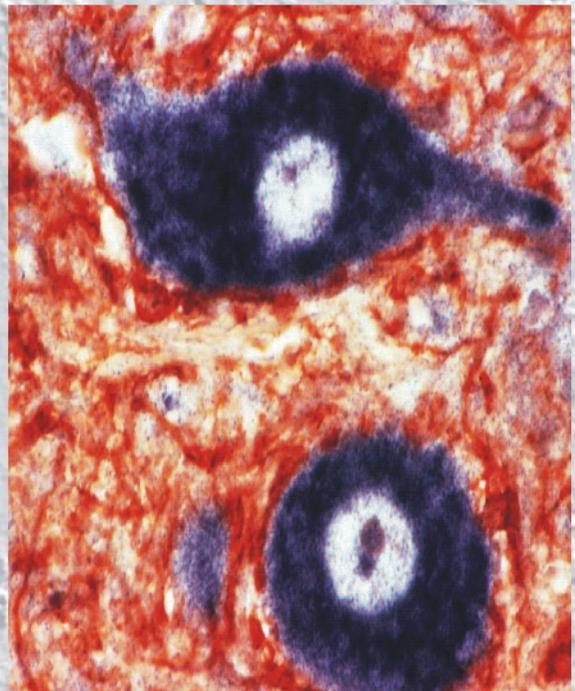


Aus dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

# Nachweis von MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS im Gehirn von Hunden mit einer Staupeenzephalitis mittels *in situ*-Hybridisierung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades  
beim Fachbereich  
Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität  
Gießen



**Sibylle Eleonore Gröters**





**Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

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

**1. Auflage 2004**

**© 2004 by Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen  
Printed in Germany**

**ISBN 3-938026-18-9**

**Verlag: DVG Service GmbH  
Frankfurter Straße 89  
35392 Gießen  
Tel. 0641/24466  
Fax 0641/25375  
[geschaeftsstelle@divg.net](mailto:geschaeftsstelle@divg.net)  
[www.divg.net](http://www.divg.net)**

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

**Nachweis von MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS im Gehirn  
von Hunden mit einer Staupeenzephalitis mittels *in situ*-  
Hybridisierung**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
SIBYLLE ELEONORE GRÖTERS  
Tierärztin aus Buchen/Odw.

Gießen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

2. Berichterstatter: PD Dr. G. Schultheiß

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2004

Die Anfertigung dieser Arbeit wurde durch ein Doktorandenstipendium der Bayer AG, Leverkusen und ein Promotionsstipendium nach dem Hessischen Gesetz zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlern (HGFöN) gefördert sowie durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Ba 815/61) unterstützt.

**MEINER FAMILIE**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>LITERATURÜBERSICHT.....</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b>2.1</b>	<b>DAS STAUEVIRUS .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>DIE STAUEVIRUS-ERKRANKUNG DES HUNDES .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	ALLGEMEIN .....	7
2.2.2	FORMEN DER STAUEENZEPHALITIS .....	11
2.2.3	DIE PATHOGENESE DER DEMYELINISIERENDEN STAUEENZEPHALITIS .....	12
<b>2.3</b>	<b>MATRIX-METALLOPROTEINASEN (MMPS) UND IHRE INHIBITOREN (TIMPS) .....</b>	<b>18</b>
2.3.1	DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX .....	18
2.3.2	ALLGEMEINES ÜBER MMPS UND TIMPS .....	19
2.3.3	MATRIX-METALLOPROTEINASEN (MMPS).....	22
2.3.3.1	Aufbau der MMPS.....	22
2.3.3.2	Regulation der MMPS .....	29
2.3.3.3	Substrate der MMPS.....	31
2.3.4	PHYSIOLOGIE UND PATHOLOGIE DER MMPS.....	32
2.3.4.1	Allgemein.....	32
2.3.4.2	MMPS und TIMPs im ZNS .....	33
<b><u>3</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN.....</u></b>	<b><u>39</u></b>
<b>3.1</b>	<b>UNTERSUCHTE HUNDE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>GEWEBEPROBEN FÜR DIE HISTOLOGIE, IMMUNHISTOLOGIE UND <i>IN SITU</i>- HYBRIDISIERUNG .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>LICHTMIKROSKOPISCHE EINTEILUNG DER STAUELÄSIONEN.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>IMMUNHISTOLOGIE .....</b>	<b>43</b>
3.4.1	ANTIKÖRPER UND SEREN .....	43
3.4.2	PROTOKOLL DER IMMUNHISTOLOGIE (ABC-METHODE) FÜR PARAFFINSCHNITTE .....	45
3.4.3	KONTROLLEN .....	47
3.4.4	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOLOGIE .....	47
<b>3.5</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSSCHRITTE .....</b>	<b>48</b>
3.5.1	ALLGEMEINE MAßNAHMEN ZUR KONTAMINATIONSVERMEIDUNG .....	50
3.5.2	RNS-ISOLIERUNG.....	50
3.5.3	REVERSE TRANSKRIPTASE – POLYMERASE KETTENREAKTION (RT-PCR) .....	53

3.5.3.1	Primer.....	53
3.5.3.2	DNase-Behandlung.....	54
3.5.3.3	Reverse Transkription.....	54
3.5.3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	55
3.5.3.5	Gelelektrophorese.....	56
3.5.4	<b>KLONIERUNGSREAKTION</b> .....	<b>57</b>
3.5.4.1	Ansatz der Klonierungsreaktion.....	57
3.5.4.2	Eluierung der Plasmid-DNS.....	59
3.5.4.3	Transformation der Plasmid-DNS in DH5 $\alpha$ kompetente Zellen.....	60
3.5.4.4	Restriktionsverdau der Plasmid-DNS.....	61
3.5.4.5	Anlegen von Glycerolstocks.....	61
3.5.4.6	Sequenzierung der Plasmid-DNS-Produkte.....	62
3.5.5	<b>PCR ZUR VERVIELFÄLTIGUNG DER PLASMID-DNS</b> .....	<b>62</b>
3.5.5.1	Primer.....	62
3.5.5.2	PCR.....	62
3.5.5.3	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	63
3.5.6	<b>DIG-MARKIERTE RNS-SONDENSYNTHESE (IN VITRO-TRANSKRIPTION)</b> .....	<b>64</b>
3.5.7	<b>IN SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH)</b> .....	<b>67</b>
3.5.7.1	Durchführung der ISH.....	67
3.5.7.2	Kontrollen in der ISH.....	69
3.5.7.3	Auswertung der ISH.....	69
<b>3.6</b>	<b>DOPPELMARKIERUNG</b> .....	<b>70</b>
<b>3.7</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b> .....	<b>71</b>
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b><u>72</u></b>
<b>4.1</b>	<b>KLINIK BEI AN STAUPE ERKRANKTEN HUNDEN</b> .....	<b>72</b>
<b>4.2</b>	<b>KLINIK DER KONTROLLHUNDE</b> .....	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>PATHOLOGISCHE BEFUNDE BEI AN STAUPE ERKRANKTEN HUNDEN</b> .....	<b>73</b>
4.3.1	PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE BEFUNDE.....	73
4.3.2	PATHOLOGISCH-HISTOLOGISCHE BEFUNDE.....	73
4.3.2.1	Extra-zerebräre Organe.....	73
4.3.2.2	Gehirn.....	74
<b>4.4</b>	<b>PATHOLOGISCHE BEFUNDE DER KONTROLLHUNDE</b> .....	<b>77</b>
<b>4.5</b>	<b>IMMUNHISTOLOGISCHE ERGEBNISSE</b> .....	<b>77</b>
4.5.1	NACHWEIS VON STAUPEVIRUS-NUKLEOPROTEIN-ANTIGEN.....	77
4.5.2	NACHWEIS VON GFAP-POSITIVEN ZELLEN.....	79
4.5.3	NACHWEIS VON BS-1 POSITIVEN ZELLEN.....	81

---

4.5.4	NACHWEIS VON CD44-POSITIVEN ZELLEN .....	82
4.5.5	NACHWEIS VON MHC KLASSE II-POSITIVEN ZELLEN .....	85
4.5.6	NACHWEIS VON MBP-POSITIVEN ZELLEN .....	86
4.5.7	NACHWEIS VON CD3E-POSITIVEN ZELLEN .....	87
4.5.8	NACHWEIS VON CD79A-POSITIVEN ZELLEN .....	88
<b>4.6</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ERGEBNISSE .....</b>	<b>90</b>
4.6.1	RT-PCR UND KLONIERUNGSREAKTION .....	90
4.6.2	<i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG .....	91
4.6.2.1	Nachweis der GAPDH-mRNS .....	91
4.6.2.2	Nachweis der Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS .....	92
4.6.2.3	Nachweis der MMP-9-mRNS .....	95
4.6.2.4	Nachweis der MMP-14-mRNS .....	98
4.6.2.5	Nachweis der TIMP-1-mRNS .....	102
4.6.2.6	Vergleichende Betrachtung der ISH-Ergebnisse .....	105
<b>4.7</b>	<b>GEMEINSAME BETRACHTUNG DER IH- UND ISH-ERGEBNISSE .....</b>	<b>106</b>
4.7.1	DOPPELMARKIERUNG .....	106
4.7.2	STATISTISCHE KORRELATION ZWISCHEN IH- UND ISH-ERGEBNISSEN .....	107
<b>4.8</b>	<b>LICHTMIKROSKOPISCHE ABBILDUNGEN .....</b>	<b>109</b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>132</u></b>
<b>5.1</b>	<b>PATHOHISTOLOGISCHE ERGEBNISSE .....</b>	<b>132</b>
<b>5.2</b>	<b>IMMUNHISTOLOGISCHE ERGEBNISSE .....</b>	<b>133</b>
5.2.1	STAUPEVIRUS-NUKLEOPROTEIN-ANTIGEN .....	133
5.2.2	GFAP UND CD44 .....	134
5.2.3	BS-1 UND MHC KLASSE II-ANTIGEN .....	136
5.2.4	MBP .....	137
5.2.5	CD3E UND CD79A .....	139
<b>5.3</b>	<b>ERGEBNISSE DER <i>IN SITU</i>-HYBRIDISIERUNG .....</b>	<b>140</b>
5.3.1	GAPDH-MRNS .....	140
5.3.2	STAUPEVIRUS-NUKLEOPROTEIN-MRNS .....	140
5.3.3	MMPs/TIMP .....	141
5.3.3.1	MMP-9- und MMP-14-mRNS .....	142
5.3.3.2	TIMP-1-mRNS .....	150
<b>5.4</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG .....</b>	<b>152</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>154</u></b>

---

<b>7</b>	<b><u>SUMMARY..... 157</u></b>
<b>8</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS ..... 160</u></b>
<b>9</b>	<b><u>ANHANG..... 184</u></b>
<b>9.1</b>	<b>BEZUGSQUELLEN FÜR REAGENZIEN, CHEMIKALIEN UND ANTIKÖRPER..... 184</b>
<b>9.2</b>	<b>BEZUGSQUELLEN FÜR GERÄTE UND EINMALARTIKEL ..... 188</b>
<b>9.3</b>	<b>LÖSUNGEN UND PUFFER..... 190</b>
9.3.1	HISTOLOGIE ..... 190
9.3.2	IMMUNHISTOLOGIE ..... 191
9.3.3	KLONIERUNGSREAKTION ..... 192
9.3.4	RNS-ISOLIERUNG, PCR UND SONDENSYNTHESE ..... 192
9.3.5	<i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG ..... 193
<b>9.4</b>	<b>ABKÜRZUNGEN ..... 199</b>

# 1 Einleitung

Das kanine Staupevirus (*Canine distemper virus*, CDV) ist ein behülltes, einzelsträngiges, negativ-orientiertes RNS-Virus und gehört, gemeinsam mit dem humanen Masernvirus (*Measles virus*, MeV), dem cetaceen Morbillivirus (*Cetacean Morbillivirus*, CeMV), dem phocinen Staupevirus (*Phocine distemper virus*, PDV), dem *Peste-des-petits-ruminants Virus* (PPRV) und dem *Rinderpest Virus* (RPV) zu dem Genus der **Morbilliviren** in der Familie der Paramyxoviridae (PRINGLE, 2000).

Das CDV ist in der Lage, bei zahlreichen terrestrischen und aquatischen Karnivoren eine Staupeviruserkrankung hervorzurufen. Die Staupeviruserkrankung kann, je nach Immunitätslage des infizierten Wirtes, dem Staupevirusstamm, sowie dem Alter des Tieres, verschiedene Verlaufsformen annehmen und entweder zu einem abortiven Verlauf, einer subklinischen Infektion oder zu einer generalisierten Erkrankung führen (APPEL, 1987). Bei der generalisierten Erkrankung kann zwischen einer katarrhalischen Form mit primärer Beteiligung des Respirations- bzw. Gastrointestinaltrakts und einer nervösen Form mit primärer Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) unterschieden werden, wobei jedoch auch Mischformen auftreten (APPEL, 1987; BAUMGÄRTNER, 1993). Man unterscheidet bei der nervösen Staupe grundsätzlich zwischen einer Polio- und einer Leukoenzephalitis, wobei die Leukoenzephalitis die typische Manifestationsform darstellt (BAUMGÄRTNER, 1993). In den Formenkreis der Polioenzephalitis zählen die so genannte "old dog encephalitis" (IMAGAWA et al., 1980; LINCOLN et al., 1973; VANDEVELDE et al., 1980), die postvakzinale Staupeenzephalitis (BESTETTI et al., 1978; HARTLEY, 1974) und die Einschlusskörperchen-Polioenzephalitis (NESSELER et al., 1997 und 1999). Die neuropathologischen Herdveränderungen bei der demyelinisierenden Leukoenzephalitis können in akute Plaques, subakute Herde ohne oder mit Entzündung, chronische sowie sklerotische Läsionen unterteilt werden (KRAKOWKA et al., 1985; WÜNSCHMANN et al., 1999). Da die histopathologischen Veränderungen bei der chronischen demyelinisierenden Staupeenzephalitis morphologisch denjenigen gleichen, die bei der Multiplen Sklerose (MS) des Menschen gefunden werden, wird die Staupevirusenzephalitis des Hundes als ein mögliches Modell für Pathogenesestudien dieser Erkrankung des Menschen angesehen (KOESTNER, 1975; SUMMERS und APPEL, 1994). Bei der demyelinisierenden Leukoenzephalitis stellt die lichtmikroskopisch sichtbare Vakuolisierung der weißen Substanz in den frühen Herdveränderungen ein Ödem der Myelinscheiden dar, wohingegen in den

älteren Läsionen eine echte Demyelinisierung charakteristisch ist (SUMMERS und APPEL, 1987). Die Pathogenese die zur Initiation und Progression der demyelinisierenden Staupeenzephalitis führt, ist nach wie vor nicht genau bekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Es handelt sich hierbei um einen biphasischen Prozess, wobei die erste Phase primär Virus-induziert ist und die zweite Phase einen immunpathologisch-dominierten Prozess darstellt (SUMMERS und APPEL, 1994). Hinweise dafür liefern zahlreiche Untersuchungen die zeigen, dass in den frühen Herdläsionen große Mengen an Staupevirus-Protein, als auch –mRNS nachweisbar ist (GAEDKE et al., 1997 und 1999). Sie sind weiterhin charakterisiert durch eine geringe MHC (“Major Histocompatibility Complex“) Klasse II-Expression und eine beginnende Aufregulierung des Hyaluronat-Rezeptors CD44 (ALLDINGER et al., 1996 und 2000; GAEDKE et al., 1999; MARKUS et al., 2002). Zusätzlich findet sich in den Gehirnen und im Liquor von Tieren mit einer frühen Staupeform unter anderem eine Aufregulierung pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin (IL)-6, -8, -12 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  (FRISK et al., 1999; GRÖNE et al., 1998, 2000 und 2002; MARKUS et al., 2002). Bei den Staupeeläsionen mit zunehmender Chronizität, d.h. einer steigenden Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen, nimmt der Nachweis von Staupevirus-Protein bzw. –mRNS in den Läsionen rapide ab, vergesellschaftet mit einem starken Anstieg CD3 $\epsilon$ -positiver Zellen und einer massiven Aufregulierung der mikroglialen MHC II-Expression (ALLDINGER et al., 1996; GAEDKE et al., 1997 und 1999; VANDEVELDE et al., 1985a; WÜNSCHMANN et al., 1999). Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihre spezifischen Inhibitoren (“tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP), werden in allen Phasen der Demyelinisierung in unterschiedlicher Ausprägung immunhistologisch im Gehirn nachgewiesen (MIAO et al., 2003).

Matrix-Metalloproteinasen stellen neutrale Proteasen dar, die neben der Degradierung der extrazellulären Matrix an zahlreichen anderen biologischen, sowohl physiologischen als auch pathologischen Prozessen beteiligt sind (CHANG und WERB, 2001; EGEBLAD und WERB, 2002; ISAKA et al., 2003; VU und WERB, 2000). Ihnen wird unter anderem bei der MS des Menschen eine wichtige pathogene Rolle zugesprochen (LO et al., 2002; ROMANIC und MADRI, 1994; ROSENBERG, 2002b; YONG et al., 2001). Ihre Fähigkeit durch Degradierung der extrazellulären Matrix die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu öffnen und damit der Immigration von Entzündungszellen in das ZNS Vorschub zu leisten, sowie durch eine Unterbrechung der Zell-Matrix Interaktionen einen neuronalen Tod zu bewirken, ist nur ein Teilaspekt ihrer Fähigkeiten (MUN-BRYCE und ROSENBERG, 1998a). Die Möglichkeit eines direkten Angriffs auf die Myelinscheiden mit einem damit verbundenen Abbau des

“myelin basic protein“ (MBP) und einer damit einhergehenden Demyelinisierung ist ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt der MMPs bei demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS (CHANDLER et al., 1995; HARTUNG und KIESEIER, 2000). Weiterhin kommt ihnen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine zu (KHUTH et al., 2001; VECIL et al., 2000). Ebenso können sie, auch im Zusammenspiel mit pro-inflammatorischen Zytokinen, eine vermehrte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle bewirken (HUMMEL et al., 2001). Diese Wirkmechanismen der MMPs machen sie zu einem wichtigen Untersuchungsobjekt im Rahmen der Staupeforschung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der mRNA verschiedener MMPs und ihrer spezifischen Inhibitoren, der TIMPs, näher zu untersuchen, um Aufschluß darüber zu erhalten, ob und inwieweit MMPs bzw. TIMPs bei verschiedenen Stadien der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes am Krankheitsprozess beteiligt sind. Hierfür wurden in einem ersten Teil der Arbeit spezifische Digoxigenin (DIG)-markierte RNS-Sonden entwickelt, die dann im zweiten Teil der Arbeit im Rahmen einer *in situ*-Hybridisierung (ISH) an unterschiedlichen Herdveränderungen der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes zum Einsatz kamen. Parallel dazu erfolgte eine immunhistologische Untersuchung bestimmter Oberflächenproteine glialer und infiltrierender Zellen, um Aufschluß über den Synthese-Ort der MMPs bzw. TIMPs zu erhalten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Staupevirus

Bei dem Krankheitsbild der kaninen Staupe handelt es sich um eine komplexe meist hochfieberhafte, endemisch verbreitete und in der Regel systemisch auftretende Erkrankung, die neben dem Respirations- und Gastrointestinaltrakt vor allem das zentrale Nervensystem affiziert (BAUMGÄRTNER; 1993). Empfänglich für das kanine Staupevirus (*Canine distemper virus*, CDV) sind neben dem Haushund (*Canis familiaris*) zahlreiche andere terrestrische und aquatische Karnivoren (DEEM et al, 2000; KENNEDY, 1998). Die Virusätiologie der Staupeerkrankung wurde 1905 von Carrè nachgewiesen, der zeigte, dass es sich bei dem Erreger um ein filtrierbares Agens handelt (FANKHAUSER, 1982). Der deutsche Name der Erkrankung "Staupe" leitet sich von dem altfriesischen Begriff "Stupa", gleichbedeutend mit "Züchtigung" oder "göttliche Strafe" ab (FANKHAUSER, 1982).

Das **kanine Staupevirus** (*Canine distemper virus*, CDV) ist ein behülltes, einzelsträngiges ("single-stranded"), negativ-orientiertes ("negative-sense") RNS-Virus aus der Familie der **Paramyxoviridae** und besteht aus 6 Strukturproteinen, wobei zwischen den *Kapsidproteinen* mit dem Nukleokapsid (N)-, dem Phospho (P)- und dem "Large" (L)-Protein, sowie den *Hüllproteinen* mit dem Matrix (M)-, dem Fusions (F)- und dem Hämagglutinin (H)-Protein unterschieden werden kann (DIALLO, 1990; HALL et al., 1980; ÖRVELL, 1980). Zusätzlich existieren mehrere Nicht-Strukturproteine. Die Familie der Paramyxoviridae gehört zu der Ordnung der Mononegavirales und wird unterteilt in die zwei Subfamilien der Paramyxo- bzw. Pneumovirinae. Innerhalb der Subfamilie der Paramyxovirinae unterscheidet man inzwischen 6 Genera, nachdem lange Zeit nur 3 Genera existierten. Zu den bereits 3 existierenden Genera Respiro-, Rubula- und Morbillivirus kamen die Genera Henipa-, Avula- und "TPMV-like Viruses" (*Tupaia virus*, TPMV) hinzu (ICTVdb, The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002, nach VAN REGENMORTELL et al., 2000 und MAYO, 2002).

Das CDV zählt zusammen mit dem humanen Masernvirus (*Measles virus*, MeV), dem cetaceen Morbillivirus (*Cetacean Morbillivirus*, CeMV), dem phocinen Staupevirus (*Phocine distemper virus*, PDV), dem *Peste-des-petits-ruminants Virus* (PPRV) und dem *Rinderpest Virus* (RPV) zu dem Genus der **Morbilliviren** (PRINGLE, 2000). Ein früher auch als

“equines Morbillivirus“ bezeichnetes Virus wurde inzwischen als *Hendravirus*, zusammen mit dem *Nipahvirus* in den Genus der Henipaviren eingeordnet (MAYO, 2002).

Innerhalb der Morbilliviren besteht ein enges verwandtschaftliches Verhältnis zwischen dem Hundestaupavirus und dem phocinen Staupevirus-1 und -2, wohingegen das “dolphin“- und “porpoise“ Morbillivirus weniger eng mit dem CDV verwandt sind und unter dem Begriff der “Cetacean Morbilliviren“ subsumiert werden.

Das bereits erwähnte Hendravirus, welches im September 1994 in Australien das erste Mal in Erscheinung trat (MURRAY et al., 1995) und neben respiratorischen Symptomen vor allem eine nichteitrige Meningoenzephalitis bei Pferden zur Folge hatte, weist ebenso wie das Nipahvirus, welches 1998/99 in Malaysia primär Schweine betraf, ein hohes zoonotisches Potential auf. Bei beiden Seuchenzügen kam es zu Todesfällen bei Menschen, die in engen Kontakt mit den lebenden oder toten Tieren kamen (CHUA et al., 2000; CHUA, 2003). Als natürliches Reservoir und potentielle Überträger beider Viren wurden zwischenzeitlich latent infizierte Fruchtfledermäuse und so genannte “fliegende Hunde“ (“flying foxes“; Familie der *Pteropodidae*) identifiziert (MACKENZIE et al., 2001; YOB et al., 2001).

Weitere Viren aus der Familie der Paramyxoviridae wurden in den letzten Jahren entdeckt (*Menangle Virus*, *Tioman Virus*), die jedoch dem Genus Rubulavirus zugeordnet werden, die bei Schweinen Totgeburten mit Missbildungen des ZNS hervorrufen können und denen ebenfalls ein potentielles zoonotisches Potential zugesprochen wird; das natürliche Reservoir stellen hier vermutlich ebenfalls Fledermäuse dar (CHANT et al., 1998; PHILBEY et al., 1998).

Das **kanine Staupevirus** ist in der Lage, Spezies aller Familien der terrestrischen Karnivoren (Fissipedia), sowie verschiedene Spezies der Pinnipedia (Wasserraubtiere) zu infizieren (BARRETT, 1999; CHOMEL et al., 1998; DURCHFELD et al., 1990; HUR et al., 1999; KENNEDY et al., 2000; LOPEZ-PENA et al., 2001; MOS et al., 2003; VAN DE BILDT et al., 2002; VAN MOLL et al., 1995;). Die terrestrischen Karnivoren umfassen die Familien der *Canidae* (Hundeartige), *Felidae* (Katzenartige), *Hyaenidae* (Hyänen), *Mustelidae* (Marder), *Procyonidae* (Kleinbären), *Ursidae* (Großbären) und *Viverridae* (Schleichkatzen). Dabei erkranken so unterschiedliche Spezies wie zum Beispiel der große (*Ailuropoda melanoleuca*) und der kleine (*Ailurus fulgens*) Panda, Marderbären (Binturong, *Arctitis binturong*), Löwen (*Panthera leo*), Tiger (*Panthera tigris*), Dachse (*Meles meles*) und Waschbären (*Procyon lotor*). Die Morbidität und Mortalität variiert jedoch sehr stark innerhalb der Karnivoren; so

beträgt bei der Familie der Kaniden die Mortalität beim Frettchen (*Mustela putorius furo*) beinahe 100% (DAVIDSON, 1986), wohingegen, abhängig vom Alter und Impfschutz ca. 50-70% der infizierten Hunde asymptomatische Träger bleiben. Ähnliches gilt für die Familie der Felidae: 1994 starben zahlreiche afrikanische Löwen während einer Staupeepidemie in der Serengeti (ROELKE-PARKER et al., 1996), wohingegen Hauskatzen (*Felis catus*) sowohl auf experimentelle, als auch natürliche Inkubation mit dem kaninen Staupevirus in der Regel nur mit einer subklinischen Infektion bzw. Serokonversion reagieren (IKEDA et al., 2001). Bei den aquatischen Karnivoren waren unter anderem die kaspischen Seehunde von Staupe-Epidemien, ausgelöst durch das CDV, betroffen (KENNEDY et al., 2000).

Das breite Wirtsspektrum des Hundestaupevirus zeigt sich auch in seiner Fähigkeit neben zahlreichen terrestrischen und aquatischen Karnivoren unter anderem auch bei Halsbandpekari (*Tayassu tajacu*) aus der Ordnung der **Artiodactyla** (Paarhufer, Unterordnung Nichtwiederkäuer, Familie der Nabelschweine) eine Staupeerkrankung hervorrufen zu können (APPEL et al., 1991), wobei hier das Staupevirus enzootisch in bestimmten Halsbandpekari-Populationen vorhanden zu sein scheint (NOON et al., 2003). Des Weiteren wird sowohl von natürlichen Infektionen bei nicht-humanen Primaten wie dem Japan Makaken (*Macaca fuscata*) berichtet (YOSHIKAWA et al., 1989), als auch von experimentellen Infektionen beim Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*) (NAGATA et al., 1990), die im Gegensatz zu den Japan Makaken (Altweltaffen) den Neuweltaffen und hier der Familie der Kapuzinerartigen (*Cebidae*) zugerechnet werden.

Nach wie vor ungeklärt und zum Teil umstritten ist die Beteiligung des CDV bei Erkrankungen des Menschen. Bei der Paget Krankheit (Osteodystrophia deformans), deren Ätiologie nach wie vor unklar ist, wurde wiederholt die Beteiligung von CDV kontrovers diskutiert (MEE et al., 1998; OOI et al., 2000). In einer neueren Studie konnte nur mittels *in situ* Reverse Transkriptase-Polymerasen Ketten Reaktion (*in situ* RT-PCR) im Gegensatz zu einer herkömmlichen *in situ*-Hybridisierung (ISH) bzw. RT-PCR ("reverse transcriptase-polymerase chain reaction"), in 100% der untersuchten Proben tatsächlich Staupevirus-RNS nachgewiesen werden (HOYLAND et al., 2003). Die ätiologische Bedeutung dieser Ergebnisse bedarf jedoch weiterer Abklärung. Die Beteiligung von Paramyxoviren, insbesondere von CDV, am Krankheitsbild der Multiplen Sklerose (MS) wird ebenfalls diskutiert. Es gibt jedoch nur seroepidemiologische Hinweise, die diese Behauptung stützen (COOK et al., 1979; ROHOWSKY-KOCHAN et al., 1995).

Hieraus ist ersichtlich, dass die Familie der Paramyxoviridae zahlreiche Viren beinhaltet, die in der Lage sind, verlustreiche Seuchenzüge bei einer breiten Palette von Tierspezies zu verursachen und die durchaus fähig sind die Speziesbarriere zu überwinden und damit eine potentielle zoonotische Gefährdung darzustellen.

Nicht nur aufgrund der sehr ähnlichen histopathologischen Veränderungen bei der chronischen demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes mit denen der MS des Menschen wird die CDV-Infektion als ein mögliches Modell für pathogenetische Studien dieser Erkrankung angesehen (GAEDKE et al., 1999; KOESTNER, 1975; SUMMERS und APPEL, 1994). Die nach wie vor ungeklärte Ätiologie der MS lässt immer wieder darüber diskutieren, ob als ursächliches Agens nicht eine virale Infektion in Betracht gezogen werden muss, zumal etliche humane und animale virusinduzierte demyelinisierende Enzephalitiden beschrieben sind (JOHNSON, 1994; LAMPERT, 1978; STOHLMAN und HINTON, 2001). Hierunter fallen unter anderem beim Menschen die “progressive multifokale Leukoenzephalopathie“ (PML), ausgelöst durch ein *Papovavirus*, die “subakute sklerosierende Panenzephalitis“ (SSPE), als Spätkomplikation einer Masernvirusinfektion, sowie eine HIV (*human immunodeficiency Virus*)-bedingte Enzephalo- und Myelopathie (BARRERO et al., 2003; JOHNSON, 1994; LAMPERT, 1978; STOHLMAN und HINTON, 2001).

Weitere Tiermodelle für demyelinisierende ZNS-Erkrankungen des Menschen stellen unter anderem die EAE (experimentelle autoimmune Enzephalitis) bei Kleinnagern (BURKHARDT und KALDEN, 1997), sowie die Theiler’s murine Enzephalomyelitis, ausgelöst durch ein Picornavirus (*Theiler’s murine encephalomyelitis Virus*, TMEV), dar (DAL CANTO und RABINOWITZ, 1982; RODRIGUEZ et al., 1987).

## 2.2 Die Staupevirus-Erkrankung des Hundes

### 2.2.1 Allgemein

Die Staupevirusinfektion beim Hund kann verschiedenartig verlaufen: abhängig vom Alter des Tieres zum Infektionszeitpunkt, dem Immunstatus sowie dem Virusstamm kann es zu einer abortiven, subklinischen oder generalisierten Erkrankung kommen.

Die klinische Manifestation äußert sich als **katarrhalische**, **nervöse** oder **systemische** Form (APPEL, 1987; BAUMGÄRTNER, 1993). Bei der katarrhalischen Form sind primär der

Respirationstrakt und/oder der Digestionstrakt im Rahmen einer Affektion der serösen und mukösen Schleimhäute betroffen, wohingegen das klinische Bild bei nervösen Formen von leichtem Muskelzucken bis hin zu epileptiformen Anfällen reicht; typisch kann das Auftreten des so genannten "Staupe-Ticks" sein. Die systemische Form stellt eine Kombination aus katarrhalischer und nervöser Form dar.

In seltenen Fällen ist auch die äußere Haut involviert, indem es zu einem teils generalisierten, teils nur den Unterbauch und die Innenschenkel betreffenden so genannten "Staupe-Exanthem" kommt (MAEDA et al., 1994); zusätzlich kann man unterschiedlich stark ausgeprägt die "hard pad disease" (Hartballenkrankheit) finden, die sich in einer orthokeratotischen Hyperkeratose, teils Hyperplasie des Nasenspiegels bzw. der Sohlenballen äußert (KRAKOWKA et al., 1985; MORITZ et al., 1998) und der vermutlich eine Virus-induzierte Proliferation mit nicht zytolytischer Infektion der Keratinozyten zu Grunde liegt (GRÖNE et al., 2003a; GRÖNE et al., 2003b).

Die Infektion erfolgt entweder nasal oder oral über eine Tröpfcheninfektion und nach einer Inkubationszeit von 1-2 Wochen kommt es sowohl durch zellgebundene als auch durch frei im Plasma vorliegende Viruspartikel zu einer hämatogenen Virämie und einer Ausbreitung des Virus in alle lymphoretikulären Gewebe des Organismus. (KRAKOWKA et al., 1980b, 1985 und 1987).

Bei allen Hunden ist zu diesem Zeitpunkt eine massive Leukopenie (Lymphopenie) zu beobachten, die begründet ist in einer Nekrose zahlreicher lymphatischer Organe mit Lymphozyten-Depletion (APPEL, 1987; IWATSUKI et al., 1995; KRAKOWKA et al., 1980a; WÜNSCHMANN et al., 2000).

In Abhängigkeit vom infizierenden Virusstamm, dem Alter des Tieres zum Infektionszeitpunkt, sowie der spezifischen Immunantwort zusammen mit konkurrierenden sekundären Infektionen, kann ab dem 7. – 14. Tag p.i. die Infektion einen unterschiedlichen Verlauf nehmen (APPEL, 1969 und 1987; APPEL und GILLESPIE, 1972; APPEL et al., 1982; KRAKOWKA und KOESTNER, 1976; KRAKOWKA et al., 1985; SUMMERS et al., 1984).

So kann zum einen eine Genesung eintreten (abortiver Verlauf), alternativ kommt es zu einer fulminanten fatalen ZNS-Beteiligung (meist akute Enzephalopathie) oder im Rahmen einer zweiten Virämie breitet sich das Virus ungehemmt im gesamten Körper aus (KRAKOWKA et al., 1985).

Der erste Nachweis von Virus im zentralen Nervensystem (ZNS) gelingt ab dem 8. bis 10. Tag p.i. (APPEL, 1987), wohingegen SUMMERS et al. (1984) postulierten, dass bereits während der ersten Virämie alle Hunde eine Infektion des Nervensystems erfahren.

Alternativ kann sich bei einer verzögerten Immunantwort eine "late onset disease" entwickeln, bei der es zu einer persistenten Infektion für 2 – 3 Monate kommen kann, oder die Tiere unterliegen einer subakuten Erkrankung, meist einer Enzephalitis (APPEL, 1987); einige dieser Tiere können mit einer starken Immunantwort jedoch immer noch genesen. Bei einer verzögerten Immunantwort verschwindet das Virus allmählich aus den lymphatischen Geweben und den meisten Organen mit Ausnahme des Gehirns, den Augen, manchmal der Lunge und bestimmten Regionen der Haut (Sohlenballen) (APPEL, 1987; KRAKOWKA et al., 1985).

Treten zentralnervöse Symptome auf, so äußern sich diese unter anderem in Inkoordination, Tremor, Myoklonien, Konvulsionen, Paresen, Tortikollis, Hyperästhesien und Nystagmus. Die meisten Hunde mit einer disseminierten Infektion sterben 2 – 4 Wochen p. i., nur wenige erholen sich, wobei ein Teil der Tiere noch Jahre nach überstandener Erkrankung verschiedenartige klinische Symptome zurückbehält. In diesen Formenkreis zählen unter anderem der so genannte "Staupe-Tick", wobei es zu unkontrollierten Muskelzuckungen kommt (APPEL, 1987), die Schmelzanomalien (Schmelzhypoplasie, "Staupegebiss") (ARNBJERG, 1986; DUBIELZIG et al., 1981) bei juvenilen Hunden, die während des Wachstums eine CDV-Infektion überstehen, sowie eine metaphysäre Osteosklerose in den Metaphysen langer Röhrenknochen großwüchsiger Hunderassen mit transientser Infektion (BAUMGÄRTNER et al., 1995).

Wichtig zu erwähnen ist die Tatsache, dass Enzephalitiden bzw. nervöse Symptome auch nach vorausgegangener subklinischer Erkrankung bzw. nach scheinbarer Genesung mit zum Teil großer zeitlicher Verzögerung auftreten können (APPEL, 1987).

Untersuchungen über den Infektions- und Verbreitungsweg des CDV in das bzw. innerhalb des zentralen Nervensystems zeigen eine ependymale Infektion mit einer sich anschließenden Ausbreitung in die subependymal gelegene weiße Substanz, was auf eine liquorogene Verbreitung schließen lässt (VANDEVELDE et al., 1985a). Zusätzlich erfolgt eine hämatogene Ausbreitung des CDV in das ZNS über virushaltige Lymphozyten (SUMMERS et al., 1979), zellfrei im Plasma (KRAKOWKA, 1989) als auch über eine Infektion der zerebralen und zerebellären endothelialen Zellen mit einer nachfolgenden Infektion der

umgebenden Perizyten und Astrozyten (AXTHELM et al., 1987; BAUMGÄRTNER et al., 1989).

Die bereits erwähnte massive Immunsuppression während einer Staupevirus-Infektion, die auch bei anderen Morbillivirus-Infektionen (Masern, Rinderpest) beobachtet wird, wird nach neuesten Studien unter anderem darauf zurückgeführt, dass bestimmte Morbilliviren offenbar in der Lage sind, zwar nicht ausschließlich jedoch in bedeutendem Umfang, wirtseigene Zellrezeptoren zu benutzen: so konnte für Masernviren gezeigt werden, dass diese neben dem CD46-Rezeptor, den humanen "signaling lymphocyte activation molecule" (SLAM)-Rezeptor (CD150) nutzen können, der ausschließlich auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird (TATSUO et al., 2000; ONO et al., 2001; SIDORENKO und CLARK, 2003). Der humane SLAM-Rezeptor ist ein membranständiges Glykoprotein, der auf immaturren Thymozyten, aktivierten Lymphozyten, aktivierten Monozyten und maturaen dendritischen Zellen exprimiert wird und er scheint die Lymphozytenaktivierung zu vermitteln sowie die Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) Produktion zu kontrollieren (TATSUO et al., 2002). Die Zerstörung und/oder die Schwächung von infizierten SLAM-positiven Zellen könnte ein Mechanismus sein, der zu der Morbillivirus-induzierten Immunsuppression führt (TATSUO et al., 2002).

Für das CDV konnte in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden, dass für die untersuchten CDV Stämme, ebenso wie beim Masernvirus, der wirtseigene SLAM-Rezeptor als Zell-Rezeptor fungiert; wirtsfremde (bovine, humane) SLAM-Rezeptoren konnten ebenfalls, jedoch mit geringerer Effizienz, genutzt werden. Bei SLAM-negativen Zellen (epitheliale Zellen, Astrozyten etc.) scheinen alternative Rezeptoren, wie z. B. CD46 beim Masernvirus, eine Rolle zu spielen (TATSUO et al., 2001). Genauere Studien über die natürliche Expression des SLAM-Rezeptors beim Hund wurden noch nicht durchgeführt, man kann jedoch vermuten, dass er, ähnlich wie beim Menschen, im lymphatischen Gewebe exprimiert wird und damit zum Teil der Lymphtropismus und die damit verbundene Immunsuppression erklärt wird (TATSUO et al., 2001). Der SLAM-Rezeptor (CD 150) scheint beim Hund somit als "virus-entry step" zu fungieren, wohingegen andere Rezeptoren, wie z. B. der CD9-Rezeptor als "post-entry step" im Rahmen der Zell-Zell-Fusion eine Rolle spielen (SCHMID et al., 2000).

Des Weiteren gibt es anhand einer neuen Untersuchung Hinweise, dass auch eine erhöhte Apoptose-Rate in depletiertem lymphatischem Gewebe, die auch in Synzytialzellen und im

Blutausstrich beobachtet werden konnte, zur Immunsuppression beitragen könnte (MORO et al., 2003a).

### 2.2.2 Formen der Staupeenzephalitis

Grundsätzlich kann bei der Staupevirusenzephalitis zwischen zwei Enzephalitisformen unterschieden werden. Die eine ist die wesentlich seltenere **Polioenzephalitis**, bei der vornehmlich die graue Substanz des Großhirns mit den Kerngebieten des Stammhirns, zum Teil auch die graue Substanz des Kleinhirns betroffen ist (BAUMGÄRTNER, 1993). Die andere ist die staupe-typische **Leukoenzephalitis**, in deren Verlauf primär die weiße Substanz vor allem im Kleinhirn betroffen ist. Es können auch beide Formen nebeneinander auftreten, jedoch dominiert meist eine Enzephalitisausprägung.

In den Formenkreis der *Polioenzephalitiden* zählen die so genannte “old dog encephalitis“ (IMAGAWA et al., 1980; LINCOLN et al., 1973; VANDEVELDE et al., 1980), die postvakzinale Staupeenzephalitis (BESTETTI et al., 1978; HARTLEY, 1974) und die Einschlusskörperchen-Polioenzephalitis (NESSELER et al., 1997 und 1999).

Die *Leukoenzephalitis* stellt bei der spontanen Staupeenzephalitis des Hundes die typische Manifestationsform dar (BAUMGÄRTNER, 1993) und neuropathologische Veränderungen findet man, abhängig vom Virusstamm, Immunitätslage und Alter des Tieres, primär im Kleinhirnmark (KRAKOWKA und KOESTNER, 1976; PEARCE-KELLING et al., 1990 und 1991; RAW et al., 1992; SUMMERS et al., 1984). Prädilektionsstellen sind vor allem ventrikelnah im Bereich des rostralen Velum medullare, den Kleinhirnstielen und subpial gelegen. Läsionen können jedoch auch im Großhirnmark und im Rückenmark nachgewiesen werden. Histologisch kann man die Herdveränderungen in **akute** Herde, **subakute** Läsionen **ohne** oder **mit Entzündung**, **chronische** sowie **sklerotische** Plaques mit einer phasenabhängigen Demyelinisierung in unterschiedlicher Ausprägung beobachten (KRAKOWKA et al., 1985; WÜNSCHMANN et al., 1999).

Häufig treten während einer Leukoenzephalitis bei einem Tier auch unterschiedlich alte Läsionen nebeneinander als Ausdruck dafür auf, dass es möglicherweise zu einer fortschreitenden Entwicklung von akuten über subakute bis hin zu chronischen Herden kommt.

### 2.2.3 Die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis

Obwohl die Staupevirus-induzierte Leukoenzephalitis des Hundes mit ihren verschiedenen Plaquetypen einen gut dokumentierten Prozess darstellt, sind die genaueren molekularen Mechanismen, die zur Initiation und Progression der verschiedenen Läsionen führen, nach wie vor nicht eindeutig klar und Gegenstand intensiver Forschung.

Aufgrund vorangegangener Untersuchungen wird angenommen, dass es sich um einen biphasischen Prozess handelt, bei welchem die akuten bzw. subakuten Herde ohne Entzündung von den chronischen bzw. subakuten Herden mit Entzündung voneinander abgegrenzt werden können. Die erste Phase der Demyelinisierung wird einer direkten Viruseinwirkung zugeschrieben, wohingegen die zweite Phase immunpathologisch bedingt sein soll (SUMMERS und APPEL, 1994).

Die **akuten** Herde zeichnen sich durch ein Ödem der Myelinscheiden, charakterisiert durch eine fokale Vakuolisierung und eine geringgradige Astro- und Mikrogliose aus. Bei den **subakuten** Läsionen **ohne Entzündung** kommen noch eine primäre Demyelinisierung sowie eine Astrogliose mit Gemistozyten, vielkernigen Astrozyten und Makrophagen hinzu. Hierbei kann bei experimentell infizierten Tieren eine spongiöse Vakuolisierung der subependymalen und subpialen weißen Substanz lichtmikroskopisch ca. 24 Tage p.i. beobachtet werden. Die Vakuolen nehmen in Form und Größe zu, um einen demyelinisierten Plaque zu bilden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass es sich bei den ersten Vakuolen lediglich um ein Ödem der Myelinscheiden handelt und nicht um eine echte Entmarkung (SUMMERS und APPEL, 1987). Das Ödem im Bereich der Markscheide führt fortschreitend zu einer Druckkompression der Axone und einer Sphäroidbildung als Ausdruck zugrundegehender Axone. Die Plaqueperipherie bildet eine Wachstumszone, innerhalb derer das Myelinödem gesehen werden kann (SUMMERS und APPEL, 1987). Der Verlust von kompaktem Myelin kann ca. 27 Tage p.i. beobachtet werden, wobei Astrozyten intaktes Myelin segmental vom Axon separieren (HIGGINS et al., 1982). Der Verlust von kompaktem Myelin nimmt seinen Ausgang von zytoplasmatischen Makrophagenausläufern, die das Axon spiralig umwinden, um dann die Myelinlamellen konzentrisch vom Axon weg zu ziehen ("myelin-stripping") (SUMMERS und APPEL, 1987). Myelinfragmente finden sich als extrazelluläre Myelintropfen oder intrazytoplasmatisch in Form von phagozytierten Produkten in Makrophagen/Mikroglia (Gitterzellen), Astrozyten oder in einzelnen Oligodendrozyten (RAINE, 1976; SUMMERS und APPEL, 1987; WISNIEWSKI et al., 1972).

Immunhistologisch können in akuten Herden große Mengen an Staupevirus-Protein nachgewiesen werden, ebenso wie auf molekularer Ebene große Mengen an Staupevirus-messenger-Ribonukleinsäure (mRNS) (GAEDKE et al., 1997 und 1999). Der Nachweis des Virusproteins gelingt in Astrozyten, Neuronen, Mikrogliazellen, ependymalen, leptomeningealen und Plexus-choroideus-Zellen (ALLDINGER et al., 1993; APPEL, 1969; VANDEVELDE et al., 1980; WÜNSCHMANN et al., 1999), wobei die Hauptzielzellen des CDV in akuten Läsionen vor allem Astrozyten sind. Mittels immunhistologischer Doppelmarkierung konnte bei 64% aller Astrozyten in akuten Läsionen ohne Entzündung im Bereich der weißen Substanz des Kleinhirns eine Staupevirus-Infektion nachgewiesen werden und diese Population stellt 95% aller infizierten Zellen dar (MUTINELLI et al., 1989).

In akuten Herden findet man außerdem eine geringgradige diffuse Infiltration mit CD3 $\epsilon$ - (T-Zellen) und CD8- (T-Killerzellen) Antigen positiven Lymphozyten (ALLDINGER et al., 1996; MARKUS et al., 2002; TIPOLD et al., 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999), sowie eine geringe MHC ("Major Histocompatibility Complex") Klasse II-Expression (ALLDINGER et al., 1996; GAEDKE et al., 1999; MARKUS et al., 2002) und eine beginnende Aufregulierung des Hyaluronat-Rezeptors CD44 (ALLDINGER et al., 2000).

Auf mRNS-Ebene haben MARKUS et al. (2002) semi-quantitativ mittels RT-PCR im Kleinhirn primär bei frühen Läsionen eine deutliche Aufregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- $\alpha$  bei gleichzeitig fehlender Aufregulierung der anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und TGF (transforming growth factor) - $\beta$  nachgewiesen, was für eine direkte virusvermittelte pro-inflammatorisch dominierte Zytokininduktion spricht. Ähnliche Ergebnisse bei *in vitro* Versuchen mit primären Hundegehirnzellen mit einer deutlich erhöhten Expression von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  nach CDV Infektion bestätigen diese Beobachtung (GRÖNE et al., 2002). Auf Protein-Ebene kann in frühen Läsionen ein deutliches Signal vor allem in Astrozyten für TNF- $\alpha$  gefunden werden, welches mit zunehmender Progredienz der Plaques geringer und mehr zur Plaqueperipherie hin verschoben wird (GRÖNE et al., 2000). IL-1 und IL-6 werden in unterschiedlichem Ausmaß in allen Läsionstypen nachgewiesen, wobei sie am häufigsten in CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> und Bandeiraea simplicifolia (BS) -1 positiven Zellen (Makrophagen/Mikroglia) im Gehirnparenchym in frühen Plaques, sowie in mononukleären perivaskulären Infiltraten in chronischen Läsionen gefunden werden (GRÖNE et al., 2000).

Arbeiten von GRÖNE et al. (1998) und FRISK et al. (1999) zeigen, dass vor allem in der Frühphase der Staupevirus-Infektion sowohl im Vollblut, als auch im Liquor cerebrospinalis

vermehrt diese pro-inflammatorischen Zytokine nachweisbar sind, welche unter anderem den zellgebundenen und den zellfreien Eintritt des CDV in das ZNS zu fördern vermögen.

**Subakute Herde mit Entzündung** und **chronische** Läsionen sind histologisch gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Demyelinisierung, Malazie mit Gitterzellen, Makrophagenaktivierung, Astrogliose sowie in chronischen Herden mit einer ausgeprägten diffusen intraläsionalen und perivaskulären mononukleären Entzündungszellinfiltration.

Dies ist vergesellschaftet mit einer starken Reduktion oder Eliminierung von Virusantigenen und viraler mRNA, einer gleichzeitigen massiven Aufregulierung der mikroglialen MHC II-Expression und einer deutlichen T-Zell-dominierten Immunantwort (ALLDINGER et al., 1996; GAEDKE et al., 1997 und 1999; VANDEVELDE et al., 1985a; WÜNSCHMANN et al., 1999).

Intraläsional und diffus im Gehirnparenchym verteilt finden sich primär CD8<sup>+</sup> Lymphozyten (T-Killerzellen), wohingegen perivaskulär CD4<sup>+</sup> Zellen (T-Helferzellen) das Zellbild dominieren. CD21<sup>+</sup> Zellen (B-Zellen) werden ebenfalls eher perivaskulär gesehen (VANDEVELDE et al., 1980; WÜNSCHMANN et al., 1999). Die plaquespezifische, räumliche und temporäre Verteilung der T-Zellsubpopulationen im ZNS lässt eine selektive Migration dieser Zellen in das ZNS vermuten (WÜNSCHMANN et al., 1999).

Im Gegensatz zu frühen Läsionen, in denen die Progredienz der Herde positiv mit der nachweisbaren Virusmenge korreliert, findet sich bei chronischen Herden eine abnehmende Expression der viralen Proteine, einschließlich der Oberflächenproteine mit zunehmender Zahl von infiltrierenden Entzündungszellen (ALLDINGER et al., 1993; BAUMGÄRTNER et al., 1989). Ebenso werden immer wieder in unmittelbarer Nachbarschaft frische akute Läsionen neben chronischen, entzündlich alterierten Plaques gefunden. Eine Erklärung hierfür könnte eine nicht-zytolytische Virusausbreitung mit einer geringen Anzahl von Virionen sein, die dadurch der Immunabwehr entgehen (BOLLO et al., 1986; ZURBRIGGEN et al., 1995). Gegen diese These sprechen Untersuchungen von GAEDKE et al. (1999), die im Bereich von chronischen Herden nicht nur den Verlust von Virusprotein, sondern auch von Virus mRNA feststellten. Im Gegensatz zu diesen Befunden in der weißen Substanz, wird allerdings in der grauen Substanz, vor allem in Kerngebieten und in läsional angrenzenden Gebieten der Körnerzellschicht, regelmäßig noch virale mRNA nachgewiesen, was auf eine restriktive Infektion der Neuronen und eine Persistenz des CDV im Gehirn hindeuten könnte (MÜLLER et al., 1995; NESSELER et al., 1997 und 1999).

Neueste Untersuchungen von MEERTENS et al. (2003) nähren jedoch die Vermutung einer nicht-zytolytischen Virusausbreitung von Zelle zu Zelle, die bei vergleichenden *in vitro* Versuchen feststellten, dass es bei persistent infizierenden CDV-Stämmen im Gegensatz zu zytolytischen Virusstämmen zu einer stark reduzierten Knospung (budding) reifer, infektiöser Virionen aufgrund einer reduzierten Expression des so genannten Fusionskomplexes an der Zelloberfläche kommt. Dies wird zurückgeführt auf eine restriktive intrazelluläre Verarbeitung des viralen Fusionsproteins auf Grund einer geringeren Spaltung der entsprechenden Vorläuferproteine (CHERPILLOD et al., 1999).

Insgesamt lässt sich in den entzündlich alterierten Plaques der älteren Läsionen eine sehr deutliche T-Zell dominierte Immunantwort mit einer starken MHC II-Expression in Verbindung mit einem massiven intraläsionalen Verlust an viralem Protein und viraler mRNA nachweisen (ALLDINGER et al., 1996; GAEDKE et al., 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999). Dies alles sind deutliche Hinweise für einen immunpathologisch dominierten Prozess der fortschreitenden Demyelinisierung (ALLDINGER et al., 1993 und 1996; BAUMGÄRTNER et al., 1989; MÜLLER et al., 1995; WÜNSCHMANN et al., 1999).

VANDEVELDE et al. (1981) zeigten, dass in chronischen Herden, im Gegensatz zu akuten Läsionen, große Mengen an Immunglobuline nachweisbar waren, woraus gefolgert werden kann, dass es sich bei der Demyelinisierung möglicherweise um eine Komplement-abhängige Antikörper-vermittelte humorale Zytotoxizität handelt (VANDEVELDE et al., 1982b). Es wird eine Antikörper-abhängige T-Zell-vermittelte Zytotoxizität vermutet, da intraläsional und perivaskulär CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten gleichzeitig mit perivaskulären CD4<sup>+</sup>- und B-Zellen erscheinen (ALLDINGER et al., 1996; VANDEVELDE et al., 1986; WÜNSCHMANN et al., 1999). Gegen eine ausschließlich autoimmun-bedingte Demyelinisierung im Sinne der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) spricht, dass sich die Läsionen der Staupeenzephalitis häufig an Prädilektionsstellen in unmittelbarer Nähe zu den Liquorräumen befinden, die auch die Eintrittspforte für das Virus darstellen können, und nicht – wie bei der EAE – disseminiert auftreten (VANDEVELDE et al., 1982a).

Ob Oligodendrozyten, als eigentliche myelinbildende Zellen im ZNS, *in vivo* und *in vitro* ebenfalls von einer produktiven CDV-Infektion befallen werden können, war lange Zeit umstritten (BLAKEMORE et al., 1989; MC CULLOUGH et al., 1974; RAINE, 1976;

VANDEVELDE et al., 1985b; ZURBRIGGEN et al., 1986, 1987a und b; ZURBRIGGEN und VANDEVELDE, 1983). ZURBRIGGEN et al. (1993b) konnten *in vivo* mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) lediglich eine restriktive Infektion mit unvollständiger Virusreifung in den Oligodendrozyten nachweisen. Auf diese Weise könnte die Infektion mit dem kaninen Staupevirus auch ohne Virustranslation zu einer direkten Zellschädigung führen (ZURBRIGGEN et al., 1987a, 1993a und b). Kürzlich konnte immunhistologisch an Staupevirus-infizierten Gehirnen erstmals gezeigt werden, dass Oligodendrozyten trotz vollständiger Demyelinisierung in chronischen Läsionen in großer Anzahl vorhanden sind (SCHOBESBERGER et al., 2002). Weiterhin fand die gleiche Arbeitsgruppe (GRABER et al., 1995; ZURBRIGGEN et al., 1998) ebenfalls auf molekularer Ebene eine verminderte Expression von basischem Myelinprotein und Myelin-assoziiertem Glykoprotein in infizierten Oligodendrozyten. Dies könnte der Erklärung dienen, dass, ohne dass es zu einer morphologischen Schädigung der Zelle kommt, der physiologische Zellstoffwechsel bereits erheblichen Schaden genommen hat.

Der Begriff "bystander demyelination" bezeichnet den Myelinverlust verursacht wahrscheinlich durch proteolytische Enzyme, sezerniert von aktivierten Makrophagen, der beobachtet wird, ohne dass es zu einer offensichtlichen Infektion und Zerstörung von Oligodendrozyten kommt (CAMMER et al., 1978). Es wird postuliert, dass die durch lymphatische Zellen aktivierten Makrophagen proteolytische Enzyme und Zytokine wie TNF- $\alpha$  abgeben und so eine Hydrolyse des Myelins verursachen (VANDEVELDE et al., 1981; LEDEEN und CHAKRABORTY, 1998).

*In vitro* Experimente zeigten, dass auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in der Lage sind, einzelne Proteinbestandteile des Myelins, wie z.B. das "myelin basic protein" (MBP) anzugreifen und abzubauen (CHANDLER et al., 1995). MMPs würden dadurch nicht nur zur Entmarkung beitragen, sondern auch zur Generierung immunogener Peptide, und somit eine autoimmune Entzündungsreaktion im Rahmen des sog. "epitope spreading" vorantreiben (TUOHY et al., 1998; VANDERLUGT et al., 1998). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungsergebnisse von MIAO et al. (2003) über die Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen an der Pathogenese der Staupeenzephalitis geben Hinweise darauf, dass dieser Gruppe von Enzymen, ähnlich wie ihre Beteiligung bei der MS (CHANDLER et al., 1997; COSSINS et al., 1997; DUBOIS et al., 1999; ÖZENCI et al., 1999; ROSENBERG, 2002a; YONG et al., 1998) des Menschen und anderen zerebrovaskulären Erkrankungen (LO

et al., 2002; LUKES et al., 1999; MUN-BRYCE et al., 1998b; ROSENBERG, 2002b; YONG et al., 2001) eine entscheidende Rolle bei der Demyelinisierung zukommen kann. MIAO et al. (2003) fanden eine deutliche Aufregulierung aller untersuchten MMPs und "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMPs) (MMP-1, -3, -7, -9, -12, -13, -14, TIMP-1, -2) in akuten und subakuten Herden ohne Entzündung, wohingegen in älteren Läsionen mit Entzündungszellinfiltraten die Expression der MMPs und TIMPs bis auf diejenige von MMP-11, -12, und -13 abnahm. Zusätzlich konnte in infiltrierenden perivaskulären mononukleären Zellen ebenfalls ein Signal beobachtet werden.

In neueren Veröffentlichungen wird außerdem davon berichtet, dass sowohl MMP-9 als auch MT1-MMP (MMP-14) an den so genannten CD44-Rezeptor binden können und dadurch gezielt in bestimmten Bereichen der extrazellulären Matrix (EZM) enzymatisch aktiv werden (YU und STAMENKOVIC, 1999; KAJITA et al., 2001). CD44 gilt als Hauptrezeptor für Hyaluron-Säure, welche den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix im Bereich der weißen Substanz im Gehirn darstellt, er dient T- und B-Zellen als "homing"-Rezeptor und Hyaluronat ist außerdem in der Lage *in vitro* Makrophagen zu aktivieren und zur Zytokinsekretion anzuregen (ASHER et al., 1991; BIGNAMI et al., 1993; NOBLE et al., 1993). Astrozyten werden als Hauptsyntheseort der Hyaluronsäure angesehen (MONTGOMERY, 1994), gelten aber gleichermaßen als Hauptzielzellen einer CDV-Infektion im ZNS (MUTINELLI et al., 1989). Der CD44-Rezeptor vermittelt Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen zum großen Teil durch seine Affinität zu Hyaluronat, aber ebenso durch seine Affinität zu anderen Liganden wie Fibronectin, Kollagenen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, sowie MMPs, wobei aber bisher wenig über die Regulation der Interaktionen dieser Liganden mit CD44 bekannt ist (CICHY et al., 2003; NAOT et al., 1997; PONTA et al., 2003).

## 2.3 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs)

### 2.3.1 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) spielt eine Schlüsselrolle in der Gewebsarchitektur und der Aufrechterhaltung der Homöostase aller Gewebe. In den meisten Organen stellen Kollagene die Hauptproteinkomponenten der EZM, die von einer Vielzahl von Zellen sezerniert werden. Zahlreiche andere Proteine, einschließlich Laminin, Entaktin, Kollagen IV, sowie zahlreiche Wachstumsfaktoren und Proteasen, tragen zu einzelnen spezialisierten Komponenten wie der Basalmembran bei.

Eine zweite Klasse von Molekülen, die eine essentielle Rolle beim Aufbau der EZM spielen, sind sezernierte Proteoglykane, deren Proteingerüst kovalent an hochmolekulare Glykosaminglykane wie Chondroitin, Heparan und Keratansulfat gebunden ist. Die EZM beinhaltet außerdem Hyaluronat, ein Hauptglykosaminglykan, welches typischerweise nicht sulfatiert oder gebunden an ein Proteingerüst vorliegt. Hyaluronat liegt in praktisch allen Organen, auch im ZNS, in der EZM vor und spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen wie Adhäsion, „trafficking“ und Signalübertragung.

Neben ihrer Aufgabe der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität regulieren die einzelnen EZM-Komponenten zusätzlich die Zellmigration und stellen ein Reservoir an Zytokinen und Wachstumsfaktoren bereit. Die EZM ist als Antwort auf zelluläre Stimuli einem ständigen dynamischen Wandel unterworfen. Dies reicht von einer ausgewogenen Homöostase bis hin zu einer vollständigen Gewebeumbildung, wie sie bei der normalen Entwicklung, aber auch bei Entzündungen, Wundheilung und malignen Tumoren auftritt und durch einschneidende Veränderungen sowohl in der Struktur als auch in der Zusammensetzung der EZM charakterisiert ist (STAMENKOVIC, 2003).

Die EZM im **Gehirn** stellt ebenfalls ein Reservoir an Integrinen, Wachstumsfaktoren, Laminin und anderen Glykoproteinen dar. Wichtige Matrix-Makromoleküle beinhalten unter anderem Glykosaminglykane, Hyaluronsäure, Heparansulfat, Chondroitinsulfat und große komplexe Glykoproteine, wobei die Matrix vornehmlich aus einem Hyaluron-Netzwerk bestehen soll. Biochemisch gesehen ist die EZM im Gehirn eine Zusammensetzung aus verschiedenen Kollagen-Typen, nicht-kollagenen Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Entaktin, Vitronectin, Tenascin), Glykosaminglykanen (Dermatan, Chondroitin, Keratan, Heparan bzw. deren Sulfate) und Proteoglykanen, wobei jedoch bis auf die synaptischen Bereiche eine klar geordnete Struktur fehlt (LUKES et al., 1999; LO et al., 2002). Die

vaskuläre Basallamina zwischen Endothel und Astrozytenfortsätzen als wesentlicher Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke (BHS) besteht ebenfalls vornehmlich aus Kollagen Typ IV, Entaktin, Laminin, Heparansulfat, Fibronectin und Vitronectin (GIESE et al., 1995). Die Hauptaufgabe der BHS besteht in der Aufrechterhaltung der Undurchlässigkeit für bestimmte zirkulierende Moleküle, um damit das Kompartiment ZNS weniger angreifbar zu machen. Bei zahlreichen zentralnervösen Erkrankungen spielt eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung.

Die im Bereich des Kortex liegende Glia limitans externa, gebildet aus Astrozytenfortsätzen die über eine Basalmembran in engem Kontakt mit der Pia mater stehen, ist ebenfalls vornehmlich aus Typ I, III und IV Kollagen, sowie Laminin, Fibronectin und Heparansulfat zusammengesetzt. Auch hier werden regelmäßig MMPs nachgewiesen, die zu einer erhöhten Durchlässigkeit nicht nur der BHS sondern auch der Blut-Liquor-Schranke führen können (LUKES et al., 1999).

### 2.3.2 Allgemeines über MMPs und TIMPs

Das weite Feld der Forschung über Matrix-Metalloproteinasen (MMP) besitzt einen klar definierten Startpunkt. Im Jahr 1962 erschien der erste Artikel von GROSS und LAPIERE, die bei ihrer Arbeit mit Teilen von Kaulquappenschwänzen im Rahmen von Seminalstudien ein kollagenolytisches Enzym entdeckten, welches in der Lage war, *in vitro* native Kollagenfibrillen anzugreifen. In weiteren Untersuchungen konnte innerhalb kurzer Zeit eine ähnliche Aktivität in einer Vielzahl von Geweben demonstriert werden und es wurde gezeigt, dass die Kollagenmoleküle in Fragmente im Verhältnis von 3 Teilen zu 1 Teil zerlegt werden und die Aktivität des Enzyms von Metallionen abhängig ist. Es wurde sehr schnell erkannt, dass MMPs in eine große Anzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen verwickelt sind, wie z.B. normale Entwicklung, Wachstum, Wundheilung, Angiogenese aber auch Arthritis, Tumormetastasierung usw.

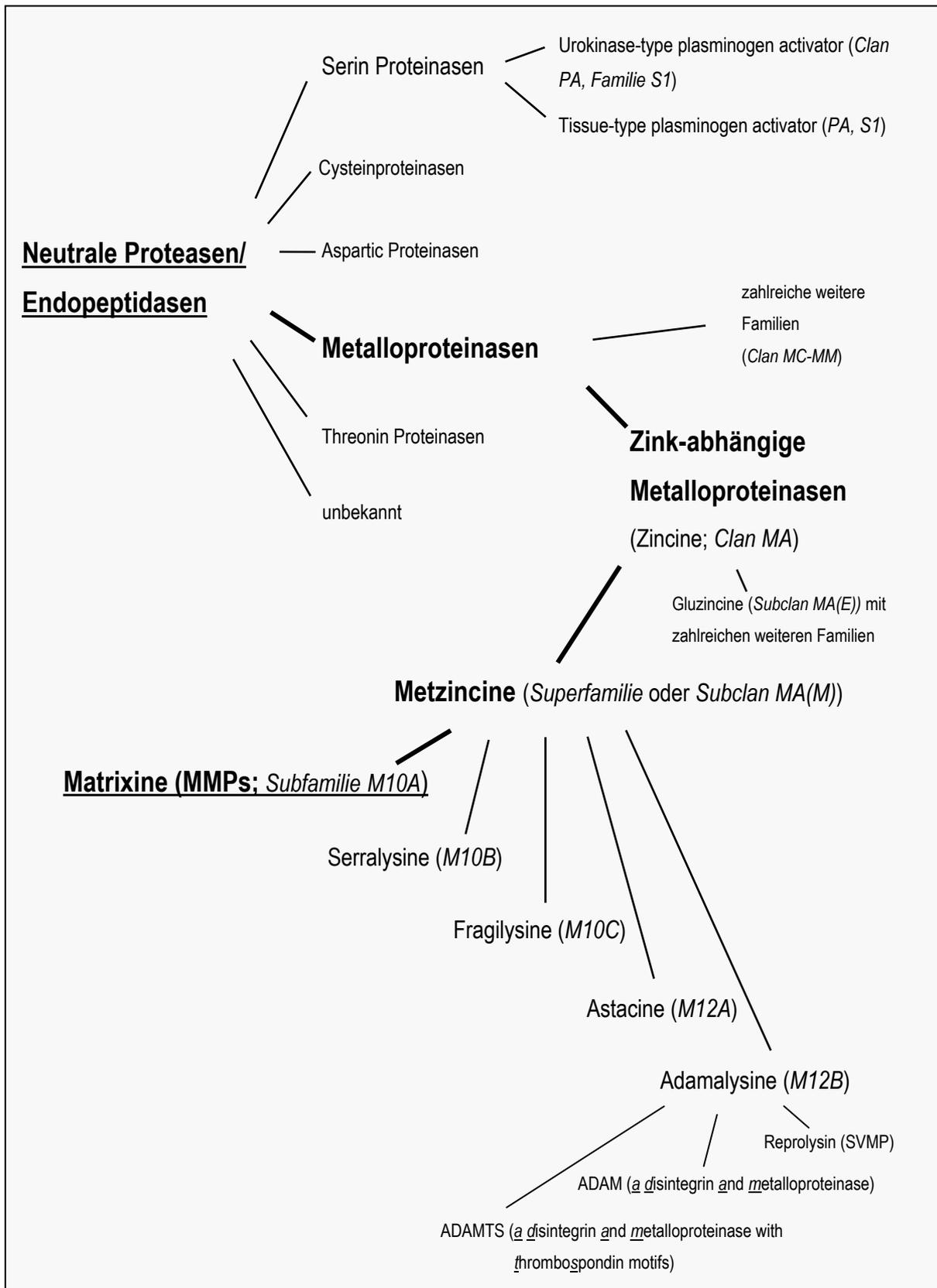
Bis heute wurden 25 unterschiedliche MMPs bei Vertebraten nachgewiesen, von denen die Mehrzahl (23) auch beim Menschen auftritt (WOESSNER, 2002; VISSE und NAGASE, 2003). Sie werden aber ebenso beim Süßwasserpolyphen (Hydra spec.) (LEONTOVICH et al., 2000), beim Seeigel (Echinoidea) (LEPAGE und GACHE, 1990) und im Pflanzenreich beim Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (MAIDMENT et al., 1999) gefunden.

Die ursprüngliche Klassifizierung der MMPs erfolgte anhand ihrer Zink-abhängigen katalytischen Aktivität und dem Vorhandensein einer großen Propeptid-Einheit, die verantwortlich ist für die Latenz des Enzyms. Nachdem weitere Enzyme mit ähnlichen Eigenschaften (z.B. Reprolysin) entdeckt wurden, entschloss man sich zur Klassifizierung der MMPs anhand der DNS (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenz.

Die **Familie der MMPs**, auch *Matrixine* genannt (Subfamilie M10A), bildet zusammen mit den *Serralysinen* (Subfamilie M10B) und den *Fragilysinen* (Subfamilie M10C) die Familie M10 des Metalloproteinasen Subclans MA(M), auch Metzincine genannt. Die eng verwandte Familie M12 mit den Subfamilien der *Astacine* (M12A) und *Adamalysine* (M12B) stellt die andere Familie des Subclans der Metzincine dar (Abb. 1). Die enge Verwandtschaft zwischen den Familien M10 und M12 ist nicht auf die DNS-Sequenz begründet, sondern auf die Protein-Faltung im Bereich des katalytischen Zentrums, die so genannte "Metzincin-Faltung" (BODE et al., 1993).

Die "**tissue inhibitors of metalloproteinases**" (**TIMPs**) sind spezifische endogene Inhibitoren mit einer durchschnittlichen Molekülmasse von 20-29 kDa, die in der Lage sind, MMPs im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zu hemmen. BAUER et al. stellten 1975 fest, dass kultivierte humane Fibroblasten ein endogenes inhibitorisches Protein sezernieren, welches in der Lage ist die Aktivität von Kollagenase zu hemmen. Als 1985 die komplette Sequenz dieser inhibitorischen Substanz vorlag, wurde offensichtlich, dass eine 100% Sequenzhomologie mit einem 5 Jahre zuvor publiziertem Protein, dem "erythroid-potentiating activity"-Faktor (EPA), bestand (DOCHERTY et al., 1985; GASSON et al., 1985).

Abb. 1 Systematische Einordnung der MMPs



Quelle: MEROPS: the protease database; RAWLINGS et al., 2002

Bisher sind 4 vertebrale TIMPs bekannt (TIMP-1 bis TIMP-4), die eine sehr große Überlappung ihrer Substratspezifität bezüglich der MMPs zeigen und neben ihrer spezifischen Hemmung der MMPs weitere biologische Aktivitäten entfalten, wie z.B. Wachstumsfaktor-Aktivität, Stimulierung der Steroidgenese und Modulation der Zellmorphologie (BREW et al., 2000; STERNLICHT und WERB, 2001).

### 2.3.3 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

#### 2.3.3.1 Aufbau der MMPs

Matrix-Metalloproteinasen sind, wie bereits oben ausgeführt, Zink-abhängige Endoproteinasen, die bis auf die “membrane-type MMPs“ (MT-MMPs) in einer inaktiven Form gebildet werden und für ihre enzymatische Tätigkeit einer Aktivierung bedürfen. Sie besitzen eine unterschiedliche, aber sehr häufig überlappende Substratspezifität (Tab. 1) und zusammengenommen sind sie in der Lage, zahlreiche extrazelluläre Substrate zu degradieren, einschließlich nahezu aller Proteine der EZM. Zusätzlich zu ihrer konservierten, katalytischen Zink-bindenden Domäne und ihrer so genannten “Metzincin Faltung“ (“Met-turn“), teilen die MMPs weite Teile ihrer Sequenzen, die ihnen insgesamt einen weitgehend konservierten Charakter verleihen.

Die einzelnen MMPs werden entweder mit ihrem eigentlichen Namen, z.B. Gelatinase B, Kollagenase 1, Stromelysin 1 oder ihrer numerischen Aufzählung entsprechend, derer man sich der besseren Übersichtlichkeit wegen entschlossen hat, z.B. MMP-9, MMP-1, MMP-3 benannt. Zusätzlich können die unterschiedlichen MMPs entsprechend ihres Domänenaufbaus in verschiedene Familien gruppiert werden. So unterscheidet man die **Kollagenasen**, **Gelatinasen**, **Stromelysine**, **Matrilysine** und die **Membran-gebundenen MMPs** (“membrane-type“-MMPs, MT-MMPs) (Tab. 1).

Alle MMPs werden innerhalb einer Zelle synthetisiert und in den Extrazellulärraum sezerniert bzw. im Falle der MT-MMPs im Bereich der Zellmembran verankert.

Tab. 1: Systematik der MMPs

<b><u>Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)</u></b>		
<b><u>Enzymfamilie</u></b>	<b><u>MMP</u></b>	<b><u>EZM Substrat (Auswahl)</u></b>
<b><u>Vertebrate:</u></b>		
<b>Kollagenasen</b>		
Interstitielle Kollagenase; Kollagenase 1	MMP-1	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, XI, Gelatin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Tenascin, Aggrecan, basisches Myelinprotein (myelin basic protein, MBP)
Neutrophile Kollagenase; Kollagenase 2	MMP-8	Kollagen Typ I, II, III, Aggrecan
Kollagenase 3	MMP-13	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, IX, X, XI, Gelatin, Fibronectin, Aggrecan, Perlecan,
Kollagenase 4	MMP-18	Kollagen Typ I (Ratte)
<b>Gelatinasen</b>		
Gelatinase A	MMP-2	Kollagen Typ I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Entactin, Tenascin, MBP
Gelatinase B	MMP-9	Kollagen Typ IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatin, Elastin, Vitronectin, Laminin, Aggrecan, Versikan, MBP
<b>Stromelysine</b>		
Stromelysin 1	MMP-3	Kollagen Typ II, III, IV, V, IX, X, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, MBP
Stromelysin 2	MMP-10	Kollagen Typ III, IV, V, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Aggrecan
Stromelysin 3	MMP-11	Gelatin, Fibronectin, Laminin

Fortsetzung (2) Tab. 1

<b><u>Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)</u></b>		
<b>Enzymfamilie</b>	<b>MMP</b>	<b>EZM Substrat (Auswahl)</b>
<b>Matrilysine</b>		
Matrilysin 1	MMP-7	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, MBP
Matrilysin 2	MMP-26	Kollagen Typ IV, Gelatin, Fibronectin, Vitronectin
<b>Membrane-type MMPs (MT-MMP)</b>		
<b>a) Transmembran</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Kollagen Typ I, II, III, Gelatin, Fibronectin, Tenascin, Laminin
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectin, Tenascin, Entactin, Laminin, Aggrecan
MT3-MMP	MMP-16	Kollagen Typ I, III, Gelatin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin
MT5-MMP	MMP-24	Fibronectin, Gelatin, Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSP)
<b>b) GPI-verankert</b>		
MT4-MMP	MMP-17	Gelatin
MT6-MMP	MMP-25	Kollagen Typ IV, Gelatin, Fibronectin, CSP

## Fortsetzung (3) Tab.1

<b><u>Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)</u></b>		
<b>Enzymfamilie</b>	<b>MMP</b>	<b>EZM Substrat (Auswahl)</b>
<b>Andere</b>		
Makrophagen Elastase	MMP-12	Kollagen Typ I, IV, Gelatin, Elastase, Fibronektin, Laminin, MBP
--	MMP-19	Kollagen Typ I, IV, Gelatin, Laminin, Entactin, Fibronektin, Aggrecan
Enamelysin	MMP-20	Amelogenin, Aggrecan
XMMP ( <i>Xenopus</i> )	MMP-21	Gelatin
CMMP ( <i>Gallus</i> )	MMP-22	Gelatin
CA-MMP	MMP-23	Gelatin
	MMP-27	nicht bekannt
Epilysin	MMP-28	nicht bekannt
<b><u>Nicht-Vertebrate</u></b>		<b>Spezies</b>
	MMP-C31	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Envelysin		Seeigel
Sojabohnen MMP		<i>Glycine max</i>

modifiziert nach WOESSNER, 2002 bzw. VISSE und NAGASE, 2003

Ihr genereller **Aufbau** (Abb. 3) besteht aus einer N-terminalen **Signalsequenz**, die während der Prozessierung in der Zelle abgespalten wird, der Translokation zum endoplasmatischen Retikulum hin dient und bei dem latenten Pro-Enzym (Zymogen) extrazellulär nicht mehr vorgefunden wird (STERNLICHT und WERB, 2001; WOESSNER und NAGASE, 2000).

An die Signalsequenz schließt sich die **Propeptid-Domäne** an, die die Latenz des Pro-Enzyms erhält, bis sie abgespalten oder unterbrochen wird. Diese Propeptid-Domäne umfasst ca. 80 Aminosäuren und ist damit deutlich länger als bei anderen Zymogen-Peptiden.

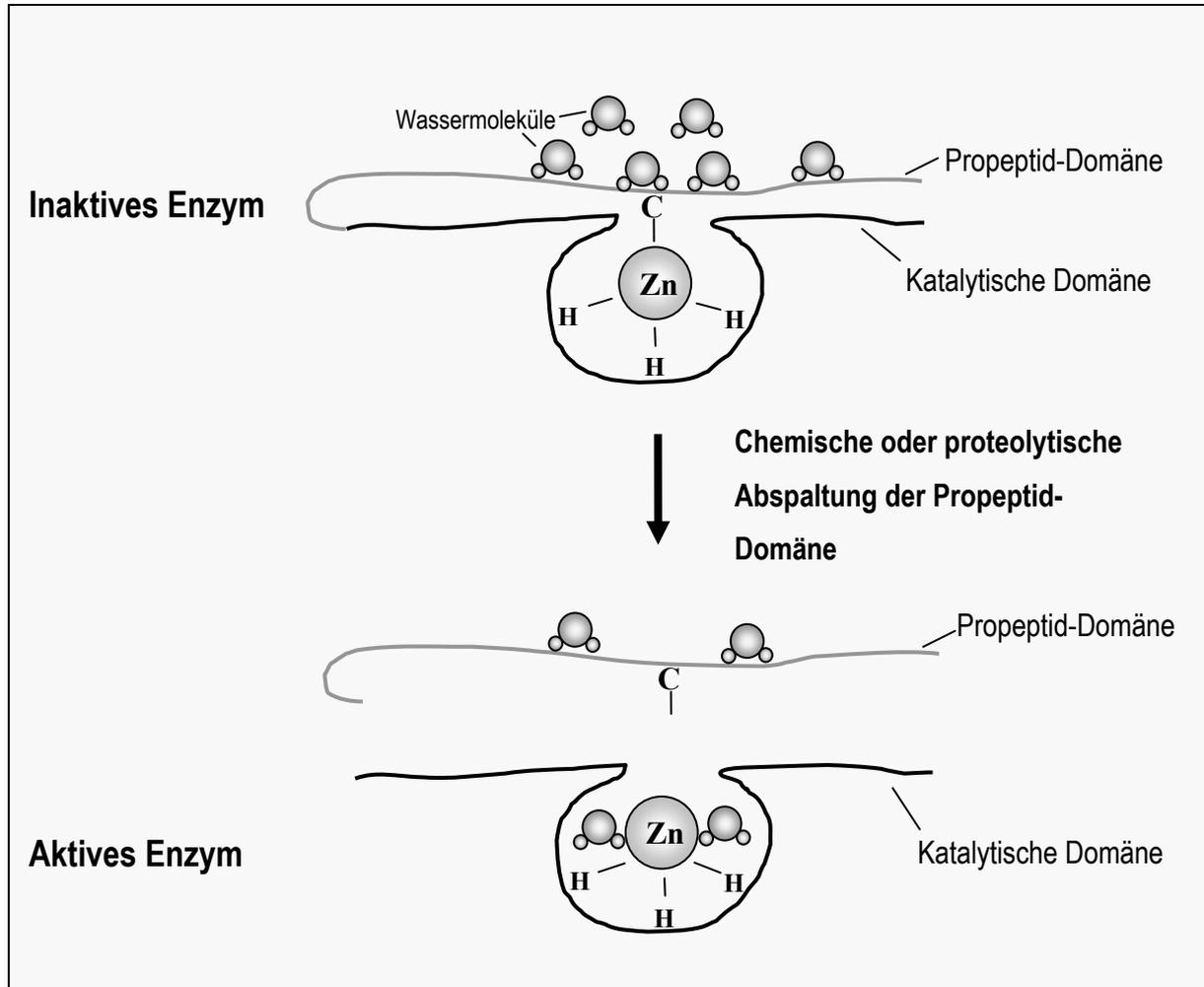
Der Wirkmechanismus, der die Latenz des Proenzym bewirkt ist Folgender (Abb. 2): über eine Thiol-(SH-) Gruppe eines hoch konservierten, ungepaarten Cysteins, welches direkt gegenüber des Zinkatoms innerhalb der katalytischen Domäne gelegen ist, wirkt das Cystein als vierter inaktiver Ligand für das katalytische Zinkatom, was in einem Ausschluss von H<sub>2</sub>O und einer Latenz des katalytischen Zentrums resultiert (SPRINGMANN et al., 1990). Erfolgt nun aufgrund einer Konformationsänderung, Proteolyse, Oxidation oder ähnlichem eine Unterbrechung der Zink-Cystein-Verbindung und eine Anlagerung von H<sub>2</sub>O an das Zinkatom, so wird die Propeptid-Domäne abgespalten und das Enzym ist aktiviert. Dieser Aktivierungsmechanismus wird als "*cysteine switch*" oder "velcro" Mechanismus bezeichnet (SOMERVILLE et al., 2003; VALLEE und AULD, 1990; VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Die meisten MMPs bedürfen außerhalb der Zelle dieses Aktivierungsmechanismus bis auf die MT-MMPs sowie MMP-11, -23 und -28, die bereits innerhalb des sekretorischen Pathways von einer Proprotein-Convertase wie z.B. Furin aktiviert werden (SOMERVILLE et al., 2003).

Direkt anschließend an die Propeptid-Domäne folgt die **katalytische Domäne** (ca. 170 Aminosäuren) mit einem Zinkatom innerhalb des katalytischen Zentrums, welches jedoch eher am C-terminalen Ende gelegen ist. Neben dem Zink-Ion innerhalb des katalytischen Zentrums besitzen die Matrixine noch ein zusätzliches strukturelles Zink-Ion sowie 2-3 Calciumionen, die für die Stabilität und Expression der enzymatischen Aktivität benötigt werden (NAGASE und WOESSNER, 1999).

Zusätzliche Fibronectin-Typ II-Einschübe innerhalb der katalytischen Domäne, die eine Gelatin-Bindung vermitteln, sind charakteristisch für die Familie der Gelatinasen (NAGASE und WOESSNER, 1999). MMP-9 weist außerdem noch einen Typ V-Kollagen-ähnlichen Einschub im Bereich der "hinge"-Region auf. Bei den Matrilysinen bildet diese Domäne das

C-terminale Ende, ist jedoch bei allen anderen MMPs noch von einer Hämapexin-ähnlichen Domäne gefolgt.

**Abb. 2:** Mechanismus des “Cysteine-switch“



C = Cystein, H = Histidin, Zn = Zink

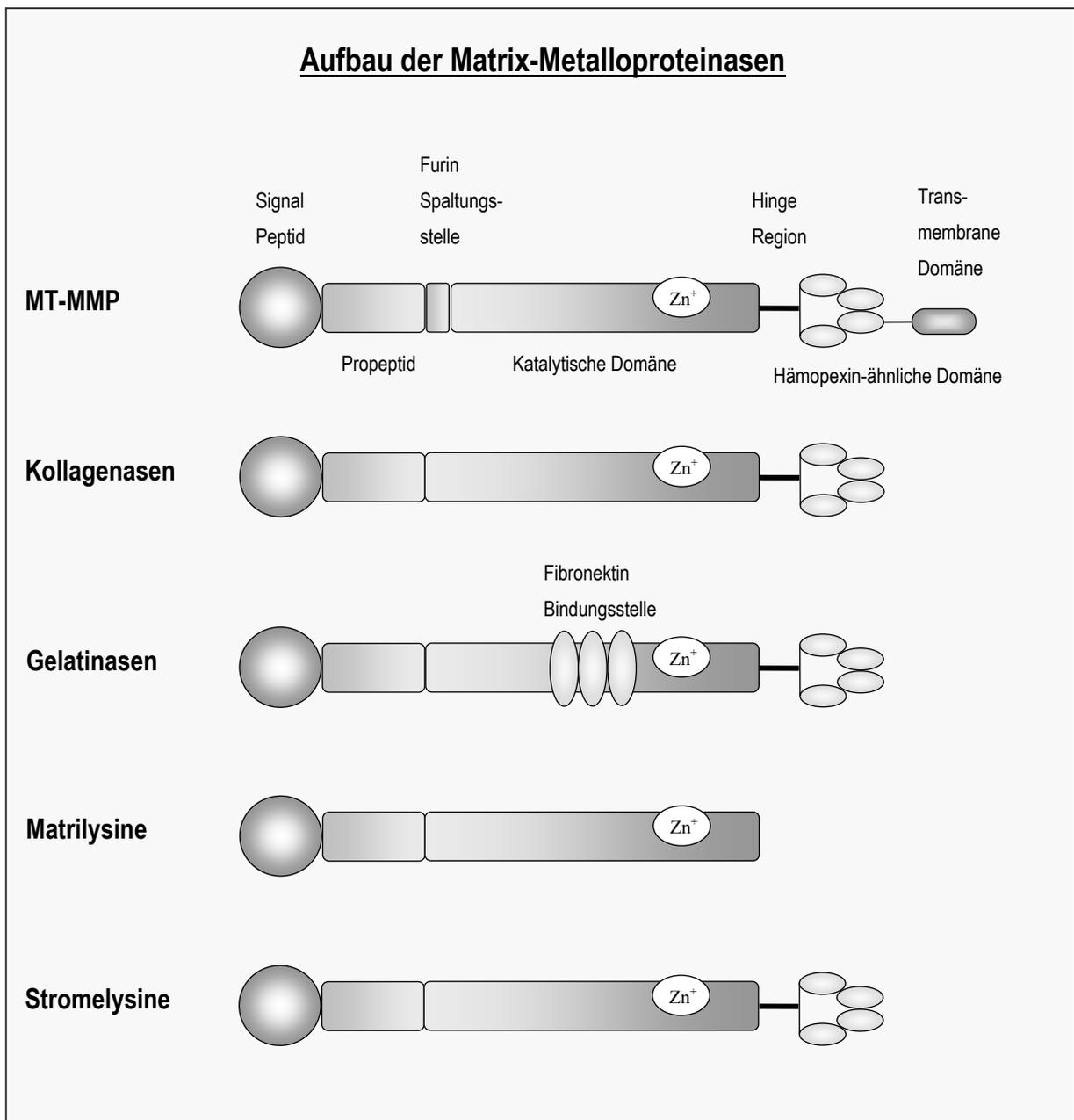
nach SOMERVILLE et al., 2003

Die **Hämapexin-ähnliche Domäne** (ca. 210 Aminosäuren) hat eine flache, ellipsoidale Form mit einer 4-flügeligen  $\beta$ -Propeller Struktur (GOMIS-RÜTH et al., 1996). Kollagenasen bedürfen dieser Domäne für die Spaltung von dreifach helikalen Kollagenen und MMP-2 benötigt sie für die MT1-MMP (MMP-14) vermittelte Aktivierung von pro-MMP-2 an der Zelloberfläche (MURPHY et al., 1992; STRONGIN et al., 1995). Zusätzlich spielt sie bei einigen MMPs eine wichtige Rolle bei der Bindung von bestimmten Substraten und TIMPs. So vermag TIMP-1 an die Hämapexin-Domäne von MMP-9 zu binden und TIMP-2 an diejenige von pro-MMP-2 (VISSE und NAGASE, 2003).

Die Funktion des prolinreichen Verbindungspeptides (*“hinge“-Region*) zwischen der katalytischen und der Hämapexin-ähnlichen Domäne ist nicht bekannt, obwohl ihre Interaktion mit dreifach helikalen Kollagenen hypothetisiert wird.

Die MT-MMPs sind die einzigen MMPs die mittels einer **transmembranen Domäne** an der Zelloberfläche verankert sind, wobei 4 MT-MMPs dem Typ I zugerechnet werden und 2 MT-MMPs Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankert sind.

**Abb. 3:** Systematischer Aufbau der MMPs



### 2.3.3.2 Regulation der MMPs

Die **Regulation** der MMP-Expression erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen, die die Transkription, die Aktivierung des Zymogens (Pro-MMP), die extrazelluläre Inhibition, die Lokalisation inner- oder außerhalb der Zelle und die Internalisierung durch Endozytose beinhaltet. Die meisten MMPs werden in der Mehrzahl der adulten Gewebe physiologischerweise nur in geringen Ausmaß exprimiert, sind aber jederzeit durch zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie zelluläre Wechselwirkungen induzierbar und die verstärkte MMP-Genexpression kann durch suppressive Faktoren wie z.B. TGF- $\beta$  oder Glukokortikoide herab reguliert werden (NAGASE und WOESSNER, 1999).

Für die **Induktion** spielen unter anderem "extracellular matrix metalloproteinase inducer" (EMMPRIN, CD 147, Basigin), welches auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert wird (GUO et al., 2000), bestimmte Signal-Transduktionswege mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Induktion von IL-1 $\alpha$  (KHERADMAND et al., 1998), sowie inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  über eine Induktion des Ceramid-Transduktionsweges entscheidende Rollen (SPIEGEL et al., 1996). Darüber hinaus wird verschiedenen Wachstumsfaktoren, einschließlich Interleukinen, Interferonen, "epidermal growth factor" (EGF), "keratinocyte growth factor" (KGF), "nerve growth factor" (NGF), "basic fibroblast growth factor" (basic FGF), "vascular endothelial growth factor" (VEGF) und "platelet-derived growth factor" (PDGF) eine entscheidende Rolle zugesprochen (FINI et al., 1998).

Ein Weg der **posttransskriptionellen Regulation** besteht zum einen in der Stabilisierung bzw. Destabilisierung der mRNA verschiedener MMPs durch Wachstumsfaktoren, zum anderen in der gesteuerten Freisetzung von intrazellulär gespeicherten MMPs (STERNLICHT und WERB, 2001).

Die **Aktivierung** des extrazellulär gelegenen Pro-Enzyms infolge einer schrittweisen Abspaltung der Pro-Peptidomäne mittels des so genannten "Cystein-switches" (s.o.) erfolgt *in vivo* meist durch Gewebs- oder Plasmaproteinasen wie z.B. Trypsin oder Plasmin oder andere bereits aktivierte MMPs (NAGASE, 1997). Eine Sonderrolle nimmt hierbei MMP-2 ein, für dessen Aktivierung neben MT1-MMP (MMP-14) auch TIMP-2 notwendig ist (BUTLER et al., 1998; STRONGIN et al., 1995; WANG et al., 2000).

Die **Aktivität** der MMPs wird streng reguliert von verschiedenen endogenen Inhibitoren. Hierbei nehmen die TIMPs eine entscheidende Rolle ein, da sie in der Lage sind, das katalytische Zentrum der MMPs im Verhältnis 1:1 reversibel zu hemmen. TIMPs variieren in ihrem Expressionsmuster und ihrer Affinität zu den verschiedenen MMPs. So inhibieren TIMP-1 und TIMP-2 eine breite Bande von MMPs und TIMP-1 ist in der Lage, analog zu TIMP-2/pro-MMP-2, einen Komplex mit pro-MMP-9 zu formen (GOMEZ et al., 1997). Dieser Komplex soll in der Lage sein eine Inaktivierung von MMP-9 zu bewirken.

In Gewebsflüssigkeiten ist  $\alpha_2$ -Makroglobulin der Hauptinhibitor der MMPs, welches einen Komplex mit den MMPs bildet, der irreversibel von "scavenger receptors" bereinigt wird (SOTTRUP-JENSEN und BIRKEDAL-HANSEN, 1989).

Zu den weiteren Molekülen, die die proteolytische Aktivität der MMPs beeinflussen können, zählen Thrombospondin-1 und -2 sowie der membranständige RECK-Rezeptor ("reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs"), die hauptsächlich MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP (MMP-14) regulieren, wobei RECK bisher den einzigen bekannten Zelloberflächeninhibitor darstellt (OH et al., 2001; STAMENKOVIC, 2003).

Ein kürzlich identifizierter Mechanismus, welcher die MMP-Aktivität kontrolliert, stellt die Lokalisation an der Zelloberfläche dar. Es wurde lange angenommen, dass die MMPs in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche tätig werden, was nun dadurch bestätigt wurde, dass eine wachsende Zahl von MMPs, zumindest vorübergehend, mittels Rezeptoren an die Zelloberfläche gebunden werden. So ist MMP-1 mit Integrinen und EMMPRIN assoziiert und MMP-2 interagiert zusätzlich zu dem MMP-14/TIMP-2 Komplex mittels seiner Hämopexin-ähnlichen Domäne mit  $\alpha\beta_3$ -Integrinen. MMP-9 bindet ebenfalls an verschiedene Zellrezeptoren, unter anderem an CD44, ICAM-1 und Integrine, und man vermutet, dass MMP-9 außerdem Zellmembran-gebundene Kollagen IV-Ketten als Ankopplungs-Mechanismus nutzt (STAMENKOVIC, 2003). Dieser Lokalisations-Mechanismus verstärkt häufig die MMP Aktivierung, begrenzt den Zugriff durch MMP Inhibitoren, konzentriert die MMPs in der Nachbarschaft ihrer Angriffspunkte und limitiert das Ausmaß der Proteolyse auf bestimmte perizelluläre Areale (STERNLICHT und WERB, 2001).

### 2.3.3.3 Substrate der MMPs

Obwohl MMPs in der Lage sind, praktisch alle strukturellen Komponenten der EZM abzubauen, können sie ebenso verschiedene zirkulierende, Zellmembran-ständige und perizelluläre Proteine spalten, welches sie dazu befähigt, das Zellverhalten auf zahlreiche Art und Weisen zu regulieren. Diese Mechanismen beinhalten die Veränderung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen, die Freisetzung, Aktivierung oder Inaktivierung von autokrin- oder parakrin-wirkenden Signalmolekülen und die potentielle Aktivierung oder Inaktivierung von zellgebunden Oberflächen-Rezeptoren (McCawley und Matrisian, 2001). Neben den in Tabelle 1 aufgeführten EZM Substraten, sind MMPs in der Lage zahlreiche nicht-EZM-Moleküle von Wachstumsfaktor-Vorstufen und Bindungsproteinen bis hin zu oberflächenständigen Adhäsionsrezeptoren zu degradieren und sie damit in biologisch aktive oder inaktive Formen zu überführen. Damit liegt die Aufgabe der MMPs nicht alleine in der bloßen Degradierung der EZM, sondern ist wesentlich vielgestaltiger zu verstehen als eine Kombination aus der Unterbrechung der Zell-Matrix Interaktion auf der einen Seite und der Freisetzung eines Heeres von EZM-stämmigen Zytokinen auf der anderen Seite.

So werden z.B. latente TGF- $\beta$  Bindungsproteine von MMP-2 und MMP-9 proteolytisch gespalten und damit die Bioverfügbarkeit von latentem TGF- $\beta$  erhöht. Zahlreiche andere Rezeptoren wie "heparin-binding EGF" (HB-EGF), "fibroblast growth factor receptor 1", E-cadherin, CD44, Integrine, ICAM-1 usw. zählen zu den Substraten verschiedener MMPs (Stamenkovic, 2003; Sternlicht und Werb, 2001).

Ebenso unterliegen eine Vielzahl verschiedener Zytokine, Zytokinrezeptoren und Chemokine einer MMP-vermittelten Spaltung. So wird z.B. TNF- $\alpha$  von der Zelloberfläche von MMP-1, -3 und -7 freigesetzt, während der IL-2-Rezeptor einer MMP-9 abhängigen Herabregulierung unterworfen sein soll. MMP-9 spaltet außerdem IL-8 und steigert damit dessen Aktivität (Stamenkovic, 2003; Sternlicht und Werb, 2001).

Die Gelatinasen **MMP-2** (Gelatinase A, 72kDa-Type IV-Gelatinase) und **MMP-9** (Gelatinase B, 92kDa-Type IV-Gelatinase) sind in der Lage verschiedene Kollagene abzubauen, wobei MMP-2 unter anderem Elastin und Fibronectin, sowie Kollagene vom Typ IV, VII und X in helikalen Domänen und Gelatine (denaturiertes Kollagen des Typs I) und, im Gegensatz zu MMP-9, ebenfalls intakte Kollagenfibrillen des Typs I abbauen kann. MMP-9 spaltet neben

Elastin, Typ IV-, V- und VII-Kollagene in helikalen Domänen, Gelatine und weitere EZM-Moleküle, aber kein intaktes Typ I-Kollagen.

Die **MT-MMPs** sind, bis auf MT4-MMP, alle in der Lage proMMP-2 zu aktivieren und können ebenfalls eine Vielzahl EZM-Moleküle spalten; **MMP-14 (MT1-MMP)** hat unter anderem eine zusätzliche kollagenolytische Aktivität bezüglich Kollagen Typ I, II und III und spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese. (VISSE und NAGASE, 2003).

## 2.3.4 Physiologie und Pathologie der MMPs

### 2.3.4.1 Allgemein

Wie bereits oben erwähnt, nehmen neutrale Proteasen, auch Endopeptidasen genannt, eine wichtige Rolle bei der Degradierung der EZM im Rahmen von physiologischen (Embryonalentwicklung, Trophoblasteneinnistung, Menstruationszyklus, Angiogenese, Axonwachstum, Wundheilung etc.) als auch pathologischen Prozessen (Arthritis, Tumormetastasierung, multiple Sklerose etc.) beim Menschen ein (CHANG und WERB, 2001; EGEBLAD und WERB, 2002; ISAKA et al., 2003; VU und WERB, 2000).

Beim **Hund** existieren inzwischen ebenfalls einige Arbeiten über die mögliche Beteiligung von MMPs und TIMPs an verschiedenen Pathomechanismen spezieller Erkrankungen. Hierzu zählen Berichte über den Zusammenhang mit: dem Metastasierungsverhalten maligner Tumoren, der Entstehung von Arthritiden, dem Vorkommen im Endometrium, entzündlichen Veränderungen am Auge, sowie ihrem Auftreten und Verhalten bei experimentellen Untersuchungen an Koronararterien am Herzen (ARICAN et al., 1999; CAI et al., 2003; CHU et al., 2002; COUGHLAN et al., 1998; HEGEMANN et al., 2002; HIRAYAMA et al., 2002; LANA et al., 2000; LOUKOPOULOS et al., 2003).

Ebenso finden sich einzelne Berichte über das Vorkommen von MMPs und TIMPs im ZNS bei Untersuchungen über das Expressionsmuster verschiedener MMPs und TIMPs bei Hunden mit Alzheimer-ähnlichen Gehirnveränderungen oder einer Staupeenzephalitis bzw. den physiologischen Status im Liquor cerebrospinalis (BERGMAN et al., 2002; LIM et al., 1997; MIAO et al., 2003).

#### 2.3.4.2 MMPs und TIMPs im ZNS

Im zentralen Nervensystem kommt es unter zu Hilfenahme extrazellulärer Proteasen wie MMPs und des Plasminsystems unter anderem bei der neuronalen Zellmigration im Rahmen der Entwicklung sowie während des Neuritenwachstums zu einer physiologischen Proteolyse der extrazellulären Matrix. Ebenso wird ihnen und ihren Inhibitoren bei pathologischen Prozessen wie Invasion und Metastasierung von primären und sekundären Gehirntumoren, der Anlockung und Migration von Leukozyten ins Gehirnparenchym, wie sie z.B. bei der multiplen Sklerose, bei Autoimmunerkrankungen sowie infektiös bedingten Enzephalitiden auftritt, bei Schlaganfällen, bei Alzheimer und bei demyelinisierenden Erkrankungen eine entscheidende Rolle zugesprochen (ROMANIC und MADRI, 1994; ROSENBERG, 2002b; LO et al., 2002; YONG et al., 2001).

Unter physiologischen Bedingungen exprimieren im Gehirn zahlreiche Zellen entweder konstitutiv oder nach Stimulation eine große Anzahl von MMPs und TIMPs. Zu diesen Zellen gehören primär Mikroglia/Makrophagen, Astrozyten, Neurone, Ependymzellen, Endothelzellen, Oligodendrozyten und Perizyten, wobei die Expressionshöhe der einzelnen MMPs im gesunden Gehirn meist sehr niedrig ist und erst nach Stimulation stark ansteigen kann. Diese zuerst *in vitro* gemachten Beobachtungen konnten inzwischen in zahlreichen Studien *in vivo* bestätigt werden (GOTTSCHALL und DEB, 1996; HARKNESS et al., 2000; ROSENBERG, 2002b; SEKINE-AIZAWA et al., 2001; YONG et al., 1998 und 2001).

So exprimieren Astrozyten neben MMP-9, MMP-2, MMP-3 und MMP-1 auch TIMP-1, wohingegen Mikroglia vor allem MMP-2 und MMP-9 bilden. Potente Stimulatoren für eine erhöhte Expression dieser MMPs *in vitro* stellen verschiedene pro-inflammatorisch wirkende Zytokine dar, hierbei vor allem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und zusätzlich Lipopolysaccharide (LPS) (GOTTSCHALL und DEB, 1996).

PAGENSTECHEER et al. (1998) demonstrierten im Gehirn von gesunden Mäusen die Expression von MT1-MMP (MMP-14), MMP-9 und MMP-11 auf niedrigem Niveau, wohingegen TIMP-2 und TIMP-3 vor allem in Neuronen und im Plexus choroideus stark exprimiert wird. Zugleich konnte bei Tieren mit EAE und bestimmten transgenen Typen eine starke Induktion bzw. Aufregulierung der spezifischen mRNS gesehen werden, sowie eine starke Induktion von TIMP-1.

Der Nachweis von MMP-9 aber nicht MMP-2 in Neuronen des Hippocampus erwachsener Ratten gelang SZKLARCZYK et al (2002), wobei MMP-9 primär im Bereich der Zellkörper und Dendriten nachweisbar war; nach systemischer Applikation eines Glutamat-Rezeptor-Agonisten stieg sowohl der Proteingehalt, als auch die enzymatische Aktivität im Zusammenhang mit einem Anstieg der mRNA.

Humane zerebrale Endothelzellen zeigen *in vitro* ebenfalls eine konstitutive Expression von MMP-2 und MMP-3, wobei nach TNF- $\alpha$  Applikation nur eine Erhöhung des MMP-3 Gehaltes verzeichnet wurde (HUMMEL et al., 2001). In der gleichen Untersuchung konnten MMP-9 und MMP-12 mRNA in den Endothelzellen nur unter entzündlichen Bedingungen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte mittels eines künstlichen MMP-Inhibitors die TNF- $\alpha$  vermittelte Freisetzung des "vascular cell adhesion molecule-1" (VCAM-1) verhindert werden, was Hinweise darauf liefert, dass von den Endothelzellen selbst gebildete MMPs aktiv in den Abschilferungsprozess von löslichen Adhäsionsmolekülen im Bereich der Blut-Hirn-Schranke verwickelt sind (HUMMEL et al., 2001).

MUN-BRYCE und ROSENBERG (1998a) betonen die herausragende Stellung von MMP-9 als Modulator einer selektiven Öffnung der BHS während Entzündungsprozessen. Ihnen gelang der Nachweis eines signifikanten Anstieges der MMP-9 Aktivität nach experimenteller intrazerebraler Verabreichung von LPS an Ratten im Zusammenhang mit einer Invasion bestimmter radiomarkierter exogener Markersubstanzen in das Gehirn als Nachweis einer selektiven Öffnung der BHS.

Ebenso lassen sich Astrozyten und Mikroglia *in vitro* von verschiedenen Pflanzenlektinen stimulieren, die zu einer erhöhten Aktivität von MMP-2 und MMP-9 führen können, was dahingehend interessant ist, da Lektine als Stimulatoren und Modulatoren des vertebreten Immunsystems bekannt sind und über eine intestinale Resorption teilweise in den Körperkreislauf gelangen können (LIUZZI et al., 1999).

Nach experimenteller intrazisternaler Infektion von Ratten mit Meningokokken zeigten diese ebenfalls einen signifikanten Anstieg der MMP-9 mRNA sowie der proteolytischen Aktivität im Gehirn, wobei gleichzeitig ein Anstieg von MMP-3 und MMP-13 verzeichnet wurde; MMP-2, MMP-7, MMP-10 und MMP-11 hingegen blieben unverändert (KIESEIER et al., 1999a). Weiterhin konnte mittels Farbinjektion deutlich der Zusammenbruch der BHS demonstriert werden. Identische Ergebnisse lieferten die Untersuchungen an humanen Gehirnen mit einer bakteriellen Enzephalitis, die natürlich infiziert waren. Diese Ergebnisse liefern ebenfalls deutliche Hinweise auf die Beteiligung von MMPs, im speziellen von MMP-9, bei der Degradierung der BHS.

RATHKE-HARTLIEB et al. (2000) erhalten in ihrer Untersuchung an Wobbler-Mäusen Hinweise darauf, dass MT1-MMP (MMP-14), exprimiert von aktivierten Astrozyten, nicht nur pro-inflammatorische Eigenschaften entwickelt sondern auch, TNF- $\alpha$  vermittelt, abhängig vom Zeitpunkt der Entzündung, einer Neuroregeneration dienen kann.

YAMADA et al. (1995b) hingegen konnten MT1-MMP (MMP-14) sowohl in gesundem humanem Gehirngewebe als auch bei Alzheimer-Erkrankten auf mRNA- und auf Proteinebene, ausschließlich auf Mikroglia der weißen Substanz nachweisen. Die gleiche Arbeitsgruppe wies MMP-2 im gesunden humanen Gehirn und bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen ebenfalls ausschließlich in Mikroglia der weißen Substanz und in Schwannzellen nach (YAMADA et al., 1995a).

Dass pro-inflammatorischen Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Regulation von MMPs einnehmen können, zeigten VECIL et al. (2000) in ihren Versuchen an isolierten humanen fetalen Neuronen und Astrozyten, als auch an posttraumatischen Mäusegehirnen. Sie fanden eine vergleichbare Menge an MMP-2 und MMP-9 in den humanen Astrozyten, aber einen deutlich höheren Gehalt an MMP-9 in den Neuronen, der sich nach IL-1 $\beta$  Gabe noch deutlich steigerte. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen an den posttraumatischen Mäusegehirnen, was den Schluss zulässt, dass IL-1 $\beta$  einen Schlüsselregulator für die neuronale MMP-9 Expression darstellt.

Ebenfalls bedeutend in der Regulation bzw. Modulation der MMPs und TIMPs sind verschiedene Chemokine wie "monocyte chemoattractant protein 1" (MCP1), "macrophage inflammatory proteins 1 $\beta$ " (MIP1 $\beta$ ), RANTES, IL-8 und Fractalkine (CX3CL1), die *in vitro* einen steigernden Einfluß auf die Sekretion von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in humanen als auch Ratten Mikrogliazellen zeigten (CROSS und WOODROOFE, 1999).

Nach akuten Gehirnverletzungen stellen infiltrierende Entzündungszellen eine Hauptquelle der MMP-Aktivität dar und etliche MMP-Gene werden hochreguliert (LO et al., 2002). Die Promotor-Regionen der meisten MMPs beinhalten "activator protein-1" (AP-1)- und "nuclear factor  $\kappa$ B" (NF $\kappa$ B)-Bindungsstellen, so dass die MMP-Erhöhung wahrscheinlich über den MAP-Kinase-Transduktionsweg oder oxidativen Stress vermittelt wird (FINI et al., 1998; LO et al., 2002).

Zusätzlich zur Fähigkeit der Degradierung der EZM und der Generierung von reaktiven Radikalen, stellt das ZO-1 Protein als Bestandteil der endothelialen "tight junctions" und damit der BHS, ein Substrat für MMP-9 dar (HARKNESS et al., 2000). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass MMPs über eine Unterbrechung der neuronalen Zell-Matrix Verbindung

und die Spaltung bestimmter Rezeptoren wie FasL direkt oder indirekt eine Apoptose bestimmter Zellen vermitteln können (LO et al., 2002).

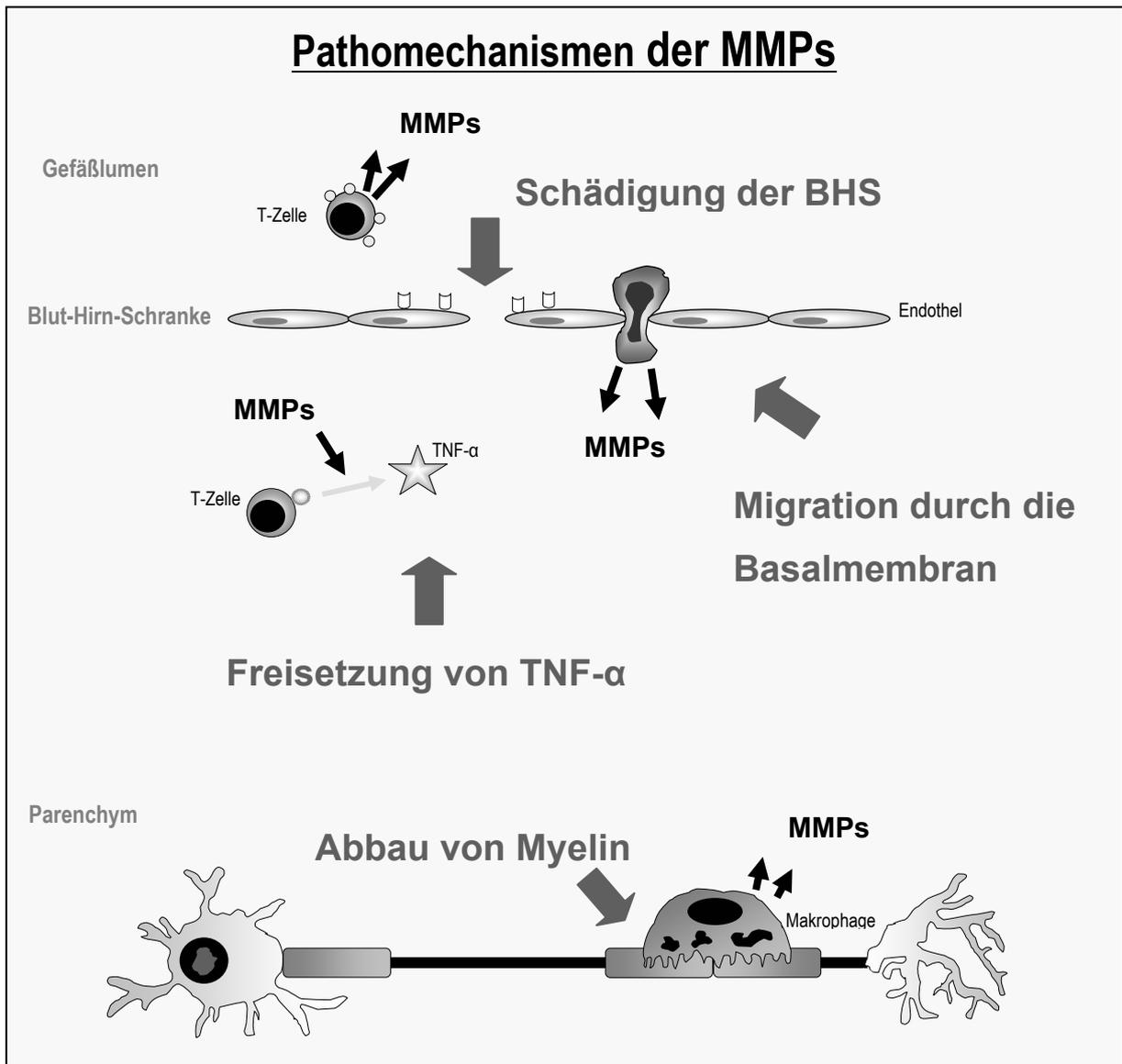
Bei der multiplen Sklerose des Menschen werden ebenfalls zahlreiche MMPs intra- und extraläsional im Gehirn nachgewiesen. Insbesondere akute Schübe gehen mit einer Erhöhung vor allem von MMP-9 im Liquor und im Serum einher, wobei zusätzlich mittels "magnet resonance imaging" (MRI)-Untersuchungen eine deutliche Zunahme der Durchlässigkeit der BHS demonstriert werden kann (GIJBELS et al., 1992; LEE et al., 1999; LEPPERT et al., 1998; WAUBANT et al., 1999). Da der Zellgehalt des Liquors während akuten Schüben sehr gering ist, wird vermutet, dass dem Anstieg der MMPs eine intrazerebrale Produktion zugrunde liegt (ROSENBERG et al., 2002a). Auffallend bei diesen Untersuchungen ist die Tatsache, dass TIMP-1 bzw. TIMP-2 auf sehr niedrigem Niveau bleiben, was hinweisend auf eine Dysregulation der MMP/TIMP-Achse ist.

Immunhistologische Untersuchungen an MS-Gehirnen mit akuten Entzündungen zeigten eine astrozytäre Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 (MAEDA und SOBEL, 1996), wohingegen ANTHONY et al. (1997) in akuten und chronischen Läsionen nur MMP-2 und MMP-7 nachweisen konnten. COSSINS et al. (1997) konnten ebenfalls eine vermehrte Expression von MMP-7 und MMP-9 in demyelinisierten Läsionen feststellen.

Der Nachweis eines erhöhten intraläsionalen mRNA Gehaltes von MMP-2 und MMP-9 gelang LINDBERG et al. (2001) auf allen Stufen der Läsionsbildung, wobei MMP-9 auch extraläsional in unverändert erscheinenden Bezirken erhöht war. MMP-2 und MMP-3 hingegen waren, beschränkt auf sehr frühe Herde, nur minimal erhöht. Gleichzeitig konnte in allen Läsionen keine signifikante Aufregulierung oder Expression aller 4 TIMPs beobachtet werden, was dahingehend interpretiert wird, dass das mangelnde Vermögen, eine kompensatorische Inhibition gegen die exzessive proteolytische Aktivität zu induzieren, ein Hauptmerkmal der MS darstellt (LINDBERG et al., 2001).

Die Untersuchungen an Mäusegehirnen, die experimentell mit einem neurotrophen CDV-Stamm infiziert wurden, zeigen ebenfalls einen starken Anstieg des proMMP-9 Gehaltes primär in hippocampalen Neuronen, eine spezifische und signifikante mRNA Aufregulierung von MT1-MMP (MMP-14), eine MMP/TIMP Imbalanz sowie eine vermehrte Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6 und INF- $\gamma$ , was ebenfalls deutliche Hinweise auf eine Beteiligung von MMPs und der entsprechenden Zytokine an der Initiation und Progression von entzündlichen und nichtentzündlichen neurologischen Prozessen liefert (KHUTH et al., 2001).

Abb. 4: Pathomechanismen der MMPs



nach HARTUNG und KIESEIER, 2000

Zusammenfassend lassen sich unter anderem folgende Wirkmechanismen (Abb. 4) einer erhöhten Expression und proteolytischen Aktivität von MMPs im Gehirn zuordnen:

1. Degradierung der extrazellulären Matrix und damit
  - a) Öffnung der Blut-Hirn-Schranke → Immigration von Entzündungszellen
  - b) Unterbrechung der Zell-Matrix Interaktionen → neuronaler Tod
2. Abbau von MBP → Demyelinisierung
3. Aktivierung und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine
4. vermehrte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle

Damit stehen die MMPs zusammen mit anderen neutralen Proteinase in vorderster Front bei der Erforschung entzündlicher, nicht-entzündlicher und degenerativer Erkrankungen des ZNS und machen sie auch im Rahmen der Staupeforschung zu einem interessanten Untersuchungsobjekt.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die Expression der mRNA von MMP-9 und MMP-14 und ihres spezifischen Inhibitors TIMP-1 näher zu untersuchen, um Aufschluß darüber zu erhalten, ob und inwieweit MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 bei verschiedenen Stadien der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes am Krankheitsprozess beteiligt sind. Hierfür wurden in einem ersten Teil der Arbeit spezifische DIG-markierte RNS-Sonden entwickelt, die dann im zweiten Teil der Arbeit im Rahmen einer *in situ*-Hybridisierung (ISH) an unterschiedlichen Stadien der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes zum Einsatz kamen. Parallel dazu erfolgte eine immunhistologische Untersuchung bestimmter Oberflächenproteine glialer und infiltrierender Zellen, um Aufschluß über den Synthese-Ort der untersuchten MMPs bzw. TIMP-1 zu erhalten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Untersuchte Hunde

Für die Untersuchung standen die Gehirne von insgesamt 17 Tieren zur Verfügung, von denen 13 Hunde immunhistologisch nachweisbar an einer Staupevirusenzephalitis erkrankt waren. Die Gehirne der übrigen 4 Tiere stammten aus einer klinisch gesunden Kontrollgruppe eines Pharmaunternehmens, die regelmäßig nach Standardprotokollen geimpft und entwurmt wurden und bei denen sich sowohl histologisch als auch immunhistologisch keine Hinweise auf eine Staupevirusenzephalitis oder eine andere ZNS-Erkrankung ergaben.

Die an Staupe erkrankten Tiere wurden zum überwiegenden Teil (9 Tiere) dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen, die dort routinemäßig seziiert wurden. Die Gehirnprouben weiterer Tiere (4 Tiere) wurden freundlicherweise von Dr. Juan Alberto Morales, Servicio de Patologia, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica zur Verfügung gestellt (Tab. 2).

Alle an Staupe erkrankten Tiere zeigten eine spontane natürliche Staupevirusinfektion und waren teilweise gegen Staupe geimpft, wobei bei den meisten Tieren nicht bekannt war, wann, ob und mit welchem Impfstoff vakziniert wurde. Die Hunde wurden aufgrund schlechter Prognose euthanasiert oder starben an den Folgen der Staupevirusinfektion und wurden zur diagnostischen Sektion an das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder den Servicio de Patologia der Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica überwiesen. Alter, Geschlecht und Rasse der Tiere sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Sektion der Tiere erfolgte wenige Stunden bzw. bis zu 3 Tagen post mortem. Während der routinemäßig durchgeführten Sektion der Tiere, in deren Verlauf ein breites Organspektrum (Auge, Dünn- und Dickdarm, Harnblase, Haut, Knochenmark, Leber, Lunge, div. Lymphknoten, Magen, Milz, Niere, Tonsille etc.) gewonnen wurde, wurde das Gehirn *in toto* entnommen und zur Herstellung von Paraffin-Blöcken in 10%igem nicht-gepuffertem Formalin fixiert.

**Tab. 2:** Diagnose, Tagebuch-Nummer, Alter, Geschlecht und Rasse der für die Untersuchung verwendeten Hunde

Hund-Nr.	Diagnose	Tgb.-Nr.	Alter	Geschlecht	Rasse
1	Staupe	121/80 GI	6 Jahre	weiblich	DSH
2	Staupe	1217/80 GI	4 Monate	weiblich	Bernhardiner
3	Staupe	2965/88 GI	5 Monate	weiblich	Wachtel
4	Staupe	1443/99 GI	6 Monate	männlich	Mischling
5	Staupe	2154/99 GI	2 Monate	männlich	Labrador
6	Staupe	1107/00 GI	2 Monate	männlich	Mischling
7	Staupe	1734/00 GI	3 Monate	männlich	Mischling
8	Staupe	1780/00 GI	7 Monate	weiblich	Gold. Retriever
9	Staupe	2050/01 GI	4 Monate	männlich	Mischling
10	Staupe	N 60-89-34 CR	5 Monate	männlich	Dobermann
11	Staupe	N 55-90-34 CR	3 Jahre	weiblich	Chihuahua
12	Staupe	N 27-94-1 CR	1 Jahr	weiblich	Pudel
13	Staupe	N 20-01-3 CR	2 Jahre	männlich	Rottweiler
14	Kontrolle	H-1/99	9 Monate	männlich	Beagle
15	Kontrolle	H-2/99	9 Monate	männlich	Beagle
16	Kontrolle	H-3/99	9 Monate	weiblich	Beagle
17	Kontrolle	H-4/99	9 Monate	weiblich	Beagle

GI = Gießen, CR = Costa Rica, DSH = Deutscher Schäferhund

Nach einer Fixationszeit von einem bis zu mehreren Tagen wurde das gesamte Gehirn lamelliert und jeweils eine Probe aus dem Lobus parietalis des Großhirns, dem Hippocampus inkl. Ammonshorn, mehreren Lokalisationen des Kleinhirns und allen übrigen vorhandenen Organen der Tiere entnommen und eingebettet. Die Einbettung der Proben wurde nach maschineller Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei 56°C in einem Paraffin-Paraplast-Gemisch (Histo-Comp® 56°C, Fa. Vogel, Gießen) durchgeführt. Die Aufbewahrung der Paraffin-Blöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

### 3.2 Gewebeproben für die Histologie, Immunhistologie und *in situ*-Hybridisierung

Für die histologische, immunhistologische und molekularbiologische Untersuchung des formalinfixierten Gewebes wurden von den Paraffinblöcken jeweils 2-3 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf SuperFrost/Plus-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen.

Für die ausgewählten, zur Untersuchung herangezogenen **Kleinhirnbezirke** aller Tiere wurden 2-3 µm dicke Serienschnitte hergestellt und numerisch aufsteigend (von 1 bis ca. 110) einzeln auf SuperFrost/Plus- Objektträger aufgebracht. Diese Schnitte wurden chronologisch aufsteigend in den Untersuchungen eingesetzt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4°C.

Um eine Zuordnung der Expression bestimmter MMP- bzw. TIMP-mRNS zu einem Stadium der Staupeenzephalitis bzw. dem Läsionstyp in Verbindung mit dem immunhistologischen Nachweis bestimmter Oberflächen-Antigene von Lymphozyten, Makrophagen und Astrozyten zu ermöglichen, wurden bestimmte Serienschnitte histochemisch und immunhistochemisch untersucht und klassifiziert.

Dabei wurde jeder 1., 50., und letzte Serienschnitt (ca. 110., abhängig von der Blockdicke) eines Blockes maschinell in einem Färbeautomaten (Shandon 24-3 (Varistain<sup>®</sup>), Thermo Electron GmbH, Dreieich) mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Der 12. und 48. Schnitt jedes Blockes wurde immunhistologisch auf Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen untersucht; die Schnitte von Seriennummer 30 bis 50 dienten der immunhistologischen Aufarbeitung bestimmter Oberflächenproteine (Kap. 3.4.).

Zum Nachweis der Demyelinisierung wurde Schnitt-Nr. 49 Luxol-Fast-Blue – Kresylviolett (LFB-KV) gefärbt (ROMEIS, 1989; GAEDKE, 1997).

Schnitt-Nr. 46 und 79 wurden jeweils in einer *in situ*-Hybridisierung mittels der spezifischen DIG-markierten-“antisense“-Sonde auf die Expression spezifischer CDV-mRNS untersucht. Die dazwischen liegenden Schnitte (51-110) wurden ebenfalls in einer *in situ*-Hybridisierung zum Nachweis von MMP-9-, MMP-14- bzw. TIMP-1-mRNS mittels spezifischer DIG-markierter-“antisense“-RNS-Sonden eingesetzt.

### 3.3 Lichtmikroskopische Einteilung der Staupeläsionen

Auf der Grundlage der Ergebnisse der histochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte die Klassifizierung und Einteilung der Staupeläsionen im Kleinhirn anhand der HE- sowie LFB-KV-Färbung und des Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen Nachweises in folgende **fünf** Gruppen:

- **Gruppe I:** gesunde Kontrolltiere ohne ZNS Läsionen (**Kontrolle**)
- **Gruppe II:** lichtmikroskopisch nicht/kaum nachweisbare Läsionen (**LMNS**)
- **Gruppe III:** akute Läsionen (**AKUT**)
- **Gruppe IV:** subakute Läsionen mit Entzündung (**SAME**)
- **Gruppe V:** chronische Läsionen (**CH**)

In die Gruppe **II (LMNS)** wurden alle diejenigen Herde eingruppiert, die lichtmikroskopisch in der HE-Färbung keine pathohistologischen Veränderungen aufwiesen. Die eigentliche Lokalisation dieser Herdveränderungen erfolgte anhand der Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse des Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen Nachweises. In diese Gruppe wurden sowohl Läsionen im Bereich der weißen, als auch der grauen Substanz eingeordnet.

Die Herdveränderungen der Gruppe **III (AKUT)** waren gekennzeichnet durch eine gering- bis mittelgradige Vakuolisierung der weißen Substanz mit geringgradiger Astroglie, einzelnen Gemistozyten sowie teilweise recht prominenten intranukleären und intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen. Hierbei entspricht die Vakuolisierung einem Ödem der Myelinscheiden und noch keiner Entmarkung.

Die Gruppe **IV (SAME)** war charakterisiert durch herdförmige Läsionen mit einer mittel- bis hochgradigen Vakuolisierung der weißen Substanz mit Demyelinisierung, einer ausgeprägten Astroglie, teilweise Malazien mit zahlreichen Gitterzellen und einer Makrophagenaktivierung. Zusätzlich fand sich eine gering- bis mittelgradige intra- und extraläsionale, teils diffus im Parenchym liegende, teils perivaskulär orientierte 1- bis 2-lagige Infiltration mit lympho-, histio- und plasmazytären Entzündungszellen. Ebenso konnten teils zahlreiche intranukleäre und intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in den Gliazellen beobachtet werden.

Die Herdveränderungen der Gruppe **V (CH)** waren gekennzeichnet durch eine mittel- bis hochgradige Demyelinisierung mit mittelgradiger Astroglie und teils zahlreichen Gitterzellen, sowie mittel- bis hochgradiger intra- und extraläsionaler diffuser und

perivaskulärer (3- bis mehrlagig) Infiltration mit Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Zu beobachten war in einigen Läsionen auch eine Malazie mit Abräumreaktion.

### 3.4 Immunhistologie

Zum immunhistologischen Nachweis des Staupevirus-Nukleo(N)-Protein-Antigens (N-4), der Lymphozytendifferenzierungsantigene CD3 $\epsilon$  und CD79 $\alpha$ , des MHC Klasse II-Oberflächenantigens und des Lektins *Bandeiraea simplicifolia*-1 (BS-1) auf aktivierten Makrophagen bzw. Mikroglia, des sauren Gliafaserproteins (GFAP) in Astrozyten, des "myelin basic protein" (MBP) und des CD44-Hyaluronat-Rezeptors (ALLDINGER et al., 1996 und 2000; GRÖNE et al., 2000) wurden Paraffinschnitte verwendet und die Avidin-Biotin-Komplex-Methode eingesetzt (ABC-Methode; ALLDINGER et al., 1996).

#### 3.4.1 Antikörper und Seren

Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper wurden, soweit keine anderen Angaben gemacht werden, in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) verdünnt. Die Angaben zu den Primärantikörpern sind in Tabelle 3 aufgeführt. Eine Übersicht der verwendeten Antikörperkombination ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab. 3:** Spezifität, Klon, Herkunftsspezies, Verdünnung, Bezugsquelle und dargestelltes Antigen der verwendeten Primärantikörper bzw. Lektins

Antigen	Klon	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Antigen
N-4 (NP-2)	3.991	Maus	1:6000	C. Örvell	Staupevirus-Nukleoprotein
huCD3 $\epsilon$	--	Kaninchen	1:250	DAKO (A0452)	T-Lymphozyten
caCD44	2D10	Ratte	1:200	E. Kremmer	Hyaluronat-Rezeptor
huCD79 $\alpha$	HM57	Maus	1:50	DAKO (M7051)	B-Lymphozyten
GFAP		Kaninchen	1:500	DAKO (Z0334)	Astrozyten
caMHC II	26-1	Ratte	1:40	C. Voss	MHC II-Ag
MBP	--	Maus	1:1000	Sternberger (SMI 94)	basisches Myelinprotein

Fortsetzung **Tab. 3:**

Lektin	Herkunft	Nachgewiesener Zucker	Verdünnung
BS-1 (biotinil.)	Bandeiraea simplicifolia	$\alpha$ -D-Galaktose	3 $\mu$ g/ml

BS-1 = Bandeiraea simplicifolia; biotinil. = biotiniliert, ca = canine; GFAP = saures Gliafaserprotein; hu = human; MHC II = major histocompatibility complex II; MBP = myelin basic protein; N-4 (NP-2) = Staupevirus-Nukleoprotein

**Tab. 4:** Übersicht der verwendeten Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper einschließlich Vorbehandlung

Antigen	Primär-Ak (Klon)	Sekundär-Ak	Tertiär-Ak bzw. Detektionssystem	Vorbehandlung
N-4 (NP-2)	3.991	biot. Pferd-anti-Maus-Ig	ABC	keine
huCD3 $\epsilon$	--	biot. Ziege-anti-Kaninchen-Ig		Protease 0,05%, 5 min, 37°C
caCD44	2D10	biot. Kaninchen-anti-Ratte-Ig		keine
huCD79 $\alpha$	HM57	biot. Pferd-anti-Maus-Ig		Citrat pH 6,0, 20 min, 800W
GFAP	--	biot. Ziege-anti-Kaninchen-Ig		keine
caMHC II	Dog 26-1	biot. Kaninchen-anti-Ratte-Ig		TUF, 10 min, 90°C
MBP	--	biot. Pferd-anti-Maus-Ig		keine
BS-1	--	entfällt		keine

ABC = Avidin-Biotin-Komplex; biot. = biotiniliert; BS-1 = Bandeiraea simplicifolia; °C = Grad Celsius; ca = canine; GFAP = saures Gliafaserprotein; hu = human; Ig = Immunglobulin; MHC II = "major histocompatibility complex" II; MBP = "myelin basic protein"; min = Minuten; N-4 (NP-2) = Staupevirus-Nukleoprotein; TUF = "target unmasking fluid"; W = Watt

Bei den **Sekundär-Antikörpern** handelt es sich um:

- a) biotinierter Pferd-anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratories, BA 2000, Verdünnung: 9 µl in 1 ml TBS)
- b) biotinierter Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Vector Laboratories, BA 4000, Verdünnung: 9 µl in 1 ml TBS)
- c) biotinierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Vector Laboratories, BA 1000, Verdünnung: 9 µl in 1 ml TBS)

Die **Tertiär-Antikörper** sind:

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC, Vector Laboratories, PK 4000, Verdünnung: 9 µl Avidin und 9 µl Biotin in 1 ml TBS)

### 3.4.2 Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode) für Paraffinschnitte

In Anlehnung an die von HSU et al. (1981) und ALLDINGER et al. (1996) beschriebene Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode wurde folgendes Protokoll verwendet, wobei sich die Objektträger zum Auftragen der Antikörper und für die dazwischen liegenden Waschschriffe in Coverplates<sup>TM</sup> (Shandon, Thermo Electron GmbH) und Sequenza<sup>®</sup>-Einsätzen (Shandon, Thermo Electron GmbH) befinden.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti-Histol<sup>®</sup> dreimal für 5 Minuten, in Isopropylalkohol zweimal für 5 Minuten, in 96%igem Alkohol, 70%igem und 50%igem Alkohol je einmal für 3 Minuten
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,5%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol reinst (s. Anhang) für 30 min bei Raumtemperatur (dieser Schritt entfällt für BS-1; für CD44 wurde statt Methanol reinst TBS verwendet.)
3. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS (s. Anhang) für je 5 Minuten
4. Demaskierung:
  - a) des **MHC II**-Antigens durch Inkubation der Schnitte in vorgewärmter TUF-Lösung ("target unmasking fluid", Kreatech Diagnostics, s. Anhang), 1:3 verdünnt in Aqua dest., für 10 Minuten bei 90°C
  - b) des **CD79α**-Antigens durch Inkubation der Schnitte in Citrat-Puffer pH 6,0 in der Mikrowelle (800 W) für 20 Minuten (s. Anhang)

- c) des **CD3ε**-Antigens durch Proteasebehandlung der Schnitte mit 0,05% Protease (Pronase), gelöst in vorgewärmtem NaCl-PBS (pH 7,4) für 5 Minuten bei 37°C (s. Anhang)
5. Einsetzen der Schnitte in Coverplates<sup>TM</sup> und Sequenza<sup>®</sup>-Einsätze
6. Anschließend dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten
7. Inkubation der Schnitte mit **Blocking-Serum**:
  - a) für den Nachweis von **NP-2** und **CD79α** mit unverdünntem Pferdeserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur
  - b) für den Nachweis von **GFAP**, **CD3ε** und **MBP** mit unverdünntem Schweineserum für 10 Minuten bei Raumtemperatur
  - c) für den Nachweis von **CD44**, **MHC II** und des Lektins **BS-1** nicht notwendig
8. Auftragen des primären Antikörpers und Inkubation für 16h bei 4°C im Kühlschrank
9. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten
10. Auftragen des sekundären Antikörpers und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
11. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten
12. Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Herstellung des Avidin-Biotin-Komplexes mindestens 30 Minuten vor Gebrauch)
13. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten
14. Umsetzen der Schnitte in Küvetten mit TBS
15. Inkubation der Schnitte mit 3,3'Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) in 0,1 M Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,1 (s. Anhang) mit 0,3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 Minuten bei Raumtemperatur, dabei vorsichtiges Rühren auf einem Magnetrührer
16. Dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für je 5 Minuten
17. Gegenfärbung in Papanicolaou-Lösung (1:20 verdünnt in A. dest.) für 30 – 60 Sekunden, anschließend Bläuen in Leitungswasser für 5 – 10 Minuten und kurzes Eintauchen der Schnitte in A. dest
18. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 50%iger, 70%iger, 80%iger und 96%iger Alkohol für je einmal 3 Minuten, zweimal für je 5 Minuten Isopropylalkohol und zuletzt zweimal für je 5 Minuten in Roti<sup>®</sup>-Histol
19. Eindecken der Schnitte mit Hilfe des Folieneindeckautomaten Tissue-Tek<sup>®</sup> (Vogel GmbH & Co. KG)

Für den Nachweis von BS-1 entfallen die Schritte 10 und 11, da das Lektin bereits in biotinierter Form vorliegt.

### 3.4.3 Kontrollen

Als positive Kontrollen für die immunhistologische Reaktionen wurden für N-4 (NP-2) CDV-infizierte DH82-Zellen mitgeführt; für MHC II diente eine granulomatöse Entzündung mit zahlreichen Makrophagen vom Hund (T 4385/96) als Positivkontrolle. Für die Lymphozytenmarker fand ein Milzschnitt eines Hundes (S 829/99) Verwendung und für CD44 sowie BS-1 wurde ein DH82-Zellpellet eingesetzt. Für GFAP und MBP stellten bekannte Gehirnschnitte von Staupe-infizierten Hunden (S 102/95) die Positivkontrolle dar.

Als Negativkontrolle wurde, abhängig vom Primärantikörper, entsprechend verdünnte Aszitesflüssigkeit von Balb/cJ-Mäusen, TBS, Serum von nicht-immunisierten Kontrollkaninchen (KK) oder ein monoklonaler Antikörper gegen T-Zelloberflächenantigene von Hühnerlymphozyten (T1) eingesetzt.

### 3.4.4 Auswertung der Immunhistologie

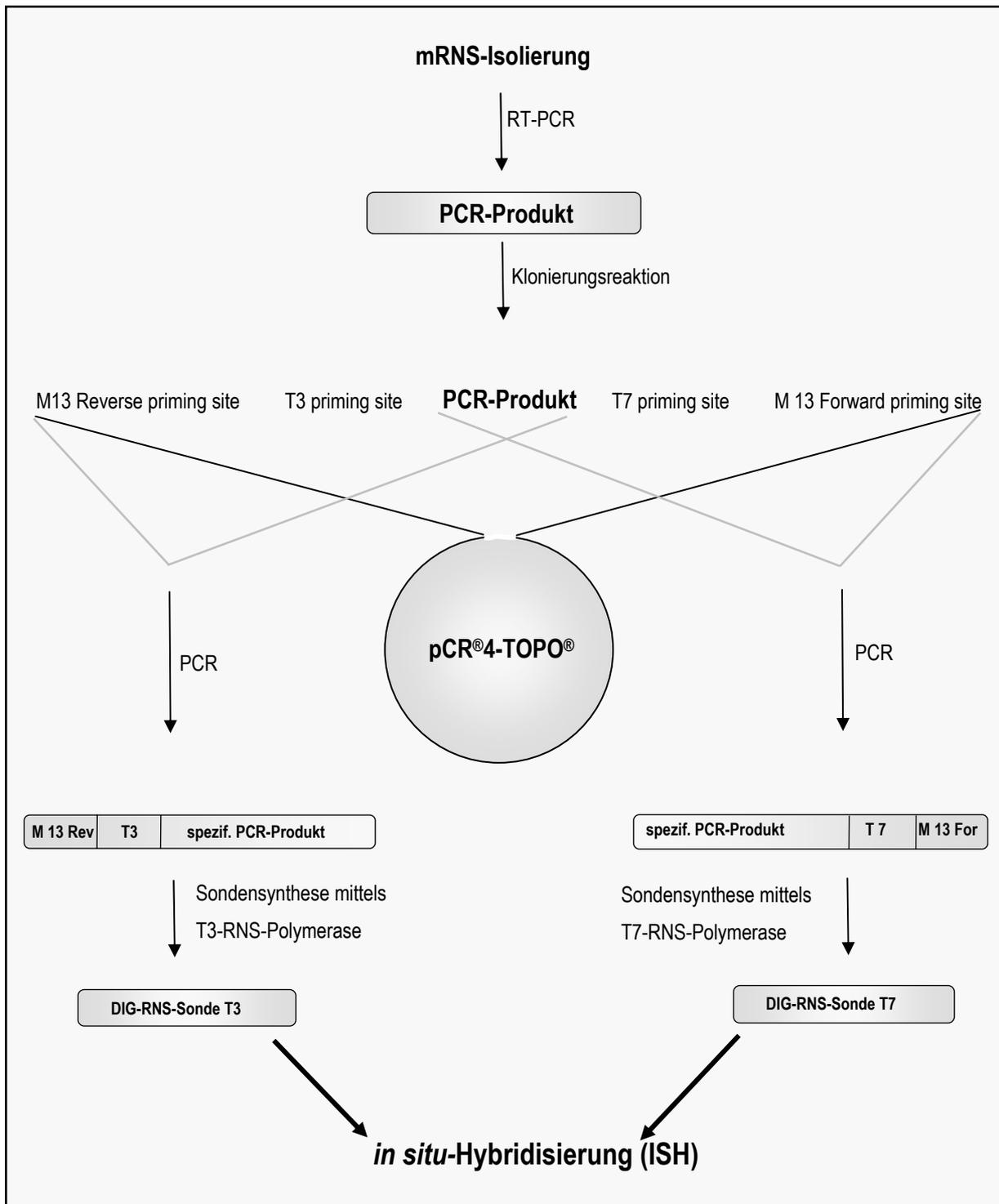
Die Auswertung der positiven Zellen in der Immunhistologie erfolgte semiquantitativ (- = negativ, + = geringe Anzahl positiv markierter Zellen, ++ = mittlere Anzahl positiv markierter Zellen, +++ = hohe Anzahl positiv markierter Zellen), indem der Schnitt unter einem Mikroskop (IX 70, OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg) mäanderförmig abgefahren wurde und intra- sowie extraläsional die Anzahl positiver Zellen/Gesichtsfeld geschätzt wurden.

### 3.5 Molekularbiologische Arbeitsschritte

Im Rahmen einer *in situ*-Hybridisierung (ISH) wurde mittels Digoxigenin (DIG)-markierter RNS-Sonden die mRNA ausgewählter Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und "tissue inhibitor of matrix metalloproteinase" (TIMP) sowie Staupevirus-messenger und – genomische RNS nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte der Nachweis der mRNA des so genannten "house-keeping"-Gens GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), um die Integrität der mRNA zu überprüfen.

Die prinzipielle Vorgehensweise bei der Synthese der entsprechenden DIG-markierten RNS-Sonden war bei allen Untersuchungen identisch (Abb. 5). Zuerst wurde aus CDV-infizierten DH82-Zellen bzw. Concanavalin A (Con A) stimulierten Lymphozyten (für 16h stimuliert) mit Standardmethoden RNS isoliert, die dann im Rahmen einer RT-PCR mittels spezifischer Primerpaare amplifiziert wurde. Die synthetisierte DNS wurde anschließend in einem weiteren Schritt in einer Klonierungsreaktion eingesetzt. Das so erhaltene Plasmid, welches "upstream" und "downstream" der "multiple cloning site" neben den T3- bzw. T7-RNS-Polymerase-Bindungsstellen auch "M13Reverse-" bzw. "M13Forward priming sites" besitzt, diente in einer PCR mit spezifische Primern als "template". Dieses PCR-Produkt wurde aufgereinigt und diente in einer RNS-Sonden-Synthese-Reaktion als Matrize zur Herstellung spezifischer DIG-markierter RNS-Sonden. Die Spezifität der RNS-Sonden wurde durch eine Sequenzierung der Plasmide und anschließenden Vergleich mit bekannten veröffentlichten Sequenzen überprüft. Die so erhaltenen DIG-markierten RNS-Sonden wurden dann in einer *in situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis spezifischer mRNA von MMP-9, MMP-14, TIMP-1, CDV und GAPDH im Gehirn von natürlich Staupe-infizierten Hunden, sowie den Kontrolltieren und den Positivkontrollen eingesetzt.

Abb. 5: Schematische Darstellung der RNS-Sonden Synthese



Zuerst wurde mit Standardmethoden mRNS isoliert, die dann im Rahmen einer RT-PCR mittels spezifischer Primerpaare amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem weiteren Schritt in einer Klonierungsreaktion eingesetzt. Das so erhaltene Plasmid, welches "upstream" und "downstream" der "multiple cloning site" neben den T3- bzw. T7-RNS-Polymerase-Bindungsstellen auch "M13Reverse-" bzw. "M13Forward priming sites" besitzt, diente in einer PCR mit spezifische Primern als "template". Nach Aufreinigung diente dieses PCR-Produkt in einer RNS-Sonden-Synthese-Reaktion als Matrize zur Herstellung spezifischer DIG-markierter RNS-Sonden. Die so erhaltenen DIG-markierten RNS-Sonden wurden dann in einer *in situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis spezifischer mRNS eingesetzt.

### 3.5.1 Allgemeine Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung

Um DNS-Kontaminationen und vor allem Verunreinigungen mit RNasen sowohl bei der RT-PCR, als auch der Sondensynthese und der ISH zu vermeiden, wurden bei den molekularbiologischen Arbeitsschritten folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen:

1. Tragen von Latex-Einweghandschuhen, die zwischen bestimmten Arbeitsschritten regelmäßig gewechselt wurden
2. Verwendung von Diethylpyrokarbonat (DEPC 0,1%)-behandeltem und autoklaviertem Aqua bidest.
3. Autoklavieren von Gebrauchslösungen, Instrumenten und Plastikwaren für 20 Minuten bei 121°C und 210 kPa (kiloPascal; entspricht 2,05 bar)
4. Ausbacken von Glaswaren und Gebrauchsgegenständen für die ISH für 6h bei 220°C
5. Verwendung von sterilen RNase- und DNase-freien, gestopften Pipettenspitzen sowie sterilen RNase- und DNase-freien Plastikeinwegwaren
6. Aliquotierung von Reagenzien, Lösungen und RNS-Sonden in kleine Mengen
7. Räumliche Trennung und Verwendung von separaten Instrumenten für die RNA-Isolierung, das Ansetzen der RT-PCR, der Detektion der PCR-Amplifikate, der Klonierungsschritte, der RNS-Sondensynthese und der ISH
8. Einsatz von Negativkontrollen bei der RT-PCR und der ISH
9. Mitführen einer Positivkontrolle bei der RT-PCR und der ISH
10. Regelmäßiges Reinigen der Arbeitsplätze und der Instrumente mit 10%iger Natriumhypochloritlösung
11. Die Präparationsschritte der RT-PCR sowie bestimmte Arbeitsschritte der Klonierungsreaktion, der Sondensynthese und der ISH erfolgten auf Eis. Temperaturempfindliche Reagenzien und Proben wurden bei ihrer Verwendung in eisgekühlten Metallblocks oder Kühlracks abgestellt.

### 3.5.2 RNS-Isolierung

Zur RNS-Isolierung dienten zum einen Staupevirus-infizierte DH82-Zellen und zum anderen Concanavalin A (Con A)-stimulierte kanine Lymphozyten. Bei den DH82-Zellen handelt es sich um eine kanine Makrophagenzelllinie, die mit dem Onderstepoort-Staupevirus-Stamm infiziert wurde (GRÖNE et al., 1999 und 2002). Die Staupevirus-infizierten DH82-Zellen

wurden dankenswerterweise von Frau Dr. S. Fonfara und die Con A-stimulierten kaninen Lymphozyten von Frau Dr. U. Kaim zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der DH82-Zellen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen und die Stimulierung der Lymphozyten in 9 cm<sup>2</sup> Petrischälchen. Zur RNS-Isolierung der infizierten DH82-Zellen wurden mittels eines sterilen Schabers die Zellen vom Flaschenboden abgekratzt und zusammen mit dem Zellüberstand in sterile 10-ml-Glaszentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 x g und der Überstand wurde verworfen. Aus dem entstandenen Zellpellet wurde gemäß Protokoll mit TRIzol<sup>®</sup> die RNS isoliert.

Parallel zur RNS-Isolierung wurde aus Zellkulturflaschen der identischen Passage und Infektion ein DH82-Zellpellet gewonnen, welches später als Positivkontrolle in der ISH diente. Hierfür wurde nach der Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 x g) das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und diese Resuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Hütchen überführt. Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 x g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml PBS-Formalin (s. Anhang) resuspendiert und sofort im Anschluss für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert und das Zellpellet für 24h bei 4 °C fixiert. Danach wurde das Pellet in eine Biopsiekapsel überführt und es folgte eine standardmäßige Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit anschließender routinemäßigen Einbettung in einem Paraffin-Paraplast-Gemisch (Histo-Comp<sup>®</sup> 56°C). 3 µm dicke Schnitte wurden auf SuperFrost/Plus-Objekträger aufgezogen und bei 4°C gelagert.

Aus dem zellhaltigen Überstand der Con A-stimulierten Lymphozyten wurde ebenfalls ein Zellpellet hergestellt. Um die restlichen auf dem Boden der Petrischale verbliebenen Zellen ebenfalls mit aufzunehmen, wurde die Petrischale durch mehrmaliges auf- und abpipettieren von 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz gespült und dieser 1 ml TRIzol<sup>®</sup> direkt auf das zuvor gewonnene Zellpellet gegeben.

Anschließend erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNS für das DH82- bzw. Lymphozyten-Pellet, wobei das kommerziell erhältliche TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen<sup>™</sup> GmbH, Karlsruhe) Verwendung fand. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers ausgeführt, welches auf der RNS-Isolierungsmethode nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) beruht.

1. 1 ml TRIzol<sup>®</sup> auf die in einem 2-ml Eppendorf-Hütchen befindlichen Zellpellets geben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut mischen (schleimige Konsistenz), danach 5 Minuten inkubieren
2. Zugabe von 300µl Chloroform und 15 Sekunden kräftiges Schütteln
3. Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 x g und Raumtemperatur zur Auftrennung des Gemisches in eine obere, wässrige und untere, organische Phase
4. Vorsichtige Entnahme der oberen, wässrigen RNS-haltigen Phase und Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß. Ggf. Wiederholung der Schritte 2. und 3.
5. Zugabe von 700µl 100%igem Isopropanol RNase-frei (Rotipuran<sup>®</sup>, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und gutes Durchmischen bis die Schlieren verschwinden
6. Inkubation bei -20°C über Nacht oder -80°C für mind. 30 Minuten zum Ausfällen der RNS
7. Danach Zentrifugation bei 12.000 x g für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur zur Erstellung des RNS-Pellets
8. Vorsichtiges Abpipettieren oder zügiges Abkippen des Überstandes und Waschen des RNS-Pellets durch Zugabe von 600µl 75%igem Ethanol
9. Zentrifugation bei 12.000 x g für 5 Minuten
10. Verwerfen des Überstandes und Überschichtung des RNS-Pellets mit 150 µl 75%igem Ethanol
11. Lagerung des Ethanol-überschichteten RNS-Pellets bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung

Vor der Durchführung der RT-PCR wurden die RNS-Pellets wie folgt verarbeitet:

Nach einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Alkohol vorsichtig abpipettiert oder zügig abgekippt und das Reaktionsgefäß unter einer Reinraum-Werkbank für etwa 10 Minuten mit der Öffnung nach unten auf ein sauberes Papierhandtuch gestellt, sodass der verbliebene Alkohol abfließen und verdunsten kann. Dabei darf das RNS-Pellet nicht vollständig austrocknen, um die Löslichkeit nicht herabzusetzen. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst und die RNS-Konzentration der Lösung mit einem Spektralphotometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech jetzt: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 260 nm gemessen. Um eine einheitliche Ausgangsmenge der

RNS zu erreichen, wurde von allen Proben eine Verdünnung mit der Konzentration von 100ng/µl hergestellt.

### 3.5.3 Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

#### 3.5.3.1 Primer

Für die Amplifikation der mRNA in der RT-PCR wurden folgende Primer (Tab. 5) aus der Literatur ausgewählt und bei der MWG Biotech AG, Ebersberg, in Auftrag gegeben (BARNES et al., 2000; GAEDKE et al., 1997; GRÖNE et al., 1998;). Bei den Primern von MMP-9 und MMP-14 handelt es sich um humane Primer, wobei die Übereinstimmung der PCR-Produkte mit den entsprechenden kaninen Sequenzen durch Sequenzvergleiche sowohl in der Literatur (BARNES et al., 2000), als auch im Rahmen dieser Arbeit stattgefunden hat. Die von der MWG Biotech AG erhaltenen Primer-Lyophilisate wurden nach Herstellerangaben mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. gelöst und ebenfalls mit Aqua bidest.-DEPC auf eine Konzentration von 15pmol/µl eingestellt. Diese Gebrauchslösungen wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tab. 5:** Zusammenfassung der Namen, interne Bezeichnung, Sequenz, Amplikonlänge, sowie Accession-Nummer und Position der verwendeten Primer

Primer	Bez.	Sequenz (5'-3' Richtung)	Amplikonlänge	Acc.-Nr. und Position
CDV S	p 1	aca gga ttg ctg agg acc tat	287 bp	X02000; 635-655
CDV AS	p 2	caa gat aac cat gta cgg tgc		X02000; 901-921
GAPDH S	p 42	gcc aaa agg gtc atc atc tc	228 bp	BC014085; 1225-1244
GAPDH AS	p 43	ggg gcc atc cac agt ctt ct		BC014085; 1452-1433
MMP-9 S	p 85	gag gtt cga cgt gaa ggc gca gat	200 bp	J05070; 1918-1941
MMP-9 AS	p 86	cat agg tca cgt agc cca ctt ggt c		J05070; 2117-2093
MMP-14 S	p 87	tgc ctg cgt cca tca aca ctg	487 bp	X90925; 1203-1223
MMP-14AS	p 88	atc acc tcc gtc tcc tcc tca		X90925; 1686-1666
TIMP-1 S	p 89	gcg tta tga gat caa gat gac	343 bp	AF077817; 224-244
TIMP-1 AS	P 90	ctg gtc cgt cca caa gca		AF077817; 565-549

Acc.-Nr. = GenBank<sup>®</sup>-Accession-Nummer; AS = "antisense"-Primer; Bez. = interne Bezeichnung; bp = Basenpaare; CDV = canine distemper virus; S = "sense"-Primer;

### 3.5.3.2 DNase-Behandlung

Um eine DNS-Verunreinigung auszuschließen, wurde der Reversen Transkription eine DNase-Behandlung vorangestellt (GRÖNE et al., 1999), die ebenso wie die RT-Reaktion und die konventionelle PCR in 0,5 ml fassenden RNase-freien, autoklavierten PCR-"tubes" (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt wurde.

Hierfür wurden 6,5 µl der aliquotierten, auf 100 ng/µl eingestellten RNS-Lösung mit 3,25 µl eines DNase-Mastermixes vermischt (Tab. 6) und in einem Multicycler<sup>®</sup> PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- 10 Minuten für 37°C (Aktivitätsphase der DNase)
- 5 Minuten für 75°C (Inaktivierung der DNase)
- Abkühlung auf 4°C bis zur Entnahme und direkten Weiterverarbeitung der Proben

**Tab. 6:** Ansatz zur DNase-Behandlung von 6,5 µl RNA-Lösung

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
MnCl (10 mM)	1,0 µl	1 mM
10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)	1,0 µl	1 x PCR Puffer
DNase I, RNase-frei (10 U/µl)	1,0 µl	1 U/µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl	1 U/µl

### 3.5.3.3 Reverse Transkription

Die cDNS Synthese durch Reverse Transkription, ebenso wie die sich anschließende PCR wurde unter Verwendung des "GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH) in einem Multicycler<sup>®</sup> PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt. Von dem aus der DNase-Behandlung hervorgegangenen Gesamtvolumen von 9,75 µl wurden in diesem Reaktionsschritt 1,5 µl benötigt, um 10 µl cDNS zu synthetisieren. Je nach gewünschter cDNS-Menge wurden die Volumina der einzelnen Reaktionskomponenten entsprechend vervielfacht (Tab. 7).

**Tab. 7:** Ansatz zur Herstellung von 10 µl cDNS-Lösung (RT-Mastermix)

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0 µl	5 mM
10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)	1,0 µl	1 x PCR-Puffer
dATP (10 mM)	1,0 µl	1 mM
dCTP (10 mM)	1,0 µl	1 mM
dGTP (10 mM)	1,0 µl	1 mM
dTTP (10 mM)	1,0 µl	1 mM
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
murine Reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,5 µl	2,5 U/µl
“random hexamers“ (50 µM)	0,5 µl	2,5 µM
DNase-behandelte RNA (Produkt aus 3.5.3.1)	1,5 µl	10 ng/µl

dATP: Desoxyadenintriphosphat; dCTP: Desoxycytosintriphosphat; dGTP: Desoxyguanintriphosphat; dTTP: Desoxythymidintriphosphat

Die Inkubation der RT-Reaktion erfolgte unter folgenden Temperaturbedingungen:

- 8 Minuten bei 20°C (Temperaturadaptation der Oligonukleotid-Hexamere)
- 15 Minuten bei 42°C (Binden und Elongation der Hexamere)
- 5 Minuten bei 96°C (Inaktivierung der reversen Transkriptase)
- 5 Minuten bei 5°C (Abkühlung der Proben)
- bei 4°C bis zur Entnahme der Proben

Die aus dieser Reaktion hervorgegangene cDNS wurde entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss in der PCR eingesetzt.

### 3.5.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um die notwendige spezifische DNS für die Klonierungsreaktion zu erhalten, wurde die cDNS mit folgendem Ansatz (Tab. 8) in einer PCR eingesetzt. Die Reaktion fand ebenfalls unter Verwendung des “GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR Core Kit“ (Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH) in dem Multicycler<sup>®</sup> PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH) statt.

**Tab. 8:** Ansatz der PCR-Reaktion (PCR-Mastermix)

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
Aqua bidest.	32,75 µl	
10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)	4 µl	0,8 x PCR-Puffer
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl	1 mM
“sense“-Primer (15 pmol/µl)	0,5 µl	0,15 pmol/µl
“antisense“-Primer (15 pmol/µl)	0,5 µl	0,15 pmol/µl
Ampli Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	0,025 µl
cDNS (Produkt aus 3.5.3.2)	10 µl	

Die PCR-Reaktion fand für alle Primerpaare unter folgenden Temperaturbedingungen statt:

- 1 Minute bei 94°C (Denaturierung der RNS-DNS-Heteroduplexen)
- 40 Zyklen: 1 Minute für 94°C (Denaturierung der DNS-DNS-Duplexen)  
2 Minuten bei 59,5°C (Primeranlagerung)  
1 Minute bei 72°C (Elongation der Primer durch die Taq Polymerase)
- 20 Minuten bei 72°C (finale Elongation zum Erhalt von 3'-Poly-A-Überhängen)
- 4°C bis zur Entnahme (Abkühlung)

Nach den erfolgten 40 Zyklen erfolgte die Inkubation der PCR-Produkte für 20 min bei 72°C, um eine Elongation der Produkte unter Bildung von so genannten 3'-Poly-A-Überhängen zu bewirken, die für eine erfolgreiche Klonierung notwendig sind. Danach erfolgte eine Abkühlung der Proben auf 4°C bis zur Entnahme.

Die PCR-Produkte wurden danach entweder sofort in die Klonierungsreaktion eingesetzt oder bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

### 3.5.3.5 Gelelektrophorese

Zur Auswertung und Überprüfung der amplifizierten mRNA wurde mit den PCR-Produkten eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür befand sich in einer horizontalen Laufkammer ein 2%iges, ethidiumbromidhaltiges Agarose-Gel (s. Anhang), welches pro Probe mit 15 µl PCR-Produkt plus 3 µl Bromphenol-Laufpuffer (ABgene<sup>®</sup>, Advanced Biotechnologies, Hamburg) in die jeweiligen Gel-Taschen beladen wurde. Zusätzlich erfolgte das Auftragen einer 100bp-Leiter (ABgene<sup>®</sup>, Advanced Biotechnologies, Hamburg) zum

Ablesen der Amplifikatlänge der PCR-Produkte. An die Elektrophoresekammer wurde für 24 Minuten eine Spannung von 6 V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500mA angelegt. Danach erfolgte die Visualisierung des Gels mittels Durchlicht bei 312 nm auf einem UV-Transilluminator. Die photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch das Instant Camera System Polaroid (MP4) mit 667 Schwarz-Weiß Instantfilm-Kassetten.

### 3.5.4 Klonierungsreaktion

Nachdem die PCR-Produkte im Agarose-Gel visualisiert worden waren und anhand des Vergleichs der Basenpaar-Länge mit der Leiter das entsprechende Amplifikat gewonnen war, wurde dieses direkt und ohne Aufreinigung entweder frisch oder nach Lagerung bei -20°C aus dem PCR-Reaktionsgefäß in die Klonierungsreaktion eingesetzt.

Durch Vorversuche konnte ermittelt werden, dass sich der Klonierungserfolg und die Klonierungseffizienz durch eine Aufreinigung der PCR-Produkte sowohl aus dem Gel als auch des flüssigen Amplifikates nicht steigern ließ. In der Regel wurde eine mittlere Menge an PCR-Produkt, das heißt eine im Agarose-Gel saubere, gut sichtbare, aber nicht zu prominente Einzelbande in zwei Ansätzen (Ansatz I = 1 µl PCR-Produkt; Ansatz II = 4 µl PCR-Produkt) für die Klonierung verwendet.

Für die Klonierungsreaktion kam das "TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing" (Invitrogen<sup>™</sup> GmbH, Karlsruhe) zum Einsatz, welches das "pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-Plasmid (3957 bp)" beinhaltet. Dieses Plasmid besitzt "upstream" bzw. "downstream" der "multiple cloning site" T3- bzw. T7-RNS-Polymerase Bindungsstellen und benutzt das so genannte "Topoisomerase-System", um PCR-Produkte mit 3'-Poly-A-Überhängen in kurzer Zeit (5 Minuten) bei Raumtemperatur und ohne zusätzliche Arbeitsschritte zu klonieren.

#### 3.5.4.1 Ansatz der Klonierungsreaktion

Standardmäßig wurden pro PCR-Produkt zwei Klonierungsansätze nach Herstellerangaben durchgeführt (Tab. 9):

**Tab. 9:** Ansatz der Klonierungsreaktion I und II

Reagenzien	Ansatz I (1 µl PCR-Produkt)	Ansatz II (4 µl PCR-Produkt)
PCR-Produkt	1 µl	4 µl
Salz-Lösung <sup>1</sup>	1 µl	1 µl
Steriles H <sub>2</sub> O bidest. <sup>1</sup>	3 µl	---
TOPO <sup>®</sup> Vektor <sup>1</sup>	1 µl	1 µl

<sup>1</sup> vom Hersteller mitgeliefert

Am ersten Versuchstag wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Pipettieren der einzelnen Reaktionskomponenten in 0,5 ml-Eppendorf-Hütchen und vorsichtiges Mischen
2. Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 Minuten bei Raumtemperatur, danach auf Eis
3. Sofort danach 2 µl dieses Reaktionsansatzes in ein mitgeliefertes Plastikröhrchen mit darin enthaltenen und vorsichtig auf Eis aufgetauten "TOP10 One Shot<sup>®</sup> Chemically Competent *E. coli*" geben und sanft mischen
4. Inkubation dieses Reaktionansatzes für 15 Minuten auf Eis
5. Hitzeschock-Behandlung der Zellen für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad ohne Schütteln, danach sofort wieder auf Eis
6. Zugabe von 250 µl SOC Medium (im Kit enthalten), auf Raumtemperatur gebracht
7. Horizontales Schütteln der Reaktionsgefäße für eine Stunde bei 37°C (225rpm)
8. Unterschiedliche Mengen (30 µl bzw. 100 µl) des Reaktionsansatzes auf Ampicillin-haltigen (75 µg/ml) Luria-Bertani (LB)-Platten (s. Anhang) ausplattieren
9. Inkubation über Nacht (16 h) im Brutschrank bei 37°C

Am zweiten Versuchstag durchgeführte Arbeitsschritte:

1. Picken von 6 – 10 Kolonien mittels steriler Zahnstocher und animpfen von einzelnen "Minipräps" (3,5 ml flüssiges LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin, s. Anhang) in jeweils sterilen 10 ml fassenden Glaszentrifugenröhrchen
2. Inkubation über Nacht (16 h) in Schüttelinkubator bei 37 °C (225 rpm)

### 3.5.4.2 Eluierung der Plasmid-DNS

Nachdem ein ausreichendes Wachstum der Bakterienkultur in den "Minipräps" stattgefunden hatte, wurde die Plasmid-DNS Isolierung mit Hilfe des "NucleoBond<sup>®</sup> PC 20-Kit" (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) durchgeführt.

Mit leichter Abwandlung des Originalprotokolls vom Hersteller wurde dieses Kit für alle Isolierungen herangezogen. Das Kit enthält alle zur Isolierung benötigten Lösungen (Puffer S1, S2, S3, N2, N3, N5), sowie die entsprechenden silikathaltigen Anionenaustauschersäulen. Vor Beginn der Isolierung muss lediglich nach Herstellerangaben die mitgelieferte lyophilisierte RNase im Puffer S1 gelöst werden (100 µg RNase A/ml Puffer S1).

1. 1,5 ml Bakterienkultur in 2 ml-Eppendorf-Hütchen pipettieren und bei 3.000 – 4.000 x g für 4 Minuten zentrifugieren
2. Überstand verwerfen und nochmals 1,5 ml Bakterienkultur auf das schon vorhandene Zellpellet geben, bei 3.000 – 4.000 x g für 4 Minuten zentrifugieren
3. Überstand verwerfen und mit 0,6 ml Puffer S1 (50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase A, pH 8,0) das Zellpellet vorsichtig resuspendieren
4. Zugabe von 0,6 ml Puffer S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) und sofortiges Mischen der Lösung durch vorsichtiges auf den Kopf drehen und schwenken
5. Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur
6. Zugabe von Puffer S3 (2,8 M KAc, pH 5,1) und sofortiges Mischen der Lösung durch vorsichtiges auf den Kopf drehen und schwenken
7. Inkubation für 5 Minuten auf Eis
8. Zentrifugation bei 14.000 x g für 15 – 20 Minuten bei 4°C
9. In der Zwischenzeit Equilibration der Anionenaustauschersäulen mit 1 ml Puffer N2 (100 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton-X-100, pH 6,3)
10. Nach der Zentrifugation den klaren Überstand aus den Eppis vorsichtig abpipettieren und auf die Anionenaustauschersäulen geben, Eppis verwerfen
11. Danach 3-maliges Waschen der Säulen mit jeweils 1 ml Puffer N3 (100 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3)
12. Nach dem letzten Waschschritt DNase- und RNase-freie, autoklavierte 1,5 ml Eppendorf-Hütchen unter die jeweilige Säule stellen und die Plasmid-DNS mit 0,9 ml Puffer N5 (100 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8,5) eluieren
13. Die gereinigte Plasmid-DNS mit 0,7 ml 100%igem, RNase-freiem eisgekühltem Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) fällen

14. Zentrifugation bei 14.000 x g für 30 Minuten bei 4°C
15. Waschen der Plasmid-DNS mit 50 – 100 µl 70%igem, RNase-freiem eisgekühltem Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
16. Zentrifugation bei 14.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C
17. Nach kurzem Trocknen das DNS-Pellet in 25 µl A. bidest-DEPC lösen

Nach der Eluierung der Plasmid-DNS wurde diese in einem Spektralphotometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech jetzt: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 260 nm gemessen und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **3.5.4.3 Transformation der Plasmid-DNS in DH5α kompetente Zellen**

Da sich in Vorversuchen durch unterschiedliche Isolierungsmethoden die Ausbeute der Plasmid-DNS nicht wesentlich steigern ließ und konstant zwischen 1 – max. 5 µg pro Minipröp und Säule lag, wurde die im ersten Schritt (3.5.4.2) gewonnene Plasmid-DNS in einer Menge von 2 – 10 ng in “Library Efficiency<sup>®</sup> DH5α<sup>™</sup> Competent Cells“ (Invitrogen<sup>™</sup> GmbH, Karlsruhe) transformiert, um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNS zu erzielen.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Herstellen einer Gebrauchslösung der Plasmid-DNS aus 3.5.4.2 in einer Konzentration von 2 – 10 ng/µl durch Zugabe von Aqua bidest-DEPC
2. Auftauen der DH5α-Zellen nach Herstellerangaben und aliquotieren von 100 µl der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Eppendorf-Hütchen, dabei auf Eis arbeiten
3. Zugabe von 2 – 10 ng Plasmid-DNS aus der Gebrauchslösung zu den DH5α-Zellen und vorsichtiges mischen
4. Inkubation der Zellen für 30 Minuten auf Eis
5. Hitzeschock-Behandlung der Zellen für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad ohne Schütteln, danach sofort wieder auf Eis
6. Für 2 Minuten auf Eis belassen
7. 0,9 ml SOC Medium zugeben, auf Raumtemperatur gebracht
8. Horizontales Schütteln der Reaktionsgefäße für eine Stunde bei 37°C (225rpm)
9. Unterschiedliche Mengen (50 µl bzw. 100 µl) des Reaktionsansatzes auf Ampicillin-haltigen (75 µg/ml) Luria-Bertani (LB)-Platten (s. Anhang) ausplattieren
10. Inkubation über Nacht (16 h) im Brutschrank bei 37°C

Nachdem ein sehr gutes Wachstum der Bakterienkolonien über Nacht stattgefunden hatte wurde gemäß 3.5.4.2 abermals die Plasmid-DNS isoliert. Der einzige Unterschied zu der oben beschriebenen Eluierung bestand darin, dass als Ausgangsmaterial kein Minipräp zur Verfügung stand, sondern mit Hilfe steriler Zahnstocher die Bakterienkolonien von den Agar-Platten gekratzt wurden und in ein 2 ml-Eppendorf-Hütchen, welches 1 ml LB-Medium enthielt, gegeben wurden. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde mit Punkt 3 des oben angegebenen Protokolls (3.5.4.2) fortgefahren und die Menge der isolierten Plasmid-DNS ebenfalls spektralphotometrisch ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNS bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.5.4.4 Restriktionsverdau der Plasmid-DNS**

Um den Erfolg der Klonierungsreaktion zu überprüfen wurde sowohl mit der Plasmid-DNS aus der 1. Isolation (3.5.4.2) als auch der 2. Isolation (3.5.4.3) ein Restriktionsverdau mit Hilfe der Restriktions-Endonuklease “Eco R I“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Hierfür wurde eine entsprechende Menge Plasmid-DNS (0,2 – 0,5  $\mu\text{g}$ ) mit 1  $\mu\text{l}$  Eco R I-Enzym und 2  $\mu\text{l}$  spezifischem Puffer vermischt und der Reaktionsansatz bis auf 20  $\mu\text{l}$  mit DEPC-Aqua bidest. aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation für 1,5 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Bromphenol-Laufpuffer (ABgene<sup>®</sup>, Advanced Biotechnologies, Hamburg) gestoppt und die Proben einer Gelelektrophorese in einem 2%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarose-Gel (s. Anhang) unterzogen. Zusätzlich erfolgte das Auftragen einer 100bp-Leiter (ABgene<sup>®</sup>, Advanced Biotechnologies, Hamburg) zum Ablesen der Länge der verdauten Plasmid-DNS und als interne Kontrolle das Auftragen des entsprechenden PCR-Produktes, welches einmal nativ war und einmal ebenfalls mit verdaut wurde.

An die Elektrophoresekammer wurde für 24 Minuten eine Spannung von 6 V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500mA angelegt. Danach erfolgte die Visualisierung des Gels mittels Durchlicht bei 312 nm auf einem UV Transilluminator. Die photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch das Instant Camera System Polaroid (MP4) mit 667 Schwarz-Weiß Instantfilm-Kassetten.

#### **3.5.4.5 Anlegen von Glycerolstocks**

Sowohl aus der Klonierungsreaktion (3.5.4.1) als auch der Transformationsreaktion (3.5.4.3) wurden Glycerolstocks der Bakteriensuspension als Dauerstock angelegt. Hierfür wurden 0,7

ml der Bakteriensuspension mit 0,3 ml Glycerin in gut verschließbaren Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel vermischt und bei -80°C gelagert.

#### **3.5.4.6 Sequenzierung der Plasmid-DNS-Produkte**

Nachdem der Restriktionsverdau ein positives Ergebnis erbrachte, wurde von jeder Plasmid-DNS eine entsprechende Menge (3 – 5 µg) entnommen und an die MWG Biotech AG, Ebersberg, zur Sequenzierung geschickt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe der GenBank<sup>®</sup> mit bereits veröffentlichten kaninen Sequenzen verglichen und danach ebenfalls zur Veröffentlichung eingereicht.

#### **3.5.5 PCR zur Vervielfältigung der Plasmid-DNS**

Um genügend Ausgangsmaterial für die RNS-Sonden-Synthese zur Verfügung zu haben, wurde mit spezifischen Primern und der spezifischen Plasmid-DNS als “Template“ eine PCR durchgeführt, das PCR-Produkt aufgereinigt und als Matrize in der RNS-Sondensynthese eingesetzt.

##### **3.5.5.1 Primer**

Es wurden für die PCR je nach Versuchsansatz als “sense“- bzw. “antisense“-Primer die spezifischen Primer (s. 3.5.3.1), in Kombination mit den kommerziell erhältlichen M13Reverse- bzw. M13Forward-Primern (Invitrogen<sup>TM</sup> GmbH, Karlsruhe) eingesetzt.

Daraus ergaben sich dann PCR-Produkte, die neben dem spezifischen PCR-Produkt entweder die T3-RNS-Polymerase-Bindungsstelle oder die T7-RNS-Polymerase-Bindungsstelle besaßen (Abb. 5, Kapitel 3.5)

##### **3.5.5.2 PCR**

Um die Matrize für die Sondensynthese zu gewinnen, wurde die spezifische Plasmid-DNS in einer Konzentration von 10-100 ng/µl mit unten stehendem Ansatz in einer PCR eingesetzt (Tab. 10). Die Reaktion fand ebenfalls unter Verwendung des “GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR Core Kit“ (Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH) in dem Multicycler<sup>®</sup> PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH) statt.

**Tab. 10:** Ansatz der PCR-Reaktion zur Vervielfältigung der Plasmid-DNS

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
Aqua bidest.-DEPC	34,75 µl	
10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl)	5 µl	1 x PCR-Puffer
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl	2 mM
dATP (10 mM)	1 µl	0,2 mM
dCTP (10 mM)	1 µl	0,2 mM
dGTP (10 mM)	1 µl	0,2 mM
dTTP (10 mM)	1 µl	0,2 mM
“sense“-Primer (15 pmol/ µl)	0,5 µl	0,15 pmol/µl
“antisense“-Primer (15 pmol/µl)	0,5 µl	0,15 pmol/µl
Ampli-Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	0,025 U/µl
Plasmid-DNS (aus 3.5.4.3)	1 µl	

dATP: Desoxyadenintriphosphat; dCTP: Desoxycytosintriphosphat; dGTP: Desoxyguanintriphosphat; dTTP: Desoxythymidintriphosphat

Die PCR-Reaktion fand für alle Primerpaare unter folgenden Temperaturbedingungen statt:

- 1 Minute bei 94°C (Denaturierung)
- 40 Zyklen: 1 Minute für 94°C (Denaturierung)  
2 Minuten bei 59,5°C (Primeranlagerung)  
1 Minute bei 72°C (Elongation durch die Taq Polymerase)
- 5 Minuten bei 72°C (finale Elongation)
- 4°C bis zur Probenentnahme

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese gemäß 3.5.3.5 durchgeführt, wobei statt 15 µl lediglich 10 µl PCR-Produkt auf das Gel aufgetragen wurden, um eine höhere Ausgangsmenge PCR-Produkt für die nachfolgende Aufreinigung bzw. die sich anschließende Sondensynthese zur Verfügung zu haben.

### 3.5.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte, die als Matrize in die Sondensynthese eingesetzt werden sollten, wurde das kommerziell erhältliche “NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1“-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) eingesetzt. In diesem Kit sind bereits alle

benötigten Lösungen (Puffer NT1, NT2, NT3, NE) und Anionenaustauschersäulen enthalten, es müssen lediglich vor der erstmaligen Benutzung 28 ml 96-100%iger Ethanol zu Puffer NT3 gegeben werden.

1. Mit 10 µl Aqua bidest.-DEPC den PCR-Reaktionsansatz (aus 3.5.5.2) auf 50 µl auffüllen
2. 200 µl Puffer NT1 zum PCR-Produkt zugeben und gut mischen
3. NucleoSpin<sup>®</sup> Extract-Säule in mitgeliefertes Auffanggefäß platzieren, Lösung aus 2.) auf Säule geben und 1 Minute bei 11.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, danach Auffanggefäß ausschütten
4. 600 µl Puffer NT3 auf Säule geben und 1 Minute bei 11.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, danach Auffanggefäß ausschütten
5. 200 µl Puffer NT3 auf Säule geben und 2 Minuten bei 11.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, danach Auffanggefäß ausschütten
6. Säule in ein steriles RNase- und DNase freies 1,5 ml Eppendorf-Hütchen platzieren und 50 µl Puffer NE auf Säule geben, 1 Minute bei Raumtemperatur stehen lassen und danach für 1 Minute bei 11.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren

Die Konzentration des so aufgereinigten PCR-Produkts wurde dann nochmals mittels eines Spektralphotometers (GeneQuant II, Pharmacia Biotech jetzt: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bei 260 nm gemessen und das PCR-Produkt wurde entweder direkt in die RNS-Sondensynthese eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.5.6 DIG-markierte RNS-Sondensynthese (*in vitro*-Transkription)

Für die Synthese der Digoxigenin (DIG)-markierten RNS-Sonden wurde der "DIG RNA Labeling Mix, 10 x konz." (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) sowie die entsprechende T3-RNA-Polymerase bzw. T7-RNA-Polymerase (beide: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet (Tab. 11). Hierbei synthetisieren die entsprechenden RNS-Polymerasen in Gegenwart von markierten Nukleotiden (hier: DIG-11-UTP) einzelsträngige RNS-Sonden (Ribosonden, "riboprobes").

Die Menge an PCR-Produkt, welches in die Sondensynthese eingesetzt wurde, lag durchschnittlich bei 100-200 ng/Ansatz.

**Tab. 11:** Ansatz für die Synthese von DIG-markierten RNS-Sonden

Reagenzien	Menge
100-200 ng PCR-Produkt	X µl
DIG RNA labeling mix	2 µl
Transkriptionspuffer	2 µl
Aqua bidest.-DEPC, bis zu einem Volumen von 18 µl auffüllen	X µl
RNA-Polymerase (T3 oder T7)	2 µl
Endvolumen	20 µl

1. Alle Reagenzien laut Tabelle 11 in ein steriles, RNase-freies 0,5 ml-Eppendorf-Hütchen pipettieren, gut mischen und kurz abzentrifugieren, dabei auf Eis arbeiten
2. 2 Stunden bei 37°C auf einem Wärmeblock inkubieren
3. 2 µl DNase I, RNase-frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zur Entfernung der Template-DNS zugeben
4. 15 Minuten bei 37°C inkubieren
5. Mit 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 (s. Anhang) die Reaktion stoppen
6. 2,5 µl 4 M LiCl (s. Anhang) und 75 µl vorgekühlten (-20°C) 98%igen Ethanol zugeben und gut mischen
7. Für mindestens 2 Stunden bei -20°C oder 30 Minuten bei -80°C zur RNS-Fällung inkubieren
8. Für 15 Minuten bei 13.000 x g bei 4°C zentrifugieren
9. Überstand vorsichtig abpipettieren oder zügig abkippen und Pellet mit 50 µl vorgekühltem (-20°C) 70%igem Ethanol waschen
10. Für 5 Minuten bei 13.000 x g bei 4°C zentrifugieren
11. Überstand verwerfen und Pellet kurz antrocknen lassen
12. Pellet in 100 µl Aqua bidest.-DEPC lösen
13. Zugabe von 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und aliquotieren der DIG-markierten RNS-Sonde

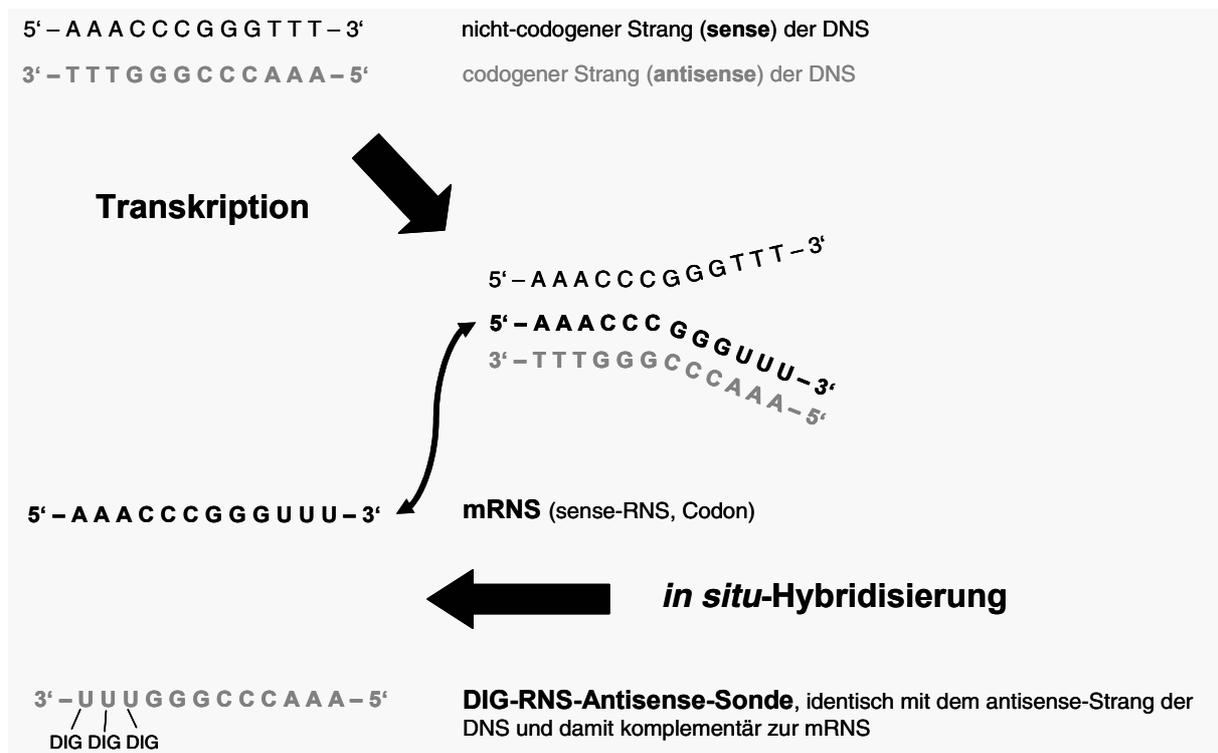
Die Sonde wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Anhand der Sequenzierungsergebnisse wurde die Orientierung der DIG-markierten RNS-Sonden bestimmt (Tab. 12).

**Tab. 12:** Orientierung der DIG-markierten RNS-Sonden

RNS-Sonde	Orientierung
CDV T3	“antisense“
CDV T7	“sense“
GAPDH T3	“sense“
GAPDH T7	“antisense“
MMP-9 T3	“sense“
MMP-9 T7	“antisense“
MMP-14 T3	“antisense“
MMP-14 T7	“sense“
TIMP-1 T3	“antisense“
TIMP-1 T7	“sense“

Gemäß Nomenklatur ist die **RNS-“antisense“-Sonde** diejenige Sonde, die komplementär zum nicht-codogenen (“sense“) Strang der DNS ist und damit in der ISH mit der mRNA hybridisiert, d.h. diese detektiert. Die “sense“-Sonde (komplementär zum codogenen [“antisense“] Strang der DNS) wird häufig als interne Negativ-Kontrolle verwendet (Abb. 6).

**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Bindung der DIG-RNS-“antisense“-Sonde

### 3.5.7 *in situ*-Hybridisierung (ISH)

Die Durchführung der ISH zum Nachweis der mRNA von MMP-9, MMP-14, TIMP-1, GAPDH und Staupevirus-Nukleoprotein erfolgte entsprechend den Protokollen nach GRABER et al. (1993) und GAEDKE et al. (1997).

Alle Puffer und Lösungen (s. Anhang) wurden vor Gebrauch autoklaviert oder im Versuch frisch angesetzt, die Glaswaren wurden sterilisiert und die Plastik- und Einmalartikel ebenfalls autoklaviert. Während aller Arbeiten wurden die unter 3.5.1 gemachten Vorschriften eingehalten, um ein sauberes, RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten.

#### 3.5.7.1 Durchführung der ISH

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation der Schnitte in Standküvetten mit bis zu 16 Objektträgern bei Raumtemperatur. Waren höhere Temperaturen erforderlich, so wurden die entsprechenden Lösungen in Standzylindern aliquotiert und im Wasserbad vorgewärmt und die Inkubation der Schnitte erfolgte dann in der Standküvette im Wasserbad. Die Hybridisierung der Schnitte erfolgte liegend in einer feuchten Kammer.

1. die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte in Roti<sup>®</sup>-Histol für 3 x 5 Minuten, danach in Isopropanol, 96%igem Alkohol und 70%igem Alkohol für jeweils 5 Minuten (liegende Küvette)
2. Waschen der Schnitte in Aqua bidest.-DEPC 1 x 5 Minuten und 1 x 1 Minute, danach 5 Minuten 1xPBS (s. Anhang; Standküvette)
3. Zum Aufschluß der Zellmembran Inkubation für 20 Minuten in 0,2 M HCl (s. Anhang) bei Raumtemperatur (RT)
4. Waschen in 2xSSC + 5 mM EDTA (s. Anhang) bei 50°C zweimal für 30 Minuten
5. Proteolytische Vorbehandlung mit 5 µg/ml Proteinase K für 15 Minuten bei 37°C (s. Anhang, die Lösung wurde jeweils im Versuch frisch angesetzt)
6. Abstoppen der Proteinase K durch Inkubation in 0,2%igem Glycin-PBS (s. Anhang) für 5 Minuten bei RT
7. Nachfixierung in 4%igem Paraformaldehyd (s. Anhang) für 4 Minuten bei RT
8. Waschen der Schnitte in 1xPBS zweimal für 1 Minute und in 1xPBS + 5 mM MgCl<sub>2</sub> (s. Anhang, frisch hergestellt) für 15 Minuten bei RT
9. Azetylierung der Schnitte in 0,25%igem Azetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin, pH 7,5 für 10 Minuten bei RT (s. Anhang, frisch hergestellt)

10. Waschen der Schnitte in 1xPBS, zweimal 1 Minute und einmal 15 Minuten
11. Prähybridisierung der Schnitte für mindestens 60 Minuten bei 52°C (s. Anhang, teilweise frisch hergestellt)
12. Hybridisierung der Sonde für 16 Stunden bei 52°C in einer mit A. bidest.-DEPC-befeuchteten Kammer. Hierbei wurde der Hybridisierungspuffer unter Verwendung einer tiefgefrorenen Stammlösung frisch hergestellt (s. Anhang). Die Schnitte wurden einzeln aus der Prähybridisierungslösung genommen und um das Gewebe herum mit sterilen, sauberen und faserfreien Tüchern sorgfältig abgetrocknet. Danach erfolgte das Auftragen der Hybridisierungslösung (20-30µl) auf den waagrecht liegenden Objektträger und das Abdecken der Hybridisierungslösung mit Gelbond<sup>®</sup> Film. Anschließend wurde der Gelbond<sup>®</sup> Film luftdicht mit Fixogum<sup>®</sup> abgedichtet. Die Objektträger wurden in die vorgewärmte feuchte Kammer verbracht. Die Konzentration der eingesetzten Sonde lag durchschnittlich bei 100 – 200 ng/ml Hybridisierungsmix. Jede Sonde wurde vor dem Auftragen 5 Minuten bei 96°C gekocht und kam danach sofort in ein Ethanol-Eis-Bad.
13. Posthybridisierungswaschungen (nach Abheben des Gelbond<sup>®</sup> Films inkl. Fixogum<sup>®</sup>) unter hochstringenten Bedingungen mit 6xSSC + 45%igem Formamid (s. Anhang, frisch hergestellt) zweimal für 15 Minuten bei 42°C und mit 2xSSC zweimal für 5 Minuten bei RT
14. RNase Behandlung für 30 Minuten bei 37°C (Lösung s. Anhang, frisch hergestellt) zum Verdau nicht gebundener RNS-Sonde und der Reduktion des Hintergrundes
15. Waschen der Schnitte unter steigend stringenten Bedingungen mit 2xSSC zweimal für 5 Minuten bei RT und mit 0,2xSSC zweimal für 15 Minuten bei 50°C
16. Waschen der Schnitte in Puffer 1 (s. Anhang) für eine Minute bei RT
17. Inkubation der Schnitte in Puffer 2 (Blocking-Lösung, s. Anhang, frisch hergestellt) für 30 Minuten bei RT
18. Entnahme der Objektträger aus den Standküvetten, sorgfältiges Abtrocknen um das Gewebe herum und Umrunden des Gewebes mit einem Pap-Pen<sup>®</sup>. Auftragen des Anti-DIG-Antikörpers (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:200 (s. Anhang, frisch hergestellt), 200-400 µl pro Objektträger und Inkubation der Schnitte für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei RT
19. Waschen der Schnitte in Puffer 1 (s. Anhang) zweimal für 15 Minuten bei RT und in Puffer 3 (s. Anhang) einmal für 2 Minuten

20. Inkubation der Schnitte in der Farblösung (NBT/X-Phosphat, s. Anhang, frisch angesetzt), abhängig von der hybridisierten Sonde bis zu 16 Stunden im Dunkeln bei RT
21. Abstoppen der Farbreaktion in Puffer 4 (s. Anhang) zweimal für 10 Minuten im Dunkeln bei RT, Wässern der Schnitte zweimal für 1-2 Minuten in Aqua bidest. und anschließend in Leitungswasser
22. Eindecken der Schnitte mit Glycergel<sup>®</sup> (DakoCytomation, Hamburg)

### 3.5.7.2 Kontrollen in der ISH

Als Positivkontrollen für die ISH wurden in jedem Versuch Staupevirus-infizierte DH82-Zellen und ein kanines kutanes Histiocytom (T 8520/99) mitgeführt, wobei die isolierte RNS aus den DH82-Zellen in der RT-PCR für alle untersuchten Sonden deutliche positive Banden erbrachten und die Histiocytom-RNS außer für die Staupevirus-mRNS mit den übrigen Primerpaaren in der RT-PCR ebenfalls deutlich positiv war.

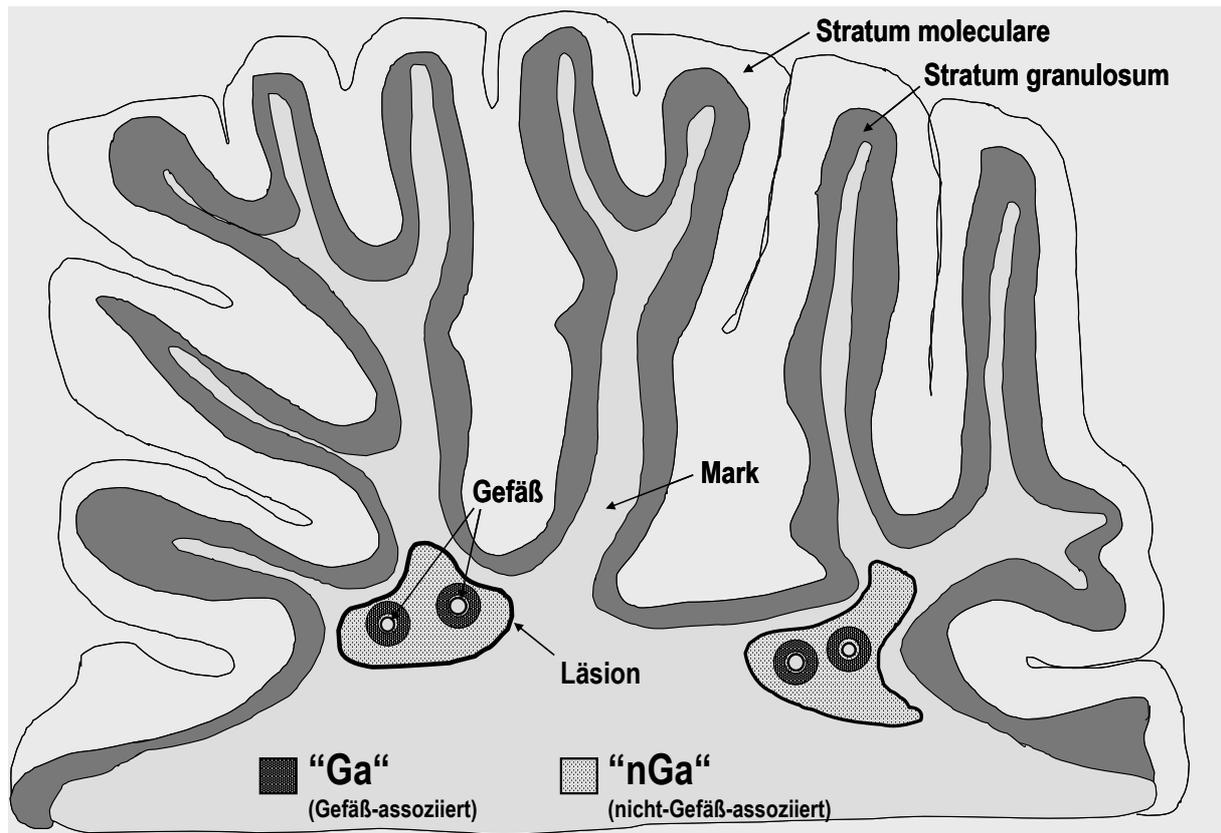
Zusätzlich wurde jeder nachfolgende Serienschnitt mit der entsprechenden "sense"-Sonde inkubiert und ein Serienschnitt eines jeden Tieres wurde nur mit Hybridisierungspuffer ohne Sonde inkubiert.

### 3.5.7.3 Auswertung der ISH

Die Auswertung der ISH-Schnitte erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops (IX 70, OLYMPUS Deutschland GmbH, Hamburg) mit zu Hilfenahme einer eingesetzten Netzmikrometerplatte (U-OCMSQ10/10, OLYMPUS Deutschland GmbH). Diese Netzmikrometerplatte begrenzt bei der Verwendung eines 10-fach Okulars (WH 10x-H/22) und des 40er-Objektivs ein Zählfeld von 0,0625 mm<sup>2</sup> (0,25 mm x 0,25 mm), welches aus 100 kleinen Kästchen (0,025 mm x 0,025 mm) besteht. Die Schnitte wurden mäanderförmig abgefahren und intraläsional jeder Herd komplett ausgezählt. Hierbei wurden die Werte für die **intraläsionalen** Parameter "Ga" (Gefäß-assoziert) bzw. "nGa" (nicht-Gefäß-assoziert) für die Sonden CDV, MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 getrennt aufgeführt und die erhaltenen Zahlen statistisch ausgewertet (Abb. 7).

Bei den Gehirnschnitten der Negativkontrollen (H-1 bis H-4) wurden exemplarisch in der weißen Substanz vier zufällig ausgewählte Lokalisationen mit jeweils 5 Zählfeldern, zehn zufällig ausgewählte Lokalisation im Str. moleculare mit jeweils 1 Zählfeld, vier zufällig ausgewählte Lokalisationen im Str. granulosum mit jeweils 1 Zählfeld sowie ein zufällig ausgewähltes Kerngebiet mit fünf Zählfeldern ausgezählt.

**Abb. 7:** Schematische Darstellung der intraläsionalen Parameter "Ga" und "nGa"



### 3.6 Doppelmarkierung

Für die gleichzeitige Darstellung spezifischer mRNS von CDV, MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 einerseits und Astrozyten bzw. Makrophagen andererseits wurde in einem ersten Schritt nach Standard-Protokoll (s.u.) eine *in situ*-Hybridisierung (ISH) zur Visualisierung der mRNS durchgeführt (NBT/X-Phosphat) und anschließend eine Immunhistologie zum Nachweis von Astrozyten bzw. Makrophagen. Nach der ISH wurden die Schritte nicht eingedeckt, sondern verblieben in 1xTBS und es wurde beginnend mit Schritt 2 die Immunhistologie fortgeführt. Im Unterschied zum Standard-Immunhistologie-Protokoll erfolgte die Umsetzung der Peroxidase nicht mit DAB, sondern mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, DakoCytomation GmbH), so dass statt des braunen Farbtönen ein rotes Signal für eine positive Immunhistologie-Reaktion zu erkennen war. Daraus folgte für eine positive Doppelmarkierung ein blau-roter Mischton. Anschließend erfolgte ein Eindecken der Schnitte mit Glycergel™ (DakoCytomation GmbH).

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse und der Ergebnisse in der *in situ*-Hybridisierung erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms "Statistical Analysis System" (SAS) für Windows, Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, USA, im Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Hierbei wurden die ermittelten Zahlen zuerst einer Untersuchung auf Normalverteilung unterzogen. Anschließend wurde als Globaltest zum Gruppenvergleich der Kruskal-Wallis-Test herangezogen und für den paarweisen Gruppenvergleich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) als nicht-parametrische Ein-Weg-Varianzanalyse angewandt, da die Daten nicht normalverteilt waren. Um etwaige Korrelationen zwischen den immunhistologischen Ergebnissen und denen der ISH darzustellen, wurde für ausgewählte Gruppen der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ) berechnet. Bei allen Berechnungen wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 ( $p < 0,05$ ) als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinik bei an Staupe erkrankten Hunden

Insgesamt standen 13 an Staupe erkrankte Hunde für diese Untersuchungen zur Verfügung, die im Rahmen der Routinediagnostik entweder im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen oder des Servicio de Patologia der Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica obduziert wurden (Tab. 2, Kap. 3.1).

Von diesen 13 untersuchten Hunden litten 2 Tiere (2154/99; 1734/00) nur an der katarrhalischen Form der Staupe in Form von eitriger Rhinitis und Konjunktivitis, Dyspnoe, Vomitus und Diarrhoe.

7 Tiere (121/80; 2965/88; 1443/99; 1107/00; 1780/00; 2050/01; N 27-94-1) zeigten zusätzlich zu den respiratorischen und gastrointestinalen Symptomen auch zentralnervöse Ausfälle in Form von unkoordinierten Bewegungen, Schwanken und mangelndem Stehvermögen (121/80; 2965/88; 1107/00), epileptiformen Anfällen bzw. Krampfanfällen (1443/99; 1780/00; 2050/01; N 27-94-1).

Bei 3 Tieren (1217/80; N 60-89-34; N 55-90-34) beschränkte sich die Klinik auf rein zentralnervöse Symptome, die sich in Apathie und tonisch-klonischen Krämpfen (1217/80), Bewegungsstörungen und Zittern (N 60-89-34) sowie Konvulsionen, Zittern und Opisthotonus (N 55-90-34) äußerte. Inwieweit diese Tiere im Vorfeld ebenfalls katarrhalische Anzeichen einer Staupeinfektion aufwiesen, konnte retrospektiv nicht mehr ermittelt werden. Zusätzlich zu den aufgeführten klinischen Symptomen konnte vereinzelt rezidivierendes Fieber (121/80; 2154/99) und bei einem Hund (1780/00) eine pustulöse Dermatitis am ventralen Abdomen mit brauner Schuppenbildung beobachtet werden. Bei einem Tier (N 20-01-3) konnten keine klinischen Befunde ermittelt werden.

5 Tiere waren vorberichtlich gegen Staupe geimpft (1443/99; 2154/99; 1780/00; N 55-90-34; N 20-01-3), wobei nichts über den Impfstoff bzw. das Impfschema bekannt ist. Bei den übrigen Hunden kann keine Aussage über den Impfstatus gemacht werden.

### 4.2 Klinik der Kontrollhunde

Alle 4 Kontrollhunde waren klinisch gesund, regelmäßig geimpft und entwurmt. Sie gehörten einer Kontrollgruppe für eine Toxizitäts-Studie an und wiesen nach Aussage des

Pharmaunternehmens keinerlei klinischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen auf.

### **4.3 Pathologische Befunde bei an Staupe erkrankten Hunden**

#### **4.3.1 Pathologisch-anatomische Befunde**

Bei der Sektion wiesen 5 Tiere (1443/99; 2154/99; 1734/00; 1780/00; 2050/01) eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie auf. Zwei dieser Tiere (2154/99; 1780/00) zeigten zusätzlich eine ausgeprägte Thymusatrophie. Die übrigen Hunde wiesen lediglich unterschiedlich stark ausgeprägt ein akutes diffuses alveoläres Ödem und Emphysem auf. Eine akute diffuse katarrhalische Enteritis fand sich bei 4 Tieren (121/80; 1443/99; 1107/00; 2050/01) und bei 2 Hunden (1217/80; 1734/00) war der Magen-Darm-Trakt futterleer. Geringgradig anämisch zeigten sich 3 Tiere (1217/80; 1443/99; 1780/00) und bei 2 Hunden (1107/00; 1734/00) wies die Milz eine pulpöse Hyperplasie auf. Ein Tier (1780/00) zeigte eine gering- bis mittelgradige Hyperkeratose des Nasenspiegels. Alle übrigen Organe waren, soweit makroskopisch beurteilbar, ohne besonderen Befund.

Von den Tieren aus Costa Rica (N 60-89-34; N 55-90-34; N 27-94-1; N 20-01-1) lagen keine makroskopischen Befunde vor.

#### **4.3.2 Pathologisch-histologische Befunde**

##### **4.3.2.1 Extra-zerebräre Organe**

Eine unterschiedlich stark ausgeprägte katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie fand sich bei 6 Tieren (1443/99; 2154/99; 1107/00; 1734/00; 1780/00; 2050/01), wobei ein Tier (2154/99) zusätzlich eine Desquamationspneumonie aufwies. Bei einem Tier (N 20-01-3) konnte eine mittelgradige interstitielle Pneumonie diagnostiziert werden und bei 4 Tieren (1734/00; 1780/00; 2050/01; N 20-01-3) fanden sich im Bronchialepithel gelegene eosinophile zytoplasmatische und intranukleäre Einschlusskörperchen.

Der Dünndarm des Tieres 1443/99 wies eine geringgradige multifokale Zottenatrophie mit Epithelverlust sowie zahlreiche intraluminale Kokzidien-Oozysten auf. Eine geringgradige Entzündungszellinfiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen in der Lamina mucosa fand sich bei dem Hund 2154/99. Eine mittelgradige folliculäre Depletion der Milz zeigte ein Tier (2154/99), während der Hund mit der Tagebuch-Nr. 1780/00 zahlreiche Einzelzellnekrosen in

der weißen Pulpa aufwies. Lediglich bei einem Tier (1734/00) waren sowohl im Nierenbeckenepithel als auch im Magenepithel einzelne intranukleäre und zytoplasmatische Einschlusskörperchen zu sehen. Die übrigen untersuchten Organe (Leber, Harnblase, Haut, Knochenmark, Magen, Tonsille, Lymphknoten) waren ohne besonderen Befund.

#### 4.3.2.2 Gehirn

Anhand von HE- und LFB-KV-gefärbten Schnitten wurden zwei Ebenen des Großhirns (L. parietalis, Hippocampus incl. Ammonshorn) sowie mehrere Lokalisationen im Kleinhirn histologisch untersucht und anhand der Veränderungen klassifiziert. Die in der Auswertung berücksichtigten Herdläsionen befanden sich mehrheitlich in der weißen Substanz des Kleinhirns (Kleinhirnlamellen und Marklager), sowie bei einem Tier nur in der grauen Substanz (1734/00) und bei einem weiteren Tier (1443/99) sowohl in der weißen, als auch in der grauen Substanz des Kleinhirns.

Die **Großhirne** zeigten außer einer geringgradigen nicht-eitrigen Meningitis bei einem Tier (1443/99) und einer mittelgradigen multifokalen chronischen Entmarkungsenzephalitis mit mittel- bis hochgradigen perivaskulären lymphohistiozytären Infiltraten, Gemistozyten und einer Astrogliose, wobei die Veränderungen teilweise auch in der grauen Substanz zu finden waren, bei einem weiteren Tier (N 20-01-3) keine lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen. Die LFB-KV-Färbung zeigte bei dem Tier mit der Tagebuch-Nr. N 20-01-3 eine deutlich geringere Anfärbbarkeit des Myelins.

Die pathologisch-histologischen Befunde am **Kleinhirn** der betroffenen Hunde gliederten sich wie folgt:

**Keine** pathologisch-histologischen Veränderungen im HE-Schnitt fanden sich bei einem Tier (1734/00) sowie in zahlreichen Arealen eines weiteren Tieres (1443/00). Diese Tiere zeigten jedoch sowohl in der Immunhistologie (IH) zum Nachweis von Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen, als auch in der *in situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von Staupevirus-mRNS in den identischen Lokalisationen ein mittleres bis starkes positives Signal, so dass diese als lichtmikroskopisch nicht sichtbare Herdläsionen (Gruppe II, LMNS) in diese Arbeit aufgenommen wurden (Gesamtzahl 10). Bei der LFB-KV-Färbung zeigte sich keine verminderte Anfärbbarkeit der Myelinscheiden.

**Akute** Herdläsionen (Gruppe **III**, Gesamtzahl 13), gekennzeichnet durch eine gering- bis mittelgradige Vakuolisierung der weißen Substanz mit geringgradiger Astrogliose, einzelnen Gemistozyten sowie teils prominenten eosinophilen intranukleären und zytoplasmatischen Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A in den Gliazellen fanden sich bei 4 Tieren (1443/99, 2154/99, 1780/00 und einzelne Bereiche von 1107/00) wobei die Läsionen vor allem subpial in der Tiefe der Kleinhirnfurchen und in den Marklamellen lagen (Abb. 19). Die LFB-KV-Färbung zeigte auch hier keine verminderte Anfärbbarkeit der Myelinscheiden im Bereich der weißen Substanz.

Bei 7 Tieren (121/80; 1217/80; 2965/88; 1107/00; 2050/01; N 55-90-34; N 60-89-34) lagen **subakute** Herdveränderungen **mit Entzündung** vor (Gruppe **IV**, Gesamtzahl 20). Diese waren charakterisiert durch eine mittel- bis hochgradige Vakuolisierung der weißen Substanz mit deutlicher Demyelinisierung, einer ausgeprägten Astrogliose, teilweise Malazien mit zahlreichen Gitterzellen und einer Makrophagenaktivierung. Zusätzlich fand sich eine gering- bis mittelgradige intra- und extraläsionale, teils diffus im Parenchym liegende, teils perivaskulär orientierte Infiltration mit lympho-, histio- und plasmazytären Entzündungszellen. Außerdem wiesen 5 Tiere (121/80; 1217/80; 2965/88; 1107/00; 2050/01), teils zahlreiche, intranukleäre und zytoplasmatische Einschlusskörperchen in Astrozyten auf (Abb. 20, 22). Bei allen Tieren fand sich in der LFB-KV-Färbung eine gering- bis überwiegend mittelgradige verminderte Anfärbbarkeit der weißen Substanz, wobei zwei Tiere (121/80, 1217/80-2) jeweils in zwei Herdveränderungen eine hochgradig verminderte Anfärbbarkeit der Myelinscheiden aufwiesen.

Eine mittel- bis hochgradige Demyelinisierung mit mittelgradiger Astrogliose und teils zahlreichen Gitterzellen, sowie mittel- bis hochgradiger intra- und extraläsionaler diffuser und perivaskulärer Infiltration mit Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen war charakteristisch für die **chronischen** Herdläsionen, die bei 4 Tieren (1217/80; N 20-01-3; N 27-94-1; N 60-89-34-1) vorlagen (Gruppe **V**, Gesamtzahl 20). Zu beobachten war in einigen Läsionen auch eine Malazie mit Abräumreaktion (Abb. 21, 23, 24). Die LFB-KV-Färbung wies bei allen Tieren eine mittel- bis hochgradige verminderte Anfärbbarkeit der Myelinscheiden in der weißen Substanz nach.

Das Auftreten verschiedener Läsionstypen nebeneinander im gleichen Schnitt konnte bei allen Tieren beobachtet werden. Die endgültige Diagnose für jedes Tier richtete sich daher nach der

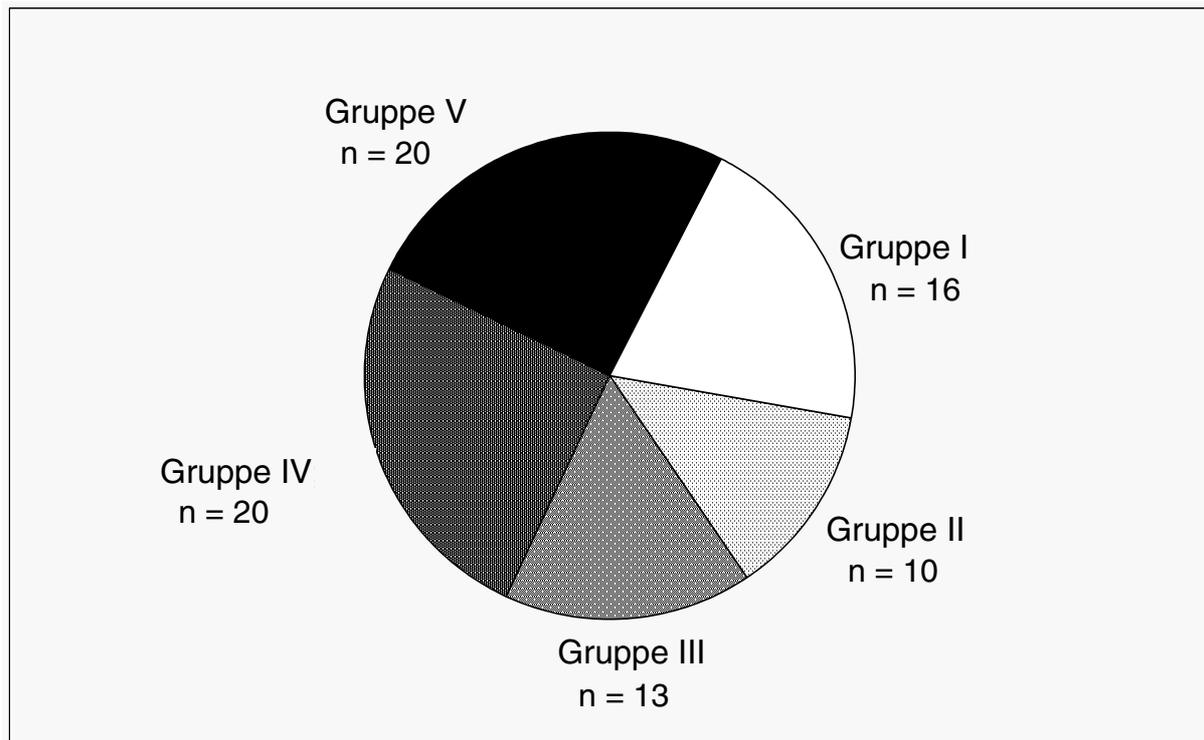
am weitesten fortgeschrittenen Läsion. Zusätzlich zu der neurohistopathologischen Gesamtdiagnose (Tab. 13) des Tieres wurde jede Herdläsion (Plaque) noch einmal einzeln klassifiziert.

**Tab. 13:** Neurohistopathologische Gesamtdiagnosen der an Staupe erkrankten Tiere

<b>Tagebuch-Nr.</b>	<b>Gesamtdiagnose</b>
1734/00	akute Polioenzephalitis
1443/99	akute Enzephalitis
2154/99	akute Enzephalitis
1780/00	akute Enzephalitis
2050/01	subakute demyelinisierende Enzephalitis mit Entzündung
2965/88	subakute demyelinisierende Enzephalitis mit Entzündung
1107/00	subakute demyelinisierende Enzephalitis mit Entzündung
121/80	subakute demyelinisierende Enzephalitis mit Entzündung
N 55-90-34	subakute demyelinisierende Enzephalitis mit Entzündung
1217/80	chronische demyelinisierende Enzephalitis
N 60-89-34	chronische demyelinisierende Enzephalitis
N 27-94-1	chronische demyelinisierende Enzephalitis
N 20-01-3	chronische demyelinisierende Enzephalitis

Hieraus ergab sich ein Einteilungsschema der Gruppen, welches der nachfolgenden immunhistologischen und ISH-Auswertung zugrunde gelegt wurde. Eine Ausnahme bildeten die Tiere, die lichtmikroskopisch keine Veränderungen zeigten. Bei diesen Tieren wurde die Lage der Läsionen anhand des immunhistologischen Ergebnisses ermittelt. Es ergaben sich insgesamt 79 Plaques, die ausgezählt wurden, wobei diese Zahl die 16 unveränderten Lokalisationen im Kleinhirn der Kontrolltiere beinhaltet (Abb. 8).

**Abb. 8:** Verteilung der Anzahl der Herdläsionen anhand der lichtmikroskopischen Einteilung



n = Anzahl

#### 4.4 Pathologische Befunde der Kontrollhunde

Alle 4 Kontrollhunde (Gruppe I) wiesen sowohl bei der pathologisch-anatomischen als auch der pathologisch-histologischen Untersuchung keine Veränderungen des Gehirns auf. Laut Auskunft des beteiligten Pharmaunternehmens zeigten auch die übrigen Organe keinerlei pathologische Veränderungen.

#### 4.5 Immunhistologische Ergebnisse

##### 4.5.1 Nachweis von Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen

In den **Kleinhirnen** der an Staupe erkrankten Tiere wurde Staupevirus-Antigen in zahlreichen Zellen vor allem der weißen, aber auch der grauen Substanz nachgewiesen. Es stellte sich als feingranuläres, teils grobscholliges, mittel- bis dunkelbraunes zytoplasmatisches Farbsignal dar. Teilweise waren auch in Verbindung mit Einschlusskörperchen intranukleäre Signale zu beobachten. Betroffen waren im Kleinhirn vor allem die Kleinhirnlamellen und das Marklager. Staupevirus-Antigen fand sich in fibrillären, langstrahligen Astrozyten im Kleinhirnmark, in protoplasmatischen, kurzstrahligen Astrozyten in der grauen Substanz des

Kleinhirns und in den so genannten Bergmann-Gliazellen, die als unipolare protoplasmatische Astrozyten im Bereich der Purkinje-Zellen angesiedelt sind, sowie deren Ausläufern. Weiterhin konnte ein brauner Farbniederschlag in Mikrogliazellen, Neuronen und ihren Fortsätzen, Ependymzellen, Plexusepithelzellen und Zellen der Leptomeninx gesehen werden.

In den Gehirnen mit **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und **akuten** Herden fand sich eine mittel- bis hochgradige diffuse Verteilung des braunen Präzipitats in nahezu allen Marklamellen mit einer deutlichen läsionalen Akzentuierung. Intraläsional waren vor allem fibrilläre Astrozyten mit ihren Ausläufern markiert, aber auch Mikrogliazellen und Endothelzellen. Hierbei war das Virus-Antigen überwiegend gleichmäßig innerhalb der Herde verteilt (Abb. 25).

Extraläsional fand sich neben einem deutlichen zellassozierten Farbniederschlag in der übrigen weißen Substanz ebenfalls ein gering- bis mittelgradiges Signal in den Zellen des Stratum granulosum und des Stratum moleculare, sowie einzelnen Purkinje-Zellen. Hierbei handelte es sich größtenteils um protoplasmatische Astrozyten, Bergmann-Glia, Neuronen sowie Ependym- und Plexus choroideus-Zellen. Es fiel auf, dass neben einer läsionalen Akzentuierung eine Konzentration des Staupevirus-Antigens vor allem die subpial, subventrikulär und subependymal gelegenen Zellen betraf.

Für die Tiere, die überwiegend **subakute** Herde **mit Entzündung** aufwiesen, war eine generelle Abnahme von Staupevirus-Antigen positiven Zellen zu beobachten. Hierbei war auffällig, dass sich vor allem extraläsional das positive Signal stark verringerte (1107/00) bis hin zum völligen Verschwinden (1217/80), so dass nur noch intraläsional ein mittelgradiger Farbniederschlag zu erkennen war. Die Mehrzahl der Staupevirus-positiven Zellen waren aktivierte Astrozyten sowie in geringerer Zahl Mikrogliazellen und Neuronen. In Arealen mit Entmarkung und Abräumreaktion enthielten zahlreiche Gitterzellen Staupevirus-positives Material, und die Gitterzellen wiesen zusätzlich ein stark zellmembranorientiertes braunes Signal auf (121/80; 1107/00) (Abb. 26). Auffällig war außerdem, dass zum Teil innerhalb der Läsionen die zentralen Bereichen weniger stark positiv erschienen und das Staupevirus-Antigen peripher orientiert lag. In Einzelfällen (121/80; N 55-90-34) waren im Zentrum einiger Plaques nur noch sehr wenige bis gar keine positiven Zellen mehr erkennbar, wohingegen die angrenzende graue Substanz (in der Regel das Stratum granulosum) ein starkes positives Signal aufwies (Abb. 50).

**Chronische** Herdläsionen zeichneten sich durch einen hochgradigen Schwund von Zellen aus, die Staupevirus-Protein enthielten (Abb. 27). Dies war gekennzeichnet durch sehr wenige, vereinzelt liegende positive Zellen bis hin zum völligen Verlust dieser Zellen innerhalb der Plaques, wobei die positiven Zellen eher peripher angeordnet waren. Lagen die chronischen Läsionen eher subependymal, subventrikulär oder subpial, so waren in den Randbereichen dieser Läsionen teilweise noch eine mittlere Anzahl positiver Zellen zu erkennen. Waren die chronischen Plaques in den Marklamellen anzutreffen, so war auffällig, dass teilweise die angrenzende graue Substanz (Stratum granulosum, Stratum moleculare, Purkinje-Zellen) in wenigen Zellen ein sehr starkes positives Signal aufwies. Die perivaskulär liegenden mononukleären Entzündungszellen waren negativ für Staupevirus-Protein.

In den Kleinhirnen aller **Kontrolltiere** konnte kein Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen nachgewiesen werden. Ebenso waren alle Kontrollschnitte der an Staupe erkrankten Tiere, die statt mit NP-2 Antikörper mit Aszitesflüssigkeit von Balb/cJ-Mäusen inkubiert wurden, negativ.

Bei der statistischen Auswertung mittels des Kruskal-Wallis Testes konnten bei einem Gruppenvergleich (Gruppe I (Kontrolle) vs. Gruppe II (lichtmikroskopisch nicht sichtbar, LMNS) vs. Gruppe III (akut, A) vs. Gruppe IV (subakut mit Entzündung, SAME) vs. Gruppe V (chronisch, CH) statistisch hochsignifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden ( $p < 0,0001$ ). Bei einem paarweisen Vergleich der Gruppen miteinander mittels einer nicht-parametrischen Einwegvarianzanalyse (Wilcoxon-Test) konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl positiver Zellen bezüglich der Expression des Staupevirus-Nukleoprotein-Antigens zwischen allen Gruppen, außer zwischen Gruppe II und III ermittelt werden (Abb. 9).

#### 4.5.2 Nachweis von GFAP-positiven Zellen

GFAP-positive Zellen fanden sich in allen **Kleinhirnen** von Staupevirus-infizierten Hunden in unterschiedlicher Gestalt und Anzahl. Diese waren gekennzeichnet durch einen mittel- bis dunkelbraunen, zellassozierten Farbniederschlag. Generell konnte zwischen fibrillären, langstrahligen im Kleinhirnmark gelegenen und protoplasmatischen, kurzstrahligen in der grauen Substanz gelegenen Astrozyten unterschieden werden. Zusätzlich zeigten die Bergmann-Gliazellen und die von ihnen ausgehenden radiär das Stratum moleculare

durchziehenden so genannten Bergmann-Fasern ein deutliches feingranuläres hellbraunes Präzipitat. Gemistozyten waren ebenfalls, abhängig von der Herdläsion, zahlreich vertreten.

In **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und **akuten** Herden konnte eine im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren generelle gering- bis mittelgradige verstärkte Expression von GFAP beobachtet werden (Abb. 28). Hierbei fiel auf, dass die Astrozyten in als lichtmikroskopisch nicht sichtbar klassifizierten Herden ein deutlich stärkeres individuelles zellassoziertes Signal aufwiesen als die Astrozyten im umgebenden unveränderten Gewebe. Von der Zellmorphologie her glichen sie Gemistozyten mit geschwollenem Zellkörper und verkürzten Fortsätzen. Eine ähnliche Beobachtung konnte in akuten Herden gemacht werden.

**Subakute** Läsionen **mit Entzündung** zeigten ein ähnliches Bild wie die oben beschriebenen Gehirne mit akuten Herden. Das heißt, es wurde eine über den gesamten Schnitt beobachtete gering- bis mittelgradige verstärkte Expression von GFAP gegenüber den Kontrolltieren festgestellt. Innerhalb der Läsionen variierte die Anzahl der Astrozyten von gering- bis mittelgradig vermindert bis hin zu gering- bis mittelgradig erhöht, wobei die überwiegende Zahl der intraläsional liegenden Astrozyten ebenfalls die Zellmorphologie von Gemistozyten besaßen (Abb. 29, 30). Weiterhin auffällig war in einzelnen Plaques eine Konzentration der Astrozyten zur Peripherie der Veränderung hin.

**Chronische** Herdveränderungen wiesen im Vergleich zu dem nicht betroffenen Gewebe in der Umgebung einen fast vollständigen Verlust von Astrozyten auf; lediglich im Randbereich der Läsionen, aber eher extraläsional gelegen, fanden sich saumartig angeordnet mäßig viele aktivierte Astrozyten.

Die **Kontrolltiere** wiesen alle ein gleichmäßiges diffuses Verteilungsmuster weniger stark, jedoch deutlich markierter fibrillärer Astrozyten in der weißen Substanz auf. Sowohl die Anzahl als auch die Farbintensität positiver Astrozyten in der grauen Substanz hingegen, vornehmlich im Stratum granulosum, war deutlich geringer im Vergleich zu den staupekranken Tieren. Ebenso waren die radiär verlaufenden Astrozytenausläufer im Stratum moleculare nur schwach markiert, wobei das Signal zur Membrana limitans gliae superficialis hin zunahm.

Bei der statistischen Auswertung konnten mittels Kruskal-Wallis-Test ebenfalls hoch signifikante Unterschiede bezüglich der GFAP-Expression zwischen den Gruppen gefunden werden ( $p < 0,0001$ ). Der paarweise Gruppenvergleich (Wilcoxon-Test) erbrachte signifikante Gruppenunterschiede, wobei die Anzahl positiver Zellen von Gruppe II und III gegenüber den Kontrollen (I), Gruppe IV und V signifikant erhöht war, sowie von Gruppe IV gegenüber Gruppe V (Abb. 9).

#### 4.5.3 Nachweis von BS-1 positiven Zellen

Das positive Signal des Lektins *Bandeiraea simplicifolia* (BS-1) für Makrophagen/Mikroglia zeichnete sich in den **Kleinhirnen** staupeerkrankter Tiere durch ein streng zytoplasmatisches, hell- bis meist dunkelbraunes, mittel- bis grobscholliges Präzipitat aus, das dem Zytoplasma ein fein- bis grobblasiges Erscheinungsbild gab. Die Zellen waren meist relativ groß mit mittelgroßem, blass erscheinendem Zellkern.

In allen Kleinhirnen staupekrankter Hunde war das endotheliale Signal in den meningealen Gefäßen sowie in den Kapillaren der grauen und weißen Substanz mittelgradig stärker, d.h. dunkelbrauner als in den Kontrollgehirnen gesunder Hunde. Außerdem konnte in allen Gehirnen eine plaqueassoziierte, jedoch herabhängig unterschiedliche, deutlich verstärkte Expression BS-1 positiver Mikroglia/Makrophagen gegenüber den Kontrolltieren gesehen werden. Extraläsional entsprach, bis auf das stärkere Signal endothelialer Zellen, das Verteilungs- und Expressionsmuster der staupekranken Tiere demjenigen der Kontrolltiere.

So konnte schon beginnend bei den **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** Läsionen eine deutliche diffuse intraläsionale Zunahme dieser Zellen gegenüber den gesunden Kontrolltieren beobachtet werden, die sich durch einen mittel- bis dunkelbraunen, scholligen, zytoplasmatischen Farbniederschlag darstellten und den Zellen ein fein- bis grobblasiges Erscheinungsbild verliehen.

Die **akuten** Herdveränderungen wiesen eine noch deutlichere läsional orientierte Zunahme positiver Zellen auf, wobei auffiel, dass intravaskulär in diesen Bereichen ebenfalls mehr positive überwiegend mononukleäre Zellen zu beobachten waren (Abb. 31).

Die **subakuten Herde mit Entzündung** zeigten, ähnlich den akuten Herdveränderungen, eine mittel- bis teilweise hochgradige intraläsionale Zunahme diffus verteilter positiver Zellen. Intraläsional gelegene Gitterzellen wiesen ebenfalls ein sehr starkes grobscholliges braunes Präzipitat auf. Weiterhin erkennbar war ein deutliches Signal einer mittleren Anzahl von Zellen in perivaskulären mononukleären Infiltraten, die vor allem im Bereich der Läsionen gelegen waren (Abb. 32).

Das Erscheinungsbild bei **chronischen** Herden glich sehr stark dem bei subakuten Herden mit Entzündung (Abb. 33). Allein die Lage der positiven Zellen variierte in einigen Herden. So konnte bei einem Teil der Plaques eine Verschiebung der Mehrzahl der positiven Zellen zum Rand der Läsion hin beobachtet werden und eine Abnahme der zentral intraläsional gelegenen Zellen bis hin zu einem fast völligen Schwund (Abb. 34). Auch hier war eine mittlere Anzahl perivaskulärer Infiltratzellen deutlich positiv. Ebenfalls mittelgradig positiv für BS-1 waren, soweit vorhanden, zahlreiche meningeale mononukleäre Infiltratzellen.

Die Kleinhirne der **Kontrolltiere** zeigten nur ganz vereinzelt in der grauen und weißen Substanz, vor allem in der Nähe von Kapillaren liegende, hellbraun markierte Zellen, die sich häufig durch ein großblasiges Zytoplasma auszeichneten. Weiterhin fand sich ein schwaches, positives Signal in den Endothelzellen meningealer Gefäße und den Kapillaren von grauer und weißer Substanz. Auch innerhalb der Gefäße waren vereinzelt relativ große Zellen mit reichlich Zytoplasma positiv.

Bei der statistischen Auswertung konnte mittels des Kruskal-Wallis-Tests zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der Anzahl BS-1 positiver Zellen ein signifikanter Unterschied gesehen werden ( $p < 0,0001$ ), der sich auch im Wilcoxon-Test widerspiegelte. Die Anzahl positiver Zellen war in allen Gruppen staupekrankter Tiere (II-V) gegenüber der Anzahl positiver Zellen bei den Kontrolltieren (I) statistisch signifikant erhöht (Abb. 9).

#### 4.5.4 Nachweis von CD44-positiven Zellen

CD44-positive Zellen ließen sich in unterschiedlichem Ausmaß in allen Staupelesionen nachweisen. Abhängig von der Chronizität der Plaques konnte, im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren, beginnend bei den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Herden über die akuten Läsionen bis hin zu den subakuten Plaques mit Entzündung eine kontinuierlich steigende,

verstärkte Expression des CD44-Rezeptors beobachtet werden. Die chronischen Läsionen wiesen ein geringeres Signal als die akuten und die subakuten Staupeläsionen mit Entzündung auf. Das spezifische Signal bestand aus einem mittel- bis dunkelbraunen, teils feingranulären Präzipitat, welches primär zellmembranständig lokalisiert war. Hieraus ergab sich an Stellen mit positiven Zellen zum Teil ein feingeästeltes bis netzartiges Erscheinungsbild, abhängig davon, welche Zellpopulation das Signal exprimierte.

Die positiven Zellen waren von der Zellmorphologie her primär unterschiedliche Populationen von Astrozyten, wobei fibrilläre Astrozyten in der weißen Substanz in der Mehrzahl waren. Einzelne bis zahlreiche protoplasmatische Astrozyten im Stratum granulosum waren aber ebenso positiv wie vereinzelt Bergmann-Gliazellen und die dazugehörigen Bergmann-Fasern. In Bereichen mit Gitterzellen konnte ebenfalls ein sehr deutliches zellmembranständiges Signal beobachtet werden. Ebenso war, sowohl intra- als auch extraläsional, eine vaskulär akzentuierte verstärkte Expression des CD44-Rezeptors zu erkennen. Dies war dadurch gekennzeichnet, dass in Einzelfällen endotheliale Zellen ein positives Signal trugen, in der Mehrzahl der Fälle jedoch perivaskulär im Bereich der Membrana limitans gliae perivascularis ein mittel- bis dunkelbraunes Farbsignal die Gefäße säumte. Bei den chronischen Läsionen fand sich zusätzlich noch in einigen perivaskulären mononukleären Infiltratzellen ein positives Signal. Ebenso zeichneten sich vereinzelt sowohl mononukleäre, als auch polymorphkernige intravaskulär gelegene Leukozyten durch ein deutliches zellmembranständiges positives Signal aus. Außerdem konnte bei allen Tieren, unabhängig von der Art der Staupeläsion, eine verstärkte Expression des CD44-Rezeptors subpial, subventrikulär und subependymal gesehen werden. In den einzelnen Herden stellte sich das positive Signal folgendermaßen dar:

Die **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** Läsionen zeigten eine gering- bis mittelgradige intraläsional akzentuierte Aufregulierung des CD44-Rezeptors gegenüber den gesunden Kontrolltieren, wobei die Mehrzahl der Zellen morphologisch Astrozyten zuzuordnen waren. Extraläsional konnte hier keine verstärkte Expression beobachtet werden.

Bei **akuten** Herden war die intraläsionale Expression noch weiter verstärkt und die Zellpopulation entsprach ebenfalls morphologisch Astrozyten. Auch bei Gemistozyten fand sich ein deutliches zellmembranständiges positives Signal.

**Subakute Plaques mit Entzündung** zeigten eine mittel- bis teilweise hochgradige Expression des CD44-Rezeptors, abhängig von der Zahl der intraläsional vorhandenen Zellen. Läsionen mit zahlreichen Gitterzellen zeigten ein sehr starkes Signal, welches dem Plaque ein netzartiges Aussehen verlieh (Abb. 35). War die Demyelinisierung schon weiter fortgeschritten und fanden sich dementsprechend weniger intraläsionale Gliazellen, so war das positive zellassozierte Signal eher in der Peripherie der Läsion zu erkennen. Außerdem konnte in einigen Gehirnen mit subakuten Plaques mit Entzündung auch im nicht betroffenen Gewebe eine vaskulär orientierte verstärkte Expression beobachtet werden (Abb. 36).

Die eben beschriebene Verlagerung des positiven Signals aus dem Zentrum der Läsion in Richtung Peripherie nahm bei den **chronischen** Herden noch zu, so dass in einigen chronischen Herden bis auf einige kommaförmige positive Signale, die keiner histologischen Struktur eindeutig zuzuordnen waren, das Zentrum des Plaques nur noch ein geringgradiges positives Signal enthielt. Bei den kommaförmigen Strukturen könnte es sich um Residuen von Astrozytenfortsätzen handeln. Auffällig bei den chronischen Herden war, wie bereits oben erwähnt, dass zusätzlich etliche mononukleäre perivaskuläre Infiltratzellen ein zellmembranständiges positives Signal aufwiesen (Abb. 37).

Die Kleinhirne der gesunden **Kontrolltiere** zeigten eine geringgradige diffuse feingranuläre hellbraune Färbung, die sich auf die weiße Substanz beschränkte, hierbei war das Signal keiner bestimmten anatomischen Struktur zuzuordnen. Lediglich subpial, subventrikulär und subependymal war das Signal geringgradig verstärkt.

Ependymale Zellen und Plexusepithelzellen zeigten in allen Kleinhirnen bei allen Tieren kein positives Signal.

Bei der statistischen Auswertung konnten auch hier mittels Kruskal-Wallis Test zwischen den Gruppen bezüglich der Expression des CD44-Rezeptors statistisch signifikante Unterschiede ermittelt werden ( $p < 0,0001$ ). Die nicht-parametrische Ein-Weg-Varianzanalyse erbrachte statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen außer der Kontrollgruppe (I) im Vergleich mit Gruppe II sowie von Gruppe III, IV und V untereinander. So war die Anzahl positiver Zellen von Gruppe III, IV und V gegenüber den Kontrolltieren (I) sowie Gruppe II statistisch signifikant erhöht (Abb. 9).

#### 4.5.5 Nachweis von MHC Klasse II-positiven Zellen

MHC Klasse II-Antigen-positive Zellen zeichneten sich durch einen hell- bis mittelbraunen feingranulären, teils scholligen, in zahlreichen Fällen zellmembranständigen Farbniederschlag aus. Die Mehrzahl der markierten Zellen waren Makrophagen/Mikrogliazellen, sowie Endothelzellen und Perizyten. Hierbei war bei allen untersuchten Kleinhirnen die Expression des MHC II-Rezeptors in der weißen Substanz stärker ausgeprägt als in der grauen Substanz. Die Zuordnung zu einer bestimmten Zellpopulation innerhalb der grauen Substanz, vor allem im Stratum granulosum und moleculare war häufig nicht möglich. Anhand der Zellmorphologie kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass neben Makrophagen/Mikrogliazellen auch einzelne Astrozyten, Korb- bzw. Sternzellen positiv markiert waren. Zusätzlich trugen einzelne Plexus choroideus-Zellen, sowie meningeale Zellen ein braunes Farbsignal.

Bei den Kleinhirnen mit **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** Läsionen und mehr noch bei den **akuten** Herden war, im Vergleich zu den Kontrolltieren, eine mittel- bis teilweise hochgradige intraläsionale Aufregulierung des MHC II-Antigens zu beobachten. Bei den Zellen handelte es sich vornehmlich um Makrophagen/Mikroglia sowie Endothelzellen und Perizyten (Abb.38). Auffällig war in diesen Kleinhirnen jedoch, dass auch im extraläsionalen Gewebe zahlreiche multifokal verteilte Areale lagen, die eine verstärkte Expression des Rezeptors aufwiesen und in Korrelation zum immunhistologischen Nachweis von Staupevirus-Protein standen. Außerdem war ein deutliches meningeales Signal zu sehen.

Die **subakuten** Plaques **mit Entzündung** zeigten ebenfalls eine mittel- bis teilweise hochgradige Aufregulierung des MHC II-Antigens. Vor allem die Gitterzellen wiesen ein sehr starkes, teilweise zellmembranakzentuiertes Signal auf (Abb. 39). Hier war auffällig, dass im nicht betroffenen Gewebe, ebenfalls in Korrelation zu der geringer werdenden Staupevirus-Protein-Expression, das MHC II-Signal weniger stark ausgeprägt war als in Gehirnen mit überwiegend lichtmikroskopisch nicht sichtbaren und akuten Läsionen. An den Endothelzellen/Perizyten konnte jedoch intra- und extraläsional ein in etwa gleich starkes Signal im Vergleich zu den Gehirnen mit den jüngeren Herdveränderungen gesehen werden.

Die **chronischen** Läsionen wiesen von allen Gruppen die geringste Aufregulierung der MHC II-Expression auf. Das Signal beschränkte sich intraläsional auf einzelne Gitterzellen, Makrophagen/Mikroglia und perivaskulär lokalisierte mononukleäre Entzündungszellen.

Einzelne Herde mit zahlreichen Gitterzellen waren jedoch sehr stark positiv für den MHC II-Antikörper (Abb. 40). Auch hier konnte ein deutliches vaskulär orientiertes Signal (Endothelzellen/Perizyten) beobachtet werden, ebenso wie im Bereich der Leptomeninx.

Die Kleinhirne der **Kontrolltiere** wiesen nur sehr vereinzelt positive Makrophagen/Mikroglia in der weißen Substanz auf und einzelne positive Endothelzellen/Perizyten in der grauen und weißen Substanz.

Bei der statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test konnten ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der Expression des MHC II-Rezeptors gesehen werden ( $p < 0,0001$ ), wobei es sich um eine statistisch signifikante Erhöhung der positiv markierten Zellen aller Gruppen erkrankter Tiere (II-V) gegenüber den Kontrolltieren (I) handelte (Abb. 9).

#### 4.5.6 Nachweis von MBP-positiven Zellen

Die Kleinhirne der **Kontrolltiere** zeigten eine homogene hell- bis mittelbraune Farbe im Bereich der weißen Substanz mit zahlreichen feinen Ausläufern, die das Stratum granulosum durchzogen. Das Stratum moleculare sowie die Neuronen waren negativ für MBP.

Die Kleinhirne mit **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** Läsionen sowie mit **akuten** Läsionen zeigten keine Abweichungen von den Kontrolltieren, d.h. auch hier fand sich eine homogene Braunfärbung des Kleinhirnmarkes einschließlich aller Herdveränderungen. Hinweise auf weniger starke Anfärbbarkeit lagen nicht vor.

Im Bereich der **subakuten** Plaques **mit Entzündung** konnte bereits eine geringere Anfärbbarkeit beobachtet werden, die sich auf die **chronischen** Herdläsionen fortsetzte (Abb. 41). Hier war intraläsional eine zum Teil deutlich verringerte Anfärbbarkeit der weißen Substanz zu erkennen.

Bei der statistischen Auswertung konnten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) bezüglich der Expression des MBP zwischen den Gruppen gefunden werden, wobei es sich um eine statistisch signifikante Verringerung der Anzahl positiver Zellen bei den Gruppen IV und V gegenüber den Kontrollen (I), sowie Gruppe II und III handelte (Abb. 9).

#### 4.5.7 Nachweis von CD3ε-positiven Zellen

Der Nachweis des CD3ε-Komplexes, als gemeinsames Epitop aller reifen T-Zellen, gelang in unterschiedlichem Ausmaß in allen untersuchten Kleinhirnen der staupekranken Tiere. Das Signal stellte sich als mittel- bis dunkelbraunes, eher homogenes, rein zytoplasmatisches Präzipitat dar.

In den Kleinhirnen, die in überwiegender Anzahl **lichtmikroskopisch nicht sichtbare** und/oder **akute** Läsionen beinhalteten, konnten intra- und extraläsional diffus verteilt nur ganz vereinzelt CD3ε-positive Zellen beobachtet werden.

In **subakuten** Läsionen **mit Entzündung** fand sich eine gering- bis mittelgradige Anzahl intraläsional diffus verteilter positiver Zellen. In Bereichen, die eine 1-2-lagige perivaskuläre mononukleäre Infiltration von Entzündungszellen aufwiesen, waren ebenfalls zahlreiche perivaskuläre Zellen CD3ε positiv. Sowohl Gehirne mit einer bereits lichtmikroskopisch sichtbaren Leptomeningitis, als auch Tiere ohne augenscheinliche entzündliche Infiltration im Bereich der Leptomeninx wiesen hier eine mittlere Anzahl positiver Zellen auf.

Der deutlichste Nachweis CD3ε-positiver Zellen gelang bei **chronischen** Staupelesionen. Sowohl intraläsional, als auch in geringerem Ausmaß extraläsional, fand sich eine mittel- bis hochgradige diffus verteilte und perivaskulär liegende Infiltration dieser positiven Zellen (Abb. 42). Die Mehrzahl der perivaskulären Infiltratzellen waren CD3ε positiv, ebenso wie die Infiltratzellen in der Leptomeninx. Der extraläsionale Nachweis der positiven Zellen betraf vor allem die weiße Substanz, es konnten jedoch auch einige Gebiete innerhalb der grauen Substanz und hier vor allem im Stratum granulosum gesehen werden.

Die Kleinhirne der gesunden **Kontrolltiere** wiesen lediglich in der weißen Substanz ganz vereinzelt liegende positive Zellen auf.

Bei der statistischen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) bezüglich der Expression des CD3ε-Epitops zwischen den Gruppen IV und V im Vergleich zu den Gruppen I, II und III im Sinne einer statistisch signifikanten Erhöhung der Anzahl positiver Zellen. Zusätzlich war die Anzahl positiver Zellen von Gruppe V gegenüber Gruppe IV statistisch signifikant erhöht (Abb. 9).

#### 4.5.8 Nachweis von CD79 $\alpha$ -positiven Zellen

Der Antikörper, welcher gegen das intrazytoplasmatische Epitop von CD79 $\alpha$  gerichtet ist, ergab in der immunhistologischen Untersuchung ein hell- bis mittelbraunes zytoplasmatisch gelegenes Präzipitat in Zellen, die primär in der weißen Substanz lokalisiert waren. Als Positivkontrolle wurde Milzgewebe eines Hundes mitgeführt.

Die Kleinhirne von Hunden mit überwiegend **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und/oder **akuten** Herden zeigten keinen Unterschied im Verteilungsmuster von intra- und extraläsional gelegenen positiven Zellen. Es fanden sich, ähnlich zu den Kontrolltieren, nur ganz vereinzelt diffus in der weißen Substanz verteilte positive Zellen.

Bei Tieren mit **subakuten** Läsionen **mit Entzündung** konnte intraläsional teilweise eine geringgradig verstärkte diffuse Infiltration CD79 $\alpha$ -positiver Zellen beobachtet werden.

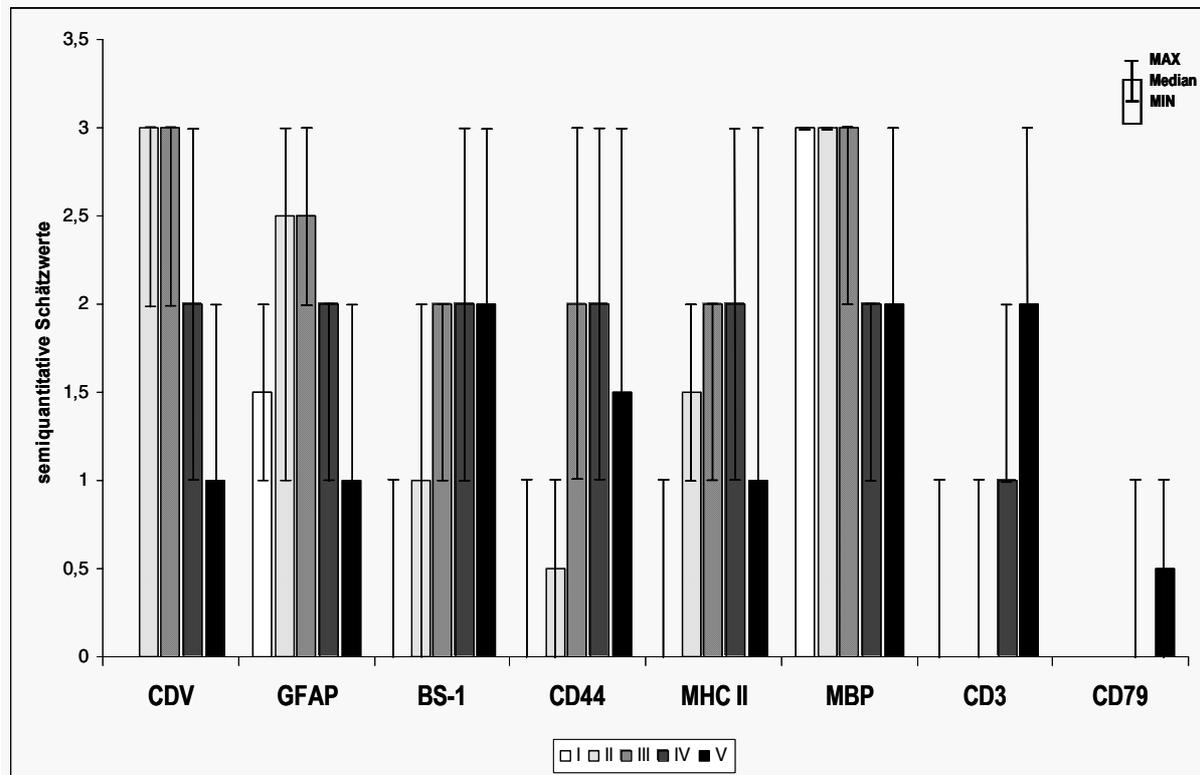
In den **chronischen** Plaques war teilweise die diffuse und perivaskuläre Infiltration mit positiven Zellen, im Vergleich zu den subakuten Herden mit Entzündung, noch einmal geringgradig erhöht (Abb. 43). Das extraläsionale Gewebe war nicht betroffen.

Insgesamt betrachtet konnte bei den Staupevirus-infizierten Tieren, kontinuierlich ansteigend zu den chronischen Läsionen, lediglich eine geringgradige intraläsionale Infiltration mit CD79 $\alpha$ -positiven B-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Die Kleinhirne der **Kontrolltiere** zeigten lediglich ganz vereinzelt in der weißen Substanz liegende positive Zellen.

In der statistischen Auswertung waren bezüglich der Expression des CD79 $\alpha$ -Epitops die Gruppenunterschiede signifikant ( $p < 0,0004$ ), d.h. es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl positiver Zellen in den Gruppen IV und V gegenüber den Gruppen I, II und III (Abb. 9).

**Abb. 9:** Darstellung der Medianwerte, Minimum und Maximum der immunhistologisch untersuchten Antigene zwischen den einzelnen Gruppen anhand semiquantitativer Schätzwerte



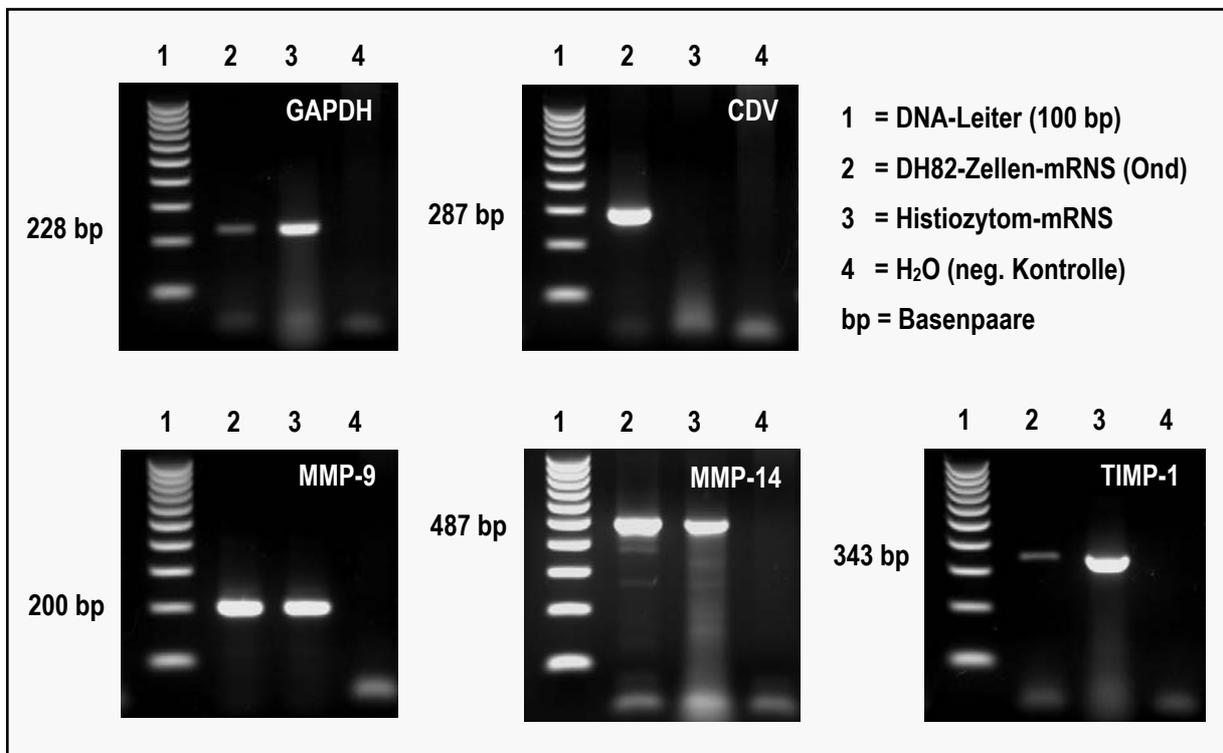
BS-1 = *Bandeiraea simplicifolia*-1; CD44 = "cluster of differentiation" 44; CDV = "canine distemper virus"; GFAP = saures Gliafaserprotein; Max = Maximum; MBP = "myelin basic protein"; MHC II = "major histocompatibility complex" II; Min = Minimum; 0 = keine positiven Zellen; 1 = geringgradige Anzahl positiver Zellen; 2 = mittelgradige Anzahl positiver Zellen; 3 = hochgradige Anzahl positiver Zellen; I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen

## 4.6 Molekularbiologische Ergebnisse

### 4.6.1 RT-PCR und Klonierungsreaktion

Die spezifischen, in der RT-PCR erhaltenen Amplifikate (Abb. 10), wurden gemäß Protokoll (s. 3.5.4) in die Klonierungsreaktion eingesetzt. Um die PCR- und Klonierungsergebnisse zu überprüfen, wurden alle daraus resultierenden Plasmide in definierter Menge an die MWG Biotech AG, Ebersberg zur Sequenzierung geschickt. Die Ergebnisse dieser Sequenzierungen wurden mit Hilfe der GenBank<sup>®</sup> mit bekannten kaninen Sequenzen verglichen und die Homologien ermittelt. Aus diesen Sequenzvergleichen ergaben sich folgende Homologien: Das **CDV** PCR-Produkt bzw. Plasmid wies eine Homologie von 99% mit bereits veröffentlichten Sequenzen (AF305419; AF014953) auf. **GAPDH** zeigte eine Homologie von 95% mit bereits veröffentlichten kaninen Sequenzen (AB038240; AF091136; AF327898; U31247). **MMP-9** zeigte eine Homologie von 98% (AF169244; U89842; AB006421), **MMP-14** von 99% (AF097638) und **TIMP-1** von 100% (AB016817) im Vergleich mit bereits veröffentlichten kaninen Sequenzen. Die Accession-Nummern der bei der GenBank<sup>®</sup> zur Veröffentlichung hinterlegten eigenen Sequenzen finden sich in Tabelle 14.

**Abb. 10:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im 2%igen Agarose-Gel



**Tab. 14:** Eigene bei der GenBank® zur Veröffentlichung eingereichte Sequenzen der PCR-Produkte mit ihren Accession-Nummern

PCR-Produkt	Accession-Nummer (GenBank®)
CDV	AY684629
GAPDH	AY684628
MMP-9	AY534614
MMP-14	AY534615
TIMP-1	AY534616

#### 4.6.2 *in situ*-Hybridisierung

Das positive Hybridisierungssignal des Nitrobluetetrazolium/5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (NBT/BCIP bzw. X-Phosphat) – Detektionssystems in der *in situ*-Hybridisierung (ISH) war dunkelblau und konnte bei Verwendung der jeweiligen zur Detektion der mRNA spezifischen DIG-markierten RNS-Sonden (**“antisense“-Sonde**) in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe, in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde in unterschiedlicher Intensität und Verteilung sowohl in den Positivkontrollen (CDV-infizierte DH82-Zellen bzw. Histiocytom) als auch im Kleinhirn staupevirusinfizierter Hunde gefunden werden.

Die jeweils auf dem folgenden numerischen Serienschnitt als interne Negativkontrolle mitgeführte spezifische “sense“-Sonde erbrachte, ebenfalls in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde, entweder kein Signal oder ein im Vergleich zur “antisense“-Sonde deutlich reduziertes Signal. Bei der Applikation des reinen Hybridisierungspuffers während der ISH als weitere Negativkontrolle fand sich keinerlei spezifisches oder unspezifisches Signal.

##### 4.6.2.1 Nachweis der GAPDH-mRNS

Die Kleinhirne der vier **Kontrolltiere** zeigten nach Inkubation mit der **“antisense“-Sonde** ein sehr deutliches neuronal akzentuiertes Signal (Abb. 44, 45). Vor allem große Neuronen in Kerngebieten im Markbereich, sowie Purkinje-Zellen wiesen ein zytoplasmatisches Signal unter Aussparung des Zellkerns auf. Des Weiteren zeigten sich mäßig viele Zellen im Stratum moleculare, die ebenfalls positiv markiert waren. Hierbei handelte es sich anhand der

Zellmorphologie am ehesten um Korb- und Sternzellen. Im Stratum granulosum fanden sich vereinzelt protoplasmatische Astrozyten sowie Bergmann-Gliazellen, die ebenfalls ein positives Signal trugen. Der Bereich der Kleinhirnlamellen, Plexus choroideus- bzw. Ependymzellen, meningeale Zellen sowie Gefäßendothelien zeigten bis auf ganz vereinzelte positive Zellen kein positives Signal. Die als weitere Positivkontrollen eingesetzten Schnitte der Staupevirus-infizierten DH82-Zellen sowie des kaninen kutanen Histiozytoms zeigten ebenfalls nach Hybridisierung mit der "antisense"-Sonde ein deutliches, zytoplasmatisch lokalisiertes typisches Signal. Die Hybridisierung mit der "**sense**"-Sonde erbrachte bei allen Kontrolltieren bzw. -gewebe kein Signal (Abb. 44a, 45a).

Die Kleinhirne der **Staupevirus-infizierten** Hunde zeigten nach der Hybridisierung mit der "**antisense**"-Sonde ein weitgehend identisches Anfärbe- und Verteilungsmuster wie das der Kontrolltiere. Zusätzlich zeigte sich in Abhängigkeit vom Plaquetyp teilweise ebenfalls eine intraläsionale Anfärbbarkeit bei denjenigen Herdveränderungen, die eine erhöhte intraläsionale Zellzahl aufwiesen, wie subakute Läsionen mit Entzündung und chronische Plaques. Nach der Inkubation mit der "**sense**"-Sonde zeigten einzelne Kleinhirne staupekranker Hunde ein geringes zellulär orientiertes, zytoplasmatisches Signal, welches vom Verteilungsmuster identisch war mit demjenigen der "antisense"-Sonde.

#### 4.6.2.2 Nachweis der Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS

Die Staupevirus-infizierten DH82-Zellen zeigten sowohl bei Hybridisierung mit der "**antisense**"- als auch mit der "**sense**"-Sonde deutliche zellassozierte, zytoplasmatische Reaktionen. Das Signal der "antisense"-Sonde zum Nachweis der viralen mRNS und zu einem geringeren Anteil der (positiv-orientierten) antigenomischen ssRNS war jedoch um ein vielfaches stärker als das der "sense"-Sonde, welche nur mit der (negativ-orientierten) genomischen ssRNS hybridisierte.

Dieses Ergebnis konnte auch in Vorversuchen an Staupevirus-infizierten Kleinhirnen bestätigt werden, wobei ersichtlich wurde, dass nicht nur die Farbintensität, sondern auch die Sensitivität der "sense"-Sonde erheblich unter der der "antisense"-Sonde lag. Aus diesem Grund kam im Hauptversuch nur noch die "antisense"-Sonde zum Nachweis der viralen mRNS zum Einsatz.

Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS wurde bei den **staupeerkrankten** Hunden mittels der "**antisense**"-Sonde in den gleichen Kleinhirnabschnitten nachgewiesen wie das Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen in der immunhistologischen Untersuchung (s. Kap. 4.5.1.). Es fand

sich sowohl in Zellen der weißen (fibrilläre Astrozyten, Mikroglia) als auch der grauen (Bergmann-Gliazellen, protoplasmatische Astrozyten, Körnerzellen des Stratum granulosum, Purkinje-Zellen, Neuronen) Substanz, wobei vor allem die Kleinhirnlamellen und das Marklager betroffen waren. Es stellte sich als starkes, tiefdunkelblaues bis fast schwarzes Signal dar, welches ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert war. Intranukleäre Einschlusskörperchen, welche in der immunhistologischen Untersuchung positiv für CDV-Protein waren, zeigten bei der ISH kein positives Signal. Zusätzlich zum Zellkörper wiesen etliche Zellen, wie fibrilläre und protoplasmatische Astrozyten, Bergmann-Gliazellen und Neuronen auch in ihren Ausläufern ein deutliches Signal auf. In einzelnen Fällen fand sich Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS in Plexusepithelzellen und der Leptomeninx. Teilweise konnte in perivaskulär gelegenen Astrozyten ein deutliches Signal gesehen werden, ohne dass die Gefäßendothelien oder die perivaskulären Infiltrate positiv waren. Die Infektion von Oligodendrozyten blieb aufgrund unzureichender morphologischer Charakterisierbarkeit fraglich.

Bei den Tieren mit **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und **akuten** Läsionen beschränkte sich der Nachweis von Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS vor allem auf die intraläsionalen Bereiche, wobei bei einem Tier (1734/00) ein sehr starkes neuronales Signal beobachtet wurde, welches in der Stärke mit dem Nachweis des korrespondierenden Antigens vergleichbar war. Die intraläsional liegenden Zellen stellten sich überwiegend als Astrozyten dar (Abb. 46). Extraläsional fanden sich vereinzelt liegende Zellen oder Zellansammlungen, die individuell ein sehr starkes Signal aufwiesen. Hierbei handelte es sich meist um Purkinje-Zellen, Körnerzellen bzw. Astrozyten und deren Ausläufer. Beachtenswert ist ferner die Tatsache, dass zum Teil in Nähe der Läsionen, zum Teil auch nicht läsionsassoziiert ein starkes Signal beobachtet werden konnte, welches sich ausschließlich auf die graue Substanz beschränkte und beginnend von den Purkinje-Zellen und den Bergmann-Gliazellen durch das Stratum granulosum in Richtung Stratum moleculare zog und sich hier verlor.

Kleinhirne von Staupevirus-infizierten Hunden mit **subakuten** Läsionen **mit Entzündung** wiesen gegenüber **akuten** Läsionen eine niedrigere Anzahl mRNS-positiver Zellen auf. Hierbei war im Zentrum der Läsion die Anzahl positiver Zellen, die in der Mehrzahl aktivierte Astrozyten und Gemistozyten darstellten (Abb. 47), in einigen Plaques gegenüber lichtmikroskopisch nicht sichtbaren bzw. akuten Läsionen gering- bis mittelgradig vermindert (1217/80; 1107/00; N 55-90-34), in anderen Plaques etwa gleichhoch (N 55-90-34; 1217/80)

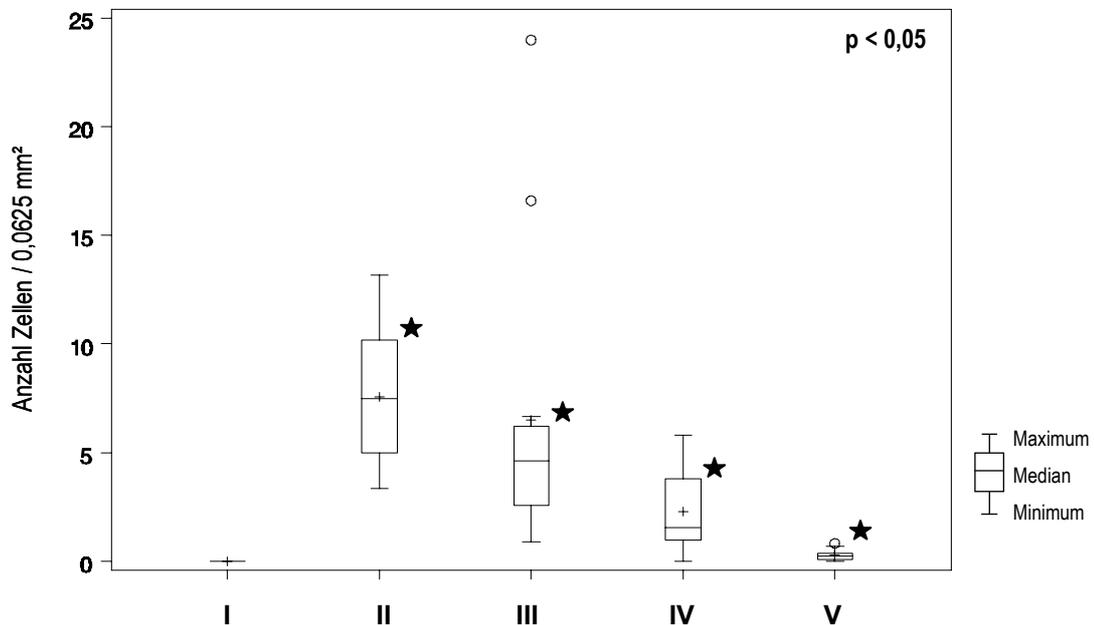
und in einem Teil der Herdveränderungen höher (121/80). Auffällig war weiterhin, dass das positive Signal für die Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS in diesen Läsionen teilweise fast vollständig vom Zentrum der Läsion an die Peripherie verlagert war (N 55-90-34; 1107/00; 121/80) bzw. zusätzlich zu dem zentroläsionalen Signal eine starke Reaktion im Randbereich des Plaques aufwies (121/80; N 55-90-34). Waren die Herdveränderungen so gelegen, dass sie unmittelbar an das Stratum granulosum angrenzten, bzw. Teile davon mit einschlossen, dann konnte in fast allen Fällen ein sehr starkes und ausgedehntes positives Signal innerhalb der Körnerzellschicht gesehen werden (Abb. 49).

Innerhalb der **chronischen** Läsionen fanden sich nur noch sehr vereinzelt liegende bis fast keine positive Zellen mehr und auch hier konnte eine Reduktion mRNS-positiver Zellen im Zentrum mit einem eher peripher orientierten Signal nachgewiesen werden (Abb. 48). Extraläsional konnten ebenfalls nur noch ganz vereinzelt liegende Zellen mit einer eher mäßigen zytoplasmatischen Reaktion gesehen werden.

In den Kleinhirnen der gesunden **Kontrolltiere** und in dem kaninen kutanen Histiozytom fanden sich keine positiven Signale zum Nachweis einer Staupevirus-Infektion.

Bei der statistischen Auswertung der Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS-positiven Zellen bei den verschiedenen Läsionstypen konnten mittels Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden ( $p < 0,0001$ ). Im paarweisen Gruppenvergleich mittels nicht-parametrischer Einwegvarianzanalyse (Wilcoxon) wiesen alle Gruppen (I-V), außer dem Gruppenvergleich II – III, untereinander statistisch signifikante Unterschiede auf (Abb. 11).

**Abb. 11:** Graphische Darstellung der durchschnittlichen Verteilung **Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS**-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen anhand von Box- und Whisker-Plots



I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; o = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

#### 4.6.2.3 Nachweis der MMP-9-mRNS

Bei Verwendung der “**antisense**“-Sonde zum Nachweis der MMP-9-mRNS wurde ein sehr deutliches dunkelblau-braunes Signal festgestellt, welches zytoplasmatisch gelegen war. Die “**sense**“-Sonde zeigte in keinem der untersuchten Gehirne ein Signal. Lediglich in den Positivkontrollen (CDV-infizierte DH82-Zellen und kanines kutanes Histiozytom) war ein sehr leichtes Signal zu beobachten, welches von der Lokalisation dem Signal mit der “**antisense**“-Sonde entsprach.

In allen Kleinhirnen **Staupevirus-infizierter** Hunde fand sich ein sehr starkes neuronales Signal, welches sich vor allem auf die Purkinje-Zellen und die großen Neuronen im Stammhirn, sowie in etwas weniger ausgeprägter Form auf die Körnerzellen erstreckte (Abb. 53). Zusätzlich wiesen zahlreiche diffus in der weißen Substanz liegende Zellen, die von der Zellmorphologie fibrillären Astrozyten bzw. Mikrogliazellen zuzuordnen waren, ein gering- bis mittelgradig ausgeprägtes Signal auf. Die im Stratum moleculare gelegenen Zellen (Korb-

und Sternzellen) zeigten ebenfalls eine zytoplasmatische Reaktion. In zahlreichen Endothelzellen, leptomeningealen Zellen und Plexusepithelzellen war, unabhängig von dem überwiegenden Charakter der Herdveränderungen des jeweiligen Kleinhirns, ein deutliches positives Signal zu beobachten. Hinzu kam, dass einzelne intravaskulär liegende mononukleäre Zellen auch positiv markiert waren.

Insgesamt betrachtet fiel auf, dass mit der Zunahme der zellulären Infiltration sowohl diffus intraläsional als auch perivaskulär ein signifikanter Anstieg der Expression der MMP-9-mRNS verbunden war.

So fand sich, neben den oben beschriebenen Beobachtungen, in den Kleinhirnen mit **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und **akuten** Läsionen im Bereich der Läsionen in der weißen Substanz eine gegenüber den Kontrolltieren geringgradige Erhöhung der MMP-9-mRNS exprimierenden Zellen. Diese Zellen waren anhand ihrer Zellmorphologie am ehesten Astrozyten zuzuordnen (Abb. 51, 51a).

Durch die zunehmende Zellzahl in **subakuten** Läsionen **mit Entzündung** nahm auch die Zahl der MMP-9-mRNS exprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollen und den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren sowie akuten Herden statistisch signifikant zu. Es war deutlich zu erkennen, dass sowohl intraläsional diffus gelegene Gitterzellen als auch Gemistozyten bzw. nicht aktivierte Astrozyten und Lymphozyten deutlich positiv markiert waren. Neben den diffus intraläsional gelegenen positiven Zellen waren zahlreiche mononukleäre perivaskulär gelegene Zellen, die ebenfalls ein positives Signal trugen (Abb. 52, 52a).

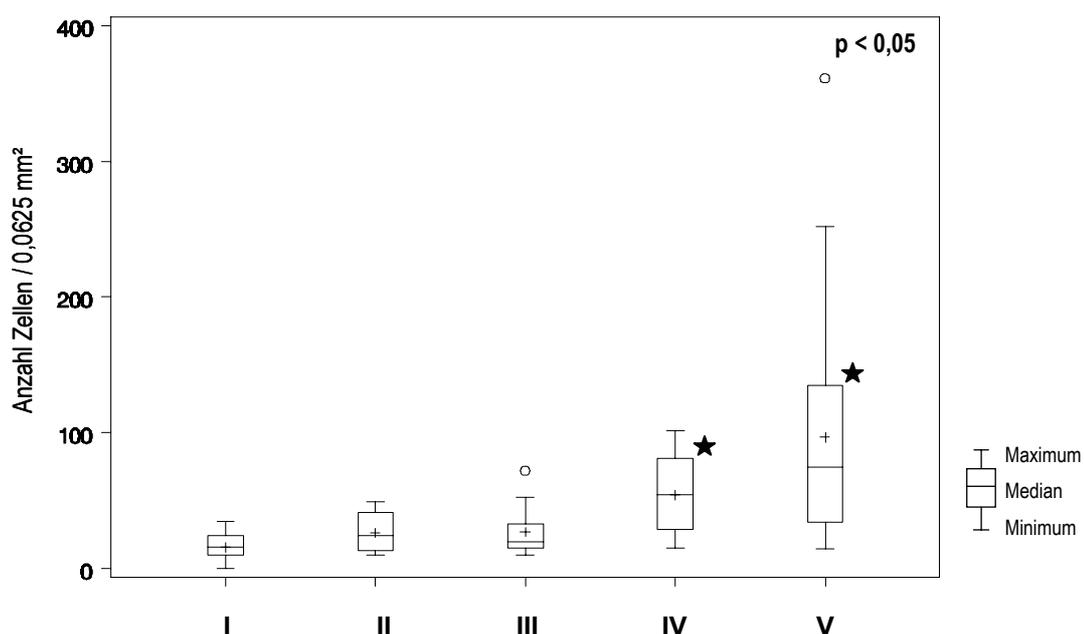
Dieser zu beobachtende Trend verstärkte sich noch bei den **chronischen** Läsionen, die gleichfalls innerhalb der Läsionen bzw. der perivaskulären Infiltrate gegenüber den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren bzw. akuten Läsionen einen statistisch signifikanten Anstieg der MMP-9-mRNS positiven Zellen zu verzeichnen hatten. Die intraläsional gelegenen Zellen waren teilweise anhand ihrer Zellmorphologie klar anzusprechen. Hierzu gehörten z.B. Lymphozyten und Mikroglia/Makrophagen. Auffällig war die geringe Anzahl positiver Astrozyten (Abb. 54, 54a, 55, 55a, 68, 68a).

Die Kleinhirne der gesunden **Kontrolltiere** zeigten ebenfalls ein primär neuronal akzentuiertes positives Signal, wobei, ähnlich wie bei den staupekranken Tieren, Purkinje-

Zellen, große Neuronen und in geringerem Ausmaß Körnerzellen markiert waren. Das individuelle Signal pro Zelle war aber wesentlich geringer als bei den erkrankten Tieren. Die diffus in der weißen Substanz verteilten Oligodendrozyten bzw. fibrillären Astrozyten zeigten ebenfalls ein schwaches Signal, ebenso wie mäßig viele Zellen im Stratum moleculare.

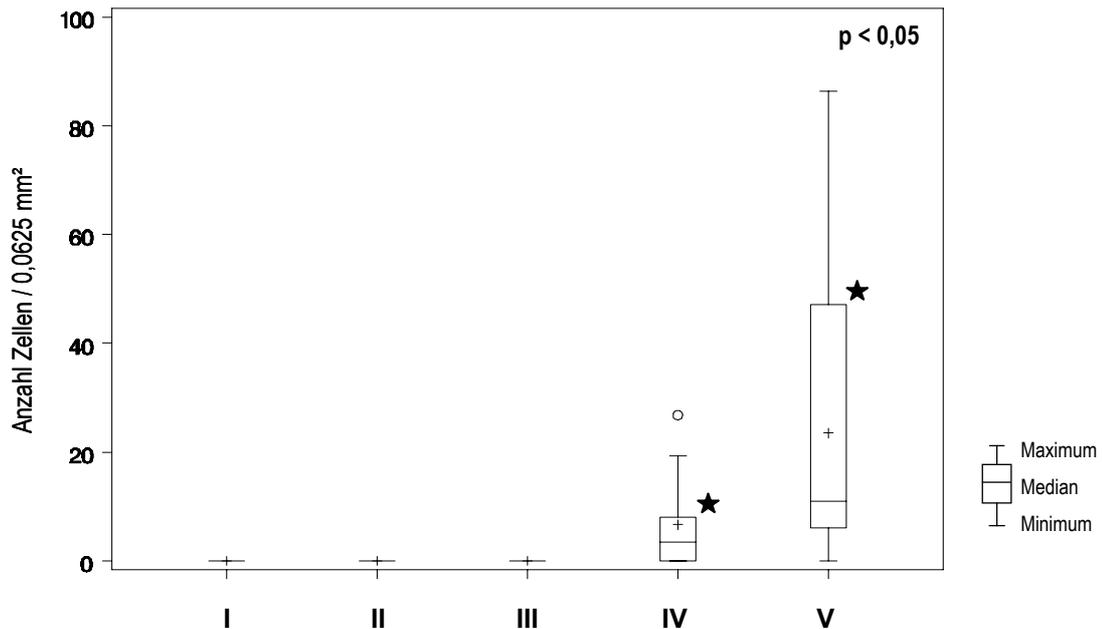
Bei der statistischen Auswertung der Anzahl MMP-9-mRNS-positiver Zellen bei den verschiedenen Läsionstypen konnten intraläsional sowohl bei nicht-Gefäß-assoziierten (Parameter "nGa" = nicht-Gefäß-assoziiert) als auch bei gefäßassoziiert gelegenen Zellen (Parameter "Ga" = Gefäß-assoziiert) mittels Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden (jeweils  $p < 0,0001$ ). Im paarweisen Gruppenvergleich mittels nicht-parametrischer Einwegvarianzanalyse (Wilcoxon) war die Anzahl positiver Zellen bei subakuten Läsionen mit Entzündung (Gruppe IV) und chronischen Herden (Gruppe V) gegenüber den Kontrollen (Gruppe I), lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Läsionen (Gruppe II) und akuten Herden (Gruppe III) bei beiden Parametern ("Ga" bzw. "nGa") statistisch signifikant erhöht. Zusätzlich hierzu war bei den Gefäß-assoziiert gelegenen Zellen ("Ga") die Anzahl positiver Zellen bei chronischen Plaques (Gruppe V) gegenüber der Anzahl bei subakuten Läsionen mit Entzündung (Gruppe IV) ebenfalls statistisch signifikant erhöht ( $p < 0,0388$ ) (Abb. 12 und Abb. 13).

**Abb. 12:** Graphische Darstellung der Anzahl MMP-9-mRNS-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen für den Parameter "nicht-Gefäß-assoziiert" ("nGa") anhand von Box- und Whisker-Plots



I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; ○ = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

**Abb. 13:** Graphische Darstellung der Anzahl **MMP-9-mRNS**-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen für den Parameter “Gefäß-assoziiert“ (“Ga“) anhand von Box- und Whisker-Plots



I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; ○ = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

#### 4.6.2.4 Nachweis der MMP-14-mRNS

Bei der Verwendung der “antisense“-Sonde zum Nachweis der MMP-14-mRNS konnte ebenfalls, wie bei dem Nachweis der MMP-9-mRNS, ein sehr deutliches dunkelblau-braunes Signal gesehen werden, welches zytoplasmatisch gelegen war. Die “sense“-Sonde zeigte in den Kleinhirnen der Kontrolltiere ebenso wie in den Kleinhirnen der Tiere mit lichtmikroskopisch nicht sichtbaren, akuten oder subakuten Läsionen mit Entzündung keine oder nur eine sehr geringe Reaktion. In den Kleinhirnen mit überwiegend chronischen Läsionen konnte eine etwas stärkere Reaktion der “sense“-Sonde im Vergleich zu den anderen Kleinhirnen gesehen werden, wobei die Farbreaktionen in den identischen

Lokalisationen lagen wie bei Verwendung der “antisense“-Sonde, jedoch wesentlich geringer war.

Das Verteilungsmuster des spezifischen Signals für MMP-14-mRNS entsprach weitgehend demjenigen für MMP-9 mRNS, d.h. dass sich in allen Kleinhirnen **Staupevirus-infizierter** Hunde ein sehr starkes neuronales Signal fand, welches sich vor allem auf die Purkinje-Zellen und die großen Neuronen im Stammhirn, sowie in etwas weniger ausgeprägter Form auf die Körnerzellen erstreckte. Zusätzlich wiesen zahlreiche diffus in der weißen Substanz liegende Zellen, die von der Zellmorphologie fibrillären Astrozyten bzw. Mikrogliazellen zuzuordnen waren, ein mittel- bis teilweise hochgradig ausgeprägtes Signal auf. Die absolute Anzahl der positiven Zellen war deutlich höher als bei dem Nachweis von MMP-9-mRNS. Die im Stratum moleculare gelegenen Zellen (Korb- und Sternzellen) zeigten ebenfalls eine zytoplasmatische Reaktion. In zahlreichen Endothelzellen, leptomeningealen Zellen und Plexusepithelzellen war, unabhängig von dem überwiegenden Charakter der Herdveränderungen des jeweiligen Kleinhirns, ein deutliches positives Signal zu beobachten. Hinzu kam, dass einzelne intravaskulär liegende mononukleäre Zellen auch positiv markiert waren.

Insgesamt betrachtet fiel auf, dass mit der Zunahme der zellulären Infiltration sowohl diffus intraläsional als auch perivaskulär ein signifikanter Anstieg der Expression der MMP-14-mRNS verbunden war.

So fand sich, neben den oben beschriebenen Beobachtungen, in den Kleinhirnen mit **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und **akuten** Läsionen im Bereich der Läsionen in der weißen Substanz eine gegenüber den Kontrolltieren mittelgradige Erhöhung der MMP-14-mRNS exprimierenden Zellen (Abb. 56, 56a, 57, 57a, 58, 58a). Diese Zellen waren anhand ihrer Zellmorphologie am ehesten Astrozyten zuzuordnen. Ebenso fiel auf dass, wie oben bereits erwähnt, auch extraläsional diffus in der weißen Substanz verteilte Zellen ein zum Teil sehr starkes individuelles Signal aufwiesen.

Durch die zunehmende Zellzahl in **subakuten** Läsionen **mit Entzündung** nahm auch die Zahl der MMP-14 mRNS exprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollen (I) ( $p < 0,0001$ ) und den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Herden (LMNS, II) ( $p < 0,0079$ ) statistisch signifikant zu (Abb. 59, 59a). Es war deutlich zu erkennen, dass sowohl intraläsional diffus gelegene Gitterzellen, Gemistozyten bzw. nicht aktivierte Astrozyten und Lymphozyten deutlich positiv markiert waren (Abb. 61). Neben den diffus intraläsional gelegenen positiven

Zellen waren zahlreiche mononukleäre perivaskulär gelegene Zellen, die ebenfalls ein positives Signal trugen.

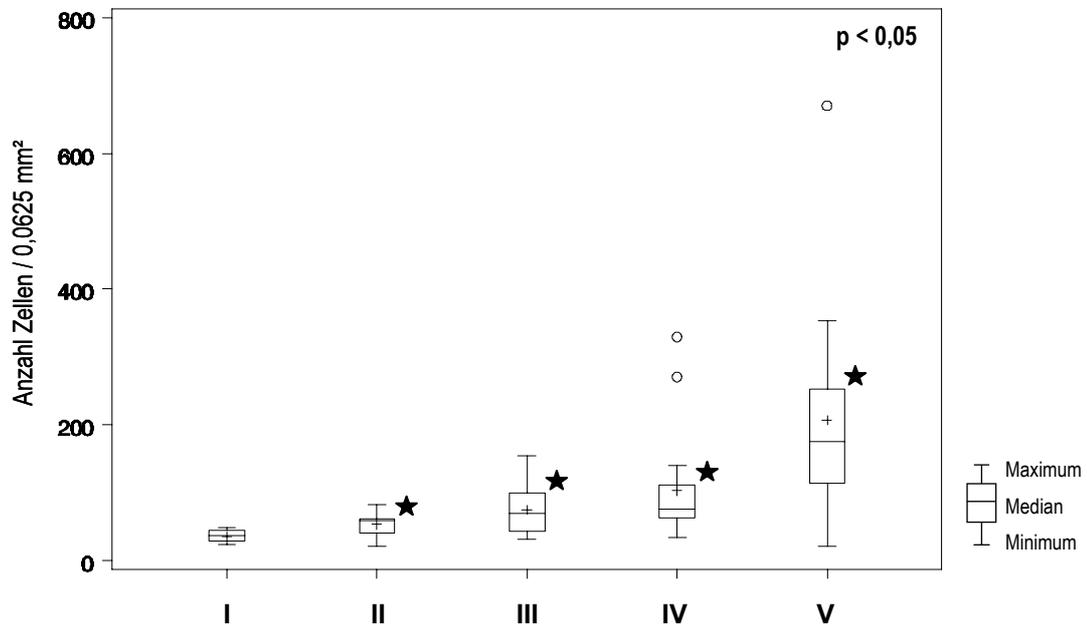
Dieser zu beobachtende Trend verstärkte sich noch bei den **chronischen** Läsionen, die gleichfalls innerhalb ihrer Läsionen bzw. der perivaskulären Infiltrate gegenüber den Kontrollen, den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren und den akuten Herden, als auch den subakuten Läsionen mit Entzündung einen statistisch signifikanten Anstieg der MMP-14 mRNS positiven Zellen zu verzeichnen hatten (Abb. 60, 60a). Die intraläsional gelegenen Zellen waren teilweise anhand ihre Zellmorphologie klar anzusprechen, wie z.B. Lymphozyten (Abb. 69, 69a). Andere gehörten, läsionsabhängig, der Mikroglia/Makrophagen-Population an. Auffällig war die geringe Anzahl positiver Astrozyten.

Die Kleinhirne der gesunden **Kontrolltiere** zeigten ebenfalls ein primär neuronal akzentuiertes positives Signal, wobei, ähnlich wie bei den staupekranken Tieren, Purkinje-Zellen, große Neuronen und in geringerem Ausmaß Körnerzellen markiert waren. Das individuelle Signal pro Zelle war aber wesentlich geringer als bei den erkrankten Tieren. Die diffus in der weißen Substanz verteilten Makrophagen/Mikroglia, Oligodendrozyten bzw. fibrillären Astrozyten zeigten ebenfalls ein schwaches Signal, ebenso wie mäßig viele Zellen im Stratum moleculare.

Bei der statistischen Auswertung der Anzahl MMP-14-mRNS-positiver Zellen bei den verschiedenen Läsionstypen konnten für die intraläsionalen Parameter "nGa" als auch "Ga" mittels Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden ( $p < 0,0001$ ). Im paarweisen Gruppenvergleich mittels nicht-parametrischer Einwegvarianzanalyse (Wilcoxon), bezogen auf die Anzahl positiver intraläsionaler Zellen für den Parameter "nicht-Gefäß-assoziiert" ("**nGa**") war die Anzahl positiver Zellen bei allen Gruppen der staupeerkrankten Tiere (Gruppe II-V) gegenüber den Kontrolltieren (Gruppe I) statistisch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Das Gleiche trifft auf den Gruppenvergleich zwischen Gruppe IV und II zu. Die Anzahl positiver Zellen der Gruppe V war gegenüber allen anderen Gruppen (I-IV) ebenfalls statistisch signifikant erhöht (Abb. 14).

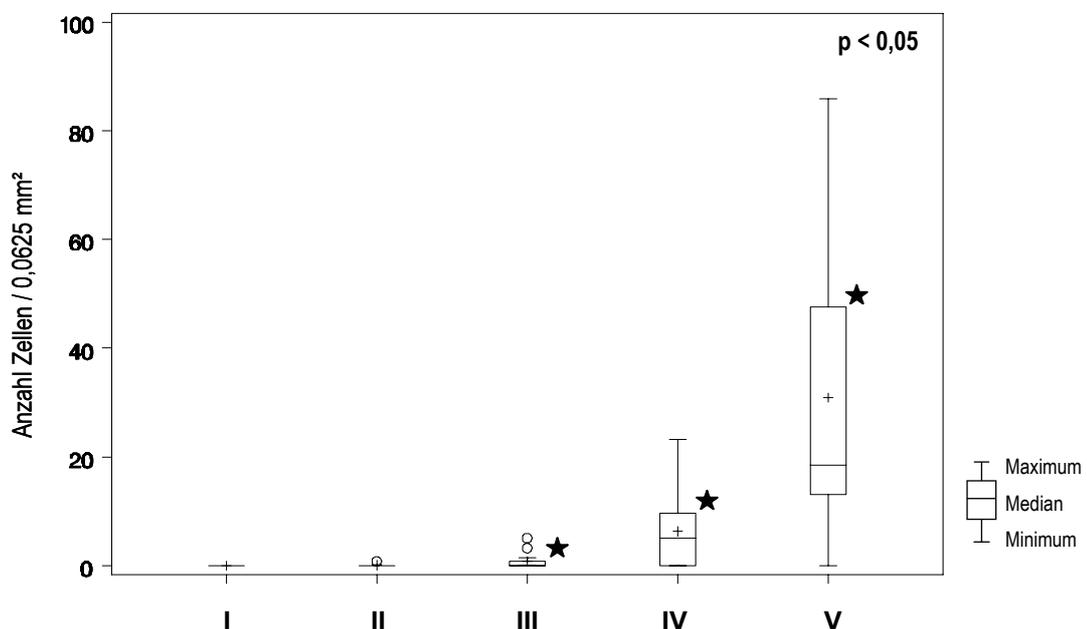
Bei der Anzahl positiver, Gefäß-assoziiert ("**Ga**") gelegener Zellen ergab sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellzahl der Gruppen III, IV und V gegenüber den Kontrollen (I), Gruppe IV gegenüber Gruppe II und III, sowie Gruppe V gegenüber Gruppe II, III und IV ( $p < 0,05$ ) (Abb. 15).

**Abb. 14:** Graphische Darstellung der Anzahl **MMP-14-mRNS**-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen für den Parameter “nicht-Gefäß-assoziiert“ (“**nGa**“) anhand von Box- und Whisker-Plots



I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; o = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

**Abb. 15:** Graphische Darstellung der Anzahl **MMP-14-mRNS**-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen für den Parameter “Gefäß-assoziiert“ (“**Ga**“) anhand von Box- und Whisker-Plots



I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; ○ = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

#### 4.6.2.5 Nachweis der TIMP-1-mRNS

Bei Verwendung der **“antisense“-Sonde** zum Nachweis der mRNA konnte, abhängig vom Charakter der Läsion, ein in der Farbintensität variables, spezifisches, dunkelblau-braunes zytoplasmatisch gelegenes Signal gesehen werden. Die **“sense“-Sonde** erbrachte in den Kleinhirnen mit chronischen Herdveränderungen kein bis nur ein sehr geringgradiges Signal, in den übrigen Kleinhirnen ein etwas stärkeres Signal, wobei auffiel, dass diejenigen Lokalisationen, in denen das stärkste Signal mit der **“antisense“-Sonde** beobachtet wurde, das Signal mit der **“sense“-Sonde** nur schwach ausgeprägt war.

Die **“antisense“-Sonde** markierte in allen Kleinhirnen von **staupekranken** Tieren und **Kontrolltieren** in unterschiedlicher Variabilität und Intensität neuronale Zellen (Purkinje-Zellen, große Neuronen, Körnerzellen, Stern- und Korbzellen im Stratum moleculare), sowie diffus in der weißen Substanz liegende Astrozyten und Makrophagen/Mikroglia, wobei die großen Neuronen und Purkinje-Zellen das deutlichste Signal aufwiesen.

In den Kleinhirnen mit überwiegend **lichtmikroskopisch nicht sichtbaren** und **akuten** Herden fand sich intraläsional ein gering- bis mittelgradig intensives zellassoziertes Signal (Abb. 62, 63). Die markierten Zellen gehörten aufgrund ihrer Zellmorphologie am ehesten der Astrozyten-, bzw. Makrophagen/Mikroglia-Population an. Im Vergleich zu extraläsionalen Bezirken, bzw. den Kontrolltieren, waren intraläsional von der Anzahl her gering- bis mittelgradig mehr Zellen positiv. Die Anzahl der positiven Zellen nahm in akuten Herden, gegenüber den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Herden, geringgradig zu.

In den **subakuten** Läsionen **mit Entzündung** blieb die Zahl der diffus intraläsional gelegenen Zellen gegenüber den akuten Herdveränderungen relativ konstant, wobei zahlreiche Gitterzellen und teilweise Gemistozyten positiv markiert waren (Abb. 64). Zusätzlich konnte jedoch eine starke Zunahme von sehr intensiv markierten endothelialen Zellen beobachtet werden, wobei diese Gefäße intraläsional gelegen waren (Abb. 65).

Diese ausgeprägte vaskuläre Orientierung des Signals setzte sich auch auf die **chronischen** Läsionen fort, wobei hier auch zahlreiche perivaskulär orientierte mononukleäre Zellen ein positives Signal trugen (Abb. 66, 67, 70, 70a). In einzelnen Kleinhirnen konnte ein sehr starkes diffuses zellassoziertes intraläsionales Signal gesehen werden, in anderen Kleinhirnen dominierten die endothelial/vaskulär/perivaskulär gelegenen Signale.

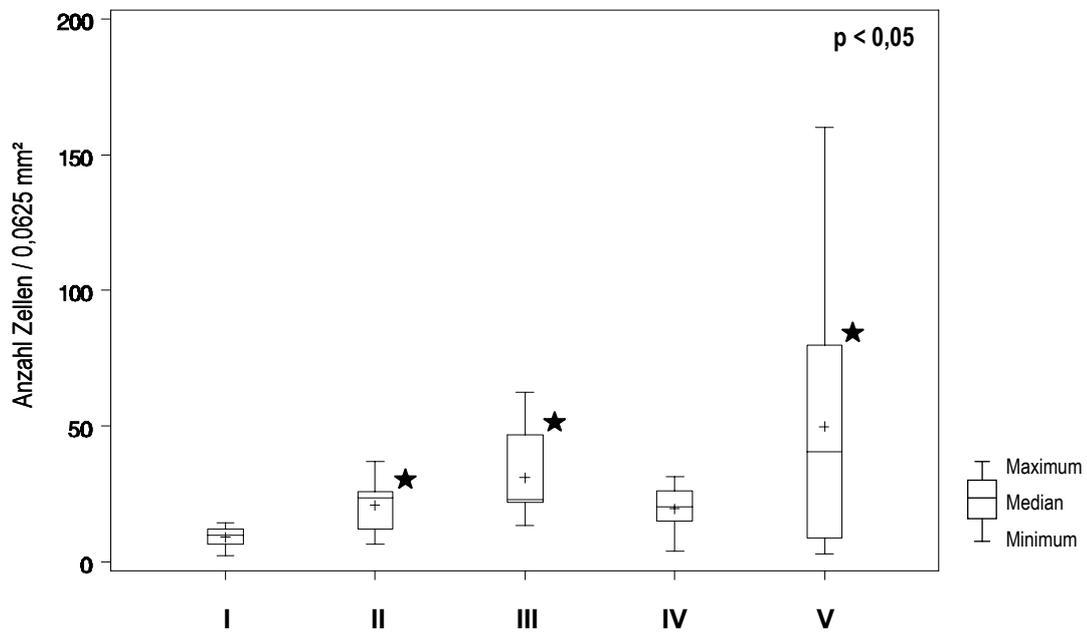
Bei allen Staupevirus-infizierten Kleinhirnen konnten teils vereinzelte, teils zahlreiche positive leptomeningeale, ependymale und Plexusepithelzellen gesehen werden.

Die Kleinhirne der **Kontrolltiere** wiesen außer den bereits oben erwähnten positiven Signalen, bis auf einzelne positive Oligodendrozyten in der weißen Substanz der Marklamellen, keine weiteren Markierungen auf. Die Farbintensität war im Vergleich zu den staupekranken Tieren etwas geringer.

Bei der statistischen Auswertung der Anzahl TIMP-1-mRNS-positiver Zellen bei den verschiedenen Läsionstypen konnten intraläsional sowohl für den Parameter "nGa" als auch den Parameter "Ga" mittels Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden ( $p < 0,0001$ ). Im paarweisen Gruppenvergleich mittels nicht-parametrischer Einwegvarianzanalyse (Wilcoxon), bezogen auf die Anzahl positiver Zellen für den Parameter "nicht-Gefäß-assoziiert" ("**nGa**"), war die Anzahl positiver Zellen bei allen Gruppen der staupeerkrankten Tiere (II-V) gegenüber den Kontrolltieren (I) statistisch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Das Gleiche trifft auf den Gruppenvergleich zwischen Gruppe III und V gegenüber Gruppe IV zu (Abb. 16).

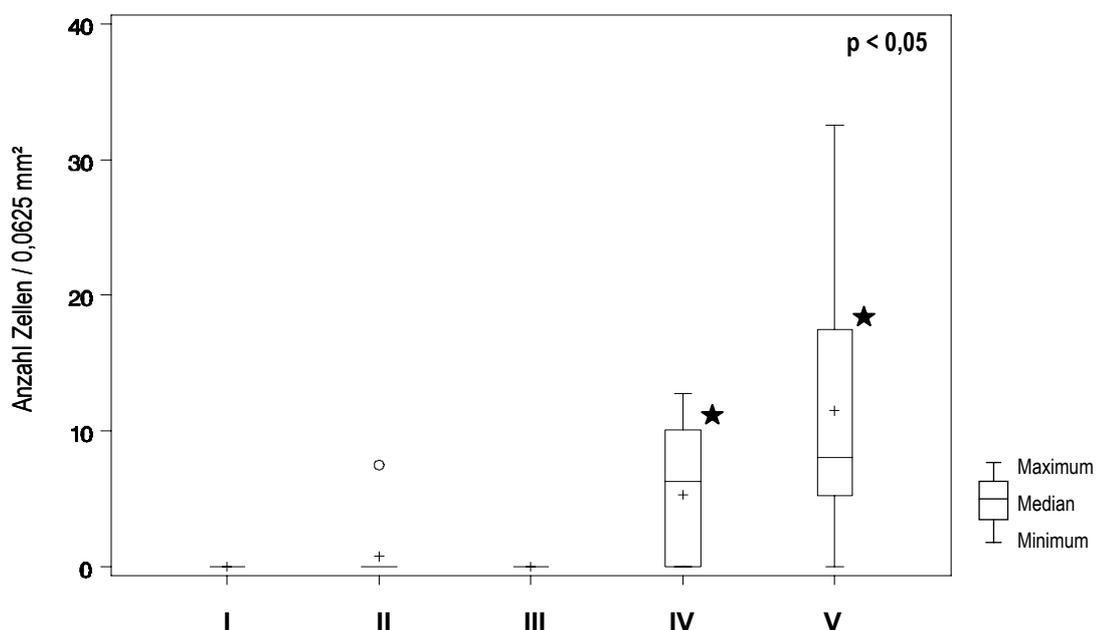
Bei der Anzahl positiver, Gefäß-assoziiert gelegener Zellen ("**Ga**") ergab sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellzahl der Gruppe IV gegenüber den Gruppen I, II und III sowie der Gruppe V gegenüber allen anderen Gruppen (I-IV) ( $p < 0,05$ ) (Abb. 17).

**Abb. 16:** Graphische Darstellung der Anzahl **TIMP-1-mRNS**-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen für den Parameter “nicht-Gefäß-assoziiert“ (“nGa“) anhand von Box- und Whisker-Plots



I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; ○ = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

**Abb. 17:** Graphische Darstellung der Anzahl **TIMP-1-mRNS**-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Gruppen für den Parameter “Gefäß-assoziiert“ (“Ga“) anhand von Box- und Whisker-Plots



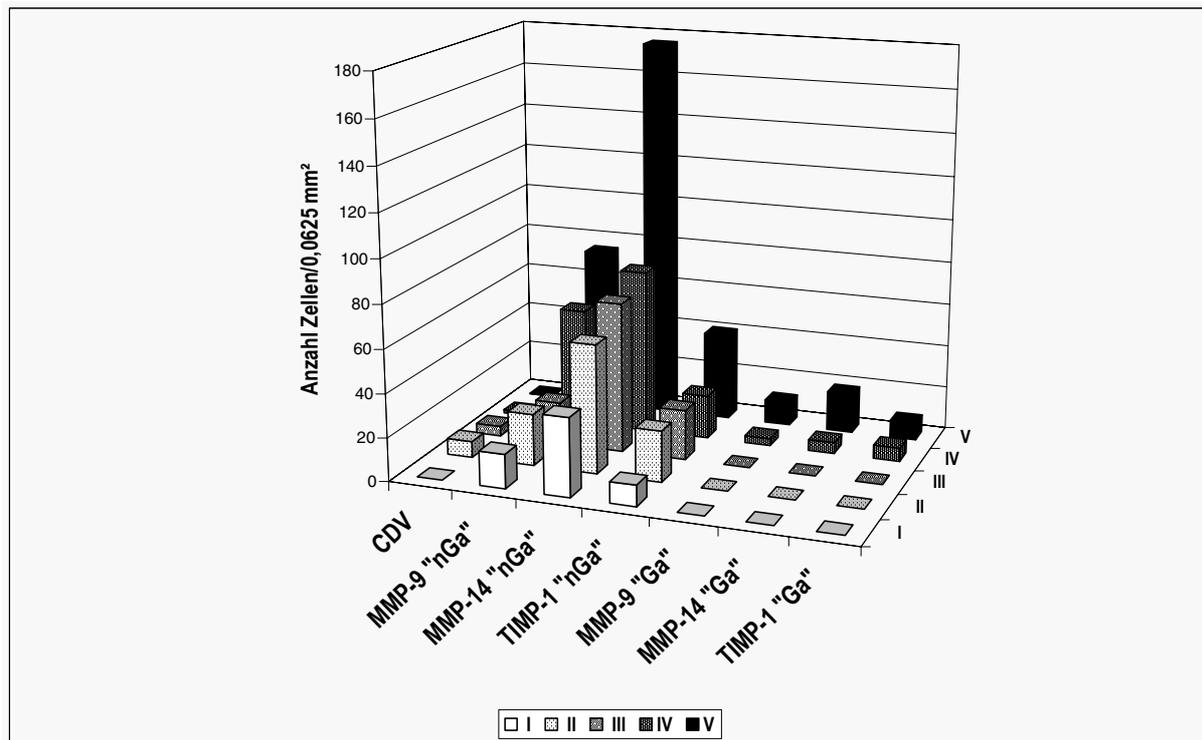
I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen; ○ = Ausreißer innerhalb der 4. Quartile, + = Mittelwert, ★ = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

#### 4.6.2.6 Vergleichende Betrachtung der ISH-Ergebnisse

Bei der vergleichenden Betrachtung der ISH-Ergebnisse fiel auf, dass die durchschnittlichen Medianwerte der einzelnen Parameter (MMP-9-“nGa“, MMP-9-“Ga“, MMP-14-“nGa“, MMP-14-“Ga“, TIMP-1-“nGa“ und TIMP-1-“Ga“) in ihrer absoluten Höhe erheblich differierten (Abb. 18). So sind die Medianwerte, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen betrachtet, von MMP-14-“nGa“ im Durchschnitt 1½- bis teilweise 3-mal so hoch wie die Medianwerte von MMP-9-“nGa“, wohingegen TIMP-1-“nGa“ bei den Gruppen I, II und III annähernd die gleichen Werte wie MMP-9-“nGa“ erreicht. Bei der Gruppe IV ist TIMP-1-“nGa“ jedoch nur knapp ein Drittel und bei der Gruppe V nur die Hälfte so hoch wie MMP-9-“nGa“.

Bezogen auf die Parameter MMP-9-“Ga“, MMP-14-“Ga“ und TIMP-1-“Ga“ ließ sich feststellen, dass die durchschnittlichen Medianwerte erheblich unter denen lagen, die für die jeweiligen Parameter “nGa“ ermittelt wurden. In den Gruppen I, II und III wurden die Gefäß-assoziierten Parameter gar nicht exprimiert, wohingegen bei der Gruppe IV der Medianwert des Parameters TIMP-1-“Ga“ geringgradig am höchsten lag; danach folgten MMP-14-“Ga“ und MMP-9-“Ga“. Bei der Gruppe V lagen die Werte für die Parameter MMP-9-“Ga“ bzw. MMP-14-“Ga“ 3- bzw. 3½-mal so hoch im Vergleich zu IV, wohingegen TIMP-1-“Ga“ nur um ein Drittel gegenüber IV erhöht war (Abb. 18).

**Abb. 18:** Darstellung der Medianwerte der verschiedenen MMPs und TIMP zwischen den einzelnen Gruppen angegeben in Anzahl Zellen/0,0625 mm<sup>2</sup>



CDV = canine distemper virus; "Ga" = Gefäß-assoziiert; MMP = Matrix-Metalloproteinase; "nGa" = nicht-Gefäß-assoziiert; TIMP = "tissue inhibitor of matrix metalloproteinase"; I = Kontrollgruppe; II = Gruppe mit lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Läsionen; III = Gruppe mit akuten Läsionen; IV = Gruppe mit subakuten Läsionen mit Entzündung; V = Gruppe mit chronischen Läsionen

## 4.7 Gemeinsame Betrachtung der IH- und ISH-Ergebnisse

### 4.7.1 Doppelmarkierung

Die Doppelmarkierung wurde durchgeführt, um Aufschluß darüber zu erhalten, welche Zellpopulation in welchem Ausmaß MMP-9- und MMP-14- bzw. TIMP-1-mRNS exprimiert. Aus diesem Grunde wurde an ausgewählten Schnitten in einem ersten Schritt eine ISH mit der jeweiligen spezifischen "antisense"-Sonde durchgeführt, um daran eine immunhistologische Untersuchung zur Markierung von Astrozyten (GFAP-Ak) bzw. Makrophagen/Mikroglia (Lektin BS-1) anschließen zu können.

Dabei zeigte sich, dass sowohl Astrozyten als auch Makrophagen/Mikroglia in der Lage sind, MMP-9- bzw. MMP-14-mRNS und TIMP-1-mRNS zu exprimieren. In allen verschiedenen Herdläsionen stellte sich die Doppelmarkierung folgendermaßen dar: Es gab zahlreiche Zellen

mit einem dunkelblauen Farbniederschlag, welche die Markierung für die spezifische MMP-9-, MMP-14- bzw. TIMP-1 "antisense"-Sonde darstellte, und daneben etliche Zellen mit dem roten Signal für Astrozyten (GFAP-Ak) bzw. Makrophagen/Mikroglia (BS-1). In etlichen Zellen konnte eine deutliche Vermischung bzw. ein Nebeneinander dieser zwei Farbtöne gesehen werden, welche in der Mehrzahl der Fälle in einem blau-roten bis lilafarbenen Mischton resultierte. Abhängig vom Charakter der Herdläsion und der damit verbundenen hauptsächlich Zellpopulation dominierten in lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Läsionen und akuten Plaques die Astrozyten als primäre intraläsionale Quelle für MMP- und TIMP-1-mRNS, wobei sich in subakuten Plaques mit Entzündung und chronischen Herdveränderungen das ganze Geschehen zu Makrophagen/Mikroglia hin verschob (Abb. 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77).

#### 4.7.2 Statistische Korrelation zwischen IH- und ISH-Ergebnissen

Um eine etwaige Korrelation zwischen den immunhistologischen Ergebnissen und denjenigen aus der ISH zu erfassen, wurde mit den Werten der Parameter MMP-9-"nGa", MMP-9-"Ga", MMP-14-"nGa", MMP-14-"Ga", TIMP-1-"nGa" und TIMP-1-"Ga" aus der ISH und den Werten der Parameter BS-1, CD44 und GFAP aus der IH der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Hierbei ergab sich für die **Gruppe III** eine positive Korrelation zwischen MMP-9-"nGa" und CD44 ( $r_s$ : 0,75262;  $p < 0,0047$ ), die sich auch in der Gruppe V fand ( $r_s$ : 0,52692;  $p < 0,0204$ ). Außerdem zeigte sich in der Gruppe III eine Korrelation zwischen BS-1 und MMP-14-"nGa" ( $r_s$ : 0,73247;  $p < 0,0388$ ), die auch in der Gruppe IV zu finden war ( $r_s$ : 0,62060;  $p < 0,0046$ ).

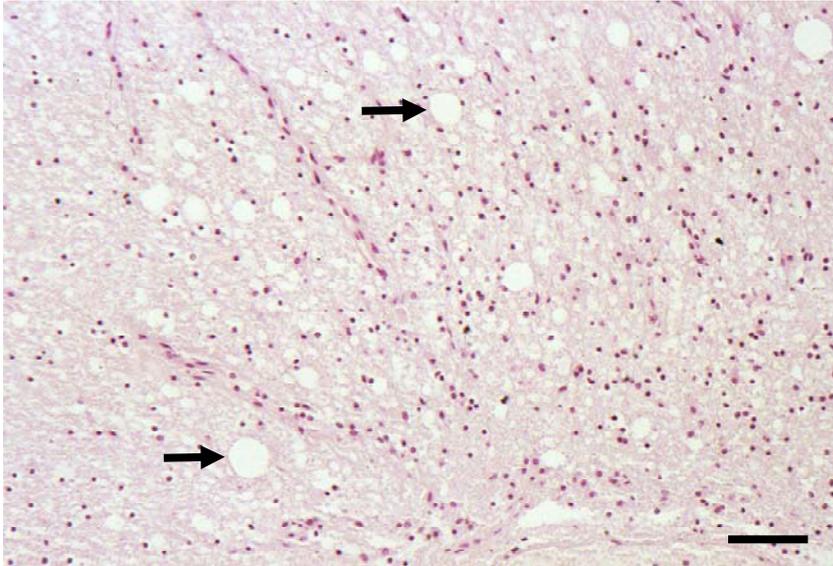
In der **Gruppe IV** fand sich außerdem eine positive Korrelation zwischen CD44 und MMP-14-"nGa" ( $r_s$ : 0,45847;  $p < 0,0484$ ), die auch die Gruppe V aufwies ( $r_s$ : 0,49581;  $p < 0,0262$ ), sowie eine Korrelation zwischen CD44 und TIMP-1-"Ga" ( $r_s$ : 0,55860;  $p < 0,0123$ ).

In der **Gruppe V** zeigte sich neben den oben bereits erwähnten Korrelationen noch zusätzlich ein Zusammenhang zwischen BS-1 und TIMP-1-"nGa" ( $r_s$ : 0,52566;  $p < 0,0173$ ).



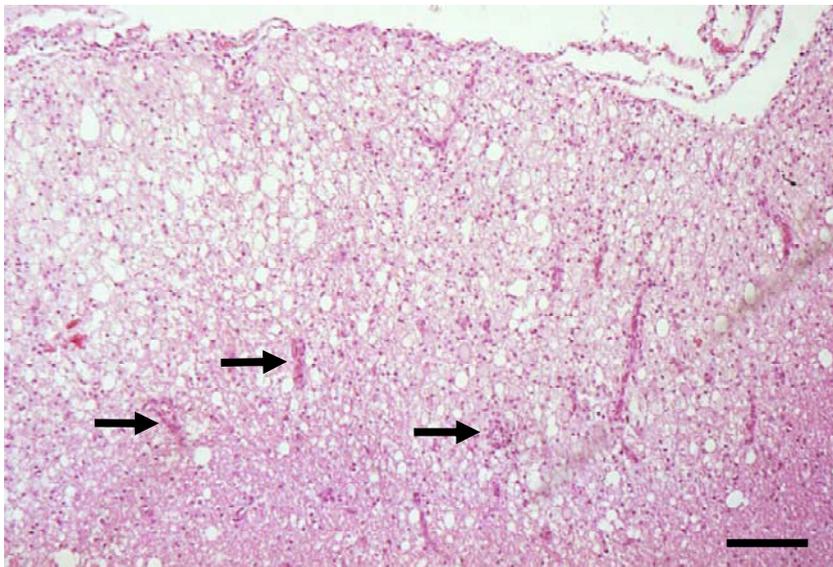
4.8

## **Lichtmikroskopische Abbildungen**

**Abb. 19**

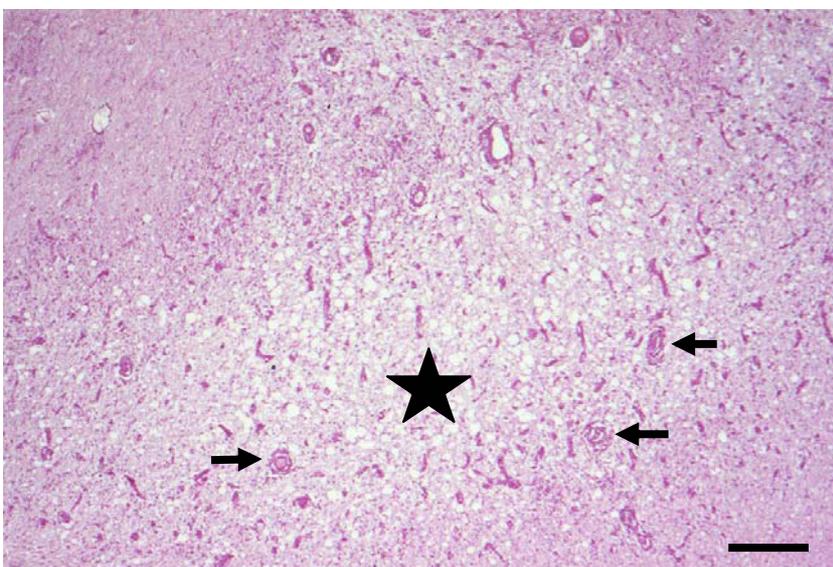
**Akute** Herdläsion mit Vakuolisierung (Pfeile) und geringgradiger Astrogliose.

Hund Nr. 4, Gruppe III  
Kleinhirn, weiße Substanz,  
HE-Färbung, Bar = 66µm

**Abb. 20**

**Subakute** Herdläsion mit **Entzündung**. Mittel- bis hochgradige Vakuolisierung des Kleinhirnmarks mit mittelgradiger Demyelinisierung und gering- bis mittelgradiger perivaskulärer und diffuser lymphohistiozytärer Entzündungszellinfiltration (Pfeile).

Hund Nr. 1, Gruppe IV,  
Kleinhirn, weiße Substanz,  
HE-Färbung, Bar = 132 µm

**Abb. 21**

**Chronische** Läsion mit hochgradiger perivaskulärer und diffuser intralésionaler Infiltration lymphohistiozytärer Entzündungszellen (Pfeile), sowie hochgradiger Demyelinisierung (Stern).

Hund Nr. 13, Gruppe V,  
Kleinhirn, weiße Substanz, HE-  
Färbung, Bar = 264 µm

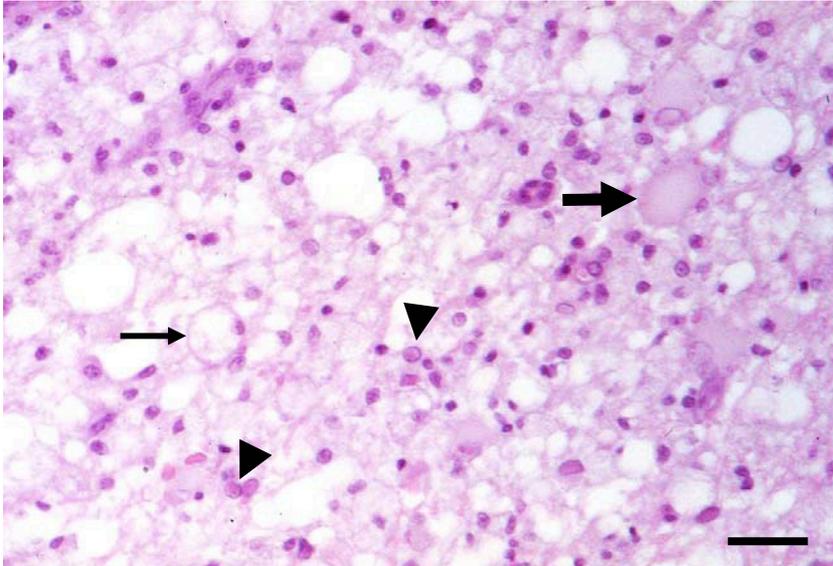


Abb. 22

**Subakute** Läsion mit **Entzündung** mit zahlreichen Gitterzellen (dünner Pfeil), Gemistozysten (dicker Pfeil) und intranukleären Einschlusskörperchen (Pfeilspitzen) sowie mittelgradiger Demyelinisierung.

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, HE-Färbung, Bar = 33µm

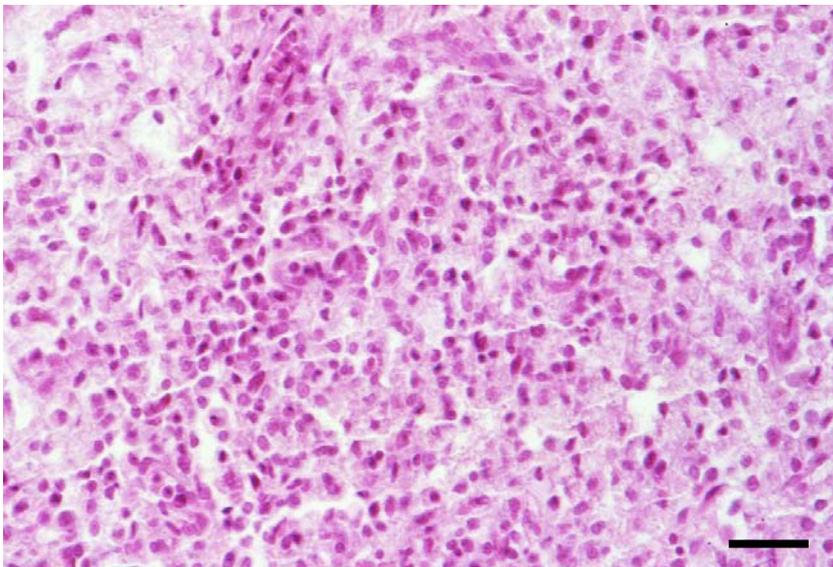


Abb. 23

**Chronische** Herdläsion mit hochgradiger diffuser intralésionaler lymphohistiozytärer Entzündungszellinfiltration.

Hund Nr. 12, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, HE-Färbung, Bar = 33µm

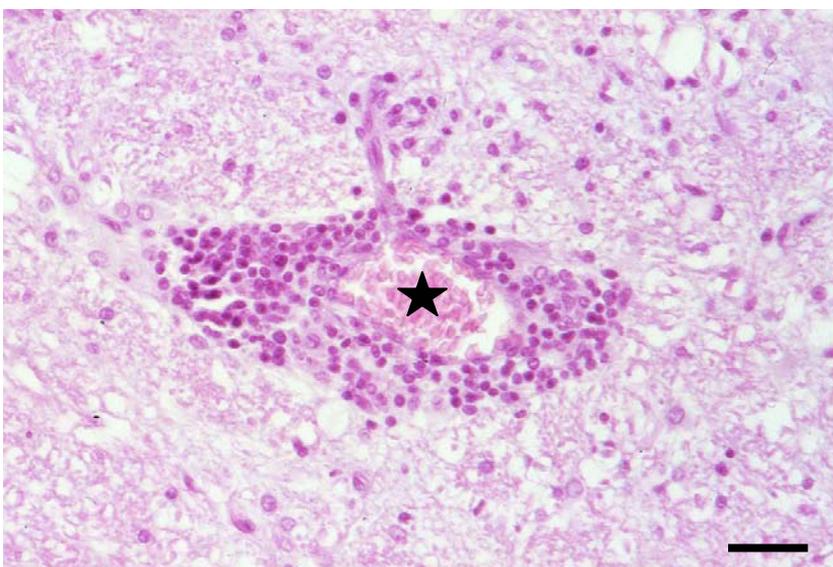
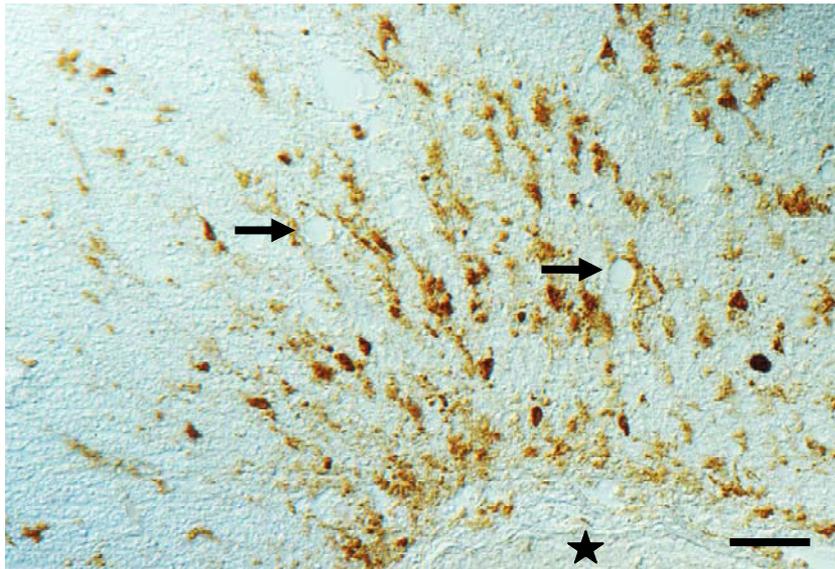


Abb. 24

Hochgradige lymphohistiozytäre perivaskuläre Infiltration innerhalb einer **chronischen** Herdläsion.

Stern = Gefäßlumen

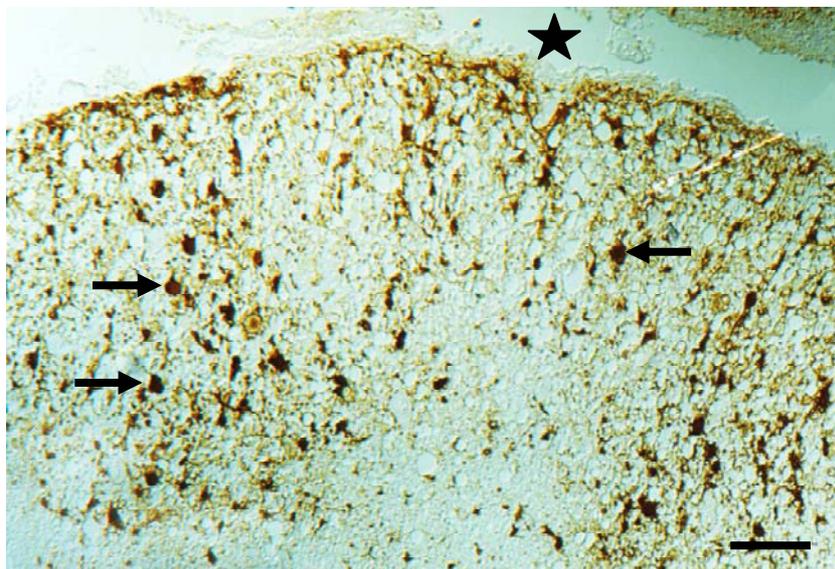
Hund Nr. 10, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, HE-Färbung, Bar = 33µm

**Abb. 25**

Zahlreiche intraläsional gelegene **Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen**-positive Zellen (Astrozyten und Mikroglia) in einer *akuten* Herdläsion mit Vakuolisierung

Stern = Gefäßlumen  
Pfeile = Vakuolisierung

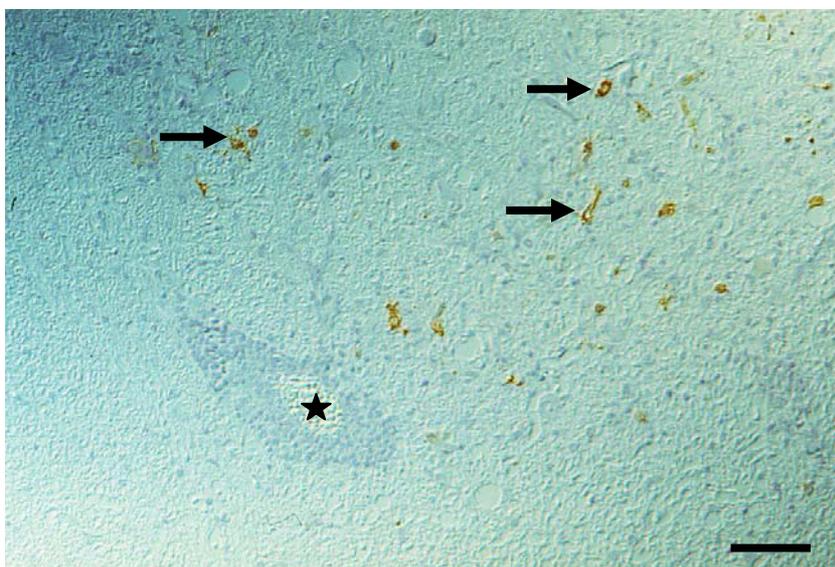
Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 26**

Zahlreiche **Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen**-positive Astrozyten (Pfeile) mit geringgradiger Tendenz zur peripheren Verlagerung des positiven Signals in einer *subakuten Läsion* mit *Entzündung*.

Stern = subarachnoidaler Raum

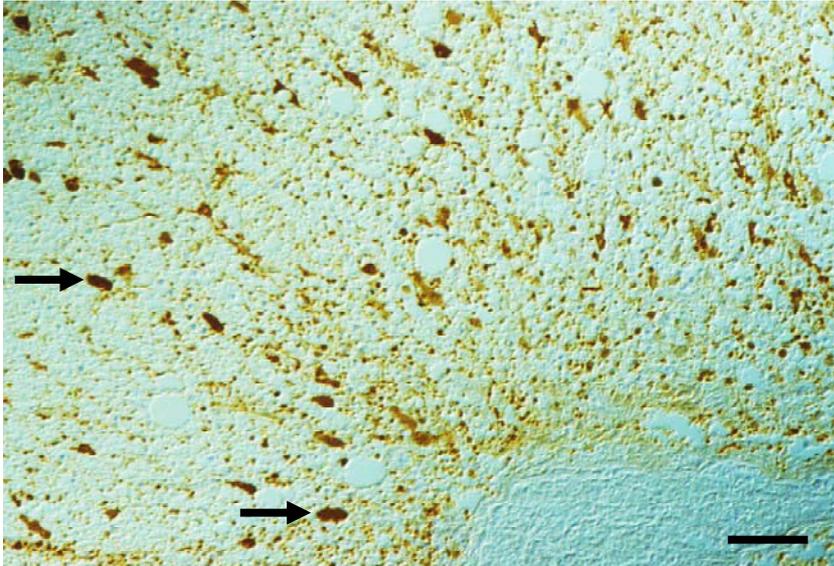
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 132 µm

**Abb. 27**

Vereinzelte **Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen**-positive Zellen (Pfeile) in einer *chronischen* Läsion mit Verlagerung des Signals in die Peripherie der Läsion.

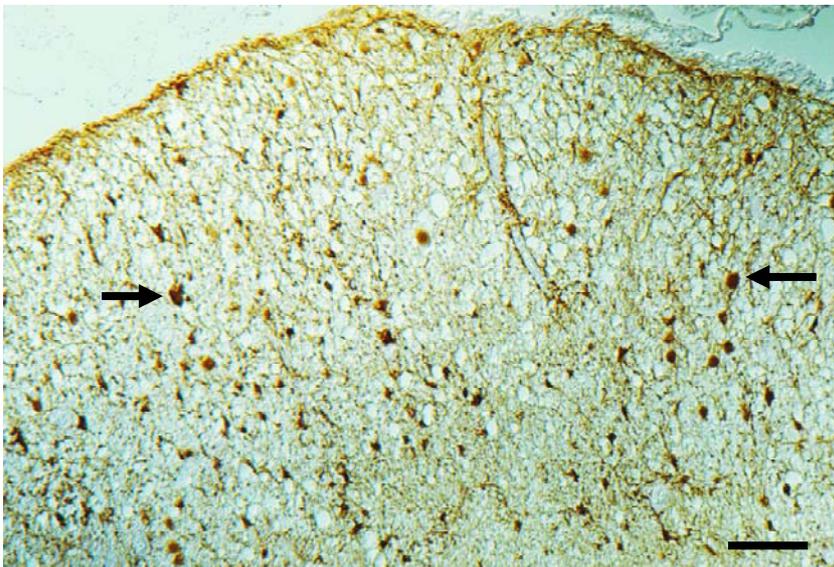
Stern = Gefäß mit perivaskulärem Infiltrat

Hund Nr. 10, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 28**

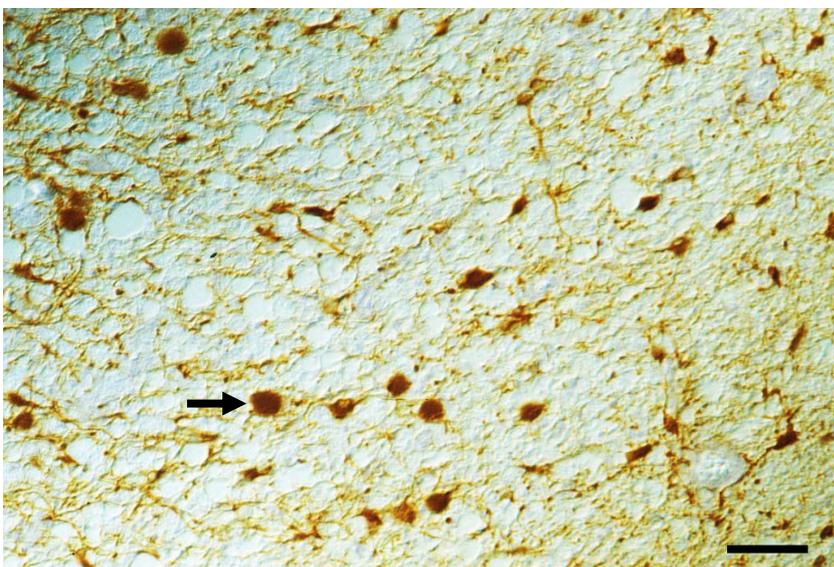
**GFAP**-positive Astrozyten (Pfeile) mit deutlich geschwollenem Zellkörper und verkürzten Fortsätzen (aktivierte Astrozyten) in einer *akuten* Läsion.

Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 29**

Geringgradig verminderte Anzahl **GFAP**-positiver Astrozyten (Pfeile) in einer *subakuten Läsion* mit Entzündung.

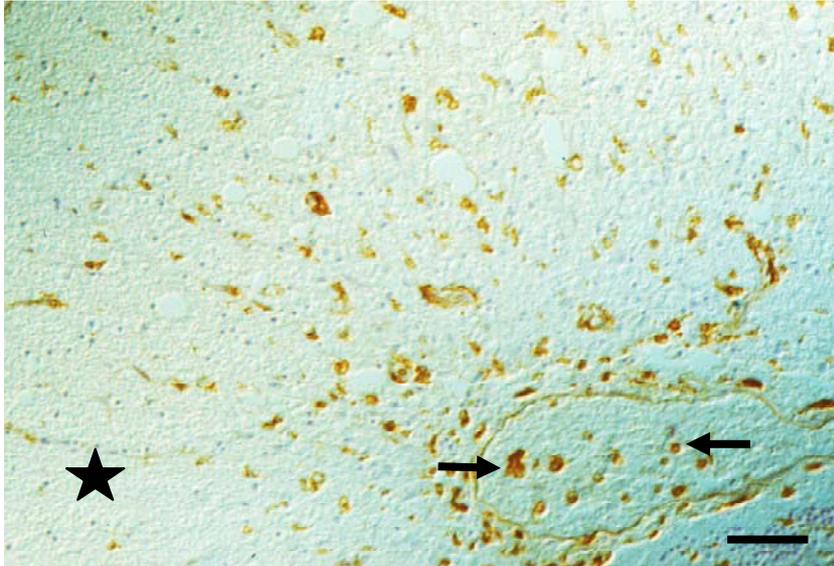
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 132 µm

**Abb. 30**

Detailvergrößerung aus Abb. 29

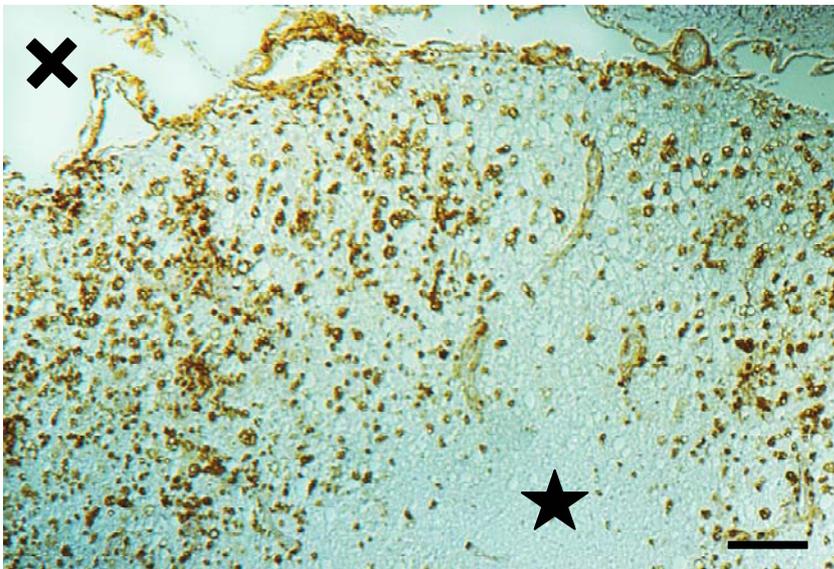
Deutlich abgerundete fibrilläre **GFAP**-positive Astrozyten (Pfeil) mit verkürzten Zellfortsätzen als Kennzeichen einer Aktivierung.

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 31**

Deutliche intraläsionale Zunahme **BS-1**-positiver Makrophagen/Mikroglia im Zentrum einer *akuten* Läsion im Gegensatz zur angrenzenden normalen Region (Stern) sowie intravaskulär gelegene positive Zellen (Pfeile).

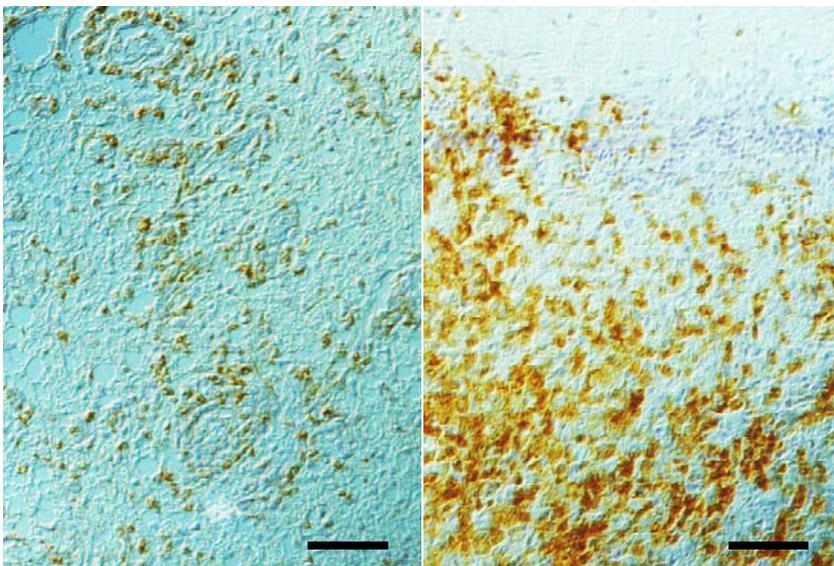
Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 32**

Mittel- bis teilweise hochgradige intraläsionale Zunahme **BS-1**-positiver Makrophagen/Mikroglia in einer *subakuten Läsion mit Entzündung* unter Aussparung der unveränderten Bezirke (Stern).

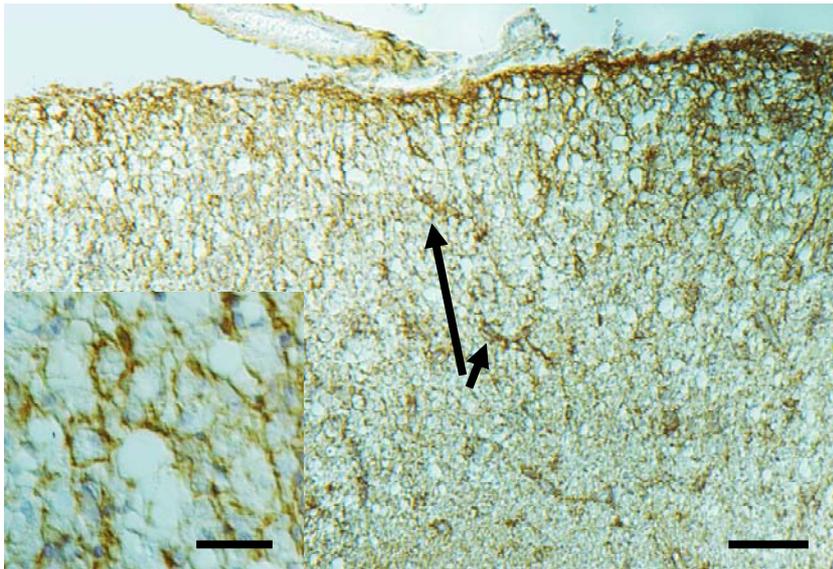
Kreuz = subarachnoidaler Raum

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 132 µm

**Abb. 33** (links)**Abb. 34** (rechts)

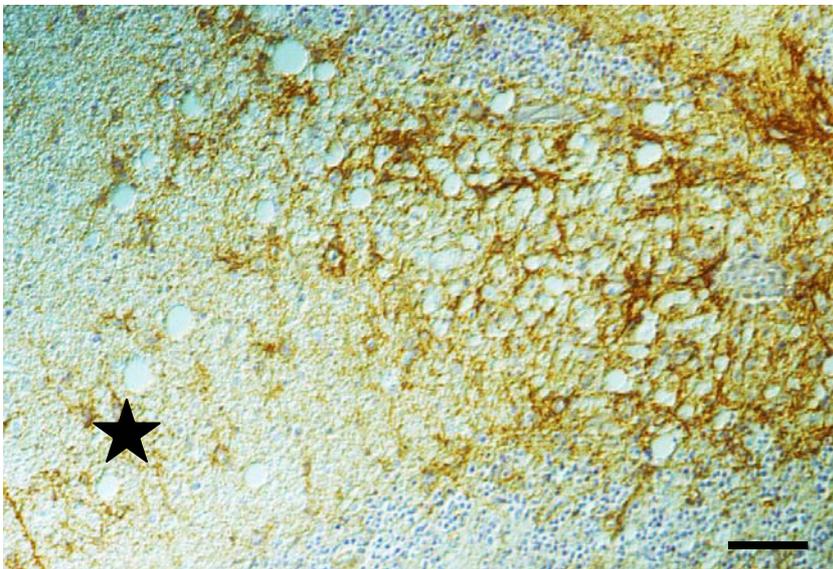
Mittel- bis hochgradige Zunahme intraläsional gelegener **BS-1**-positiver Zellen bei chronischen Läsionen, teilweise mit Verlagerung des Signals an den Randbereich der Läsion (Abb. 33).

Hund Nr. 13 (Abb. 33) bzw. Hund Nr. 12 (Abb. 34), Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 35**

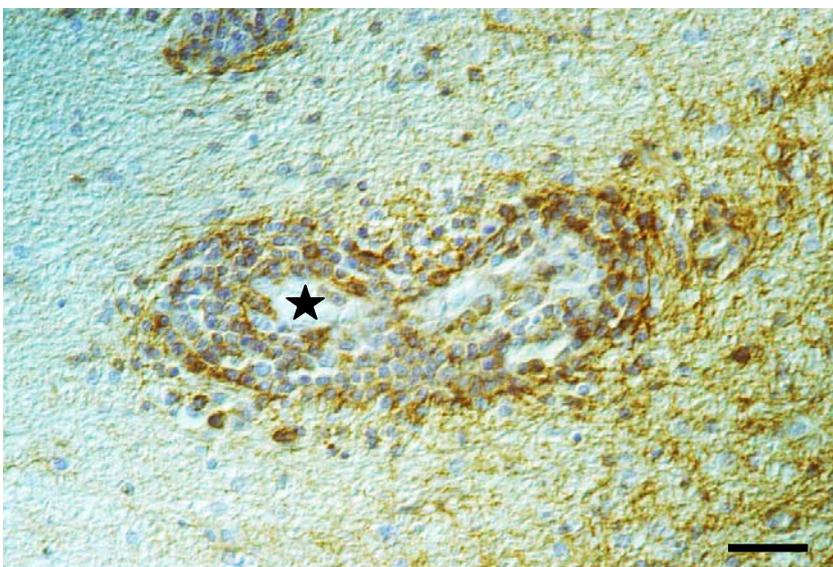
Mittelgradige Expression des **CD44**-Rezeptors, teilweise mit vaskulärer Orientierung (Pfeil) in einem *subakuten Herd mit Entzündung*. Das positive zellmembranständige Signal (Insert) verleiht der Läsion ein netzartiges Aussehen.

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 132  $\mu\text{m}$  (Insert: Bar = 33  $\mu\text{m}$ )

**Abb. 36**

Deutliches intraläsional verstärktes Signal für den **CD44**-Rezeptor im Vergleich zur angrenzenden unveränderten Region (Stern) in einer *subakuten Läsion mit Entzündung*.

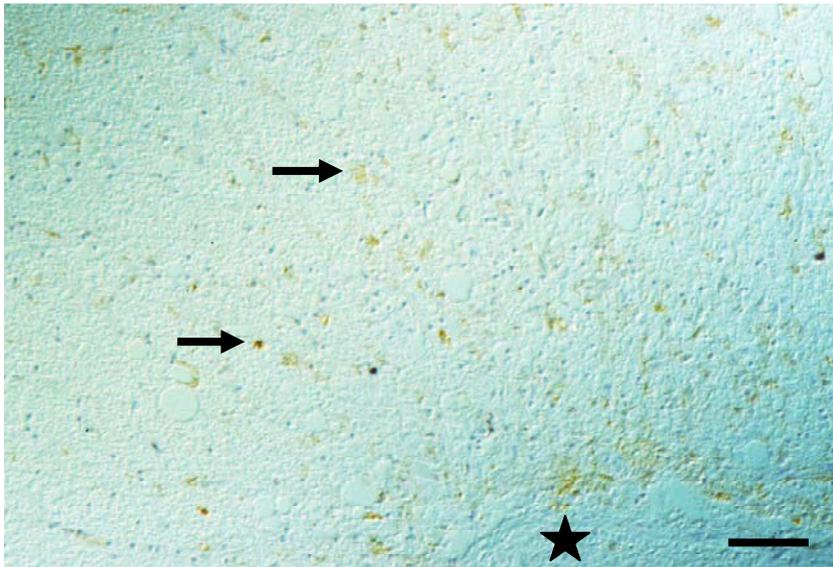
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66  $\mu\text{m}$

**Abb. 37**

Starkes positives Signal des **CD44**-Rezeptors auf perivaskulär gelegenen und einzelnen intravaskulären Lymphozyten in einer *chronischen Läsion*.

Stern = Gefäßlumen

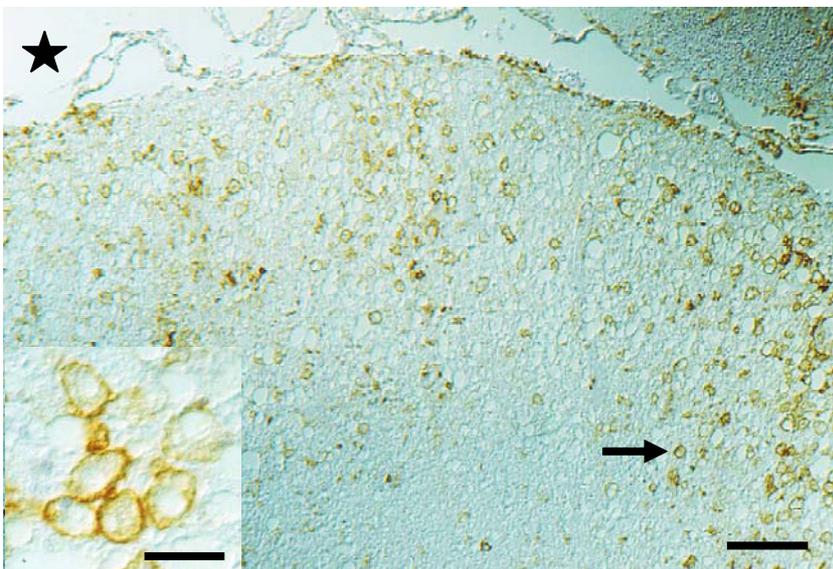
Hund Nr. 10, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 33  $\mu\text{m}$

**Abb. 38**

Intraläsionale geringgradige Aufregulation des **MHC Klasse II**-Rezeptors in einer *akuten* Läsion. Positive Zellen sind vornehmlich Makrophagen/Mikroglia (Pfeil).

Stern = Gefäßlumen

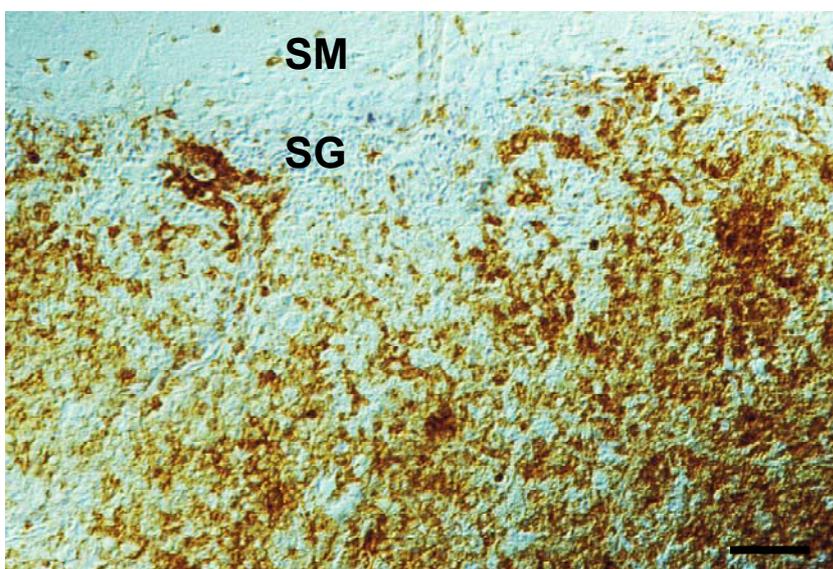
Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 39**

Mittel- bis hochgradige intraläsionale Zunahme des **MHC Klasse II**-Signals in einer *subakuten Läsion mit Entzündung* mit zellmembranständiger Akzentuierung (Pfeil und Insert).

Stern = subarachnoidaler Raum

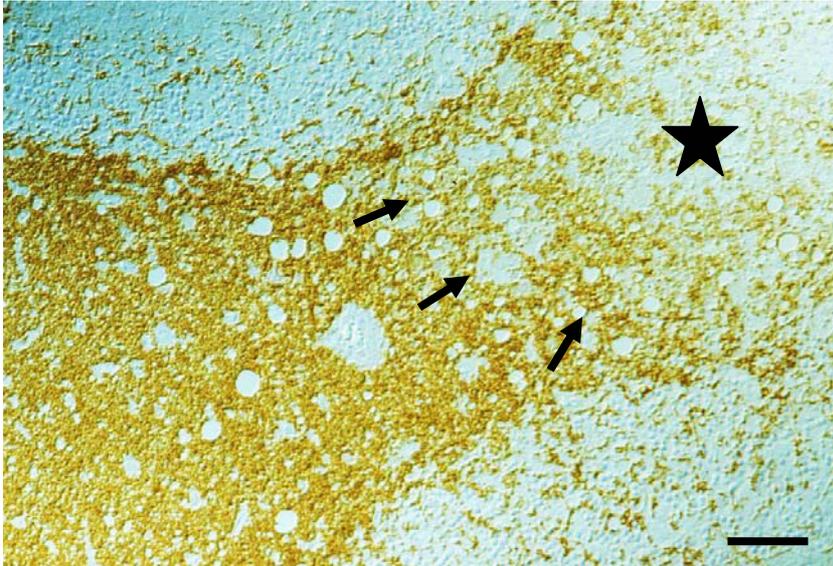
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 132 µm, (Insert: Bar = 33 µm)

**Abb. 40**

Hochgradige intraläsionale Zunahme **MHC Klasse II**-positiver Zellen in einer *chronischen* Läsion mit zahlreichen Makrophagen/Mikroglia.

SM = Str. moleculare  
SG = Str. granulosum

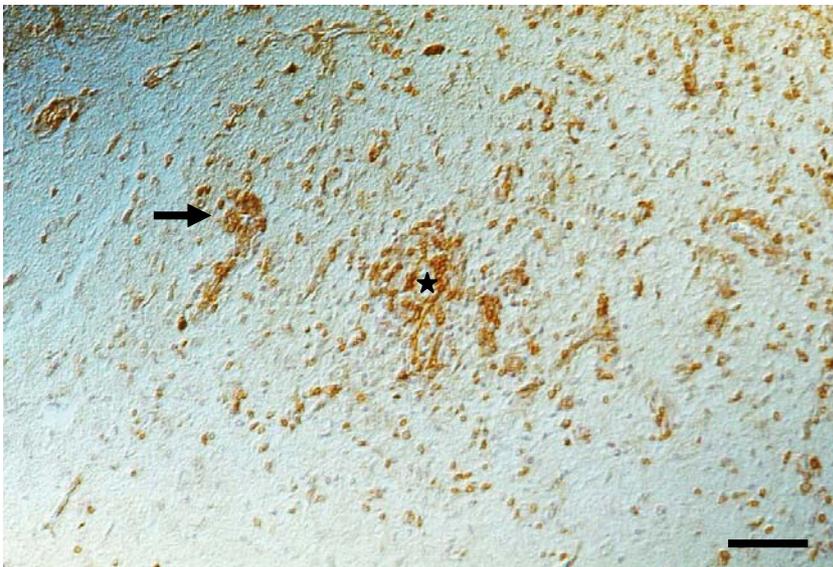
Hund Nr. 12, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 41**

Intraläsional gering- bis mittelgradig verminderter Expression des **MBP** als Hinweis auf eine Demyelinisierung (Pfeile) in einer *subakuten Läsion mit Entzündung*.

Stern = intraläsional

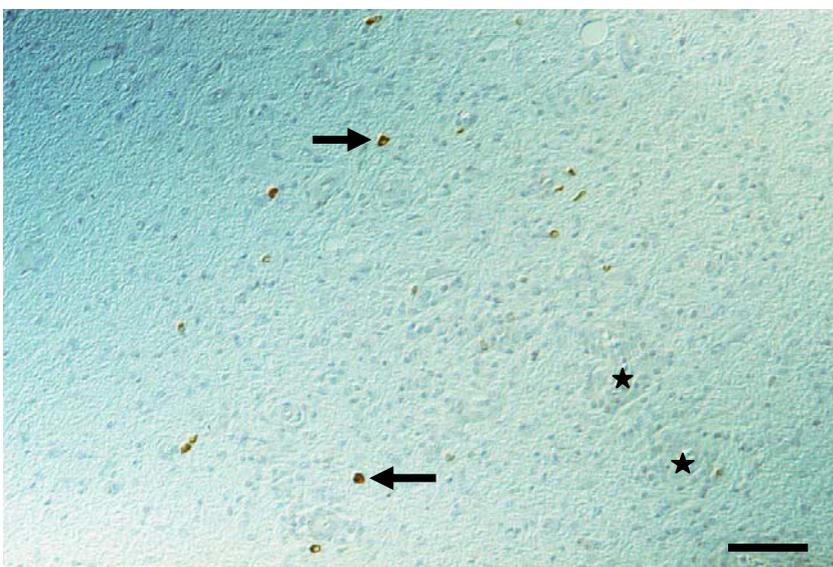
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66  $\mu$ m

**Abb. 42**

Mittel- bis hochgradige intraläsionale diffus verteilte und perivaskulär (Pfeil) liegende Infiltration mit **CD3 $\epsilon$** -positiven Lymphozyten in einer *chronischen Läsion*.

Stern = Gefäßlumen

Hund Nr. 10, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66  $\mu$ m

**Abb. 43**

Gering- bis mittelgradig verstärkte Expression diffus verteilter **CD79 $\alpha$** -positiver Zellen (Pfeil) in einer *chronischen Läsion*.

Stern = perivaskuläre Infiltrate

Hund Nr. 10, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66  $\mu$ m

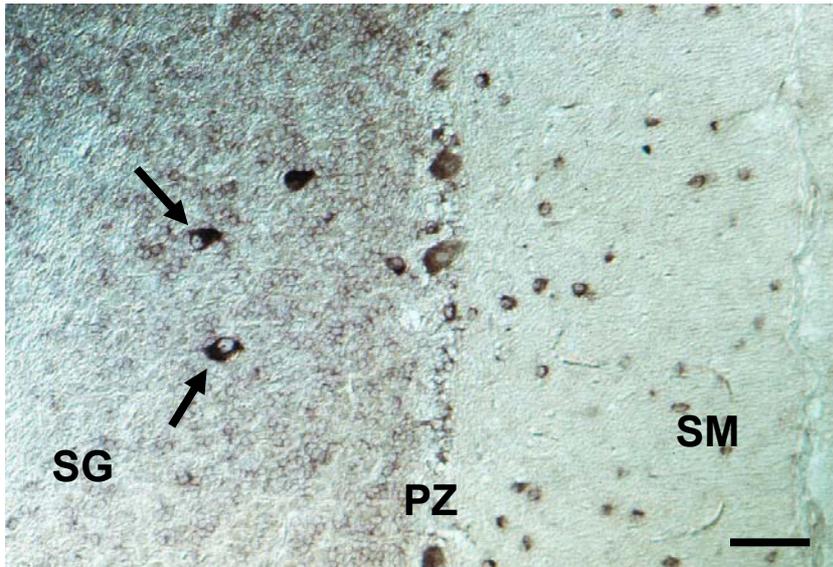


Abb. 44

Zahlreiche **GAPDH-mRNS**-exprimierende Zellen (*“antisense“-Sonde*) bei einem *Kontrolltier* im Str. granulosum (SG), im Str. moleculare (SM) und der Purkinjezellschicht (PZ); die großen Zellen stellen ektopische Purkinjezellen dar (Pfeile).

Hund Nr. 17, Gruppe I, Kleinhirn, graue Substanz, *in situ*-Hybridisierung (ISH), NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

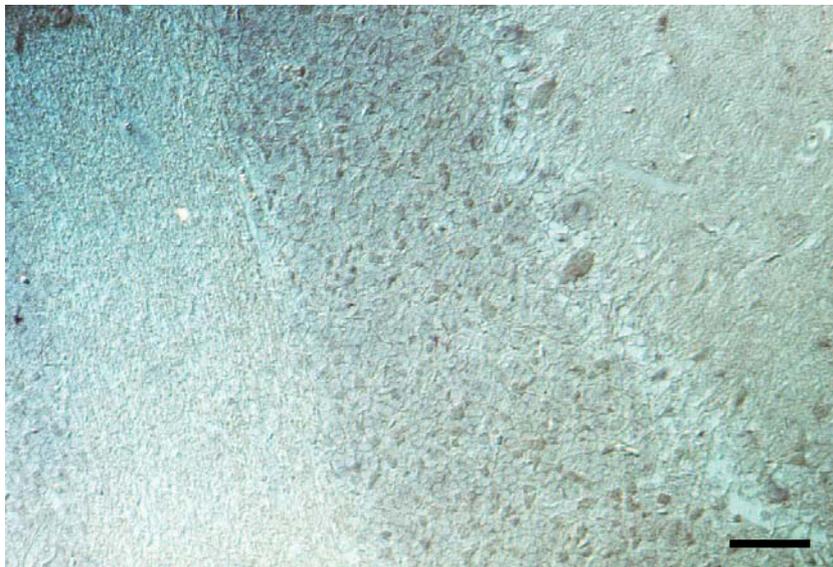


Abb. 44a

(Folgeschnitt zu Abb. 44)

Kein positives Signal für **GAPDH** bei Verwendung der spezifischen *“sense“-Sonde* (Negativkontrolle) zum Nachweis genomischer DNS.

Hund Nr. 17, Gruppe I, Kleinhirn, graue Substanz, ISH, *“sense“-Sonde* NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

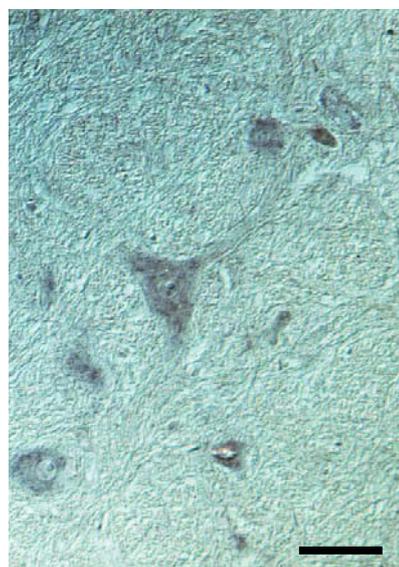
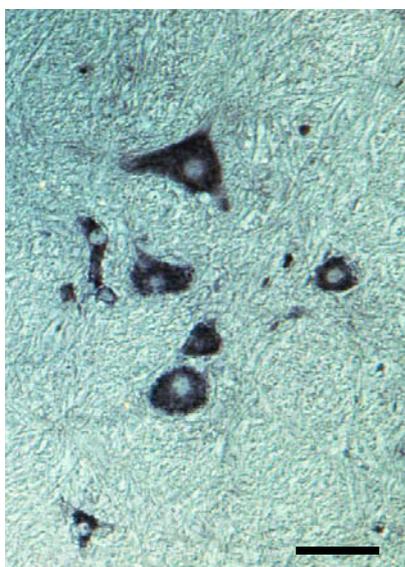


Abb. 45 (links)

Abb. 45a (rechts)

Links: Nachweis der **GAPDH-mRNS** (*“antisense“-Sonde*) in Neuronen des Kerngebietes im Marklager.

Rechts: Negativkontrolle bei Verwendung der spezifischen *“Sense“-Sonde*.

Hund Nr. 17, Gruppe I, Kleinhirn, graue Substanz, ISH, *“antisense“- bzw. “sense“-Sonde*, NBT/X-Phosphat, Bar je = 66 µm

**Abb. 46**

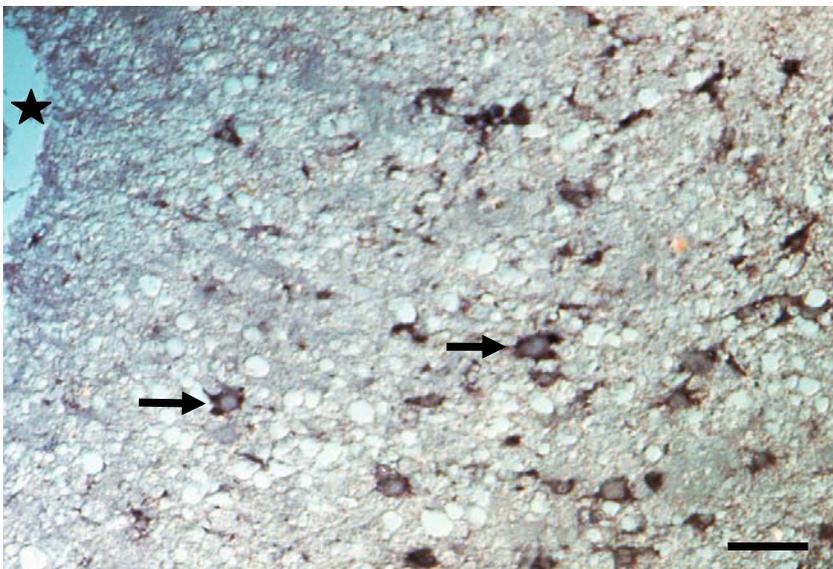
Nachweis zahlreicher intraläsional gelegener **Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS**-positiver Astrozyten (Pfeil) mittels der spezifischen “*antisense*“-Sonde innerhalb einer *akuten* Läsion.

Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, “*antisense*“-Sonde, NBT/X-Phosphat. Bar = 66 µm

**Abb. 46a**

(Folgeschnitt zu Abb. 46)  
Negativkontrolle zu Abb. 46 durch Auftragen des **Hybridisierungs-Mix**.

Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 47**

Mittlere Anzahl **Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS**-positiver Zellen, die vorwiegend Gemistozyten (Pfeil) darstellen und vor allem im Randbereich der *subakuten Läsion mit Entzündung* liegen.

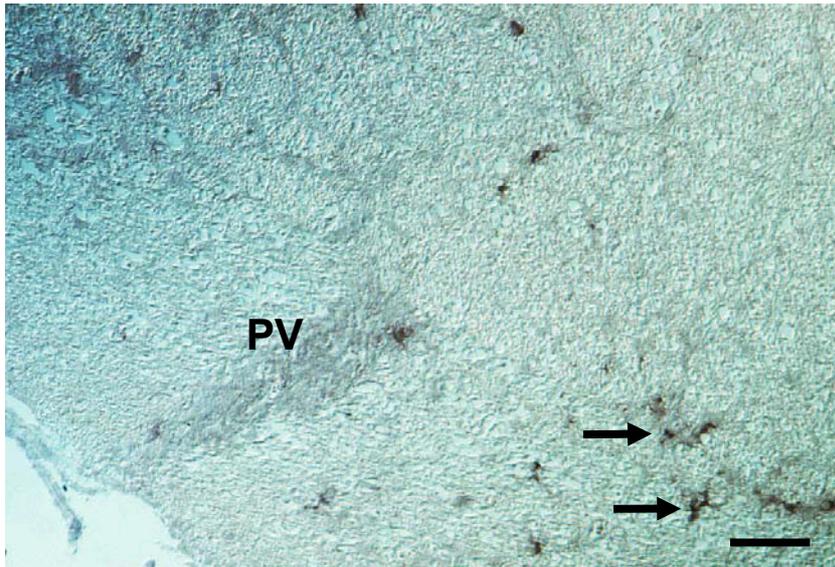
Stern = subarachnoidaler Raum

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, “*antisense*“-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 47a**

(Folgeschnitt zu Abb. 47)  
Negativkontrolle zu Abb. 47 durch Auftragen des **Hybridisierungs-Mix**.

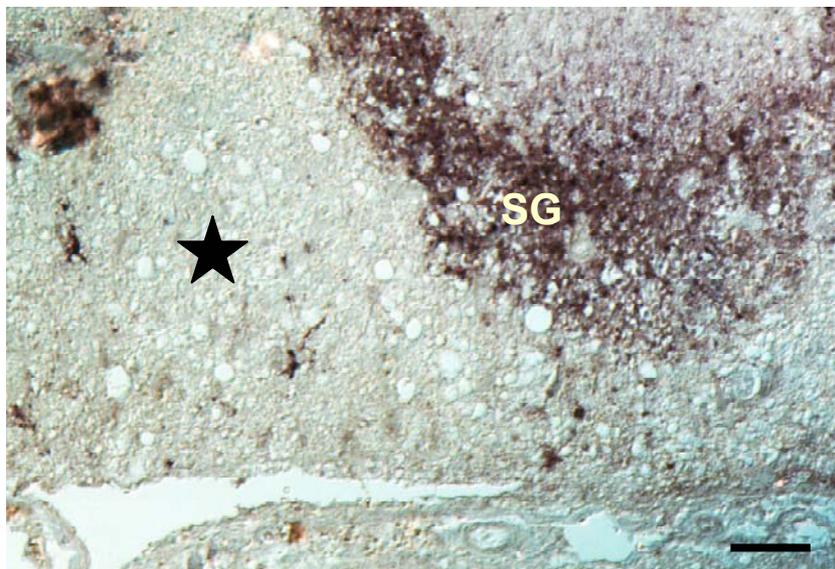
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 48**

Nur noch einzelne im Randbereich liegende **Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS**-positive Zellen (Pfeile) in einer *chronischen* Läsion

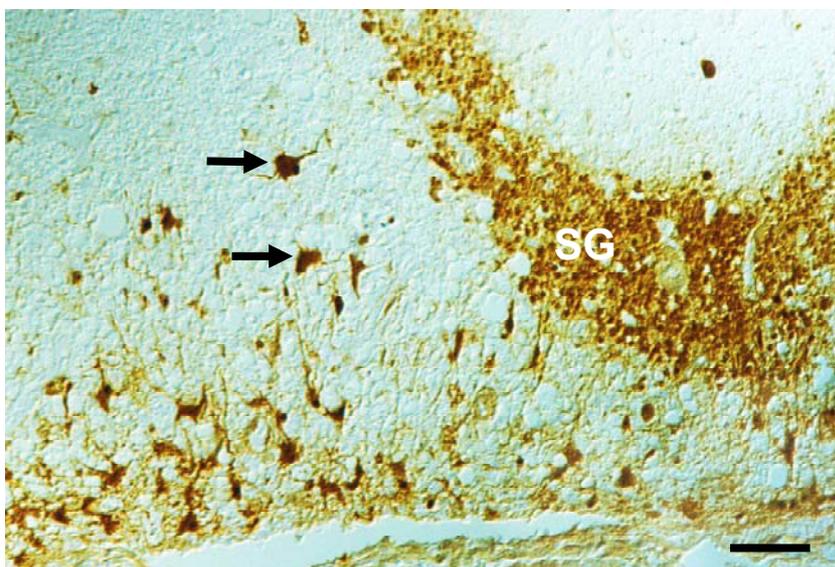
PV = perivaskuläres Infiltrat.

Hund Nr. 10, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 49**

Reduktion der **Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS**-Expression im Zentrum einer *subakuten Läsion mit Entzündung* (Stern) und einem starken Signal im angrenzenden Stratum granulosum (SG).

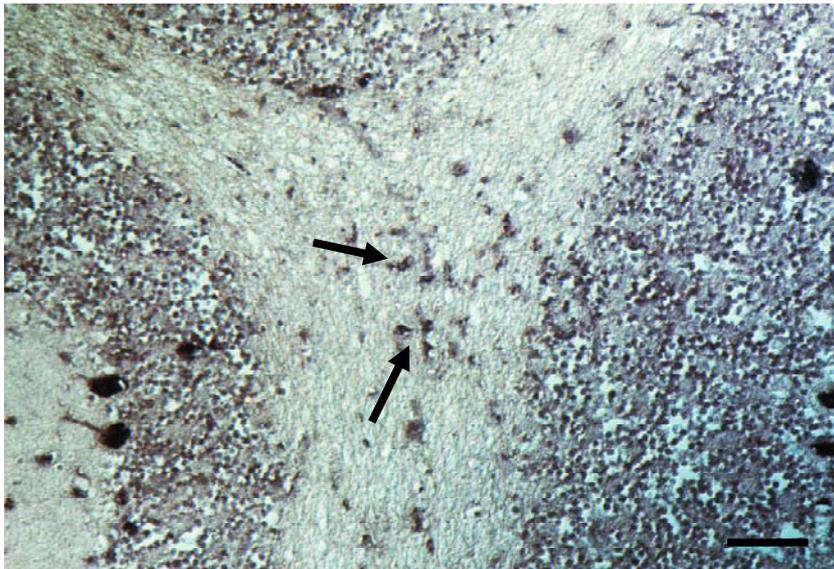
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 50**

Identische Lokalisation zu Abb. 49.

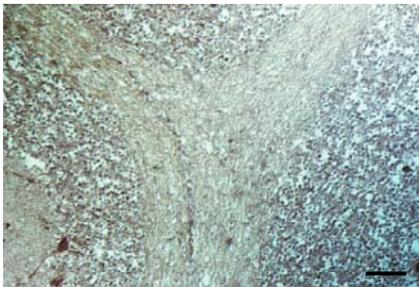
Starkes positives Signal für **Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen** im Stratum granulosum (SG) und zusätzlich zahlreiche positive intraläsional gelegene Astrozyten (Pfeil).

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ABC-Methode, Bar = 66 µm

**Abb. 51**

Intraläsionale Ansammlung von **MMP-9-mRNS**-positiven Zellen (Pfeile) in einer *akuten* Läsion.

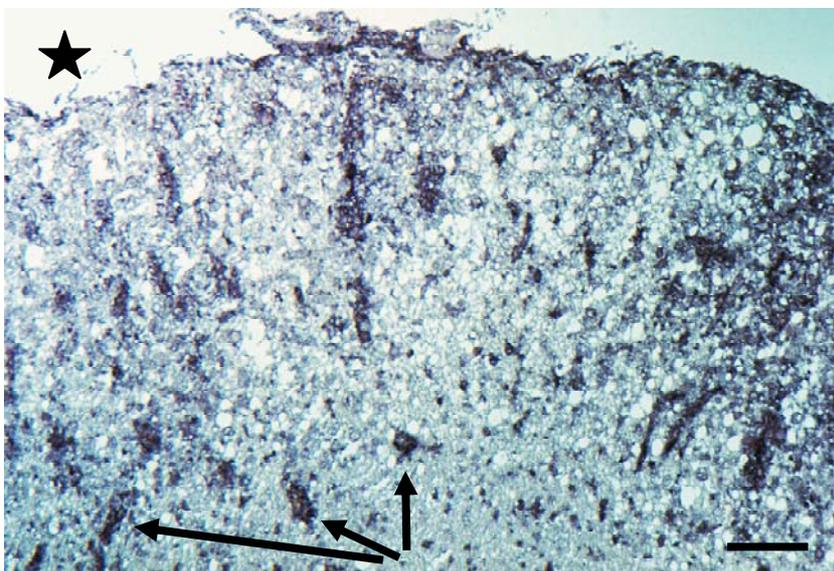
Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 51a**

Folgeschnitt zu Abb. 51

Negativkontrolle durch Verwendung der **MMP-9**-"sense"-Sonde. Kein Signal nachweisbar.

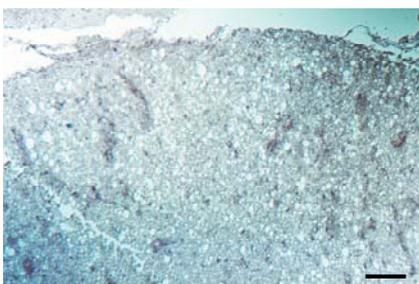
ISH, Sense-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 52**

Mittelgradige Zunahme **MMP-9-mRNS**-positiver intraläsionaler (Gemistozysten und Gitterzellen) und perivaskulärer lymphohistiozytärer Zellen (Pfeile) in einer *subakuten Läsion mit Entzündung*.

Stern = subarachnoidaler Raum

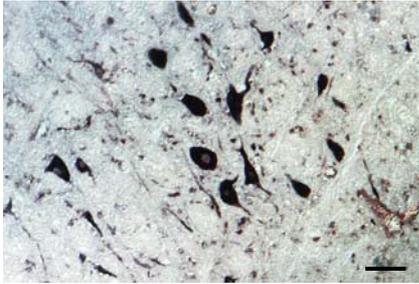
Hund Nr. 1, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb 52a**

Folgeschnitt zu Abb. 52

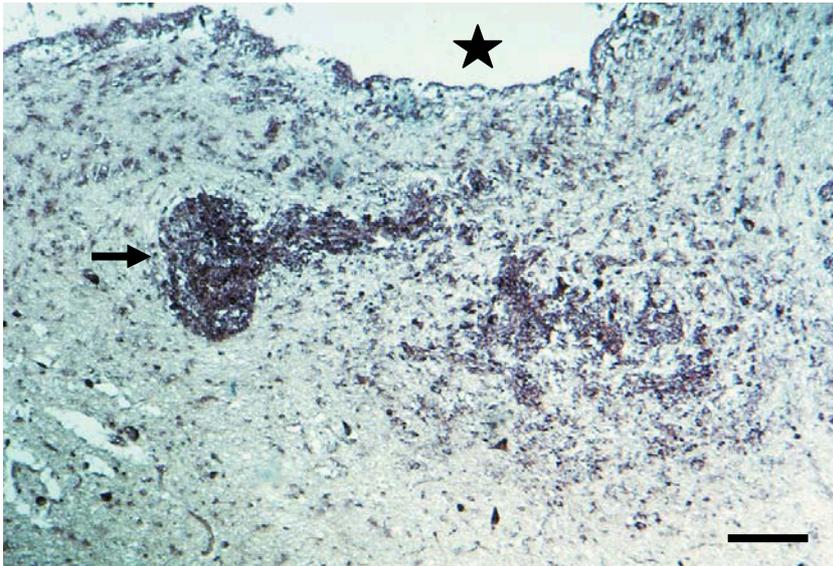
Negativkontrolle durch Verwendung der **MMP-9**-"sense"-Sonde. Kein Signal nachweisbar

ISH, "sense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb. 53**

**MMP-9-mRNS-positive** Neuronen im Marklager eines an Staupe erkrankten Tieres.

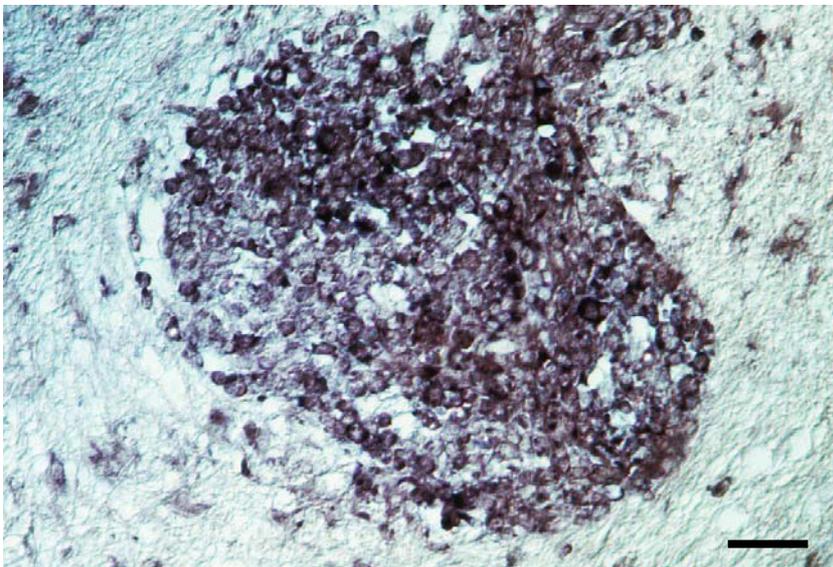
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, graue Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 54**

Hochgradige Zunahme **MMP-9-mRNS-positiver** Zellen in einem *chronischen* Herd mit starker diffuser intraläsionaler und perivaskulärer (Pfeil) lymphohistiozytärer Infiltration.

Stern = IV. Ventrikel

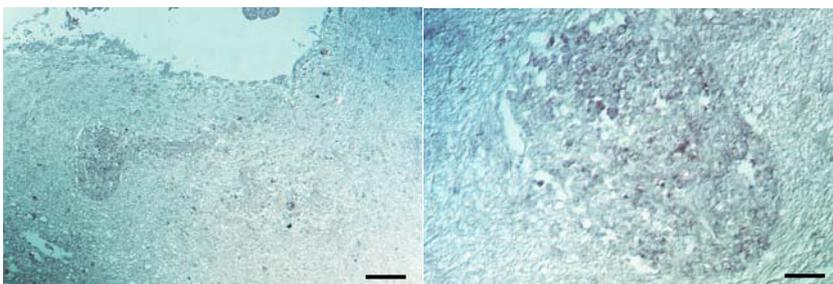
Hund Nr. 2, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb. 55**

Detailvergrößerung aus Abb. 54.

Deutlich positive **MMP-9-mRNS-Expression** überwiegend auf Lymphozyten und Makrophagen in einem perivaskulären Infiltrat.

Hund Nr. 2, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 33 µm

**Abb. 54a** (links)**Abb. 55a** (rechts)

Folgeschnitte zu Abb. 54 + 55  
Negativkontrollen durch Verwendung der **MMP-9-**"sense"-Sonde. Kein Signal nachweisbar.

ISH, "sense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 + 33 µm

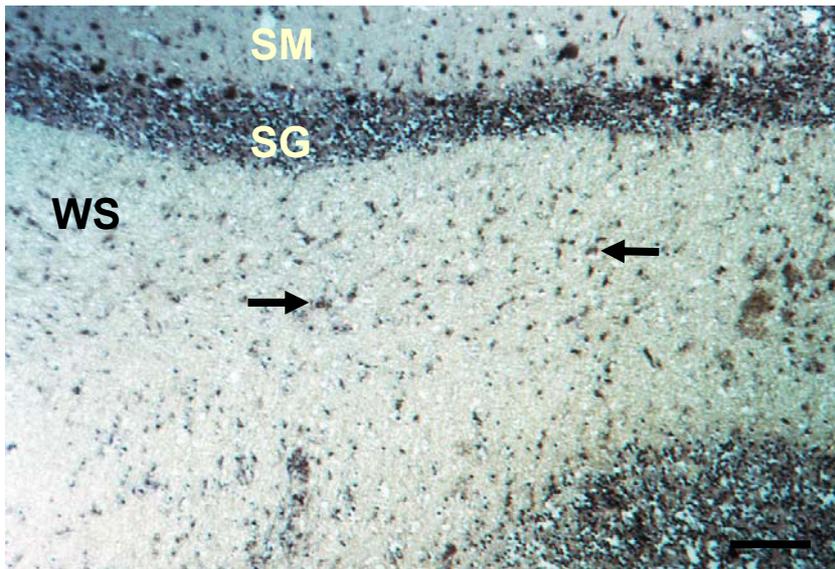


Abb. 56

Geringgradige Zunahme **MMP-14-mRNS**-positiver Zellen (Pfeile) in der weißen Substanz (WS) in einer in der HE-Färbung *nicht sichtbaren* Läsion.

Str. granulosum (SG),  
Str. moleculare (SM)

Hund Nr. 4, Gruppe II, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

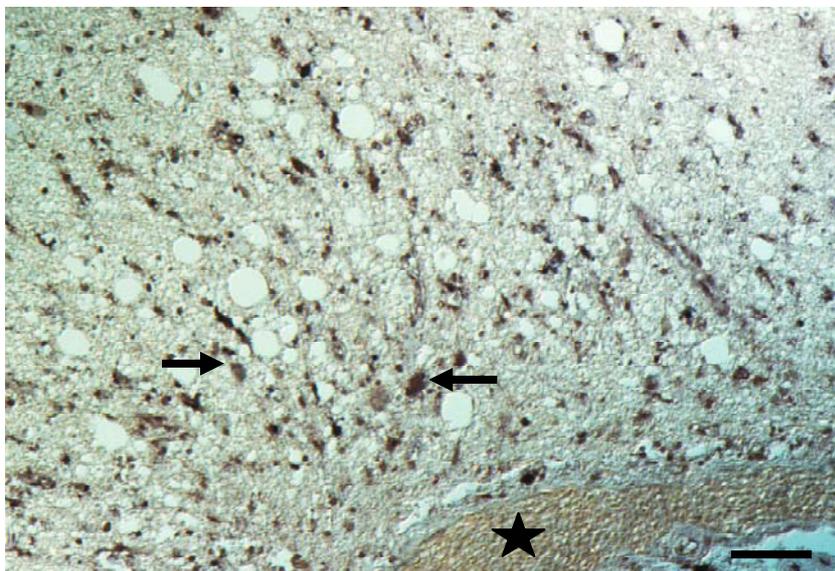


Abb. 57

Gering- bis mittelgradige Zunahme **MMP-14-mRNS**-positiver Zellen in einer *akuten* Läsion, wobei die Hauptzellpopulation Astrozyten darstellen (Pfeile).

Stern = Gefäß

Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

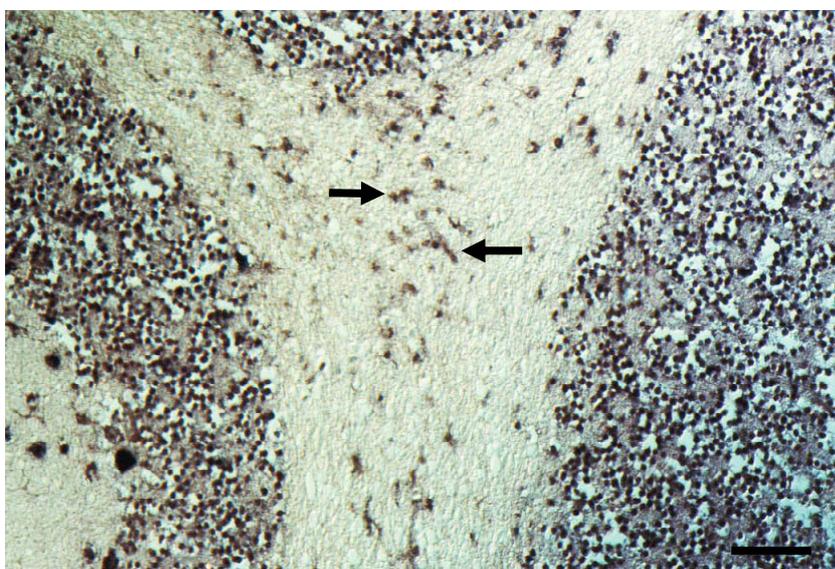
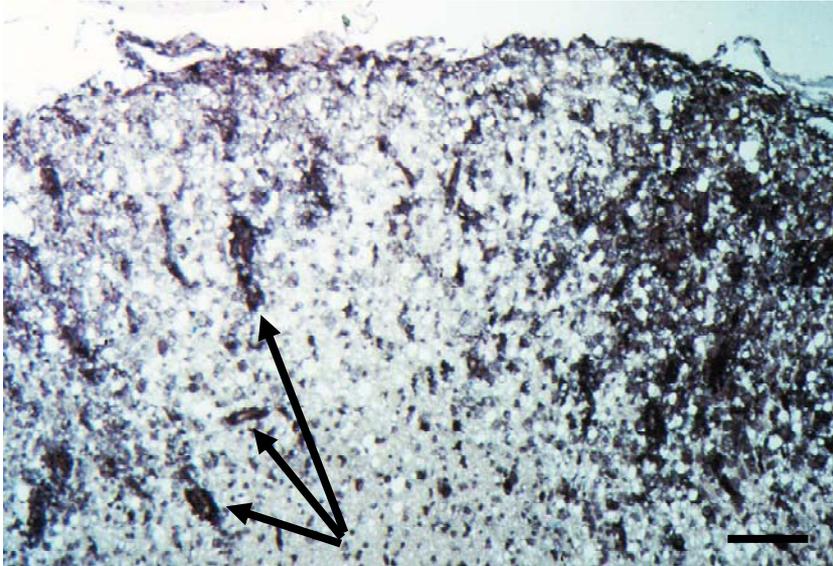


Abb. 58

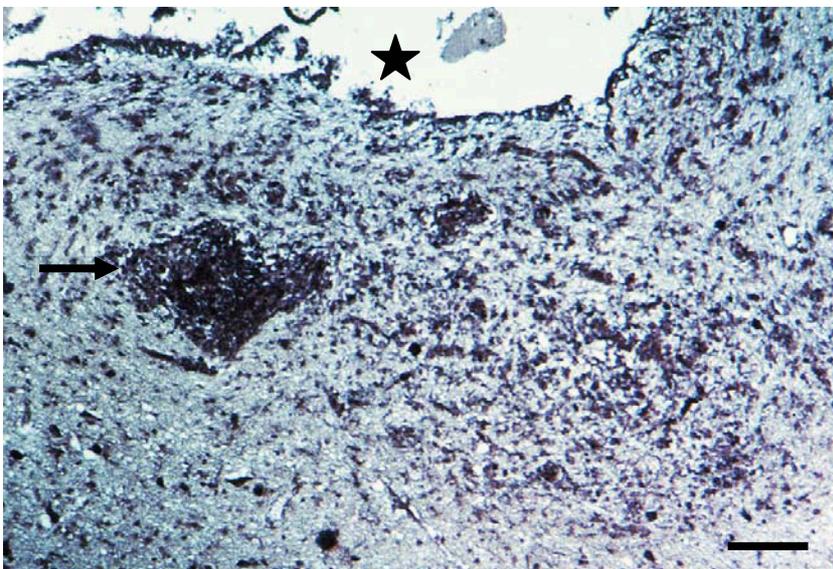
Einzelne intraläsional gelegenen **MMP-14-mRNS**-positive Zellen in der weißen Substanz (Pfeile) einer *akuten* Läsion.

Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 59**

Zahlreiche, peripher akzentuiert liegende intraläsionale (Gemistozysten und Gitterzellen) und perivaskuläre (Pfeil) lymphohistiozytäre **MMP-14-mRNS**-positive Zellen in einer *subakuten Läsion mit Entzündung*.

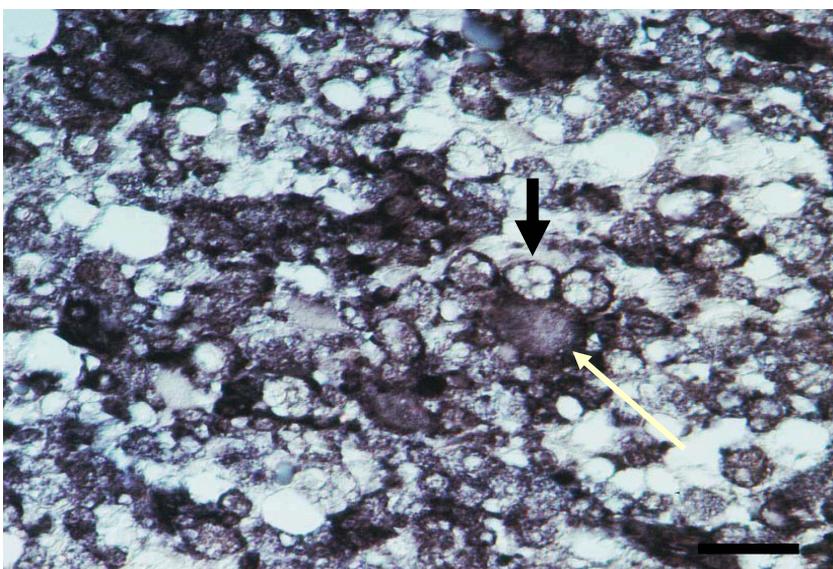
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb. 60**

Hochgradige Zunahme **MMP-14-mRNS**-positiver Zellen in einem *chronischen* Herd mit starker intraläsionaler und perivaskulärer (Pfeil) lymphohistiozytäre Infiltration.

Stern = IV. Ventrikel

Hund Nr. 2, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb. 61**

Detailvergrößerung aus Abb. 59.

Deutlich sichtbare **MMP-14-mRNS**-positive Gitterzellen (dicker Pfeil) und Gemistozysten (dünner Pfeil), sowie einzelne Lymphozyten.

Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 33 µm

Abb. 56a



Abb. 59a

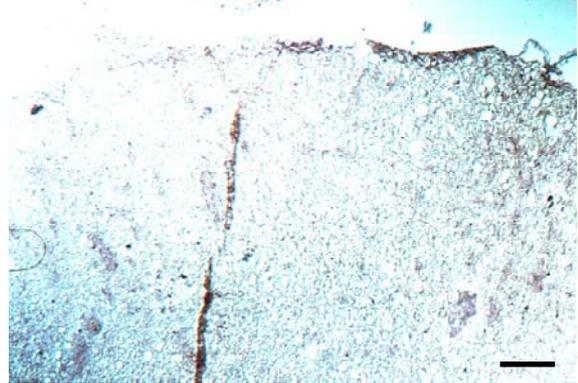


Abb. 57a

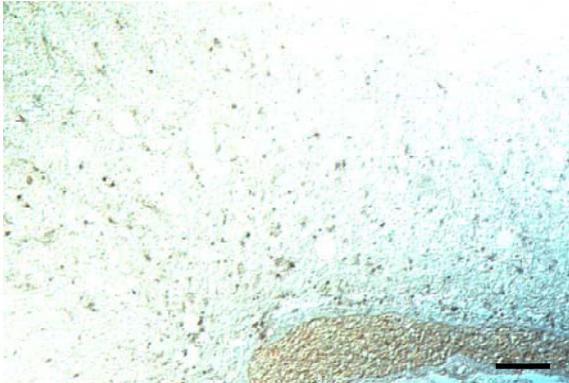


Abb. 60a

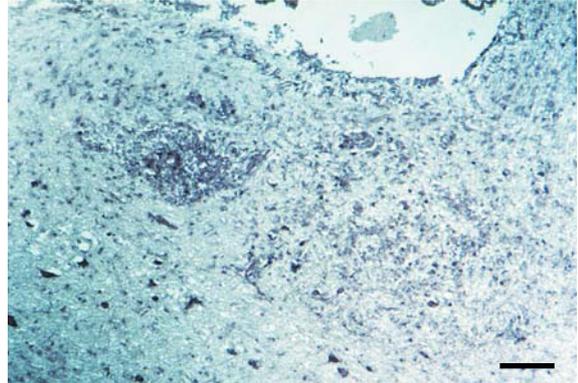


Abb. 58a



**Abb. 56a:** Folgeschnitt zu Abb. 56, Bar = 132  $\mu\text{m}$

**Abb. 57a:** Folgeschnitt zu Abb. 57, Bar = 66  $\mu\text{m}$

**Abb. 58a:** Folgeschnitt zu Abb. 58, Bar = 66  $\mu\text{m}$

**Abb. 59a:** Folgeschnitt zu Abb. 59, Bar = 132  $\mu\text{m}$

**Abb. 60a:** Folgeschnitt zu Abb. 60, Bar = 132  $\mu\text{m}$

**Abb. 56a – 60a** stellen die Negativkontrollen zu Abb. 56 – 60 durch Verwendung der **MMP-14-“sense“**-Sonde dar. Kein Signal nachweisbar.

Alle Schnitte: Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, “sense“-Sonde, NBT/X-Phosphat

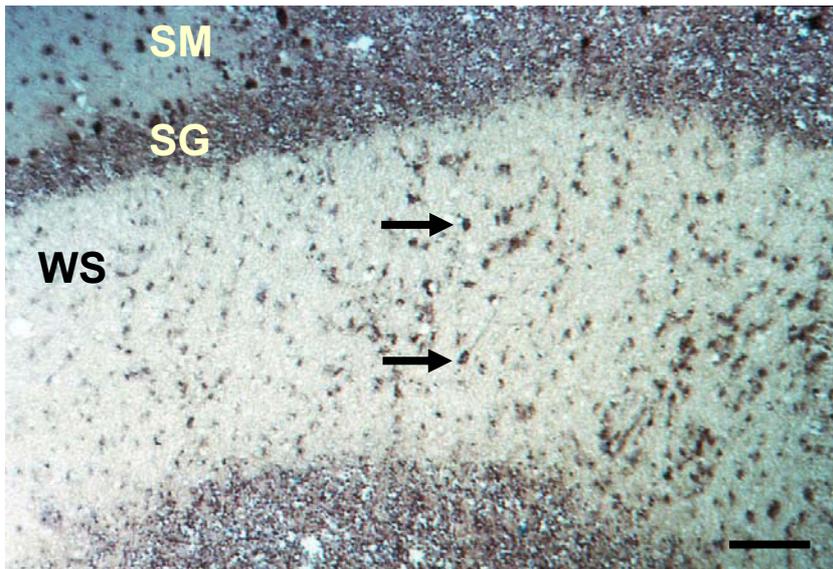


Abb. 62

Geringgradige Zunahme **TIMP-1-m-RNS**-positiver Zellen (Pfeil) in der weißen Substanz (WS) in einer in der HE-Färbung *nicht sichtbaren* Läsion.

Str. granulosum (SG),  
Str. moleculare (SM)

Hund Nr. 4, Gruppe II, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

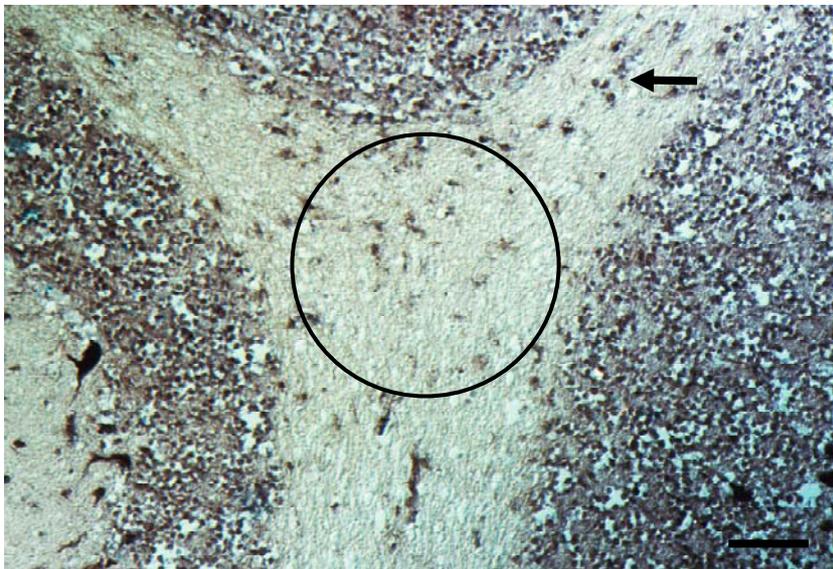


Abb. 63

Vereinzelt intra- (Kreis) und extraläsional (Pfeil) gelegene **TIMP-1-mRNS**-positive Zellen in der weißen Substanz einer *akuten* Läsion.

Hund Nr. 4, Gruppe III, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

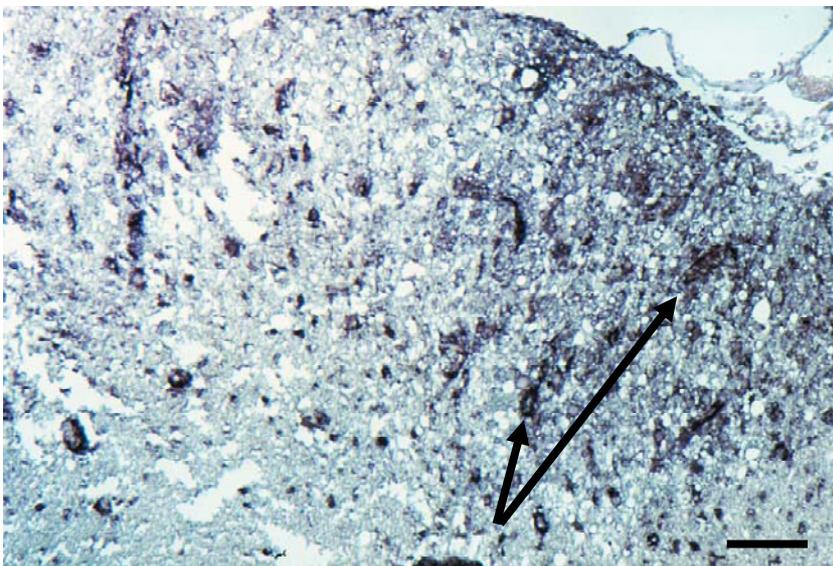
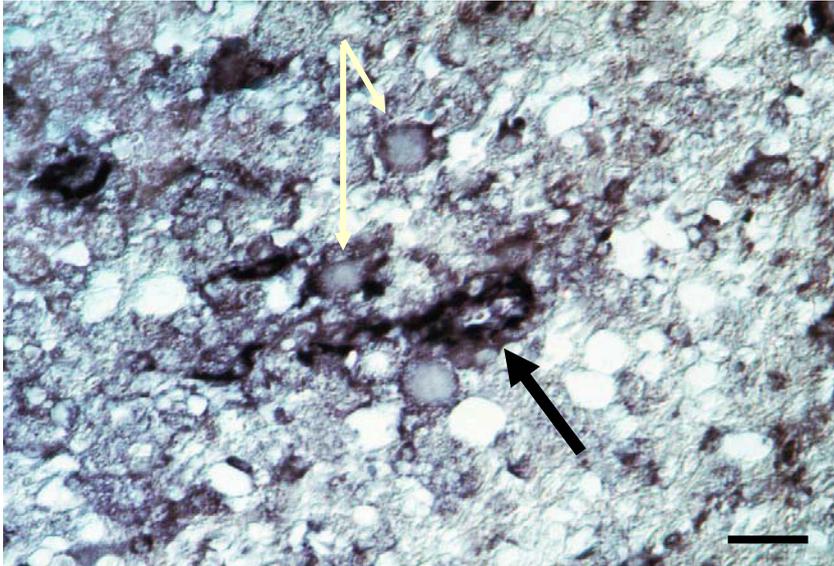


Abb. 64

Stark perivaskulär bzw. vaskulär (Pfeile) akzentuiertes Signal für **TIMP-1-mRNS** in einer *subakuten Läsion mit Entzündung*. Zusätzlich zeigen zahlreiche Gemistozyten und Gitterzellen ein positives Signal.

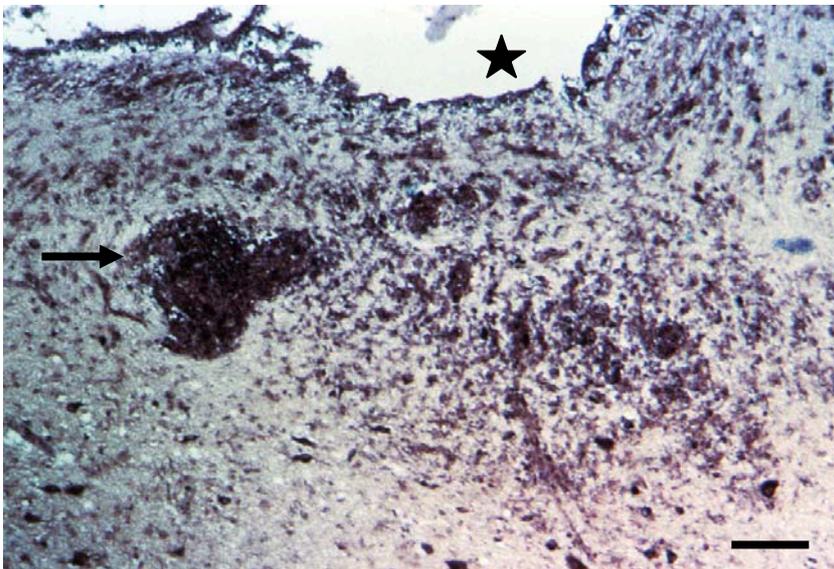
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb. 65**

Detailvergrößerung aus Abb. 64.

Deutlich positive **TIMP-1-mRNS**-Expression in Gemistozyten (dünner Pfeil) und perivaskulär gelegene Lymphozyten (dicker Pfeil).

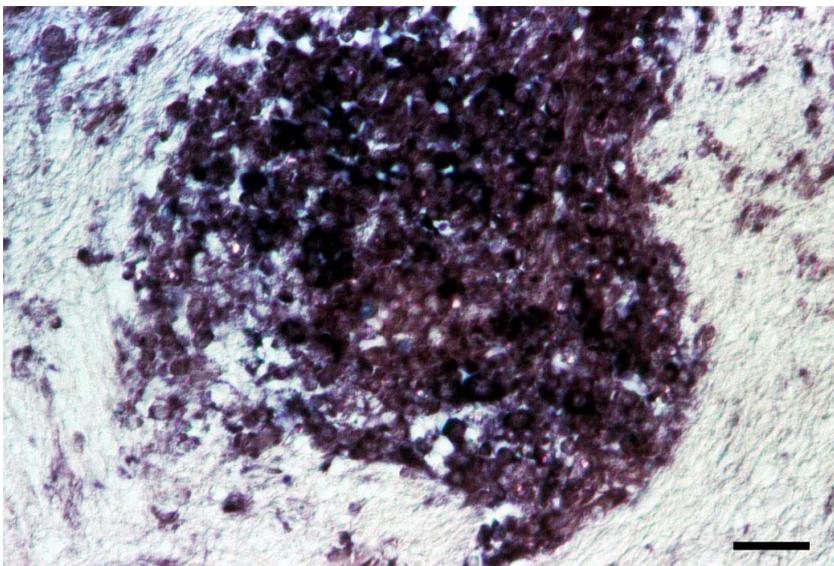
Hund Nr. 1, Gruppe IV, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 33 µm

**Abb. 66**

Hochgradige Zunahme **TIMP-1-mRNS**-positiver Zellen in einem *chronischen* Herd mit starker intraläsionaler und perivaskulärer (Pfeil) lymphohistiozytärer Infiltration.

Stern = IV. Ventrikel

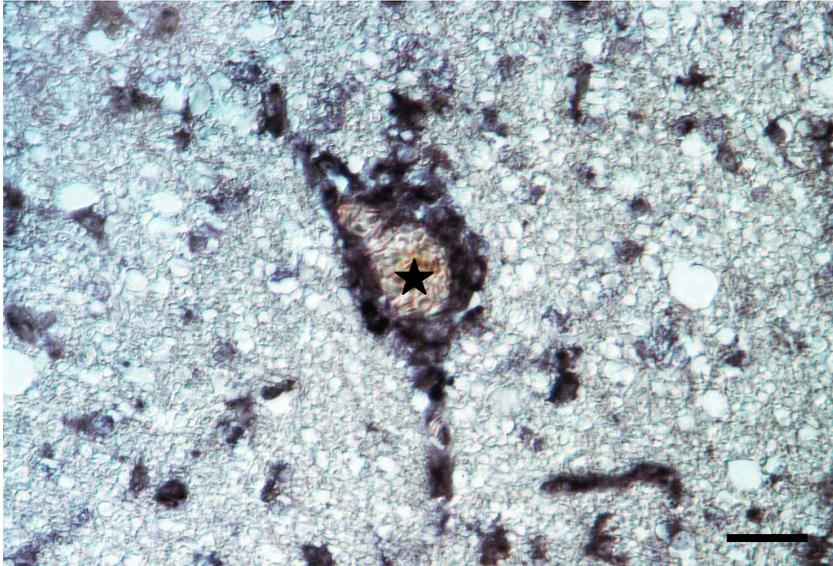
Hund Nr. 2, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 132 µm

**Abb. 67**

Detailvergrößerung aus Abb. 66.

Deutlich positive **TIMP-1-mRNS**-Expression überwiegend auf Lymphozyten und Makrophagen in einem perivaskulären Infiltrat.

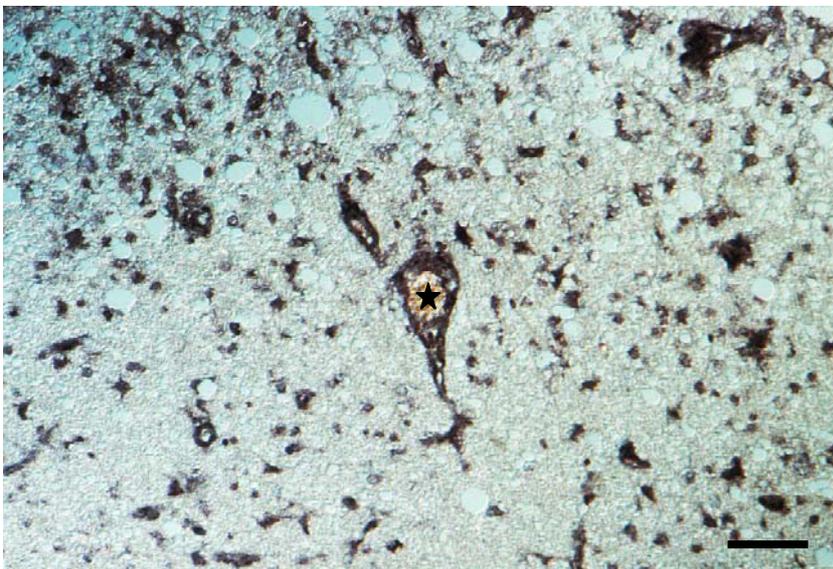
Hund Nr. 2, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 33 µm

**Abb. 68**

Deutlich positive **MMP-9-mRNS**-Expression überwiegend auf Lymphozyten und Makrophagen in einem perivaskulären Infiltrat in einer *chronischen* Läsion.

Stern = Gefäßlumen

Hund Nr. 12, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 33 µm

**Abb. 69**

Deutlich positive **MMP-14-mRNS**-Expression überwiegend auf Lymphozyten und Makrophagen in einem perivaskulären Infiltrat in einer *chronischen* Läsion.

Stern = Gefäßlumen

Hund Nr. 12, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 66 µm

**Abb. 70**

Weniger stark ausgeprägte **TIMP-1-mRNS**-Expression überwiegend auf Lymphozyten und Makrophagen in einem perivaskulären Infiltrat in einer *chronischen* Läsion.

Stern = Gefäßlumen

Hund Nr. 12, Gruppe V, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, "antisense"-Sonde, NBT/X-Phosphat, Bar = 33 µm

Abb. 68a



Abb. 70a

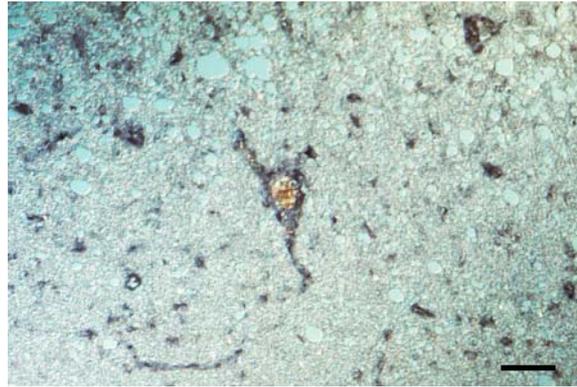


Abb. 69a



**Abb. 68a:** Folgeschnitt zu Abb. 68, Bar = 66  $\mu\text{m}$

**Abb. 69a:** Folgeschnitt zu Abb. 69, Bar = 66  $\mu\text{m}$

**Abb. 70a:** Folgeschnitt zu Abb. 70, Bar = 66  $\mu\text{m}$

**Abb. 68a – 70a** stellen die Negativkontrollen zu Abb. 68 – 70 durch Verwendung der spezifischen “sense“-Sonden dar. Kein spezifisches Signal nachweisbar.

Alle Schnitte: Kleinhirn, weiße Substanz, ISH, “sense“-Sonde, NBT/X-Phosphat

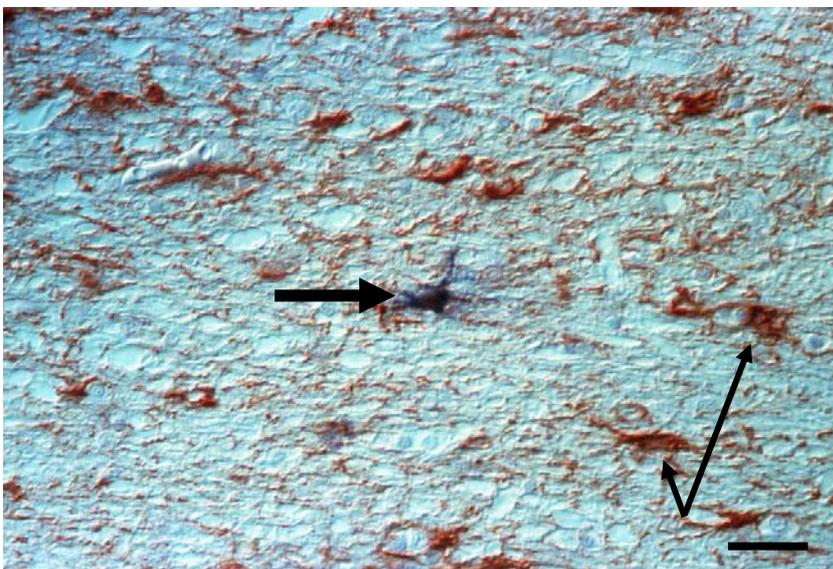
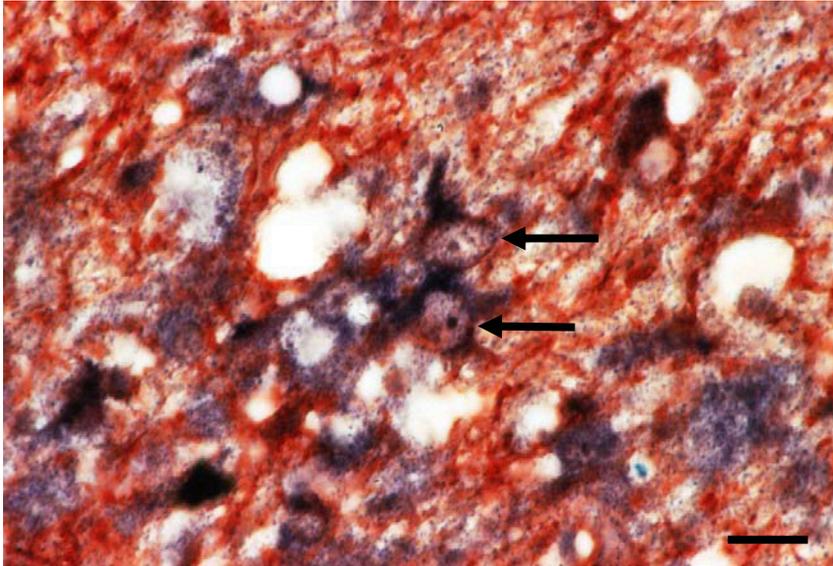


Abb. 71

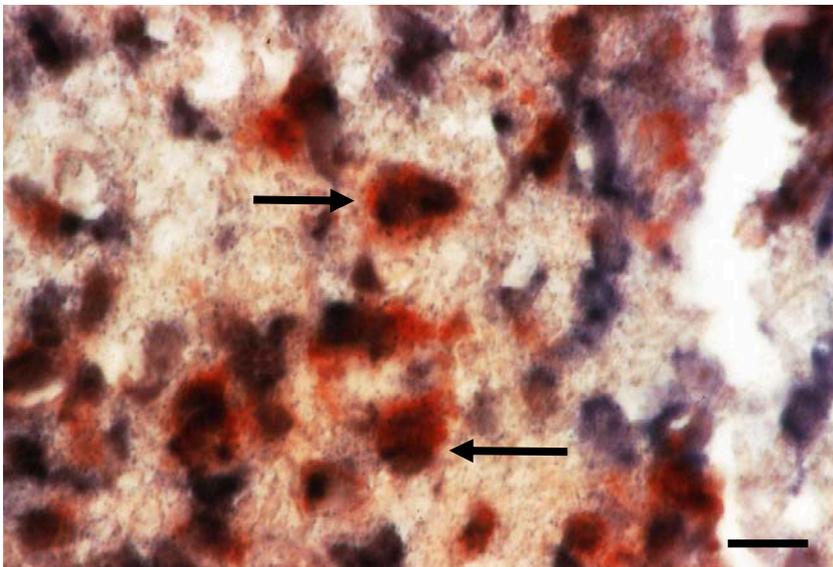
Für **Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS** (blau) und **GFAP** (rot) doppelmarkierter Astrozyt, der sich durch eine blaue-rote Mischfarbe darstellt (dicker Pfeil). Nur GFAP-markierte Astrozyten sind rot dargestellt (dünner Pfeil).

Hund Nr. 7, Gruppe II, Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 33  $\mu\text{m}$

**Abb. 72**

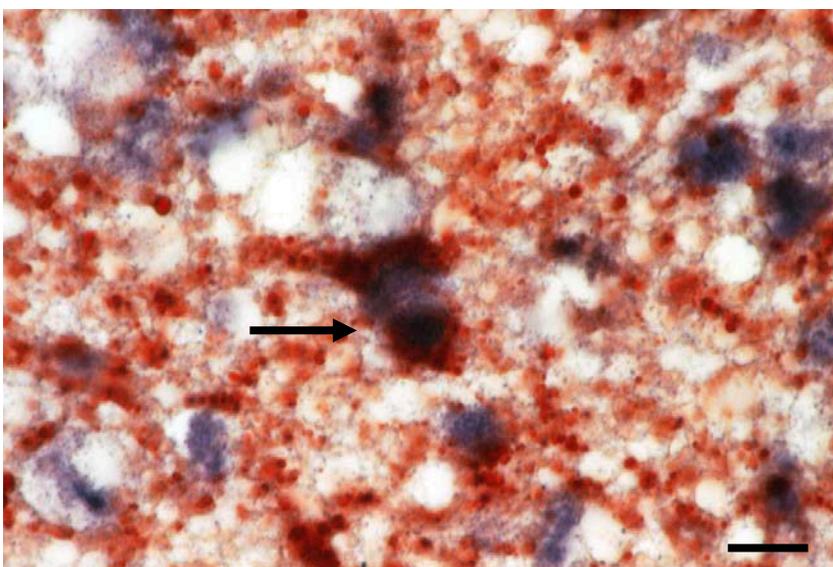
Doppelmarkierung zur Darstellung der **MMP-9-mRNS-Expression** (blau) durch **Astrozyten** (GFAP, rot). In einzelnen Zellen ist eine rot-blaue Mischfarbe (Pfeile) erkennbar.

Hund Nr. 3, Gruppe IV  
Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 13 µm

**Abb. 73**

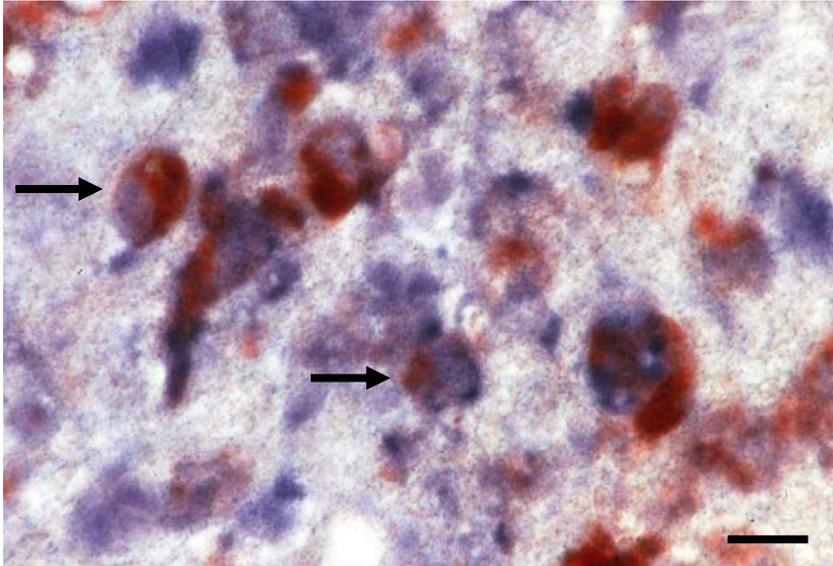
Doppelmarkierung zur Darstellung der **MMP-9-mRNS-Expression** (blau) durch **Makrophagen/Mikroglia** (BS-1, rot). In einzelnen Zellen ist eine rot-blaue Mischfarbe (Pfeile) erkennbar.

Hund Nr. 12, Gruppe V  
Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 13 µm

**Abb. 74**

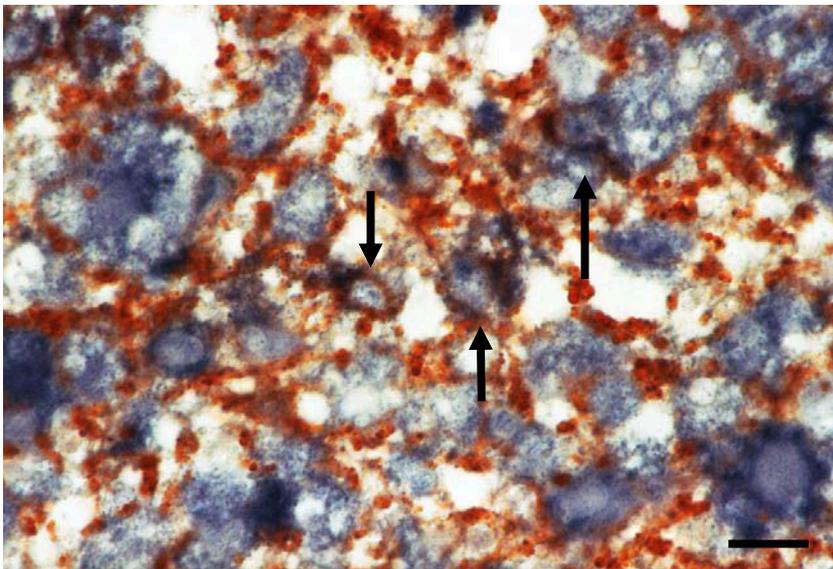
Doppelmarkierung zur Darstellung der **MMP-14-mRNS-Expression** (blau) durch **Astrozyten** (GFAP, rot). In einzelnen Zellen ist eine rot-blaue Mischfarbe (Pfeil) erkennbar.

Hund Nr. 3, Gruppe IV  
Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 13 µm

**Abb. 75**

Doppelmarkierung zur Darstellung der **MMP-14-mRNS**-Expression (blau) durch **Makrophagen/Mikroglia** (BS-1, rot). In einzelnen Zellen ist eine rot-blaue Mischfarbe (Pfeil) erkennbar.

Hund Nr. 10, Gruppe V  
Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 13 µm

**Abb. 76**

Doppelmarkierung zur Darstellung der **TIMP-1-mRNS**-Expression (blau) durch **Astrozyten** (GFAP, rot). In einzelnen Zellen ist eine rot-blaue Mischfarbe (Pfeile) erkennbar.

Hund Nr. 3, Gruppe IV  
Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 13 µm

**Abb. 77**

Doppelmarkierung zur Darstellung der **TIMP-1-mRNS**-Expression (blau) durch **Makrophagen/Mikroglia** (BS-1, rot). In einzelnen Zellen ist eine rot-blaue Mischfarbe (Pfeile) erkennbar.

Hund Nr. 9, Gruppe IV  
Kleinhirn, weiße Substanz, ISH = NBT/X-Phosphat, IH = ABC-Methode (AEC), Bar = 13 µm

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen der mRNA bestimmter Matrix-Metalloproteinasen (MMP-9 und MMP-14) und ihres spezifischen Inhibitors (TIMP-1) mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) in unterschiedlichen Herdläsionen bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit der Expression der Staupevirus-mRNA, des Staupevirus-Antigens, des Oberflächenmarkers CD44, des MHC Klasse II-Antigens und dem Grad der Demyelinisierung in den untersuchten Arealen in Korrelation gesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Phänotypisierung von Astrozyten, Makrophagen/Mikroglia und infiltrierenden T- bzw. B-Zellen.

Hierfür wurden in einem ersten Teil der Arbeit spezifische DIG-markierte RNS-Sonden entwickelt und ausgetestet, die dem Nachweis der CDV-, GAPDH-, MMP-9- und -14- bzw. TIMP-1-mRNA dienten. Diese Sonden wurden dann im zweiten Teil der Arbeit bei Hunden mit verschiedenen Herdläsionen einer demyelinisierenden Staupeenzephalitis zur Untersuchung eingesetzt. Parallel dazu wurden immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Oberflächenproteine durchgeführt, um Aufschluß über die beteiligten Zellpopulationen und den Syntheseort der MMPs und TIMPs zu erhalten, wobei zusätzlich an ausgewählten Schnitten eine *in situ*-Hybridisierung (ISH)/Immunhistologie (IH)-Doppelmarkierung erfolgte.

### 5.1 Pathohistologische Ergebnisse

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der HE- und LFB-KV-gefärbten Gehirnschnitte der an Staupe erkrankten Tiere und Klassifizierung der einzelnen Herdläsionen (Abb. 19 – 24) bei der demyelinisierenden Leukoenzephalitis konnte nur bei zwei Tieren ein pathologischer Befund im **Großhirn** erhoben werden. Ein Tier (1443/99) zeigte eine geringgradige, nicht-eitrige (lymphoplasmazelluläre) Meningitis und ein weiteres Tier (N 20-01-3) wies eine mittelgradige multifokale chronische Entmarkungsenzephalitis mit mittel- bis hochgradigen perivaskulären lymphohistiozytären Infiltraten, Gemistozyten und einer Astrogliose auf. Zusätzlich konnte mittels LFB-KV-Färbung bei diesem Tier eine Entmarkung nachgewiesen werden.

Die Herdläsionen im **Kleinhirn** der untersuchten Tiere reichten von lichtmikroskopisch nicht sichtbar (Gruppe II, n = 10), über akute Läsionen (Gruppe III, n = 13) und subakute Läsionen mit Entzündung (Gruppe IV, n = 20) bis hin zu chronischen Herdveränderungen (Gruppe V, n = 20). Hierbei erfolgte die Klassifizierung der Gruppe II anhand des immunhistologischen Ergebnisses und des Signals in der *in situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen bzw. -mRNS. Es wurden solche Läsionen ausgewählt, die in beiden Untersuchungen in den identischen Lokalisationen ein positives Signal aufwiesen, wobei mittels der LFB-KV-Färbung hier keine Entmarkung nachgewiesen werden konnte und diese Stellen als Frühphase einer lokalen Staupevirus-Infektion gedeutet werden. Aufgrund der geringen Plaquezahl wurden die lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Herdläsionen in der weißen und grauen Substanz in einer Gruppe (Gruppe II) zusammengefasst. Neben den histologischen Veränderungen, die charakteristisch für akute Läsionen sind, fand sich in der Gruppe III ebenfalls keine Entmarkung in den betroffenen Arealen. Beginnend bei der Gruppe IV (subakute Läsionen mit Entzündung) und am deutlichsten ausgeprägt in der Gruppe V (chronische Läsionen) wiesen die Herdveränderungen eine mittel- bis hochgradige Demyelinisierung auf.

## 5.2 Immunhistologische Ergebnisse

### 5.2.1 Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen

Die Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung der unterschiedlichen Läsionstypen bezüglich des **Staupevirus-Nukleoprotein-Antigens** (Abb. 25 – 27, Abb. 50) stimmen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein (ALLDINGER et al., 1993; GAEDKE et al., 1997 und 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999). So fand sich in den Herdläsionen der Gruppen II und III das stärkste Signal, wobei das Signal innerhalb der Läsion gleichmäßig verteilt war und die Hauptzielpopulation des Virus Astrozyten darstellten. Zusätzlich zu den intraläsionalen Bereichen konnte extraläsional sowohl in der weißen Substanz, als auch weniger ausgeprägt in der grauen Substanz ein zellassoziertes Signal gesehen werden. In den Gruppen IV und V war die Zahl der Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen-positiven Zellen dagegen reduziert und in einzelnen Plaques, vor allem aus der Gruppe V, konnte eine vollständige Eliminierung von Virusprotein festgestellt werden. Angrenzend an einzelnen Läsionen, die kaum oder keine positiven Zellen mehr enthielten, konnte ein stark positives Signal in den Zellen des Stratum granulosum nachgewiesen werden. Es bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Läsion und der Anzahl Staupevirus-

Antigen-positiver Zellen. Obwohl es nicht möglich ist die Progredienz einzelner Herdveränderungen zu untersuchen, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Eliminierung von Antigen und ebenso der viralen mRNA einen kontinuierlichen Prozess darstellt. Inwieweit der Nachweis von Virusprotein, in Kombination mit dem Nachweis von viraler mRNA in Zellen der graue Substanz als Ko-Infektion, oder aber als etwaiger Persistenzmechanismus des Staupevirus angesehen werden muss, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt (MÜLLER et al., 1995).

### 5.2.2 GFAP und CD44

Während sich **GFAP**-positive Astrozyten (Abb. 28 – 30) in den Gehirnen der Kontrolltiere als diffus in der weißen Substanz verteilte schlanke, fibrilläre, langstrahlige Astrozyten mit hellbraunem Zytoplasma präsentierten, konnten in den Gehirnen der an Staupe erkrankten Tiere teilweise zahlreiche aktivierte Astrozyten in Form von Gemistozyten beobachtet werden. Diese Gemistozyten waren besonders deutlich in den Gruppen II und III zu sehen und hoben sich auch gegen extraläsional gelegene Astrozyten ab. Die Anzahl der positiv markierten Astrozyten war in den Gruppen II und III gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht und nahm zu den chronischen Läsionen hin kontinuierlich ab. Innerhalb der chronischen Läsionen war die Anzahl GFAP-positiver Zellen, ebenso wie bei dem Nachweis von CDV-Nukleoprotein, intraläsional stark reduziert, wodurch es zu einem fast vollständigen Verlust GFAP-positiver Zellen kam. Waren noch einzelne Zellen vorhanden, dann waren diese eher in der Peripherie der Läsion angeordnet. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (ALLDINGER et al., 1993; GAEDKE et al., 1997 und 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999).

**CD44**-positive Zellen (Abb. 35 – 37) ließen sich in unterschiedlichem Ausmaß in allen Staupe-läsionen nachweisen. Abhängig von der Chronizität der Plaques konnte, im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren, beginnend bei der Gruppe II über die Gruppe III bis hin zu Gruppe IV eine kontinuierlich steigende, verstärkte Expression des CD44-Rezeptors beobachtet werden, wobei Gruppe V ein geringeres Signal als Gruppe III und IV aufwies. Die positiven Zellen waren vorwiegend Astrozyten, außerdem Gitterzellen und es konnte zusätzlich intra- und extraläsional eine vaskulär akzentuierte verstärkte Expression des CD44-Rezeptors gesehen werden. Bei den chronischen Läsionen fand sich zusätzlich noch in einigen perivaskulären mononukleären Infiltratzellen ein positives Signal. Ebenso zeichneten sich

vereinzelte sowohl mononukleäre, als auch polymorphkernige intravaskulär gelegene Leukozyten durch ein deutliches zellmembranständiges positives Signal aus. Außerdem konnte bei allen Tieren, unabhängig von der Art der Staupeläsion, eine verstärkte Expression des CD44-Rezeptors subpial, subventrikulär und subependymal gesehen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sind in weiten Teilen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von ALLDINGER et al. (2000). Die Aufregulierung des CD44-Rezeptors ging vor allem mit einer starken Expression des Astrozyten-assoziierten GFAP-Signals einher, wobei eine starke Ko-Lokalisation dieser beiden Antikörper beobachtet werden konnte. Hieraus kann gemutmaßt werden, dass vor allem Astrozyten CD44 exprimieren. Diese Annahme wird durch ALLDINGER et al. (2000) erhärtet, die im Gehirn von Hunden mit einer demyelinisierenden Staupeenzephalitis immunelektronenmikroskopisch CD44 auf der Zellmembran von verbreiterten Astrozytenfortsätzen lokalisierten. So kann die vor allem in chronischen Läsionen beobachtete intraläsionale Abnahme von CD44 durch die Abnahme GFAP-positiver Astrozyten erklärt werden.

Die meisten Zelltypen exprimieren CD44, binden aber kein Hyaluronat. Die biologischen Funktionen von CD44, einschließlich der Regulierung einer Lymphozyten-Rekrutierung zu bestimmten Entzündungsstellen bedarf der Bildung eines funktionell-aktiven Hyaluronat-adhäsiven Phänotyps (GEE et al., 2004). ANNABI et al. (2004) berichten bei U-87-Gliomazellen von einem MT1-MMP (MMP-14)-abhängigen Mechanismus, der die intrinsische Zelloberflächenbindung von Hyaluronat vermittelt. Hieraus könnte gefolgert werden, dass die in der vorliegenden Studie beobachtete MMP-14-mRNS Aufregulierung im Zusammenhang mit einer verstärkten CD44-Expression verantwortlich ist für die Generierung eines Hyaluronat-adhäsiven Phänotyps und einer damit verbundenen verstärkten, selektiven Migration bestimmter Lymphozyten ins ZNS. Einen weiteren Hinweis darauf liefern die in subakuten Läsionen mit Entzündung und chronischen Läsionen gefundenen perivaskulär gelegenen CD44-positiven Lymphozyten. Diese perivaskulär gelegenen CD44-positiven Lymphozyten könnten im Rahmen des so genannten "rolling" ins ZNS gelangt sein, wobei die Aktivierung von T-Zellen ihre Bindung zu Hyaluronat erhöht und eine CD44-vermittelte primäre Adhäsion ermöglicht, wobei diese innerhalb des "lymphocyte targeting" zu spezifischem extralymphoidem Gewebe gelangen (DEGRENDELE et al., 1997). BRENNAN et al. (1999) bestätigen diese selektive Leukozyten-Extravasation von CD4+-Gedächtniszellen auch während entzündlicher ZNS-Erkrankungen wie z.B. der EAE.

Mikrogliazellen sind in der Regel negativ für CD44, wohingegen im Gehirn von MS-Patienten jedoch ebenfalls ein deutliches Signal gesehen werden kann (CRUZ et al., 1986),

was in Übereinstimmung mit der hier beobachteten starken Positivität der Gitterzellen ist. NOBLE et al. (1993) berichten z. B. von einer Hyaluronat-vermittelten *in vitro*-Stimulation von Makrophagen, die daraufhin proliferierten und Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  exprimierten. Auch bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis wird angenommen, dass pro-inflammatorische Zytokine eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielen. So haben verschiedene Autoren in den unterschiedlichen Herdläsionen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nachweisen können (FRISK et al., 1999; GRÖNE et al., 1998, 1999, 2000; MARKUS et al., 2002), die ihrerseits wiederum eine modulatorische Eigenschaft auf die Sekretion verschiedener MMPs haben.

### 5.2.3 BS-1 und MHC Klasse II-Antigen

**BS-1**-positive Makrophagen/Mikroglia (Abb. 31 – 34) fanden sich fast ausschließlich in den Gehirnen der Staupe-erkrankten Tiere, lediglich einzelne Zellen in den Kontrollgehirnen zeigten ein positives Signal. In der Gruppe II konnte bereits eine deutliche intraläsionale Zunahme positiver Makrophagen/Mikroglia beobachtet werden, die sich in der Gruppe III noch steigerte. Die Gruppen IV und V zeigten ebenfalls eine mittel- bis hochgradige Zunahme intraläsional gelegener positiver Zellen, die zum großen Teil aus Gitterzellen bestand. Hier fanden sich zusätzlich eine mittlere Anzahl positiver Zellen in perivaskulären mononukleären Infiltraten, wobei es sich hier um perivaskulär gelegene parenchymale Makrophagen handeln könnte. Auffällig war bei den chronischen Läsionen, dass die Anzahl positiver Zellen von Läsion zu Läsion zum Teil erheblich variierte. Gleiche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren (GRÖNE et al., 2000) beschrieben. Grundsätzlich ist es schwierig, auch mittels BS-1, zwischen ortsständigen (Mikroglia) und infiltrierenden Makrophagen zu unterscheiden, so dass keine sichere Aussage über den Ursprung der Zellen gemacht werden kann (CARSON, 2002).

Aktivierte Mikroglia reagieren sehr früh auf Insulte in Form der Produktion von zahlreichen Botenstoffen wie z.B. IP-10, MIP-1, -2, CCL19, MCP-1, -2, die neben dem Anlocken von Makrophagen und T-Zellen, auch für eine Transkriptionsinduktion zahlreicher MMPs und TIMPs gelten. Außerdem sieht man in ihnen eine Quelle von reaktiven oxidativen Produkten wie NO, MMPs und pro-inflammatorischen Zytokinen. Zusätzlich sind sie in der Lage mittels Expression des MHC II-Rezeptors und eines spezifischen Antigens zu Antigen-präsentierenden Zellen zu werden und so in der Peripherie aktivierte spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezielt im Gehirn zurückzuhalten (CARSON, 2002).

**MHC Klasse II-Antigen**-positive Zellen (Abb. 38 – 40) fanden sich primär in der weißen Substanz und hier intraläsional vor allem in den Gruppen II und III. Die Anzahl positiver Zellen in diesen Herdveränderungen war im Vergleich zu den Kontrolltieren mittel- bis teilweise hochgradig erhöht. Jedoch konnte auch extraläsional häufig eine lokale Aufregulierung des MHC Klasse II-Antigens beobachtet werden, welches in deutlicher Korrelation zur Expression des Staupevirus-Nukleoproteins stand. Die Mehrzahl der positiven Zellen waren Makrophagen/Mikroglia. In subakuten Läsionen mit Entzündung zeigten vor allem Gitterzellen ein stark zellmembranakzentuiertes Signal, jedoch konnte extraläsional, korrespondierend mit der abnehmenden Staupevirus-Nukleoprotein-Expression ein geringeres Signal als in lichtmikroskopisch nicht sichtbaren und akuten Läsionen festgestellt werden. Die chronischen Herdveränderungen wiesen die geringste MHC Klasse II-Aufregulierung auf. Lediglich vereinzelte intraläsional gelegene Gitterzellen, Makrophagen/Mikroglia und perivaskulär lokalisierte Lymphozyten waren positiv für MHC II. Es fiel jedoch auf, dass einzelne Herde mit zahlreichen Gitterzellen ein stark positives Signal aufwiesen. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von anderen Autoren überein und es wird postuliert, dass die MHC II-Aufregulierung vor allem in späteren Läsionen Ausdruck eines immunpathologisch dominierten Prozesses ist (ALLDINGER et al., 1996; GAEDKE et al., 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999).

Im Gegensatz zu anderen Studien wurde in der vorliegenden Studie, abgesehen von wenigen Läsionen, nicht innerhalb der chronischen Herdveränderungen die größte Anzahl MHC II-positiver Zellen gefunden, was aber dadurch erklärt werden könnte, dass nicht auf Gefriermaterial zurückgegriffen werden konnte, und die Demaskierung des MHC Klasse II-Epitops daher nur unzureichend erfolgte.

#### 5.2.4 MBP

Der Nachweis des “**myelin basic protein**“ (MBP) gelang in allen Gehirnen (Abb. 41), wobei jedoch in den Gruppen IV und V eine mittelgradig verminderte Anfärbbarkeit zu beobachten war. Der Verlust der Myelinscheiden und eine damit verbundene verminderte Anfärbbarkeit des MBP werden unter anderem auf eine nicht-zytolytische Infektion der Oligodendrozyten mit dem Staupevirus zurückgeführt. Bei *in vitro* Versuchen an primären Hundegehirnzellen konnte im Verlauf einer restriktiven Infektion mit dem CDV eine Herabregulierung der Myelin-Gen-Transkription in Oligodendrozyten nachgewiesen werden; hiervon betroffen war nicht nur das Gen, welches für das MBP codiert, sondern ebenso die Gene, welche für das

Proteolipid-Protein (PLP) und das "myelin-associated glycoprotein" (MAG) codieren, lange bevor morphologische Alterationen der Zellen erkennbar waren (GRABER et al., 1995). Auf welchem Weg die CDV-Infektion der Oligodendrozyten zu einer verminderten Transkription der entsprechenden, für die Myelinisierung verantwortlichen Gene führt, ist nach wie vor unklar. Auffällig ist jedoch, dass auch in chronischen Läsionen mit weit fortgeschrittener Demyelinisierung, zwar in verminderter Anzahl, aber immer noch Oligodendrozyten nachgewiesen werden können (SCHOBESBERGER et al., 2002). Es ist nicht ausgeschlossen, dass aufgrund einer restriktiven Infektion der Oligodendrozyten, die molekularen Abläufe innerhalb der einzelnen Zelle auf eine Art und Weise dysreguliert werden, die eine Demyelinisierung nach sich zieht.

Einen weiteren Angriffspunkt auf die intakten Myelinscheiden stellt der direkte Abbau des MBP, als wesentlichem Bestandteil der Myelinscheide, durch verschiedene Matrix-Metalloproteinasen dar. So konnten bereits PROOST et al. (1993) zeigen, dass Gelatinase B (MMP-9) aus Leukozyten in der Lage ist, humanes MBP zu spalten und dabei enzephalitogene Auto-Antigene zu generieren. Dies kann potentiell mindestens zwei pathologische Folgen haben. Zum einen kann durch die Spaltung des MBP die direkte Demyelinisierung vorangetrieben werden, zum anderen kann durch die Generierung enzephalitogener Auto-Antigene ein Fortschreiten der Demyelinisierung im Rahmen eines (auto-) immunpathologischen Prozesses getriggert werden, wie er auch für die MS des Menschen diskutiert wird. CHANDLER et al. (1995) beschrieben zusätzlich eine ähnliche Wirkung auf MBP für die 72-kDa-Gelatinase (MMP-2), Stromelysin-1 (MMP-3), interstitielle Kollagenase (MMP-1), Matrilysin 1 (MMP-7) und ebenso für 92-kDa-Gelatinase (MMP-9), wobei jedoch MMP-2, MMP-3 und MMP-7 noch eine 100-fach stärkere Wirkung auf MBP haben sollen als MMP-9. MMPs würden dadurch nicht nur zur Entmarkung beitragen, sondern auch zur Generierung immunogener Peptide, und somit eine autoimmune Entzündungsreaktion im Rahmen des sog. "epitope spreading" vorantreiben (TUOHY et al., 1998; VANDERLUGT et al., 1998). Da diese MMPs im ZNS unter anderem von Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen, Neuronen, infiltrierenden Leukozyten und Makrophagen gebildet werden können, ist es nahe liegend, dass MMPs auf vielfältige Weise eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese demyelinisierender ZNS-Erkrankungen spielen können (HARTUNG und KIESEIER, 2000; ROSENBERG, 2002b; YONG et al., 2001). So kann spekuliert werden, ob den MMPs durch die in der vorliegenden Studie vor allem bei Läsionen der Gruppe IV und V, die durch eine mittel- bis hochgradige Demyelinisierung charakterisiert

sind, beobachtete hochgradige Aufregulierung von MMP-9-mRNS in dieser Phase der Entzündung durch die Möglichkeit der direkte Degradierung der Myelinscheiden eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis zukommt.

### 5.2.5 CD3 $\epsilon$ und CD79 $\alpha$

**CD3 $\epsilon$ -positive Zellen** (Abb. 42) fanden sich in vermehrter Anzahl in subakuten Läsionen mit Entzündung sowie in chronischen Herdveränderungen. In subakuten Läsionen mit Entzündung war intraläsional eine gering- bis mittelgradige Anzahl diffus verteilter positiver Zellen sichtbar, als auch in perivaskulären mononukleären Infiltraten. Der deutlichste Nachweis gelang in den chronischen Herdveränderungen, hier war intraläsional, als auch in geringerem Ausmaß extraläsional, eine teils hochgradige diffuse und perivaskuläre Infiltration mit CD3 $\epsilon$ -positiven Zellen zu beobachten. Hierbei war der Anstieg der positiven Zellen statistisch signifikant. Identische Ergebnisse erbrachten die Arbeiten von WÜNSCHMANN et al. (1999) und TIPOLD et al. (1999), wobei perivaskulär vor allem CD4+ und intraläsional CD8+ zu finden waren; zusätzlich konnten in diesen Studien in frühen Läsionen eher CD8+ als CD4+ Zellen nachgewiesen werden.

**CD79 $\alpha$ -positive Zellen** (Abb. 43) zeigten in den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren und akuten Läsionen ein ähnliches Verteilungsmuster wie die gesunden Kontrolltiere, d.h. es fanden sich nur ganz vereinzelt diffus in der weißen Substanz verteilte positive Zellen. Subakute Läsionen mit Entzündung wiesen intraläsional eine geringgradig verstärkte diffuse Infiltration mit positiven Zellen auf und chronische Herdveränderungen zeigten gegenüber den subakuten Läsionen mit Entzündung nochmals eine geringgradige Steigerung der intraläsional und perivaskulär gelegenen positiven Zellen auf. Diese Beobachtungen sind identisch mit denen von WÜNSCHMANN et al. (1999), die diskutieren, dass in chronischen Phasen der Entzündung die vorhandenen B-Zellen, stimuliert von einer Zytokin-Expression der CD4+-Zellen, Antikörper produzieren und damit den Entzündungsprozess aufrechterhalten.

## 5.3 Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung

### 5.3.1 GAPDH-mRNS

Die Durchführung der *in situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis der **GAPDH-mRNS** (Abb. 44 – 45) erfolgte zum Nachweis intakter mRNS. GAPDH findet als so genanntes “house-keeping“-Gen auch im Rahmen von “Ribonuclease protection assays“ und RT-PCRs Verwendung, um die Integrität der RNS zu gewährleisten (GRÖNE et al., 1996 und 1999). In der vorliegenden Studie konnte GAPDH-mRNS in allen Gehirnen, einschließlich der gesunden Kontrollgehirne, nachgewiesen werden. Das Signal fand sich vor allem in großen Neuronen des Stammhirns sowie in Purkinje-Zellen und in Zellen des Stratum moleculare und Stratum granulosum, wobei es sich anhand der Morphologie am ehesten um Korb- und Sternzellen, bzw. protoplasmatische Astrozyten und Bergmann-Gliazellen handelte. Die als weitere Positivkontrollen eingesetzten Schnitte der CDV-infizierten DH82-Zellen sowie des kaninen kutanen Histiocytems zeigten ebenfalls deutliche zellassozierte Signale. In den Kleinhirnschnitten der Staupevirus-infizierten Hunde fand sich zusätzlich, abhängig vom Plaquetyp, intraläsional mit zunehmender Anzahl der infiltrierenden Zellen auch ein ansteigendes positives Signal in Assoziation mit den infiltrierenden Zellen. Hieraus kann geschlossen werden, dass in allen untersuchten Geweben noch ausreichende Mengen intakter zellulärer mRNS zur Detektion vorhanden waren, unabhängig vom Zeitpunkt der postmortalen Probengewinnung und der damit verbundenen degradierenden Wirkung von RNasen (SRINIVASAN et al., 2002).

### 5.3.2 Staupevirus-Nukleoprotein-mRNS

Der Nachweis der **viralen mRNS** und der (positiv-orientierten) antigenomischen ssRNS des **Staupevirus-Nukleoprotein**-Abschnitts mittels der DIG-markierten-“antisense“-Sonde sowie der (negativ-orientierten) genomischen ssRNS mittels der DIG-markierten-“sense“-Sonde gelang in allen Kleinhirnen der Staupevirus-infizierten Tiere und der entsprechenden Positivkontrolle (CDV-infizierte DH82-Zellen; Abb. 46 – 49). Hierbei war das Signal, welches mit der “sense“-Sonde erzielt wurde in den gleichen Lokalisationen und Zellen zu finden wie das der “antisense“-Sonde, wobei das Signal der “sense“-Sonde jedoch, wie erwartet, weniger farbtensiv war und sich in einer geringeren Anzahl von Zellen fand. Die Kleinhirne der Kontrolltiere und das kanine kutane Histiozytom waren negativ für den Nachweis von CDV-mRNS bzw. –ssRNS. Insgesamt ließ sich feststellen, dass die gleichen

Zellpopulationen für CDV-mRNS positiv waren, wie in der immunhistologischen Untersuchung (Kap. 4.6.2.2) und dass das Verteilungsmuster innerhalb und zwischen den einzelnen Läsionstypen in der Immunhistologie (IH) und *in situ*-Hybridisierung (ISH) stark korrelierte. Allerdings muss angemerkt werden, dass in den frühen Läsionen das Signal der IH stärker und deutlicher ausgeprägt war als das Signal der ISH und sich das Expressionsmuster zu den chronischen Läsionen hin anglich. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Eliminierung von Antigen und mRNS einen kontinuierlichen Prozess darstellt. Dies unterstützt die Hypothese, dass der chronischen demyelinisierenden Enzephalitis eine immunpathologische Pathogenese zugrunde liegt. Diese Beobachtungen stimmen mit denen früherer Veröffentlichungen überein, und bestätigen die Annahme, dass es nicht aufgrund einer Viruspersistenz innerhalb der chronischen Läsionen zu einem Fortschreiten der Demyelinisierung kommt (GAEDKE et al., 1997 und 1999; MÜLLER et al., 1995), sondern dass offenbar immunpathologische Mechanismen in Verbindung mit anderen Faktoren, wie Zytokinen, MMPs usw., entscheidend dazu beitragen. Es kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass aufgrund einer Viruspersistenz in den Neuronen die spezifische und unspezifische Immunabwehr nach wie vor aktiviert bleibt und so der Demyelinisierung im Rahmen einer Dysregulation Vorschub leistet.

### 5.3.3 MMPs/TIMP

Der Nachweis von **MMP-9-**, **MMP-14-** und **TIMP-1-mRNS** (Abb. 51 – 55, 68; Abb. 56 – 61, 69; Abb. 62 – 67, 70) gelang sowohl in den Kontrollgehirnen, als auch in den Gehirnen von an Staupe erkrankten Hunden, wobei sich, abhängig vom Charakter der Herdläsion, zum Teil statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl positiver Zellen ergaben. In den **Kontrollgehirnen** konnte die MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS vor allem in großen Neuronen, Purkinje-Zellen, Zellen des Stratum moleculare, Körnerzellen des Stratum granulosum und Zellen der weißen Substanz, die von der Morphologie Oligodendrozyten, Mikroglia und fibrillären Astrozyten entsprachen, gefunden werden. Es wurde jedoch ein durchweg von der Intensität schwächeres Signal gesehen als in den Kleinhirnen der Staupevirus-infizierten Tiere. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein. So konnten MIAO et al. (2003) in einer immunhistochemischen Untersuchung über die Expression verschiedener MMPs und TIMPs bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis in den Kleinhirnen der gesunden Kontrolltiere nur eine geringgradige Expression der untersuchten MMPs und TIMPs feststellen. So waren z.B.

Purkinje-Zellen und Gefäßwandzellen für MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 geringgradig positiv, wobei MMP-9 zusätzlich in Neuronen und ependymalen Zellen nachweisbar war. Zellen innerhalb der weißen Substanz waren durchweg negativ oder nur sehr gering positiv. Ähnliche Ergebnisse erbrachten eine immunhistologische Untersuchung von MAEDA et al. (1996) über die Expression von MMP-1, -2, -3 und -9 in unverändertem humanem Gehirngewebe im Vergleich zu verschiedenen MS-Läsionen, die eine in ihrer Intensität geringere MMP-Expression in den perivaskulär und parenchymatös gelegenen Mikrogliazellen finden konnten. Gleichsinnige Ergebnisse für MMP-7 und MMP-9 erbrachte die Studie von COSSINS et al. (1997), die zusätzlich zur Proteinexpression auch die mRNA nachwies.

### 5.3.3.1 MMP-9- und MMP-14-mRNS

Eine statistisch signifikante Erhöhung der **MMP-9-mRNS** exprimierenden Zellzahl ergab sich intraläsional sowohl für nicht-Gefäß-assoziierte (Parameter "nGa") als auch Gefäß-assoziierte (Parameter "Ga") Lokalisationen für die Gruppen IV und V gegenüber den Gruppen I, II und III, wobei jedoch auch die Anzahl der positiven Zellen in den Gruppen II und III gegenüber den Kontrollen (Gruppe I) erhöht war.

Die Anzahl der intraläsionalen nicht-Gefäß-assoziiert liegenden **MMP-14-mRNS**-positiven Zellen (Parameter "nGa") nahm über die Gruppen I – V hinweg kontinuierlich signifikant zu, wobei die Anzahl der gefäßassoziiert (Parameter "Ga") liegenden positiven Zellen beginnend in der Gruppe III, aber besonders ausgeprägt in den Gruppen IV und V signifikant erhöht war. Besonders auffällig war in den Gruppen IV und V die mittel- bis hochgradige Zunahme gefäßassoziiert (endothelial, vaskulär und perivaskulär) liegender positiver Zellen für MMP-9-mRNS und MMP-14-mRNS. Anhand der Zellmorphologie konnte die Identität der intraläsional gelegenen positiven Zellen nicht immer eindeutig angesprochen werden, jedoch entsprach die Mehrzahl der Zellen in den lichtmikroskopisch nicht sichtbaren und akuten Läsionen am ehesten Astrozyten bzw. Makrophagen/Mikroglia, wohingegen in den subakuten Läsionen mit Entzündung und chronischen Herden zusätzlich auch zahlreiche Lymphozyten in unterschiedlichem Ausmaß ein positives Signal aufwiesen. Dies konnte mittels den durchgeführten Doppelmarkierungen bestätigt werden und ist auch in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur (COSSINS et al., 1997; MAEDA et al., 1996; MIAO et al., 2003.). Weiterhin beachtenswert bei Läsionen der Gruppen IV und V war die Tatsache, dass sich die exprimierende Zellpopulation dahingehend wandelte, dass vor allem infiltrierende Zellen (Lymphozyten, Makrophagen) und weniger ortsständige Zellen (Astrozyten) ein

positives Signal trugen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass es in chronischen demyelinisierenden Läsionen zu einem Schwund GFAP-positiver Astrozyten und damit verbundenen zwangsläufig zu einer verminderten Expression durch diese Zellpopulation kommt. Im Gegenzug dazu ist jedoch unter anderem die Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen ein histologisches Kriterium für die Chronizität der demyelinisierenden Staupeenzephalitis, die in diesen Läsionen dann vermehrt MMP-9-, MMP-14- bzw. TIMP-1-mRNS exprimierten.

Matrix-Metalloproteinasen werden durch ihre besonderen biologischen Eigenschaften bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen im ZNS eine entscheidende pathogenetische Rolle zugeordnet. So spielen sie nicht nur durch ihre Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix zu degradieren eine entscheidende Rolle für die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, sondern sind ebenso in der Lage durch ihre enzymatische Tätigkeit bestimmte Proteine in ihre aktive oder inaktive Form zu überführen. So fanden MIAO et al. (2003) bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes auf Proteinebene eine deutliche Aufregulierung von MMP-1, -3, -7, -9, -12, -13 und -14 sowie TIMP-1 und -2 im Gehirn staupeerkrankter Hunde gegenüber gesunden Kontrolltieren, wobei sich die höchste Expression bei akuten Läsionen und subakuten Herden ohne Entzündung fand. In älteren Läsionen mit Entzündungszellinfiltraten nahm die Expression der MMPs und TIMPs bis auf diejenige von MMP-11, -12, und -13 gegenüber den früheren Läsionen hingegen ab. Hierbei exprimierten vor allem Makrophagen/Mikroglia, Astrozyten, Gemistozyten und infiltrierende perivaskuläre mononukleäre Zellen in unterschiedlichem Ausmaß die untersuchten MMPs und TIMPs, wobei unter anderem MMP-9 zusätzlich von Plexus choroideus-Zellen exprimiert wurde. Die divergierenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Gruppenverteilung, innerhalb derer die höchste MMP- bzw. TIMP-Expression gefunden wurde, im Vergleich zu der Arbeit von MIAO et al. (2003), könnte sich durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erklären lassen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der mRNS untersucht, wohingegen MIAO et al. (2003) das Proteinmuster charakterisierten. Da die Regulation der MMP- bzw. TIMP-Expression auf zahlreichen Ebenen wie der Transkription, Translation, Aktivierung des Zymogens (Pro-MMP), extrazellulären Inhibition, Lokalisation inner- oder außerhalb der Zelle sowie der Internalisierung durch Endozytose erfolgen kann, muss eine Aufregulation der mRNS nicht zwangsläufig eine erhöhte Expression des entsprechenden Proteins bedingen bzw. umgekehrt.

Die hier beobachtete Aufregulierung bestimmter MMPs ist auch für eine Reihe anderer ZNS-Erkrankungen beschrieben, in deren Verlauf es zu einer Schädigung der BHS kommt und einem damit verbundenen erhöhten Influx inflammatorisch wirkender Entzündungszellen. So gelingt der intrazerebrale Nachweis von verschiedenen MMPs bei zahlreichen ZNS-Erkrankungen (MS, EAE, SSPE, HIV-bedingter Enzephalopathie, bakteriellen Enzephalitiden und schlaganfallbedingten Ischämien) die mit einer Schädigung der BHS einhergehen. Die in der vorliegenden Studie beobachtete Erhöhung der MMP-9-mRNS, die besonders in den subakuten und chronischen Herden deutlich wird, und teilweise eine starke endotheliale/vaskuläre Akzentuierung erfährt, spiegelt ähnliche Verhältnisse wider, die bei Studien über das Expressionsmuster der verschiedenen MMPs bei der MS gemacht wurden. So fanden COSSINS et al. (1997) eine verstärkte Expression von MMP-9-Protein sowie MMP-7-mRNS und -Protein in demyelinisierten MS-Läsionen, wobei MMP-7 vor allem in Makrophagen/Mikroglia und MMP-9 im Bereich von Blutgefäßen nachgewiesen wurde. MAEDA et al. (1996) konnten bei MS-Patienten MMP-9-Protein zusätzlich in Makrophagen, Lymphozyten und Astrozyten nachweisen, wobei die Hauptzellpopulation der positiven Zellen Makrophagen/Mikroglia darstellten. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Studie gesehen werden, in der neben einem leichten Anstieg der MMP-9-mRNS Expression in den frühen Läsionen (Gruppe II und III), in den späteren Läsionen (Gruppe IV und V) in Verbindung mit einer steigenden Zellinfiltration von Makrophagen und Lymphozyten ein signifikanter Anstieg der MMP-9-mRNS verzeichnet werden konnte. Gleichzeitig ließ sich über die Gruppen hinweg ein stetiger Anstieg der MMP-14-mRNS beobachten, der ebenso wie die MMP-9-mRNS Expression in den späteren Läsionen stark vaskulär akzentuiert war. Auch KHUTH et al. (2001) beobachteten bei der experimentellen Infektion von Mäusen mit CDV neben der leicht erhöhten Expression von MMP-2- bzw. -9-mRNS einen stark erhöhten MMP-14-mRNS Gehalt im Cortex und Hypothalamus, verbunden mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität der MMPs und in Korrelation zu einem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ . Die Autoren folgern hieraus eine Virus-vermittelte Aufregulation der Zytokinexpression mit konsekutiver Modulation der MMP-Expression. Weiterhin zu beachten ist die Tatsache, dass es durch den Anstieg von MMP-14 zu einer verstärkten Aktivierung von MMP-2 kommen kann, da MMP-2 einer MMP-14 vermittelten Freisetzung unter Beteiligung von TIMP-2 unterliegt und damit der erhöhte MMP-14 Gehalt auch indirekt die Erhöhung von MMP-2 bewirken kann.

Die Aufregulation der MMPs in den frühen Läsionen der Staupevirusenzephalitis ist vermutlich direkt virusvermittelt. So exprimieren im gesunden Gehirn Endothelzellen nur einige Adhäsionsmoleküle, Mikrogliazellen werden über die Bindung ihres CD200-Rezeptors an Neuronen im Ruhezustand gehalten und Astrozyten bilden neben neurotrophen Substanzen konstitutiv das anti-inflammatorische Zytokin TGF- $\beta$ , ebenso wie Neurone (GRIFFIN et al., 2003; HOEK et al., 2000). Dringt jedoch ein Virus in das ZNS ein, so entwickelt sich über die angeborene Immunabwehr eine unspezifische Immunantwort. Hierbei produzieren infizierte Zellen unter anderem INF- $\beta$ , die Zytokine INF- $\gamma$ , IL-6 und die Chemokine Fractalkine (CX3CL1) und "secondary lymphoid tissue chemokine" (SLC, CCL21). CX3CL1 wird nach einem neurotoxischen Schaden sehr schnell von der Zelloberfläche von Neuronen abgespalten und vermag durch die Bindung an seinen spezifischen von Makrophagen und Gliazellen exprimierten Rezeptor diese zu aktivieren. Die Abspaltung von CX3CL1 wiederum kann *in vitro* durch einen MMP-Inhibitor unterbunden werden, was dafür spricht, dass der Abspaltungsprozess durch MMPs vermittelt wird (CHAPMAN et al. 2000). Weiterhin sollen CX3CL1 und IL-6 einen steigernden Einfluß auf die Sekretion von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in Mikrogliazellen haben (CROSS und WOODROOFE, 1999). Dies erklärt unter anderem den Anstieg dieser MMPs und TIMPs am Beginn einer Virusinfektion, was auch in der vorliegenden Studie in den frühen Läsionen beobachtet werden konnte. Da die Promoter-Region der meisten induzierbaren MMPs AP-1- und NF $\kappa$ B-Bindungsstellen besitzen, wird der MMP-"Level" nach ZNS-Insulten wahrscheinlich auch über den MAP-Kinase-Transduktionsweg oder oxidativen Stress vermittelt (LO et al., 2002).

Aktiviert Mikroglia und Astrozyten können sehr schnell eine breite Palette an Zytokinen und Chemokinen produzieren, so unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MCP1, MCP3, RANTES und IP10 (GRIFFIN et al., 2003), wobei MIP1 $\beta$ , MCP1 und RANTES, ähnlich wie CX3CL1, ebenfalls einen steigernden Einfluß auf die Sekretion von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 haben sollen (CROSS und WOODROOFE, 1999). Auf mRNA-Ebene haben MARKUS et al. (2002) semi-quantitativ mittels RT-PCR im Kleinhirn primär bei frühen Läsionen der Staupeenzephalitis eine deutliche Aufregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- $\alpha$  bei gleichzeitig fehlender Aufregulierung der anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und TGF (transforming growth factor) - $\beta$  nachgewiesen, was für eine direkte virusvermittelte pro-inflammatorisch dominierte Zytokininduktion spricht. Ähnliche Ergebnisse bei *in vitro* Versuchen mit primären Hundehirnzellen mit einer deutlich erhöhten Expression von IL-1-, IL-6- und TNF- $\alpha$ -mRNA nach CDV Infektion bestätigen diese Beobachtung (GRÖNE et al., 2002). Auf

Protein-Ebene konnte in frühen Läsionen ein deutliches Signal vor allem in Astrozyten für TNF- $\alpha$  gefunden werden, welches mit zunehmender Progredienz der Plaques geringer und mehr zur Plaqueperipherie hin verschoben wird (GRÖNE et al., 2000). IL-1 und IL-6 wurden in unterschiedlichem Ausmaß in allen Läsionstypen nachgewiesen, wobei sie am häufigsten in CD3 $\epsilon$ + Zellen und Makrophagen/Mikroglia im Gehirnparenchym in frühen Plaques, sowie in mononukleären perivaskulären Infiltraten in chronischen Läsionen gefunden werden (GRÖNE et al., 2000). Eine Reihe dieser Zytokine und Chemokine greifen ebenfalls in die Regulationskreise der MMPs ein. So ist für die Induktion der Transkription der MMPs eine fördernde Rolle für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  über eine Induktion des Ceramid-Transduktionsweges beschrieben (SPIEGEL et al., 1996). VECIL et al. (2000) konnten einen IL-1 $\beta$  vermittelten Anstieg von neuronalem MMP-9 beobachten, dies würde in der vorliegenden Studie wiederum die erhöhte Expression der MMP-9- und MMP-14-mRNS erklären. Auf der anderen Seite unterliegen jedoch eine Vielzahl verschiedener Zytokine, Zytokinrezeptoren und Chemokine einer MMP-vermittelten Spaltung. So wird z.B. TNF- $\alpha$  von der Zelloberfläche von MMP-1, -3 und -7 freigesetzt, während der IL-2-Rezeptor einer MMP-9 abhängigen Herabregulierung unterworfen sein soll. MMP-9 spaltet außerdem IL-8 und steigert damit dessen Aktivität (STAMENKOVIC, 2003; STERNLICHT und WERB, 2001).

Der signifikante Anstieg der MMP-9- und MMP-14-mRNS in den Gruppen IV und V kann sich dadurch erklären lassen, dass Makrophagen/Mikroglia und Lymphozyten als ein Hauptsyntheseort von verschiedenen MMPs gelten (KOUWENHOVEN et al., 2001). So konnten BAR-OR et al. (2003) bei einer vergleichenden Analyse mittels quantitativer RT-PCR von Leukozyten aus Kontrollblut in Blutmonozyten eine Anreicherung von MMP-1, -3, -9, -10, -14, -19 und -25 finden, wohingegen B-Zellen primär MMP-11, -26 und -27 und T-Zellen MMP-15, -16, -24 und -28 exprimierten; MMP-2 und -17 fand sich sowohl in Monozyten als auch B-Zellen. Zusätzlich besaßen Monozyten von MS-Patienten einen höheren Gehalt an MMP-2 und -14 im Vergleich zu gesunden Patienten. Bei mehreren chronischen Herdläsionen in dieser Studie, die eine hochgradige intraläsionale Ansammlung mit CD44- und MHC II-positiven Makrophagen/Mikroglia aufwiesen, exprimierten diese Zellen ebenfalls ein starkes positives Signal für MMP-9- und MMP-14-mRNS. Hierbei kann die starke MHC II-Expression als Aktivierung der Makrophagen/Mikroglia-Population angesehen werden, die daraufhin verstärkt MMPs transkribieren. Handelt es sich bei einem Teil der Makrophagen/Mikroglia nicht um ortsständige parenchymale Makrophagen oder Mikroglia, sondern um emigrierte Blutmonozyten, so kann die Expression des CD44-

Rezeptors auf diesen Zellen als Aktivierung gedeutet werden, mit der Möglichkeit ins ZNS zu wandern (BRENNAN et al., 1999; PONTA et al., 2003).

So kommt es einige Tage nach dem Eindringen des Virus in das ZNS unter anderem durch die erhöhte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle zur zerebralen Infiltration von in der Peripherie aktivierten T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen (GRIFFIN, 2003). Da unter anderem das ZO-1-Protein als Bestandteil der endothelialen "tight junctions" und damit der BHS ein Substrat für MMP-9 darstellt (HARKNESS et al., 2000) erleichtert eine Degradierung dieses Proteins durch MMP-9 zusätzlich das Eindringen der Leukozyten in das ZNS. Damit sind MMPs, wie bereits erwähnt, in der Lage durch die Degradierung extrazellulärer Matrix die Blut-Hirn-Schranke zu öffnen und damit dem Influx von Entzündungszellen Vorschub zu leisten (HARTUNG und KIESEIER, 2000; CUZNER und OPDENAKKER, 1999). Wird nun den aktivierten T-Zellen das entsprechende Antigen in Verbindung mit dem MHC II-Molekül präsentiert, so verbleiben die T-Zellen im Gehirn (IRANI et al., 1996) und stellen eine weitere Quelle für Zytokine, Chemokine und MMPs dar, wie es auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte. So konnten WÜNSCHMANN et al. (1999) bei der Staupeenzephalitis in frühen Läsionen eine geringgradige diffuse intraläsionale Infiltration mit CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sehen, wohingegen in den chronischen Läsionen eine starke diffuse intraläsionale (CD8<sup>+</sup>) und perivaskuläre (CD4<sup>+</sup>) Infiltration dominiert. Da, wie bereits ausgeführt, Leukozyten einen bedeutenden Syntheseort für MMPs und TIMPs darstellen, ist es erklärbar, dass es, in Verbindung mit aktivierten Mikroglia und in Korrelation mit einer steigenden Infiltration von Entzündungszellen, in der vorliegenden Studie zu einem statistisch signifikanten Anstieg von MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS in den Gruppen IV und V gekommen ist.

Es wird weiterhin postuliert, dass die durch lymphatische Zellen aktivierten Makrophagen Zytokine wie TNF- $\alpha$  sowie proteolytische Enzyme wie MMPs abgeben und so im Rahmen einer "bystander demyelination" eine Hydrolyse des Myelins verursachen (VANDEVELDE et al., 1981; LEDEEN und CHAKRABORTY, 1998). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass MMPs *in vitro* unter Spaltung des "myelin basic protein" (MBP) in der Lage sind Peptidfragmente zu generieren (CHANDLER et al., 1995; GIJBELS et al., 1993). Es wurde gefolgert, dass dieser Prozess auch *in vivo* stattfindet und neben einer direkten Degradierung der Myelinscheide auch zur Generierung enzephalitogener Autoantigene führt und damit den Demyelinisierungsprozeß aufrechterhält, wie es auch für die EAE gezeigt werden konnte (CHANDLER et al., 1997; OPDENAKKER und VAN DAMME, 1994). Ähnliche

Pathogenitätsmechanismen können auch für die Staupeenzephalitis nicht ausgeschlossen werden.

Neben diesen bereits ausgeführten potentiellen Wirkungsweisen, die MMPs im ZNS vermitteln oder bedingen können, kommt hinzu, dass MMPs auf verschiedene Art und Weise eine neurotoxische Wirkung entfalten können. Verschiedene Autoren beschreiben eine direkte Neurotoxizität von MMP-1 und MMP-2 auf Neuronen. So kann im Fall der Degradierung der EZM durch MMPs zusätzlich der neuronale Tod durch die Unterbrechung der Zell-Matrix Verbindung und damit der Integrin-Signale erfolgen. Des weiteren können über die Spaltung bestimmter Rezeptoren wie FasL direkt oder indirekt bestimmte "pathways" moduliert werden, die zur Apoptose der betroffenen Zellen führen (YONG et al., 2001), wobei Apoptose bei der Staupeenzephalitis eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint, dies zum Teil jedoch kontrovers diskutiert wird (MORO et al., 2003b; SCHOBESBERGER et al., 1999).

Verbunden mit dem intrazerebralen Nachweis gelingt der intrathekalen Nachweis zahlreicher MMPs. So wurden für die MS des Menschen erhöhte Gehalte an MMPs für Serum und Liquor beschrieben, wobei hier vor allem MMP-9 eine Schlüsselrolle zugeordnet wird. So konnten LEPPERT et al. (1998) vor allem bei dem schubförmig-remittierendem Verlauf ("relapsing-remitting"-MS, RR-MS) der MS im Verlauf von akuten Schüben mittels Zymographie einen signifikanten Anstieg der MMP-9-Aktivität im Liquor feststellen, der mit einer erhöhten Durchlässigkeit der BHS korrelierte und die Untersuchung von GIJBELS et al. (1992) bestätigte. Gleichzeitig fanden WAUBANT et al. (1999) und LEE et al. (1999) korrespondierend hierzu einen erhöhten Serum-Gehalt an MMP-9, wohingegen TIMP-1 nicht erhöht war. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch die Untersuchungen von LIUZZI et al. (2002), die darüber hinaus das gleiche Ergebnis bei anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen des ZNS erhielten. Weitere Autoren sehen bei zahlreichen bakteriellen, viralen, fungalen sowie nicht-entzündlichen Enzephalitiden ebenfalls eine Erhöhung von MMP-9-mRNS bzw. -Protein im Liquor (AZEH et al., 1998; KIRCHNER et al., 2000; KOLB et al., 1998; LIUZZI et al., 2000; MATSUURA et al., 2000). Der Liquor von Nagern mit EAE enthält ebenfalls einen erhöhten Gehalt an MMP-9, wobei MMP-9 und MMP-2 immunhistologisch in infiltrierenden mononukleären Zellen und im perivaskulären Raum lokalisiert sind (KIESEIER et al., 1999b).

Für den Hund liegt lediglich eine Untersuchung vor, die die physiologischen Verhältnisse im Liquor von klinisch gesunden Hunden untersucht (BERGMAN et al. 2002). Hierbei konnte mittels zymographischer Methoden nur proMMP-2, aber kein MMP-9 im Liquor gefunden werden, was auch die Normalbefunde beim Menschen widerspiegelt. Es kann vermutet werden, dass bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis ähnliche Verhältnisse zutreffen wie bei den oben beschriebenen neuropathologischen Veränderungen, es liegen hierüber jedoch keinerlei Untersuchungen vor. Hinweisend dafür kann die Tatsache gesehen werden, dass FRISK et al. (1999) in ihren Untersuchungen über das Verteilungsmuster von Zytokinen im Vollblut und Liquor von an Staupeenzephalitis erkrankten Hunden eine deutliche Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  gefunden haben, die ihrerseits modulatorische Eigenschaften auf die Sekretion von MMPs haben. STRAZIELLE et al. (2003) z.B. fanden bei Ratten Hinweise darauf, dass Epithelzellen des Plexus choroideus nach Gabe von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 vermehrt MMP-2 und MMP-9 in die Zerebrospinalflüssigkeit sezernieren und damit als Quelle intrathekaler MMPs in Betracht gezogen werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl für MMP-9-, als auch MMP-14-mRNS ein positives Signal in Plexus choroideus-Zellen gesehen werden, ebenso wie in der Arbeit von MIAO et al. (2003) woraus gemutmaßt werden kann, dass ähnliche Verhältnisse auch bei der Staupeenzephalitis des Hundes vorliegen und im Liquor erhöhte MMP-Gehalte festgestellt werden könnten, was jedoch weiteren Untersuchungen bedarf.

In neueren Veröffentlichungen wird außerdem davon berichtet, dass sowohl MMP-9 als auch MMP-14 an den CD44-Rezeptor binden können und dadurch gezielt in bestimmten Bereichen der EZM enzymatisch aktiv werden (YU und STAMENKOVIC, 1999; KAJITA et al., 2001). Hierzu passt die in der vorliegenden Untersuchung gefundene positive Korrelation für die Expression des Hyaluronat-Rezeptors CD44 mit MMP-9-<sup>111</sup>In in den Gruppen III und V sowie mit MMP-14-<sup>111</sup>In in den Gruppen IV und V. Dies liefert Hinweise darauf, dass auch in der vorliegenden Untersuchung eine Assoziation zwischen der Expression des CD44-Rezeptors und dem Gehalt an MMP-9- bzw. MMP-14-mRNS besteht, wodurch eine selektive Anreicherung der MMPs in bestimmten Arealen erfolgen kann.

LASSMANN et al. (2003) konnten bei einem bestimmten Haupttyp (III) der MS eine Kreuzreaktion des CDV-spezifischen Antikörpers D-110 mit einem endogenen,

phosphorylierten Epitop des Gehirns nachweisen. Diese Kreuzreaktion wurde vor allem im Zusammenhang mit einer Expression des "hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ " (HIF-1 $\alpha$ ) beobachtet. Da eine HIF-1 $\alpha$  Induktion unter anderem eine "vascular endothelial growth factor" (VEGF) Aufregulierung vermittelt, die auch im Gehirn zu Tragen kommt (LIU et al., 1995; NORDAL et al., 2004; SHARP et al., 2004; SHWEIKI et al., 1992) und VEGF eine entscheidende Rolle für die Induktion der MMP-Transkription zugesprochen wird (FINI et al., 1998; PUFÉ et al., 2004), kann gemutmaßt werden, dass es möglicherweise auch im Staupegehirn über eine HIF-1 $\alpha$  vermittelte Aufregulierung von VEGF zu einer erhöhten Transkription von MMPs kommen kann. Untersuchungen über die Expression von HIF-1 $\alpha$  im Rahmen der Staupeenzephalitis liegen bisher allerdings nicht vor.

### 5.3.3.2 TIMP-1-mRNS

Die Anzahl TIMP-1-mRNS positiver Zellen nahm ebenfalls von Gruppe I – V zu, blieb aber in ihrer Gesamtzahl deutlich unter der der MMP-9- bzw. -14-mRNS positiver Zellen, wobei in den Gruppen IV und V ein sehr deutliches vaskulär akzentuiertes Signal zu beobachten war. So lag die Zahl TIMP-1-mRNS exprimierender Zellen vor allem intraläsional nicht-Gefäß-assoziiert (Parameter "nGa") um die Hälfte bis zu zwei Dritteln unter der der MMP-9- bzw. MMP-14-mRNS exprimierenden Zellzahl. Es ist unbestritten, dass TIMPs die bedeutendsten endogenen Inhibitoren für MMPs darstellen, wobei TIMP-1 die enzymatisch aktiven Formen aller MMPs hemmt, MMP-14 jedoch nur mäßig gut zu hemmen in der Lage ist und eine Assoziation mit pro-MMP-9 eingehen kann (BAKER et al., 2002). Zusätzlich können TIMPs neben ihrer Namensgebenden Funktion noch in zahlreiche weitere biologische Abläufe eingreifen (BAKER et al. 2002; BREW et al., 2000).

TIMP-1 soll im Gegensatz zu TIMP-2, -3 und -4 im Gehirn konstitutiv nur sehr gering exprimiert werden (PAGENSTECHEER et al., 1998), wobei Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen TIMP-1-Protein exprimieren (NAKAGAWA et al., 1994). Auch in der vorliegenden Studie konnte in den Kontrollgehirnen nur ein geringes positives Signal primär auf einzelnen Astrozyten, Makrophagen/Mikrogliazellen und Neuronen gesehen werden, wohingegen bei den an Staupe erkrankten Tieren zahlreiche Astrozyten, Makrophagen/Mikrogliazellen und Lymphozyten ein positives Signal trugen. MIAO et al. (2003) fanden bei ihrer Untersuchung am Staupegehirn von Hunden eine verhältnismäßig geringe Expression von TIMP-1- und TIMP-2-Protein, woraus die Autoren eine Imbalanz der MMP/TIMP-Achse postulieren. Auch die vorliegende Studie lässt schlussfolgern, dass

aufgrund der geringeren TIMP-1-mRNS-Expression im Verhältnis zur MMP-9- bzw. MMP-14-mRNS-Aufregulation eine Verschiebung der MMP/TIMP-Ratio zu Gunsten der MMPs erfolgt. Während PAGENSTECHER et al. (1998) an EAE-erkrankten und IL-3-, IL-6- und TNF- $\alpha$ -transgenen Mäusen neben der Erhöhung von verschiedenen MMPs eine signifikante Aufregulierung von TIMP-1-mRNS fanden, die vor allem in Astrozyten in Korrelation mit den entzündlichen Läsionen gelegen war und der Eindämmung entzündlicher Herde dienen soll, wurden bei Untersuchungen der TIMP-Spiegel bei MS-Patienten teils widersprüchliche Ergebnisse festgestellt. CUZNER et al. (1996) konnten sowohl in Kontrollgehirnen als auch bei verschiedenen Stadien der MS TIMP-1-Protein in Gliazellen, der Blutgefäßmatrix und zusätzlich im Bereich von Läsionen in Gitterzellen und Kollagendebris feststellen, wohingegen in anderen Untersuchungen die mRNA bei der RR-MS von MMP-7 und MMP-9 gegenüber den Kontrollen im Gehirn erhöht war, nicht jedoch die von MMP-2, MMP-3, "TNF- $\alpha$  converting enzyme" (TACE) sowie TIMP-1 – 4 (LINDBERG et al., 2001). ÖZENCI et al. (1999) fanden in Blutmonozyten von MS-Patienten einen höheren Gehalt an MMP-9-, MMP-3- und TIMP-1-mRNS, sowie eine positive Korrelation für MMP-9 und TIMP-1, wohingegen LIUZZI et al. (2002) bei der RR-MS im Serum hohe Gehalte an MMP-9 Protein, jedoch niedrige Gehalte an TIMP-1 Protein gemessen haben. LEE et al. (1999) wiederum stellten bei der RR-MS und anderen neurologischen Erkrankungen erhöhte Serumspiegel von MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 fest, auf TIMP-1 bezogen jedoch keine Unterschiede in der Höhe zwischen Schub und ruhender Phase, wohingegen MMP-9 während eines Schubes erhöht war. Bei anderen neuronalen Schäden wie zerebraler Kontusion kann mittels ISH ebenfalls ein Anstieg der MMP-9- und TIMP-1-mRNS beobachtet werden (VON GERTTEN et al., 2003). Interessant ist die Tatsache, dass KOLB et al. (1998) im Liquor von Menschen mit einer viralen Meningitis einen hohen Gehalt sowohl von MMP-9 als auch TIMP-1 Protein fanden und KHUTH et al. (2001) bei der experimentellen Infektion von Mäusen mit CDV neben der leicht erhöhten Expression von MMP-2- bzw. -9-mRNS und einem stark erhöhten MMP-14-mRNS Gehalt, eine ausgeprägte Aufregulierung der TIMP-1-mRNS beobachten konnten, was dem Bild in der hier vorliegenden Studie ähnelt. Ausgehend von der Beobachtung, dass MS-Patienten nach der therapeutischen Gabe von INF- $\beta$  erhöhte TIMP-1 Spiegel im Blutserum haben (WAUBANT et al., 2001) und die Chemokine MCP1, MIP1 $\beta$ , RANTES, IL-8 und CX3CL1 auch eine steigernde Wirkung auf die Transkription von TIMP-1 und TIMP-2 (CROSS et al. 1999) haben, kann gemutmaßt werden, ob die bei einer viralen Infektion des ZNS ausgelöste Immunantwort resultierend in der Sekretion von INF- $\beta$  und zahlreichen Chemokinen, im Gegensatz zur MS, und analog zu anderen Viruserkrankungen

und der EAE auch bei der CDV-Infektion einen starken TIMP-1-mRNS Anstieg bedingt. Ebenso könnte die in den Gruppen IV und V beobachtete stark endothelial/vaskulär akzentuierte Expression der TIMP-1-mRNS als Versuch gewertet werden, der erhöhten MMP-Expression in diesem Bereich entgegen zu wirken.

#### 5.4 Schlussbetrachtung

Wie bereits ausgeführt ist die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis, ähnlich wie bei anderen demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS, nach wie vor unklar. Es wird angenommen, dass die erste Phase der Demyelinisierung aufgrund großer Mengen intraläsional nachweisbaren Virus-Proteins und -mRNS unmittelbar Virus-induziert ist, wohingegen in den späteren Läsionen mit abnehmender Virusmenge ein immunpathologischer Prozess diskutiert wird. Das Fortschreiten der Demyelinisierung bei der Staupeenzephalitis wird daher nicht begründet durch eine Persistenz des Virus innerhalb der Läsionen (GAEDKE et al., 1999), wie sie z.B. für die Theiler's murine Enzephalomyelitis beschrieben ist (RODRIGUEZ et al., 1996), jedoch lässt sich nicht sicher ausschließen, dass die immunpathologischen Prozesse in der zweiten Phase der Demyelinisierung zusätzlich durch eine unvollständige Eliminierung des Virus aus einzelnen Zellen "getriggert" werden.

Zusammenfassend muss angenommen werden, dass den MMPs und TIMPs durch ihre breite biologische Wirksamkeit, ähnlich wie bei anderen demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis zukommt. Die Untersuchung des Expressionsmusters von MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS in der vorliegenden Untersuchung liefert Hinweise für eine Dysregulation der MMP/TIMP-Achse im Sinne einer überschießenden Produktion proteolytischer Enzyme ohne hemmende Gegenspieler im Rahmen einer Staupevirusinfektion. Hierbei konnten in den frühen Läsionen vor allem Astrozyten und Makrophagen/Mikroglia und in den späteren Läsionen neben Makrophagen/Mikroglia auch infiltrierende Lymphozyten als Hauptsyntheseort der untersuchten MMPs/TIMP identifiziert werden.

Da in der vorliegenden Arbeit vorrangig die Expression der mRNS von MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 untersucht wurde, dies aber noch keine endgültige Aussage über die tatsächliche proteolytische Aktivität dieser Enzyme macht, sollte in zukünftigen Arbeiten mittels *in situ*-

Zymographie die proteolytische Aktivität einzelner MMPs bei verschiedenen Herdläsionen der demyelinisierenden Staupeenzephalitis untersucht werden und in Zusammenhang mit weiteren Chemokinen und Zytokinen gebracht werden. Zusätzlich sollte versucht werden, anhand von Tiermodellen mit bestimmten MMP-transgenen Knockout-Mäusen die exakten Pathomechanismen bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen genauer zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

In der Literaturübersicht wird neben der Klassifikation der Morbilliviren, ihrem Wirtsspektrum und der Pathogenese der Hundestaube eine kurze Zusammenfassung über den derzeitigen Wissenstand der pathogenetischen und molekularen Mechanismen, die der demyelinisierenden Leukoenzephalitis zugrunde liegen, gegeben. Darüber hinaus werden anhand einer allgemeinen Übersicht die speziellen Wirkungsweisen von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihren spezifischen endogenen Inhibitoren ("tissue inhibitors of metalloproteinases", TIMP) bei neuroinflammatorischen Prozessen im ZNS erörtert.

Eingegangen in diese Untersuchung sind die Kleinhirne von insgesamt 17 Tieren, von denen 13 Hunde an einer Staubeenzephalitis erkrankt waren und 4 Hunde einer klinisch gesunden Kontrollgruppe entstammten.

Für die immunhistologischen Untersuchungen (IH) fand Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe Anwendung. Hierbei wurden Antikörper zum Nachweis von Astrozyten (GFAP), T- und B-Zellen (CD3 bzw. CD79 $\alpha$ ), MHC Klasse II-Antigen (MHCII), des Hyaluronat-Rezeptors CD44 (CD44), des Staubevirus-Nukleoprotein-Antigens (NP-2) sowie des basischen Myelinproteins (MBP) und das Lektin BS-1 zum Nachweis von Makrophagen/Mikroglia verwendet. Zusätzlich wurde an ausgewählten Schnitten eine Doppelmarkierung zum Nachweis von GFAP bzw. BS-1 nach erfolgter *in situ*-Hybridisierung durchgeführt.

Für die *in situ*-Hybridisierung zum Nachweis von CDV-, GAPDH-, MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS fand ebenfalls Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Material Verwendung. Die Isolierung der spezifischen mRNS für die RT-PCR erfolgte aus Staubevirus-infizierten (Stamm Onderstepoort) DH82-Zellen, Con A-stimulierten kaninen Lymphozyten bzw. O.C.T.-eingebettetem Gefriermaterial eines kaninen kutanen Histiocytems. Nach Amplifizierung der mRNS und Klonierung der PCR-Produkte in ein Plasmid wurden mittels *in vitro*-Transkription spezifische DIG-markierte RNS-Sonden gewonnen, die entweder komplementär zur mRNS ("antisense"-Sonde) oder zur genomischen DNS bzw. RNS ("sense"-Sonde) waren. So standen die "antisense"-Sonden zur Detektion

von CDV-, GAPDH-, MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS sowie die entsprechenden “sense“-Sonden als Negativkontrollen zur Verfügung.

Die Kleinhirnläsionen der an einer demyelinisierenden Staupeenzephalitis erkrankten Tiere wurden anhand ihres pathohistologischen Erscheinungsbildes sowie des immunhistologischen Nachweises des Staupevirus-Nukleoprotein-Antigens in 4 Gruppen eingeteilt, so dass sich insgesamt 5 Gruppen mit folgenden Charakteristika ergaben: Kontrolltiere (Gruppe I), Herde mit lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Läsionen (Gruppe II), akuten Läsionen (Gruppe III), subakuten Läsionen mit Entzündung (Gruppe IV) und chronischen Läsionen (Gruppe V).

Bei den immunhistologischen Untersuchungen war der Nachweis des Staupevirus-Nukleoprotein-Antigens bei allen an Staupe erkrankten Tieren positiv, jedoch in den Gruppen II bis V in abfallender Ausprägung und Intensität. GFAP-positive Zellen fanden sich in allen untersuchten Gruppen, wobei die Gruppen II und III eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellzahl gegenüber den Kontrolltieren aufwies, in den Gruppen IV und vor allem V jedoch ein Schwund intraläsional gelegener Zellen zu verzeichnen war. In Korrelation dazu nahm die Expression des CD44-Rezeptors bis zur Gruppe IV zu, um in der Gruppe V wieder abzunehmen. BS-1 positive Makrophagen/Mikroglia waren von der Gruppe I bis V zunehmend, jedoch am stärksten in den Gruppen IV und V zu sehen, was auch mit einer deutlichen Aufregulierung des MHC Klasse II-Antigens einherging. Das Signal für MBP nahm von Gruppe I bis hin zu Gruppe V ab, wohingegen in den Gruppen IV und V eine deutliche Infiltration mit CD3- und CD79 $\alpha$ -positiven Lymphozyten zu beobachten war.

In der ISH gelang der Nachweis von GAPDH-mRNS als so genanntes “house-keeping“-Gen zur Bestätigung der Integrität der vorhandenen mRNS in den Gehirnen aller 5 Gruppen. Der Nachweis der viralen mRNS und der (positiv-orientierten) antigenomischen ssRNS des Staupevirus-Nukleoprotein-Genabschnittes mittels der DIG-markierten-“antisense“-Sonde sowie der (negativ-orientierten) genomischen ssRNS mittels der DIG-markierten-“sense“-Sonde gelang in allen Kleinhirnen der Staupevirus-infizierten Tiere. Hierbei bestand eine deutliche Korrelation mit dem immunhistologischen Nachweis des Staupevirus-Nukleoprotein-Antigens.

Die mRNS für MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 war in allen 5 Gruppen nachweisbar, wobei sich das positive Signal für alle 3 untersuchten MMPs/TIMP bei den Kontrolltieren (Gruppe

I) primär auf Neurone und einzelne diffus in der weißen Substanz gelegene Zellen beschränkte und insgesamt wesentlich geringer ausfiel als in den Gruppen II bis V. Die Expression der mRNA aller 3 untersuchten MMPs/TIMP nahm in den Kleinhirnen der Tiere mit einer demyelinisierenden Staupeenzephalitis intraläsional für die Parameter “nGa“ (nicht-Gefäß-assoziiert) und “Ga“ (Gefäß-assoziiert) von den Gruppen II bis V ansteigend stark zu, wobei die Expression der MMP-9- und MMP-14-mRNA gegenüber der TIMP-1-mRNA überproportional zunahm. In den frühen Läsionen (Gruppen II und III) waren vor allem Astrozyten und aktivierte Mikroglia/Makrophagen und in den späteren Läsionen (Gruppen IV und V) aktivierte Mikroglia/Makrophagen sowie infiltrierende Lymphozyten als Hauptsynthesequelle der MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNA anzusehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes in Abhängigkeit von der Herdveränderung zu einer unterschiedlich starken Aufregulierung der mRNA-Synthese von MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 kommt. Aus der geringeren Aufregulierung der TIMP-1-mRNA im Vergleich zur MMP-9- und MMP-14-mRNA kann vermutet werden, dass eine Dysregulation des biologischen MMP/TIMP-Verhältnisses zu einem Überschuss proteolytisch aktiven Enzyms führen kann. Im Hinblick auf die breite biologische Wirksamkeit der MMPs kann daraus schlussfolgernd postuliert werden, dass den MMPs als endogenen Proteasen im Zusammenspiel mit anderen Proteasen, Chemokinen und Zytokinen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis zukommt.

## 7 Summary

In the literature section, a short review about classification of the morbillivirus genus, host spectrum and pathogenesis of canine distemper is given. In addition, present knowledge upon the pathogenic and molecular mechanisms underlying the myelin loss in distemper leukoencephalitis are outlined. Furthermore, a general overview on the role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific endogenous inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) in neuroinflammatory processes is provided.

The cerebella of a total of 17 dogs, 13 of them suffering from distemper leukoencephalitis and 4 healthy control dogs, have been used in the present investigation.

For the immunohistochemical investigation formalin-fixed, paraffin-embedded tissue was used. Antibodies specific for astrocytes (GFAP), T- and B-cells (CD3 $\epsilon$  and CD79 $\alpha$ , respectively), MHC class II-antigen (MHC II), hyaluron-receptor CD44 (CD44), canine distemper virus-nucleoprotein-antigen (NP-2), basic myelin protein (MBP) and the lektin BS-1 expressed by macrophages/microglia have been employed. Additionally, double-labelling was carried out on selected slides using immunohistochemistry and *in situ*-hybridization.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue was used to detect CDV-, GAPDH-, MMP-9-, MMP-14, and TIMP-1-mRNA by *in situ*-hybridization. For probe preparation specific mRNA for the RT-PCR was isolated from canine distemper virus-infected tissue culture cells (DH82), Con A-stimulated canine blood lymphocytes and O.C.T-embedded material of a canine cutaneous histiocytoma, respectively. After amplification of the mRNA by RT-PCR and cloning of the PCR-product into an appropriate plasmid, specific DIG-labelled RNA-probes were synthesized using *in vitro*-transcription. The specific DIG-labelled RNA-probes were either complementary to the mRNA (antisense-probe) or to the genomic DNA or RNA, respectively. The antisense-probe were used to detect CDV-, GAPDH-, MMP-9-, MMP-14- and TIMP-1-mRNA and the corresponding sense-probes served as negative controls.

The lesions in the cerebella of the diseased dogs, suffering from demyelinating distemper encephalitis were grouped into 4 classes by using neuropathology and immunohistologic appearance of the distemper virus-nucleoprotein-antigen resulting in 5 groups with following characteristics: control dogs (group I), animals with areas and/or plaques without micros-

copical lesions (group II), acute lesions (group III), subacute lesions with inflammation (group IV) and chronic lesions (group V).

By immunohistology, distemper virus-nucleoprotein-antigen was present in all distemper dogs and not in controls. The signal decreased from group II to V. GFAP-positive cells were detected in plaques of all groups investigated, whereby group II and III showed a significant increase in the cell numbers, whereas in group IV and V plaques, a loss of intralésionally positive cells was seen. The expression of the CD44-receptor increased from group II to IV, and decreased in group V. The number of BS-1-positive macrophages/microglia increased from group I to V, and expression was most prominent in group IV and V. Similarly, there was a strong MHC class II-antigen upregulation in all plaques increasing from II to IV. The signal for MBP decreased in the plaques from group I to V, and in plaques in group IV and V a strong infiltration with CD3 $\epsilon$ - and CD79 $\alpha$ -positive lymphocytes was observed.

The detection of GAPDH-mRNA was used to confirm the integrity of mRNA in the investigated tissues and to ensure accessibility of mRNA for ISH. This house-keeping gene could be detected in all brains of all five groups by *in situ*-hybridization. The detection of viral mRNA and the (positive-sense) antigenomic ssRNA of canine distemper virus-nucleoprotein-gene sequence with the DIG-labelled antisense-probe and of (negative-sense) genomic ssRNA with the DIG-labelled sense-probe was successful in all cerebella of CDV-infected dogs. In addition, a close correlation with the positive immunohistologic CDV-signal was observed.

MMP-9-, MMP-14-, and TIMP-1-mRNA was detected in all plaques of all five groups in varying amount. In control dogs (group I) the positive signal of the 3 investigated mRNAs of MMPs/TIMP was restricted mainly to neurons and single cells diffusely distributed in the white matter. The signal was weak in group I, but was prominent in group II – V. The expression of mRNA of all 3 investigated MMPs/TIMP increased strongly in the cerebella of the distemper dogs intralésionally in non-vascular associated and vascular associated locations in the group II – V. Additionally, the expression of MMP-9- and MMP-14-mRNA increased overproportional in contrast to TIMP-1-mRNA. In early lesions (group II and III) especially astrocytes and activated microglia/macrophages and in older lesions (group IV and V) activated microglia/macrophages and infiltrating lymphocytes represent the main source for MMP-9-, MMP-14-, and TIMP-1-mRNA synthesis.

---

Summarized, depending on the kind of lesion in demyelinating distemper encephalitis, there is a differently strong up-regulation of MMP-9-, MMP-14-, and TIMP-1-mRNA. Because of the reduced up-regulation of TIMP-1-mRNA compared to MMP-9- and MMP-14-mRNA it can be suspected, that a dysregulation of the MMP/TIMP-ratio may lead to an overexpression of proteolytic active enzyme. Considering the broad biologic efficacy of MMPs it can be postulated, that MMPs as endogenous proteases may play a key role in the pathogenesis of demyelinating distemper encephalitis.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aldinger, S., Baumgärtner, W., Örvell, C.** (1993). Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol* 85: 635-645
- Aldinger, S., Wünschmann, A., Baumgärtner, W., Voss, C., Kremmer, E.** (1996). Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol* 92: 273-280
- Aldinger S., Fonfara, S., Kremmer, E., Baumgärtner, W.** (2000). Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. *Acta Neuropathol* 99: 138-146
- Annabi, B., Thibeault S., Moundjian, R., Beliveau, R.** (2004). Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem* 279: 21888-21896
- Anthony, D.C., Ferguson, B., Matyzak, M.K., Miller, K.M., Esiri, M.M., Perry, V.H.** (1997). Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 406-415
- Appel, M.J.G.** (1969). Pathogenesis of canine distemper. *Am J Vet Res* 30: 1167-1182
- Appel, M.J.G., Gillespie, J.H.** (1972). Canine distemper virus. In: Gard, S., Hallauer, C, Meyer, K.F. (eds). *Virology Monographs* 11. Springer-Verlag, New York, pp 1-96
- Appel, M.J.G., Shek, W.R., Summers, B.A.** (1982). Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect Immun* 37: 592-600
- Appel, M.J.G.** (1987). Canine distemper virus. In: Horzinek, M.C.M. (Hrsg.) *Virus infections of vertebrates* Vol. 1. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, pp 133-159
- Appel, M.J., Reggiardo, C., Summers, B.A., Pearce-Kelling, S., Mare, C.J., Noon, T.H., Reed, R.E., Shively, J.N., Orvell, C.** (1991). Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Arch Virol* 119: 147-152
- Arican, M., Ceylan, C.** (1999). Metalloproteinases in canine experimental traumatic keratokonjunctivitis. *Zentralbl Veterinarmed A* 46: 527-532
- Arnbjerg, J.** (1986). Schmelz- und Wurzelhypoplasien nach Staupe. *Kleintierpraxis* 31: 323-326

- Asher, R., Perides, G., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A.** (1991). Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of a hyaluronate-protein complex. *J Neurosci Res* 28: 410-421
- Axthelm, M.K., Krakowka, S.** (1987). Canine distemper virus: the early blood-brain barrier lesion. *Acta Neuropathol* 75: 27-33
- Azeh, I., Mader, M., Smirnov, A., Beuche, W., Nau, R., Weber, F.** (1998). Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leukocyte invasion. *Neurosci Lett* 256: 127-130
- Baker, A.H., Edwards, D.R., Murphy, G.** (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115: 3719-3727
- Barnes, A., Bee, A., Bell, S., Gilmore, W., Mee, A., Morris, R., Carter, S.D.** (2000). Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82. *Vet Immunol Immunopathol* 75: 9-25
- Bar-Or, A., Nuttall, R.K., Duddy, M., Alter, A., Kim, H.J., Ifergan, I., Pennington, C.J., Bourgoin, P., Edwards, D.R., Yong, V.W.** (2003). Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 126: 2738-2749
- Barrero, P.R., Grippo, J., Viegas, M., Mistchenko, A.S.** (2003). Wild-type measles virus in brain tissue of children with subacute sclerosing panencephalitis, Argentina. *Emerg Infect Dis* 9: 1333-1336
- Barrett, T.** (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on Morbillivirus of carnivores. *Vet Microbiol* 69: 3-13
- Bauer, E.A., Stricklin, G.P., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z.** (1975). Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 232-240
- Baumgärtner, W., Örvell, C., Reinacher, M.** (1989). Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol* 78: 504-512
- Baumgärtner, W.** (1993). Virale Infektionskrankheiten bei Welpen und Junghunden unter besonderer Berücksichtigung der Staupevirusinfektion. *Prakt. Tierarzt* 74: 26-32
- Baumgärtner, W., Boyce, R.W., Alldinger, S., Axthelm, M.K., Weisbrode, S.E., Krakowka, S., Gaedke, K.** (1995). Metaphyseal bone lesions in young dogs with systemic canine distemper virus infection. *Vet Microbiol* 44: 201-209

- Bergman, R.L., Inzana, K.D., Inzana, T.J.** (2002). Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 63: 1359-1362
- Bestetti, G., Fatzer, R., Fankhauser, R.** (1978). Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 43: 69-75
- Bigami, A., Hosley, M., Dahl, D.** (1993) Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol* 188: 419-433
- Blakemore, W.F., Summers, B.A., Appel, M.G.J.** (1989). Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 77: 550-553
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., Stöckler, W.** (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331: 134-140
- Bollo, E., Zurbriggen, A., Vandeveld, M., Fankhauser, R.** (1986). Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol* 72: 69-73
- Brennan, F.R., O'Neill, J.K., Allen, S.J., Butter, C., Nuki, G., Baker, D.** (1999). CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease. *Immunology* 98: 427-435
- Brett, F.M., Mizisin, A.P., Powell, H.C., Campbell, I.L.** (1995). Evolution of neuropathologic abnormalities associated with blood-brain barrier breakdown in transgenic mice expressing interleukin-6 in astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 766-775
- Brew, K., Dinakarandian, D., Nagase, H.** (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structures and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-283
- Bürge, T., Griot, C., Vandeveld, M., Peterhans, E.** (1989). Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. *J Virol* 63: 2790-2797
- Burkhardt, H., Kalden, J.R.** (1997). Animal models of autoimmune disease. *Rheumatol Int* 17: 91-99
- Butler, G.S., Butler, M.J., Atkinson, S.J., Will, H., Tamura, T., van Westrum, S.S., Crabbe, T., Clements, J., d'Ortho, M.P., Murphy, G.** (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 273: 871-880

- Cai, W.J., Koltai, S., Kocsis, E., Scholz, D., Kostin, S., Luo, X., Schaper, W., Schaper, J.** (2003). Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H31-40
- Cammer, W., Bloom, B.R., Norton, W.T., Gordon, S.** (1978). Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1554-1558
- Chandler, S., Coates, R., Gearing, A., Lury, J., Wells, G., Bone, E.** (1995). Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 201: 223-226
- Chandler, S., Miller, K.M., Clements, J.M., Lury, J., Corkill, D., Anthony, D.C., Adams, S.E., Gearing, A.J.** (1997). Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 72: 155-161
- Chang, C., Werb, Z.** (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11: S37-43
- Chant, K., Chan, R., Smith, M., Dwyer, D.E., Kirkland, P.** (1998). Probable human infection with a newly described virus in the family Paramyxoviridae. The NSW Expert Group. *Emerg Infect Dis* 4: 273-275
- Chapman, G.A., Moores, K., Harrison, D., Campbell, C.A., Stewart, B.R., Strijbos, P.J.** (2000). Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J Neurosci* 20: RC87: 1-5
- Cherpillod, P., Beck, K., Zurbriggen, A., Wittek, R.** (1999). Sequence analysis and expression of the attachment and fusion proteins of canine distemper virus wild-type strain A75/17. *J Virol* 73: 2263-2269
- Chomczynski, P., Sacchi N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*: 156-159
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Chappuis, G., Soulier, M., Kikuchi, Y.** (1998). Serological survey of selected canine viral pathogens and zoonoses in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*) and black bears (*Ursus americanus*) from Alaska. *Rev Sci Tech* 17: 756-766
- Chu Py, P.Y., Salamonsen, L.A., Lee, C.S., Wright, P.J.** (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction* 123: 467-477
- Chua, K.B.** (2003). Nipah virus outbreak in Malaysia. *J Clin Virol* 26: 265-275
- Chua, K.B., Bellini, W.J., Rota, P.A., Harcourt, B.H., Tamin, A., Lam, S.K., Ksiazek T.G., Rollin, P.E., Zaki, S.R., Shieh, W., Goldsmith, C.S., Gubler, D.J., Roehrig, J.T., Eaton, B., Gould, A.R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A.E., Peters, C.J.,**

- Anderson, L.J., Mahy B.W.** (2000). Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288: 1432-1435
- Cichy, J., Pure, E.** (2003). The liberation of CD44. *J Cell Biol* 161: 839-843
- Cook, S.D., Dowling, P.C., Russell, W.C.** (1979). Neutralizing antibodies to canine distemper and measles virus in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 41: 61-70
- Cossins, J.A., Clements, J.M., Ford, J., Miller, K.M., Pigott, R., Vos, W., van der Valk, P., de Groot, C.J.** (1997). Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* 94: 590-598
- Coughlan, A.R., Robertson, D.H., Bennett, D., May, C., Beynon, R.J., Carter, S.D.** (1998). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec* 143: 219-223
- Cross, A.K., Woodroffe, M.N.** (1999). Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia* 28: 183-189
- Cruz, T.F., Quackenbush, E.J., Letarte, M., Moscarello, M.A.** (1986). Elevated levels of a glycoprotein antigen (P-80) in gray and white matter of brain from victims of multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 11: 877-889
- Cuzner, M.L., Gveric, D., Strand, C., Loughlin, A.J., Paemen, L., Opdenakker, G., Newcombe, J.** (1996). The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1194-1204
- Cuzner, M.L., Opdenakker, G.** (1999). Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 94: 1-14
- Dal Canto, M.C., Rabinowitz, S.G.** (1982). Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. *Ann Neurol* 11: 109-127
- Davidson, M.** (1986). Canine distemper virus infection in the domestic ferret. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 8: 448-453
- Deem, S.L., Spelman, L.H., Yates, R.A., Montali, R.J.** (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J Zoo Wildl Med* 31: 441-451
- DeGrendele, H.C., Estess, P., Siegelman, M.H.** (1997). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278: 672-675

- Diallo, A.** (1990). Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Vet Microbiol* 23: 155-163
- Docherty, A.J., Lyons, A., Smith, B.J., Wright, E.M., Stephens, P.E., Harris, T.J., Murphy, G., Reynolds, J.J.** (1985). Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318: 66-69
- Dubois, B., Opdenakker, G., Carton, H.** (1999). Gelatinase B in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neurol Belg* 99: 53-56
- Durchfeld, B., Baumgärtner, W., Herbst, W., Brahm, R.** (1990). Vaccine-associated canine distemper infection in a litter of African hunting dogs (*Lycaon pictus*). *Zentralbl Veterinärmed B.* 37: 203-212
- Dubielzig, R.R., Higgins, R.J., Krakowka, S.** (1981). Lesions of the enamel organ of developing dog teeth following experimental inoculation of gnotobiotic puppies with canine distemper virus. *Vet Pathol* 18: 684-689
- Egeblad, M., Werb, Z.** (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174
- Fankhauser, R.** (1982). Hundestaupe – Geschichte einer Krankheit. *Schweiz Arch Tierheilk* 124: 245-256
- Fini, M.E., Cook, J.R., Mohan, R., Brinckerhoff, C.E.** (1998). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: *Matrix Metalloproteinases*. Parks, W.C., Mecham, R.P. (eds.), New York, Academic Press, pp 299-356
- Frisk, A.L., Baumgärtner, W., Gröne, A.** (1999). Dominating interleukin-10 mRNA expression induction in cerebrospinal fluid cells of dogs with natural canine distemper virus induced demyelinating and non-demyelinating CNS lesions. *J Neuroimmunol* 97: 102-109
- Gaedke, K., Zurbriggen, A., Baumgärtner, W.** (1997). In vivo and in vitro detection of canine distemper virus nucleoprotein gene with digoxigenin-labelled RNA, double-stranded DNA probes and oligonucleotides by in situ hybridization. *Zentralbl Veterinärmed B* 44: 329-340
- Gaedke, K., Zurbriggen, A., Baumgärtner, W.** (1999). Lack of correlation between virus nucleoprotein and mRNA expression and the inflammatory response in demyelinating distemper encephalitis indicates a biphasic disease progress. *Eur Vet Pathol* 5: 9-20
- Gasson, J.C., Golde, D.W., Kaufman, S.E., Westbrook, C.A., Hewick, R.M., Kaufman, R.J., Wong, G.G., Temple, P.A., Leary, A.C., Brown, E.L., et al.** (1985). Molecular

- characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* 315: 768-771
- Gee, K., Kryworuchko, M., Kumar, A.** (2004). Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune disease. *Arch Immunol Ther Exp* 52: 13-26
- Giese, A., Loo, M.A., Rief, M.D., Tran, N., Berens, M.E.** (1995). Substrates for astrocytoma invasion. *Neurosurgery* 37: 294-301
- Gijbels, K., Masure, S., Carton, H., Opdenakker, G.** (1992). Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 41: 29-34
- Gijbels, K., Proost, P., Masure, S., Carton, H., Billiau, A., Opdenakker, G.** (1993). Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res* 36: 432-440
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, Thorgeirsson, U.P.** (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-122
- Gomis-Rüth, F.X., Gohlke, U., Betz, M., Knauper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C., Bode, W.** (1996). The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *J Mol Biol* 264: 556-566
- Gottschall, P.E., Deb, S.** (1996). Regulation of matrix metalloproteinase expression in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 3: 69-75
- Graber, H.U., Zurbriggen, A., Vandeveld, M.** (1993). Identification of canine glial cells by nonradioactive *in situ* hybridization. *J Vet Med* 40: 665-671
- Graber, H.U., Müller, C.F., Vandeveld, M., Zurbriggen, A.** (1995). Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes. *Acta Neuropathol* 90: 312-318
- Griffin, D.E.** (2003). Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat Rev Immunol* 3: 493-502
- Gröne, A., Weckmann, M.T., Capen, C.C., Rosol, T.J.** (1996). Canine glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase complementary DNA: polymerase chain reaction amplification, cloning, partial sequence analysis, and use as loading control in ribonuclease protection assays. *Am J Vet Res* 57: 254-257

- Gröne, A., Frisk, A.L., Baumgärtner, W.** (1998). Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 65: 11-27
- Gröne, A., Fonfara, S., Markus, S., Baumgärtner, W.** (1999). RT-PCR amplification of various canine cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes. *Zentralbl Veterinärmed B*: 301-310
- Gröne, A., Alldinger, S., Baumgärtner, W.** (2000). Interleukin-1beta, -6, -12 and tumor necrosis factor-alpha expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *J Neuroimmunol* 110: 20-30
- Gröne, A., Fonfara, S., Baumgärtner, W.** (2002). Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection. *Viral Immunol* 15: 493-505
- Gröne, A., Engelhardt, P., Zurbriggen, A.** (2003a). Canine distemper virus infection: proliferation of canine footpad keratinocytes. *Vet Pathol* 40: 574-578
- Gröne, A., Gröters, S., Koutinas, A., Saridomichelakis, M., Baumgärtner, W.** (2003b). Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper. *Vet Microbiol* 96: 157-163
- Gross, J., Lapière, C.M.** (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1014-1022
- Guo, H., Li, R., Zucker, S., Toole, B.P.** (2000). EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res* 60: 888-891
- Hall, W.W., Lamb, R.A., Choppin, P.W.** (1980). The polypeptides of canine distemper virus: synthesis in infected cells and relatedness to the polypeptides of other morbilliviruses. *Virology* 100: 433-449
- Harkness, K.A., Adamson, P., Sussman, J.D., Davies-Jones, G.A., Greenwood, J., Woodroffe, M.N.** (2000). Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* 123: 698-709
- Hartley, W.J.** (1974). A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Vet Pathol* 11: 301-312
- Hartung, H.P., Kieseier, B.C.** (2000). The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 107: 140-147

- Hegemann, N., Kohn, B., Brunnberg, L., Schmidt, M.F.** (2002). Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 714-721
- Hemmer, B., Archelos, J.J., Hartung, H.P.** (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3: 291-301
- Higgins, R.J., Krakowka, S., Metzler, A.E., Koestner, A.** (1982). Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. *Acta Neuropathol* 58: 1-8
- Hirayama, K., Yokota, H., Onai, R., Kobayashi, T., Kumata, T., Kihara, K., Okamoto, M., Sako, T., Nakade, T., Izumisawa, Y., Taniyama, H.** (2002). Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *J Comp Pathol* 127: 249-256
- Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., Barclay, A.N., Sedgwick, J.D.** (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290: 1768-1771
- Hoyland, J.A., Dixon, J.A., Berry, J.L., Davies, M., Selby, P.L., Mee, A.P.** (2003). A comparison of in situ hybridisation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for the detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease. *J Virol Methods* 109: 253-259
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.** (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
- Hummel, V., Kallmann, B.A., Wagner, S., Fuller, T., Bayas, A., Tonn, J.C., Benveniste, E.N., Toyka, K.V., Rieckmann, P.** (2001). Production of MMPs in human cerebral endothelial cells and their role in shedding adhesion molecules. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 320-327
- Hur, K., Bae, J.S., Choi, J.H., Kim, J.H., Kwon, S.W., Lee, K.W., Kim, D.Y.** (1999). Canine distemper virus infection in binturongs (*Arctitis binturong*). *J Comp Pathol* 121: 295-299
- ICTVdb version 3** (2002). The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk>
- Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Chen, M.C., Kuo, T.F., Lin, J.A., Mikami, T., Kai, C., Takahashi, E.** (2001). Seroprevalence of Canine Distemper Virus in Cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 641-644

- Imagawa, D.T., Howard, E.B., Van Pelt, L.F., Ryan, C.P., Bui, H.D., Shapshak, P.** (1980). Isolation of canine distemper virus from dogs with chronic neurological diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 164: 355-362
- Irani, D.N., Griffin, D.E.** (1996). Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *J Immunol* 156: 3850-3857
- Isaka, K., Usuda, S., Ito, H., Sagawa, Y., Nakamura, H., Nishi, H., Suzuki, Y., Li, Y.F., Takayama, M.** (2003). Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 24: 53-64
- Iwatsuki, K., Okita, M., Ochikubo, F., Gemma, T., Shin, Y.S., Miyashita, N., Mikami, T., Kai, C.** (1995). Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J Comp Pathol* 113: 185-190
- Johnson, R.T.** (1994). The virology of demyelinating diseases. *Ann Neurol* 36 Suppl: S54-60
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., Seiki, M.** (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153: 893-904
- Kennedy, S.** (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J Comp Pathol* 119: 201-225
- Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P.D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., van de Bildt, M.W., Osterhaus, A.D., Eybatov, T., Duck, C., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I., Wilson, S.** (2000). Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerg Infect Dis* 6: 637-639
- Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z.** (1998). Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280: 898-902
- Khuth, S.T., Akaoka, H., Pagenstecher, A., Verlaeten, O., Belin, M.F., Giraudon, P., Bernard, A.** (2001). Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J Virol* 75: 8268-8282
- Kieseier, B.C., Paul, R., Koedel, U., Seifert, T., Clements, J.M., Gearing, A.J., Pfister, H.W., Hartung, H.P.** (1999a). Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain* 122: 1579-1587
- Kieseier, B.C., Seifert, T., Giovannoni, G., Hartung, H.P.** (1999b). Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatments. *Neurology* 53: 20-25

- Kirchner, A., Koedel, U., Fingerle, V., Paul, R., Wilske, B., Pfister, H.W.** (2000). Upregulation of matrix metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of patients with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 368-371
- Koestner, A.** (1975). Animal model of human disease: Distemper-associated demyelinating encephalomyelitis. *Am J Pathol* 78: 361-364
- Kolb, S.A., Lahrtz, F., Paul, R., Leppert, D., Nadal, D., Pfister, H.W., Fontana, A.** (1998). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 84: 143-150
- Kouwenhoven, M., Özenci, V., Gomes, A., Yarilin, D., Giedraitis, V., Press, R., Link, H.** (2001). Multiple sclerosis: elevated expression of matrix metalloproteinases in blood monocytes. *J Autoimmun* 16: 463-470
- Krakovka, S., McCullough, B., Koestner, A., Olsen, R.** (1973). Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. *Infect Immun* 8: 819-827
- Krakovka, S., Koestner, A.** (1976): Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *J Infect Dis* 134: 629-632
- Krakovka, S., Higgins, R.J., Koestner, A.** (1980a). Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res.* 41: 284-292
- Krakovka, S., Higgins, R.J., Metzler, A.E.** (1980b). Plasma phase viremia in canine distemper virus infection. *Am J Vet Res.* 41: 144-146
- Krakovka, S., Axthelm, M.K., Johnson, G.C.** (1985). Canine distemper virus. In: Olsen, R.G., Krakowka, S., Blakeslee jr, J.R. (eds). *Comparative Pathobiology of Viral Diseases*, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, pp 137-164
- Krakovka, S., Cork, L.C., Winkelstein, J.A., Axthelm, M.K.** (1987). Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 17: 471-482
- Krakovka, S.** (1989). Canine distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *J Neuroimmunol* 21: 75-80
- Lampert, P.W.** (1978). Autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. A review. *Am J Pathol* 91: 176-208
- Lana, S.E., Ogilvie, G.K., Hansen, R.A., Powers, B.E., Dernell, W.S., Withrow, S.J.** (2000). Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. *Am J Vet Res* 61: 111-114

- Lassmann, H., Reindl, M., Rauschka, H., Berger, J., Aboul-Enein, F., Berger, T., Zurbriggen, A., Lutterotti, A., Bruck, W., Weber, J.R., Ullrich, R., Schmidbauer, M., Jellinger, K., Vandeveld, M.** (2003). A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 126: 1347-1357
- Ledeen, R.W., Chakraborty, G.** (1998). Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: review and hypothesis. *Neurochem Res* 23: 277-289
- Lee, M.A., Palace, J., Stabler, G., Ford, J., Gearing, A., Miller, K.** (1999). Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 122: 191-197
- Leontovich, A.A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagase, H., Sarras, M.P. Jr.** (2000). A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development* 127: 907-920
- Lepage, T., Gache, C.** (1990). Early expression of a collagenase-like hatching enzyme in the sea urchin embryo. *EMBO J* 9: 3003-3012
- Leppert, D., Ford, J., Stabler, G., Grygar, C., Lienert, C., Huber, S., Miller, K.M., Hauser, S.L., Kappos, L.** (1998). Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121: 2327-2334
- Lim, G.P., Russell, M.J., Cullen, M.J., Tokes, Z.A.** (1997). Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. *J Neurochem* 68: 1606-1611
- Lincoln, S.D., Gorham, J.R., Davis, W.C., Ott, R.L.** (1973). Studies of old dog encephalitis. II. Electron microscopic and immunohistologic findings. *Vet Pathol* 10: 124-129
- Lindberg, R.L., de Groot, C.J., Montagne, L., Freitag, P., van der Valk, P., Kappos, L., Leppert, D.** (2001). The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 124: 1743-1753
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S.** (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77: 638-643
- Liuzzi, G.M., Santacroce, M.P., Peumans, W.J., van Damme, E.J., Dubois, B., Opdenakker, G., Riccio, P.** (1999). Regulation of gelatinases in microglia and astrocyte cell cultures by plant lectins. *Glia* 27: 53-61

- Liuzzi, G.M., Mastroianni, C.M., Santacroce, M.P., Fanelli, M., D'Agostino, C., Vullo, V., Riccio, P.** (2000). Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases. *J Neurovirol* 6: 156-163
- Liuzzi, G.M., Trojano, M., Fanelli, M., Avolio, C., Fasano, A., Livrea, P., Riccio, P.** (2002). Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Mult Scler* 8: 222-228
- Lo, E.H., Wang, X., Cuzner, M.L.** (2002). Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 69: 1-9
- Lopez-Pena, M., Vazquez, S., Aleman, N., Lopez-Beceiro, A., Munoz, F., Pereira, J.L., Nieto, J.M.** (2001). Canine distemper in a Genet (*Gennetta gennetta*), associated with Endogenous Lipid Pneumonia. *J Comp Pathol* 124: 207-211
- Loukopoulos, P., Mungall, B.A., Straw, R.C., Thornton, J.R., Robinson, W.F.** (2003). Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol* 40: 382-394
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H.** (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707-717
- Lukes, A., Mun-Bryce, S., Lukes, M., Rosenberg, G.A.** (1999). Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 19: 267-284
- Mackenzie, J.S., Chua, K.B., Daniels, P.W., Eaton, B.T., Field, H.E., Hall, R.A., Halpin, K., Johansen, C.A., Kirkland, P.D., Lam, S.K., McMinn, P., Nisbet, D.J., Paru, R., Pyke, A.T., Ritchie, S.A., Siba, P., Smith D.W., van den Hurk, A.F., Wang, L.F., Williams, D.T.** (2001). Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerg Infect Dis* 7: 497-504
- Maeda, A., Sobel, R.A.** (1996). Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 300-309
- Maeda, H., Ozaki, K., Takagi, Y., Sawashima, K., Narama, I.** (1994). Distemper skin lesions in a dog. *Zentralbl Veterinarmed A* 41: 247-250
- Maidment, J.M., Moore, D., Murphy, G.P., Murphy, G., Clark, I.M.** (1999). Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J Biol Chem* 274: 34706-34710

- Markus, S., Failing, K., Baumgärtner, W.** (2002). Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *J Neuroimmunol* 125: 30-41
- Matsuura, E., Umehara, F., Hashiguchi, T., Fujimoto, N., Okada, Y., Osame, M.** (2000). Marked increase of matrix metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis. *J Neurol Sci* 173: 45-52
- Mayo, M.A.** (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147/8: 1655-1656
- McCawley, L.J., Matrisian, L.M.** (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540
- McCullough, B., Krakowka, S., Koestner, A.** (1974). Experimental canine distemper virus-induced demyelination. *Lab Invest* 31: 216-222
- Mee, A.P., Dixon, J.A., Hoyland, J.A., Davies, M., Selby, P.L., Mawer, E.B.** (1998). Detection of canine distemper virus in 100% of Paget's disease samples by in situ-reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Bone* 23: 171-175
- Meertens, N., Stoffel, M.H., Cherpillod, P., Wittek, R., Vandeveld, M., Zurbriggen, A.** (2003). Mechanism of reduction of virus release and cell-cell fusion in persistent canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol* 106: 303-310
- Miao, Q., Baumgärtner, W., Failing, K., Alldinger, S.** (2003). Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol* 106: 486-494
- Montgomery, D.L.** (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 31: 145-167
- Moritz, A., Frisk, A.L., Baumgärtner, W.** (1998). Beurteilung diagnostischer Möglichkeiten bei der Staupevirusinfektion des Hundes. *Kleintierpraxis* 43: 153-172
- Moro, L., de Sousa Martins, A., de Moraes Alves, C., de Araujo Santos, F.G., dos Santos Nunes, J.E., Carneiro, R.A., Carvalho, R., Vasconcelos, A.C.** (2003a). Apoptosis in canine distemper. *Arch Virol* 148: 153-164
- Moro, L., Martins, A.S., Alves, C.M., Santos, F.G., Del Puerto, H.L., Vasconcelos, A.C.** (2003b). Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 221-225
- Mos, L., Ross, P.S., McIntosh, D., Raverty, S.** (2003). Canine distemper virus in river otters in British Columbia as an emergent risk for coastal pinnipeds. *Vet Rec* 152: 237-239

- Müller, C.F., Fatzer, R.S., Beck, K., Vandavelde, M., Zurbriggen, A.** (1995). Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathol* 89: 438-445
- Mun-Bryce, S., Rosenberg, G.A.** (1998a). Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274(5Pt2): R1203-1211
- Mun-Bryce, S., Rosenberg, G.A.** (1998b). Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1163-1172
- Murphy, G., Willenbrock, F., Ward, R.V., Cockett, M.I., Eaton, D., Docherty, A.J.** (1992). The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biochem J* 283: 637-641
- Murray, K., Selleck, P., Hooper, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H., Hiley, L., Selvey, L., Rodwell, B.** (1995). A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 286: 94-97
- Mutinelli, F., Vandavelde, M., Griot, C., Richard, A.** (1989). Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol* 77: 333-335
- Nagase, H., Barrett, A.J., Woessner, J.F. Jr.** (1992). Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1:421-424
- Nagase, H.** (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-160
- Nagase, H., Woessner, J.F. Jr.** (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494
- Nagata, T., Ochikubo, F., Yoshikawa Y., Yamanouchi, K.** (1990). Encephalitis induced by a canine distemper virus in squirrel monkeys. *J Med Primatol* 19: 137-49
- Nakagawa, T., Kubota, T., Kabuto, M., Sato, K., Kawano, H., Hayakawa, T., Okada, Y.** (1994). Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg* 81: 69-77
- Naot, D., Sionov, R.V., Ish-Shalom, D.** (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71: 241-319
- Nessler, A., Baumgärtner, W., Gaedke, K., Zurbriggen, A.** (1997). Abundant expressing of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body polioencephalitis of canine distemper. *J Comp Pathol* 116: 291-301

- Nessler, A., Baumgärtner, W., Zurbriggen, A., Örvell, C.** (1999). Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body encephalitis. *Vet Microbiol* 69: 23-28
- Noble, P.W., Lake, F.R., Henson, P.M., Riches, D.W.** (1993). Hyaluronate activation of CD 44 induces insulin-growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest* 91: 2368-2377
- Nordal, R.A., Nagy, A., Pintilie, M., Wong, C.S.** (2004). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 target genes in central nervous system radiation injury: a role for vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 10: 3342-3353
- Noon, T.H., Heffelfinger, J.R., Olding, R.J., Wesche, S.L., Reggiardo, C.** (2003). Serological survey for antibodies to canine distemper virus in collared peccary (*Tayassu tajacu*) populations in Arizona. *J Wildl Dis* 39:221-223
- Örvell, C.** (1980). Structural polypeptides of canine distemper virus. *Arch Virol* 66: 193-206
- Özenci, V., Rinaldi, L., Teleshova, N., Matusевич, D., Kivisakk, P., Kouwenhoven, M., Link, H.** (1999). Metalloproteinases and their inhibitors in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 12: 297-303
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C., Noda, M.** (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107: 789-800
- Ono, N., Tatsuo, H., Tanaka, K., Minagawa, H., Yanagi, Y.** (2001). V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol* 75: 1594-1600
- Ooi, C.G., Walsh, C.A., Gallagher, J.A., Fraser, W.D.** (2000). Absence of measles virus and canine distemper virus transcripts in long-term bone marrow cultures from patients with Paget's disease of bone. *Bone* 27: 417-421
- Opdenakker, G., Van Damme, J.** (1994). Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol Today* 15: 103-107
- Pagenstecher, A., Stalder, A.K., Kincaid, C.L., Shapiro, S.D., Campbell, I.L.** (1998). Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* 152: 729-741

- Pearce-Kelling, S., Mitchell, W.J., Summers, B.A., Appel, M.J.G.** (1990). Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: relationship to in vivo persistence and disease. *Microb Pathog* 8: 71-82
- Pearce-Kelling, S., Mitchell, W.J., Summers, B.A., Appel, M.J.G.** (1991). Virulent and attenuated canine distemper virus infects multiple dog brain cell types in vitro. *Glia* 4: 408-416
- Philbey, A.W., Kirkland, P.D., Ross, A.D., Davies, R.J., Gleeson, A.B., Love, R.J., Daniels, P.W., Gould, A.R., Hyatt, A.D.** (1998). An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats. *Emerg Infect Dis* 4: 269-271
- Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A.** (2003). CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 33-45
- Pringle, C.R.** (2000). Family Paramyxoviridae. In: "Virus Taxonomy" Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Edited by van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. 1<sup>st</sup> edition. Academic Press, San Diego
- Proost, P., van Damme, J., Opdenakker, G.** (1993). Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 1175-1181
- Pufe, T., Lemke, A., Kurz, B., Petersen, W., Tillmann, B., Grodzinsky, A.J., Mentlein, R.** (2004). Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am J Pathol* 164: 185-192
- Rabanal, R.M., Ferrer, L., Else, R.W.** (1995). Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 47: 13-23
- Raine, C.S.** (1976). On the development of the CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 30: 13-28
- Rathke-Hartlieb, S., Budde, P., Ewert, S., Schlomann, U., Staeger, M.S., Jockusch, H., Bartsch, J.W., Frey, J.** (2000). Elevated expression of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) in reactive astrocytes following neurodegeneration in mouse central nervous system. *FEBS Lett* 481: 227-234
- Raw, M.E., Pearson, G.R., Brown, P.J., Baumgärtner, W.** (1992). Canine distemper infection associated with acute nervous signs in dogs. *Vet Rec* 130: 291-293
- Rawlings, N.D., O'Brien, E.A., Barrett, A.J.** (2002). MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res* 30: 343-346 und <http://merops.sanger.ac.uk>

- Ries, C., Petrides, P.E.**(1995). Cytokine regulation of matrix metalloproteinases activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 345-355
- Rima, B.K., Duffy, N., Mitchell, W.J., Summers, B.A., Appel, M.J.G.** (1991). Correlation between humoral immune response and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Arch Virol* 121: 1-8
- Rodriguez, M., Oleszak, E., Leibowitz, J.** (1987). Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol*: 7: 325-365
- Rodriguez, M., Pavelko, K.D., Njenga, M.K., Logan, W.C., Wettstein, P.J.** (1996). The balance between persistent virus infection and immune cells determines demyelination. *J Immunol* 157: 5699-5709
- Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S.J., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G.L.M., Mgasa, M.N., Machange, G.A., Summers, B., Appel, M.J.** (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379: 441-445
- Rohowsky-Kochan, C., Dowling, P.C., Cook, S.D.** (1995). Canine distemper specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* 45: 1554-1560
- Romanic, A.M., Madri, J.A.** (1994). Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol* 4: 145-156
- Romeis, B.** (1989). *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg Verlag, München
- Rosenberg, G.A.** (2002a). Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist* 8: 586-595
- Rosenberg, G.A.** (2002b). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39: 279-291
- Schmid, E., Zurbriggen, A., Gassen, U., Rima, B., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies J.** (2000). Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J Virol* 74: 7554-7561
- Schobesberger, M., Zurbriggen, A., Summerfield, A., Vandeveld, M., Griot, C.** (1999). Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis ? *Acta Neuropathol* 97: 279-287
- Schobesberger, M., Zurbriggen, A., Doherr, M.G., Weissenbock, H., Vandeveld, M., Lassmann, H., Griot, C.** (2002). Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathol* 103: 11-9
- Sekine-Aizawa, Y., Hama, E., Watanabe, K., Tsubuki, S., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Arai, H., Aizawa, H., Iwata, N., Saido, T.C.** (2001). Matrix metalloproteinase (MMP)

- system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J Neurosci* 13: 935-948
- Sharief, M.K., Thompson, E.J.** (1992). In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 38: 27-33
- Sharp, F.R., Bernaudin, M.** (2004). HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 5: 437-448
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845
- Sidorenko, S.P., Clark, E.A.** (2003) The dual-function CD 150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol* 4: 19-24
- Somerville, R.P., Oblander, S.A., Apte, S.S.** (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 4: 216
- Sottrup-Jensen, L., Birkedal-Hansen, H.** (1989). Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 264: 393-401
- Spiegel, S., Foster, D., Kolesnick, R.** (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* 8: 159-167
- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H., van Wart, H.E.** (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci* 87: 364-368
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell S.** (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 161: 1961-1971
- Stamenkovic, I.** (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200: 448-464
- Sternlicht, M.D., Werb, Z.** (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516
- Stohlman, S.A., Hinton, D.R.** (2001). Viral induced demyelination. *Brain Pathol* 11: 92-106
- Strazielle, N., Khuth, S.T., Murat, A., Chalon, A., Giraudon, P., Belin, M.F., Ghersi-Egea, J.F.** (2003). Pro-inflammatory cytokines modulate matrix metalloproteinase secretion and organic anion transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1254-1264

- Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I.** (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-5338
- Summers, B.A., Greisen, H.A., Appel, M.J.G.** (1979). Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 46: 1-10
- Summers, B.A., Greisen, H.A., Appel, M.J.G.** (1984). Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. *J Comp Pathol* 94: 65-75
- Summers, B.A., Appel, M.J.G.** (1985). Syncytia formation: an aid in the diagnosis of canine distemper encephalomyelitis. *J Comp Pathol* 95: 425-435
- Summers, B.A., Appel, M.J.G.** (1987). Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. *J Neurocytol* 16: 871-881
- Summers, B., Appel, M.J.G.** (1994). Aspects of canine distemper virus and measles encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 525-534
- Szklarczyk, A., Lapinska, J., Rylski, M., McKay, R.D., Kaczmarek, L.** (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodelling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22: 920-930
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., Yanagi, Y.** (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893-897
- Tatsuo, H., Ono, N., Yanagi, Y.** (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75: 5842-5850
- Tatsuo, H., Yanagi, Y.** (2002). The Morbillivirus receptor SLAM (CD 150). *Microbiol Immunol* 46: 135-142
- Tipold, A., Moore, P., Zurbriggen, A., Burgener, I., Barben, G., Vandeveld, M.** (1999). Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol* 97: 45-56
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Johnson, J.M., Mathisen, P.M., Weinstock-Guttman, B., Kinkel, R.P.** (1998). The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 164: 93-100
- Vallee, B.L., Auld, D.S.** (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29: 5647-5659
- van de Bildt, M.W.G., Kuiken, T., Visee, A.M., Lema, S., Fitzjohn, T.R., Osterhaus, A.D.M.E.** (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerg Infect Dis* 8: 211-213

- van Moll, P., Alldinger, S., Baumgärtner, W., Adami, M.** (1995). Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Vet Microbiol* 44: 193-199
- van Regenmortel, M.H., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L.** (2000). "Virus Taxonomy" Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1<sup>st</sup> edition. Academic Press, San Diego
- van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H.** (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci* 87: 5578-5582
- Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Howard, L.M., Eagar, T.N., Bluestone, J.A., Miller, S.D.** (1998). The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev* 164: 63-72
- Vandevelde, M., Kristensen, B., Braund, K.G., Greene, C.E., Swango, L.J., Hoerlein, B.F.** (1980). Chronic canine distemper virus encephalitis in mature dogs. *Vet Pathol* 17: 17-28.
- Vandevelde, M., Fankhauser, R., Kristensen, F., Kristensen, B.** (1981). Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta Neuropathol* 54: 31-41
- Vandevelde, M., Higgins, R.J., Kristensen, B., Kristensen, F., Steck, A.J., Kihm, U.** (1982a). Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathological, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol* 56: 285-293
- Vandevelde, M., Kristensen, F., Kristensen, B., Steck, A.J., Kihm, U.** (1982b). Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol* 56: 1-8
- Vandevelde, M., Bichsel, P., Cerruti-Sola, S., Steck, A., Kristensen, F., Higgins, R.J.** (1983). Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. A sequential immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* 59: 269-276
- Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Higgins, R.J., Palmer, D.** (1985a). Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol* 67: 211-218
- Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Dumas, M., Palmer, D.** (1985b). Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. *J Neurol Sci* 69: 133-137
- Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Steck, A., Bichsel, P.** (1986). Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis. *J Neuroimmunol* 11: 41-51

- Vecil, G.G., Larsen, P.H., Corley, S.M., Herx, L.M., Besson, A., Goodyer, C.G., Yong, V.W.** (2000). Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 61: 212-224
- Visse, R., Nagase, H.** (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839
- von Gertten, C., Holmin, S., Mathiesen, T., Nordqvist, A.C.** (2003). Increase in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation. *J Neurosci Res* 73: 803-810
- Vu, T.H., Werb, Z.** (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14: 2123-2133
- Wang, Z., Juttermann, R., Soloway, P.D.** (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 275: 26411-26415
- Waubant, E., Goodkin, D.E., Gee, L., Bacchetti, P., Sloan, R., Stewart, T., Andersson, P.B., Stabler, G., Miller, K.** (1999). Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 53: 1397-1401
- Waubant, E., Gee, L., Miller, K., Stabler, G., Goodkin, D.** (2001). IFN-beta1a may increase serum levels of TIMP-1 in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 21: 181-185
- Wisniewski, H., Raine, C.S., Kay, W.J.** (1972). Observations on viral demyelinating encephalomyelitis. Canine distemper. *Lab Invest* 26: 589-599
- Wisniewski, H.M., Bloom, B.R.** (1975). Primary demyelination as a nonspecific consequence of a cell-mediated immune reaction. *J Exp Med* 141: 346-359
- Woessner, J.F. Jr.** (1998). The matrix metalloproteinase family. In: W.C. Parks and R.P. Mecham (eds). *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press, San Diego, pp 1-14.
- Woessner, J.F. Jr., Nagase, H.** (2000). *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Peter Sheterline (ed.). Oxford University Press, Oxford
- Woessner, J.F. Jr.** (2002). MMPs and TIMPs – an historical perspective. *Mol Biotechnol* 22: 33-49
- Wünschmann, A., Alldinger, S., Kremmer, E., Baumgärtner, W.** (1999). Identification of CD4+ and CD8+ cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Vet Immunol Immunopathol* 67: 101-116

- Wünschmann, A., Kremmer, E., Baumgärtner, W.** (2000). Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 73: 83-98
- Yamada, T., Miyazaki, K., Koshikawa, N., Takahashi, M., Akatsu, H., Yamamoto, T.** (1995a). Selective localization of gelatinase A, an enzyme degrading beta-amyloid protein, in white matter microglia and in Schwann cells. *Acta Neuropathol* 89: 199-203
- Yamada, T., Yoshiyama, Y, Sato, H., Seiki, M., Shinagawa, A., Takahashi, M.** (1995b). White matter microglia produce membrane-type matrix metalloprotease, an activator of gelatinase A, in human brain tissues. *Acta Neuropathol* 90: 421-424
- Yong, V.W., Krekoski, C.A., Forsyth, P.A., Bell, R., Edwards, D.R.** (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 21: 75-80
- Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P., Edwards, D.R.** (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2: 502-511
- Yoshikawa, Y., Ochikubo, F., Matsubara, Y., Tsuruoka, H., Ishii, M., Shirota, K., Nomura, Y., Sugiyama, M., Yamanouchi, K.** (1989). Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Microbiol* 20: 193-205
- Yob, J.M., Field, H., Rashdi, A.M., Morrissy, C., van der Heide, B., Rota, P., bin Adzhar, A., White, J., Daniels, P., Jamaluddin, A., Ksiazek T.** (2001). Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 7: 439-441
- Yu, Q., Stamenkovic, I.** (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13: 35-48
- Zurbriggen, A., Vandeveld, M.** (1983). Canine distemper virus-induced glial cell changes in vitro. *Acta Neuropathol* 62: 51-58
- Zurbriggen, A., Vandeveld, M., Dumas, M.** (1986). Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro. *Lab Invest* 54: 424-431
- Zurbriggen, A., Vandeveld, M., Dumas, M., Griot, C., Bollo, E.** (1987a). Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro. *Acta Neuropathol* 74: 366-373
- Zurbriggen, A., Vandeveld, M., Bollo, E.** (1987b). Demyelinating, non-demyelinating and attenuated canine distemper virus strains induce oligodendroglial cytolysis in vitro. *J Neurol Sci* 79: 33-41
- Zurbriggen, A., Müller, C., Vandeveld, M.** (1993a). In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue, using digoxigenin-labeled probes. *Am J Vet Res* 54: 1457-1461

- 
- Zurbriggen, A, Yamawaki, M., Vandeveld, M.** (1993b). Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. *Lab Invest* 68: 277-284
- Zurbriggen; A., Graber, H.U., Wagner, A., Vandeveld, M.** (1995a). Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J Virol* 69: 1678-1686
- Zurbriggen, A., Schmid, I., Graber, H.U., Vandeveld, M.** (1998). Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathol* 95: 71-77

## 9 Anhang

### 9.1 Bezugsquellen für Reagenzien, Chemikalien und Antikörper

#### **ABgene<sup>®</sup> Advanced Biotechnologies, Hamburg**

“Superladder-Low“ (100bp ladder), SLL-100

“6x gel loading buffer“, AB-0594

#### **Camon Labor-Service GmbH, Wiesbaden**

Aszitesflüssigkeit von nicht-immunisierten Balb/cJ Mäusen, CL8100

biotinierter Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Vector Laboratories), BA 4000

biotinierter Pferd-anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratories), BA 2000

biotinierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Vector Laboratories), BA 1000

Vectastain ABC Kit Standard (Vector Laboratories), PK 4000

#### **Chroma GmbH + Co. KG, Münster**

Kresylechtviolett, 1A 396

Luxolechtblau MBS, 1B 389

#### **DakoCytomation GmbH (ehemals DAKO<sup>®</sup> Diagnostika GmbH), Hamburg**

AEC Plus-Substratlösung, K 3469

DakoCytomation Pen, S 2002

CD3-Antikörper, polyklonal Kaninchen Anti-Human, A0452

CD79 $\alpha$ -Antikörper, monoklonal Maus Anti-Human, M7051

Gliafaserprotein (GFAP)-Antikörper, polyklonal Kaninchen Anti-Rind, Z0334

Glycergel<sup>™</sup>, Eindeckmedium C 0563

#### **Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (vormals MBI Fermentas)**

Ribonuklease-Inhibitor, EO 0312

#### **Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen**

Liquemin<sup>®</sup>N 25.000, Heparin-Natrium

#### **I. Hecht, Kiel-Hassee**

Eukitt<sup>®</sup> (Corbit-Balsam)

#### **Invitrogen<sup>™</sup> GmbH, Karlsruhe**

“Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> Competent Cells“, 18263-012

“TOPO TA Cloning Kit<sup>®</sup> for Sequencing, with *One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent E.coli*”, K4575-01

TRIzol<sup>®</sup> Reagent, 15596-026

**Kremmer E., GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München**

CD44-Antikörper, monoklonal Ratte Anti-Hund

**Kreatech Biotechnology, Amsterdam, Niederlande**

TUF (“target unmasking fluid“), SP-0025

**Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren**

“NucleoBond<sup>®</sup> Kit PC 20“, 740571.100

“NucleoSpin<sup>®</sup> Extract“, 740590.50

**MWG Biotech AG, Ebersberg**

Auftragssynthese der spezifischen “sense“- bzw. “antisense“-Primer

**Örvell, C., Huddinge University Hospital, Department of Clinical Virology, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden**

Staupevirus-N-Protein-Antikörper, monoklonal Maus Anti-Staupevirus-Nukleoprotein, Klon 3.991

**Qbiogene GmbH, Heidelberg**

Formamid, deionisiert 1l, FORMD003

**PAA Laboratories GmbH, Cölbe**

Pferdeserum (unverdünnt), B15-023

Schweineserum (unverdünnt), B15-030

Eagle’s Minimal Essential Medium mit Earle’scher Salzlösung und Glutamin (MEME), E15-825

**Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt**

GeneAmp RNA PCR Core Kit, N8080143

**Roche Diagnostics GmbH, Mannheim**

Anti-Digoxigenin-AP, “Fab fragments“, vom Schaf, 1093274

DNase I, RNase-frei, 776785

DIG RNA Labeling Mix, 10 x konz., 1 277 073

Proteinase K 5ml, 1373196

Restriktion Endonuklease Eco RI, 1175084

RNase, DNase-frei, 1119915

RNase T1, 109207

T 3-RNA-Polymerase, 1 031 163

T 7-RNA-Polymerase, 881 767

**Roth C. GmbH & Co. KG, Karlsruhe**

Agar-Agar, für Bakteriologie, 2266

Agarose, Roti<sup>®</sup>garose, für Elektrophorese, 2267

Essigsäure, Rotipuran<sup>®</sup>, 3738

Ethanol, Rotipuran<sup>®</sup>, 9065

Formaldehyd 37%, 7398

Methanol, Rotipuran<sup>®</sup>, 99,9%, p.a., 4627

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat p.a. ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ )

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ ), Rotipuran<sup>®</sup>, 4984.1

2-Propanol, Rotipuran<sup>®</sup> (Isopropylalkohol), 6752

Roti<sup>®</sup>-Histol, 6640

Trichlormethan/Chloroform, Rotisolv<sup>®</sup>, 7331

**SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg**

Pepton aus Casein, tryptisch, 48600

“Yeast extract“ SERVABACTER<sup>®</sup>, 24540

Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)· Na<sub>2</sub>-Salz · 2 H<sub>2</sub>O p.a., 11280

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen** (vormals Sigma, Fluka, Riedel de Haën)

Albumine, “bovine Fractione V“ 10g, A2153

Ampicillin “Sodium Crystalline“ 5g, A9518

Azetanhydrid, 45830

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (X-Phosphat) 500mg, B6777

Concanavalin A (Con A), C5275

“Deoxyribonucleic acid type XIV from Herring testes“ (ssDNS) 250mg, D6898

Dextransulfat, Na-Salz aus Leuconostoc 10g, 31403

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)-Dihydrat purum p.a., 32750

Diethylpyrocarbonat (DEPC) 100ml, 32490

N,N-Dimethylformamid, D4551

Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml, 10 ml, E1510

Ficoll<sup>®</sup> 400 25g, F2637

Imidazol puriss. p.a., 56750

Isopentan (2-Methylbutan), 59075

Kanamycin “Acid Sulfate“ 1g, K1876

Lektin Bandeiraea simplicifolia BS-1 1 mg, L3759

Levamisol, L9756

Lithiumchlorid Lösung 8 M, 50ml, 62479

Natriumbikarbonat, 71628

“Nitro Blue Tetrazolium“ (NBT) 1g, N6639

Paraformaldehyd (PFA), 76240

Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfatsäure] di-Natrium Salz (PIPES) 25 g, P3768

Polyvinylpyrrolidone (PVP), P5288

“Ribonucleic acid type IV from calf liver“ 250 mg, R7250

Normales Schafserum, steril, S2263

SOC Medium, S1797

Trizma<sup>®</sup> Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), 93352

### **Sternberger Monoclonals Incorporated (SMI), Lutherville, Maryland, USA**

“Myelin Basic Protein“-Antikörper, monoklonal Maus Anti-Human, SMI 94

### **Vogel GmbH, Gießen**

Histo-Comp<sup>®</sup> 56°C, VO-5-1002

### **VOKO Bürozentrum, Gießen**

Fixogum<sup>®</sup>, “Rubber Cement“, Marabu

### **Voss, C., Kremmer E., GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München**

MHC II-Antikörper, monoklonal Ratte Anti-Hund, Dog 26

### **VWR<sup>TM</sup> International GmbH, Darmstadt (vormals Merck KGaA, Darmstadt)**

Borsäure krist. Reinst, 1.00160

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O), 1.02382.0500

Eosin (gelblich), 1.15935.0100

Ethanol (Alkohol), absolut p.a., 1.00983

Formamid p.a., 1.09684.2500

Glycin, p.a., 1.04201.1000

Hämatoxylin, krist., 1.15938.0100

Kaliumchlorid (KCl), p.a., 1.04936.0500

Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) p.a., 1.04873.0250

Lithiumcarbonat, p.a., 1.05680

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O), 1.05833.1000

Methanol, reinst, 1.06008

Natriumchlorid (NaCl), reinst, 1.06400.1000

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O), p.a., 1.06580.1000

Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH) p.a., 1.06498.1000  
Natriumhypochlorit-Lösung, 1.05614  
Natronlauge (NaOH) p.a., 1.09137  
Papanicolaous Lösung 1b, 1.09254  
Pronase E, 1.07433.  
2-Propanol (Isopropanol) reinst, 1.00995  
Salzsäure (HCl) 2 N, 1.09063.1000  
Salzsäure 25%, reinst, 1.00312.2500  
Titrisol<sup>®</sup> Salzsäure 1N, 1.09970  
Titrisol<sup>®</sup> Natronlauge 1N, 1.09956  
Triethanolamin (TEA), p.a., 1.08379.0250  
Triton<sup>®</sup> X-100, p.a., 1.08643  
Wasserstoffperoxid 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup>) p.a., 1.07210  
Zitronensäure-Monohydrat p.a., 1.00244  
Xylol, reinst, 1.08685

## 9.2 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Es sind nur die über eine Laborgrundausrüstung (insbesondere eines Histologielabors) hinausgehenden Geräte und Einmalartikel aufgeführt:

### **Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg** (vormals Pharmacia Biotech)

Spektralphotometer GeneQuant<sup>™</sup> II

### **Besier, Wiesbaden**

Polaroid Film Noir & Blanc A 667, Tageslichtfilm

### **Bibby Sterilin Ltd., Staffordshire, England**

“Stuart Shaker Incubator“ S 150

### **Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf**

Gelbond<sup>®</sup> Film, 863748

“Multicycler<sup>®</sup> PTC 200“

“Safeseal-Tips“ (gestopfte Pipettenspitzen), 1000 µl, 781002

“Safeseal-Tips“ (gestopfte Pipettenspitzen), 100 µl, 780102

“Safeseal-Tips“ (gestopfte Pipettenspitzen), 20 µl, 780027

“PCR-Tubes“ 0,5 ml, 710910

**Consort, Belgien**

Mikrocomputer "Elektrophoresis Power Supply", E 425

**Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde**

StarFrost<sup>®</sup> Objektträger

**Eppendorf AG, Hamburg**

Eppendorf Zentrifuge 5415 C

Eppendorf Zentrifuge 5417 R

"Safe-Lock" Reaktionsgefäße 1,5 ml, 0030.120.086

"Safe-Lock" Reaktionsgefäße 2,0 ml, 0030.120.094

**Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold (vormals Heraeus)**

Heraeus Wärmeschrank ST 6200

Heraeus Wärmeschrank B 6030

Heraeus Wärmeschrank UT 6

Heraeus Zentrifuge Biofuge 13

Heraeus LaminAir<sup>®</sup> HLB 2472 GS

**Keutz Laborgeräte, Reiskirchen**

Flachgel-Elektrophoresekammer "Midi", horizontal, 0030191-00

Gießvorrichtung, 0030191-03

**Kisker GbR, Steinfurt**

Pap-Pen<sup>®</sup>, MKP-1

**Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach**

Wasserbad WB 22

Wasserbad WB 45

**Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig**

SuperFrost<sup>®</sup>-Plus Objektträger, 041300

**Mettler-Toledo GmbH, Gießen**

Präzisionswaage LabStyle 204

**Olympus GmbH, Hamburg**

Netzmikrometerplatte U-OCMSQ 10/10, 034077

**Polaroid, Massachusetts, USA**

Kamera MP 4

**Renner GmbH, Dannstadt**

Zellkultur Schalen 100x20 mm, 93100

**Schleicher & Schuell, Dassel**

Papierfaltenfilter 110 mm Durchmesser, 311643

**Systec GmbH, Wettenberg**

Autoklav 3850 ELC

**Thermo Electron GmbH, Dreieich**

Shandon 24-3 (Varistain<sup>®</sup>) Färbeautomat

Shandon Coverplates<sup>™</sup>, 72110013

Shandon Sequenza<sup>®</sup>-Einsätze, 7331017

**Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich**

UV-Transilluminator 312 nm

**Vogel GmbH, Gießen**

Tissue-Tek<sup>®</sup> Eindeckautomat, Modell 4765

**Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen**

Eismaschine ZBE 70-35

## 9.3 Lösungen und Puffer

### 9.3.1 Histologie

**Luxol-Fast-Blue MBS/Kresylechtviolett-Färbung** (Markscheidenfärbung nach Klüver und Barrera; Romeis 1989):

- Luxol-Fast-Blue-Lösung (0,1%iges LFB in 95%igem Ethanol):  
0,1 g LFB/100ml abs. Ethanol und 0,5 ml 10%ige Essigsäure
- Kresylechtviolett-Kösung:  
0,1 g Kresylechtviolett/100 ml Aqua dest. (A. dest.)  
kurz vor Gebrauch: 5 Tropfen 10%ige Essigsäure auf 30 ml Farblösung
- 0,05% Lithiumcarbonatlösung  
Färbeanleitung:
  1. Entparaffinieren bis 2 x Isopropanol
  2. 16-24 h LFB-Lösung bei 57°C
  3. in 96%igem Alkohol waschen
  4. spülen in A. dest.
  5. einige Sekunden in 0,05%iger Lithiumcarbonatlösung differenzieren
  6. 20-30 sec in 70%igem Alkohol differenzieren
  7. Spülen in A. dest

8. 10-25 sec in 0,05%iger Lithiumcarbonatlösung
9. kurz 70%iger Alkohol
10. evtl. 8-9 wiederholen
11. A. dest
12. ca. 6 Minuten 0,1 %iges Kresylechtviolett bei 37°C (Lösung vorwärmen)
13. 2-3 x 96% Alkohol, absoluter Alkohol, eindecken mit Eukitt® (Corbit-Balsam)

### 9.3.2 Immunhistologie

#### 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloridlösung (DAB)

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), anschließend filtrieren und 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ig) zugeben.

#### 0,5%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol oder TBS (für Paraffinschnitte)

1,5 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

100 ml Methanol, reinst, oder 100ml 1 x TBS, pH 7,6

#### 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer, pH 7,1

6,81 g Imidazol mit 1000 ml A. dest. lösen und ca. 500 ml 0,1 M HCl zufügen, bis pH-Wert 7,1 eingestellt ist.

#### Papanicolaou-Lösung

Papanicolaou-Lösung und A. dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

#### Pronase E/Protease-Lösung

0,03 g Pronase E in 60 ml vorgewärmtes NaCl-PBS (37°C) geben

#### 10 x TBS ("Tris buffered saline") Puffer, pH 7,6 (Stammlösung)

60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14)

ad 610 ml A. dest., lösen

mit 1 N HCl ( ca. 390 ml) pH auf 7,6 einstellen

ad 1000 ml A. dest.

#### 1 x TBS, pH 7,6 (Gebrauchslösung)

100 ml 10 x TBS

ad 900 ml 0,8%iges NaCl in A. dest.

ggf. pH-Wert justieren

#### Zitratpuffer 10 mM

2,1 g Zitronensäure-Monohydrat

ad 1000 ml A. dest.

auf pH 6,0 einstellen

### 9.3.3 Klonierungsreaktion

#### Ampicillin-Lösung 75mg/ml (Stammlösung)

75 mg Ampicillin

1000 µl Aqua bidest. (A. bidest.)

#### Kanamycin-Lösung 50mg/ml (Stammlösung)

50 mg Kanamycin

1000 µl A. bidest.

#### LB (Luria-Bertani)-Medium, flüssig

10 g Trypton (Pepton)

5 g "Yeast Extract" (Hefe)

10 g NaCl

ad 1000 ml A. bidest. und pH auf 7,0 einstellen, autoklavieren

nach Abkühlen (ca. 60°C) 1µl Ampicillin-Stammlösung (75mg/ml)/ml LB-Medium zugeben (entsprechend 1 µg Ampicillin/ 1 ml LB-Medium)

#### LB-Medium, Agarplatten

wie oben, jedoch vor dem autoklavieren 15 g Agar/l LB-Medium zugeben

nach dem Abkühlen (ca. 60°C) entsprechende Menge Ampicillin (75µg/ml) bzw. Kanamycin (50µg/ml) zugeben

Platten gießen und erstarren lassen (1l ergeben ca. 25 Platten)

### 9.3.4 RNS-Isolierung, PCR und Sondensynthese

#### Aqua bidest. Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt

1 ml Diethylpyrokarbonat (DEPC) Reinsubstanz

1000 ml A. bidest.,

unter Abzug rühren (Magnetrührer) bis gelöst (über Nacht), danach autoklavieren

#### 2%iges Agarosegel (104,3 cm<sup>3</sup>)

1,82 g Agarose

91 ml 1 x TBE-Puffer

kurz aufkochen in der Mikrowelle bis gelöst und auf ca. 65°C erkalten lassen

Zugabe von 1,8 µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)

Blasenfrei ausgießen und erstarren lassen

**0,2 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0**

0,4 ml 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0

0,6 ml A. bidest-DEPC

**0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0**

18,6 g di-Natrium-EDTA-di-Hydrat (MW 372,31)

ad 60 ml A. bidest.-DEPC

mit 5 N NaOH auf pH 8,0 einstellen

auf 100 ml auffüllen, danach autoklavieren

**Formalin-PBS**

450 ml 1 x PBS, pH 7,4

50 ml Formaldehyd (37%ig)

**4 M Lithiumchloridlösung**

0,5 ml 8 M Lithiumchloridlösung

0,5 ml A. bidest-DEPC

**10 x TBE-Elektrophoresepuffer (Stammlösung)**

108,8 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

40,0 ml 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0

ad 1000 ml A. bidest., danach autoklavieren

**1 x TBE-Elektrophoresepuffer (Gebrauchslösung)**

100 ml 10 x TBE-Puffer

900 ml A. bidest

**9.3.5 *in situ*-Hybridisierung**

Alle Lösungen und Puffer werden, soweit nicht anders angegeben, **autoklaviert** (20 Minuten bei 121°C und 210 kPa). Prähybridisierungspuffer, Hybridisierungspuffer und deren einzelne Bestandteile werden nicht autoklaviert, sondern von vornherein RNase-frei hergestellt.

**Aqua bidest. Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt**

1 ml Diethylpyrokarbonat (DEPC) Reinsubstanz

1000 ml A. bidest.,

unter Abzug rühren (Magnetrührer) bis gelöst (über Nacht), danach autoklavieren

**Aqua bidest. steril**

A. bidest. in sterile Flaschen füllen

**5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (X-Phosphat, BCIP) 50 mg/ml (Stammlösung)**

500 mg X-Phosphat

10 ml 100%iges Dimethylformamid

entspricht Stammlösung mit 50mg/ml Endkonzentration

in Originalpackung ansetzen, aufbewahren bei -20°C

**0,1 M CaCl<sub>2</sub>**

1,47 g CaCl<sub>2</sub> (MW 147,02)

100 ml A. bidest.

**0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0**

18,6 g di-Natrium-EDTA-di-Hydrat (MW 372,31)

60 ml A. bidest.-DEPC

mit 5 N NaOH auf pH 8,0 einstellen, auf 100 ml auffüllen

**50 x Denhardts**

5 g Ficoll

5 g Polyvinylpyrolidone

5 g bovines Serumalbumin

500 ml A. bidest.-DEPC

in 50 ml Aliquots abfüllen und bei -20°C lagern

steril herstellen, nicht autoklavieren

**0,2 %iges Glycin in 1 x PBS**

1 g Glycin

500 ml 1 x PBS, pH 7,4

Lagerung bei 4°C

**0,2 N HCl**

50 ml 2 N HCl

450 ml A. bidest.

**Heringsperma-DNS (ssDNS)-Lösung, 10mg/ml**

in Originalpackung Lyophilisat mit Puffer 4, pH 8,0 lösen

bei 250 mg Lyophilisat hinzufügen von 25 ml Puffer 4 (Endkonzentration 10mg/ml)

Lagerung bei 4°C, nicht autoklavieren

**Hybridisierungs-Puffer (steril herstellen)**

16 ml 100%iges Formamid, *deionisiert*

8 ml 20 x Hybridisierungssalze

3,2 ml 50 x Denhardts

320 µl Heparin

320 µl 10%iges Triton X-100

aliquotieren in 40 Aliquots à 696 µl, Lagerung bei -20°C, nicht autoklavieren

*im Versuch je Aliquot hinzufügen:*

18 µl RNS-Lösung

20 µl ssDNS-Lösung

80 µl Dextransulfat

100 ng/ml RNS-Sonde

gesamten Ansatz inkl. Sonde für 5 Minuten kochen und danach in Eis-Ethanol-Bad

### **20 x Hybridisierungssalze**

10 ml 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0

10 ml 0,5 M PIPES, pH 7,0

30 ml 5 M NaCl

### **1 M MgCl<sub>2</sub>**

20,33 g MgCl<sub>2</sub> (Hexahydrat, MW 203,3)

100 ml A. bidest-DEPC

steril filtrieren, nicht autoklavieren (MgCl<sub>2</sub> fällt sonst aus !)

### **NaCl**

5 M: 29,22 g NaCl (MW 58,44)

100 ml A. bidest.

3 M: 87,66 g NaCl (MW 58,44)

500 ml A. bidest.

### **5 N NaOH**

20 g NaOH-Plätzchen (MW 40)

100 ml A. bidest.

### **Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) 75mg/ml (Stammlösung)**

1 g NBT

13,3 ml 70%iges Dimethylformamid (14 ml 100% igesDMF + 6 ml A. bidest.)

entspricht Stammlösung mit 75mg/ml Endkonzentration

in Originalpackung ansetzen, aufbewahren bei 4°C

### **4 %iges Paraformaldehyd (PFA), pH 7,35-7,4**

40 g Paraformaldehyd

1000 ml 1 x PBS, pH 7,4

CAVE, mit Atemmaske unter Abzug arbeiten, rührend auflösen bei ca. 60°C, pH auf 7,35-7,4 einstellen, nicht autoklavieren, kann bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden

**10 x PBS (“Phosphate buffered saline“)-Puffer (Stammlösung)**

80,0 g NaCl

2,0 g KCl

14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1000 ml A. bidest.

**1 x PBS, pH 7,4 (Gebrauchslösung)**

100 ml 10 x PBS

900 ml A. bidest, erst dann pH auf 7,4 einstellen

**1 x PBS + 5 mM MgCl<sub>2</sub>**

100 ml 10 x PBS

5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> (steril filtriert)

1000 ml Aqua bidest.-DEPC

steril filtriert

*oder im Versuch frisch angesetzt*

6 ml 10 x PBS

300 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> (steril filtriert)

60 ml A.bidest.-DEPC

**0,5 M Piperazin-N,N’bis[2-ethansulfatsäure] (PIPES), pH 7,0**

8,6575 g PIPES (MW 346,3)

50 ml A. bidest.-DEPC

steril herstellen, nicht autoklavieren

**Prähybridisierungs-Puffer (steril herstellen)**

450 ml 20 x SSC

675 ml 100%iges Formamid, *deionisiert*

150 ml 50 x Denhardts

210 ml A. bidest.-DEPC

entspricht insgesamt 30 Aliquots à 49,5 ml, Lagerung bei -20°C, nicht autoklavieren

*im Versuch je Aliquot hinzufügen:*

0,5 ml ssDNS-Lösung (zuvor 5 Minuten auf 95°C erhitzen und auf Eis abschrecken)

1,25 ml RNS-Lösung

**Puffer 1, pH 7,5**

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14)

8,77 g NaCl (MW 58,44)

1000 ml A. bidest.

pH-Einstellung mit konzentrierter HCl unter Abzug

**Puffer 3, pH 9,5 (Stammlösung)**

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

5,84 g NaCl

1000 ml A. bidest., auf pH von 9,5 einstellen, autoklavieren

*im Versuch frisch angesetzt:*

2,03 g  $\text{MgCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$

200 ml Stammlösung Puffer 3

**Puffer 4, pH 8,0**

1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

0,37 g EDTA- $\text{Na}_2$  (MW 372,3)

1000 ml A. bidest.

**Ribonukleinsäure (RNS)-Lösung, 10 mg/ml**

in Originalverpackung Lyophilisat mit A. bidest.-DEPC lösen

bei 250 mg Lyophilisat hinzufügen von 25 ml Aqua bidest.-DEPC (Endkonzentration 10 mg/ml)

Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$ , nicht autoklavieren

**20 x SSC ("standard saline citrat"), pH 7,0 (Stammlösung)**

175,3 g NaCl

88,2 g Na-Citrat (Tri-Natrium-Di-Hydrat)

ad 800 ml A. bidest.

mit 1 N HCl auf pH 7,0 einstellen, auf 1000 ml auffüllen

**2 x SSC + 5 mM EDTA- $\text{Na}_2$** 

50 ml 20 x SSC

5 ml 0,5 M EDTA- $\text{Na}_2$

500 ml A. bidest.-DEPC

**1 M Tris-HCl, pH 8,0**

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14)

100 ml A. bidest.

pH mit konzentrierter HCl einstellen

im Versuch werden folgende Lösungen stets frisch angesetzt (alle Angaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf das Volumen einer vollen Standküvette, 60 ml):

**Antikörper-Lösung** (3ml-Ansatz; 1:200)

3 ml Puffer 1 \*

31 µl normales steriles Schafserum \*

94 µl 10%iges Triton X-100 \*

\*zusammen vorinkubieren bei 37°C

*unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von:*

15 µl Anti-DIG-Antikörper, AP konjugiert

**0,25%iges Azetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin, pH 7,5**

894 mg Triethanolamin

60 ml A. bidest.-DEPC

pH auf 7,5 einstellen

150 µl Azetanhydrid unmittelbar vor Inkubation zugeben und 60 sec rühren

**Dextransulfat-Lösung**

250 mg Dextransulfat

400 µl A. bidest.-DEPC

in 1,5 ml Eppendorf-Hütchen geben und im ca. 70°C warmen Wasserbad lösen

**Färbelösung** (50ml)

225 µl NBT (Stammlösung)

175 µl X-Phosphat (Stammlösung)

12 mg Levamisol

50 ml Puffer 3, *bis zum unmittelbaren Gebrauch abdunkeln*

**Proteinase K-Lösung**

1 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0 \*

1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> \*

60 ml A. bidest.-DEPC \*

\*zusammen vorinkubieren bei 37°C

*unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von:*

4,3/3,9 µl bzw. 21,5/19,5 µl Proteinase K (14,0/15,6mg/ml) (Endkonzentration 1 bzw.

5 µg Prot. K/ml Verdaulösung)

**Puffer 2 (Blockierungsreagenz)**

1,2 ml normales steriles Schafserum

1,8 ml 10%iges Triton-X-100 (autoklaviert)

60 ml Puffer 1

**RNase-Lösung**

10 ml 3 M NaCl \*

600 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 \*

120 µl 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0 \*

49 ml A. bidest. (steril) \*

\*zusammen vorinkubieren bei 37°C

*unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von:*

15 µl RNase, DNase frei (RNase A)

10 µl RNase T1

**6 x SSC + 45% Formamid, 120 ml**

36 ml 20 x SSC

54 ml 100%iges Formamid, *nicht deionisiert*

30 ml A. bidest. (steril)

**9.4 Abkürzungen**

A	Adenin
A	akute Läsion
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AS	“antisense“
A. dest.	Aqua destillata
A. bidest.	Aqua bidestillata
AP	Alkalische Phosphatase
Abb.	Abbildung
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BS-1	Bandeiraea simplicifolia-1
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	canine
CD	cluster of differentiation
CD3ε	CD3ε-Antigen
CD4+	CD4-Antigen-positiv
CD8+	CD8-Antigen-positiv
CD21+	CD21-Antigen-positiv
CD44	CD44-Antigen
cDNS	komplementäre DNS
CDV	“canine distemper virus“
CDV-Ond	Onderstepoort-CDV-Stamm
CH	chronische Läsion
Con A	Concanavalin A

CR	Costa Rica
DAB	3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
dUTP	Desoxyuridintri-phosphat
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einschlußkörperchen
EZM	extrazelluläre Matrix
G	Guanin
g	Gramm
g	Gravitation
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	“glial fibrillary acidic protein“, saures Gliafaserprotein
GI	Gießen
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
hu	humane
IH	Immunhistologie
IL	Interleukin
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
K	Kontrolltiere
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LFB-KV	Luxol-Fast-Blue – Kresyl-Violett
LMNS	lichtmikroskopisch nicht sichtbare Läsion
LPS	Lipopolysaccharid
M/mM	Molarität (molar/millimolar)
mA	MilliAmpere
MBP	“myelin basic protein“, basisches Myelinprotein
MEME	Eagle's Minimal Essential Medium mit Earlescher Salzlösung
µg	Microgramm
MHC II	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
µl	microliter

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNS	“messenger“ RNS, Boten-Ribonukleinsäure
MS	multiple Sklerose
MT-MMP	“membrane-type“-MMP
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
N	Normalität (normal)
n.b.	nicht bekannt
NBT	Nitrobluetetrazolium
n.d.	nicht durchgeführt
NK	“natural killer cell“, natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NP	Nukleokapsid-Protein
Nr.	Nummer
p	Primer
p.a.	pro analysi (für analytische Zwecke)
PBS	“phosphat buffered saline“, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	“polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post infectionem
PIPES	Piperazin-N,N’bis[2-ethansulfatsäure]
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	“rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
S	“sense“
SAME	subakute Läsion mit Entzündung
SLAM	“signaling lymphocyte activation molecule“
SSC	“standard saline citrate“
ssDNS	“single strand“ DNS, Heringssperma-DNS
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	“tris buffered saline“, Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TIMP	“tissue inhibitor of metalloproteinase“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TUF	“target unmasking fluid“
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei zahlreichen Menschen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit erst ermöglichten.

Als erstes gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, Ph.D., für die Überlassung des Themas, seine ständige und unermüdliche Diskussionsbereitschaft und Ansprechbarkeit nicht nur zu Fragen dieser Arbeit, sondern auch zu allen anderen Fragen aus dem großen weiten Feld der Pathologie.

Frau Dr. Susanne Alldinger und Qin Miao danke ich für ihre Unterstützung in Teilen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Veterinär-Pathologie in Gießen.

Ihm sowie Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt und Herrn Prof. Dr. K. Frese danke ich für das geduldige und gewissenhafte Vermitteln nicht nur der Grundlagen der Pathologie, sondern auch um das Wissen, dass die Pathologie weit mehr ist als das Zerlegen von Tieren und auch nach Jahren spannend ist wie am ersten Tag.

Der "Außenstelle Hofmannstraße" allen voran Herrn Dr. Hecht danke ich für viele gute Tipps bezüglich meiner lieben kleinen E. colis.

Ute, Anne, Steff, Andreas und Anna-Lena brachten mir die Fallstricke molekularbiologischen Arbeitens näher und standen mir nicht nur einmal mit Rat und Tat zur Seite, wenn mal wieder gar nichts laufen wollte. Unser "A-Team" ist unvergessen und endlich auch der letzte Mohikaner am Ziel...

Annette, Danuta und Petra halfen mir ebenfalls immer überaus hilfsbereit, kompetent und umgehend bei unzähligen Fragen bezüglich technischer Fragen im Labor. Danke dafür.

Herrn Dr. K. Rohn vom Institut für Biometrie der TiHo gebührt mein besonderer Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Mit den Mitgliedern unserer ehemaligen Arbeitsgruppe in Gießen, allen voran Stephi, Ute und Andreas, habe ich nicht nur viele fröhliche Stunden im und um das Institut herum verbracht, sondern darüber hinaus zahlreiche Aktivitäten im erholsamen Freizeitstress.

Auch allen anderen Mit-DoktorandInnen und KollegInnen der Patho in Gießen sei für ihre vielfältige Hilfe und Unterstützung nicht nur bei der Anfertigung dieser Arbeit, im Labor und der Sektionshalle gedankt.

Die Hannoveraner KollegInnen im Institut für Pathologie der TiHo machten mir den Einstieg sehr einfach durch ihre liebe und nette Art, freundliche Aufnahme, ihre Geduld und nicht zuletzt aufmunternden Worte während der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit, auch wenn sich die sprachliche Verständigung ob des hessisch-bayrischen Kauderwelschs manchmal als schwierig gestaltete.

Allen alten und neuen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe in Hannover, vor allem meinen "Mitbewohnern", danke ich für die nette Stimmung und zahlreiche überaus amüsante Stunden im hohen Norden fernab der Heimat.

Den größten Dank jedoch schulde ich Mama, Papa, Jeannette und Rüdiger, sowie allen unseren 4-Beinern, die mich immer in allen privaten sowie beruflichen Lebenslagen begleiten und mir nicht nur durch ihre moralische und finanzielle Unterstützung überhaupt erst die Möglichkeit gaben, diesen Weg zu beschreiten und mir zu jeder Zeit das Gefühl geben, dass das, was ich mache, gut ist.

Gundi und Anne danke ich für die schönste Zeit meines Lebens und dafür, dass sie auch mit Spüllumpen-Geständnissen prima leben kann...

Ganz zum Schluss, in memoriam Tschülie, die mich vieles lehrte und mich stets begleitet...



ISBN 3-938026-18-9



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 0641/244 66 · Fax: 0641/25375  
e-mail: [Geschaeftsstelle @dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>