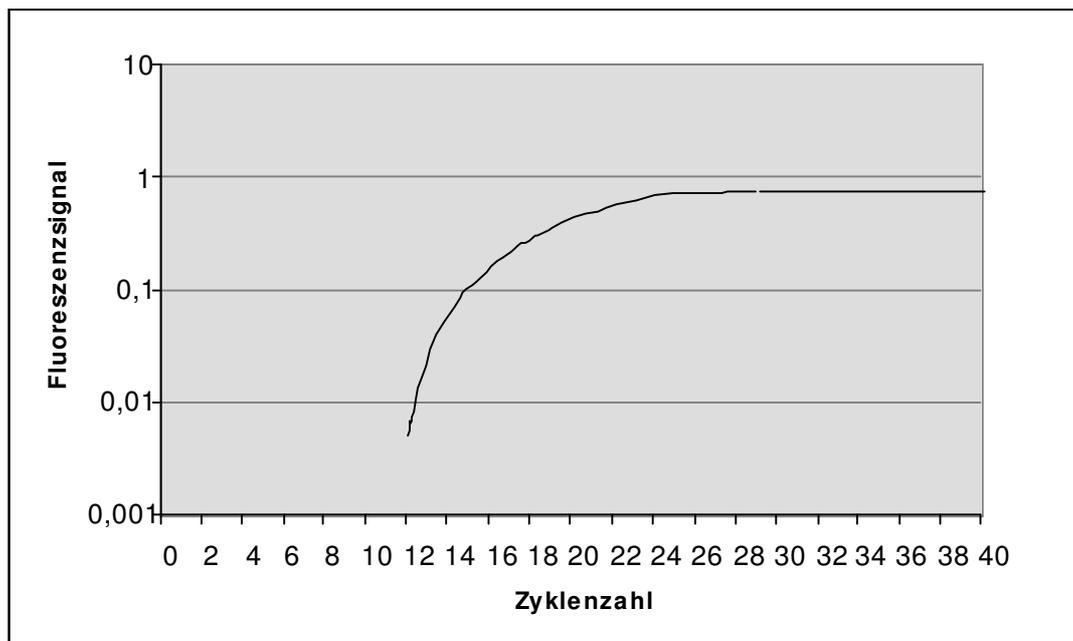


Abb.3: Mit zunehmender Zyklenzahl wächst das Fluoreszenzsignal

Die Auswertung eines PCR-Laufs in der exponentiellen Vermehrungsphase ermöglicht die Berechnung der eingesetzten DNA-Menge (vgl. Kapitel 3.2.3.7.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden MGB[®] (minor-groove-binder)-Sonden verwendet. Diese Oligonukleotide sind am 3'-Ende mit einer MGB-Gruppe (z.B. Dihydrocyclopyrroloindol Tripeptid = DPI3) konjugiert, die es ihnen ermöglicht sehr stabile Verbindungen mit Einzelstrang-DNAs einzugehen. Dabei binden konjugierte MGB in die kleine Furche, die durch Hybridisierung der terminalen fünf bis sechs Basenpaare der Sonde mit der Matrizen-DNA entsteht. Dies hat eine große Bindungsaffinität zur Folge und erlaubt durch Senkung der Schmelztemperatur den Gebrauch kürzerer Sonden (Kutyavin *et al.*, 2000; Afonina *et al.*, 1997). Da sich dadurch der Abstand zwischen Reporter und Quencher zu Beginn der Reaktion verkürzt, wird der Energietransfer zwischen den beiden Farbstoffen verstärkt und damit das „Hintergrundrauschen“ des emittierenden Reporterfarbstoffes verringert. Zudem besitzen die verwendeten MGB[®]-Sonden einen nicht-fluoreszierenden

Quencherfarbstoff (z.B. Dabcyl, Methylorange) anstelle von TAMRA. Dieser sogenannte „Dark Quencher“ interferiert nicht mit der Messung und ermöglicht eine noch präzisere Messung durch das real-time Detektionssystem.

Die Quantifizierung von Zytokin-mRNA im Blut mittels „Real Time TaqMan[®]“-PCR wurde bereits bei Mensch (Kruse et al., 1997), Maus (Wang et al., 1998), Rind (Waldvogel et al., 2000) und Katze (Leutenegger et al., 1999, Kipar et al., 2001) durchgeführt.

III. Material und Methoden

3.1 Material

Geräte- und Materialienliste im Anhang

3.1.1 Primer/Sonde

Geeignete Primer- und Sondensequenzen für die „TaqMan[®]“-PCR wurden mit Hilfe der Primer Express Software von der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, ausgewählt und über gleiche Firma bezogen.

Alle Primer wurden als entsalzte Lyophilisate bezogen. Die „Minor groove Binder“- (MGB[®]-) Sonden sind HPLC-gereinigt und am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporterfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) markiert.

Amplifikation von caniner IFN γ -mRNA

IFN γ -Primer-Sonden-System 1

Primer IFN γ dogfwd1: 5 ' GTA AGT CTC GGT TTA ACA GAG AAA G 3'

Dieses Oligonukleotid bindet im Exon 3 der caninen IFN γ -cDNA.

Primer IFN γ dogrev1: 5' GCC ACC CAG AGA AAA GCA TCT ATA A 3'

Dieses Oligonukleotid bindet im Exon 2 der caninen IFN γ -cDNA.

MGB[®]-Sonde IFN γ dog1: 5' TAC CTC TCT CCT CTC ACT GT 3'

Diese MGB[®]-Sonde hybridisiert mit der caninen IFN γ -cDNA über der Grenze zwischen Exon 2 und Exon 3.

IFN γ -Primer-Sonden-System 2

Primer IFN γ dogfwd2: 5 ' CAT GCT TGG CAA GTT CTT AAA TAG C 3'

Dieses Oligonukleotid bindet im Exon 3 der caninen IFN γ -cDNA.

Primer IFN γ dogrev2: 5 ' GCG CTG GAC CTG CAG ATC 3'

Dieses Oligonukleotid bindet im Exon 4 der caninen IFN γ -cDNA.

MGB[®]-Sonde IFN γ dog2: 5' AGC TGA TTC AAA TTC CTG T 3'

Diese MGB[®]-Sonde hybridisiert mit der caninen IFN γ -cDNA über der Grenze zwischen Exon 3 und Exon 4.

Amplifikation von caniner GAPDH-mRNA

Primer GAPDHdogfwd: 5' TGA CAA CTC CCT CAA GAT TGT CA 3'

Dieses Oligonukleotid bindet im Exon 6 der caninen GAPDH-cDNA.

Primer GAPDHdogrev: 5' ACT TCG GCA TCG TGG AGG 3'

Dieses Oligonukleotid bindet im Exon 7 der caninen GAPDH-cDNA.

MGB[®]-Sonde GAPDH: 5' CAA TGC CTC CTG CAC C 3'

Diese MGB[®]-Sonde hybridisiert mit der caninen GAPDH-cDNA über der Grenze zwischen Exon 6 und Exon 7.

3.1.2 Immunmodulator/Kontrollsubstanz

3.1.2.1 Baypamune[®]

Folgende Baypamune[®]-Chargen wurden verwendet:

000402, 000507, TK000ZT

Die Chargen 000402 und 000508 enthalten in 1 ml chemisch inaktiviertes *Parapox-ovis*-Virus (Stamm D1701) mit einem Titeräquivalent von $10^{7.0}$ TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50%) sowie 25 mg Polygeline als Stabilisator. Die Charge TK000ZT enthält in 1 ml das inaktivierte Virus mit einem Titeräquivalent von 3×10^8 TCID₅₀. Das lyophilisierte Präparat wurde vor der Injektion in Wasser für Injektionszwecke gelöst.

3.1.2.2 Kontrollsubstanz

Folgende Placebo-Charge wurde verwendet:

010910

Diese Placebo-Charge entspricht in ihrer Zusammensetzung dem Präparat Baypamune[®] ohne virale Bestandteile.

Alle Baypamune[®]- bzw. Placebochargen wurden von der Firma Bayer AG, Geschäftsbereich Tiergesundheit, Monheim zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Impfstoff

Alle Hunde wurden mit dem Kombinationsimpfstoff Virbagen[®]-canis SHA2PPi/LT (Fa. Virbac, Bad Oldesloe) zur Schutzimpfung gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis, Parvovirose, Parainfluenza canis, Leptospirose und Tollwut geimpft (vgl. Kapitel 4.2.3.4).

3.1.4 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden klinisch gesunde weibliche Beagle des Stammes Hsd Cpb: DOBE, im Alter von 8 bis 15 Monaten und mit einem Gewicht von ca. 15 kg eingesetzt. Die Hunde wurden von der Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Klinische und diagnostische Methoden

3.2.1.1 Klinische Überwachung der Versuchstiere

Für die Durchführung der Experimente standen zwölf weibliche Beagle für den Zeitraum von sechs Monaten zur Verfügung. Alle Hunde waren bei Einstellung ca. neun Monate alt. Mindestens einmal wöchentlich wurde der Gesundheitszustand der Tiere überprüft. Beurteilungskriterien waren dabei: Puls, Atmung, Temperatur, Ernährungszustand, Haut- und Haarkleid sowie die Schleimhautfarbe. Die

Hündinnen wurden nur nach klinisch unauffälligem Befund in die Experimente einbezogen.

3.2.1.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis oder der Vena cephalica antebrachii mit einer sterilen Einmalkanüle und einer sterilen 2 ml Spritze am stehenden Tier.

3.2.1.2.1 RNA-Extraktion

Für die direkte RNA-Extraktion aus Hundeblood wurden jeweils 1,5 ml des aufgezogenen Blutes in PAXgene™ Blood RNA Tubes (Fa. PreAnalytix/Qiagen, Hilden) überführt. Diese Röhrchen enthalten ein Reagenz, welches sofort intrazelluläre RNA bis zu fünf Tagen bei Raumtemperatur stabilisiert. Nach Vermischung des Blutes mit dem Reagenz wurden die Proben mindestens zwei Stunden bis maximal fünf Tage bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.1.2.2 Blutanalyse

Für die Blutanalyse im Hämatologiesystem Technicon H*1 wurde das Blut in 2 ml Ethylen-Diamine-Tetra-Acetate-(EDTA-) beschichteten Röhrchen gesammelt und durch sofortiges Schwenken eine Durchmischung des Blutes mit dem Antikoagulant EDTA gewährleistet.

3.2.1.2.3 PBMC-Gewinnung

Das Sammeln größerer Blutmengen für die Gewinnung von mononukleären Zellen (PBMCs) geschah mit Hilfe von EDTA-beschichteten Monovetten.

3.2.1.3 Blutanalyse im Hämatologiesystem Technicon H*1

Um die Wirkung einer Mehrfachimpfung auf die IFN γ -mRNA-Menge im Blut (vgl. Kapitel 4.2.3.4) zu klären, wurden täglich Blutproben mit Hilfe des Technicon H*1 (Bayer, Leverkusen) analysiert. Folgende Parameter (Auswahl) werden bei dieser Methode in dem mit EDTA versetzten Blut bestimmt:

„Kleines Blutbild“:

Parameter	Referenzbereich Hund	Einheit
Leukozyten	6 - 17	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Erythrozyten	5,5 - 8,5	$\times 10^6/\mu\text{l}$
Hämoglobin	12,0 - 18,0	g/dl
Hämatokrit	37 - 55	%
MCV	60 - 77	fl
MCH	19,5 - 24,5	pg
MCHC	32,0 - 36,0	g/dl
Thrombozyten	150 - 500	$\times 10^3/\mu\text{l}$

“Differentialblutbild”:

Parameter	Referenzbereich Hund	Einheit
Neutrophile Granulozyten	ca. 11, 5	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Lymphozyten	1 - 4,8	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Monozyten	0,15 - 1,35	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Eosinophile Granulozyten	0,1 - 1,25	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Basophile Granulozyten	selten	$\times 10^3/\mu\text{l}$

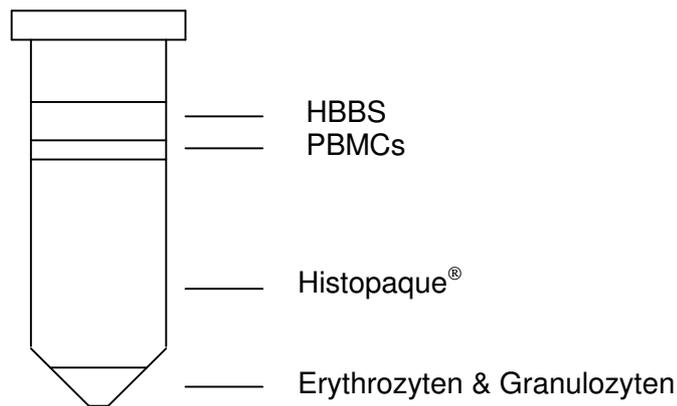
Referenzbereiche : Nemi C. Jain „Essentials of Veterinary Hematology“ (1993)

3.2.2 Zellkultur-Methoden

3.2.2.1 Isolierung von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Die Aufreinigung von mononukleären Zellen geschah in Anlehnung an Kipar *et al.*, 2001 und Leutenegger *et al.*, 1999. Sie diente letztendlich zur quantitativen Bestimmung der Zytokin-mRNA aus Zellen des Hundesbluts oder zur In-vitro-Stimulation von PBMCs des Hundes.

Das in EDTA-beschichteten Monovetten gesammelte Blut wurde mit Hilfe eines Vacutainers entnommen, das Plasma abzentrifugiert und mit einer Pipette abgehoben. Nach Zugabe von *Hank's balanced salt solution* (HBBS) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) in der gleichen Menge wurde das Volumen dieser Blut/Puffer-Mischung bestimmt und auf den Dichtegradienten Histopaque[®]-1077 (Dichte 1,077 g/ml; Fa. Sigma-Aldrich, Seelze) im Mengenverhältnis 1 : 1 gegeben. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (570 g, 25 Minuten) ergab sich folgende Schichtung des Röhrcheninhalts:



Die mononukleäre Zellschicht (weiße Interphase) wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in 10 ml HBBS überführt. Um Reste des Gradienten vollständig zu entfernen wurde erneut zentrifugiert (400 g, 10 min) und schließlich der Überstand verworfen.

3.2.2.2 Ermittlung der Zellzahl

Die gewaschenen PBMCs wurden in 5 ml HBBS aufgenommen. Um die Zellzahl zu ermitteln und tote Zellen anzufärben wurden 100 μ l dieser Zellsuspension mit 50 μ l Trypanblau vermischt. Der Farbstoff Trypanblau wird passiv durch Diffusion von Zellen aufgenommen. Da lebende Zellen den Farbstoff durch ihre Stoffwechselaktivität sezernieren können, werden sie – im Gegensatz zu toten Zellen – nicht angefärbt. Die ungefärbten Zellen wurden in 75 Kleinstquadraten einer Bürkerkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zellzahl pro μ l nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}}$$

Fläche eines Kleinstquadrates: 0,04 mm²

Kammertiefe: 0,1 mm

Verdünnung: 1 : 2

Die Einstellung der Zellzahl und Weiterverarbeitung der mononukleären Zellen erfolgte entsprechend des Zweckes der Aufarbeitung.

3.2.2.3 Weiterverarbeitung der PBMCs für die RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden jeweils 5 Mio. Zellen pro Ansatz eingesetzt. Dazu wurden die in HBBS aufgenommenen PBMCs für zehn Minuten bei 400 g abzentrifugiert und die Zellen in Lysispuffer (Fa. Qiagen, Hilden) resuspendiert. Die Aufnahme in Lysispuffer ermöglicht es, die PBMCs bei -80°C einzufrieren und zu einem späteren Zeitpunkt die RNA zu extrahieren.

3.2.2.4 Stimulation der PBMCs

Die in HBBS aufgenommenen PBMCs wurden so auf Reaktionsgefäße verteilt, dass sich in jedem Reaktionsgefäß 2,5 Mio. Zellen befanden. Nach Zentrifugation (400 g, 10 min) wurden die Zellpellets jeweils in 1 ml des folgenden Mediums aufgenommen:

- RPMI Medium 1640
- 10 Vol.% hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum (FKS)
- 5 ml/l Polymixin (Endkonzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 10 ml/l Neomycin (Endkonzentration: 100 Einheiten/ml)

Nach Verteilung der Zellsuspensionen auf eine 24-Loch-Platte (1 ml, d.h. 2,5 Mio. Zellen pro Napf) erfolgte die Stimulation der PBMCs durch Zugabe von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalin A (Leutenegger *et al.*, 1999) bzw. 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Phytohemagglutinin P (Phillips *et al.*, 1989). Die Zellkulturplatten wurden schließlich im CO_2 Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Für die Ernte wurden die jeweiligen Zellsuspensionen zu den verschiedenen Zeitpunkten aus den Näpfen entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (400 g, 10 min) wurden die Zellpellets in 1 ml HBBS gewaschen, in den entsprechenden Lysispuffer des später verwendeten RNA-Extraktion-Kits resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.3 Molekulargenetische Methoden

3.2.3.1 Extraktion der RNA

3.2.3.1.1 RNA-Extraktion aus Hundevollblut

Für die Isolierung der RNA aus Hundevollblut wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen:

- TRIzol[®] LS Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- NucleoSpin[®] RNA II Blood Kit (Fa. Macherey & Nagel, Düren)
- NucleoSpin[®] RNA Blood XL (Fa. Macherey & Nagel, Düren)
- PAXgene[™] Blood RNA Kit (Fa. Qiagen, Hilden)

Diese Methoden sind Modifikationen der Guanidiniumthiocyanat-Methode nach Chirgwin *et al.*, 1979. Die Extraktion mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Systems unterscheidet sich von den herkömmlichen Methoden durch die Vermischung des Blutes mit einem die intrazelluläre RNA stabilisierenden Reagenz (vgl. Kapitel 3.2.1.2). Die Durchführung der Extraktionsmethoden geschah jeweils nach Herstellerangabe.

Dabei wurde jeweils ein DNA-Abbau mittels RNase-freier DNase durchgeführt.

3.2.3.1.2 RNA-Extraktion aus PBMCs

Für die Isolierung der RNA aus mononukleären Zellen wurden folgende Methoden verwendet:

- NucleoSpin[®] RNA II Kit (Fa. Macherey & Nagel, Düren)
- RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden)

Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangabe. Dabei wurde jeweils ein DNA-Abbau mittels RNase-freier DNase durchgeführt (vgl. Leutenegger *et al.*, 2000).

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA bzw. DNA

Die Konzentration der gelösten RNA bzw. DNA wurde durch photometrische Messung im BioPhotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dabei erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen ein Lösungsmittel (Leerwert für

RNA: Elutions-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden; Leerwert für DNA: DNase/RNase-freies Wasser).

Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Aufschluss über die Verunreinigung der Nukleinsäure durch Proteine. Reine RNA soll einen Wert von ca. 2,0, reine DNA von ca. 1,8 bis 2,0 zeigen. Das Verhältnis A_{260}/A_{230} schätzt die Reinheit der Probe bezüglich der Verunreinigung durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen ab und soll bei ca. 2,2 liegen.

3.2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Für eine Quantifizierung einzelner mRNA-Fractionen aus Hundeblood bzw. mononukleären Zellen mittels „Real Time“-PCR musste zunächst die extrahierte Gesamt-RNA in cDNA umgewandelt werden. Hierzu wurde das Reagenziensystem TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben verwendet. In diesem System sind sogenannte Random Hexamer Primer enthalten. Dies sind kurze, nach dem Zufallsprinzip synthetisierte Oligonukleotide, die statistisch verteilt an die gesamte RNA (rRNA, tRNA, mRNA) hybridisieren, so dass die cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase abschnittsweise gebildet wird. Im Gegensatz zu Oligo-dT Primer, die sich an das Poly-A-Ende der mRNA anlagern und damit nur mRNA umschreiben, ermöglicht die Verwendung dieser Random Hexamer Primer den Einsatz von 18S rRNA als interne Kontrolle.

Folgender Reaktionsansatz wurde laut Herstellerangaben verwendet:

Komponente	Volumen μl	Endkonzentration
10 x RT Buffer	10	1x
25 mM MgCl_2	22	5,5 mM
Random Hexamers	5	2,5 μM
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μl)	2,5	1,25 U/ μl
RNase Inhibitor	2	0,4 U/ μl
deoxyNTPs mixture	20	500 μM per dNTP
RNA Template RNase-freies Wasser	38,5	0,25 – 2,0 μg
Gesamt	100	-

3.2.3.5 Agarosegelelektrophorese

3.2.3.5.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die PCR-Produkte wurden in 2 % und 4 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die erforderliche Menge Agarose (Nu Sieve[®] und Seakem[®] LE, Fa. Biozym, Hess. Oldendorf) wurde unter Aufkochen in 1 x TAE-Puffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) gelöst und anschließend durch Rühren auf ca. 50°C abgekühlt und in eine Gelkammer gegossen. Nach Auftrag der mit 6 x Ladepuffer (Gel Loading Solution, Fa. Sigma-Aldrich, Seelze) versetzten DNA bzw. des Standards (pUC-Mix, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in TAE-Laufpuffer bei einer Spannung von etwa 5 V/cm Gellänge (vgl. Sambrook *et al.*, 1989). Die so aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Anfärbung im Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) für 20 min unter UV-Licht sichtbar gemacht und ihre Größe durch Vergleich mit einem Standard bestimmt.

3.2.3.5.2 Auftrennung von RNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von RNA-Fragmenten dienten vorgefertigte, käufliche Gelelektrophorese-Systeme (E-Gel[®], Fa. Invitrogen, Karlsruhe), in denen jeweils 1 bis 1,5 µg RNA aus Hundeblood mit RNA-Ladepuffer (RNA Sample Loading Buffer ohne Ethidiumbromid, Fa. Sigma-Aldrich, Seelze) im Verhältnis 2 : 1 vermischt und aufgetragen wurde. Als Standard dienten 15 µg RNA aus Mäusemilz (Mouse spleen Total RNA, Fa. Ambion, U.K.). Die Durchführung der Elektrophorese verlief nach Herstellerprotokoll. Anschließend erfolgte der Vergleich der RNA-Fragmente unter UV-Licht.

3.2.3.6 Klonierung und Sequenzierung

3.2.3.6.1 Klonierung

Die Klonierung des PCR-Fragmentes in den pCR4 Blunt-TOPO Vektor fand mit Hilfe des Zero Blunt[®] TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) statt. Hierbei werden Vektor und Fragment durch das Enzym Topoisomerase miteinander verknüpft. Die Klonierung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* TOP 10 Bakterien (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und einstündiger Inkubation bei 37°C in SOC-Medium (Fa.

Invitrogen, Karlsruhe) wurden 50 bzw. 250 µl der Bakteriensuspension zur selektiven Vermehrung auf mit Kanamycin angereicherten Platten (*E.coli* FastMedia™ LB Agar Kanamycin, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) ausgestrichen. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden ausgewählte Kolonien der dicht bewachsenen Platte jeweils mit einer sterilen Öse in Flüssigmedium (*E.coli* FastMedia™ LB Liquid Kanamycin, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) überführt und erneut inkubiert.

3.2.3.6.2 Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus den für 24 Stunden inkubierten Bakterienkulturen erfolgte mit Hilfe des High Speed™ Plasmid Midi Kit der Fa. Qiagen, Hilden entsprechend der Herstellerangaben. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA (vgl. Kapitel 3.2.3.2).

3.2.3.6.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde in Anlehnung an Sanger *et al.* mit Hilfe des ABI PRISM® 310 Genetic Analyser unter Verwendung des ABI PRISM® BigDye™ Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Nach Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA wurde diese als Template in eine Standard-PCR zur Fluoreszenzmarkierung unter Verwendung von M13 Primern eingesetzt. Der PCR-Ansatz erfolgte in einem Volumen von 20 µl:

4 µl Prämix

2,5 µl M13-Primer fwd bzw. rev 2 pmol/µl (Endkonzentration 3,75 µM)

2 µl Plasmid-DNA 0,2-0,5 µg

11,5 µl H₂O

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des DyeEx Spin Kits (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt und 4 µl des Eluates in 16 µl HPLC-Wasser in die Sequenzierung eingesetzt.

3.2.3.7 "Real Time TaqMan[®]"-PCR

Die in dieser Arbeit verwendete „Real Time TaqMan[®]“-PCR dient zur Quantifizierung von IFN γ -mRNA- bzw. cDNA-Kopien. Während eines PCR-Laufs wird die Ausgangsmenge der IFN γ -mRNA- bzw. cDNA-Kopien in der Gesamt-RNA bzw. Gesamt-cDNA der Blutproben bestimmt. Hierfür wurde das ABI PRISM[™] 7700 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt.

Für jede Probe wurde für IFN γ und das gewählte Housekeeping-Gen (18S rRNA oder GAPDH) jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Um Verunreinigungen ausschließen zu können, wurde außerdem ein Dreifachansatz mit Wasser anstelle des cDNA-Templates untersucht. Für eine hohe Reproduzierbarkeit wurden die Pipettierschritte auf ein Minimum reduziert.

Zunächst wurden die jeweiligen Gesamtansätze ohne Zugabe des cDNA-Templates durch Pipettieren folgender Komponenten hergestellt:

Amplifikation von IFN γ bzw. GAPDH:

Komponente	Volumen μ l	Endkonzentration
2x TaqMan Universal Master Mix	25	1x
Forward Primer (10 μ M)	1,5	300nM
Reverse Primer (10 μ M)	1,5	300nM
Sonde (10 μ M)	1	200nM
cDNA-Template*	2-10	0,016-10ng
HPLC Wasser	ad 50	
Gesamt	50	

*Template wurde später hinzugefügt

Amplifikation von 18S rRNA:

Komponente	Volumen μ l	Endkonzentration
2x TaqMan Universal Master Mix	25	1x
20x 18S rRNA	2,5	1x
cDNA-Template*	2-10	0,016-10ng
HPLC Wasser	ad 50	
Gesamt	50	

*Template wurde später hinzugefügt

Das Volumen des Ansatzes errechnet sich nach der zu untersuchenden Probenzahl x 3,5 (Dreifachansatz) + 1 (Volumenverlust durch mehrere Pipettierschritte).

Im Anschluss wurde die Gesamtmenge entsprechend der Anzahl der Proben als Dreifachansätze aliquotiert und schließlich jeweils das entsprechende cDNA-Template bzw. Wasser als Kontrolle zugegeben.

Von jedem Dreifachansatz wurden jeweils 50 µl in drei Reaktionsgefäße einer MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate pipettiert und die Platte mit einer optischen Folie verschlossen.

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

- | | |
|--|--------------|
| 1. Aktivierung der AmpErase® Uracil N-Glycosylase: | 50 °C, 10min |
| 2. Aktivierung der AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase: | 95 °C, 10min |
| 3. 45 Zyklen: | |
| Denaturierung: | 95 °C, 15sec |
| Annealing/Extension: | 60 °C, 1min |

3.2.3.7.1 Bestimmung der relativen IFN γ -mRNA-Menge

Für die relative Quantifizierung wurde bei der Auswertung der „Real-Time“-PCR der Reaktionsverlauf des zu untersuchenden Gens (IFN γ) mit dem des Housekeeping-Gens verglichen. Dabei wird das wachsende Fluoreszenzsignal jeder PCR-Reaktion graphisch gegenüber der Zyklenzahl aufgetragen (vgl. Abb. 3).

Um ein Amplifikationsplot auszuwerten wird in den exponentiellen Bereich der PCR der Schwellenwert (Threshold) gelegt, der die Phase anzeigt, in der die PCR noch nicht linear (Plateauphase) verläuft. Der Schnittpunkt einer Fluoreszenzkurve mit dem Schwellenwert markiert den Ct-Wert (Threshold Cycle) für diese Reaktion. Der Ct-Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der zum ersten Mal ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erfasst, d.h. der Schwellenwert überschritten wird (vgl. Abb. 4).

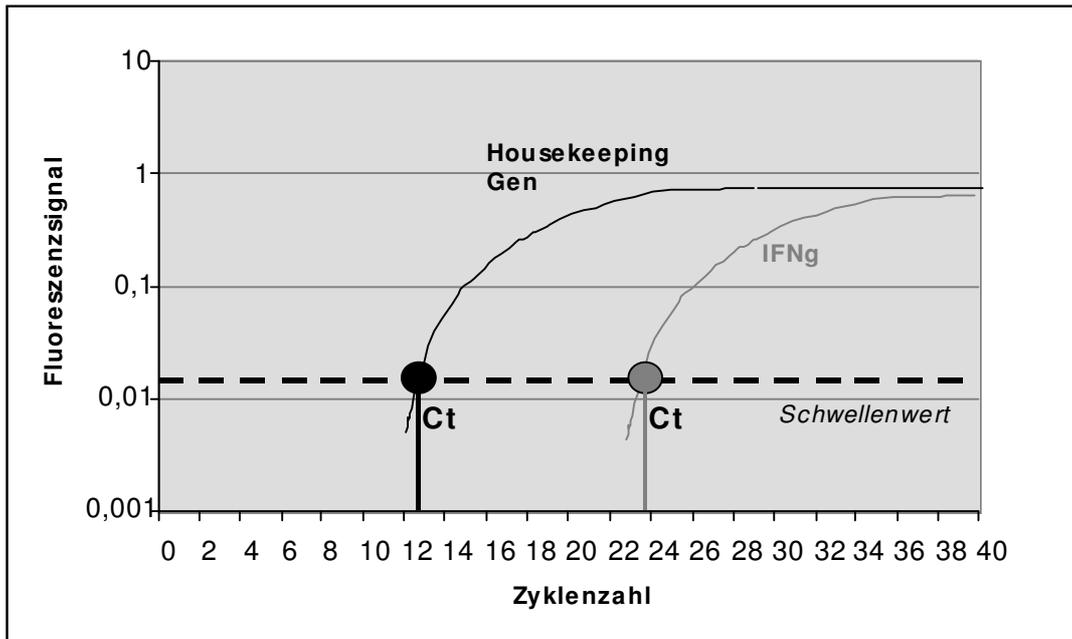
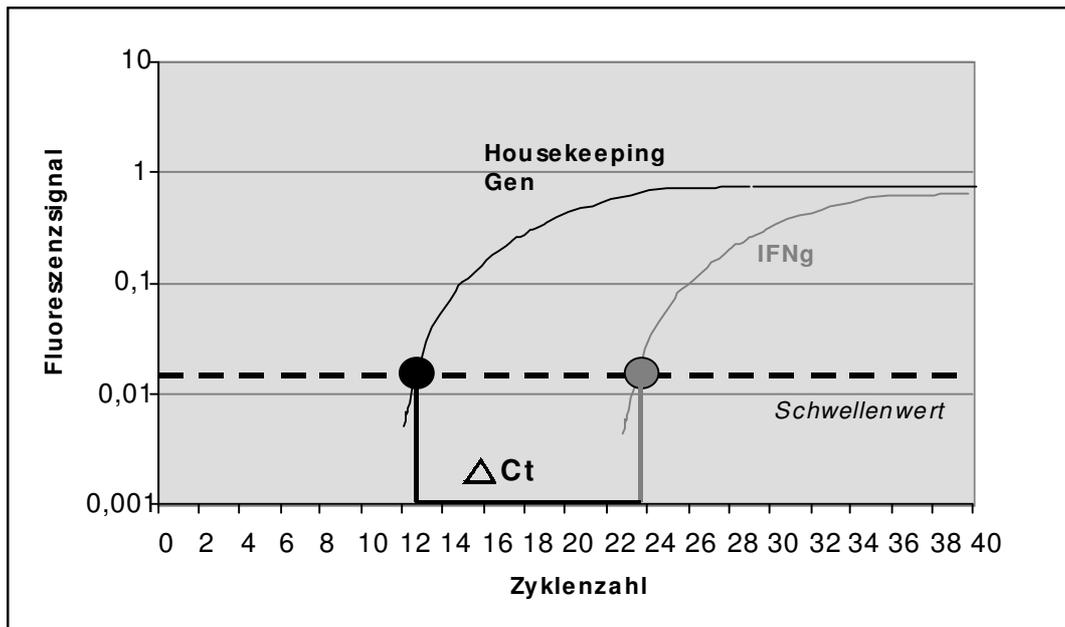


Abb. 4: Bestimmung der Ct-Werte

Von jeder cDNA-Probe wurde eine simultane Amplifikation von IFN γ und des Housekeeping-Gens durchgeführt, so dass die erhaltenen Ct-Werte beider PCR-Reaktionen miteinander verrechnet werden können. Dafür wurde die Differenz der Ct-Werte beider Reaktionen – der sogenannte delta Ct-Wert (Δ Ct) – bestimmt.

$$Ct_{\text{IFN}\gamma} - Ct_{\text{18S resp. GAPDH}} = \Delta Ct$$

Das vorliegende Beispiel in Abb. 5 zeigt für die Referenzreaktion einen Ct-Wert von ca. 12,5 und für die Amplifikation von IFN γ einen Ct-Wert von ca. 24, woraus sich ein Δ Ct-Wert von 11,5 ergibt.

Abb. 5: Bestimmung des ΔC_t -Werts

Das Fluoreszenzsignal der Referenzreaktion erreicht bereits nach 12,5 Zyklen den Schwellenwert, da hier die Anzahl der Startkopien größer war als bei der PCR-Reaktion für $IFN\gamma$, die erst bei 24 Zyklen den Schwellenwert überschreitet. Dies verdeutlicht, dass das Referenzgen stärker exprimiert wird als $IFN\gamma$.

Unter der Bedingung, dass beide PCR-Reaktionen mit 100%iger Effizienz ablaufen, sich also die Amplifikatmenge im exponentiellen Wachstumsbereich mit jedem Zyklus verdoppelt, kann die $IFN\gamma$ -mRNA-Menge relativ zur Menge des konstant exprimierten Housekeeping-Gens quantifiziert werden. Der ΔC_t -Wert gibt demnach die Differenz der Schwellenwert-Zyklenzahlen von $IFN\gamma$ -Amplifikation und 18S rRNA- bzw. GAPDH-Amplifikation an und verdeutlicht so die Expression von $IFN\gamma$ relativ zur Expression des Referenz-Gens. Je kleiner der ΔC_t -Wert, desto größer ist die Expressionsrate für das zu untersuchende Gen.

Berechnung des zeitlichen Verlaufs der relativen $IFN\gamma$ -mRNA-Menge

Um den zeitlichen Verlauf der relativen $IFN\gamma$ -mRNA-Menge verschiedener RNA-Proben (z.B.: 1, 2,...) in Bezug zum Basiswert (0) einer Kinetik zu berechnen wurde die vergleichende $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. Dabei wurde die relative $IFN\gamma$ -mRNA-Menge ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) aus den mittleren C_t -Werten der jeweiligen Dreifachansätze für $IFN\gamma$ und 18S rRNA bzw. GAPDH nach folgenden Formeln ermittelt:

- I. $Ct_{IFN\gamma} - Ct_{18S/GAPDH} = \Delta Ct$
- II. $\Delta Ct_{(1)} - \Delta Ct_{(0)} = \Delta\Delta Ct_{(1)}$
- III. $\Delta Ct_{(2)} - \Delta Ct_{(0)} = \Delta\Delta Ct_{(2)}$

Der $\Delta\Delta Ct$ -Wert gibt die Differenz der Schwellenwert-Zyklenzahlen von $IFN\gamma$ -Amplifikation und 18S rRNA- bzw. GAPDH-Amplifikation relativ zum Basiswert an.

Die relative $IFN\gamma$ -mRNA-Menge wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{bzw.} \quad 1 / 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Um bei einem negativen $\Delta\Delta Ct$ -Wert ein negatives Mengenverhältnis nicht rechnerisch zu verzerren, wurde der negative Kehrwert der relativen $IFN\gamma$ -mRNA-Menge berechnet.

3.2.4 Tierversuchsdurchführung

3.2.4.1 Experiment I: Subkutane Applikation von Baypamune®

Zur Untersuchung der relativen $IFN\gamma$ -mRNA-Menge in Blutlymphozyten von Hunden nach Baypamune®-Applikation wurde den Tieren 1 ml des Immunmodulators (*Parapox-ovis*-Virus-Titeräquivalent: 10^7 TCID₅₀/ml) subkutan injiziert (vgl. Kapitel 4.2.3.1). Für die Ermittlung des Basiswerts wurde an drei Tagen vor der Applikation Blut entnommen und bei der späteren Auswertung (vgl. Kapitel 4.2.3.1) der Mittelwert aus den erhaltenen Ct-Werten gebildet. Weiterhin wurde 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Applikation allen Hunden Blut entnommen. Neben der Baypamune®-Gruppe wurde eine entsprechende Kontrollgruppe mitgeführt (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Gruppeneinteilung und –stärke sowie Applikationsroute und Zeitpunkt der Blutentnahme im Experiment I

Status der Tiere	Anzahl	Immunmodulator	Placebo	Zeitpunkt der Blutentnahme
Tiere der Baypamune®-Gruppe	6	1 ml Baypamune® (10 ⁷ TCID ₅₀ /ml, vgl. 3.1.2.1)	-	vor Applikation (Basiswert) + 6, 12, 24, 48, 72, 96 Stunden nach Applikation
Kontrolltiere	6	-	1 ml Kontrollsubstanz (25 mg Polygeline, vgl. 3.1.2.2)	

3.2.4.2 Experiment II: Subkutane Applikation der 60fachen Baypamune®-Dosis

Um die IFN γ -mRNA-Menge nach Applikation einer mehrfachen Dosis Baypamune® zu untersuchen, wurde den Tieren 2 ml des Immunmodulators mit einem *Parapox-ovis*-Virus-Titeräquivalent von 3 x 10⁸ TCID₅₀/ml subkutan injiziert (vgl. Kapitel 4.2.3.2). Die mitgeführten Kontrolltiere erhielten 2 ml der Kontrollsubstanz, die den Stabilisator Polygeline in einer der 60fachen Baypamune®-Dosis entsprechenden Menge enthält (ca. 1,5 g Polygeline in 2 ml Baypamune® mit dem Titeräquivalent 6 x 10⁸ TCID₅₀). Der Basiswert der IFN γ -mRNA-Menge wurde entsprechend Experiment I (vgl. Kapitel 3.2.4.1) ermittelt. Die Gruppeneinteilung und -stärke sowie die applizierten Substanzen und das Applikationsschema sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung und –stärke sowie Applikationsroute und Zeitpunkt der Blutentnahme im Experiment II

Status der Tiere	Anzahl	Immunmodulator	Placebo	Zeitpunkt der Blutentnahme
Tiere der Baypamune®-Gruppe	4	2 ml Baypamune® (3×10^8 TCID ₅₀ /ml, vgl. 3.1.2.1)	-	vor Applikation (Basiswert) + 9, 12, 24, 33, 36, 48, 57, 96, 105, 120 Stunden nach Applikation
Kontrolltiere	2	-	2 ml Kontroll- substanz (1,5 g Polygeline, vgl. 3.1.2.2)	

3.2.4.3 Experiment III: Intramuskuläre Applikation von Baypamune®

Um die IFN γ -mRNA-Menge nach intramuskulärer Applikation von Baypamune® zu untersuchen wurde 2 Tieren 1 ml des Immunmodulators mit einem *Parapox-ovis*-Virus-Titeräquivalent von 2×10^7 TCID₅₀/ml intramuskulär injiziert (vgl. Kapitel 4.2.3.3). Die Ermittlung des Basiswerts verlief wie in den vorangegangenen Experimenten. Des Weiteren wurde den Tieren 6, 9, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation des Immunmodulators Blut entnommen.

3.2.4.4 Experiment IV: Wiederholte Baypamune®-Applikation und Impfung

In diesem Experiment wurde in Hunden neben der IFN γ -mRNA-Menge, die absolute Lymphozytenzahl sowie die mitogene Stimulierbarkeit vor und nach zweimaliger Baypamune®-Applikation und einmaliger Impfung ermittelt (vgl. Kapitel 4.2.3.4).

Der Basiswert der IFN γ -mRNA-Menge wurde entsprechend vorangegangener Experimente ermittelt. Die Gruppeneinteilung und –stärke sowie die applizierten Substanzen und das Applikationsschema sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Gruppeneinteilung und –stärke sowie Applikationsroute und Zeitpunkt der Blutentnahme für die Untersuchung der IFN γ -mRNA-Menge im Experiment IV

Status der Tiere	Anzahl	Immunmodulator/ Placebo	Impfstoff	Zeitpunkt der Blutentnahme
Tiere der BPN ¹⁾ - Gruppe	6	1 ml BPN ¹⁾ (2 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml, vgl. 3.1.2.1)	1 ml SHA2PPi/LT (vgl. Kapitel 3.1.3)	<p><u>IFNγ-mRNA-Menge:</u> vor Applikation (Basiswert) + 1,3, 9, 72 Stunden nach der ersten BPN¹⁾-bzw. Placebo- Applikation + 1, 3, 9, 24, 48, 72, 144, 168, 216 Stunden nach der zweiten BPN¹⁾-Applikation Applikation des Impfstoffes am ersten Tag nach der zweiten BPN¹⁾- bzw. Placebo- Applikation</p>
Kontroll- tiere	6	1 ml Kontroll- substanz (50 mg Polygeline, vgl. 3.1.2.2)	1 ml SHA2PPi/LT (vgl. Kapitel 3.1. 3)	<p><u>Absolute Lymphozytenzahl:</u> vor Applikation (Basiswert) + 3 Tage nach der ersten BPN¹⁾- bzw. Placebo Applikation 1-9 Tage nach der zweiten BPN¹⁾- bzw. Placebo- Applikation (bzw. 1-8 Tage nach der Impfung)</p> <p><u>Mitogene Stimulierbarkeit caniner PBMCs:</u> vor Applikation (Basiswert) + 8 und 10 Tage nach der zweiten BPN¹⁾- bzw. Placebo Applikation, d.h. am 6. und 8. Tag nach der Impfung</p>

¹⁾ Baypamune®

3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Aufbereitung der Daten erfolgte auf einem Personalcomputer mit den Programmen Microsoft Excel, Version 97 SR-2 und SigmaStat, Version 2.0, NT & 3.1.

3.2.5.1 Korrelations- und Regressionsanalyse

Bei der Auswertung des Effizienzvergleichs (vgl. Kapitel 4.1.2.5) wurde das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r (Bestimmtheitsmass) und die Regressionsgerade zur Darstellung des linearen Zusammenhangs der Meßergebnisse berechnet. In den Diagrammen werden die Meßwertpaare (x/y) als Punktwolke und die Regressionsgerade mit der Gleichung $y = mx + b$ (m = Steigung, b = Achsenabschnitt) abgebildet. Bei einer vollkommenen Übereinstimmung der Meßwertpaare mit der Regressionsgeraden entspricht $r^2 = 1$.

3.2.5.2 t-Test

Die Bestimmung der Signifikanz zwischen den Einzelwerten in der Test- und der Kontrollgruppe (vgl. Kapitel 4.2.3.4.2) erfolgte bei normalverteilten Daten mittels t-Test für verbundene Stichproben.

Der Vergleich von Lymphozytenzahlen (vgl. Kapitel 4.3.2.4.1) zwischen Test- und Kontrollgruppe wurde unter Zuhilfenahme des t-Tests für unabhängige Daten durchgeführt. Für alle Berechnungen wurde eine Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ berücksichtigt.

IV. Ergebnisse

4.1 „Real Time TaqMan[®]“-PCR zum Nachweis caniner IFN γ -mRNA aus Hundeblood

4.1.1 Optimierung der RNA-Extraktion aus Hundeblood

Eine schnelle Methode für die Gewinnung von IFN γ -mRNA des Hundes ist die Extraktion von Gesamt-RNA aus zirkulierendem Blut.

Für die Optimierung der RNA-Extraktion aus Hundeblood wurden verschiedene Extraktionsmethoden verglichen. Dabei ergab die Extraktion von RNA mittels herkömmlicher Methoden (TRIzol[®] LS Reagent, Fa. Invitrogen, Karlsruhe; NucleoSpin[®] Blood RNA Kits, Fa. Macherey & Nagel, Düren) eine Ausbeute von durchschnittlich 0,5 μ g Gesamt-RNA aus 1,5 ml EDTA-Blut.

Im Gegensatz hierzu konnte mit Hilfe des PAXgene[™] Blood RNA Systems (Fa. PreAnalytiX/Quiagen, Hilden) durchschnittlich 10 μ g aus 1,5 ml Blut gewonnen werden.

4.1.1.1 Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese

Die mittels PAXgene[™] Blood RNA System aus Hundeblood gewonnene RNA wurde elektrophoretisch in Agarosegel (1,2 %; E-Gel[®], Fa. Invitrogen, Karlsruhe) aufgetrennt. Die Ergebnisse in Abb.6 zeigen, dass sich die extrahierte RNA bei einer Konzentration von 1,6 μ g (Spur 6) entsprechend der im RNA-Standard vorhandenen 28S und 18S ribosomalen RNAs deutlich nachweisen ließ.

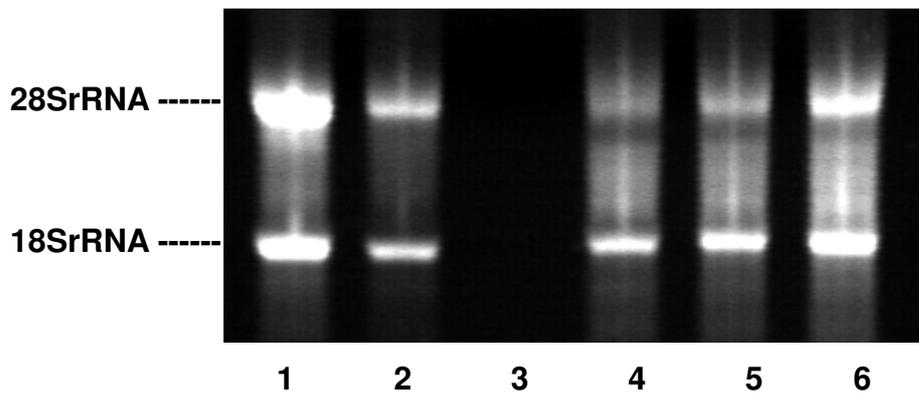


Abb.6: Nachweis der mittels PAXgene™ Blood RNA System extrahierten RNA aus Hundeblood und Vergleich mit Standard-RNA aus Mäusemilz in verschiedenen Konzentrationen.

- Spur 1: Mäusemilz-RNA (2 µg/10 µl)
- Spur 2: Mäusemilz-RNA (1 µg/10 µl)
- Spur 3: Mäusemilz-RNA (0,5 µg/10 µl)
- Spur 4: RNA aus Hundeblood (1 µg/10 µl)
- Spur 5: RNA aus Hundeblood (1,3 µg/10 µl)
- Spur 6: RNA aus Hundeblood (1,6 µg/10 µl)

4.1.2 Auswahl eines geeigneten Primer-Sonden-Systems

4.1.2.1 Sequenzvergleich zum Auffinden der Exon-Intron-Grenzen von *IFN γ*

Bei der Auswahl des Primer-Sonden-Systems für die Amplifizierung von *IFN γ* -cDNA des Hundes musste berücksichtigt werden, dass das System eine Exon-Exon-Grenze der RNA überspannt. Dadurch wird bei eventuell kontaminierten Proben die unerwünschte Amplifizierung von DNA vermieden. Da die Exon-Intron-Strukturen für dieses Gen des Hundes nicht bekannt sind, wurde die mRNA-Sequenz mittels einer Gendatenbank (Blast Search, PubMed) mit anderen verwandten Sequenzen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die canine mRNA-Sequenz eine große Homologie zur porcinen *IFN γ* -DNA-Sequenz besitzt. Daher wurde zum Auffinden von Exon-Exon-Grenzen ein Vergleich der Sequenzen caniner *IFN γ* -mRNA zu *IFN γ* -DNA und -mRNA des Schweines durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen drei homologe Sequenzabschnitte innerhalb des Sequenzvergleichs (vgl. Abb.7), die auf Exonstrukturen in der mRNA-Sequenz des Hundes hinweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse ließen sich die notwendigen Primer-Sonden-Systeme unter Zuhilfenahme der Primer Express Software (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) auswählen.

1381 1440

IFN-g_swgenomic.SEQ CCCAG | AATGCAAGTACCTCAGATGTACCTAATGGTGGACCTCTTTTCTTAGAAATTTG

IFN-g_swmRNS.SEQ | AATGCAAGTACCTCAGATGTACCTAATGGTGGACCTCTTTTCTTAGAAATTTG

IFN-g_dog,_CDS.SEQ | AATGCAAGTAATCCAGATGTATCGGACGGTGGGTCTCTTTTCGTAGATATTTG

Primer (rev) 1

1441 1500

IFN-g_swgenomic.SEQ AAGAATTGGAAAGAG | GTAAGCTGAACATTTCTATTTGGCTGATTTTCTGTTGCTTATTT

IFN-g_swmRNS.SEQ AAGAATTGGAAAGAG |

IFN-g_dog,_CDS.SEQ AAGAAATGGAGAGAG |

Sonde 1

1501 1560

IFN-g_swgenomic.SEQ TCTACTGGATAAATTCACATCACTCTCTCTTTGTGCTCTTTTCTCCAAG | GAGAGTGACA

IFN-g_swmRNS.SEQ | GAGAGTGACA

IFN-g_dog,_CDS.SEQ | GAGAGTGACA

1561 1620

IFN-g_swgenomic.SEQ AAAAAATAATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAATCTTTGAAATCTTCAAAG

IFN-g_swmRNS.SEQ AAAAAATAATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAATCTTTGAAATCTTCAAAG

IFN-g_dog,_CDS.SEQ AAACAAT CATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTGAAACTGTTTGACAACCTTTAAAG

Primer (fwd) 1

1621 1680

IFN-g_swgenomic.SEQ ATAACCAGGCCATTCAAAGGAGCATGGATGTGATCAAGCAAGACATGTTTCAGAGGTTCC

IFN-g_swmRNS.SEQ ATAACCAGGCCATTCAAAGGAGCATGGATGTGATCAAGCAAGACATGTTTCAGAGGTTCC

IFN-g_dog,_CDS.SEQ ATAACCAGATCATTCAAAGGAGCATGGATACCATCAAGGAAGACATGCTTGCAAGTTCT

Primer (fwd) 2

1681 1740

IFN-g_swgenomic.SEQ TAAATGGTAGCTCTGGGAAACTGAATGACTTCGAAAAGCTGATTAATAATCCG | GTGAGAT

IFN-g_swmRNS.SEQ TAAATGGTAGCTCTGGGAAACTGAATGACTTCGAAAAGCTGATTAATAATCCG |

IFN-g_dog,_CDS.SEQ TAAATAGCAGCACCAGTAAGAGGGAGGACTTCCTTAAGCTGATTCAAATTCCT |

Sonde 2

	4501		4560
IFN-g_swgenomic.SEQ	TGAAATTAATTTTGCTGTTTTCTCTCCCAACAG		GTAGATAATCTGCAGATCCAGCGCAA
IFN-g_swmRNS.SEQ		GTAGATAATCTGCAGATCCAGCGCAA
IFN-g_dog,_CDS.SEQ		GTGAACGATCTGCAGGTCCAGCGCAAG

Primer (rev) 2

	4561		4620
IFN-g_swgenomic.SEQ	GCCATCAGTGAACCTCATCAAAGTGATGAATGATCTGTACCAAGATCTAACCTAAGAAAG		
IFN-g_swmRNS.SEQ	GCCATCAGTGAACCTCATCAAAGTGATGAATGATCTGTACCAAGATCTAACCTAAGAAAG		
IFN-g_dog,_CDS.SEQ	GCGATAAATGAACCTCATCAAAGTGATGAATGATCTCTACCAAGATCCAACCTAAGGAAG		

Kursiv: IFN γ -Primer-Sonden-System 1

Nicht kursiv: IFN γ -Primer-Sonden-System 2

Abb.7: Alignment der porcinen IFN γ -DNA-Sequenz zur porcinen mRNA-Sequenz sowie zur Sequenz der caninen IFN γ -mRNA zum Nachweis von Exon-Exon-Grenzen innerhalb der IFN γ -mRNA-Sequenz des Hundes und Darstellung der ausgewählten Primer-Sonden-Systeme.

4.1.2.2 Sequenzvergleich zum Auffinden der Exon-Intron-Grenzen von *GAPDH*

Auch für das canine Housekeeping-Gen GAPDH sind die Exon-Intron-Strukturen nicht bekannt. Zur Ermittlung von Exonstrukturen innerhalb der GAPDH-mRNA-Sequenz des Hundes wurde deshalb analog zu Kapitel 4.1.2.1 die GAPDH-mRNA-Sequenz des Hundes mit der humanen GAPDH-DNA- und mRNA-Sequenz verglichen. Der Sequenzvergleich (vgl. Abb.8) zeigt einen Ausschnitt der homologen Sequenzabschnitte, die auf Exon-Intron-Strukturen hinweisen. Das GAPDH-Primer-Sonden-System konnte aufgrund dieser Ergebnisse mittels der Primer Express Software (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewählt werden.

	3781		3840
GAPDH.DNAhuman.SEQ	CCATGTTTCGTTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAG		GT
GAPDHhuman.SEQ	CCATGTTTCGTTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAG		..
GAPDHdog.SEQ	CCATGTTTGTGATGGGCGTGAACCATGAGAAGTA	<u>TGACA</u>	<u>ACTCCCTCAAGATTGTCAG</u> ..

Primer fwd

	3841		3900	
GAPDH.DNAhuman.SEQ	GAGGAAGGCAGGGCCCGTGGAGAAGCGGCCAGCCTGGCACCTATGGACACGCTCCCCTG			
GAPDHhuman.SEQ			
GAPDHdog.SEQ			
	3901		3960	
GAPDH.DNAhuman.SEQ	ACTTGCGCCCGCTCCCTCTTTCTTTGCAG		CAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTAGC	
GAPDHhuman.SEQ		CAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTAGC	
GAPDHdog.SEQ		CAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTGGC	
		Sonde		
	3961		4020	
GAPDH.DNAhuman.SEQ	ACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGGTATCGTGGAAGGACTCATG		GTATGAGA	
GAPDHhuman.SEQ	ACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGGTATCGTGGAAGGACTCATG		
GAPDHdog.SEQ	TCCTCTAGCCAAAGTCATCCATGACC	<u>ACTTCGGCATCGTGGAGGCCTCATG</u>	
		Primer rev		

Abb.8: Alignment der humanen GAPDH-DNA-Sequenz zur humanen mRNA-Sequenz sowie zur Sequenz der caninen GAPDH-mRNA zum Nachweis von Exon-Exon-Grenzen innerhalb der GAPDH-mRNA-Sequenz des Hundes und Darstellung des ausgewählten Primer-Sonden-Systems.

4.1.2.3 Spezifität der ausgewählten Primer

4.1.2.3.1 Prüfung mittels PCR und Agarosegelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob das IFN γ -1-Amplifikat von 84 bp mit den ausgewählten Primern des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 1 amplifiziert werden kann, wurden in einer PCR Annealing-Temperaturen von 58°C und 60°C gewählt und die PCR Produkte auf Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das IFN γ -1-Amplifikat ohne Nebenprodukte nachgewiesen werden kann (vgl. Abb.9).

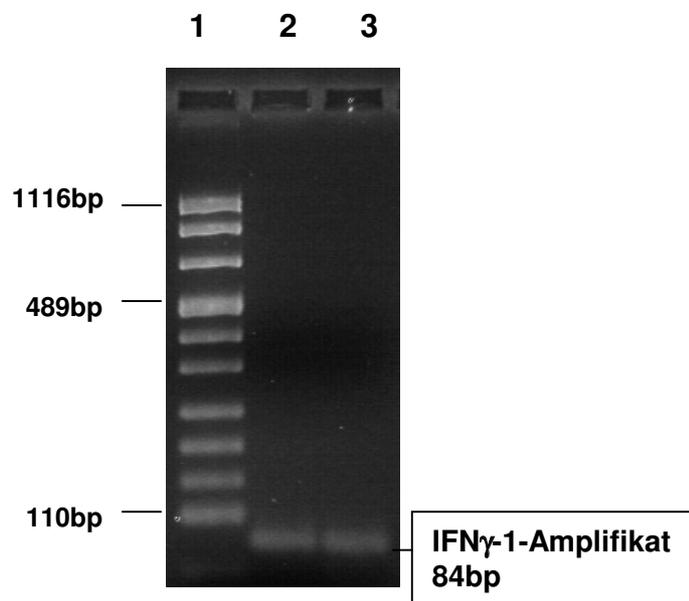


Abb.9: Nachweis des IFN γ -1-Amplifikats von 84 bp mit den Primern aus dem IFN γ -Primer-Sonden-System 1.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker

Spur 2: PCR-Produkt 1 - Annealingtemperatur 58°C

Spur 3: PCR-Produkt 2 - Annealingtemperatur 60°C

Für die Amplifikationskontrolle des IFN γ -2-Amplifikats (94 bp) wurden in einer PCR Annealing-Temperaturen zwischen 54°C bis 60°C gewählt und die PCR-Produkte auf Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Auch das IFN γ -2-Amplifikat kann über ein breites Temperaturspektrum ohne Nebenprodukte nachgewiesen werden (vgl. Abb.10).

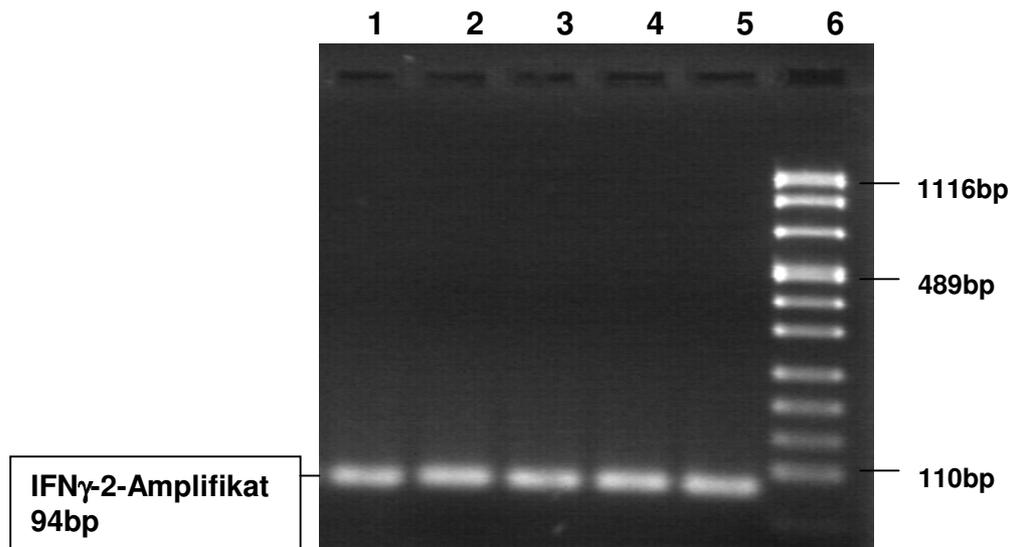


Abb.10: Nachweis des IFN γ -2-Amplifikats von 94 bp mit den Primern aus dem IFN γ -Primer-Sonden-System 2.

- Spur 1: PCR-Produkt 1 - Annealingtemperatur 54°C
- Spur 2: PCR-Produkt 2 - Annealingtemperatur 55°C
- Spur 3: PCR-Produkt 3 - Annealingtemperatur 57°C
- Spur 4: PCR-Produkt 4 - Annealingtemperatur 58°C
- Spur 5: PCR-Produkt 5 - Annealingtemperatur 60°C
- Spur 6: Molekulargewichtsmarker

Für die Überprüfung des mit Hilfe der ausgewählten Primer gewonnenen GAPDH-Amplifikats von 98 bp wurde in einer PCR eine Annealing-Temperatur von 60°C gewählt und die PCR-Produkte zur elektrophoretischen Auftrennung auf Agarosegel aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen, dass das GAPDH-Amplifikat ohne Nebenprodukte nachgewiesen werden kann (vgl. Abb.11).

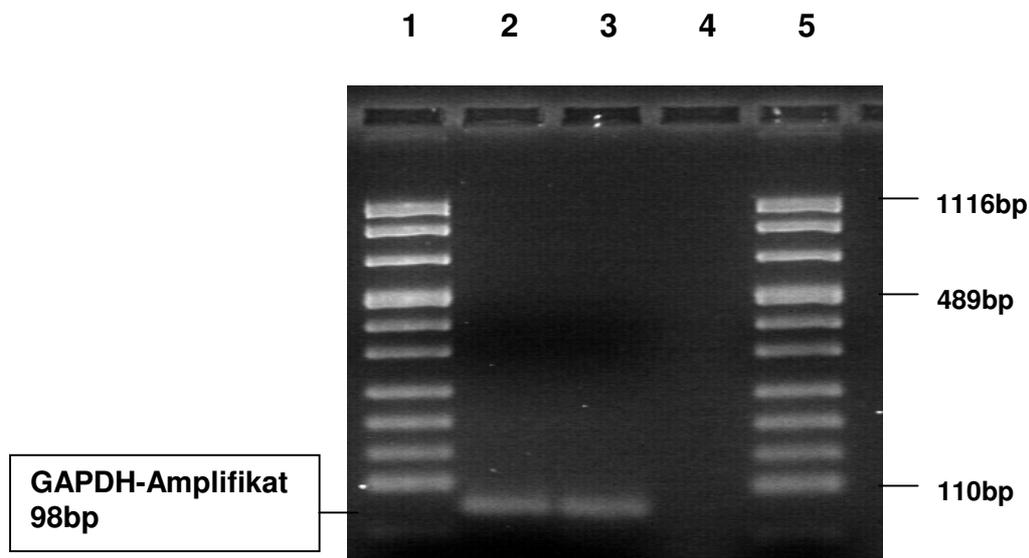


Abb.11: Nachweis des GAPDH-Amplifikats von 98 bp mit den Primern aus dem GAPDH-Primer-Sonden-System.

- Spur 1: Molekulargewichtsmarker
- Spur 2: Annealingtemperatur 60°C
- Spur 3: Annealingtemperatur 60°C
- Spur 4: leer
- Spur 5: Molekulargewichtsmarker

4.1.2.3.2 Prüfung mittels Klonierung und Sequenzierung

Die Spezifität der ausgewählten Primer-Sonden-Systeme zur Amplifizierung von GAPDH-mRNA und IFN γ -mRNA wurde mittels Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft. Das anschließende Alignment der caninen Sequenzen für IFN γ -mRNA und GAPDH-mRNA aus der Gendatenbank ergab eine hundertprozentige Homologie mit den entsprechenden Plasmidsequenzen.

4.1.2.4 Produktion ausreichender Mengen IFN γ -mRNA aus PBMCs mittels Concanavalin-A-Stimulation

Da die IFN γ -mRNA-Konzentration im zirkulierenden Blut des Hundes sehr gering ist, musste für weitere Etablierungs- und Optimierungsschritte eine Positivkontrolle gewonnen werden, die eine ausreichend hohe IFN γ -mRNA-Menge enthält. Zu diesem Zweck wurden canine PBMCs in einem Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit für 24 – 120 h mit Con A stimuliert. Zur Auswertung fand die vergleichende $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Berechnung Verwendung (vgl. Kapitel 3.2.3.7.1.2). Tabelle 5

zeigt, dass mit einer 407,31fachen IFN γ -mRNA-Menge nach 24 h bereits ein Maximalwert erreicht wurde.

Tabelle 5: Ermittlung der relativen IFN γ -mRNA-Menge aus PBMCs nach sequenzieller (h) Stimulation mit Concanavalin A

Zeit in h	Ct-Wert IFN γ (MW)	Ct-Wert 18S (MW)	Δ Ct Ct IFN γ - Ct 18S	$\Delta\Delta$ Ct Δ Ct Probe - Δ Ct 0h	relative IFN γ -mRNA-Menge $2^{-\Delta\Delta$ Ct}
0	31,33	12,94	18,39	0	
24	22,06	12,34	9,72	-8,67	407,31
48	23,12	12,33	10,79	-7,6	194,01
72	26,05	12,36	13,69	3,97	25,99
96	27,41	12,38	15,03	-3,36	10,27
120	25,76	12,36	13,4	-4,99	31,78

Um für weitere Optimierungsschritte eine ausreichend hohe IFN γ -mRNA-Konzentration zu erhalten, wurden PBMCs 24 Stunden stimuliert und die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.1.2.5 Vergleich der Effizienzen von IFN γ -Systemen und Referenzreaktionen

Bei der relativen Quantifizierung wird die Zielsequenzreaktion (IFN γ) mit der Referenzreaktion (18S rRNA bzw. GAPDH) verrechnet, um sicherzustellen, dass immer die gleiche Probenmenge RNA eingesetzt wird. Für die Anwendung der $\Delta\Delta$ Ct-Berechnung (vgl. Kapitel 3.2.3.7.1) muss die Effizienz der IFN γ -Reaktion und der 18S rRNA- bzw. GAPDH-Reaktion nahezu gleich sein. Eine sehr empfindliche Methode, um zu überprüfen, ob die Effizienzen zweier Amplicons gleich sind, bietet ein Vergleich des Δ Ct (\cong Ct-Wert der Zielsequenzreaktion – Ct-Wert der Referenzreaktion) bei verschiedenen Verdünnungstufen der Matrizen.

4.1.2.5.1 Effizienzvergleich der IFN γ -Primer-Sonden-Systeme und 18S rRNA

Um die Effizienzen der IFN γ -Primer-Sonden-Systeme und des 18S rRNA-Systems zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe der zu amplifizierenden cDNA erstellt. Diese Proben wurden in einem PCR-Lauf mit einem der IFN γ -Primer-Sonden-Systeme und dem kommerziell zu erwerbenden Reagenzien-Mix für die Amplifizierung von 18S rRNA eingesetzt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Ct-Werte und Δ Ct-Werte. Bei einem PCR-System mit 100% Effizienz ist zu erwarten, dass der Ct-Wert mit jeder Halbierung der Startkopienzahl um einen Zyklus zunimmt. Bei Verrechnung der Ct-Werte für die Amplifikation von IFN γ und 18S rRNA würde bei nahezu gleicher Effizienz der beiden Systeme der Δ Ct-Wert auch bei unterschiedlicher RNA-Konzentration gleich bleiben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ct-Werte für das 18S rRNA-System mit Halbierung der Startkonzentration um einen Zyklus zunehmen, während sie für das IFN γ -System 1 bei abnehmender RNA-Konzentration um mehr als einen Zyklus ansteigen (vgl. Tabelle 6). Der Effizienzvergleich von IFN γ -Primer-Sonden-System 1 und 18S rRNA zeigt, dass in Folge dessen mit abnehmender Gesamt-RNA-Konzentration der Δ Ct-Wert zunimmt.

Tabelle 6: Effizienzvergleich von IFN γ -Primer-Sonden-System 1 und 18S rRNA

Startkonzentration (ng Gesamt-RNA)	IFN γ (durchschn. Ct)	18S rRNA (durchschn. Ct)	Δ Ct (IFN γ - 18S rRNA)
1	27,34	14,44	12,9
0,5	28,43	15,29	13,14
0,25	29,47	16,19	13,28
0,125	30,38	17,14	13,24
0,063	31,93	18,14	13,79
0,032	32,64	19,07	13,57
0,016	34,29	20,24	14,05
0,008	35,58	21,39	14,19

Der Vergleich der Effizienzen von IFN γ -Primer-Sonden-System 2 und 18S rRNA ergab dagegen keine konzentrationsabhängige Veränderung des Δ Ct-Werts (vgl.

Tabelle 7). Für beide Systeme konnte bei Halbierung der Gesamt-RNA-Startkonzentration ein Anstieg der Zyklenzahl um einen Zyklus nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Effizienzvergleich von IFN γ -Primer-Sonden-System 2 und 18S rRNA

Startkonzentration (ng Gesamt-RNA)	IFN γ (durchschn. Ct)	18S rRNA (durchschn. Ct)	Δ Ct (IFN γ - 18S rRNA)
1	27,03	15,08	11,95
0,5	27,94	16,06	11,88
0,25	29,18	17,1	12,08
0,125	30,12	17,89	12,23
0,063	30,95	19,04	11,91
0,032	31,99	20,09	11,9
0,016	33,02	21,05	11,97

Beurteilung der gewonnenen Meßdaten

Für die Beurteilung der mit verschiedenen Primer-Sonden-Paaren gewonnenen Meßdaten wurden im Folgenden die Ergebnisse anhand der Korrelationsanalyse und der Regressionsgeraden dargestellt (vgl. Kapitel 3.2.5.1).

In Abb. 12-15 sind die Wertepaare (log ng RNA/ Ct) in einem Diagramm aufgetragen, wobei die Werte der Abszisse die logarithmisch (log) transformierte RNA-Startkonzentration darstellen und die Werte der Ordinate die Ct-Werte in Abhängigkeit von IFN γ -Primer-Sonden-System und der internen Prozeßkontrolle 18S rRNA.

In den so entstandenen Punktwolken ist zusätzlich die Regressionsgerade eingezeichnet. Rechts neben der Abbildung ist jeweils das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten (R^2 = Bestimmtheitsmass) und die Regressionsgeradengleichung ($y = mx + b$) angegeben. Bei einem PCR-System, bei dem mit Halbierung der eingesetzten log ng Gesamt-RNA- bzw. cDNA-Menge die Zyklenzahl um einen Zyklus steigt, würden die Wertepaare auf einer Geraden mit der Steigung 3,3 liegen [Steigung (m) = 3,3 oder $-3,3$] und $R^2 = 1$.

Abb. 12 bis 14 zeigen, dass das IFN γ -Primer-Sonden-System 2 – sowie das 18S rRNA-System – eine Steigung von 3,3 und ein Bestimmtheitsmass von 0,99 aufweist und das Primer-Sonden-System 2 damit dem IFN γ -Primer-Sonden-System 1 (Steigung = 3,88) überlegen ist.

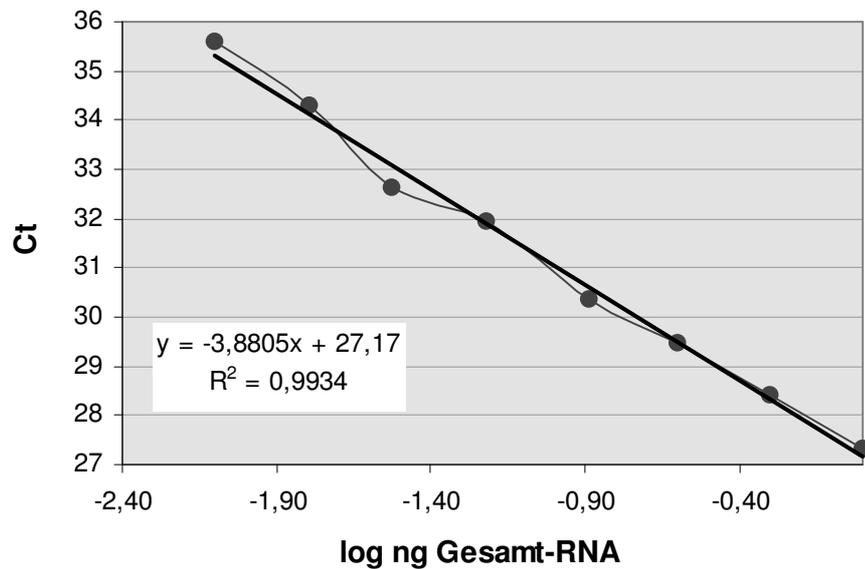


Abb.12: Nachweis der Effizienz des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 1

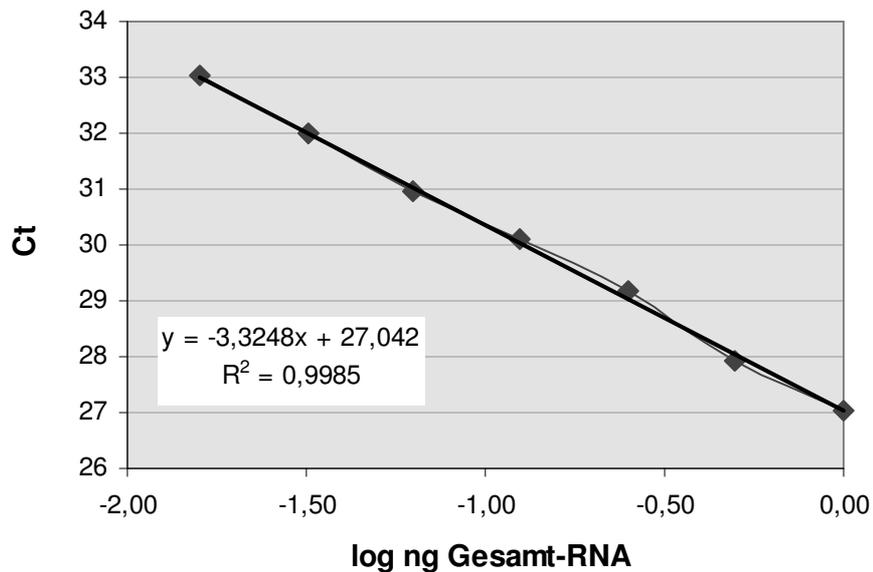


Abb.13: Nachweis der Effizienz des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 2

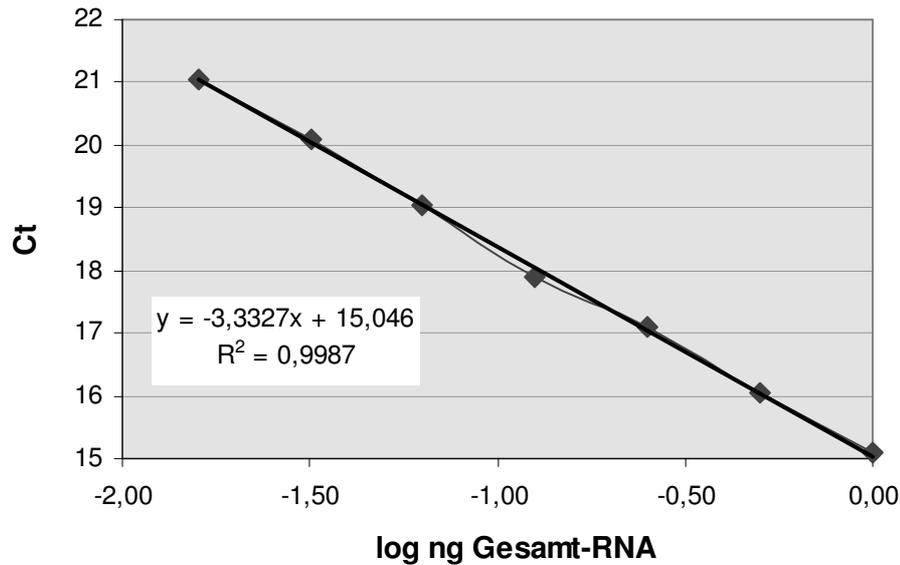


Abb.14: Nachweis der Effizienz des 18S rRNA-Primer-Sonden-Systems

Für einen direkten Vergleich der Effizienzen von IFN γ -Primer-Sonden-System 1 bzw. 2 und dem 18S rRNA-System wurde mit Hilfe der ermittelten Wertepaare (log ng RNA/ Δ Ct) nachfolgende Diagramme (Abb. 15-17) erstellt. In diesen Diagrammen stellen die Werte der Abszisse wiederum die log transformierte RNA-Startkonzentration dar und diejenigen der Ordinate die Δ Ct-Werte. Bei nahezu gleichen Effizienzen der beiden untersuchten Systeme würden die Δ Ct-Werte in Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Konzentration annähernd gleich bleiben und damit die Wertepaare auf einer Geraden liegen, deren Steigung sich 0 nähert [Steigung (m) $<0,1$ oder $>0,1$] und $R^2 = 1$.

Das Ergebnis in Abb.15 bestätigt, dass sich die Effizienzen des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 1 und des 18S rRNA-Systems unterscheiden, was sich in der Regressionsgeraden widerspiegelt, deren Steigung mit $-0,59$ größer ist als $-0,1$. Dagegen zeigt das Diagramm für den Effizienzvergleich des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 2 und des 18S rRNA-Systems (Abb.16) eine nahezu waagerechte Regressionsgerade ($m = 0,0079$). Für die Überprüfung dieses Ergebnisses, wurde cDNA von drei Hunden gewonnen und die verdünnte cDNA jeweils mit zwei verschiedenen 18S rRNA-Chargen eingesetzt. Da sich das Ergebnis in diesen Wiederholungsversuchen bestätigen ließ, wurde das IFN γ -Primer-Sonden-System 2

für die quantitative „TaqMan®“-PCR zum Nachweis caniner IFN γ -mRNA aus Hundeblood eingesetzt.

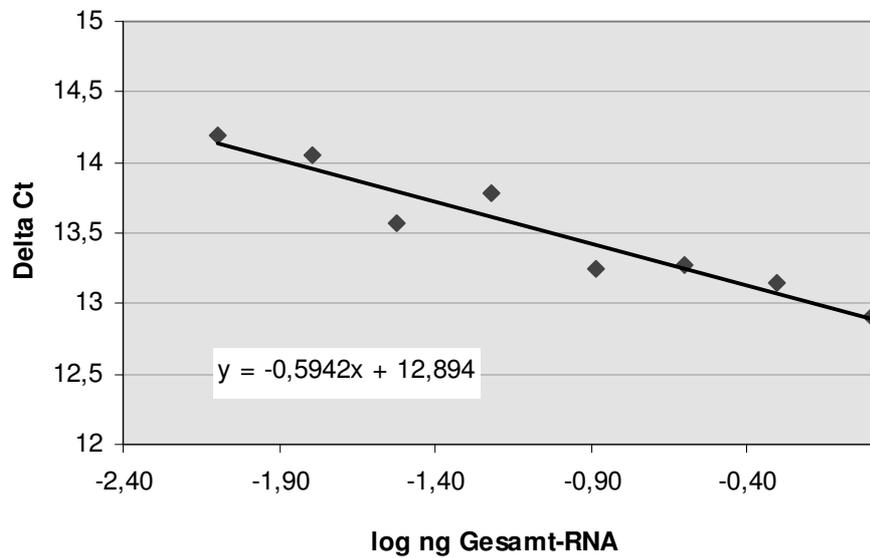


Abb.15: Effizienzvergleich des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 1 und des 18S rRNA-Systems

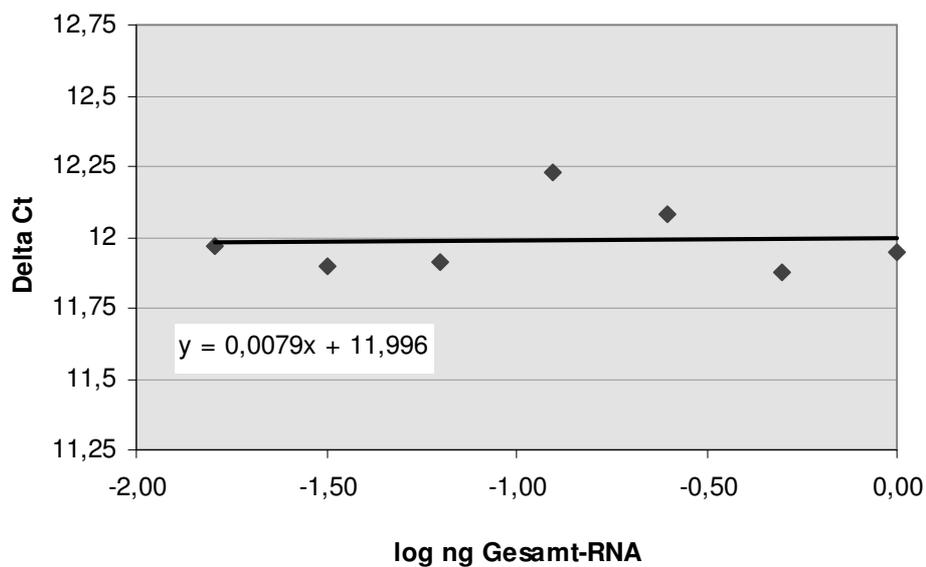


Abb.16: Effizienzvergleich des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 2 und des 18S rRNA-Systems

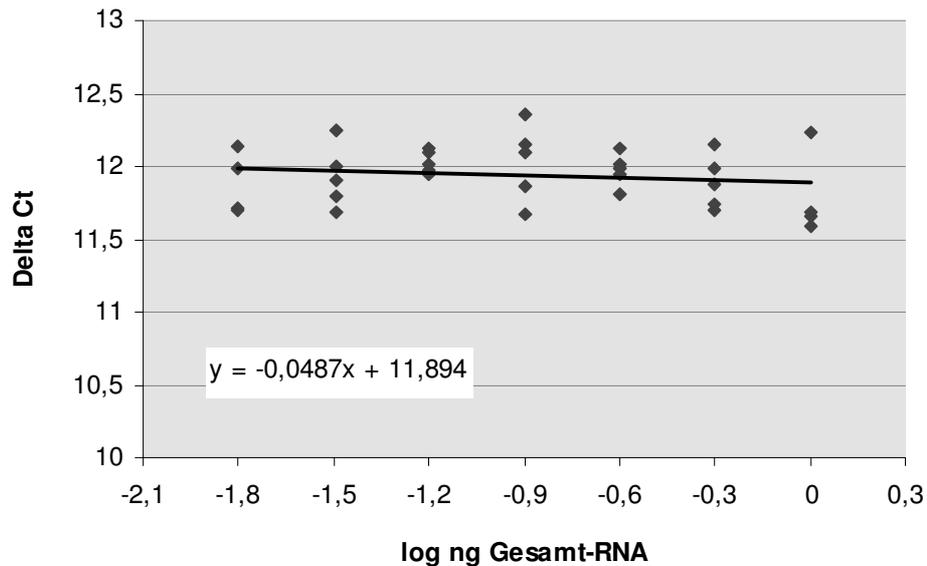


Abb.17:Wiederholungsversuche: Effizienzvergleich des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 2 und des 18S rRNA-Systems

4.1.2.5.2 Effizienzvergleich des ausgewählten IFN γ -Primer-Sonden-Systems und des GAPDH-Primer-Sonden-Systems

Analog zum Kapitel 4.1.2.5 wurde GAPDH als interne Systemkontrolle für den Effizienzvergleich mit dem ausgewählten IFN γ -Primer-Sonden-System eingesetzt. Das Ergebnis wies darauf hin, dass die beiden Systeme eine annähernd gleiche Amplifikationseffizienz zeigen (vgl. Abb.18) und aus diesem Grunde in der quantitativen „TaqMan[®]“-PCR zum Nachweis caniner IFN γ -mRNA miteinander verrechnet werden können.

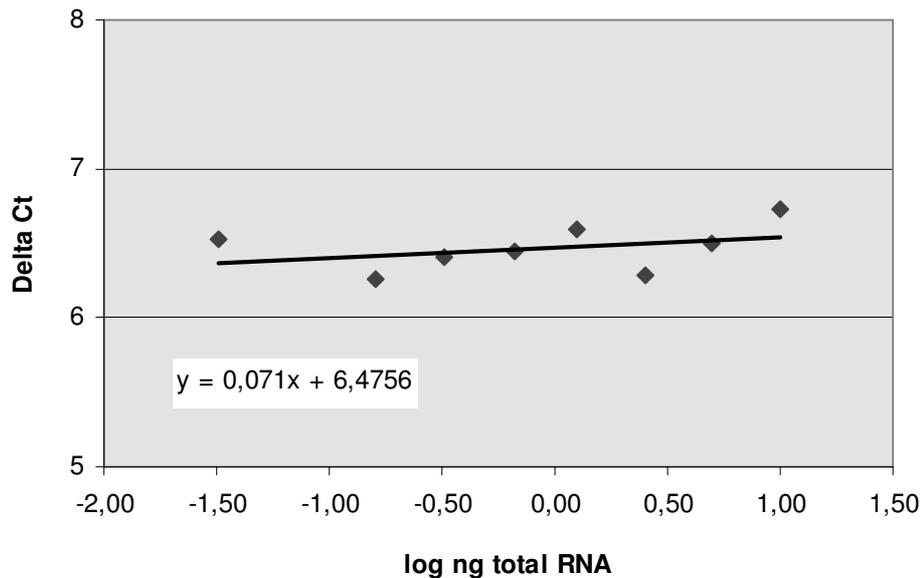


Abb.18: Effizienzvergleich des IFN γ -Primer-Sonden-Systems 2 und des GAPDH-Systems

Da die Effizienz von IFN γ -Primer-Sonden-System 2 eine größere Übereinstimmung zum 18S rRNA-System ($m = 0,0079$) als zum GAPDH-System ($m = 0,071$) zeigt, wird für die folgenden Versuche 18S rRNA zur Standardisierung eingesetzt.

4.2 Untersuchung des IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutlymphozyten von Hunden

4.2.1 Validierung der quantitativen „TaqMan[®]“-PCR

Für die Untersuchung zur Wirkung von Baypamune[®] bei Hunden sollte den Tieren Baypamune[®] appliziert werden und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation der IFN γ -mRNA-Gehalt im Blut relativ zum Zeitpunkt vor der Applikation bestimmt werden. Um die etablierte Methode (Gewinnung von Hundeblood → Extraktion der RNA → cDNA-Synthese → Q-PCR) in den geplanten Experimenten anwenden zu können, musste das Nachweissystem zunächst validiert werden.

4.2.1.1 Bestimmung der „Intra-assay-Varianz“

Bei der Bestimmung der „Intra-assay-Varianz“ erfolgt die Berechnung der Variationskoeffizienten durch Vergleich der Ergebnisse einer Probe in einem Testansatz. In der vorliegenden Arbeit dient sie zur Ermittlung der Schwankungen innerhalb der etablierten „TaqMan[®]“-PCR. Hierfür wurde dieselbe cDNA eines

Hundes zehnmal in einen „TaqMan®“-PCR-Lauf eingesetzt. Mit Hilfe des maximalen und minimalen ΔCt -Wertes wurde die n-fache Zunahme bzw. Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Mittelwert (MW) aller ermittelten ΔCt 's bestimmt. Die Werte aus der Dreifachbestimmung sind in Tabelle 8 und Abb.19 dargestellt.

Tabelle 8: Bestimmung der „Intra-assay-Varianz“

Versuch	MW ΔCt 's	ΔCt max.	ΔCt min.	MW $\Delta Ct - \Delta Ct$ max.	Zunahme der mRNA-Menge $2^{-\Delta\Delta Ct}$	MW $\Delta Ct - \Delta Ct$ min.	Abnahme der mRNA-Menge $-1 / 2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	18,45	18,8	17,87	-0,35	1,27	0,58	-1,49
2	19,5	19,7	19,09	-0,2	1,15	0,41	-1,33
3	11,46	11,98	11,03	-0,52	1,43	0,43	-1,35

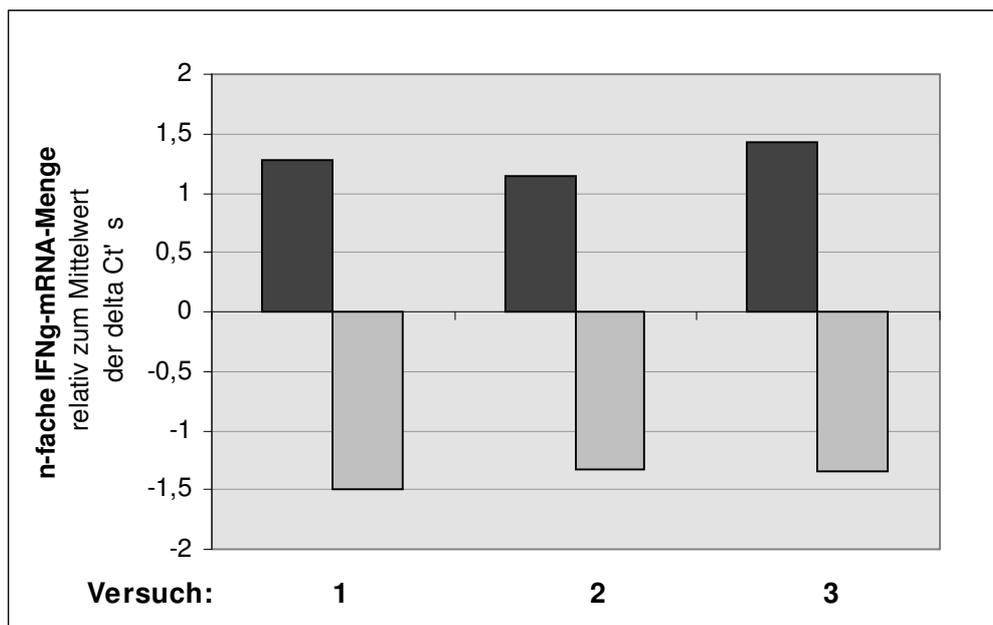


Abb.19: Ermittlung der system-bedingten Schwankungen („Intra-assay-Varianz“). In einem Versuch wurde dieselbe cDNA eines Hundes zehnmal in einen PCR-Lauf eingesetzt. Dargestellt ist jeweils die n-fache Induktion (maximaler ΔCt) bzw. Reduktion (minimaler ΔCt) der IFN γ -Expression relativ zum ΔCt Mittelwert aller Proben.

Diese Untersuchungen ergaben, dass eine bis zu 1,5fache Zunahme bzw. 1,5fache Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge auf System-bedingte Schwankungen zurückzuführen ist.

4.2.1.2 Bestimmung der „Inter-assay-Varianz“

Bei der „Inter-assay-Varianz“ erfolgt die Berechnung der Variationskoeffizienten durch den Vergleich von unterschiedlichen Testansätzen mit einer Probe. In der vorliegenden Arbeit bezeichnet sie Schwankungen, die aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen (z.B. an verschiedenen Versuchstagen) zustande kommen. Um diese Varianzen zu ermitteln, wurde von einem Hund an einem Tag Blut entnommen, in neun Proben aufgeteilt und an vier aufeinanderfolgenden Tagen aufgearbeitet. Die gewonnenen cDNA-Proben wurden in einen PCR-Lauf eingesetzt und dieser Lauf viermal an vier Tagen wiederholt. Die Auswertung eines Laufs erfolgte durch Bestimmung der n-fachen Induktion (maximaler ΔCt) bzw. Reduktion (minimaler ΔCt) der IFN γ -Expression relativ zum ΔCt Mittelwert aller Proben. Die Werte sind in Tabelle 9 und Abb.20 dargestellt.

Tabelle 9: Bestimmung der „Inter-assay-Varianz“

Versuch	MW ΔCt 's	ΔCt max.	ΔCt min.	MW ΔCt - ΔCt max.	Induktion $2^{-\Delta\Delta Ct}$	MW ΔCt - ΔCt min.	Reduktion $1/2^{-\Delta\Delta Ct}$
Tag 1/ 9 Proben	18,54	19,02	17,34	-0,48	1,39	1,20	-2,30
Tag 2/ 9 Proben	18,33	19,47	17,75	-1,14	2,20	0,58	-1,49
Tag 3/ 9 Proben	18,32	19,14	17,69	-0,82	1,77	0,63	-1,55
Tag 4/ 9 Proben	17,96	18,69	17,15	-0,73	1,66	0,81	-1,75

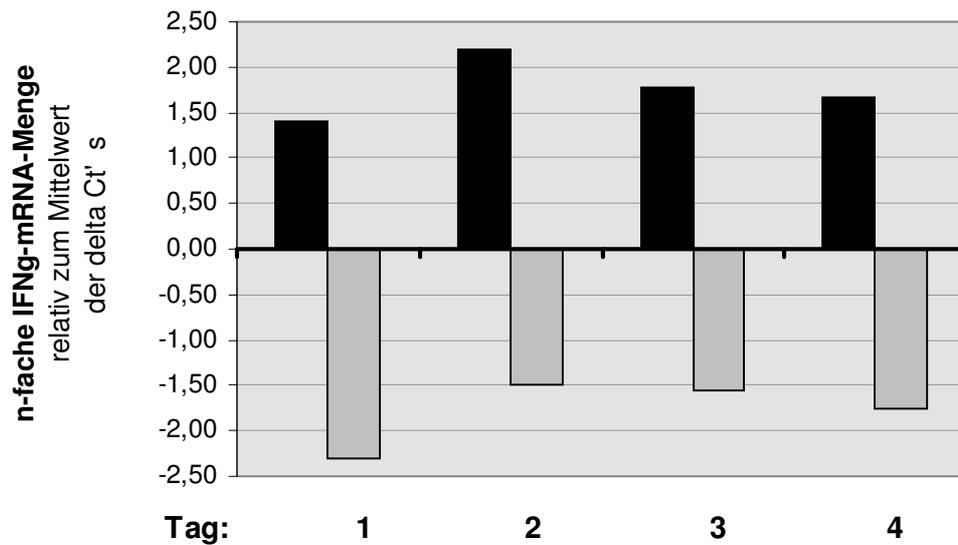


Abb.20: Ermittlung der Schwankungen aufgrund der Versuchsdurchführung („Inter-assay-Varianz“). An einem Tag wurden jeweils 9 Proben desselben Hundes in einen PCR-Lauf eingesetzt. Dargestellt ist die n-fache Induktion (maximaler ΔCt) bzw. Reduktion (minimaler ΔCt) der IFN γ -Expression relativ zum ΔCt Mittelwert aller Proben.

Wiederholte Untersuchungen ergaben, dass eine bis zu 2,5fache Zunahme bzw. 2,5fache Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge auf Schwankungen aufgrund der Probenverarbeitung zurückzuführen ist.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der „Intra-„ und „Inter-assay-Varianz“-Bestimmung ist bei den weiteren Untersuchungen, erst eine 2,5fache Zu- bzw. Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge als relevant zu bewerten.

4.2.1.3 Vergleich der Basislevel des IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutlymphozyten aller Hunde

Für einen Vergleich des IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutlymphozyten der Hunde ($n = 12$) wurde den Tieren zur gleichen Zeit Blut entnommen und aufgearbeitet. Nach Durchführung der „TaqMan[®]“-PCR wurde die Zunahme bzw. Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum ΔCt -Mittelwert aller Proben bestimmt (vgl. Abb.21).

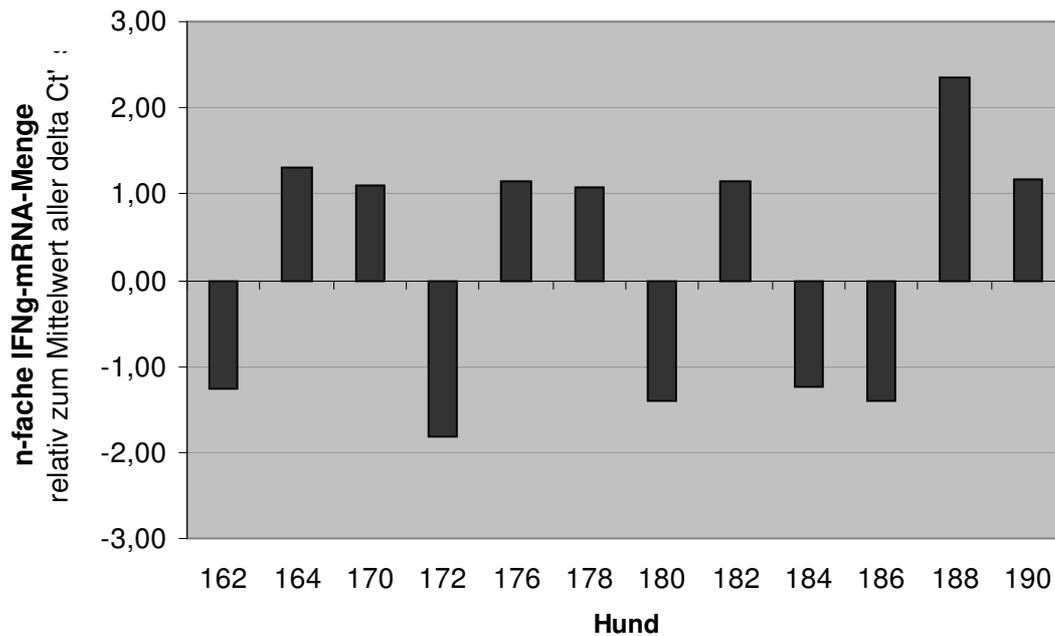


Abb.21: Vergleichende Analyse der IFN γ -mRNA-Menge in Blutlymphozyten von Hunden (n = 12) nach Blutentnahme zum selben Zeitpunkt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die IFN γ -mRNA-Mengen des untersuchten Hundesblutes unter- bzw. oberhalb der ermittelten Grenzwerte von 2,5facher Zu- bzw. Abnahme liegen. Zwischen den Basiswerten des IFN γ -mRNA-Gehalts in den Blutlymphozyten der einzelnen Hunde konnte demnach kein relevanter Unterschied ermittelt werden. Dieses Ergebnis konnte in einem Wiederholungsversuch, der unter Zuhilfenahme derselben cDNA und unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, bestätigt werden.

4.2.1.4 Ermittlung der Tagesschwankungen des IFN γ -mRNA-Gehalts in caninen Blutlymphozyten

Um tageszeitliche Schwankungen der IFN γ -mRNA-Menge in Blutlymphozyten von Hunden zu prüfen, wurde von zwei Tieren über 24 Stunden stündlich Blut entnommen und die Ergebnisse der „TaqMan[®]“-PCR verglichen. Abb.22 zeigt die ermittelte IFN γ -mRNA-Menge des Blutes von Hund 170 (Hd170) und Hund 178 (Hd 178) relativ zum Mittelwert der Δ Ct-Werte.

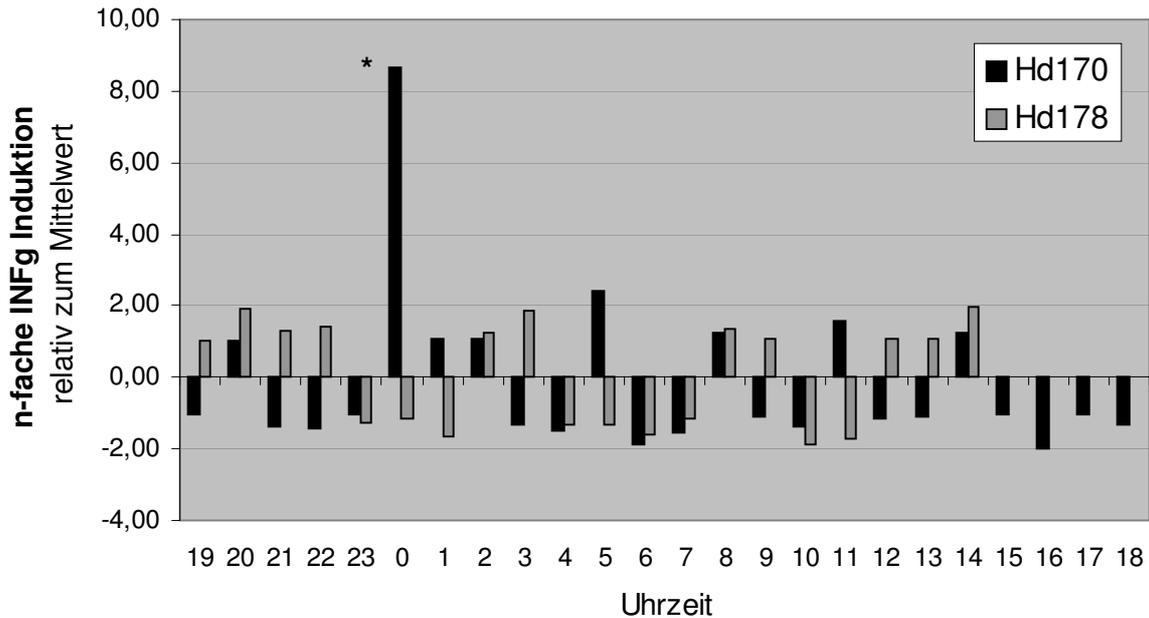


Abb.22: Nachweis der Schwankungen des IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutlymphozyten zweier Hunde im Verlauf eines Tages. Der mit * gekennzeichnete Wert wurde nicht in die Auswertung einbezogen.

Die IFN γ -mRNA-Mengen in den caninen Blutlymphozyten schwankten im Tagesverlauf um den Wert 2,5. Da diese Messschwankungen innerhalb der für das Testsystem evaluierten Varianzgrenzen liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die IFN γ -Expression des Hundes keinen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt.

4.2.2 Untersuchung des IFN γ -mRNA-Gehalts nach Stimulation caniner PBMCs mit Baypamune[®]

Um eine mögliche Induktion der IFN γ -Expression nach In-vitro-Stimulation von caninen PBMCs mit Baypamune[®] zu prüfen, wurden ca. 1 Millionen PBMCs mit Baypamune[®] (Titeräquivalent: 5×10^5 TCID₅₀) kultiviert und RNA zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert, um sie in die RT-PCR einzusetzen. Als Kontrollen wurden PBMCs mit Placebo, das Polygeline in einer der Baypamune[®]-Dosis entsprechenden Menge enthält, und PBMCs ohne Zusatz in den üblichen Medien (Negativkontrolle) inkubiert (vgl. Kapitel 3.2.2.4). Anschließend erfolgte die Ermittlung der IFN γ -mRNA-Menge zu den unterschiedlichen RNA-Extraktionszeitpunkten relativ zur IFN γ -mRNA-Menge des Ausgangswerts (Extraktion der RNA direkt nach Gewinnung der PBMCs).

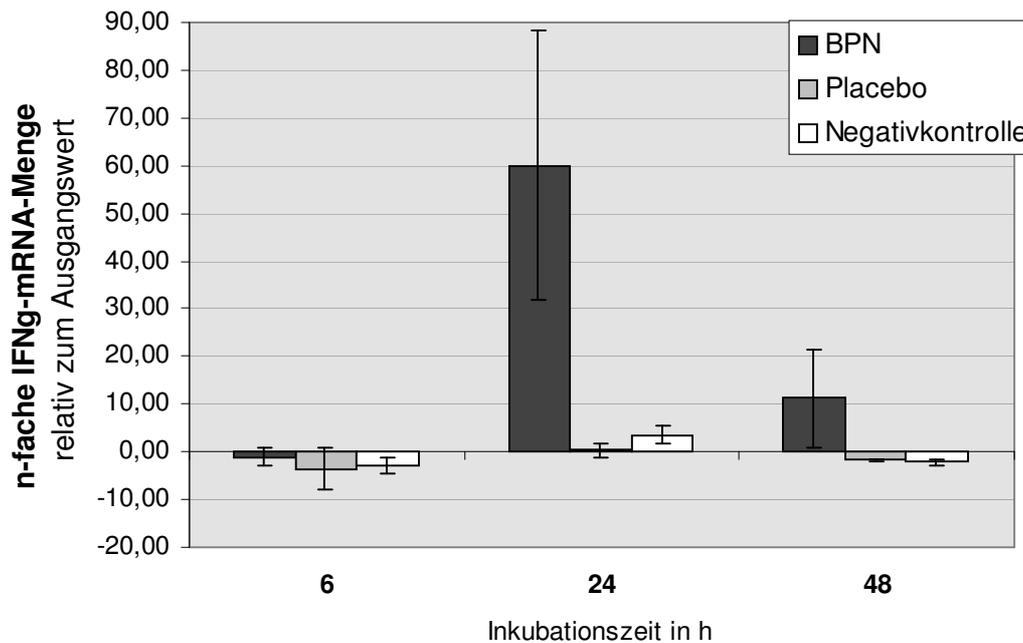


Abb.23: Nachweis der IFN γ -mRNA-Menge nach sequenzieller (h) Stimulation caniner PBMCs mit Baypamune[®]. Die graphische Darstellung beinhaltet die Mittelwerte der n-fachen IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Ausgangswert aus drei Versuchen und jeweils zwei Ansätzen pro Zeitwert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von Baypamune[®] nach 24 Stunden Inkubation die IFN γ -mRNA-Menge in caninen PBMCs im Mittel 60fach gegenüber der IFN γ -mRNA-Menge des Ausgangswerts induziert. Nach 48stündiger Stimulation konnte nur noch eine durchschnittlich zehnfache Induktion gemessen werden. Daneben ließ sich auch in unstimulierten Zellen (Negativkontrollen) nach 24 Stunden eine bis zu fünffache Steigerung der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Ausgangswert nachweisen. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden zeigte sich sowohl in den Placebo- als auch in den Negativkontrollen eine über 2,5fache Abnahme des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts.

4.2.3 Untersuchung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach Baypamune[®]- Applikation

4.2.3.1 Experiment I: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts nach subkutaner Applikation von Baypamune[®]

Um die In-vitro-Stimulation von caninen PBMCs (vgl. Kapitel 4.2.2) mit Baypamune[®] mit den Verhältnissen *in vivo* zu vergleichen, wurde bei Hunden (n = 6) nach einmaliger subkutaner Injektion von 1 ml Baypamune[®] (Titeräquivalent: 1×10^7 TCID₅₀/ml) die relative IFN γ -mRNA-Menge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten sechs Hunde, die in gleicher Weise 1 ml des Placebopräparates erhielten (vgl. Kapitel 3.2.4.1).

Um die IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Ausgangswert vor Applikation zu ermitteln und damit einen Vergleich vor und nach der Stimulation zu gewährleisten, wurde an drei Tagen vor der Baypamune[®] bzw. Placebo-Applikation Blut entnommen und der Mittelwert der IFN γ -mRNA-Menge (= Ausgangswert) festgehalten.

Nach subkutaner Applikation von Baypamune[®] konnte zu keinem Meßzeitpunkt ein erhöhter oder erniedrigter relativer IFN γ -mRNA-Gehalt nachgewiesen werden. Alle Werte lagen im Bereich der System-abhängigen Schwankungen. Die Ergebnisse sind in Abb.24 zusammengefasst.

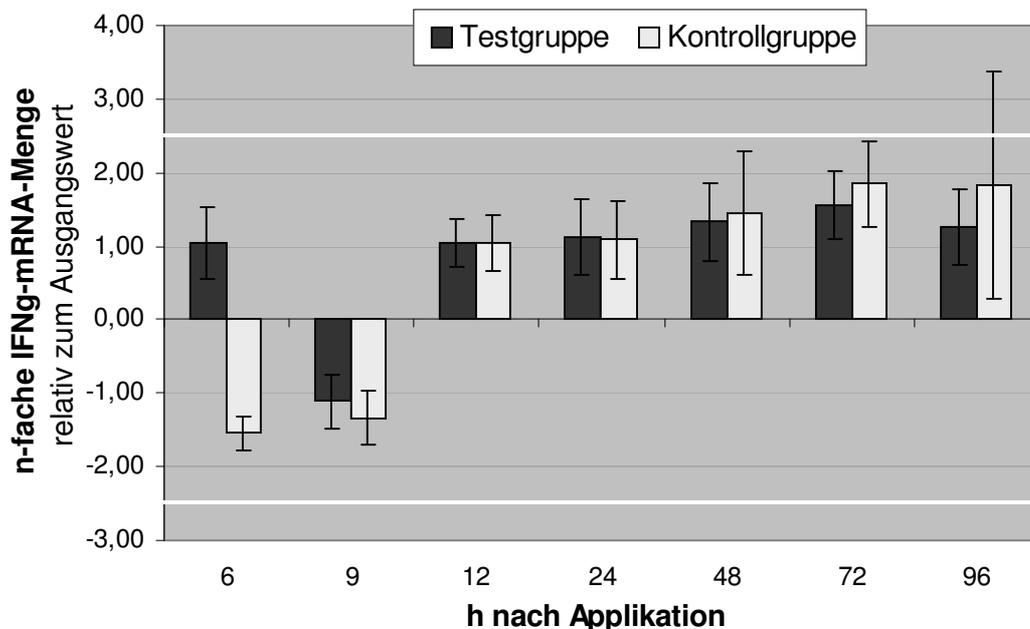


Abb.24: Nachweis des Verlaufs der relativen IFN γ -mRNA-Menge von Testgruppe und Kontrollgruppe nach subkutaner Applikation von Baypamune[®] bzw. Placebo. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Bestimmungen bei sechs Tieren pro Gruppe. Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

Die Darstellungen der Einzelwerte in Abb.25 und Abb.26 verdeutlichen, dass bei keinem der untersuchten Hunde eine Zu- oder Abnahme der relativen IFN γ -mRNA-Menge ober- bzw. unterhalb der validierten Grenzwerte nachzuweisen war.

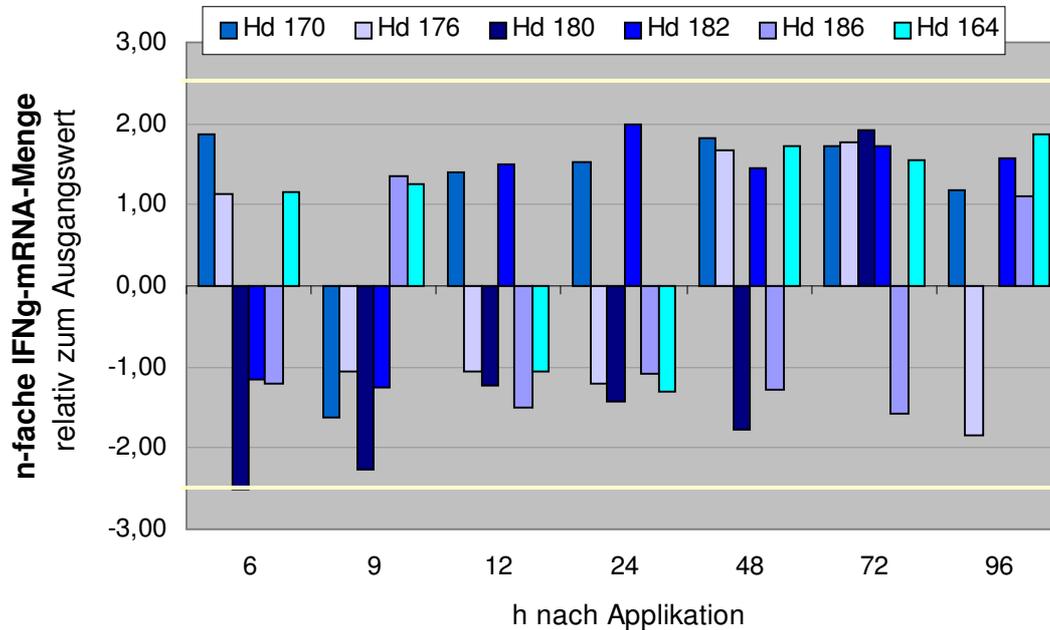


Abb.25: Verlauf des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts von Blutproben nach subkutaner Applikation von Baypamune[®] in Hunden (Hd = Hund). Angegeben sind die Einzelwerte von sechs Hunden. Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

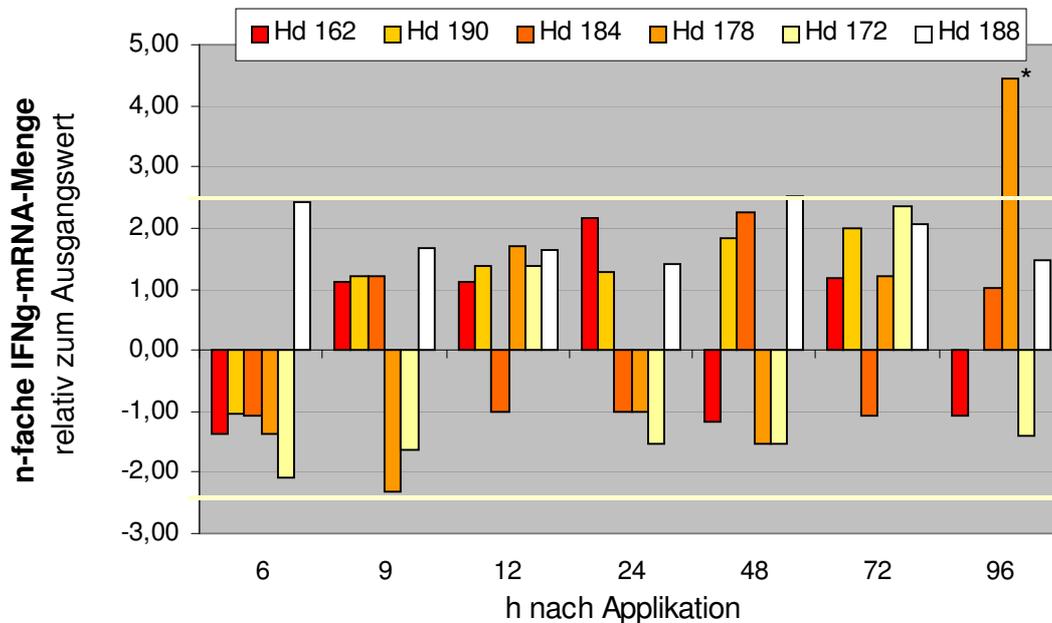


Abb.26: Verlauf des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts von Blutproben nach subkutaner Applikation von Placebo in Hunden (Hd = Hund). Angegeben sind die Einzelwerte von sechs Hunden. Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

* dieser Wert wurde nicht in die Bewertung einbezogen

4.2.3.2 Experiment II: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach subkutaner Applikation der 60fachen Baypamune[®]-Dosis

Um auszuschließen, dass die ausbleibende IFN γ -Induktion nach subkutaner Applikation einer Dosis Baypamune[®] (Titeräquivalent: 10^7 TCID₅₀) in einer zu geringen Baypamune[®]-Dosis begründet war, wurde im folgenden Experiment die Dosis stark erhöht. Dazu wurde vier Hunden die 60fache Dosis (entspricht einem Titeräquivalent von 6×10^8 TCID₅₀) Baypamune[®] in 2 ml Injektionswasser subkutan injiziert. Als Referenz erhielten zwei Hunde die entsprechende Dosis Placebo. Die Blutentnahme geschah an vier Tagen vor der Applikation für die Bestimmung des Ausgangswertes und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation zur Ermittlung der Zu- bzw Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Mittelwert der Ausgangswerte (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

Klinisch zeigte sich bei allen Hunden der Baypamune[®]-Gruppe ca. acht Stunden nach subkutaner Injektion am Applikationsort eine bis zu 6 x 6 cm große, schmerzhaft und warme Schwellung. Nach ca. 24 Stunden konnte diese flächenhafte Schwellung bei keinem Hund mehr beobachtet werden. Die Körpertemperatur blieb bei allen Hunden während des Untersuchungszeitraumes im Normbereich. Eine relevante Veränderung der IFN γ -mRNA-Menge liess sich auch mit dieser Baypamune[®]-Dosis nicht induzieren (Abb. 27).

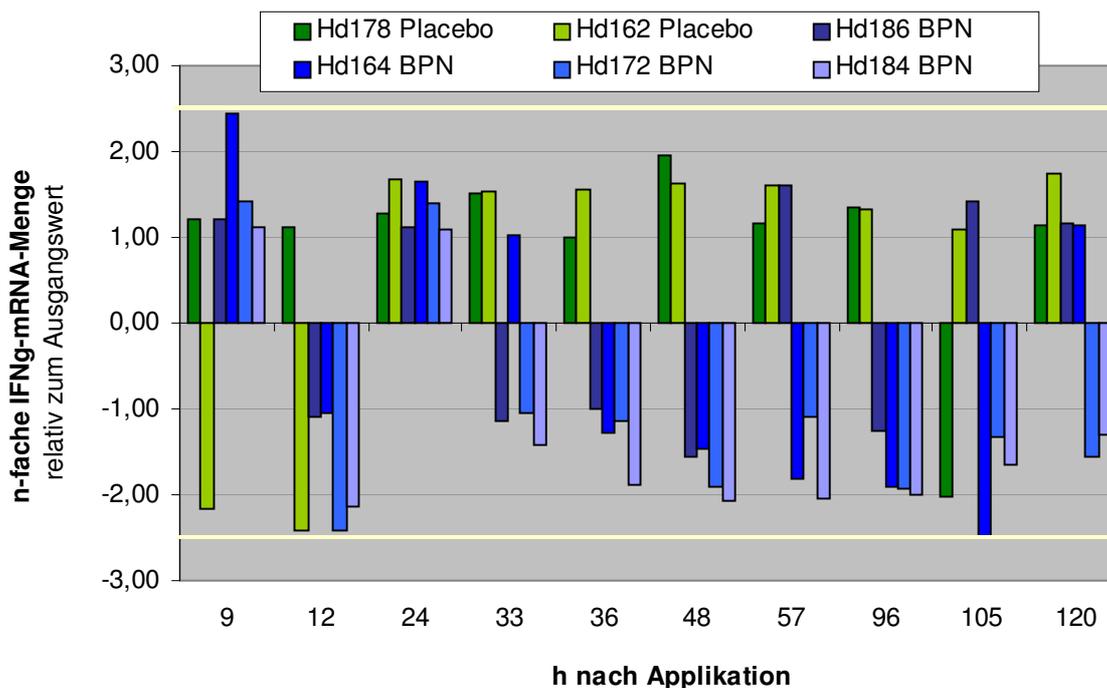


Abb.27: Nachweis des Verlaufs des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben nach subkutaner Applikation von Baypamune[®] (BPN) mit dem Titeräquivalent 6×10^8 TCID₅₀ bzw. der entsprechenden Menge Placebo in Hunden (Hd = Hund). Angegeben sind die Einzelwerte von zwei Hunden der Placebo- und vier Hunden der Baypamune[®]-Gruppe. Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

4.2.3.3 Experiment III: Ermittlung des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach intramuskulärer Applikation der zweifachen Baypamune[®]-Dosis

Um zu prüfen, ob der Applikationsweg des Baypamunes[®] am Hund Einfluss auf die IFN γ -mRNA-Menge im Blut hat wurde zwei Hunden Baypamune[®] mit dem Titeräquivalent 2×10^7 TCID₅₀ intramuskulär appliziert und an drei Tagen vor (Mittelwert der Ausgangswerte) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation der IFN γ -mRNA-Gehalt in Blutproben gemessen (vgl. Kapitel 3.2.4.3).

Die Ergebnisse in Abb. 28 zeigen, dass auch nach intramuskulärer Applikation von Baypamune[®] keine erhöhte bzw. erniedrigte IFN γ -mRNA-Menge relativ zur Expression vor der Applikation nachgewiesen werden konnte.

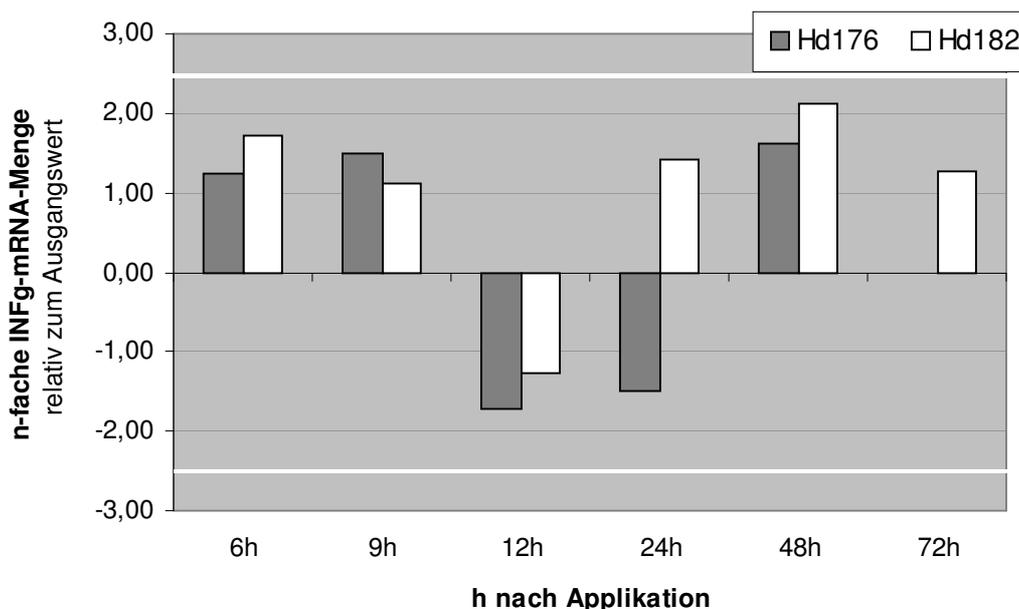


Abb.28: Nachweis des Verlaufs der relativen $\text{IFN}\gamma$ -mRNA-Menge nach intramuskulärer Applikation von Baypamune[®] mit dem Titeräquivalent 2×10^7 TCID₅₀ in Hunden (Hd = Hund). Angegeben sind die relativen IFN -mRNA-Mengen von zwei Hunden zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten nach Applikation des Immunmodulators. Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

4.2.3.4 Experiment IV: Ermittlung des relativen $\text{IFN}\gamma$ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach wiederholter Baypamune[®]-Applikation und Impfung

Im folgenden Experiment wurde die relative $\text{IFN}\gamma$ -mRNA-Menge in Blutproben von Hunden nach zweimaliger Baypamune[®]-Applikation und nachfolgender Injektion eines polyvalenten Impfstoffes (Virbagen[®]-canis SHA2PPi/LT) untersucht. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, ob die prophylaktische Gabe von Baypamune[®] den immunsupprimierenden Effekt nach Applikation eines polyvalenten Impfstoffes, der eine Kombination von lebenden, attenuierten Viren enthält, aufheben kann. Des Weiteren sollte der Einfluss einer zweimaligen Applikation des Immunmodulators auf die relative $\text{IFN}\gamma$ -mRNA-Menge geklärt werden.

Als Parameter wurde der relative $\text{IFN}\gamma$ -mRNA-Gehalt, die absolute Lymphozytenzahl sowie die mitogene Stimulierbarkeit vor und nach Impfung ermittelt. Hierzu wurde jeweils sechs Hunden (Baypamune[®]-Gruppe: Hd164, 170, 172, 178, 182, 190; Placebo-Gruppe: Hd162, 176, 180, 184, 186, 188) im Abstand von drei Tagen zweimal Baypamune[®] (Titeräquivalent 2×10^7 TCID₅₀) oder Placebo intramuskulär injiziert. Einen Tag nach der zweiten Baypamune[®]-Applikation erfolgte die subkutane

Applikation des polyvalenten Impfstoffes (vgl. Kapitel 3.2.4.4 und Abb.29). Als Kontrolle wurde für jeden der zwölf Hunde der Ausgangswert der Expression durch Blutentnahme an drei verschiedenen Tagen vor Versuchsbeginn bestimmt.

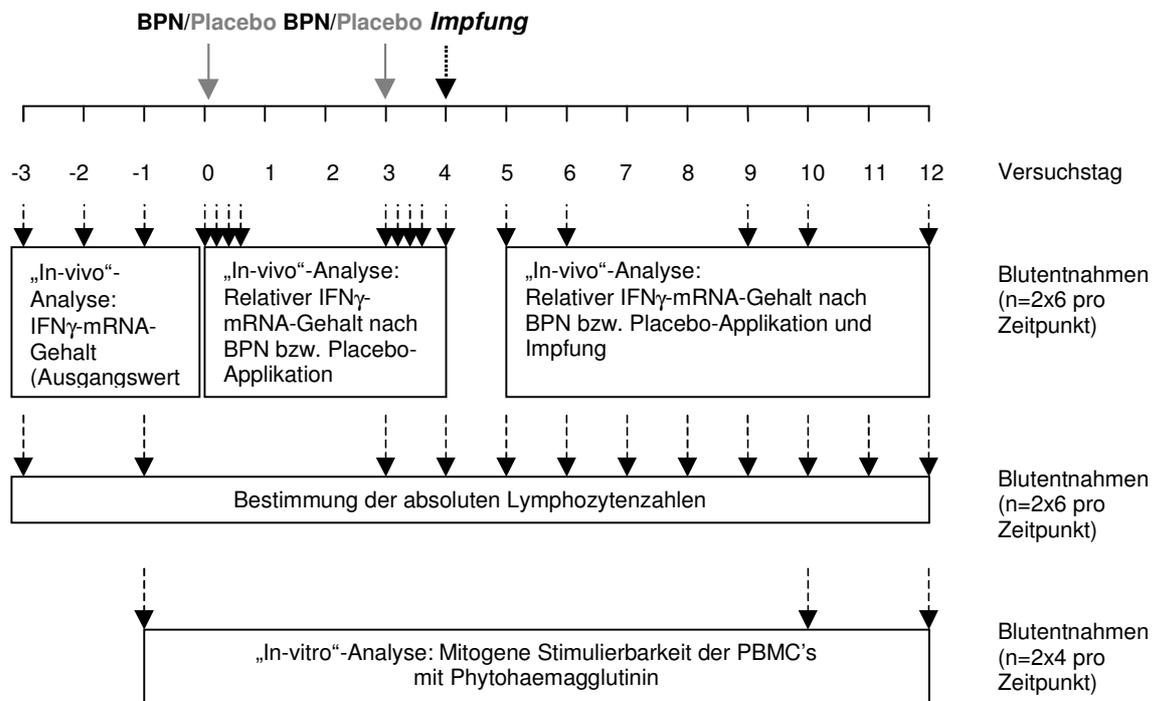


Abb.29: Übersicht der zeitlichen Abläufe der „In-vivo“- und „In-vitro“-Analysen in Experiment IV

In Abb.30 ist die relative IFN γ -mRNA-Menge der Blutproben aller untersuchten Hunde (n = 12) nach der ersten und zweiten Baypamune[®]- bzw. Placebo-Injektion und vor Impfung dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass eine Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Ausgangswert durch die zweimalige Gabe von Baypamune[®] ausgeschlossen werden kann. Die Werte liegen im Bereich der System-bedingten Schwankungen.

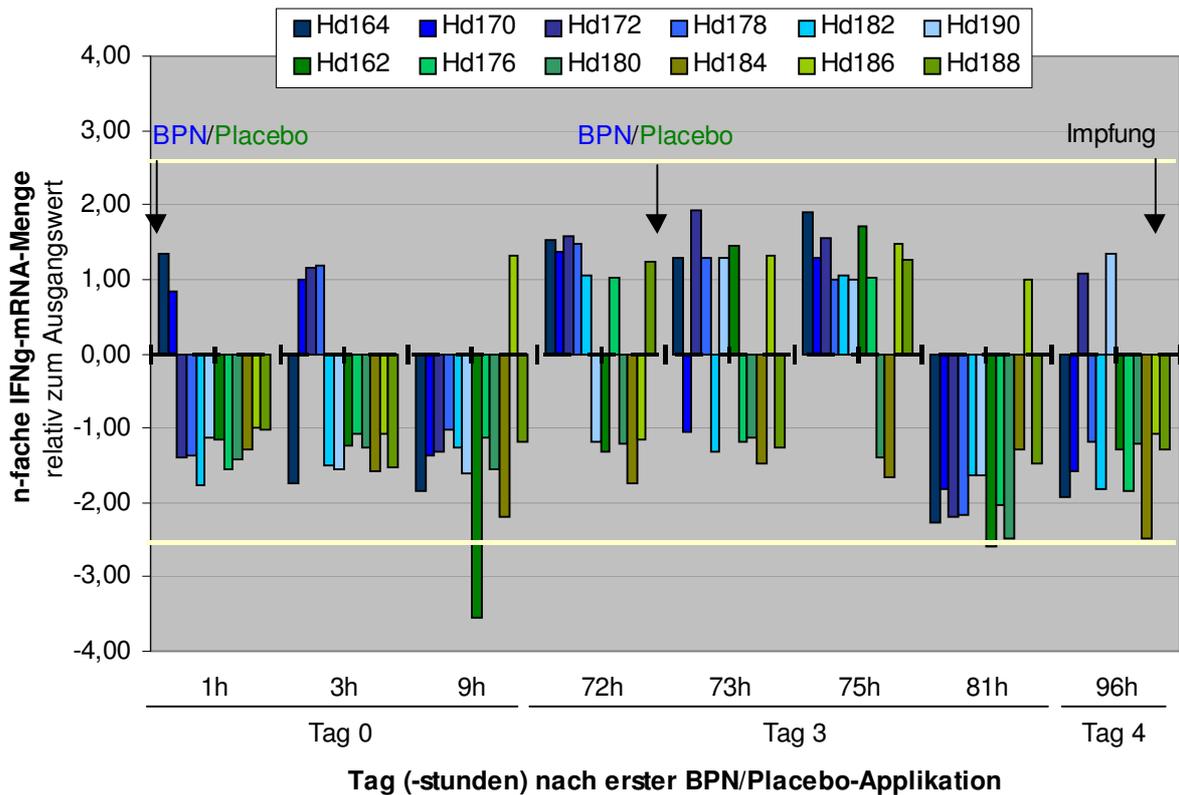


Abb.30: Nachweis des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden zu verschiedenen Zeitpunkten nach zweimaliger intramuskulärer Applikation von Baypamune[®] (blau) bzw. Placebo (grün). Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte. Die Blockpfeile verweisen auf den Zeitpunkt der jeweiligen Baypamune[®] - bzw. Placebo-Injektion und Impfung.
(Zeichenerklärung: Hd = Hund; BPN = Baypamune[®])

Der Nachweis des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben nach zweimaliger Placebo-Applikation und Impfung zeigt, dass es bei allen sechs untersuchten Hunden zu einer Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Ausgangswert kam (vgl. Abb. 31). Die Reduktion unterhalb der validierten Varianzgrenzen erreichte ihr Maximum am ersten Tag (Hd 188) bzw. am zweiten Tag nach Impfung (Hd 162, Hd 176, Hd 180, Hd 184), um am sechsten Tag bei allen Hunden (n = 6) wieder den Ausgangswert zu erreichen.

Die Ergebnisse der Baypamune[®]-Gruppe zeigen, dass es auch nach prophylaktischer Baypamune[®]-Applikation bei drei (Hd 164, Hd 178, Hd 182) von sechs untersuchten Hunden am zweiten Tag nach der Impfung zu einer Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Ausgangswert kam (vgl. Abb.32). In den Blutproben der Hunde 178 und 182 konnte auch am fünften Tag nach Applikation

des polyvalenten Impfstoffes noch eine Abnahme der relativen IFN γ -mRNA-Menge unterhalb der ermittelten Varianzgrenzen festgestellt werden.

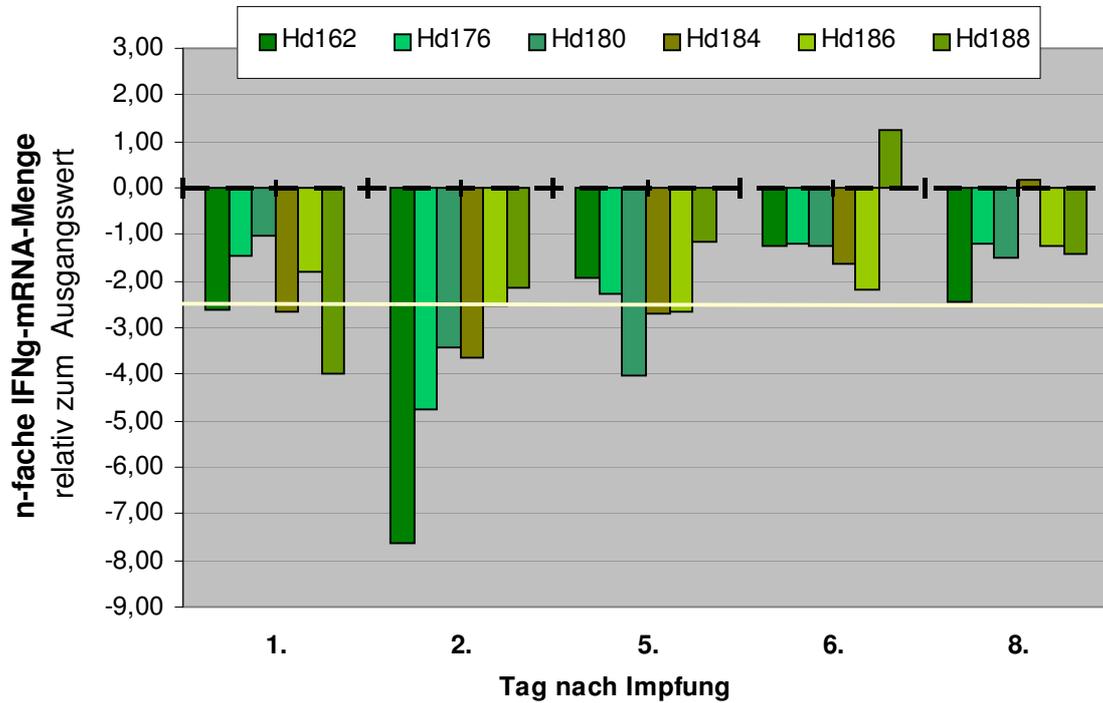


Abb.31: Nachweis des Verlaufs der relativen IFN γ -mRNA-Menge nach zweimaliger intramuskulärer Applikation von Placebo und anschließender Impfung in sechs Hunden (Hd = Hund). Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

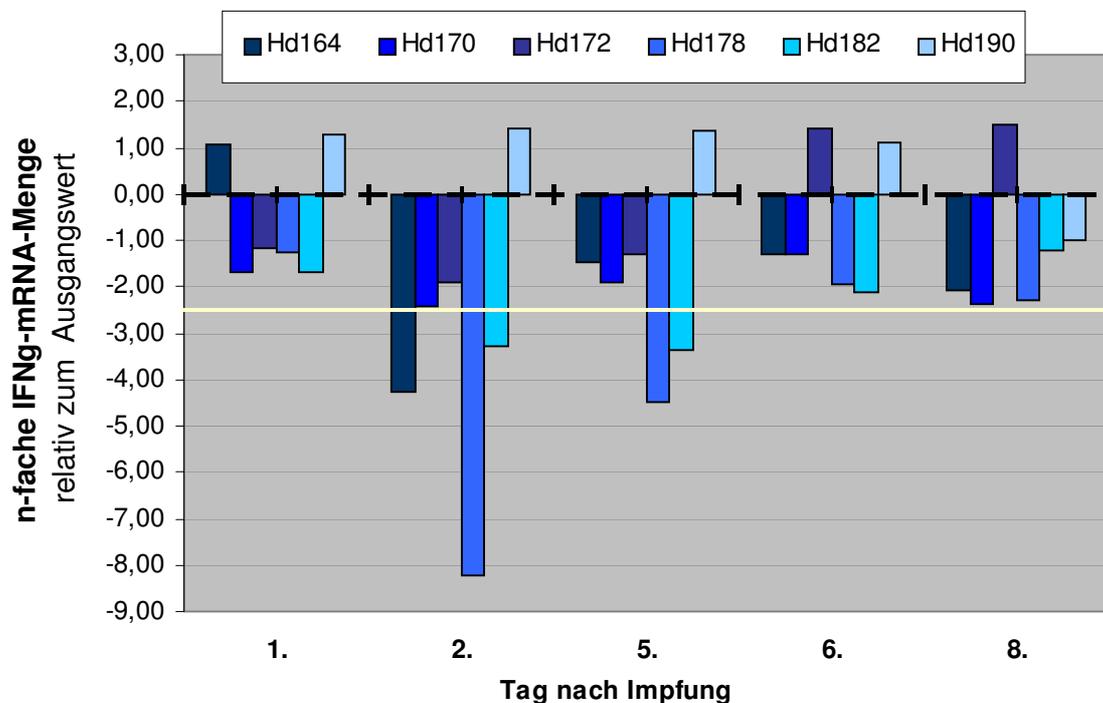


Abb.32: Nachweis des Verlaufs des relativen IFN γ -mRNA-Gehalts in Blutproben von Hunden nach zweimaliger intramuskulärer Applikation von Baypamune[®] und anschließender Impfung in sechs Hunden (Hd = Hund). Die hellen Linien kennzeichnen die validierten Grenzwerte.

4.2.3.4.1 Nachweis der absoluten Lymphozytenzahl nach zweimaliger Baypamune®-Applikation und Impfung

Die im Verlauf des Experiments (vgl. Abb. 29) gemessenen absoluten Lymphozytenzahlen lagen für drei Hunde der Baypamune®-Gruppe und zwei Hunde der Placebo-Gruppe oberhalb des physiologischen Bereichs von $1 - 4,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Referenzbereiche nach Nemi C. Jain, 1993; vgl. Kapitel 3.2.1.3). Die erhöhten Lymphozytenzahlen konnten bei diesen Hunden vor allem drei Tage nach der ersten Baypamune®- bzw. Placebo-Applikation und 2-5 Tage nach subkutaner Injektion der polyvalenten Vakzine gemessen werden. Dabei zeigten die Ausgangswerte von Hund 162 und 164 bereits Lymphozytenzahlen über dem Referenzbereich (vgl. Tabelle 10 und 11).

Tabelle 10: Absolute Lymphozytenzahlen ($\times 10^3/\mu\text{l}$) der Baypamune®-Gruppe vor und nach zweimaliger Baypamune®-Applikation und Injektion der polyvalenten Vakzine

Versuchstag	Hd164	Hd170	Hd172	Hd178	Hd182	Hd190
- 3	4,67	3,53	3,53	3,69	4,08	4,07
- 1	<i>5,29*</i>	3,87	3,65	4,02	4,24	4,07
BPN-Applikation						
+ 3	<i>5,64</i>	3,55	4,68	3,89	4,86	4,18
+ 4	<i>5,42</i>	3,29	4,32	4,21	4,09	3,91
Impfung						
+ 5	4,48	2,93	3,28	4,13	3,85	3,72
+ 6	4,85	3,63	3,99	4,31	4,14	4,99
+ 7	<i>5,25</i>	3,89	4,11	<i>5,46</i>	3,81	<i>5,87</i>
+ 8	<i>5,06</i>	3,22	4,24	<i>5,23</i>	3,8	<i>5,41</i>
+ 9	<i>5,39</i>	3,22	3,94	<i>4,99</i>	4,04	<i>5,28</i>
+ 10	4,04	2,97	3,28	4,08	3,5	<i>4,91</i>
+ 11	<i>4,92</i>	3,19	3,69	5	3,66	3,8
+ 12	4,3	3,06	3,21	3,85	4,04	4,73

*Kursiv gekennzeichnete Werte der Tabellen geben Lymphozytenzahlen oberhalb des Referenzbereiches ($1 - 4,8 \times 10^3/\mu\text{l}$) an

Tabelle 11: Absolute Lymphozytenzahlen ($\times 10^3/\mu\text{l}$) der Placebo-Gruppe vor und nach zweimaliger Placebo-Applikation und Injektion der polyvalenten Vakzine

Versuchstag	Hd162	Hd176	Hd180	Hd184	Hd186	Hd188
- 3	4,5	3,96	3,65	3,05	2,92	3,53
- 1	4,92	4,64	3,66	3,06	3,35	4,55
Placebo-Applikation						
+ 3	<i>5,46</i>	<i>5,41</i>	4,33	3,38	3,83	4,21
+ 4	4,3	4,22	3,29	2,66	3,13	3,41
Impfung						
+ 5	4,12	3,99	3,09	3,05	2,58	3,28
+ 6	<i>5,2</i>	<i>5,05</i>	3,26	3,19	2,87	4,13
+ 7	<i>5,42</i>	<i>5,05</i>	3,46	3,13	3,19	3,86
+ 8	<i>5</i>	<i>5,07</i>	3,58	3,27	3,56	3,92
+ 9	<i>4,88</i>	4,69	3,26	3,01	2,85	4
+ 10	4,28	4,28	3,43	2,38	3,28	3,69
+ 11	4,61	4,06	3,3	2,62	3,23	3,55
+ 12	4,01	3,44	3,28	2,61	2,97	3,89

*Kursiv gekennzeichnete Werte der Tabellen geben Lymphozytenzahlen oberhalb des Referenzbereiches ($1 - 4,8 \times 10^3/\mu\text{l}$) an

Die Darstellung der Mittelwerte von Baypamune[®]- und Placebogruppe in Abb.33 verdeutlicht den Verlauf der gemessenen Lymphozytenzahlen. Drei Tage nach der ersten Applikation von Baypamune[®] oder Placebo (Versuchstag +3) kam es zu einem Anstieg der absoluten Lymphozytenzahlen, der auf den Werten von vier Hunderten der Testgruppe und fünf Hunderten der Kontrollgruppe beruht (vgl. Tabellen 10 und 11). Im weiteren Verlauf fielen am Tag vor der Impfung (Versuchstag +4) und am Tag nach der Impfung (Versuchstag +5) die Lymphozytenzahlen beider Gruppen wieder ab. Dabei war der stärkere Abfall in der Placebo-Gruppe zurückzuführen auf die Reduktion der Lymphozyten aller sechs untersuchten Hunde, während in der Baypamune[®]-Gruppe nur fünf Hunde einen geringen Rückgang der absoluten Lymphozytenzahlen zeigten. Der Unterschied zwischen den insgesamt höheren Einzelwerten der Testgruppe und den niedrigeren Einzelwerten der Kontrollgruppe war statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$).

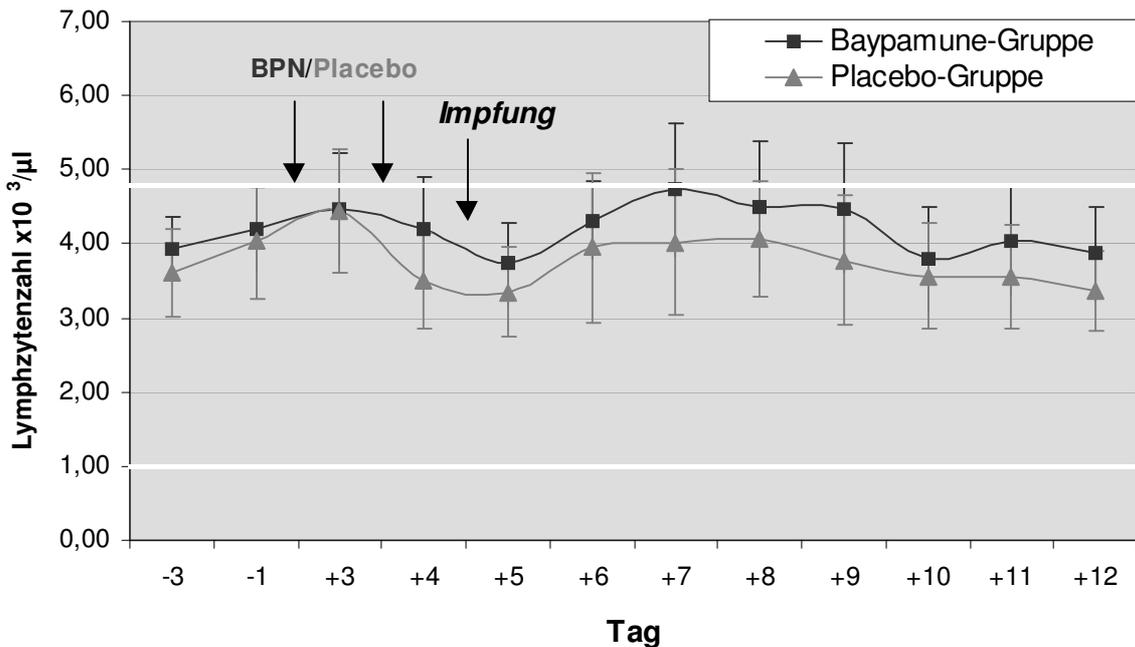


Abb.33: Nachweis des Verlaufs der absoluten Lymphozytenzahlen von Baypamune[®]- und Placebo-Gruppe. Angegeben sind Mittelwerte der Lymphozytenzahlen von sechs Hunden der Baypamune[®]- und sechs Hunden der Placebo-Gruppe. Die hellen Linien kennzeichnen den Referenzbereich nach Nemi C. Jain (BPN = Baypamune[®])

4.2.3.4.2 Mitogene Stimulierbarkeit der caninen Lymphozyten mit Phytohemagglutinin P

Im weiteren Verlauf des Experiments IV sollte die Stimulierbarkeit der caninen Lymphozyten vor und nach Verabreichung der polyvalenten Vakzine überprüft und der Einfluss prophylaktischer Baypamune[®]-Applikationen ermittelt werden. Dazu wurde zu dem in Abb. 29 dargestellten Zeitpunkten jeweils vier Hunden aus der Baypamune[®]- und Placebo-Gruppe Blut für die Gewinnung von PBMCs entnommen. Die PBMCs wurden an diesen Tagen portioniert und jeweils direkt zur RNA-Extraktion eingesetzt (Null-Stunden-Wert) oder 24 und 48 Stunden mit (+) oder ohne (-) Phytohemagglutinin P inkubiert (vgl. Kapitel 3.2.2).

Das Ergebnis der IFN γ -mRNA-Quantifizierung (Abb. 34) zeigt für alle mit Phytohemagglutinin P stimulierten Proben der Baypamune[®]- und Placebo-Gruppe eine Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum jeweiligen Null-Stunden-Wert.

Dabei kam es bei allen Hunden am zehnten und zwölften zu einer Zunahme des IFN γ -mRNA-Gehalts in den PBMCs, jedoch mit großen individuellen Unterschieden.

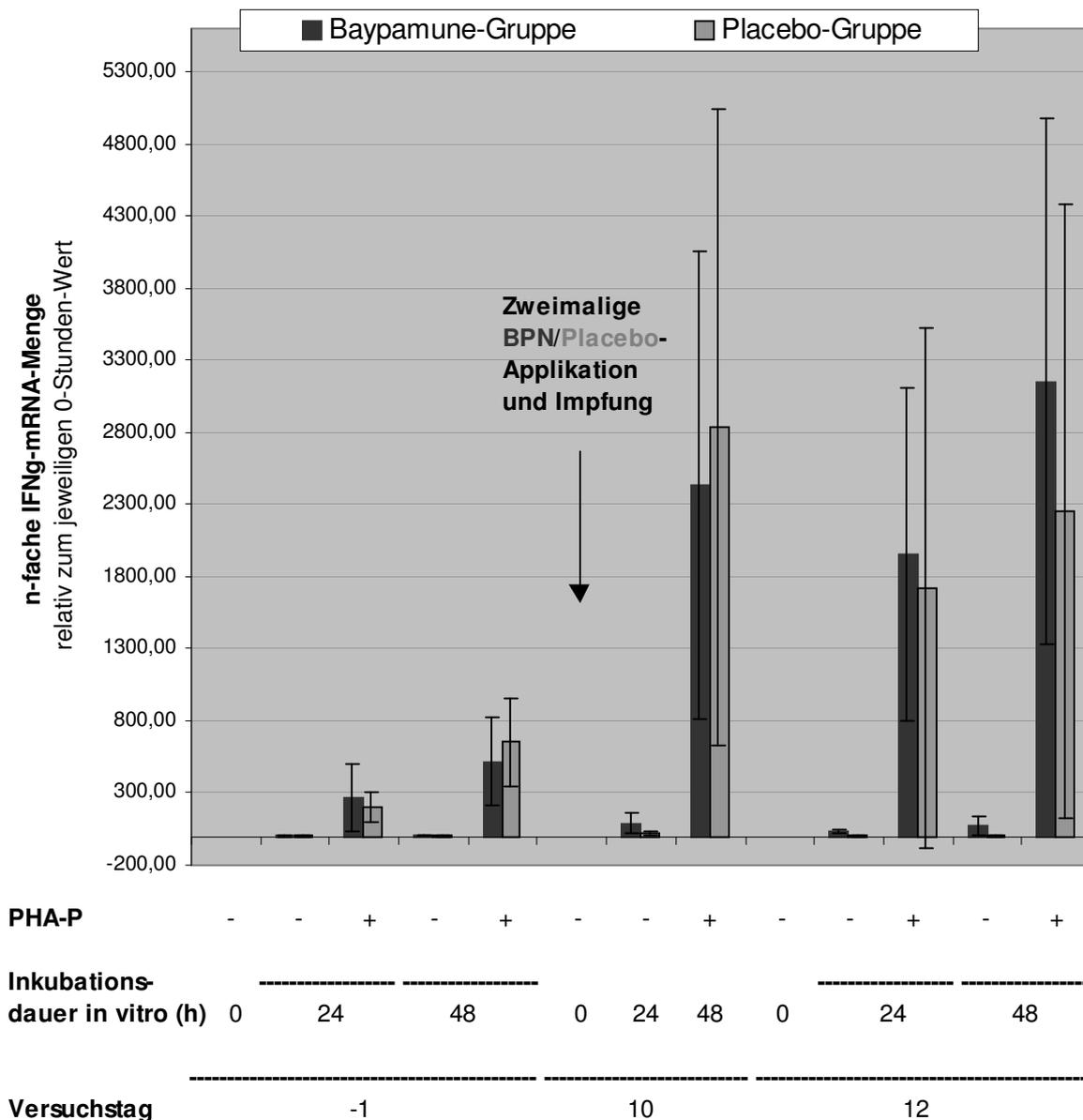


Abb.34: Mittelwerte der n-fachen Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum jeweiligen Null-Stunden-Wert nach Stimulation der PBMCs von 4 Hunden der Baypamune[®]- und 4 Hunden der Placebo-Gruppe.
(PHA-P = Phytohemagglutinin P ; h = Stunden)

Die Abb.35 zeigt die relativen IFN γ -mRNA-Mengen in PBMCs der einzelnen Hunde von Baypamune[®]- und Placebo-Gruppe vor Versuchsbeginn (Versuchstag -1) und am zwölften Versuchstag nach 24stündiger bzw. 48stündiger Stimulation. Während am zehnten Versuchstag noch für keine der beiden Gruppen eine statistisch

signifikant steigende IFN γ -mRNA-Menge in den Lymphozyten festgestellt werden konnte (Baypamune[®]-Gruppe: $p = 0,059$; Placebo-Gruppe: $p = 0,096$), ergab der t-Test für paarige Daten am zwölften Versuchstag bezüglich des Basiswertes (Basis 24+) eine signifikante Steigerung ($p = 0,041$) des IFN γ -mRNA-Gehalts in den Lymphozyten der Baypamune[®]-Gruppe. Für die Kontrollgruppe konnte keine signifikante Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge nachgewiesen werden ($p = 0,196$). Dieses Ergebnis ließ sich für die 48 Stunden-lang stimulierten PBMCs bestätigen (Baypamune[®]-Gruppe: $p = 0,047$; Placebo-Gruppe: $p = 0,201$).

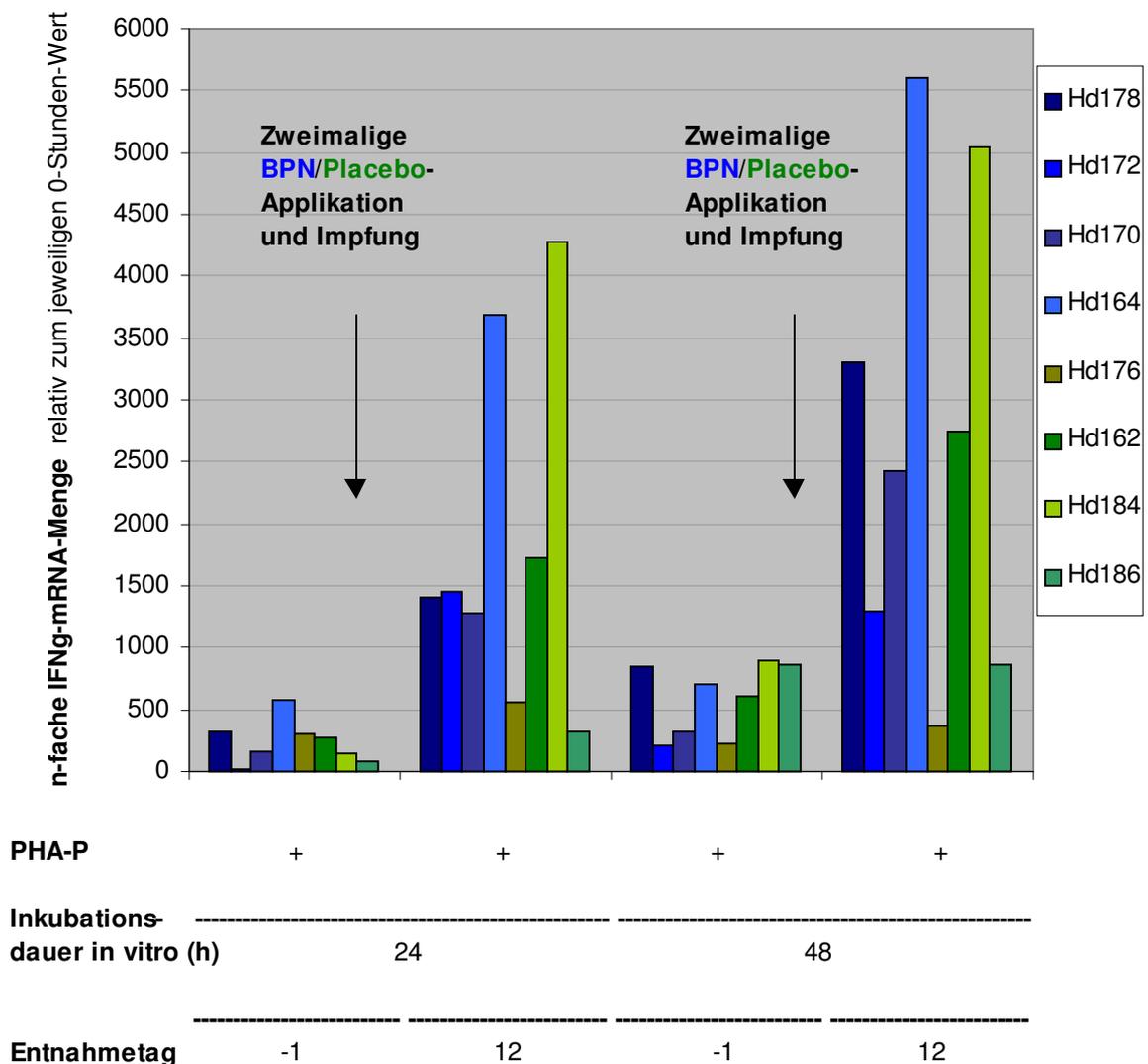


Abb.35: Nachweis der Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge in Lymphozyten der Baypamune[®]- (blaue Säulen) und der Placebo-Gruppe (grüne Säulen) am achten Tag nach Impfung bzw. zwölften Versuchstag ($n = 4$ /Gruppe). (Hd = Hund; PHP-P = Phytohemagglutinin P-P, h = Stunden)

Darüber hinaus fiel der zunehmende IFN γ -mRNA-Gehalt in caninen Lymphozyten ohne Mitogen-Zusatz vor allem am zwölften Versuchstag auf (vgl. Abb. 36). Während es hier in der Placebo-Gruppe zu einer maximal 5fachen Zunahme (Hd 176) der IFN γ -mRNA-Menge relativ zum Null-Stunden-Wert kam, konnte in der Baypamune[®]-Gruppe eine maximal 45fache Steigerung (Hd 172) gemessen werden. Der t-Test für paarige Daten ergab für die Testgruppe eine signifikante Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge ($p = 0,018$) in Bezug zu den Basiswerten (Basis 24h-), während für die Kontrollgruppe keine signifikante Steigerung errechnet werden konnte ($p = 0,204$). Am zehnten Versuchstag war auch hier die zunehmende IFN γ -mRNA-Menge in allen unstimulierten Proben noch nicht signifikant (Baypamune[®]-Gruppe: $p = 0,098$; Placebo-Gruppe: $p = 0,086$).

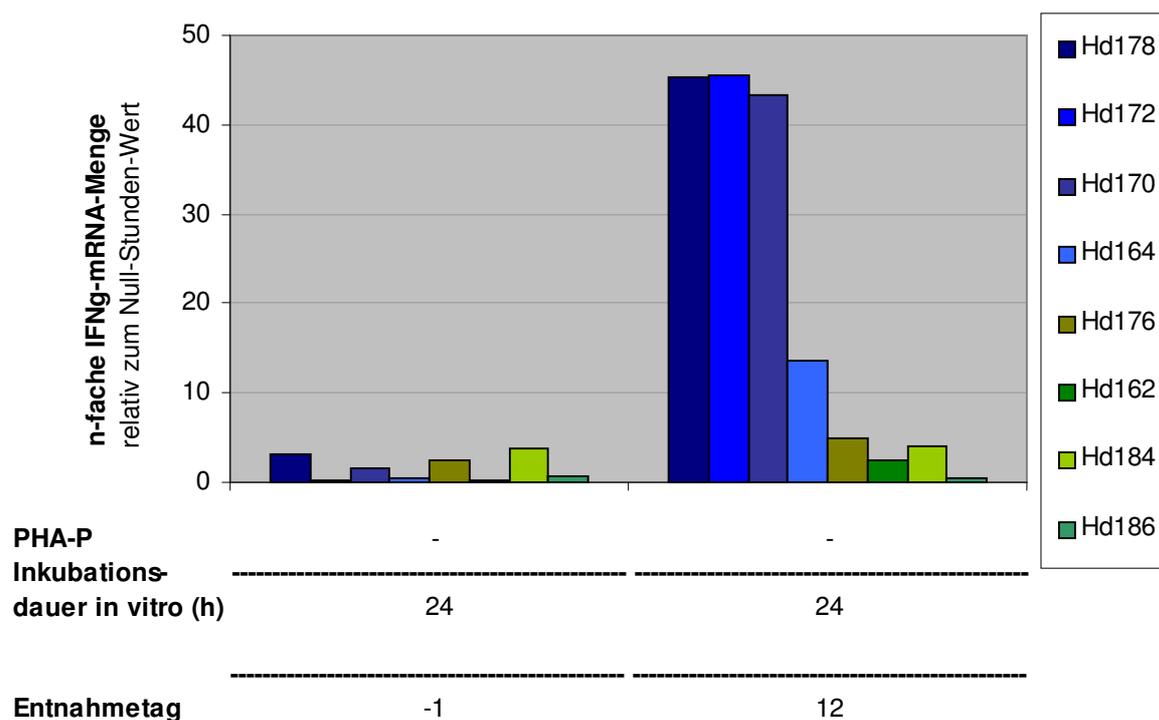


Abb.36: Nachweis der zunehmenden IFN γ -mRNA-Menge in Proben der Baypamune[®]- (blaue Säulen) bzw. Placebo-Gruppe (grüne Säulen) ohne Mitogenzusatz am achten Tag nach Impfung bzw. zwölften Entnahmetag. (Hd = Hund, PHA-P = Phytohemagglutinin-P, h = Stunden)

V. Diskussion

Um den Wirkungsmechanismus von Baypamune® im Hund zu untersuchen, sollte die IFN γ -Expression bei mit dem Immunmodulator behandelten Hunden bestimmt werden. Mit der dazu etablierten „Real Time TaqMan®“-PCR gelang es, canine IFN γ -mRNA aus unstimulierten PBMCs und aus Vollblutproben nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Baypamune® *in vitro* die IFN γ -Expression in caninen PBMCs induziert. Die In-vivo-Applikation des Immunmodulators führte nicht zur Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge in nativen Blutproben der untersuchten Hunde. Allerdings konnte eine signifikante Zunahme des IFN γ -mRNA-Gehalts in unstimulierten (nach 24stündiger Inkubation) und mit PHA-P stimulierten PBMCs nach zweimaliger Applikation von Baypamune® und Impfung der Tiere nachgewiesen werden. Sowohl die In-vitro-, als auch die In-vivo-Applikation von Baypamune® beeinflussen die IFN γ -Expression. Die Induktion der IFN γ -Expression durch den Immunmodulator ließ sich dabei nur in PBMCs mit Hilfe eines Costimulus nachweisen.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der etablierten „Real Time“-PCR unterschiedliche IFN γ -mRNA-Konzentrationen in caninen PBMCs und in Vollblutproben nachgewiesen werden können. So wurde nach Baypamune®- bzw. Placebo-Applikation und Impfung bei neun von zwölf Hunden weniger IFN γ -mRNA in den entnommenen Blutproben detektiert, als vor Versuchsbeginn (vgl. Kapitel 4.2.3.4). Dabei lag die gemessene mRNA-Menge unterhalb der zuvor ermittelten Varianzgrenzen. Für die Anwendung der „TaqMan®“-PCR zur Untersuchung der caninen Blutproben wurde die Reproduzierbarkeit des Testsystems mit Hilfe von Varianzgrenzen ermittelt, anhand derer eine System-unabhängige Ab- oder Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge beurteilt werden kann. Dabei zeigte sich, dass 2,5fache Schwankungen der mRNA-Menge auf die Versuchsdurchführung sowie intra- und interindividuelle Expressionsunterschiede zurückzuführen sind. Die Ursache für diese Schwankungsbreite sind vor allem „Inter-assay-Varianzen“. Die Manipulation der Blutproben führt vermutlich zu einer Zytokin-Induktion außerhalb des Organismus. Im Vergleich zu den interindividuellen Expressionsschwankungen wurden bei Bestimmung der „Intra-assay-Varianzgrenzen“ nur 1,5fache Zu- oder Abnahmen der IFN γ -mRNA-Menge gemessen (vgl. Kapitel 4.2.1.1). Bei Bestimmung

der Tagesschwankungen konnten in einzelnen Blutproben IFN γ -mRNA-Konzentrationen oberhalb der ermittelten Varianzgrenzen gemessen werden. Da die Abweichung dieser Werte ungewöhnlich groß war, wurden sie bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Zu erklären sind diese abweichenden Werte durch Fehler bei der mRNA-Gewinnung, wie z.B. die Entnahme zu großer Blutmengen in das vorgesehene Reagenzglas. Die entstehenden Blutkoagula führen, durch die Aggregation von Blutzellen, zu einer gesteigerten Interaktion der Zellen, die in einer Zytokin-Induktion resultiert.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten IFN γ -mRNA bereits in unstimulierten und stimulierten PBMCs von Hunden nachweisen (Tani *et al.*, 2002; Pinelli *et al.*, 1999; Chamizo *et al.*, 2001). In Vollblutproben von Hunden gelang der Nachweis dieser Zytokin-mRNA allerdings noch nicht. Gröne *et al.* (1998) konnten zwar canine IFN γ -mRNA aus Con A-stimulierten PBMCs, aber nicht aus nativen Blutproben nachweisen. Die RNA-Extraktion aus Blut erlaubt eine zeitnahe Analyse des Verlaufs der Zytokin-Expression und umgeht Kontaminationsrisiken, die mit der Aufarbeitung von PBMCs verbunden sind.

Prinzipiell stehen für die zeitnahe Zytokin-Analyse aus Vollblut zwei verschiedene Methoden zur Verfügung: der Nachweis des Proteins oder der mRNA, die für dieses Protein codiert. Für den Nachweis des caninen Zytokins wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen ELISAs etabliert, die zur Detektion einen Antikörper gegen humanes (Serrick *et al.*, 1994) oder canines IFN γ (Fuller *et al.*, 1994) verwenden. Beim Zytokin-Nachweis ist zu beachten, dass die Menge an zirkulierenden Zytokinen sehr gering ist (Bienvenu *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann in Immunoassays nicht zwischen aktiven und inaktiven Zytokinmolekülen unterschieden werden (Franciotta *et al.*, 2001). Weitere Probleme sind die kurze Halbwertszeit der Zytokine und die mögliche „Pufferung“ durch lösliche Rezeptoren im peripheren Blut (Franciotta *et al.*, 2001; Bienvenu *et al.*, 1998). Aus diesen Gründen ist die Zytokin-Expression in Körperflüssigkeiten schwer detektierbar (Härtel *et al.*, 2001; Chamizo *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 1997). Härtel *et al.* (2001) und Stordeur *et al.* (2003) konnten jedoch in Vollblutproben von Menschen zu- bzw. abnehmende mRNA-Mengen verschiedener Zytokine nachweisen.

Zur Detektion von mRNA steht die Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion zur Verfügung (Bustin, 2000, Freeman *et al.*, 1999). Da bei einem PCR-Zyklus die Menge des Startmaterials (cDNA) proportional ist zur Menge des PCR-Produkts,

kann mit Hilfe der RT-PCR auch quantifiziert werden (Provenzano *et al.*, 2001). Die herkömmlichen PCR-Methoden basieren auf der Quantifizierung des PCR-Endprodukts. Dabei wird durch Bestimmung der Endproduktmenge auf die Zahl der eingesetzten Moleküle geschlossen. Für die Messung des PCR-Produkts stehen verschiedene Methoden wie beispielsweise Southern Blot (Uchida *et al.*, 2002), andere Hybridisierungstechniken (Kellog *et al.*, 1990; Jalava *et al.*, 1993; Mulder *et al.*, 1994), Fluoreszenz-„labeling“ und Laser-induzierte Fluoreszenz durch Kapillarelektrophorese (Fasco *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996) oder Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung mit anschließender Densitometrie (Quesada *et al.*, 1991; Chamizo *et al.*, 2001) zur Auswahl. Viele dieser Methoden sind sehr zeitaufwendig, da sie mit der Herstellung vieler Einzelkomponenten verbunden sind. Durch die notwendige Manipulation des PCR-Produkts bestehen außerdem große Kontaminationsrisiken (Giulietti *et al.*, 2001). Die Quantifizierung mit Hilfe der genannten Methoden findet vor allem in der Plateauphase der PCR statt (Endpunktbestimmung) und kann deshalb durch den Reagenzienverbrauch bei unterschiedlicher Menge Startmaterial zu einer gleichen Menge Amplifikationsprodukt führen (Provenzano *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung basiert die quantitative „Real Time“-PCR-Methode auf der Detektion der PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Amplifikation. Dadurch werden viele Probleme umgangen, die mit der Quantifizierung während der Plateauphase verbunden sind (Raeymaekers 1995).

Für die endogene Kontrolle der „TaqMan[®]“-PCR wurde das Housekeeping Gen 18S rRNA gewählt. Die Normalisierung mit einem Standard ist notwendig, um Fehler in der RT-PCR zu vermeiden, die auf Grund unterschiedlicher Startmaterialmengen in den verschiedenen RNA-Proben zustande kommen können. Dies trifft vor allem zu bei Proben von unterschiedlichen Individuen (Bustin, 2000). Bei der relativen Quantifizierung ist die Auswahl einer geeigneten internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt (Thellin *et al.*, 1999). Das Referenz-Gen sollte konstant exprimiert und nicht durch die Versuchsbedingungen beeinflusst werden (Karge *et al.*, 1998; Bustin, 2000). Für die Verrechnung der IFN γ -Reaktion mit der Referenz-Reaktion müssen beide Reaktionen mit nahezu gleicher Effizienz ablaufen (vgl. Kapitel 4.1.2.5).

Als interne Kontrolle werden häufig GAPDH-mRNA, β -Aktin-mRNA oder ribosomale RNAs (rRNA) eingesetzt. Für GAPDH-mRNA konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionslevel in kernhaltigen Zellen des Blutes zwischen Proben des selben

Individuums, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden sind, stark variieren (Bustin *et al.*, 1999). Auch β -Aktin erwies sich in verschiedenen Studien als ungeeignete interne Kontrolle (Dakhama *et al.*, 1996; Foss *et al.*, 1998; Carlyle *et al.*, 1996; Markus *et al.*, 2002), da das GAPDH- und β -Actin-Gen – wie die meisten Gene – von der RNA-Polymerase II transkribiert werden. Die großen ribosomalen RNAs werden dagegen von der RNA-Polymerase I transkribiert. Im Gegensatz zur Polymerase II wird die Polymerase I weniger von äußeren Faktoren beeinflusst und verändert somit nicht ihre Transkriptionsaktivität. Daher sind versuchsbedingte Expressionsschwankungen nicht zu erwarten (Barbu & Dautry, 1989; Bustin, 2000). Trotzdem werden sowohl 18S rRNA (Kahn *et al.*, 1992, Barbu & Dautry 1989; Bhatia *et al.*, 1994) als auch GAPDH-mRNA (Markus *et al.*, 2002; Nuttal *et al.*, 2002; Chamizo *et al.*, 2001) häufig als interne Kontrollen eingesetzt. Daher wurde die Verwendung von GAPDH-mRNA und 18S rRNA untersucht (vgl. Kapitel 4.1.2.5). Aufgrund der stark konservierten 18S rRNA-Sequenz wurde ein vorgefertigtes Primer-Sonden-System zum Nachweis humaner ribosomaler RNA verwendet. Für den Nachweis von caniner GAPDH-mRNA in den Blutproben wurde ein sequenzspezifisches Primer-Sonden-System ausgewählt (vgl. 4.1.2.2), da keine 100%ige Homologie zu den GAPDH-Sequenzen anderer Spezies besteht (Leutenegger *et al.*, 1999). Die Expressionslevel beider Referenz-Gene unterlagen nur sehr geringen Schwankungen in den Untersuchungen. Die 18S rRNA-Kopienzahl in den untersuchten Proben war wesentlich größer als die IFN γ -mRNA-Kopienzahl. Dadurch lagen die Ct-Werte der 18S rRNA-Amplifikationsreaktion in einem anderen Messbereich als die Ct-Werte der IFN γ -Amplifikationreaktion. Hier könnten sich unterschiedliche Messgenauigkeiten des PCR-Geräts bemerkbar machen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reaktionen beider SONDENSYSTEM mit nahezu gleicher Effizienz verliefen. Die hohe Kopienzahl der 18S rRNA ist vermutlich eher vorteilhaft, da eine mögliche Verunreinigung der Blutproben mit genomischer DNA im Verhältnis zur exprimierten rRNA-Menge nicht ins Gewicht fällt. Da die Effizienz von IFN γ -Primer-Sonden-System eine größere Übereinstimmung zum 18S rRNA-System als zum GAPDH-System zeigte, wurde für die weiteren Versuche 18S rRNA als endogene Kontrolle eingesetzt (vgl. Kapitel 4.1.2.5.2).

Da die IFN γ -Expression im zirkulierenden Blut sehr gering ist, konnte sie bisher bei Hunden nur in isolierten PBMCs nachgewiesen werden. Mit Hilfe der etablierten „Real Time TaqMan[®]“-PCR ist es nun möglich, die Expression des Zytokins sowohl in caninen PBMCs als auch in Vollblutproben der Hunde zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass Baypamune[®] *in vitro* die IFN γ -Expression in caninen PBMCs induziert. Die alleinige Applikation des Immunmodulators *in vivo* führte allerdings nicht zur meßbaren Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge in den untersuchten Blutproben. Diese Ergebnisse veranlassen zu einer Gegenüberstellung von In-vitro- und In-vivo-Nachweissystemen für IFN γ -mRNA.

Da die meisten Zytokine nur nach zellulärer Aktivierung exprimiert werden, sind die basalen Konzentrationen in Zellkulturen *ex vivo* sehr gering (House, 2001). Deshalb sollten PBMCs beispielsweise mit Hilfe eines mitogenen Lektins, wie Con A oder PHA-P *ex vivo* aktiviert werden. Bei der In-vitro-Stimulation von PBMCs kommt es zu einer Art „System-Verschärfung“, da nur die definierten Zielzellen stimuliert werden. Dabei sollte das verwendete Mitogen in geringer Konzentration verwendet werden, da kleine Veränderungen der Zytokin-Produktion verdeckt werden können (House, 2001). Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die mögliche Regeneration der Zellen von ihrer immunmodulatorischen Aktivität nach Entfernung vom Spendertier. Dies erschwert die Durchführung von kinetischen Untersuchungen (House, 2001). Bei der In-vitro-Stimulation isolierter Zellen fehlen außerdem Interaktionen mit anderen Faktoren und Zellen des Blutes, die eventuell die Zytokin-Expression beeinflussen (Yancy *et al.*, 2001). Eine Alternative ist daher der Zytokin-Nachweis aus Vollblutkulturen (Yancy *et al.*, 2001). Friebe *et al.* (2001) zeigten, dass die Stimulation humaner PBMCs mit Baypamune[®] in einer geringeren IFN γ -Induktion resultiert, als die Stimulation von Vollblutkulturen. Die geringere IFN γ -Expression in PBMCs wurde auf das Fehlen von Komplement zurückgeführt. Untersuchungen von Zytokin-mRNA-Mengen in Vollblutproben konnten allerdings die Beeinflussung der Zytokin-Expression durch unterschiedliche Lagerungsdauer und verschiedene Raumtemperaturen nachweisen (Duvigneau *et al.*, 2003). Nach Lagerung des Blutes bei 4 °C konnte beispielsweise ein Anstieg der IFN γ -Expression gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur die schnelle Verarbeitung von Blutproben die Ex-vivo-Stimulation der Zytokin-Expression verhindert und Vollblutkulturen daher nicht In-vivo-Bedingungen widerspiegeln. In-vitro-Untersuchungen geben prinzipiell keine genaue Darstellung der Immunantwort im lebenden System wieder (House, 2001).

Trotzdem konnte in verschiedenen Experimenten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Stimulation der Zytokin-Expression nach Applikation eines Immunmodulators gezeigt werden. Die intravenöse Applikation eines Muramyl Dipeptids (MDP) bei Hunden induzierte die Expression von TNF α (Kurzman et al., 1993) und IL-6 (Shi et al., 1995). Die Konzentration dieser Zytokine in Serumproben wurde mittels Zytotoxizitäts- bzw. Bioassays bestimmt. Die höchsten Konzentrationen konnten 1-4 (TNF α) bzw. 1-24 (IL-6) Stunden nach Verabreichung des Immunmodulators gemessen werden. Bei der Stimulation caniner PBMCs mit MDP konnte die Zunahme der TNF α - und IL-6-Konzentrationen in Zellüberständen bestätigt werden (Kurzman et al., 1993; Shi et al., 1995). Auch auf mRNA-Ebene konnten Stordeur et al. (2003) die Induktion der IL-1-Expression durch Applikation von LPS *in vitro und in vivo* nachweisen. Die intravenöse Injektion des Immunmodulators bei Menschen und die In-vitro-Stimulation von humanen Vollblutproben resultierte in einer Zunahme der IL-1-mRNA Kopienzahl.

Sowohl bei der In-vitro- als auch bei der In-vivo-Untersuchung von Zytokin-mRNA-Konzentrationen kann es durch die Manipulation von Blutproben oder Zellen zu einer Beeinflussung der mRNA-Menge *ex vivo* kommen (Härtel et al., 2001). Die Zytokin-synthetisierenden T-Lymphozyten zeigen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Manipulationen während der Probenaufarbeitung (Härtel et al., 2001; Rainen et al., 2002). Dabei kann es durch beschleunigten Blutfluss bei der Probengewinnung (z.B. bei Blutentnahme in Vacutainer) zu einer Ex-vivo-Induktion der Zytokin-Expression kommen (Härtel et al., 2001). Auch durch verzögerte Weiterverarbeitung wird die Zytokin-Expression beeinflusst (Duvigneau et al., 2003). Interne Untersuchungen mit Hilfe der FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Analyse ergaben eine Abnahme von T-Lymphozyten in mittels Vacutainern entnommenen Blutproben. Der schnelle Blutstrom, der durch den im Röhrchen herrschenden Unterdruck ausgelöst wird, bewirkt ein Zerplatzen der Zellen (Dr. G. Beddies, Bayer AG, persönliche Mitteilung). Die Zerstörung der Zellen resultiert möglicherweise in einer Veränderung der Zytokin-Expression.

In verschiedenen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass es durch Verwendung Endotoxin-kontaminierter Blutsammelröhrchen oder Medien – z.B. fetales Kälberserum bei der Isolierung von PBMCs – zur Induktion der Zytokin-Synthese kommen kann (Cannon et al., 1993; Bienvenu et al., 1998; Riches et al., 1992). Auch die IFN γ -Expression wurde durch Isolierung und Inkubation caniner

PBMCs beeinflusst. Nach 24stündiger Inkubation der Zellen konnte in Placebo- und Negativkontrollen (ohne Zusatz) eine fünffache Zunahme der IFN γ -mRNA-Konzentration im Vergleich zur Konzentration in nicht inkubierten PBMCs gemessen werden (vgl. Kapitel 4.2.2). Für die Bestimmung der IFN γ -mRNA-Menge *in vivo*, sollte deshalb die Induktion oder Reduktion der IFN γ -Expression *ex vivo* vermieden werden. Das zu untersuchende Blut wurde daher in speziellen Röhrchen (PAXgeneTM, vgl. Kapitel 3.2.1.2.1), die ein RNA-stabilisierendes Reagenz enthalten, gesammelt. Die im Blut enthaltene RNA wird so vor Induktion und Degradierung geschützt (Rainen *et al.*, 2002; Stordeur *et al.*, 2003). Rainen *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Verwendung dieses Blutsammelsystems, im Vergleich zu EDTA-Röhrchen, zu konstanten RNA-Konzentrationen in verschiedenen behandelten Blutproben eines Individuums führt. Diese Ergebnisse konnten bei Bestimmung der „Intra-assay-Varianz“ bestätigt werden, da es hier nur zu einer Schwankungsbreite von 1,5facher Zu- bzw. Abnahme der IFN γ -mRNA-Menge kam. Beim Vergleich von mRNA-Extraktion aus Vollblutproben mittels PAXgeneTM und aus PBMCs mittels Heparin-Blutsammelgefäße konnte Stordeur *et al.* (2002) eine Zunahme der IFN γ -Expression in Vollblutproben und eine Abnahme der Expression in PBMCs nachweisen. Die Ursache für die geringere IFN γ -mRNA-Konzentration in PBMCs ist vermutlich der Abbau von mRNA (Stordeur *et al.*, 2002). Der durchgeführte Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden (vgl. Kapitel 3.2.3.1.1) ergab ebenfalls eine geringere Gesamt-RNA-Menge bei der RNA-Extraktion mittels herkömmlicher Methoden im Vergleich zur Extraktion mit dem PAXgeneTM-Blutsammelsystem (vgl. Kapitel 4.1.1). Stordeur *et al.* (2003) konnten bei Untersuchungen in Menschen die Induktion der IL-1-Expression *in vivo* zeigen. Zehn Personen erhielten intravenös LPS, um zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation Blut in PAXgeneTM-Reagenzröhrchen zu sammeln. Nach Extraktion der RNA wurde die IL-1-mRNA-Konzentration mittels „Real Time“-RT-PCR in den Blutproben bestimmt. Eine halbe bis eine Stunde nach Applikation des Immunmodulators konnte ein schneller Anstieg der IL-1-mRNA-Kopienzahl gemessen werden. Die Quantifizierung von Zytokin-mRNA in Vollblutproben mittels PAXgene-RNA-Extraktion und anschließender „Real Time“-RT-PCR kommt dem *in vivo*-mRNA-Status am nächsten und ist möglicherweise zurzeit die beste Methode zur Bestimmung der Zytokin-Expression im peripheren Blut (Stordeur *et al.*, 2002, 2003).

In verschiedenen Spezies wurde die Induktion der IFN γ -Expression durch Applikation von Baypamune[®] gezeigt. Fachinger *et al.* (2000) konnten die Zunahme der IFN γ -Sekretion durch In-vitro-Stimulation porciner PBMCs mit dem Immunmodulator nachweisen. Bei der In-vitro-Stimulation humaner Vollblutkulturen kam es erst nach Costimulation mit dem Mitogen Concanavalin A zu einer Induktion des Zytokins (Friebe *et al.*, 2001). Auch *in vivo* wurde die Induktion der IFN γ -Expression nachgewiesen. Die intramuskuläre und subkutane Applikation von Baypamune[®] bei Waldmurmeltieren führte zu einem bis zu 5,6fachen Anstieg der IFN γ -mRNA-Konzentration in PBMCs (Dr. D. Paulsen, Bayer AG, persönliche Mitteilung). In nichthumanen Primaten konnte eine geringe Induktion der IFN γ -Expression in Vollblutproben (PAXgene[™]) nach Applikation des Immunmodulators *in vivo* gemessen werden (Prof. Dr. H.-D. Volk, Charité Berlin, persönliche Mitteilung). Die Untersuchung der IFN γ -Expression in Hunden zeigt, dass die Induktion durch In-vitro-Stimulation caniner PBMCs mit Baypamune[®] bestätigt werden kann. Die In-vivo-Applikation bei Hunden führte allerdings zu keiner messbaren Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge in Vollblutkulturen. Mit Hilfe des etablierten Systems zum Nachweis von IFN γ -mRNA in caninen Vollblutproben ist es aber möglich, Konzentrationsunterschiede zu messen. Dies zeigte sich in Experiment IV, nach Impfung der Tiere, da eine Reduktion der IFN γ -Expression nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 4.2.3.4). Die abnehmende IFN γ -mRNA-Menge resultierte wahrscheinlich aus dem sogenannten „Lymphozyten-Trapping“ (Tizard, 2000): Antigen wird nach Ablagerung im Gewebe (z.B. nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion) mit der Gewebsflüssigkeit in die regionalen Lymphknoten transportiert. Dadurch werden normalerweise frei durch lymphatische Organe wandernde Lymphozyten abgefangen und können das Organ nicht mehr verlassen. Dieser Mechanismus führt zu einer Konzentrierung von Lymphozyten am Akkumulationsort des Antigens und erhöht die Effizienz der Immunantwort (Tizard, 2000). Die Zahl der zirkulierenden Zytokin-produzierenden Lymphozyten im Blut nimmt ab, wodurch der Nachweis einer Zunahme von Zytokin-mRNA in Vollblutproben erschwert wird. Diese Theorie wurde durch den Nachweis einer tendenziellen Abnahme der Lymphozytenzahlen im peripheren Blut nach Impfung bestätigt (vgl. Kapitel 4.2.3.4.1). Phillips *et al.* (1989) zeigte sogar, dass es nach

Vakzine-Applikation zu einer signifikanten Abnahme der Lymphozytenzahlen bei den untersuchten Hunden kam.

Obwohl in Vollblutproben keine IFN γ -Induktion gemessen werden konnte, sprechen die weiteren Ergebnisse für eine positive Wirkung von Baypamune[®] auf die IFN γ -Expression in Hunden. Die Reduktion der IFN γ -mRNA-Menge nach Impfung wurde in der Baypamune[®]-Gruppe nur bei drei von sechs Tieren nachgewiesen, während in der Placebo-Gruppe bei allen sechs Hunden weniger IFN γ -mRNA detektiert werden konnte als vor der Impfung. Dieses Ergebnis könnte auf die immunregulatorische Wirkung von Baypamune[®] zurückzuführen sein. Bisherige Untersuchungen des Wirkungsmechanismus zeigten, dass es zu einer Lenkung der adaptiven Immunantwort in Richtung einer T_H1-Immunantwort kommt (Weber *et al.*, 1999, 2003). Die Ergebnisse der PHA-P-Stimulation von PBMCs der geimpften Hunde zeigen, dass die Baypamune[®]-Applikation *in vivo* einen positiven Einfluss auf die In-vitro-Stimulierbarkeit hat. Am zwölften Versuchstag des Experiments IV kam es in den PHA-P stimulierten PBMCs der Baypamune[®]-Gruppe nach Impfung zu einer signifikanten Steigerung des IFN γ -mRNA-Gehalts gegenüber dem Gehalt in den vor Impfung mit PHA-P stimulierten Lymphozyten (vgl. Kapitel 4.2.3.4.2). In der Placebo-Gruppe war die Zunahme nicht signifikant. Die verstärkte IFN γ -Induktion nach Impfung könnte auf eine vorherige Aktivierung der T-Lymphozyten durch die Vakzine-Applikation zurückzuführen sein. Auffällig war außerdem die signifikant zunehmende IFN γ -Expression in caninen PBMCs der Baypamune[®]-Gruppe ohne PHA-P-Zusatz am zwölften Versuchstag. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass der Wirkungsmechanismus von Baypamune[®] auch im Hund unter anderem mit der Induktion der IFN γ -Expression erklärt werden kann. Warum konnte diese Induktion nicht in den In-vivo-Experimenten gezeigt werden? Stordeur *et al.* (2003) wiesen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Zunahme der IL-1-mRNA-Menge in humanen Vollblutproben durch Applikation von LPS nach. Dabei zeigten sie, dass der Anstieg der IL-1-mRNA Kopienzahl nach In-vivo-Stimulation bereits nach sechs Stunden wieder den Ausgangswert erreichte, nach In-vitro-Stimulation aber noch andauerte. Ein wesentlicher Unterschied war auch die höhere maximale Kopienzahl in den stimulierten Vollblutkulturen (275000 Kopien pro 1 Mio. β -Aktin-mRNA Kopien) im Gegensatz zur Applikation *in vivo* (10000 Kopien pro 1 Mio. β -Aktin mRNA Kopien). Die transiente Expression von IL-1-mRNA im Menschen kann mit der schnellen

Elimination von LPS aus dem Blut und dem Rücktransport von Zytokinproduzierenden Zellen in lymphatische Organe erklärt werden (Stordeur *et al.*, 2003). Da das zirkulierende Blut nur als Transportmedium für die enthaltenen Zellen dient, ist *in vivo* ein geringerer Anstieg der Zytokin-mRNA-Menge zu erwarten, als bei der In-vitro-Stimulation der Zytokin-synthetisierenden Lymphozyten. Diese Erklärung lässt darauf schließen, dass die Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge nach Baypamune[®]-Applikation *in vivo* zu gering ist, um sie mit Hilfe des etablierten Systems nachzuweisen. Die signifikante Induktion der IFN γ -Expression in PHA-P-stimulierten PBMCs nach In-vivo-Applikation von Baypamune[®] und Impfung ist wahrscheinlich Folge des Zusammenwirkens verschiedener Stimuli (vgl. Kapitel 4.2.3.4.2). Dies bedeutet, die PHA-P-Stimulation der Zellkulturen, in Verbindung mit der In-vivo-Applikation von Baypamune[®] und Impfung, bewirkt eine Aktivierung der Lymphozyten und führt zu einer detektierbaren IFN γ -Induktion. Für die These, dass ein Costimulus für eine messbare IFN γ -Induktion durch Baypamune[®] notwendig ist, sprechen auch die weiteren Ergebnisse des Einflusses einer Impfung auf die mitogene Stimulierbarkeit caniner Lymphozyten. Dabei kam es in caninen PBMCs ohne PHA-P-Zusatz am zwölften Versuchstag zu einer signifikanten Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge in der Baypamune[®]-Gruppe (vgl. Kapitel 4.2.3.4.2). Die Inkubation bzw. Aufbereitung der mononukleären Zellen nach Applikation von Baypamune[®] und Impfung fungierte dabei wahrscheinlich als Costimulus.

Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der etablierten Methode die IFN γ -Expression in nativen Vollblutproben bestimmt werden kann. Für den Nachweis der IFN γ -Induktion durch Baypamune[®] in Hunden ist eine zusätzliche Aktivierung der Zytokin-synthetisierenden Zellen notwendig, die *in vivo* wahrscheinlich erst durch den kranken Organismus geliefert wird (Friebe 2001).

Bei der Untersuchung von Immunitätsmechanismen muss berücksichtigt werden, dass die Immunantwort einer interindividuellen Variabilität unterliegt. Nach Impfung der untersuchten Hunde kam es zu einer individuellen Reduktion unterschiedlicher Intensität. Auch die Stimulierbarkeit caniner PBMCs unterlag großen individuellen Schwankungen. Marsland *et al.* (2002) zeigten, dass akuter Stress bei Menschen zu einer Veränderung quantitativer und funktioneller Bestandteile der zellulären Immunität führt und sich diese Immunreaktionen bei den Individuen in ihrer Stärke

unterscheiden. Dabei konnten die unterschiedlichen Ausprägungen auf eine interindividuelle Variabilität der Stress-induzierten Aktivierung des sympathischen Teils des Nervensystems zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der IFN γ -Expression in Hunden nach Applikation von Baypamune[®] sollten daher mit größeren Probandengruppen durchgeführt werden. Da für den Nachweis der Baypamune[®]-induzierten IFN γ -Expression die Lymphozyten zusätzlich aktiviert werden müssen, sind weitere In-vivo-Experimente mit Hilfe von Krankheitsmodellen durchzuführen.

VI. Zusammenfassung

Der Immunmodulator Baypamune[®] induziert bei Maus, Mensch und Schwein die IFN γ -Expression. Für die Zulassung des lyophilisierten Baypamune[®] sollte daher untersucht werden, ob auch im Zieltier Hund nach Baypamune[®]-Applikation eine erhöhte IFN γ -Expression nachgewiesen werden kann. Um die IFN γ -mRNA-Menge im Hundeblood zu bestimmen, wurde eine „Real Time TaqMan[®]“-PCR etabliert.

Für die Ermittlung eines geeigneten Primer-Sonden-Systems mussten die Exon-Intron-Grenzen der unbekanntes caninen IFN γ -DNA-Sequenz aufgezeigt werden. Dazu wurde die canine IFN γ -mRNA-Sequenz mit den entsprechenden DNA- und mRNA-Sequenzen des Schweines verglichen. Als endogene Kontrolle diente die Co-Amplifikation des Housekeeping-Gens der 18S rRNA. In mehreren Versuchen konnte bestätigt werden, dass die Effizienzen von IFN γ - und 18S rRNA-Amplifikation gleich sind. Für die In-vitro-Experimente wurden PBMCs aus Hundeblood isoliert und anschließend die RNA extrahiert. Um Beeinflussungen der Zytokinexpression durch Aufarbeitungsschritte *ex vivo* zu vermeiden, wurde die RNA aus Vollblutproben mit Hilfe eines RNA-stabilisierenden Reagenz (PAXgeneTM) gewonnen. Durch verschiedene Validierungsexperimente konnten Grenzwerte festgelegt werden, anhand derer eine System-unabhängige Ab- oder Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge beurteilt wurde. Demnach lagen die System-bedingten Veränderungen der mRNA-Menge bei bis zu 2,5fach.

Nach In-vitro-Stimulation caniner PBMCs mit Baypamune[®] wurde eine system-unabhängige Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge gemessen. Allerdings konnte nach In-vivo-Applikation des Immunmodulators keine vermehrte IFN γ -Expression in caninen Vollblutproben nachgewiesen werden. Auch veränderte Applikationsschemata und die Dosiserhöhung von Baypamune[®] erbrachten keine veränderten IFN γ -mRNA-Mengen bei den untersuchten Hunden. Erst nach wiederholter Baypamune[®]-Applikation und Verabreichung einer polyvalenten Vakzine konnte bei drei von sechs Hunden eine Reduktion der IFN γ -Expression gemessen werden. Dabei kam es in der Placebo-Gruppe bei allen Tieren der Baypamune[®]-Gruppe zu einer Abnahme der IFN γ -mRNA-Konzentration. Die PHA-P-Stimulation von PBMCs der untersuchten Tiere ergab bei allen Proben eine erhöhte IFN γ -Expression nach Baypamune[®]- bzw. Placebo-Applikation und Impfung. Am zwölften

Versuchstag war die Induktion nur in der Baypamune[®]-Gruppe signifikant. Die Untersuchung der PBMCs Baypamune[®]-behandelter und geimpfter Hunde zeigte, dass es auch ohne Zusatz von PHA-P am zwölften Versuchstag zu einer signifikanten Zunahme der IFN γ -mRNA-Menge kam.

Die Ergebnisse belegen, dass es mit Hilfe der etablierten „Real Time TaqMan[®]“-PCR möglich ist, System-unabhängige Ab- bzw. Zunahmen der IFN γ -mRNA-Mengen in caninen Vollblutproben und PBMCs zu messen. Es wurde gezeigt, dass Baypamune[®] *in vitro* die IFN γ -Expression in caninen PBMCs induziert. Während Baypamune[®] *in vivo* keinen Einfluss auf die IFN γ -Expression in caninen Vollblutproben hatte, konnte ein signifikanter Effekt von Baypamune[®]-Applikation und Impfung auf die IFN γ -mRNA-Menge in PBMCs nachgewiesen werden.

VII. Summary

The immune modulator Baypamune[®] induces the expression of IFN γ in mice, humans and pigs. For the admission of the lyophilised Baypamune[®] it should be therefore examined if an increased IFN γ expression after Baypamune[®] application can be detected in dogs. In order to determine the IFN γ mRNA quantity in the dog blood, a real time TaqMan[®] PCR was established.

For the determination of a suitable primer probe system the exon-intron boundaries of the unknown canine IFN γ DNA sequence had to be identified. For that purpose the canine IFN γ mRNA sequence was compared with the appropriate DNA- and mRNA-sequences of the pig. The co-amplification of the housekeeping gene of the 18S rRNA served as an endogenous control. Several experiments confirmed that the efficiencies of IFN γ and 18S rRNA amplification are equal. For *in vitro* experiments PBMCs from dog blood were isolated and the RNA extracted afterwards. In order to avoid an interference of the cytokine expression *ex vivo*, the RNA from full blood tests was extracted with the help of a RNA stabilizing reagent (PAXgene[™]). Limit values were specified by different validating experiments, on whose basis a system-independent decrease or increase of the IFN γ mRNA quantity were established. According to these values the system-dependent changes of mRNA quantities were up to 2.5 -fold.

After *in vitro* stimulation of canine PBMCs with Baypamune[®] a system-independent increase of IFN γ mRNA quantities was measured. However, no increased IFN γ expression in canine full blood samples were determined after *in vivo* application of the immune modulator. Even changes of application patterns and increases of dose rates of the immune modulator did not establish an induction or reduction of IFN γ -mRNA quantities with the examined dogs. Only after repeated Baypamune[®] application and vaccination, a reduction of the IFN γ expression was measured with three of the six dogs. All animals of the placebo-group showed a reduction of the IFN γ mRNA concentration. The PHA-P-stimulation of PBMCs of the examined animals resulted in an increased IFN γ expression in all samples after Baypamune[®]- and/or placebo application and vaccination. On the twelfth day of the experiment the induction was significant only in the Baypamune[®] group. The examination of the PBMCs of dogs treated with Baypamune[®] and Vaccine established that even without

the addition of PHA-P a significant increase of IFN γ mRNA quantities ensues on the twelfth day of the experiment.

The results prove that it is possible to measure system-independent decreases and/or increases of IFN γ mRNA quantities in canine full blood samples and PBMCs with the help of the established real time TaqMan[®] PCR. It was demonstrated that Baypamune[®] *in vitro* induces IFN γ expression in canine PBMCs. While Baypamune[®] *in vivo* did not influence IFN γ expression in canine full blood tests, a significant effect by Baypamune[®] application and vaccination on the IFN γ mRNA quantity in PBMCs was verified.

VIII. Literaturverzeichnis

- Afonina, I., M. Zivarts, I. Kutuyavin, E. Lukhtanov, H. Gamper, R.B. Meyer.** 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*, 25(13): 2657-60
- Aihara, Y., H. Kasuya, H. Onda, H. Tomokatsu, J. Takeda.** 2001. Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage. *American Heart Association, Inc.*, 32 (1): 212
- Anderson, I.E., H.W. Reid, P.F. Nettleton, C.J. McInnes, D.M. Haig.** 2001. Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon – γ mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 83: 161-176
- Argyle, D.J., C. McGillivray, L. Nicolson, D.E. Onions.** 1999. Cloning, sequencing, and characterization of dog interleukin-12. *Immunogenetics*, 49: 541-543
- Barbu, V., E. Dautry.** 1989. Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe. *Nucleic Acis Res*, 17(17): 7115
- Bathia, P., W.R. Taylor, A.H. Greenberg, J.A. Wright.** 1994. Comparison of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.*, 216: 223-226
- Becker A.M., T.A. Janik, E.K. Smith, C.A. Sousa, B.A. Peters.** 1989. Propionibacterium acnes immunotherapy in chronic recurrent canine pyoderma. An adjunct to antibiotic therapy. *J. Vet. Intern. Med.*, 3(1): 26-30
- Benveniste, O., M. Martin, F. Villinger, D. Dormont.** 1998. Techniques for quantification of cytokine mRNAs. *Cytokines, Cellular & Molecular Therapy* 1998, 4: 201-214
- Berg, G., M. Rüsse.** 1994. Der Einsatz von Baypamun HK[®] in der Mammatumorbehandlung der Hündin. *Tierärztl. Umschau*, 49: 476-480
- Bienvenu, J.A.D., G. Monneret, M.Cl. Gutowski, N. Fabien.** 1998. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology*, 129: 55-61
- Block, A., K. Hartmann, H. Lutz, W. Kraft.** 1997. Placebo-controlled double-blind study on the efficacy of a paramunity inducer in the treatment of naturally FeLV-infected cats. *Tierärztl. Praxis*, 25 (3): 261-266
- Bölcskei, A., G. Bilkei.** 1995. Langzeitstudie über behandelte FIP-verdächtige Katzen. *Tierärztl. Umschau*, 50: 721-728
- Bustin, S.A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Molecular Endocrinol.* 2000, 25: 169-193

- Bustin, S.A., V.G. Gyselman, N.S. Williams, S. Dorudi.** 1999. Detection of cytokeratins 19/20 and guanyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer* 1999, 79: 1813-20
- Büttner, M., W. Strube, G. Wolf, M. Hoerstke.** 1987. Parapoxvirus als Induktor unspezifischer Abwehrmechanismen. *Tierärztl. Umschau*, 42: 14-21
- Büttner, M., G. Belke-Louis, H.-J. Rziha, C. McInnes, O.-R. Kaaden.** 1998. Detection, cDNA cloning and sequencing of canine interleukin 12. *Cytokine*, 10 (4): 241-248
- Cannon, J.G., J.L. Nerad, D.D. Poutsika, C.A. Dinarello.** 1993. Measuring circulating cytokines. *J. Appl. Physiol.*, 75 (4): 1897-1902
- Carlyle, W.C., C.A. Toher, J.R. Vandervelde, K.M. McDonald, D.C. Homans, J.N. Cohn.** 1996. Changes in beta-actin mRNA expression in remodeling canine myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1996, 28(1): 53-63
- Castrucci, G., B.I. Osburn, F. Frigeri, M. Ferrari, D. Salvatori, D.M. Lo, F. Barreca.** 2000. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 163-173
- Castrucci, G., F. Frigeri, B.I. Osburn, M. Ferrari, F. Barreca, D. Salvatori.** 1998. Further investigations on the efficacy of a non – specific defence inducer evaluated in calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21: 155-163
- Castrucci, G., M. Ferrari, B.I. Osburn, F. Frigeri, F. Barreca, S. Tagliati, V. Cuteri.** 1996. A non-specific defence inducer in preventing clinical signs of infectious bovine rhinotracheitis in calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 19: 163-169
- Cavaillon, J.M., C. Munoz, C. Fitting, B. Misset, J. Carlet.** 1992. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ. Shock*, 38 (2): 145-152
- Chamizo, C., J.M. Rubio, J. Moreno, J. Alvar.** 2001. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. *Vet Immunol and Immunopathol* 2001, 83: 191-202
- Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. McDonald, W.J. Rutter.** 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979, 18: 5294-5299
- Clinton, S.K., E. Canto, E. O'Donnell, M.A.** 2000. Interleukin-12. Opportunities for the treatment of bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.*, 27: 147-155
- Collins, R.A., C.J. Howard, S.E. Duggan, D. Werling.** 1999. Bovine interleukin-12 and modulation of IFN γ production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68: 193-207
- Dakhama, A. V. Macek, J.C. Hogg, R.G. Hegele.** 1996. Amplification of human beta-actin gene by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction: implications for assessment of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded material. *J. Histochem. Cytochem.* 1996, 44(10): 1205-7

- De Mari, K., L. Maynard, H.M. Eun, B. Lebreux.** 2003. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet. Rec.*, 152 (4): 105-108
- Duvigneau, J.C., R.T. Hartl, M. Teinfalt, M. Gemeiner.** 2003. Delay in processing porcine whole blood affects cytokine expression. *J. Immunol. Methods.* 272 (1-29): 11-21
- Elkins, K.L., T.R. Rhinehart-Jones, S. Stibitz, J.S. Conover, D.M. Klinman.** 1999. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J. Immunol.* 162: 2291-2298
- Fachinger, V.** 2000. Vergleichende Untersuchungen der immunogenen Eigenschaften von inaktivierten Pockenviren. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen
- Fachinger, V., T. Schlapp, A. Saalmüller.** 2000. Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen. *Eur. J. Immunol.*, 30: 2962-2971
- Fasco, M.J., C.P. Treanor, S. Spivack, H.L. Figge, L.S. Kaminsky.** 1995. Quantitative RNA-polymerase chain reaction-DNA analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Anal. Biochem.*, 224: 140-147
- Ferrantini, M., F. Belardelli.** 2000. Gene therapy of cancer with interferon: lessons from tumor models and perspectives for clinical applications. *Cancer Biology*, 10: 145-157
- Foss, D.L., M.J. Baarsch, M.P. Murtaugh.** 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim. Biotechnol.*, 9(1): 67-78
- Franciotta, D., E. Zardini, R. Bergmaschi, L. Andreoni, A. Romani, V. Cosi.** 2001. The relevance of cytokines within the immuno-inflammatory response: Are they reliably measurable in biological fluids? *Functional Neurology*, 16 (4): 271-276
- Freeman, W.M., S.J. Walker, K.E. Vrana.** 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26(1): 112-22, 124-5
- Frerking, H., R. Kramer, R. Schiele, B. Roder.** 1995. Clinical experiences in the use of para-immunity-inducers in cattle during animal exhibitions. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 102 (5): 188-189
- Friebe.** 2001. Immunmodulatorische Wirkung von inaktivierten Parapox-ovis-Viruspartikeln. Inaugural-Dissertation, Humboldt-Universität Berlin
- Fuller, L., M. Carreno, V. Esquenazi, K. Zucker, S. Zheng, D. Roth, G. Burke, J. Nery, D. Asthana, L. Olson, J. Miller.** 1994. Characterization of anti-gene cytokine monoclonal antibodies specific for IFN- γ : Effect of anti-IFN- γ on renal transplant rejection. *Tissue Antigens*, 43: 163-169

- Gardiner, M.R., J. Craig, M.E. Nairn.** 1967. An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. *Aust. Vet. J.*, 43: 163-165
- Gartner, K.** 1990. A third component causing random variability beside environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year long effort to standardize laboratory animals? *Lab. Anim.*, 24: 71-77
- Gibson, U.E.M., C.A. Heid, P.M. Williams.** 1996. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995-1001
- Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valchx, B. Decallonne, R. Bouillon, C. Mathieu.** 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 2001, 25: 386-401
- Golab, J.** 2000. Interleukin 18 – interferon gamma inducing factor – a novel player in tumor immunotherapy? *Cytokine*, 12: 332-338
- Goldstein, D., P. Hertzog, E. Tomkinson, D. Couldwell, S. McCarville, S. Parrish, P. Cunningham, M. Newell, M. Owens, D.A. Cooper.** 1998. Administration of Imiquimod, an Interferon inducer, in asymptomatic Human Immunodeficiency Virus-infected persons to determine safety and biologic response modification. *J. Infect. Diseases*, 178: 858-861
- Gramzinski, R.A., D.L. Doolan, M. Sedegah, H.L. Davis, A.M. Krieg, S.L. Hoffman.** 2001. Interleukin-12 and Gamma Interferon-dependent protection against Malaria conferred by CpG Oligodeosynucleotide in mice. *Infection and Immunity*, 69 (3): 1643-1649
- Gröne, A., A.L. Frisk, W. Baumgärtner.** 1998b. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 65: 11-27
- Gröne, A., S. Aldinger, W. Baumgärtner.** 2000. Interleukin –1 β , - 6, - 12 and tumor necrosis factor - α expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *J. of Neuroimmunology*, 110: 20-30
- Gröne, A., S. Fonfara, S. Markus, W. Baumgärtner.** 1998a. RT – PCR amplification of various canine cytokines and so – called housekeeping genes in a species – specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes. *J. Vet. Med. B*, 46: 301-310
- Gröne, A., S. Fonfara, W. Baumgärtner.** 2002. Cell type-dependent cytoline expression after canine distemper virus infection. *Viral Immunol.*, 15 (3): 493-505
- Gu, M.L., S.H. Leppla, D.M. Klinman.** 1999. Protection against anthrax by vaccination with a DNA plasmid encoding anthrax protective antigen. *Vaccine*, 17 (4): 340-344
- Haas, N., S. Hauptmann, D. Paralikoudi, M. Mucbe, G. Kolde.** 2002. Interferon-gamma treatment induces granulomatous tissue reaction in a case of localized cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Dermatopathol.*, 24 (4): 319-323

- Hadziyannis, A.S.; C. Papaioannou, F. Spanou, E.K. Manesis, S.J. Hadziyannis.** 2001. Induction interferon therapy in naive patients with chronic hepatitis C: increased end-of-treatment virological responses but absence of long term-benefit. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15: 551-557
- Hadziyannis, S.J.** 2000. Why and how to treat chronic hepatitis C. *Can. J. Gastroenterol.*, 14 (B): 45B-48B
- Haig, D.M., A.A. Mercer.** 1998. Ovine diseases. *Orf. Vet. Res.*, 29: 311-326
- Haig, D.M., C. McInnes, D. Deane, A. Lear, N. Myatt, H. Reid, J. Rothel, H.F. Seow, P. Wood, D. Lyttle, A. Mercer.** 1996. Cytokine and their inhibitors in orf virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 54: 261-167
- Haig, D.M., C. McInnes, D. Deane, H. Reid, A. Mercer.** 1997. The immune and inflammatory response of orf virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 20: 197-204
- Haig, D.McK.** 1998. Poxvirus interference with the host cytokine response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 63: 149-156
- Hammerl, J., G. Wolf, H. Berner.** 1995. Klinische Untersuchungen zur Wirkung des Paramunitätsinducers Baypamun als Prophylaxe beim MMA-Komplex der Sau. *Tierärztl. Umschau*, 50: 383-386
- Härtel, C., G. Bein, M. Müller-Steinhardt, H. Klüter.** 2001. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J. Immunological Methods*, 249: 63-71
- Hartmann, K., A. Block, G. Ferk, A. Vollmar, M. Goldberg, H. Lutz.** 1998. Treatment of feline leukemia virus-infected cats with paramunity inducer. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 65: 267-275
- Hayashiya, S., K. Tani, M. Morimoto, T. Hayashi, M. Hayasaki, T. Nomura, S. Une, M. Nakaichi, Y. Taura.** 2002. Expression of T Helper 1 and T Helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *J. Vet. Med. A*, 49: 27-31
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10): 986-94
- Helfand, S.C., E.B. Dickerson, K.L. Munson, M.L. Padilla.** 1999. GD3 Ganglioside antibody augments tumoricidal capacity of canine blood mononuclear cells by induction of interleukin 12. *Cancer Research*, 59: 3119-3127
- Hengge, U.R., B. Benninghoff, T. Ruzicka, M. Goos.** 2001. Topical immunomodulators – progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *The Lancet Infect. Dis.*, 1: 189-198
- Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh, R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 10(4): 413-7

- Hirth-Dietrich, C., Schlapp T., Siegling, A., Knorr, A., O. Weber.** 2000. Verwendung von Stämmen des *Parapoxvirus ovis* gegen Organfibrosen. Patent, Le A 34 714
- Holland, S.M.** 2000. Cytokine therapy of mycobacterial infections. *Adv. Intern. Med.*, 45: 431-452
- Hörber, D., W. Schnabl, B. Mayr.** 1992. Praxiserfahrungen bei der Paramunisierung FeLV-positiver Katzen mit Baypamun HK. *Tierärztl. Umschau*, 47: 556-560
- House, R.V.** 2001. Cytokine measurement techniques for assessing hypersensitivity. *Toxicology*, 158 (1-2): 51-58
- Ibelgaufits, H.** 2003. T-helper. In H. Ibelgaufits' (ed.) *Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia*, Version 9.1, www.copewithcytokines.de/cope.cgi
- Ishiwata, K., T. Minagawa, T. Kajimoto.** 1998. Clinical effects of the recombinant feline interferon- ω on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 60 (8): 911-917
- Jalava, T., P. Lehtovaara, A. Kallio, M. Ranki, H. Söderlund.** 1993. Quantification of Hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates. *Biotechniques*, 15: 134-137
- Janeway, C.A., P. Travers.** 1997. Die Bekämpfung von Infektionen durch Beeinflussung der Immunantwort, p. 523-525. In C.A. Janeway und P. Travers (eds.), *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Jungi, T.W.** 1999. Einführung in die Immunbiologie für Studierende der Veterinärmedizin. Aus dem Institut für Veterinär-Virologie der Universität Bern, http://www.cx.unibe.ch/ivv/immunol/Deutsch/Scripten/3_3_199.pdf
- Kahn, I., T.Tabb, R.E. Garfield, A.K. Grover.** 1992. Polymerase chain reaction assay of mRNA using 28S rRNA as internal standard. *Neurosci. Lett.*, 147: 114-117
- Karge, W.H. 3rd, E.J. Schaefer, J.M. Ordovas.** 1998. Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. *Methods Mol. Biol.*, 110: 43-61
- Kellog, D.E., J.J. Sninsky, S. Kwok.** 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 189: 202-208
- Kelso, A.** 1998. Cytokines: Principles and prospects. *Immunology and Cell Biology*, 76 (4): 300-317
- Kipar, A., C.M. Leutenegger, U. Hetzel, M.K. Akens, C.N. Mislin, M. Reinacher, H. Lutz.** 2001. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Vet. Immunol Immunopathol*, 78: 305-315

- Klimentkowski, S., S. Kölbl, M. Fischer.** 1992. Untersuchungen über die Wirksamkeit der Paramunisierung zur Bekämpfung des Katzenschnupfens. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 105: 253-259
- Krieg A.M.** 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu. Rev. Immunol., 20: 709-760
- Krieg, A.M., L. Love-Homan, A-K. Yi, J. Harty.** 1998. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. J. Immunol., 161: 2428-2434
- Kruse, N., M. Pette, K. Toyka, P. Rieckmann.** 1997. Quantification of cytokine mRNA expression by RT-PCR in samples of previously frozen blood. J. Immunological Methods, 210: 195-203
- Kühn, T..** 2000. Die Alternative zu „Einstallmischungen“: Paramunisierung neugeborener Kälber mit einem nicht-mikrobiellen Inducer. Großtierpraxis, 1 (4): 30-37
- Kurzman, I.D., E.G. MacEwen, R.C. Rosenthal, L.E. Fox, E.T. Keller, S.C. Helfand, D.M. Vail, R.R. Dubielzig, B.R. Madewell, C.O. Jr. Rodriguez, et al.** 1995. Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: results of randomized clinical trials using combined liposome-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin. Clin. Cancer Res., 1(12): 1595-1601
- Kurzman, I.D., F. Shi, E.G. MacEwen.** 1993. In vitro and in vivo canine mononuclear cell production of tumor necrosis factor induced by muramyl peptides and lipopolysaccharide. Vet. Immunol. Immunopathol., 38(1-2): 45-56
- Kurzman, I.D., F. Shi, D.M. Vail, E.G. MacEwen.** 1999. In vitro and in vivo enhancement of canine pulmonary alveolar macrophage cytotoxic activity against canine osteosarcoma cells. Cancer Biother. Radiopharm., 14 (2): 121-128
- Kutyavin, I.V., I.A. Afonina, A. Mills, V.V. Gorn, E.A. Lukhtanov, E.S. Belousov, M.J. Singer, D.K. Walburger, S.G. Lokhov, A.A. Gall, R. Dempcy, M.W. Reed, R.B. Meyer, J. Hedgpeth.** 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucl. Acids Research, 23 (2): 655-661
- Kyriakis, S.C., C. Alexopoulos, K. Giannakopoulos, A.C. Tsinas, K. Saoulidis, S.K. Kritas, V. Tsiloyiannis.** 1996. Effect of a paramunity inducer on reproductive performance of gilts. Zentralbl. Veterinärmed. A, 43: 483-487
- Kyriakis, S.C., E.D. Tzika, D.N. Lyras, A.C. Tsinas, K. Saoulidis, K. Sarris.** 1998. Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. Res. Vet. Sci., 64 (3): 187-190
- Kyriakis, S.C., K. Saoulidis, S. Lekkas, ChC. Miliotis, P.A. Papoutsis, S. Kennedy.** 2002. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. J. Comp. Pathol., 126 (1): 38-46

- Lallo, M.A., M. Sanchez, L. Campos de Sa Rodrigues, E.F. Bondan.** 2002. The use of Baypamun DC in the treatment of canine malignant mammary tumours. WSAVA – FECAVA – AVEPA Congress, Oktober 2002, Granada
- Lange, W., K.N. Masihi.** 1991. Internationales Symposium „Immunotherapeutic prospects of infectious diseases“. Bundesgesundhbl., 34: 62-68
- Leopold-Temmler, B.** 2002. Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Interferonen. Der praktische Tierarzt, 83(10): 874-879
- Leutenegger, C.M., A.M. Alluwaimi, W.L. Smith, L. Perani, J.S. Cullor.** 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan[®] polymerase chain reaction. Vet Immunol and Immunopathol, 77: 275-287
- Leutenegger, C.N. Mislin, B. Sigrist, M.U. Ehrenguber, R. Hofmann-Lehmann, H. Lutz.** 1999. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. Veterinary Immunol. and Immunopathol., 71: 291-305
- Li, J., U.M. Padigel, P. Scott, J.P. Farrell.** 2002. Combined treatment with interleukin-12 and indomethacin promotes increased resistance in BALB/c mice with established Leishmania major infections. Infect. Immun., 70 (10): 5715-5720
- Lindner, A., P. von Wittke, P. Thein, 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
- Lobell, A., R. Weissert, S. Eltayeb, C. Svanholm, T. Olsson, H. Wigzell.** 1999. Presence of CpG DNA and the local cytokine milieu determine the efficacy of suppressive DNA vaccination in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Immunol., 163: 4754-4762
- Lyamichev, V., M.A. Brow, J.E. Dahlberg.** 1993. Structure specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerase. Science, 260(5109): 778-83
- Lygidakis, N.J., F.A. Ziras, E. Kyparidou, J. Parissis, P. Papadopoulou, B. Venetsanou.** 1995. Combined immunopharmaceutical therapy of patients with unresectable pancreatic carcinoma. Hepatogastroenterology, 42(6): 1039-1052
- MacEwen, E.G., A.A. Hayes, S. Mooney, A. Patnaik, I. Kurzman, W.D. Jr. Hardy.** 1985a. Levamisole as adjuvant to chemotherapy for canine lymphosarcoma. J. Biol. Response Mod., 4(4): 427-433
- MacEwen, E.G., H.J. Harvey, A.K. Patnaik, S. Mooney, A. Hayes I. Kurzman, W.D. Jr. Hardy.** 1985b. Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. J. Biol. Response Mod., 4(4): 418-426
- MacEwen, E.G., I.D. Kurzman, D.M. Vail, R.R. Dubielzig, K. Everlith, B.R. Madewell, C.O. Rodriguez, Jr., B. Phillips, C.H. Zwahlen, J. Obradovich, R.C. Rosenthal, L.E. Fox, M. Rosenberg, C. Henry, J. Fidel.** 1999. Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-

encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clinical Cancer Research*, 5: 4249-4258

MacEwen, E.G., I.D. Kurzman, R.C. Rosenthal, B.W. Smith, P.A. Manley, J.K. Roush, P.E. Howard. 1989. Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81(12): 935-938

MacEwen, E.G., I.D. Kurzman, S. Helfand, D. Vail, C. London, W. Kissebert, R.C. Rosenthal, L.E. Fox, E.T. Keller, J. Obradovich, et al. 1994. Current studies of liposome muramyl tripeptide (CGP 19835 lipid) therapy for metastasis in spontaneous tumors: a progress review. *J. Drug Target*, 2(5): 391-396

MacEwen, E.G., I.D. Kurzman. 1996. Canine osteosarcoma: amputation and chemoimmunotherapy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 26(1): 123-133

Maini, A., P.D. Morse, C.Y. Wang, R.F. Jones, G.P. Haas. 1997. New developments in the use of cytokines for cancer therapy. *Anticancer Res.*, 17 (5B): 3803-3808

Mansky, P.J. 2002. Mistletoe and cancer: controversies and perspectives. *Semin. Oncol.*, 29 (6): 589-594

Markus, S., K. Failing, W. Baumgärtner. 2002. Increased expression of pro – inflammatory cytokines and lack of up – regulation of anti – inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *J. of Neuroimmunology*, 125: 30-41

Marsland, A.L., E.A. Bachen, S. Cohen, B. Rabin, S.B. Manuck. 2002. Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious diseases. *Physiol. Behav.*, 77 (4-5): 711-716

Martin, V., W. Najbar, S. Gueguen, D. Grousson, H.M. Eun, B. Lebreux, A. Aubert. 2002. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon – omega in a placebo – controlled challenge trial. *Vet. Microbiol.*, 89 (2-3): 115-127

Mayr A., M. Büttner, S. Pawlas, V. Erfle, B. Mayr, R. Brunner, K. Osterkorn. 1986. Vergleichende Untersuchungen über die immunstimulierende (paramunisierende) Wirksamkeit von BCG, Levamisol, C.parvum und Präparaten aus Pockenviren in verschiedenen „in vivo“ und „in vitro“ Testen. *J. Vet. Med. B*, 33: 321-339

Mayr, A. 1977. Aktive Paramunsierung (I). *Kleintierpraxis*, 22: 85-87

Mayr, A. 1986. Use of paramunization in raising pigs. *Tierärztl. Praxis*, 14: 237-244

Mayr, A., B. Himmer, G. Baljer, J. Sailer. 1978. Erregerunspezifische Prophylaxe und Therapie von *Pseudomonas-aeruginosa*-Wundinfektion mittels Paramunisierung im Mäusemodell. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. A*, 506-514

Mayr, A., B. Mayr. 2002. Körper eigene Abwehr „Von der Empirie zur Wissenschaft“ Infektiologie – Immunologie – Schutzimpfung, Teil 6. *Tierärztliche Umschau*, 57 : 285-293

- Mayr, A., H. Raettig, H. Stickl, M. Aleksander.** 1979. Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer. Fortschr. Med., 97: 1159-1165
- Mayr, A., H. Stickl, W. Westhnes, W. Gillesberger, D. Schwarz, B. Bibrack.** 1977. Therapie von Herpes Zoster durch aktive Paramunisierung. 1. Therapie-Möglichkeiten, Grundlagen und Prinzip der Paramunität Paramunisierung. Fortschr. Med., 95: 87-93
- Mayr, A., M. Büttner, G. Wolf, H. Meyer, C. Czerny.** 1989. Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses. Zentralbl. Veterinärmed. (B), 36: 81-99
- Mayr, A., M. Büttner, S. Pawlas, V. Erfle, B. Mayr, R. Brunner, 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. B, 33: 321-339
- Mayr, A., M. Siebert.** 1990. Untersuchungen über die Wirksamkeit des Paramunitätsinducers PIND-ORF auf den durch Transportstress ausgelösten Kortisolanstiegs beim Pferd. Tierärztl. Umschau, 45: 677-682
- Mayr, A., W. Ahne, 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, B.** 2001. Neue Möglichkeiten der Anwendung von paraspezifischen Impfstoffen (Paramunitätsinducern) aus Pockenviren. Tierärztl. Umschau, 56: 115-120
- Mayr, B., A. Mayr.** 1995. Zum derzeitigen Stand der präklinischen Forschung über die Wirksamkeit und Unschädlichkeit von Paramunitätsinducern aus Pockenviren. Tierärztl. Praxis, 23: 542-552
- Mayr, B., D. Hörber.** 1992. Paramunisierung FeLV – positiver Katzen – ein Bericht aus der Praxis. Kleintierpraxis, 37: 515-518
- Mayr, B., S. Deininger, M. Büttner.** 1991. Treatment of chronic stomatitis of cats by local paramunization with PIND-ORF. J. Vet. Med. B, 38: 78-80
- Mayr-Bibrack, B.** 1982. Neue Bekämpfungsverfahren gegen Virusinfektionen des Hundes: Kombinationsvakzine gegen den Zwingerhusten und Paramunisierung gegen das infektiöse Welpensterben. Der praktische Tierarzt, 1/1982
- Metzner, M., K. Behrmann, D. Dopfer, W. Klee.** 1999. Efficacy of an immune modulator in enzootic pneumonia of dairy calves. Zentralbl. Veterinärmed. A, 46 (5): 293-299
- Miller, E.** 1997. The use of danazol in the therapy of immun – mediated diseases of dogs. Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim), 12 (3): 167-169

- Mulcahy, G., P. J. Quinn.** 1986. A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 9: 119-139
- Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, S. Kwok.** 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 292-300
- Nash, P., J. Barrett, J.X. Cao, S. Hota-Mitchell, A.S. Lalani, H. Everett, X.M. Xu, J. Robichaud, S. Hnatiuk, C. Ainslie, B.T. Seet, G. McFaden.** 1999. Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunmol. Rev.* 168: 103-120
- Nuttal, T.J., P.A. Knight, S.M. McAleese, J.R. Lamb, P.B. Hill.** 2002. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 87: 379-384
- Ohkusu, K., T. Yoshimoto, K. Tadedo, T. Ogura, S-I. Kashiwamura, Y. Iwakura, S. Akira, H. Okamura, K. Nakanishi.** 2000. Potentiality of Interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infection and Immunity*, May 2000: 2449-2456
- Okano, F. K, Yamada.** 2000. Canine interleukin-18 induces apoptosis and enhances Fas ligand mRNA expression in a canine carcinoma cell line. *Anticancer Res.*, 20 (5B): 3411-3415
- Okano, F., M. Satoh, K. Yamada.** 1997. Cloning and expression of the cDNA for canine interleukin-12. *J. Interferon Cytokine Res.*, 17(11): 713-718
- Olivry, T., G.A. Dean, M.B. Tompkins, J.L. Dow, P.F. Moore.** 1999. Toward an canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp. Dermatol.*, 8: 204-211
- Percival, S.S.** 2000. Use of Echinacea in medicine. *Biochem. Pharmacol.*, 60 (2): 155-158
- Phillips, B.S., M.L. Padilla, E.B. Dickerson, M.J. Lindstrom, S.C. Helfand.** 1999. Immunostimulatory effects of human recombinant interleukin 12 on peripheral blood mononuclear cells from normal dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 70(3-4): 189-201
- Phillips, T.R., J.L. Jensen, M.J. Rubino, W.C. Yang, R.D. Schultz.** 1989. Effects of Vaccines on the Canine Immune System. *Can J Vet Res* 1989, 53: 154-160
- Pinelli, E., D. Gebhard, A.M. Mommaas, M. van Hoeij, J.A. Langermans, E.J. Ruitenber, V.P. Rutten.** 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.*, 92 (3): 181-189
- Pinelli, E., S.Y. van der Kaaij, C.P.M. Broeren, E.J. Ruitenber, V.P.M.G. Rutten.** 1999a. Measurement of dog cytokines by reverse transcription – quantitative competitive polymerase chain reaction. *Immunogenetics* 1999, 49: 696-699

- Pinelli, E., S.Y. van der Kaaij, R. Slappendel, C. Fragio, E.J. Ruitenber, W. Bernadina, V.P.M.G. Rutten.** 1999b. Detection of canine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 69: 121-126
- Provenzano, M., C.R. Rossi, S. Mocellin.** 2001. The Usefulness of Quantitative Real-Time PCR in Immunogenetics. *ASHI Quarterly, Third Quarter 2001*, 89 Scientific Communications
- Pschyrembel.** 1998. *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Quesada, M.A., H.S. Rye, J.C. Gingrich.** 1991. High-sensitivity DNA detection with a laser-excited confocal fluorescence gel scanner. *Biotechniques* 1991, 10: 616-25
- Quinn, P.J.** 1990. Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Advances in veterinary sciences and comparative medicine*, 35: 43-99
- Quinnell, R.J., O. Courtenay, M-A. Shaw, M.J. Day, L.M. Garcez, C. Dye, P.M. Kaye.** 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. of Infectious Diseases*, 183: 1421-1424
- Raeymaekers, L.** 1993. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Analytical Biochemistry*, 214: 582-585
- Raeymaekers, L.** 1995. A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Research*, 5: 91-94
- Rainen, L., U. Oelmueller, S. Jurgensen, R. Wyrich, C. Ballas, J. Schram, C. Herdman, D. Bankaitis-Davis, N. Nicholls, D. Trollinger, V. Tryon.** 2002. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.*, 48 (11): 1883-1890
- Rees, C.A.** 2001. Canine and feline atopic dermatitis: a review of the diagnostic options. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, 16 (4): 230-232
- Riches, P., R. Gooding, B.C. Millar, A.W. Rowbottom.** 1992. Influence of collection and separation of blood samples on plasma IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations. *J. Immunol. Methods*, 153 (1-2): 125-131
- Rottman, J.B., W.A.F. Tompkins, M.B. Tompkins.** 1996. A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. *Vet. Pathol.*, 33: 242-248
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY
- Serrick, C., S. La Franchesca, A. Giaid, H. Shennib.** 1995. Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor- α , and interferon- γ release after ischemia/reperfusion injury in a novel autograft animal model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152: 277-282

- Shi, F., I.D. Kurzman, E.G. MacEwen.** 1995. In vitro and in vivo production of interleukin-6 induced by muramyl peptides and lipopolysaccharide in normal dogs. *Cancer Biother.*, 10(4): 317-325
- Stordeur, P., I. Zhou, M. Goldman.** 2002. Analysis of spontaneous mRNA cytokine production in peripheral blood. *J. Immunol. Methods*, 261 (1-2): 195-197
- Stordeur, P., L. Zhou, B. Byl, F. Brohet, W. Burny, D. de Groote, T. van der Poll, M. Goldman.** 2003. Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *J. Immunol. Methods*, 276 (1-2): 69-77
- Straubinger, R.K., A.F. Straubinger, B.A. Summers, H.N. Erb, L. Härter, M.J.G. Appel.** 1998. *Borrelia burgdorferi* induces the production and release of proinflammatory cytokines in canine synovial explant cultures. *Infection and Immunity*, 1: 247-268
- Strauss-Ayali, D., G. Baneth.** 2000. Canine visceral leishmaniasis. In L.E. Carmichael (ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, International Veterinary Information Services (www.ivilis.org)
- Strey, A.** 1996. Immunstimulantien, Immunpharmaka, p. 615 . In Frey H.-H. and W. Löscher (eds.), *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Strube, W., D. Kretzdorn, J. Grunmach, R.D. Bergle, P. Thein.** 1989. The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND – ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle. *Tierärztl. Praxis*, 17: 267-272
- Strube, W., P. Thein, D. Kretzdorn, J. Grunmach.** 1989. Baypamun: New possibilities for the control of infectious diseases in domestic animals. *Vet. Med. Rev.*, 60: 3-15
- Sundar, S., F. Rosenkaimer, M.L. Lesser, H.W. Murray.** 1995. Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon- γ in visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 171(4): 992-996
- Tagawa, M.** 2000. Cytokine therapy for cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 6 (6): 681-699
- Tani, K, M. Morimoto, T. Hayashi, H. Inokuma, T. Ohnishi, S. Hayashiya, T. Nomura, S. Une, M. Nakaichi, Y. Taura.** 2002. Evaluation of cytokine messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells from dogs with canine demodicosis. *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (6): 513-518
- Thellin O., W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout, E. Heinen.** 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 75(2-3): 291-5
- Tizard, I. R.** 2000. Drugs and other agents that affect the immun system, p. 426-433. In *Veterinary Immunology: An Introduction*, W.B. Saunders Company, Philadelphia

- Tomai, M.A., S.J. Gibson, L.M. Imbertson, R.L. Miller, P.E. Myhre, M.J. Reiter, T. L. Wagner, C.B. Tamulinas, J.M. Beaurline, J.F. Gerster, V.L. Horton.** 1995. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Research*, 28: 253-264.
- Truyen, U., S. Blewaska, U. Schultheiss.** 2002. Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von Interferon-Omega (IFN ω) gegen ausgewählte Viren von Hund und Katze. *Der praktische Tierarzt*, 83(10): 862-865
- Turner, P.C., R.W. Moyer.** 2002. Poxvirus immunomodulators: functional insights from animal models. *Virus Research*, 88: 35-53
- Uchide, N., K. Ohyama, T. Bessho, T. Yamakawa.** 2002. Semi-quantitative RT-PCR-based assay, improved by Southern hybridization technique, for polarity-specific influenza virus RNAs in cultured cells. *J. Virol. Methods*, 106(1): 125-34
- Vail, D.M., E.G. MacEwen, I.D. Kurzman, R.R. Dubielzig, S.C. Helfand, W.C. Kisseberth, C.A. London, J.E. Obradovich, B.R. Madewell, C.O. Jr. Rodriguez, et al.** 1995. Liposom-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dogs: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clin. Cancer Res.*, 1(10): 1165-1170
- van Kampen, K.R.** 1998. Immunotherapy and cytokines. *Seminars in Vet. Med. and Surgery (Small Animal)*, 12 (3): 186-192
- Waldvogel, A.S., B.M. Hediger-Weithaler, R. Eicher, A. Zakher, D.S. Zarlenga, L.C. Gasbarre, V.T. Heussler.** 2000. Interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 77(3-4): 201-212
- Wang, T., M.J. Brown.** 1998. mRNA Quantification by Real Time TaqMan Polymerase Chain Reaction: Validation and Comparison with RNase Protection. *Analytical Biochemistry*, 269: 198-201
- Wang, S.C., R.D. Klein, W.L. Wahl, W.H. Alarcon, R.J. Garg, D.G. Remick, G.L. Su.** 1998. Tissue coexpression of LBP and CD14 mRNA in a mouse model of sepsis. *J. Surgical Res.*, 76: 67-73
- Weber, O., A. Siegling, A. Friebe, A. Limmer, T. Schlapp, P. Knolle, A. Mercer, H. Schaller, H.-D. Volk.** 2003. Inactivated *parapoxvirus ovis* (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *Journal of General Virology*, 84 (7): 1843-1853
- Weber, O., A. Siegling, T. Schlapp.** 1999. Baypamun shows antiviral activity against HBV and HSV by induction of interferon-gamma. 26. World Veterinary Congress, Lyon, France.
- Wernette, C.M., B. F. Smith, Z.L. Barksdale, R. Hecker, H.J. Baker.** 2002. CpG oligodesoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation. *Vet. Immunol. & Immunopathol.*, 84: 223-236

- Whitley, E.M., A.C. Bird, K.E. Zucker, L.G. Wolfe.** 1995. Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res.*, 15 (3): 923-929
- Wieler, L., G. Baljer, M. Büttner, J. Adler, A. Mayr.** 1990. Comparative studies of the paraspecific immunostimulation (paramunization) by bacterial lysates in bacterial infection models and in the cytotoxicity test. *Zentralbl. Veterinärmed. (B)*, 37: 491-500
- Williams, S., C. Schwer, A. Krishnarao, C. Heid, B. Karger, P.M. Williams.** 1996. Quantitative competitive PCR: Analysis of amplified products of the HIV-1 gag gene by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Anal Biochem*, 236(1): 146-52
- Yancy, H., S.L. Ayers, D.E. Farrell, A. Day, M.J. Myers.** 2001. Differential cytokine mRNA expression in swine whole blood and peripheral blood mononuclear cell cultures. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 79 (1-2): 41-52
- Young, N.S.** 2002. Immunosuppressive treatment of acquired aplastic anemia and immune – mediated bone marrow failure syndrome. *Int. J. Hematol.*, 75 (2): 129-140
- Ziebell, K.L., D. Kretzdorn, S. Auer, K. Failing, N. Schmeer.** 1997. The use of Baypamun N in crowding-associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 2-week-old veal calves. *Zentralbl. Veterinärmed. (B)*, 44 (7): 415-424
- Ziebell, K.L., H. Steinmann, D. Kretzdorn, T. Schlapp, K. Failing, N.Schmeer.** 1997. The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses. *Zentralbl. Veterinärmed. (B)*, 44 (9): 529-536
- Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G.B. Lipford, M. Röcken, H. Wagner, K. Heeg.** 1998. Cutting edge: CpG Oligonucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.*, 160: 3627-3630
- Zur, G., S.D. White, P.J. Ihrke, P.H. Kass, N. Toebe.** 2002. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992 – 1998. Part II. Response at hyposensitization. *Veterinary Dermatology*, 13: 103-111

IX. Anhang

8.1 Materialienlisten

8.1.1 Geräte, Klinik- und Laborbedarf

8.1.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Firma/Firmensitz	Verwendung
Blutanalysegerät	Hämatologiesystem Technicon H*1	<i>Fa. Bayer, Leverkusen</i>	Bestimmung von Blutparametern (s. Kapitel 3.2.1.3)
Elektrophorese- kammer DNA	Hoefler HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit	<i>Fa. Amersham Biosciences, Freiburg</i>	Auftrennung von DNA-Fragmenten
Elektrophorese- kammer DNA	Model B1	<i>Fa. Peqlab, Erlangen</i>	Auftrennung von DNA-Fragmenten
Elektrophorese- kammer RNA	E-Gel® 1,2% Agarose + E-Gel® Base	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	Auftrennung von RNA-Fragmenten
Heizblock	Techne DRI-BLOCK® DB-3D	<i>Fa. Thermo-Dux, Wertheim</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Denaturierung von RNA • Transformation chemisch kompetenter Bakterien
Inkubations- schüttelschrank	Unitron AJ 110	<i>Fa. Infors, Übach- Palenberg</i>	Inkubation von Bakterien- Flüssigkulturen (Klonierung)
Inkubations- schrank	CO ₂ Brutschrank Heracell	<i>Fa. Heraeus, Düsseldorf</i>	Inkubation von transformierten Bakterien und PBMC-Kulturen
Inversmikroskop	Olympus CK2	<i>Fa. Olympus, Hamburg</i>	Beurteilung von PBMC-Kulturen
Lichtmikroskop	Olympus BH-2	<i>Fa. Olympus, Hamburg</i>	Zählung von PBMCs
Netzgerät	BluePower500	<i>Fa. Serva, Heidelberg</i>	Stromquelle für die Elektrophorese
PCR-Gerät Quantifizierung	ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Amplifizierung und Quantifizierung von DNA
PCR-Gerät	Mastercycler gradient	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Amplifizierung von DNA
PCR-Gerät	Thermocycler GenAmp 2400	<i>Fa. Perkin Elmer, Rodgau</i>	Amplifizierung von DNA

Photometer	Bio Photometer	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA
Pipetten	0,1-2,5 µl; 10-100 µl; 1-10 µl; 50-200 µl; 200-1000 µl	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Abmessen von Flüssigkeiten
Pipettierhilfe	Edos	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Aufziehen von Flüssigkeiten
Pipettierhilfe	Pipetboy	<i>Fa. Integra Biosciences, Fernwald</i>	Aufziehen von Flüssigkeiten
Sequenzier-automat	ABI PRISM® 310 Genetic Analyser	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Sequenzanalyse von DNA
Sterilbänke	Clean Air BS 5726	<i>Fa. Thermo Quest, Engelsbach</i>	Keimfreies Arbeiten mit Zell- und Bakterienkulturen
UV-Lichttisch	Herolab UVT-20M/W 254 mm	<i>Fa. Herolab, Wiesloch</i>	Betrachtung von Nukleinsäure-Gelen
Video-dokumentation	E.A.S.Y. RH	<i>Fa. Herolab, Wiesloch</i>	Betrachtung von Nukleinsäure-Gelen
Vortexer	MS 2 Minishaker	<i>Fa. IKA, Staufen</i>	Mischung von Lösungen
Waage	PE 3600	<i>Fa. Mettler, Gießen</i>	Abmessen von Agarose
Wasserbad	Typ 1003	<i>Fa. GFL, Burgwedel</i>	Transformation chemisch kompetenter Zellen (Klonierung)
Zellzählkammer	Bürker Zählkammer	<i>Fa. Brand, Wertheim/Main</i>	Zählung von PBMCs
Zentrifuge	Biofuge pico	<i>Fa. Heraeus, Düsseldorf</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PBMC-Isolierung</i> • <i>RNA/DNA-Extraktion</i>
Zentrifuge	Microcentrifuge 5415 D	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Erstellen des PCR-Mastermixes
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PBMC-Isolierung</i> • <i>RNA/DNA-Extraktion</i>

8.1.1.2 Klinikbedarf

Material	Typ	Firma/Firmensitz	Verwendung
Blutsammelgefäß	Monovette® EDTA KE/9 ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht	Blutgewinnung für die PBMC-Isolierung
Blutsammelgefäß	PAXgene™ Blood RNA Tube (Artikel-Nr. 762125)	Fa. PreAnalytiX/Quia gen, Hilden	Blutgewinnung für die RNA-Extraktion
Blutsammelgefäß	Vacuetten 2 ml, 4 ml, 9 ml K3 EDTA K3	Fa. Greiner, Solingen	Blutgewinnung für die Analyse im Technicon H*1
Blutsammelsystem	Vacutainer Blood Collection Needle	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg	Blutgewinnung für die Analyse im Technicon H*1
Blutsammelsystem	Vacutainer Standard Needle Holder	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg	Blutgewinnung für die Analyse im Technicon H*1
Einmal-Kanülen	Sterican® 0,90 x 0,40 mm	Fa. Braun, Melsungen	Blutgewinnung für die RNA-Extraktion
Einmal-Spritzen	Omnifix® Einmal-Spritzen 2 ml, 5 ml	Fa. Braun, Melsungen	Blutgewinnung für die RNA-Extraktion
Perfusionsbesteck	Mandrin 18 G x 45 mm	Fa. Braun, Melsungen	Blutgewinnung für die RNA-Extraktion in kurzen Zeitabständen
Perfusionsbesteck	Vasocan® Braunüle® 18 G x 45 mm	Fa. Braun, Melsungen	Blutgewinnung für die RNA-Extraktion in kurzen Zeitabständen
Perfusionsbesteck	Vasuflo® 0,8 x 19 mm	Fa. Dispomed, Gelnhausen	Blutgewinnung für die PBMC-Isolierung

8.1.1.3 Laborbedarf

Material	Typ	Firma/Firmensitz	Verwendung
Abdeckfolie für PCR-Reaktionsplatte	Micro Amp Optical Adhesive Covers	Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt	PCR im ABI PRISM™ 7700
Einmal-Handschuhe	Safe skin latex gloves	Fa. NeoLab, Heidelberg	Laborarbeiten
Einmal-Ösen	steril	Fa. Greiner Labortechnik, Solingen	Ausstreichen von Bakterien auf Agarplatten (Klonierung)

Einmal-Pipetten	Combitips Biopur 1 ml, 5 ml, 10 ml, 2,5 ml	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Abmessen von Flüssigkeiten
Einmal-Pipetten	Pasteur-Pipetten mit Watte	<i>Fa. Roth, Karlsruhe</i>	Abmessen von Flüssigkeiten
Filtertips	0.1 - 2.5 µl, 10 µl, 100 µl, 250 µl, 1000 µl	<i>Fa. Biozym, Hess. Oldendorf</i>	Pipettenaufsätze zum Abmessen von Flüssigkeiten
Kompressions- kissen für PCR- Reaktionsplatte	Micro Amp Cover Compression Pads	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	PCR im ABI PRISM™ 7700
Küvetten	UVette 220-1600 nm	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	Probengefäß für das Photometer
PCR- Reaktionsplatte	Micro Amp Optical 96- Well Reaction Plate	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	PCR im ABI PRISM™ 7700
Petrischalen	Petrischalen mit Deckel 8,8 cm ²	<i>Fa. Nunc, Wiesbaden</i>	Herstellung von Agarplatten
Reaktionsgefäß	Falcon Tubes 15 ml, 20 ml, 50 ml	<i>Fa. Becton Dickinson, Heidelberg</i>	PBMC-Isolierung
Reaktionsgefäß/ PCR	Micro Amp Caps/ Strip	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	PCR im Master- oder Thermocycler
Reaktionsgefäß- deckel/ PCR	Micro Amp Strip Reaction Tubes	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	PCR im Master- oder Thermocycler
Reaktionsgefäße mit Deckel	5 ml, 13 ml	<i>Fa. Sarstedt, Nümbrecht</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA/DNA- Extraktion • PBMC-Isolierung • PCR-Mastermixe • Verdünnungs- reihen (cDNA) • Klonierungen
Reaktionsgefäße mit Deckel	Safe Lock Micro Test Tubes, 1.5 ml, 2 ml	<i>Fa. Eppendorf, Hamburg</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNA/DNA- Extraktion • PBMC-Isolierung • PCR-Mastermixe • Verdünnungs- reihen (cDNA) • Klonierungen
Serologische Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml	<i>Fa. Sarstedt, Nümbrecht</i>	Abmessen von Flüssigkeiten

8.1.2 Reagenzien

Material	Typ	Firma/Firmensitz	Verwendung
Agar	E.coli FastMedia™ Luria Bertani (LB) Agar Kan (50 µg/ml Kanamycin) (Artikel-Nr. M0051)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Nährboden für die selektive Bakterienanzucht mit Kanamycin (Klonierung)
Agar	E.coli FastMedia™ LB Liquid Kan (50 µg/ml Kanamycin) (Artikel-Nr. M0041)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Flüssigmedium für die selektive Bakterienanzucht mit Kanamycin (Klonierung)
Agarose	NuSieve® 3:1 Agarose 4% (Artikel-Nr. 50094)	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf	Nukleinsäure- trennung (<1000 Bp)
Agarose	Seakem® LE Agarose 2% (Artikel-Nr. 50004)	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf	Nukleinsäure- trennung (>500 Bp)
Antibiotikum	Neomycin 10 mg/ml; Endkonz. 50µg/ml	Fa. Invitrogen, Karlsruhe	Zellkulturmedium (PBMC-Stimulation)
Antibiotikum	Polymixin Endkonz. 100 Einheiten /ml	Fa. Invitrogen, Karlsruhe	Zellkulturmedium (PBMC-Stimulation)
Chloroform zur Analyse		Fa. Merck, Darmstadt	RNA-Extraktion mit Trizol® LS Reagent
DNA-Leiter	pUC Mix Marker, 8 (Artikel-Nr. SM0302)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Standard zum Vergleich von DNA- Größen auf Agarosegel
DNase/RNase freies Wasser	LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie	Fa. Merck, Darmstadt	<ul style="list-style-type: none"> • RNA/DNA- Extraktion • PBMC-Isolierung • PCR-Mastermixe • Verdünnungs- reihen (cDNA)
Ethanol (99.8 %)		Fa. Merck, Darmstadt	RNA-Extraktion
Färbebad	Ethidium Bromide Solution, 10mg/ml (Artikel-Nr. 161-0433)	Fa. BIO-RAD, München	DNA-Färbung auf Agarosegel
Farbstoff	6x Loading Dye Solution (Artikel-Nr. G7654)	Fa. Sigma- Aldrich, Seelze	DNA- Gelelektrophorese
Fötales Kälberserum	Fetal Bovine Sera, cell culture tested (Artikel-Nr. F2442)	Fa. Sigma- Aldrich, Seelze	PBMC-Kulturen
Gradient	Histopaque® - 1077 (Artikel-Nr. H8889)	Fa. Sigma- Aldrich, Seelze	Zellseparierung bei der PBMC-Isolierung
Isopropanol		Fa. Merck, Darmstadt	Plasmidpräparation

Ladepuffer	Gel Loading Solution Type I, 6x konzentriert (0,25 % Bromphenolblau w/v, 0.25 % w/v Xylen Cyanol FF, 40 % Sucrose w/v) (Artikel- Nr. G7654)	<i>Fa. Sigma- Aldrich, Seelze</i>	DNA- Gelelektrophorese
Ladepuffer	RNA Sample Loading Buffer ohne Ethidiumbromid (62,5 % deionisiertes Formamid, 1,14 M Formaldehyd, 200 µg/ml Bromphenolblau, Xylen Cyanol 200 µg/ml, 1,25 x EDTA-Sodium-Acetat) (Artikel-Nr. R1386)	<i>Fa. Sigma- Aldrich, Seelze</i>	RNA- Gelelektrophorese
Laufpuffer	TAE-Buffer (40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8,3) (Artikel-Nr. 15558- 042)	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	DNA- Gelelektrophorese
Medium	RPMI 1640 Medium, flüssig, ohne Phenolrot, mit L- Glutamin (Artikel-Nr. 11835-030)	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	PBMC-Kultur
Mitogen	Concanavalin A von Canavalia ensiformis, Type IV-S, γ -irradiated (Artikel-Nr. C0412)	<i>Fa. Sigma- Aldrich, Seelze</i>	PBMC-Stimulation
Mitogen	Phytohemagglutinin PHA-P Phaseolus vulgaris (Artikel-Nr. L9132)	<i>Fa. Sigma- Aldrich, Seelze</i>	PBMC-Stimulation
PCR-Enzym	Herculase [®] -Hotstart DNA Polymerase (Artikel-Nr. 600-310)	<i>Fa. Stratagene, Heidelberg</i>	PCR für die nachfolgende Sequenzierung
PCR-Enzym	Pfu-Turbo- Polymerase (Artikel-Nr. 600-250)	<i>Fa. Stratagene, Heidelberg</i>	PCR für die nachfolgende Sequenzierung
PCR-Enzym	Platinum Pfx DNA Polymerase (Artikel- Nr. 11708-013)	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	PCR für die nachfolgende Sequenzierung

Puffer	HBSS (Hanks' gepufferte Salzlsg.; 0,4 g/L KCl, 0,06 g/L KH ₂ PO ₄ , 8 g/L NaCl, 0,35 g/L NaHCO ₃ , 0,048 g/L Na ₂ HPO ₄ , 1 g/L D-Glucose, pH 5,7) (Artikel-Nr. 14175-053)	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	PBMC-Isolierung
Puffer	RNeasy Lysis Buffer (mit Guanidiniumthiocyanat) (Artikel-Nr. 79216)	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	RNA-Extraktion
Reagenz für RNA-Extraktion	TRIzol [®] LS Reagent (mit Phenol und Guanidiniumisothiocyanat) (Artikel-Nr. 10296-028)	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	RNA-Extraktion
β-Mercaptoethanol		<i>Fa. Roth, Karlsruhe</i>	Protein-Denaturierung bei der RNA-Extraktion
Standard-RNA	Mouse Spleen Total RNA (Artikel-Nr. 7820)	<i>Fa. Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK</i>	RNA-Elektrophorese
Trypan Blau Lösung (0,4%)	Trypan Blue solution, flüssig, 0,4 % (0,8 % Natrium Chlorid, 0,06 % Kalium) (Artikel-Nr. T8154)	<i>Fa. Sigma-Aldrich, Seelze</i>	Zählung von PBMCs

8.1.3 Kits

Typ	Artikelnummer	Firma/Firmensitz	Verwendung
ABI PRISM [®] BigDye [™] Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit	4303149	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Sequenzierung
DyeEx Spin Kit	63104	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	Sequenzierung
High Speed [™] Plasmid Midi Kit	12643	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	Plasmidpräparation
NucleoSpin [®] RNA Blood XL	740954	<i>Fa. Macherey & Nagel, Düren</i>	RNA-Extraktion

NucleoSpin® RNA II Blood Kit	740999	<i>Fa. Macherey & Nagel, Düren</i>	RNA-Extraktion
NucleoSpin® RNA II Kit	740955	<i>Fa. Macherey & Nagel, Düren</i>	RNA-Extraktion
PAXgene™ Blood RNA Kit	76134	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	RNA-Extraktion
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Human 18S rRNA	4310893E	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	20fach konzentrierte Primer- und Sonden-Mischung für die Detektion von 18S rRNA
QIAprep® Spin Miniprep Kit	27106	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	DNA-Extraktion
RNase-Free DNase Set	79254	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	DNA-Abbau bei der RNA-Extraktion
RNeasy Mini Kit	741045	<i>Fa. Qiagen, Hilden</i>	RNA-Extraktion
TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N080-0234	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Reverse Transkription
TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N080-0234	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Reverse Transkription
TaqMan® Universal PCR Mastermix (Taq-Polymerase, 2 x Reaktionspuffer, dATP, dGTP, dCTP, dUTP, Uracil N-Glycosylase, Farbstoff)	4318157	<i>Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Mastermix für die TaqMan®-PCR
Zero Blunt® TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing	K-2875-20	<i>Fa. Invitrogen, Karlsruhe</i>	Sequenzierung

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit vor dem Fachbereich zu vertreten. Vor allem bedanke ich mich für das kritische Korrekturlesen und seine Hilfe bei Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Schmeer für seine sehr hilfreiche fachliche und moralische Unterstützung.

Für die fachliche Betreuung und viele interessante Diskussionen bedanke ich mich herzlich bei Dr. Sonja Friederichs.

Herrn Dr. Tobias Schlapp danke ich für die Überlassung des Themas, die finanzielle Unterstützung sowie die lehrreichen Stunden bei den „Probenvorträgen“.

Dr. Christian Menge und Dr. Heike Schoepe danke ich für das sehr ausführliche und hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke auch allen ehemaligen Mitarbeitern der „Biologie“ für das sehr nette Arbeitsklima und die unvergesslichen Nachmittage im Pausenraum.

Insbesondere möchte ich mich bei Cornelia Wollnik bedanken, die mir immer tatkräftig zur Seite stand und geduldig all meine Fragen beantwortet hat.

Stefan Buschmann danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der TaqMan-PCR und seine Unterstützung bei „mathematischen Fragestellungen“.

Martina Rehagen, Antje Gerhardt und Georg Opwis gilt mein Dank für ihre schweißtreibende Assistenz bei den Blutentnahmen zu den unmenschlichsten Tageszeiten.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Freundin und Co-Doktorandin Heike Sauer bedanken, ohne die das Jammern nur halb so schön gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion in jeglicher Weise unterstützt und das alles erst ermöglicht haben.

Vor allem danke ich Harry für seine große Geduld und die seelische Unterstützung.