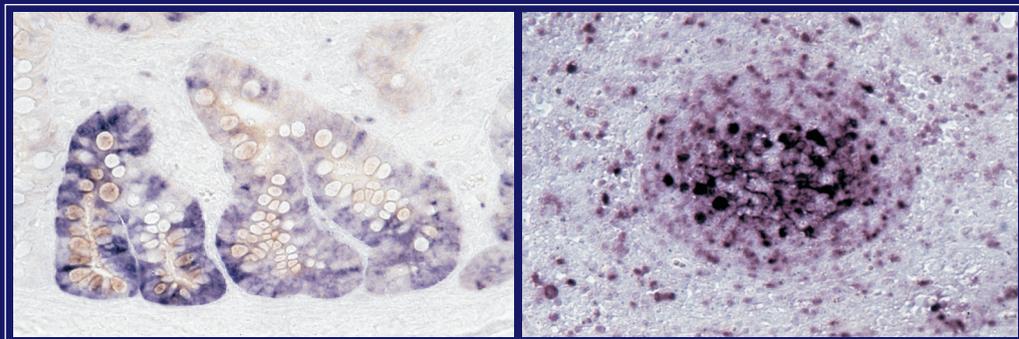


Vergleichende Untersuchungen über Translation und Transkription von Strukturproteinen des Felinen Leukämievirus nach experimenteller Infektion

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

ANSGAR BÜTTNER



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 3-89687-661-9

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wetttenberg
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE
www.vvb-ips.de

Aus dem Institut für Veterinärpathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

Vergleichende Untersuchungen
über Translation und Transkription
von Strukturproteinen des Felinen Leukämievirus
nach experimenteller Infektion

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

Eingereicht von
ANSGAR BÜTTNER
Tierarzt aus Köln (Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

2. Berichterstatter: PD Dr. N. Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 6.2.2004

Der Weg,
eigene Ziele zu erreichen
ist das Vertrauen von denen,
die dich lieben.

In Liebe und Dankbarkeit
Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Geschichte	2
2.2	Klassifizierung des FeLV	2
2.3	Virusstruktur	3
2.4	FeLV Untergruppen	4
2.5	Die Feline Acquired Immunodeficiency syndrom (FAIDS)- Variante	5
2.6	FeLV-Genom	6
2.7	Virusreplikation	8
2.8	Biologische Eigenschaften der FeLV-Proteine p27, gp70 und p15E	12
2.9	Vorkommen des FeLV in Organen und Geweben	14
2.9	Pathogenese der FeLV-Infektion	17
2.10	Infektionsformen	18
2.11	Immunreaktion und Immunsuppression nach FeLV-Infektion	19
2.12	Funktion dendritischer Zellen im lymphatischen Gewebe	21
2.13	Nachweis einer FeLV-Infektion	23
2.14	In situ-Hybridisierung	24
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
3.1	Material und Methoden	27
3.1.1	Zellkulturen	27
3.1.1.1	FeLV-infizierte Zellen	27
3.1.1.2	Kultivierung von FeLV infizierten FL74- und FE-Zellen	28
3.1.1.3	Herstellung von Zellpellets	29
3.1.1.4	Formalinfixierung und Einbettung	29
3.1.2	FeLV-infizierte Katzen, Organe und Gewebe	30
3.1.3	RNA-in situ-Hybridisierung	32
3.1.3.1	Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden	32
3.1.3.2	Durchführung der RNA-in situ-Hybridisierung (RNA-ISH)	44
3.1.4	Immunhistologie (IH)	49
3.1.5	Doppelmarkierung RNA-ISH/IH	51

3.1.6	Auswertung	51
3.1.6.1	Auswertung der in situ-Hybridisierung	52
3.1.6.2	Auswertung der Immunhistologie	52
3.1.6.3	Auswertung der Doppelmarkierung RNA-ISH/IH	52
3.2	Ergebnisse	53
3.2.1	ISH	53
3.2.1.1	Zellpellets	53
3.2.1.2	Mesenteriallymphknoten	54
3.2.1.3	Milz.....	57
3.2.1.4	Dünndarm	61
3.2.1.5	Thymus	65
3.2.1.6	Knochenmark.....	68
3.2.2	ISH/IH-Doppelmarkierung.....	72
3.2.2.1	Mesenteriallymphknoten	73
3.2.2.2	Milz.....	76
3.2.2.3	Dünndarm	79
3.2.2.4	Knochenmark.....	82
3.2.2.5	Thymus	84
4	DISKUSSION.....	87
4.1	Etablierung der Methode	87
4.2	Nachweis proviraler Transkripte	90
4.3	Virusreplikation, Antigen- und/oder RNA-Nachweis.....	91
4.4	Verteilung viraler RNA und viraler Proteine in den Organen	93
4.5	Reaktionsmuster der untersuchten Katzen	105
4.6	Mögliche Auswirkungen der Virusreplikation auf das Immunsystem	108
5	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	111
6	ABBILDUNGEN.....	115
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	142

8	ANHANG	165
8.1	Tabellen	165
8.2	Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte	196
8.3	Lösungen und Puffer	201
8.3.1	Zellkultur.....	201
8.3.2	Herstellung der Sonden	202
8.3.3	In situ-Hybridisierung	209
8.3.4	Immunhistologie.....	214
8.4	Sequenzierungsergebnisse	215
8.5	Abkürzungen	221

1 Einleitung

Das feline Leukämievirus (FeLV) ist mit zahlreichen unterschiedlichen Krankheitserscheinungen bei domestizierten Katzen assoziiert (Reinacher und Theilen, 1987; Wittmer, 1993). Persistent FeLV-infizierte Katzen können ein weites Spektrum nicht neoplastischer Krankheiten entwickeln (Hardy et al., 1969; Hoover et al., 1974; Essex et al., 1975b; Jarrett, 1984; Roiko und Olsen, 1984; Reinacher, 1987a, 1987b; Reinacher und Theilen, 1987; Kipar et al., 2000b). Weiterhin wird die Entstehung einiger Tumorentitäten, die überwiegend der Gruppe der malignen Lymphome und Fibrosarkome zuzuordnen sind, unter Anderem durch FeLV verursacht (Snyder, 1978; Theilen et al., 1987; Reinacher, 1987b). Aufgrund der Ähnlichkeiten zu der durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ausgelösten Schädigung des Immunsystems (Acquired Immunodeficiency Syndrom; AIDS) werden manche Formen der FeLV-Infektion der Katze auch als Versuchsmodell zum Verständnis der Krankheit beim Menschen verwendet (Mullins et al., 1986; Overbaugh et al., 1988a; Hoover et al., 1989).

Um die Pathogenitätsmechanismen bei der Entstehung der FeLV-assoziierten Immunsuppression besser verstehen zu können, wurden zahlreiche immunhistologische Untersuchungen durchgeführt, die sich mit dem Vorkommen verschiedener FeLV-Antigene und deren Verteilung in den Organen der infizierten Katzen beschäftigten (Rojko et al., 1979; Lutz et al., 1983; Kästner, 1992; Teebken-Schuler, 1993; Kovacevic et al., 1997; Kremendahl, 1998; Kipar et al., 2000a). Dabei wurden auch positive immunhistologische Signale bei dendritischen Zellen gefunden. Über den Nachweis von viralem Antigen kann hier allerdings nicht unterschieden werden, ob es sich um de novo synthetisiertes Antigen in Folge einer FeLV-Replikation oder lediglich um präsentiertes Antigen handelt.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit Paraffinschnitte von Geweben nach experimenteller FeLV-Infektion mittels in situ-Hybridisierungstechnik auf das Vorhandensein von FeLV-RNA untersucht. Insbesondere im lymphatischen System sollten dabei FeLV-vermehrende Zellen und deren Verteilung identifiziert werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschichte

Im Jahre 1964 wurden das feline Leukämievirus (FeLV) und seine tumorinduzierenden Eigenschaften erstmals beschrieben. Jarrett und Mitarbeitern (1964a) gelang es, bei vier Jungtieren eines Wurfes Lymphosarkome nachzuweisen, nachdem ihnen im Rahmen von Übertragungsversuchen zellfreies Material aus einer Thymusleukose einer anderen Katze inokuliert wurde. Im gleichen Jahr stellten Jarrett und Mitarbeiter (1964b) elektronenmikroskopisch Partikel in Lymphosarkomen dar, die Ähnlichkeiten mit denen des murinen Leukosevirus hatten. Drei Jahre später gelang es, typische Viruspartikel (Typ C) aus dem Blut von FeLV infizierten Katzen zu isolieren (Kawakami et al., 1967). Rickard und Mitarbeiter stellten 1969 fest, dass es bei Katzen, die in Gruppen gehalten werden, zur horizontalen Übertragung des FeLV kommen kann. Diese Erkenntnisse wurden durch das parallele Auftreten größerer Gruppen nicht verwandter FeLV-positiver Katzen in einzelnen Haushalten bestätigt (Hardy et al., 1969; Jarrett et al., 1971).

In weiteren Versuchen konnte die Übertragbarkeit von FeLV bestätigt werden (Hoover et al. 1972; Hardy et al., 1973a; Jarrett et al., 1973c).

Hardy und Mitarbeitern gelang im Jahre 1973 der Nachweis von FeLV-Antigen mittels Immunfluoreszenztechnik. 1979 wurden ausführliche Arbeiten über die Verteilung von Viruspartikeln und FeLV-Antigen in verschiedenen Organen experimentell infizierter Katzen veröffentlicht (Rojko et al., 1979).

2.2 Klassifizierung des FeLV

Das FeLV wird dem Genus Gammavirus (Mammalian Type C Retrovirus Group) der Familie Retroviridae zugeordnet (Pringle et al., 1999).

Retroviren unterscheiden sich von anderen Virusfamilien durch den Besitz einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase), die es ermöglicht, virale RNA in DNA umzuschreiben. Die neu entstandene Virus-DNA wird anschließend als Provirus in das Genom der neu infizierten Zelle integriert (Temin et al., 1971; Hardy et al., 1993).

Die Einteilung der Retroviren in die Subtypen A, B, C und D erfolgte ursprünglich an Hand der elektronenmikroskopisch sichtbaren Morphologie des viralen Innenkörpers (Core). Nach

Vorgaben des internationalen Komitees für die Taxonomie von Viren wird die Familie der Retroviren heute in Alpharetro-, Betaretro-, Gammaretro-, Deltaretro-, Epsilonretro-, Lenti- und Spumaviridae unterteilt. Die Gammaretroviren gehören zusammen mit den Alpha- und Beta-Retroviren zu den sogenannten „einfachen“ Retroviren, weil sie lediglich Sequenzen für das gag, pol und env Gen besitzen. „Komplexe“ Retroviren, denen die restlichen Subtypen zugeordnet werden, besitzen zusätzlich kodierende Sequenzen für kleine Regulationsproteine (Goff et al., 2001).

Tabelle 2.1: Gattungen der Retroviren (Übersicht bei Goff, 2001)

Neuer Name	Beispiele	Morphologie
Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV) Rous sarcoma virus (RSV)	C-type
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV) Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)	B-, D-type
Gammaretrovirus	Murine leukemia viruses (MuLV) Feline leukemia virus (FeLV) Feline sarcoma virus (FeSV) Gibbon ape leukemia virus (GaLV) Reticuloendotheliosis virus (RevT)	C-type
Deltaretrovirus	Human T-lymphotropic virus (HTLV)-1, -2 Bovine leukemia virus (BLV) Simian T-lymphotropic virus (STLV)-1, -2, -3	C-type
Epsilonretrovirus	Walley dermal sarcoma virus Walley epidermal hyperplasia virus 1	C-type
Lentivirus	Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) Simian immunodeficiency virus (SIV) Equine infectious anemia virus (EIAV) Feline immunodeficiency virus (FIV) Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) Visna/maedi virus	Rod/cone core
Spumavirus	Human foamy virus (HFV)	

2.3 Virusstruktur

Das FeLV ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Virus mit einem Durchmesser von 80-100 nm und einer Dichte von 1.15 g/cm^3 (Kawakami et al., 1967; Horzinek et al., 1985). Zentral in dem Virus gelegen befindet sich der Innenkörper (Core), der von der Virushülle durch die innere Mantelschicht begrenzt wird. Das Core des FeLV besteht aus spiralisierter viraler RNA, dicht umgeben von hexagonal angeordneten, nicht glykosylierten Innenkörperproteinen

mit einer Größe von 27000 (p27; Nukleoprotein), 15000 (p15C) und 10000 (p10) Dalton. Die Mantelschicht wird aus dem sauren Protein p12 (12000 Dalton) gebildet (Schäfer et al., 1977a; Bolognesi et al., 1978; Olsen et al., 1987; Rojko et al., 1988). Die für Retroviren charakteristische reverse Transkriptase, mit einem Molekulargewicht von 70000 Dalton, befindet sich im Core in enger Nachbarschaft zu dem Nukleoprotein (p27) (Scolnik et al., 1970).

Bei der Freisetzung des Virus aus der infizierten Zelle (budding) wird die Hülle des FeLV gebildet, die aus einer Lipiddoppelmembran zellulären Ursprungs besteht. Die viralen Proteine p15E (15000 Dalton) und gp70 (70000 Dalton) stellen die Hüllproteine des FeLV dar. Das nicht glykosylierte Protein p15E ist in die Lipiddoppelschicht eingelagert und dient dem glykosylierten Protein gp70 als Verankerung, indem sie untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind. gp70 ragt aus der Lipidschicht nach außen hervor und ist somit maßgeblich an der Ausbildung der Oberflächenstruktur des FeLV beteiligt (Bolognesi et al., 1978; Rojko et al. und Olsen et al., 1987; Neil und Onions, 1985; Varmus, 1988).

2.4 FeLV Untergruppen

Das FeLV lässt sich in drei Untergruppen einteilen, die als FeLV-A, -B und -C bezeichnet werden. Die Einteilung bezieht sich zum Einen auf unterschiedliche antigenetische Eigenschaften, zum Anderen auf unterschiedliche Wirtsspektren der einzelnen Untergruppen, die in vitro mit Interferenz- und Neutralisations-Tests darstellbar sind (Sarma und Log, 1971a; Jarrett et al., 1973a; Sarma und Log, 1973; Jarrett, 1980).

Rekombinationsversuche zeigten, dass die Wirtsspezifität der Untergruppen im „env“-Bereich des Genoms kodiert ist, und dass daraus eine unterschiedliche Antigenität des Hüllproteins gp70 resultiert (Riedel et al., 1988). Bei in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass FeLV-A nur in Katzenzelllinien kultivierbar ist (Jarrett et al., 1973a) und im Neutralisationstest keine Kreuzreaktionen mit anderen Subgruppen vorhanden sind (Russell und Jarrett, 1978b). FeLV-B und -C lassen sich auch in humanen und caninen Zellkulturen vermehren (Sarma und Log, 1973; Jarrett et al., 1978a).

Luciw und Mitarbeiter stellten 1986 durch Sequenzanalysen im FeLV-env Gen Homologien von ca. 80% zwischen den Subtypen FeLV-A und -B sowie zwischen -B und -C fest. Zwischen FeLV-A und -C lag die Homologie bei 97%.

Während FeLV-A bei natürlich infizierten Katzen stets nachweisbar ist, konnten die Subgruppen FeLV-B und -C bisher nur in Kombination mit FeLV-A aus Spontanfällen

isoliert werden (Sarma und Log, 1971a, 1973; Jarrett et al., 1978a). Es wird vermutet, dass FeLV-B und -C durch Interaktionen von endogenen FeLV-Sequenzen mit denen des FeLV-A in der infizierten Zelle entstehen (Hardy et al., 1976; Jarrett et al., 1978a, 1978b).

Die Subgruppenspezifität scheint eine bedeutende Rolle in der Auswirkung einer FeLV-Infektion zu spielen. In zahlreiche Arbeiten über experimentelle FeLV-Infektion konnte gezeigt werden, dass sich eine Korrelation zwischen den Untergruppen des FeLV und den induzierten Veränderungen feststellen lässt (Rojko und Hardy, 1994) (s. Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: FeLV-Untergruppen im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern

Subgruppe	Erkrankung	Autoren
FeLV-A	Virämie; minimale Pathogenität	Donahue et al., 1988
	vorwiegend Thymusleukosen	Rickard et al., 1969 Sarma und Lock, 1973 Hoover et al., 1976
FeLV-B	myelodysplastische Anämie	Riedel et al., 1986
FeLV-C	nicht regenerative Anämie; erythroische Aplasie	Mackey et al., 1975 Onions et al., 1982 Riedel et al., 1986
FeLV-A/-B	multizentrische Leukose; Lymphosarkome; Thymusatrophie; Immunsuppression; myeloische Leukose	Rickard et al., 1968 Toth et al., 1986 Hoover et al., 1987 Hoover et al., 1972 Hoover et al., 1973
FeLV-A/-B/-C	aplastische Anämie	Kawakami et al., 1967 Theilen et al., 1969 Hoover et al., 1976

2.5 Die Feline Acquired Immunodeficiency syndrom (FAIDS)- Variante

Im Jahre 1986 wurde von Mullins und Mitarbeitern aus dem Lymphosarkom einer Katze, die zusätzlich eine schwere Immundefizienz aufwies, eine bis dahin unbekannte Variante des FeLV isoliert. Mit dieser FeLV-Variante konnte nach einem Infektionsversuch an spezifisch pathogenfreien Katzen (SPF) bei 100% der Tiere eine Immundefizienz ausgelöst werden. Aufgrund der Ähnlichkeiten zu der durch das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ausgelösten Schädigung des Immunsystems (AIDS) wurde diese Variante als felines AIDS (FAIDS) bezeichnet (Mullins et al., 1986; Overbaugh et al., 1988a; Hoover et al., 1989).

Wie später durch molekularbiologische Analyse gezeigt werden konnte, handelte es sich bei den Virusisolaten um zwei Viruspopulationen der Subgruppe FeLV-A, die mit A61/E und A61/C bezeichnet wurden. A61/E ist replikationskompetent und besitzt eine geringe Pathogenität. Als verantwortlich für die auftretende Immundefizienz wurde das Virusisolat A61/C angesehen, das einen ausgeprägten zytopathischen Effekt besitzt. Mullins und Mitarbeiter zeigten 1986, dass zytopathogene Mechanismen des FeLV-FAIDS eng mit dem Auftreten unintegrierter viraler DNA in der infizierten Zelle korrelieren. A61/C ist aufgrund eines Replikationsdefektes für seine Vermehrung auf eine gleichzeitige Infektion mit einem replikationskompetenten FeLV angewiesen (Casey et al., 1981; Mullins et al., 1986, 1989, 1991).

Ursächlich konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Gendefekt des A61C um eine Mutation im Bereich des env-3' LTR handelt. Diese Mutation führt zu einer Strukturänderung des Hüllprotein gp70 in einem c-terminalen, 34 Aminosäuren umfassendem Segment, wodurch infizierte T-Zellen nur noch verzögert oder uneffektiv auf andersartige Superinfektionen reagieren können (Overbaught et al., 1988b; Poss et al., 1989; Quackenbush et al., 1990; Hardy et al., 1991). Der pathogene Effekt der FeLV-FAIDS-Variante auf T-Zellen konnte in Zellkulturen bestätigt werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es in Verbindung mit replikationsdefektem Virus zur Anhäufung von unintegrierter viraler DNA in infizierten Zellen und anschließend zum Zelltod kommt (Quackenbush et al., 1990; Donahue et al. 1991).

Neben anderen werden diese Mechanismen als Ursachen für die Immundefizienz in Verbindung mit der FeLV-FAIDS-Variante diskutiert. Die Immunsuppression hat zur Folge, dass infizierte Tiere, ähnlich wie beim humanen AIDS, letztlich meist an viralen oder bakteriellen Superinfektionen erkranken, die von dem geschädigten Immunsystem nicht mehr effektiv bekämpft werden können.

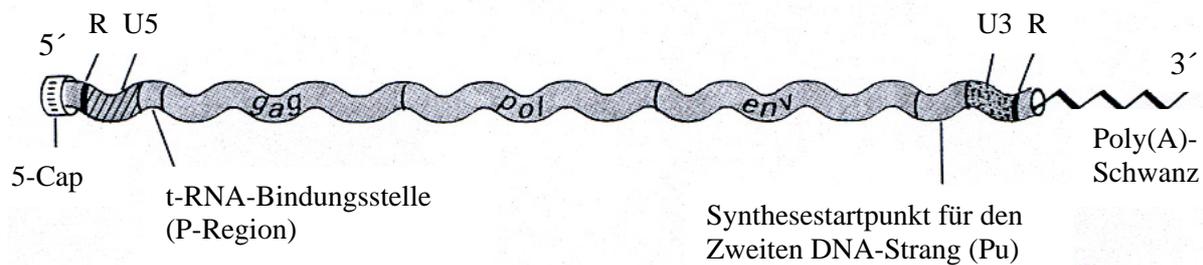
2.6 FeLV-Genom

Das FeLV-Genom besteht aus einem Dimer einer linearen, einzelsträngigen (ss) RNA. Die Polarität der Virus-RNA ist identisch mit der der zellulären mRNA (positive Polarität). Es ist allerdings nicht möglich, dass die virale RNA direkt als Vorlage zur Synthese von infektiösem Virus dient. Jede der zwei 35 S Untereinheiten besitzen an ihren 5'-Enden eine für eukariotische mRNA typische Nukleotidsequenz (Cap-Struktur), über die die RNA-

Stränge nichtkovalent miteinander verbunden sind. Die 3`-Enden der viralen RNA sind jeweils polyadenyliert (Poly-AMP-Sequenz) (Coffin, 1979; Horzinek, 1985).

Jeder der beiden RNA-Stränge des FeLV-Genoms hat eine Länge von 8840 Basen (FeLV-A; NCBI Acc. Nr.: M18247). Die Gene gag-pol-env (5'→3') werden an beiden Enden von den Sequenzen für U3 (3`-Ende) und U5 (5`-Ende) flankiert. Die Cap-Struktur bildet den Anfang einer kurzen Sequenz (R-Region), die sich am 3`-Ende wiederholt und am Anfang des Poly-A-Schwanzes lokalisiert ist. Die R-Regionen werden zusammen mit U3 und U5 nach der reversen Transkription zum long terminal repeat (LTR) der proviralen DNA (s. 2.7). Zwischen dem 3`-Ende des U5 und dem 5`-Ende des gag-Gens befindet sich die Bindungsstelle für eine zelluläre t-RNA (P-Region), die den Synthesestartpunkt der reversen Transkriptase bei der Bildung des ersten DNA-Stranges bildet (s.2.7). Direkt vor dem U3 befindet sich eine weitere für die Replikation des FeLV bedeutende Stelle, die als „Pu“ bezeichnet wird. Diese Sequenz stellt den Startpunkt für die Synthese des zweiten DNA-Stranges dar (s. 2.7) (Velicer et al., 1974; Fenner, 1976; Schäfer und Bolognesi, 1977b; Bolognesi et al., 1978; Teich, 1982; Neil und Onions, 1985).

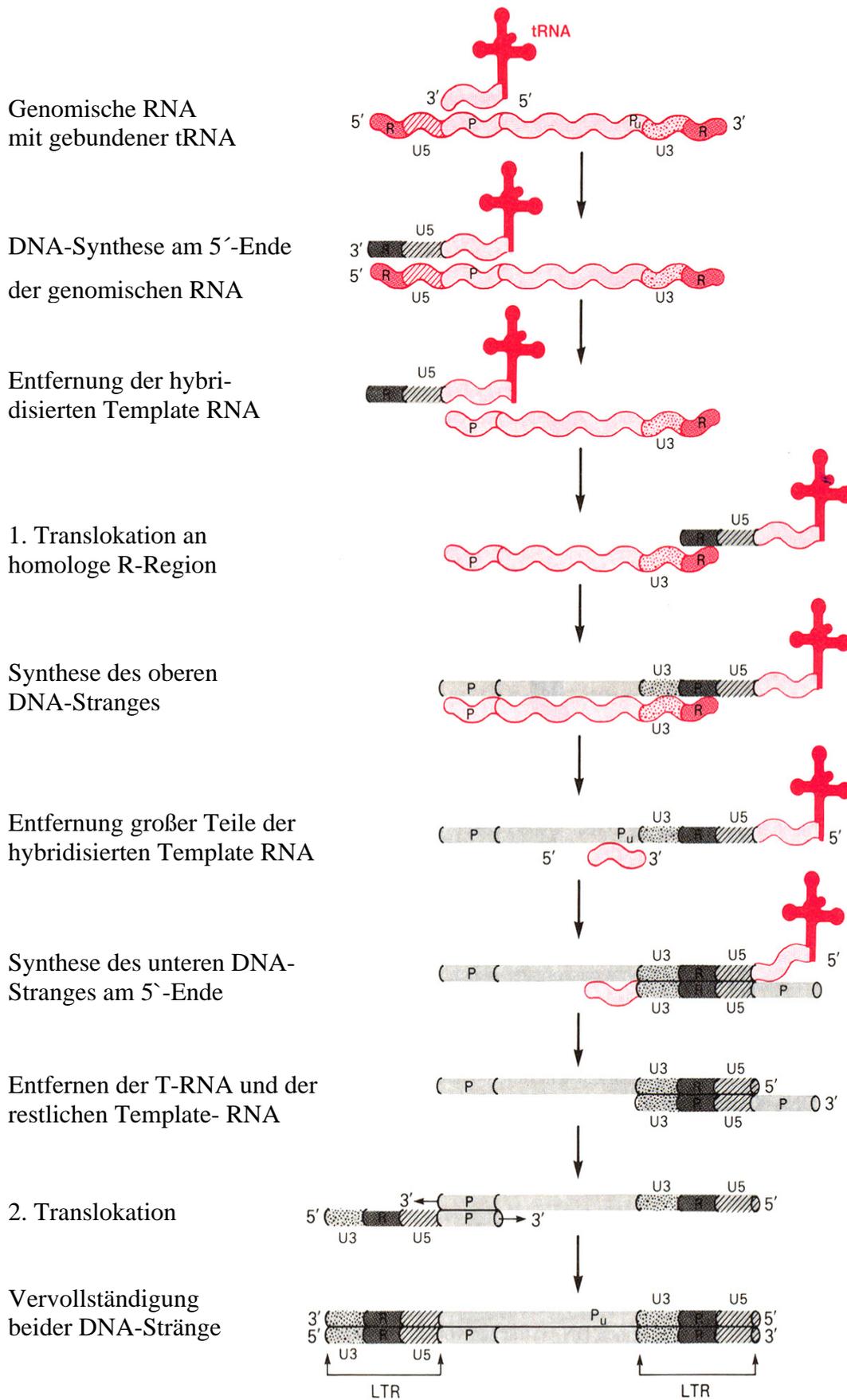
Im Bereich der gag (group-associated antigen)-Gene befinden sich die kodierenden Sequenzen für p15(C), p12, p27 und p10, die als nichtglykosylierte Proteine den Innenkörper des FeLV bilden (Khan und Stephenson, 1977; Laprevotte et al., 1984). Das Hauptprodukt des pol (polymerase)-Gens stellt die reverse Transkriptase dar (Neil und Onions, 1985). Bei dem murinen Leukosevirus (MuLV) konnten in diesem Genomabschnitt zusätzlich kodierende Sequenzen für Integrationsproteine und Proteasen identifiziert werden (Levin et al., 1984). Es wird vermutet, dass im pol-Bereich des FeLV funktionell gleichartige Enzyme kodiert sind (Neil und Onions, 1985). Im env (envelope)-Gen befinden sich die kodierenden Sequenzen für das Oberflächenprotein gp70 und das Transmembranprotein p15E (Neil et al., 1980).

Abbildung 2.1: RNA-Genom des FeLV (nach Singer und Berg, 1992)

2.7 Virusreplikation

Der Replikationszyklus des FeLV beginnt mit der Anheftung des viralen Hüllproteins gp70 an subgruppenspezifische Rezeptoren der Zelloberfläche. Anschließend fusioniert die Hülle des Virus mit der Zellmembran, wodurch das virale Core in das Zytoplasma der infizierten Zelle gelangt (Sarma et al., 1973; Rojko et al., 1988). Die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in eine doppelsträngige DNA ist charakteristisch für die Familie der Retroviren und stellt den nächsten Schritt der Virusreplikation dar. Normalerweise beginnt der Prozess der reversen Transkription unmittelbar nach dem Eindringen des Virus in die Zelle (Goff, 2001). Die Signale, die zur Transkription der viralen RNA führen, sind nicht vollständig geklärt. Möglicherweise stellt die relativ hohe lokale Konzentration der Nukleinsäuren im Zytoplasma nach der Infektion der Zelle ein auslösendes Signal für den Beginn der reversen Transkription dar (Goff, 2001). Die reverse Transkriptase (RT) ist in der Lage, DNA nach Vorlage von DNA oder RNA als Template zu synthetisieren. Außerdem baut die RT durch ihre Endonuklease-Aktivität (RNase H) doppelsträngige Nukleinsäure ab (Goff, 2001). Die reverse Transkription beginnt mit der Bindung einer viruseigenen tRNA an eine spezifische Bindungsstelle (P-Region; s. 2.6; und Abb. 2.2) der genomischen Virus-RNA. Die RT verlängert die tRNA gemäß der Vorlage des 5'-Endes der viralen RNA und entfernt gleichzeitig die hybridisierte Template-RNA (RNaseH). Anschließend kommt es zu einem „Sprung“ (Translokation) des neu synthetisierten DNA-Abschnitts an das homologe 3'-Ende (R-Region) der viralen Template-RNA. Der DNA-Strang wird verlängert und große Teile des tRNA-Stranges werden entfernt. Reste der tRNA dienen als Promoter zur Synthese des zweiten DNA-Stranges am 5'-Ende. Nach komplettem Entfernen der tRNA und verbleibender viraler RNA kommt es zur Translokation des zuletzt synthetisierten DNA-Stranges an das 3'-Ende der anfangs synthetisierten DNA. Anschließend werden beide DNA-Stränge vervollständigt (Baltimore, 1970; Temin, 1971; Stryer, 1991; Goff, 2001).

Abbildung 2.2: Reverse Transkription der viralen RNA; nach Darnell et al., 1986



Das Produkt der reversen Transkription ist eine doppelsträngige, linearisierte DNA-Kopie des viralen Genoms, das an beiden Enden von den Sequenzen des LTR (U3-R-U5) flankiert wird. Die virale DNA wird zum Zellkern der infizierten Zelle transportiert, wobei sich teilweise zirkuläre DNA-Moleküle formieren. Diese beinhalten eine oder zwei Kopien des LTR, können aber nicht in das zelluläre Genom integriert werden. Die Bedeutung und Funktion der zirkulären DNA ist unklar (Goff, 2001). Von besonderer Bedeutung für die fatalen Auswirkungen einer Retrovirusinfektion ist die sehr hohe Fehlerrate, die bei der reversen Transkription wiederholt zur Veränderung des viralen Genoms führt (Dougherty und Temin, 1988; Leider et al., 1988).

Der Transportmechanismus der viralen DNA zum Kern ist noch weitgehend unbekannt. Für die Integration der DNA ist es bei dem feline Retrovirus erforderlich, dass die infizierte Zelle zu diesem Zeitpunkt mitotisch aktiv ist (Termin, 1971 Miller et al., 1990; Roe et al. 1993). Eine Infektion von sich nicht teilenden Zellen führt zur Akkumulation von nicht integrierter viraler DNA im Zytoplasma ohne Anzeichen einer Infektion. Möglicherweise wird der Transportmechanismus der viralen DNA zum Zellkern durch die mitotische Aktivität der infizierten Zelle ermöglicht (Varmus et al., 1977; Miller et al., 1990; Roe et al., 1993; Lewis und Emermann, 1994). Die Integration der viralen DNA wird bei Retroviren durch ein virales Integrations-Protein (IN) ermöglicht, das für FeLV noch nicht klassifiziert ist. Der Ort der Integration in das zelluläre Genom scheint zufällig gewählt zu werden (Goff, 2001). An der Integrationsstelle kommt es während des Einbaus der viralen DNA zur Verdopplung weniger Basenpaare des zellulären Genoms. Als ersten Schritt der Integration erzeugt das IN-Protein jeweils überhängende 5'-Enden an beiden Seiten der viralen doppelsträngigen DNA, in dem jeweils zwei Basen an den 3'-Enden abgebaut werden (Fujiwara und Mizuuchi, 1988). Die beiden 3'-OH-Enden greifen die Phosphodiesterbindungen der zellulären DNA an und brechen diese auf. Die virale doppelsträngige DNA wird zwischen die überstehenden 5'-Bruchenden des zellulären Genoms integriert (Strangtransfer), wobei es zu einer halben Drehung der Helix kommt. Entstehende, genau definierte, Spalten in der DNA werden durch zelleigene Reparatursysteme aufgefüllt. Das integrierte virale Genom wird zusammen mit den flankierenden LTR-Sequenzen als Provirus bezeichnet. Es beinhaltet kodierende Sequenzen zur Transkription und Translation viraler Proteine und zur Synthese der viralen RNA. Der Vorgang der Reparatur benötigt die gleiche Zeit wie die initiale Integrationsreaktion (Roe et al, 1997).

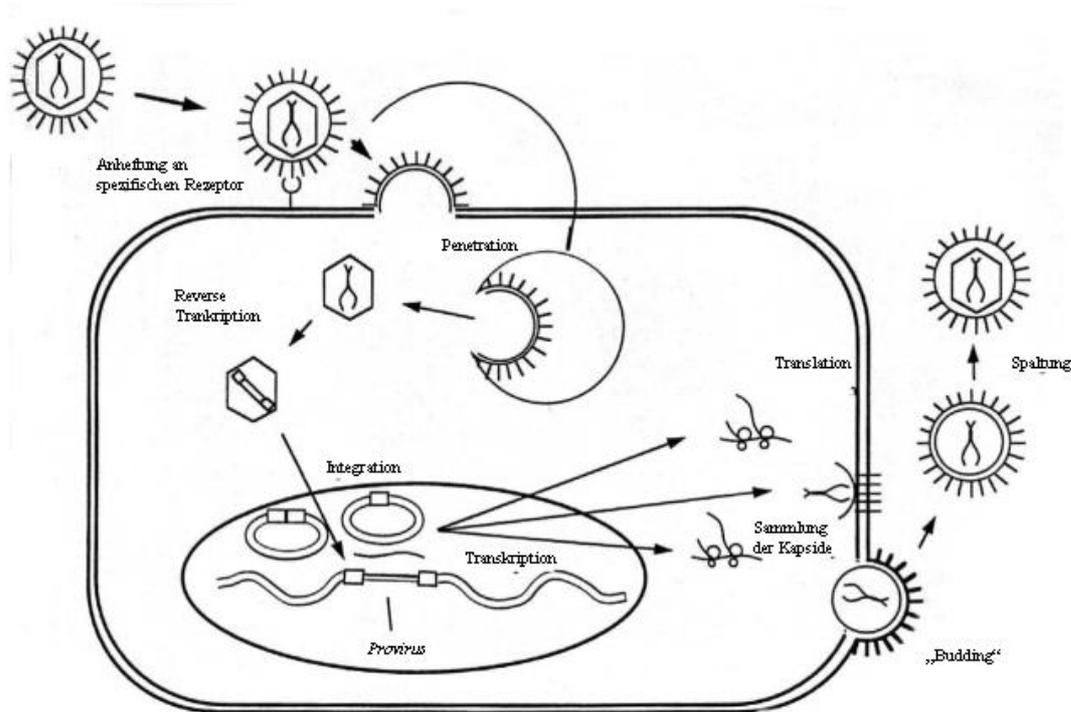
Die Produktion von infektiösem Virus startet mit der Synthese einer viralen RNA nach Vorlage des Provirus. Die zelluläre RNA-Polymerase II beginnt in der U3-Region der LTR

mit der Transkription des kompletten Virusgenoms bis in zelleigene Sequenzen. Das LTR stellt einen hoch potenten Promoter für die RNA-Synthese dar. Die Transkription wird durch zahlreiche Genprodukte des LTR gesteuert, die bis heute für das FeLV nicht vollständig bekannt sind (Bohnelein et al., 1989; Das et al., 1999). Da im Provirus zwei identische Kopien des LTR vorliegen, werden prinzipiell sowohl der Positiv-, als auch der Negativ-Strang abgelesen. Möglicherweise durch Interferenz der Promoter wird allerdings in der infizierten Zelle erheblich mehr Plus-Strang-RNA gebildet als RNA negativer Polarität (Goff, 2001). Ausschließlich Plus-Strang-RNA kann als mRNA zur Translation verwendet werden.

Die virale RNA wird teilweise in gespleißter und teilweise ungespleißter Form in das Zytoplasma der infizierten Zelle geschleust. Ungespleißte RNA wird entweder als virales Genom später in neu synthetisiertes Virus eingebaut, oder dient als mRNA für die Translation der gag- und pol-Genprodukte. Die RNA-Transkripte, die zum Aufbau der Glykoproteine des env-Gens genutzt werden, werden als einfach gespleißte mRNA ins Zytoplasma transportiert. Bei Retroviren werden die Introns vor dem Transfer der mRNA ins Zytoplasma entfernt (Goff, 2001).

Die gag-Genprodukte werden als glykosylierte Vorläuferproteine synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur Innenseite der Zelloberfläche transportiert. Teilweise tauchen sie als glykosylierte Proteine auf der Zelloberfläche infizierter Zellen auf (Goff, 2001). Die env-Genprodukte werden posttranslational mittels einer zellulären Protease in die Hüllproteine gp70 und p15E gespalten, wobei sie bereits an der inneren Zytoplasmamembran verankert sind (Bolognesi et al., 1978; Neil et al., 1980; Rojko et al., 1988). Als Hauptprodukt des pol-Gens wird die reverse Transkriptase synthetisiert und zusammen mit der viralen RNA in das neu synthetisierte Virus eingebaut (Schäfer und Bolognesi, 1977b; Pinter und Kleissner, 1979). Der Zusammenbau der Virusproteine wird hauptsächlich durch das gag-Protein gesteuert und erfolgt fast immer an der Plasmamembran der Zelle (Henderson et al., 1983). Bei der Knospung (budding) an der Zytoplasmamembran werden das Core und die innere Mantelschicht von einer Lipiddoppelschicht zellulären Ursprungs umgeben (Willis, 1991; Craven, 1991; Stewart, 1991). Neben virusspezifischen Hüllproteinen enthält die Virushülle auch zelluläre glykosylierte und nicht glykosylierte Proteine (Lutz et al., 1980a).

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Retroviren
(nach Goff, 2001)



2.8 Biologische Eigenschaften der FeLV-Proteine p27, gp70 und p15E

Gp70, das Haupthüllprotein des FeLV, ist für die Induktion spezifischer neutralisierender Antikörper gegen das Virus verantwortlich. Die Erkennung einer infizierten Zelle über die Bindung von neutralisierenden Antikörpern an gp70 führt zur Blockade der Virusabsorption und zu einem Komplement-vermittelten zytotoxischen Effekt auf diese Zellen (Sarma und Lock, 1973; Schaller und Olsen, 1975; Hardy et al., 1976; Rojko et al., 1988). Dabei werden virusneutralisierende Antikörper nur gegen Teile der antigenen Determinanten des gp70 gebildet (Hino et al., 1975, 1976; Fischinger et al., 1976). Wesentliche Sequenzunterschiede der Subgruppen FeLV-A, -B und -C befinden sich in kodierenden Bereichen des gp70-Gens. Die verschiedenen env-Genprodukte haben eine unterschiedliche Affinität zu Oberflächenrezeptoren auf Zellen, die mit FeLV infiziert werden können. Die Virusabsorption und damit die Infektiosität wird maßgeblich über die Bindungsfähigkeit an die Zelloberfläche von Zielzellen für FeLV beeinflusst (Sarma und Lock, 1973; Jarrett et al.

1973b, Rojko et al., 1988). Die starken immunsupprimierenden Eigenschaften der FeLV-FAIDS-Variante werden neben weiteren Ursachen geänderten antigenen Eigenschaften des gp70 zugeschrieben (Overbaugh et al., 1988a; Poss et al., 1989; Donahue et al., 1991).

P27 ist mit einem Anteil von 25-30 % der Teilchenmasse das Hauptcoreprotein des FeLV (Lutz, 1980b). Teile des Core-Proteins p27 stellen, wie auch bei gp70, gruppenspezifische antigene Determinanten dar, die immunogen wirken. Diese finden sich spezieübergreifend in C-Partikeln bei verschiedenen Haussäugetieren (Geerling et al., 1970; Oroszlan et al., 1971). Wie andere innere Strukturproteine kann p27 außer bei produktiver Virusvermehrung im Zytoplasma von FeLV-infizierten Zellen in größerer Menge nachgewiesen werden, ohne dass diese für den Aufbau von kompletten Viruspartikeln genutzt werden (Hardy, 1982). Bei FeLV-infizierten Katzen ist p27 teilweise mittels ELISA als lösliches Antigen im Serum, anderen Körperflüssigkeiten und Geweben nachweisbar (Hardy et al., 1969; Lutz et al., 1980b, 1983). Antikörper gegen p27 werden als nicht neutralisierend angesehen (Lutz et al., 1983).

Das Transmembranprotein p15E unterdrückt eine Reihe von Zellfunktionen und spielt somit eine wichtige Rolle bei der FeLV-assoziierten Immunsuppression. Entsprechende Untersuchungen wurden hauptsächlich bei in-vitro-Experimenten gewonnen. Es ist zu berücksichtigen, dass sich diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Situationen in natürlich infizierten Katzen übertragen lassen. Unter anderem inhibiert p15E in vitro die Mitogenese von Katzenlymphozyten (Heberbrand et al., 1977, 1979) und die Proliferation von erythrozytären Vorläuferzellen (Wellman et al., 1984). Copelan und Mitarbeiter (1983) fanden heraus, dass p15E die IL-2-Produktion und -Antwort hemmt, indem die Expression von IL-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindert wird (Hardy, 1982; Orosz et al., 1985). IL-2 spielt eine entscheidende Rolle in der Stimulation von T-Lymphozyten durch T-Helferzellen. Weiterhin wurde in vitro eine Hemmung der gamma-Interferon-Produktion durch p15E festgestellt (Orosz et al., 1985). Vermutlich blockiert p15E auch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Lafrado et al., 1987). Die Mechanismen, mit denen p15E die oben beschriebenen Effekte auslöst, sind nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass p15E eine Unterbrechung normaler zellulärer Signalketten an oder in der Nähe der Zelloberfläche verursacht. Möglicherweise spielt die Inhibierung der Produktion von cAMP eine entscheidende Rolle, wodurch dessen Funktion als "second messenger" in der Zelle verhindert wird (Übersicht bei Olsen et al., 1987). Untersuchungen an FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze deuten darauf hin, dass p15E die Apoptose von Tumorzellen induzieren kann (Köhler et al., 1998, 2003).

2.9 Vorkommen des FeLV in Organen und Geweben

Es existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit dem Auftreten und der Verteilung von Viruspartikeln und FeLV-Antigen in verschiedenen Organen beschäftigen.

Die Identifizierung des FeLV wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (EM) an Organen von infizierten Katzen vorgenommen. Schon im Jahre 1964 gelang es Jarrett und Mitarbeitern, nach experimenteller FeLV-Infektion Viruspartikel vom Typ C in Tumorgewebe nachzuweisen. Es gelang, C-Partikel in Knochenmark, Thymus, Lymphknoten, Milz, Leber, Niere, Speicheldrüse, Tonsillen, Trachea, Nasenschleimhaut, Maulschleimhaut, Darm, Pankreas, Ovarien, verschiedenen neoplastischen Geweben sowie in Speichel, Urin und Blut zu identifizieren (Rickard et al., 1968; Dougherty et al., 1969; Herz et al., 1970; Gardner et al., 1971; Jarrett et al., 1973b; Francis et al., 1977).

Für den Antigennachweis des FeLV in Organen sind verschiedene Methoden in der Literatur beschrieben. Der Nachweis gruppenspezifischer Antigene mittels Immundiffusion (ID) wurde von Hardy und Mitarbeitern (1969, 1971, 1973b) durchgeführt. Mit dieser Technik war es möglich, FeLV-Antigen in Lymphknoten, Milz, Leber, Niere, Knochenmark, Speicheldrüse, Blut und leukotischen Tumoren nachzuweisen.

Durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) (Rojko et al., 1978, 1979) und indirekte Immunperoxidase (IP) (Reinacher und Theilen, 1987) konnte ebenfalls in zahlreichen Organen FeLV-Protein detektiert werden. Mittels Southern-Blot-Hybridisierung (SB) war es möglich, nicht integrierte virale doppelsträngige DNA (nach reverser Transkription) in Knochenmark, Darm, Lymphknoten und T-Zell-Lymphomen zu identifizieren (Mullins et al., 1986; Hoover et al., 1987; Fulton et al., 1987). Der Nachweis von exogener, ins Zellgenom integrierter proviraler FeLV-DNA ist durch die Detektion von U3-LTR-Regionen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) möglich. Auch für den Nachweis von anderen Genomregionen mittels PCR sind Primersysteme schon seit längerem etabliert (Jackson et al., 1993; Kipar et al., 2001; Schwartz et al., 2001).

Im Folgenden wird genauer auf den Virus- und Antigen-Nachweis in Milz, Lymphknoten, Darm, Thymus und Knochenmark von FeLV-infizierten Katzen eingegangen.

1. Virus- und Antigen-Nachweis in der Milz nach FeLV-Infektion

In der Milz FeLV-infizierter Katzen konnte nach spontaner Infektion FeLV-Antigen in nahezu 100% der untersuchten Katzen mittels IPO (Immunperoxidase) nachgewiesen werden (Kästner, 1992). Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Hardy und Mitarbeitern (ID) (1969), Rojko und Mitarbeitern (IF) (1978, 1979) sowie Reinacher und Theilen (IPO)

(1987a) überein, die die germinativen Zentren der Milzfollikel als Ziel der FeLV-Replikation und Ort des Antigen-Nachweises beschreiben. Kästner (1992) demonstrierte in ihrer Arbeit den Antigen-Nachweis mittels IPO in mononukleären (Lymphozyten, Lymphoblasten, Makrophagen und Plasmazellen) und erstmals auch in retikulären Zellen (Antigen-präsentierende Zellen) der Milzfollikel. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an B-Zellen ergänzt, in denen eine ansteigende Konzentration von p27-Antigen während der Reifung zu Plasmazellen festgestellt wurde. Desweiteren wurden im Stadium der frühen Replikationsphase in T-Zellen FeLV-Antigen nachgewiesen (IF) (Rojko und Olsen, 1982). In der Arbeit von Teebken-Schuler (1993) wird der getrennte Nachweis von gp70- und p27-Antigen in der Milz beschrieben. Dabei zeichnen sich die Follikel durch häufiges Auftreten von p27-Antigen in mononukleären und antigenpräsentierenden Zellen aus. In T-Zell-reichen Regionen (PALS) und der roten Pulpa wurde dagegen ein vermehrter Nachweis des Hüllproteins gp70 festgestellt (IPO). Das Auftreten von antigen-positiven Zellen im Bereich des PALS und der roten Pulpa wurde von Kästner (1992) bei FeLV-infizierten Katzen zum Teil in Verbindung mit einer felines Coronavirusinfektion beobachtet (IPO).

Elektronenmikroskopisch konnten in der Milz sowohl von experimentell infizierten als auch von Katzen, die spontan mit FeLV infiziert waren, regelmäßig Viruspartikel vom Typ C nachgewiesen werden (Jarrett et al., 1973b).

2. Virus- und Antigen-Nachweis in Lymphknoten nach FeLV-Infektion

Entsprechend den Angaben für die Milz konnten in den gleichen Arbeiten Virus-Antigene in Lymphknoten mit großer Regelmäßigkeit nachgewiesen werden. Auch in diesem Gewebe fand sich in der Regel Antigen am häufigsten im Bereich der Follikel (Rojko et al., 1978, 1979 (IF), Hayes et al., 1989 (IF)). Im Gegensatz dazu fand Kästner (1992) bei Katzen mit einer manifesten Leukose im Lymphknoten eine stärkere Bindung der FeLV-Antikörper außerhalb der Follikel (IPO). Teebken-Schuler (1993) beschreibt den Nachweis von p27 Antigen bevorzugt in Lymphknotenfollikeln und von gp70 in extrafollikulären Bereichen. Laut ihren Ausführungen handelt es sich bei den antigentragenden Zellen in den Follikeln um B-Zellen und follikuläre dendritische Zellen (FDC). In Parakortex und Medulla konnten hauptsächlich retikuläre antigenpräsentierende Zellen (APC), Lymphozyten und Makrophagen als antigentragend identifiziert werden (IPO). In der frühen Phase einer FeLV-Infektion stellen nach Rojko und Mitarbeitern (1978) B-Lymphozyten in den Follikeln die Zellpopulation mit der stärksten Expression von p27-Antigen dar (IF).

Der elektronenmikroskopische Nachweis von Viruspartikeln im Lymphknotengewebe wurde von Rickard und Mitarbeitern (1968) geführt. Im Jahr 1969 fand man in lymphoidzelligen Infiltraten von Lymphknoten bei an FeLV erkrankten Tieren knospende Viruspartikel an der Zellmembran (Budding) (Dougherty et al., 1969). Bei experimentell FeLV-infizierten Katzen gelang der Nachweis von nicht ins Zellgenom integrierter viraler doppelsträngiger DNA in Lymphknotengewebe mittels Southern Blot-Hybridisierung (Hoover et al., 1987).

3. Virus- und Antigen-Nachweis im Darm nach FeLV-Infektion

Bei an FeLV erkrankten Katzen konnten bei bis zu 100% FeLV-Antigen in verschiedenen Darmabschnitten gefunden werden (Reinacher und Theilen, 1987; Kästner, 1992). In der frühen Phase der FeLV-Infektion wurde eine geringere Anzahl (ca. 66%) an Katzen mit positivem FeLV-Antigen-Nachweis im Darm beschrieben (Rojko et al., 1978). Dabei fand sich in den Epithelien der Krypten die höchste Konzentration an viralem Antigen. Zu den Zottenspitzen hin nahm der Antigengehalt in den Epithelien deutlich ab. Teebken-Schuler (1993) fand bei ihren Untersuchungen eine im Vergleich zu gp70 deutlich stärkere Expression von p27-Antigen in den Darmepithelien, gp70-positiv waren hingegen zahlreiche Infiltratzellen in der Schleimhaut.

Jarrett und Mitarbeiter (1973b) fanden in einer elektronenmikroskopischen Studie relativ wenig Viruspartikel im Darm. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass in dieser Studie nur eine geringe Anzahl an Tieren untersucht wurde.

Bei experimentell FeLV-infizierten Katzen gelang der Nachweis von nicht ins Zellgenom integriertem viraler doppelsträngiger DNA im Darm mittels Southern Blot-Hybridisierung (Hoover et al., 1987).

4. Virus- und Antigen-Nachweis im Thymus bei FeLV-infizierten Katzen

Über den Nachweis von FeLV-Antigen im Thymus existieren nur wenige Untersuchungen. Rojko und Olsen (1984) konnten nach experimenteller Infektion in neoplastischen Lymphozyten der Thymusrinde mittels Immunfluoreszenz FeLV-Antigen nachweisen.

Viruspartikel fanden sich nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei Katzen mit spontaner Leukose an der Zytoplasmamembran von Lymphozyten im Thymusmark (Rickard et al., 1968).

5. Virus- und Antigen-Nachweis im Knochenmark nach FeLV-Infektion

Sowohl nach spontaner (Reinacher und Theilen, 1987), als auch nach experimenteller (Rojko et al., 1978) FeLV-Infektion war Virusantigen immunhistologisch bei nahezu 100% der untersuchten Katzen im Knochenmark nachweisbar.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen von elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Jarrett et al., 1973b).

Nach differenzierten Untersuchungen der Zellen im Knochenmark war nach spontaner FeLV-Infektion mittels IF Antigen in Megakaryozyten, erythropoetischen Vorläuferzellen und leukotischen Infiltraten nachweisbar (Hardy et al., 1973a). Rojko und Olsen (1984) stellten in ihren Untersuchungen (IF) einen hohen Gehalt an p27-Antigen in Megakaryozyten fest. Im Verlauf der Zellreifung fand sich in Zellen der myelomonozytären Reihe ein Anstieg des p27-Antigen-Gehaltes, in erythrozytären Zellen nahm der Gehalt an p27-Antigen mit zunehmender Reifung ab. Teebken-Schuler (1993) dokumentierte in Megakaryozyten einen höheren Gehalt an gp70- als an p27-Antigen (IPO).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Viruspartikel in Megakaryozyten sowohl während der Virusfreisetzung (Budding) als auch in zytoplasmatischen Vesikeln identifiziert werden (Rickard et al., 1968; Hoover et al., 1974).

Bei experimentell FeLV-infizierten Katzen gelang der Nachweis von nicht ins Zellgenom integrierter viraler doppelsträngiger DNA im Knochenmark mittels Southern Blot-Hybridisierung (Mullins et al., 1986; Hoover et al., 1987).

2.9 Pathogenese der FeLV-Infektion

FeLV wird mit allen Körperflüssigkeiten ausgeschieden. Speichel kann bis zu zwei Millionen infektiöse Viruspartikel/ml enthalten und ist daher von besonderer Bedeutung für die Virusausscheidung (Hardy et al., 1969, 1973; Gardner et al., 1971). Meist findet die Übertragung durch direkten Kontakt statt, allerdings ist eine Übertragung trotz der hohen Empfindlichkeit des FeLV gegen Austrocknung zum Beispiel auch durch gemeinsam benutzte Futter- oder Trinkgefäße möglich (Hoover et al., 1977; Francis et al., 1979). Urin und Blut kommen als weitere Infektionsquellen in Frage (Hardy et al., 1977b).

Bei natürlichen Infektionen sind Mukosa und lymphatisches Gewebe des oronasalen Pharynx die Haupteintrittspforten (Hoover et al., 1972; Jarrett et al., 1973b; Rojko et al., 1979).

Das Virus vermehrt sich nach oronasaler Infektion zunächst in den Tonsillen und den pharyngealen Lymphknoten (1.-7. Tag post infectionem (p.i.)). Von hier aus kommt es zu

einer frühen zellassozierten Virämie, die an Lymphozyten und Monozyten gebunden ist (2.-14. Tag p.i.). Hierbei werden auch die Follikelzentren der übrigen lymphatischen Gewebe (Milz, Lymphknoten, Peyersche Platten) infiziert (3.-14. Tag p.i.). Einige Tage später setzt die Virusvermehrung in den Stammzellen des Knochenmarks und im Kryptepithel des Darmes ein (7.-21. Tag p.i.). Nach Infektion des Knochenmarks kommt es zu einer raschen und massiven Virusvermehrung. Die sich anschließende zweite Virämie (14. - 28. Tag p.i.), die sowohl in zirkulierenden Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten als auch zellfrei verläuft, schafft die Voraussetzung für die Infektion zahlreicher epithelialer Gewebe (zum Beispiel Rachen, Schlund, Magen, Blase, Speicheldrüsen), die zwischen dem 28. und 56. Tag p.i. erfolgt. Ab diesem Zeitpunkt können infizierte Katzen massiv Virus ausscheiden (Rojko et al., 1979).

2.10 Infektionsformen

Nur ein geringer Anteil FeLV-infizierter Katzen durchläuft alle Stadien der Infektion (s. 2.9) und erkrankt an FeLV-assoziierten Krankheiten mit in der Regel tödlichem Ausgang.

Bei diesen Tieren liegt eine persistierende Infektion vor, bei der Virusantigen permanent im Blut nachgewiesen werden kann (Hardy et al., 1973a; Jarrett et al., 1973c; Hardy et al., 1976; Hoover et al., 1977a; Reinacher und Theilen, 1987).

Die meisten infizierten Tiere beenden die Infektion durch Bildung neutralisierender Antikörper vor oder während einer Virämie (Essex et al., 1971a; Hardy et al., 1973b; Jarrett et al., 1973c). Diese Tiere erkranken in der Regel nicht, können aber in der virämischen Phase temporär Ausscheider von FeLV sein (Jarrett et al., 1984).

Die Viruslatenz stellt eine weitere mögliche Folge einer FeLV-Infektion dar. Dabei kommt es zur Integration von DNA in Form eines Provirus in das Genom der infizierten Zellen. Im Gegensatz zur persistierenden Infektion kommt es bei der Ausbildung von latenten Infektionen nicht bzw. nicht mehr zur produktiven Virusvermehrung und damit nicht zur persistierenden Virämie (Rojko et al., 1982). Eine Ausbreitung der Infektion wird wahrscheinlich durch die Bildung neutralisierender Antikörper verhindert (Haley et al., 1985; Pacitti et al., 1986). Bei 30-60% latent infizierter Katzen konnten Pedersen und Mitarbeiter (1984) im Knochenmark Provirus nachweisen.

Es ist möglich, dass eine latente Infektion, meist durch Immunsuppression, reaktiviert wird, wodurch es zur persistierenden Virämie kommen kann (Rojko et al., 1982; Pedersen et al., 1984).

Bei experimentell infizierten Katzen sind Fälle beschrieben, bei denen nur in einzelnen Organen, nicht aber im Knochenmark, FeLV nachgewiesen werden konnte. Dem zu Folge handelt es sich bei diesen Tieren um eine lokale FeLV-Infektion (Lutz et al., 1980a; Hayes et al., 1989).

2.11 Immunreaktion und Immunsuppression nach FeLV-Infektion

Die Immunreaktion der Katze nach FeLV-Infektion besteht im Wesentlichen aus der Bildung neutralisierender Antikörper gegen antigene Determinanten des gp70 (Sarma und Lock, 1973; Fischinger et al., 1976; Russell und Jarrett., 1978b; Rojko et al., 1988). Neben gp70 wirken aber auch andere Hauptstrukturproteine (p27, p15E, p12, p10) des FeLV immunogen (Lutz et al., 1980a). Lutz und Mitarbeiter (1980a) konnten in ihren Untersuchungen eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten virusneutralisierender Antikörper im Blut und der schnellen Beendigung einer Virämie feststellen. Hohe Titer neutralisierender Antikörper schützen die Katze vor einer systemischen Infektion. Ebenso sind Jungtiere durch die Aufnahme von maternalen Antikörpern mit der Kolostralmilch resistent gegenüber einer FeLV-Infektion (Jarrett et al., 1977; Pacitti et al., 1986). Persistent FeLV-infizierte Katzen besitzen hingegen niedrige Antikörperspiegel (Grant et al., 1980a; Lutz et al., 1980a).

Auf der Oberfläche von FeLV-infizierten transformierten Katzenlymphosarkomzellen konnten in zahlreichen Untersuchungen mittels bestimmter Antikörper (Anti-FOCMA) in Gegenwart von Komplement eine Zellyse von Tumorzellen induziert werden (Mathes et al., 1976; Grant et al., 1977, 1978, 1979, 1980a). FOCMA (feline oncornavirus-associated cell membrane antigen) wurde früher als nicht virales, tumorspezifisches Membranantigen angesehen, das in FeLV-assoziierten Tumoren exprimiert wird (Essex et al., 1975a; Schaller et al., 1975; Charman et al., 1976; Stephenson et al., 1977a; Hardy et al., 1977b; Sherr et al., 1978; Snyder et al., 1978). In späteren Untersuchungen fand man mittels monoklonaler Antikörper heraus, dass FOCMA und FeLV-gp70 ähnliche antigene Determinanten aufweisen, wodurch die virale Herkunft des Membranantigens als wahrscheinlich angesehen wurde (Vedbrat et al., 1980; Snyder et al., 1983; Vedbrat et al., 1983). Ursprung und Spezifität von FOCMA sind bis heute nicht vollständig geklärt. Möglicher Weise sind auch endogene FeLV-Sequenzen an dem Aufbau des Membranantigens beteiligt (Grand und Michalek, 1981; Snyder et al., 1983). In zahlreichen Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen dem Fehlen von Anti-FOCMA-Antikörpern bei FeLV-infizierten Katzen und dem vermehrten Auftreten von FeLV-assoziierten Tumoren bei diesen Katzen festgestellt werden.

(Essex et al., 1971b, 1973; Jarrett et al., 1973a, 1973c; Essex et al., 1975b; Hardy et al., 1976; Hoover et al., 1976).

Die zelluläre Immunantwort der Katze auf eine FeLV-Infektion scheint eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Die Tatsache, dass bei einigen experimentell infizierten Katzen eine Eliminierung des Virus ohne nennenswerten Anstieg des Antikörpertiters zu beobachten war, deutet allerdings auf effektive zelluläre und/oder unspezifische immunologische Reaktionen hin (Russell und Jarrett, 1978b; Lutz et al., 1980a; Gardner et al., 1980).

Individuell unterschiedlich kommt es durch eine FeLV-Infektion zur Immunsuppression und zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber anderen pathogenen Erregern (Hardy, 1982; Olsen et al., 1987). Dies spiegelt sich in zahlreichen viralen, bakteriellen und parasitären Sekundärinfektionen (FeLV-assoziierte Krankheiten) wieder, die meist zum Tod des betroffenen Tieres führen (Cotter et al., 1975). Wesentliche Ursachen für die Insuffizienz des Immunsystems dürften die FeLV-bedingten Zytolyse und Degeneration von Vorläuferzellen im Knochenmark darstellen (Hardy et al., 1982). Ausgelöst dadurch kommt es zur transienten Neutropenie, Lymphopenie und Thrombozytopenie sowie zur Zytopenie verschiedener Zelllinien bei der Immunantwort (Cockerell et al., 1976a; Pedersen et al., 1976; Rojko et al., 1979). In verschiedenen Veröffentlichungen wurde eine FeLV-assoziierte Anämie mit einer Knochenmarksdepression in Verbindung gebracht (Jarrett et al., 1984; Hoover und Mullins, 1991). Bei Jungtieren konnte eine Immunsuppression durch T-Zell-Depletion im Thymus festgestellt werden (Anderson et al., 1971). Auch bei adulten Tieren spielt die Beeinflussung der T-Zell-Funktion eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der Immunsuppression. Besonders in Lymphknoten, aber auch in der Milz, konnte eine Depletion der T-Zellen in kortikalen und parakortikalen Bereichen bei FeLV-Infektion festgestellt werden (Hoover et al., 1973; Hardy et al., 1982). Durch in vitro-Experimente fand man eine verminderte Reaktivität von T-Lymphozyten auf mitogenstimulierende Effekte in Verbindung mit einer FeLV-Infektion (Cockerell et al., 1976a, 1976b; Heberbrand et al., 1977). Ursächlich dafür kommt eine gestörte Sekretion von Interleukin 2 und damit eine ineffektive Stimulation von T-Zellen in Betracht (Copelan et al., 1983; Engelmann et al., 1984). Experimentelle Infektionen mit einer FeLV-FAIDS-Variante führten zur deutlichen Abnahme von CD4⁺ T-Lymphozyten im Blut (Quackenbusch et al., 1990).

Neben T-Zellen werden auch durch die Schädigung anderer Zelllinien immunsupprimierende Effekte vermittelt. Sowohl während einer transienten FeLV-Infektion als auch bei virämischen Katzen konnte mittels Chemolumineszenz-Messung eine gestörte Funktionen

von neutrophilen Granulozyten bei der unspezifischen Immunabwehr gezeigt werden. Diese beruht unter Anderem auf einer verminderten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (oxidative metabolic burst), die insbesondere bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen durch neutrophile Granulozyten gebildet werden (Lafrado et al., 1986, 1989; Dezzutti et al., 1989). Die Pathomechanismen, durch die eine FeLV-Infektion zur Hemmung des oxidative metabolic burst führt, sind bis heute nicht restlos geklärt. Es wird vermutet, dass es durch eine FeLV-Infektion zur Störung der Signaltransduktion an der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten kommt (Lewis et al., 1986). Als weitere FeLV-assoziierte immunsuppressive Faktoren gelten lösliche Serumfaktoren, die als „specific blocking faktor“ (SBF) bezeichnet werden (Olsen et al., 1987). Zu diesen zählen auch zirkulierende Immunkomplexe, die immunogene Wirkungen aufweisen können (Jones et al., 1980; Snyder et al., 1982).

2.12 Funktion dendritischer Zellen im lymphatischen Gewebe

Follikuläre dendritische Zellen (FDZ) befinden sich physiologischer Weise sowohl in den Follikelzentren als auch im Randbereich der Follikel von Milz und Lymphknoten (Stein et al., 1991), wo sie als antigenpräsentierende Zellen (APC) bei der Selektion von B-Zell-Blasten (Zentroblasten) mitwirken (siehe unten). Im Gegensatz zu lymphoiden dendritischen Zellen (LDZ), die von Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen und die dem mononukleären Phagozytensystem zugeordnet werden, ist die Herkunft der FDC bisher nicht vollständig geklärt. Außerdem exprimieren FDC im Gegensatz zu LDC keine MHC (major histocompatibility complex molecules)-Moleküle (Lydyard und Grossi, 1995a) und im Gegensatz zu T-Helferzellen kein CD4⁺-Antigen (Schriever et al., 1989; Sellheyer et al., 1989).

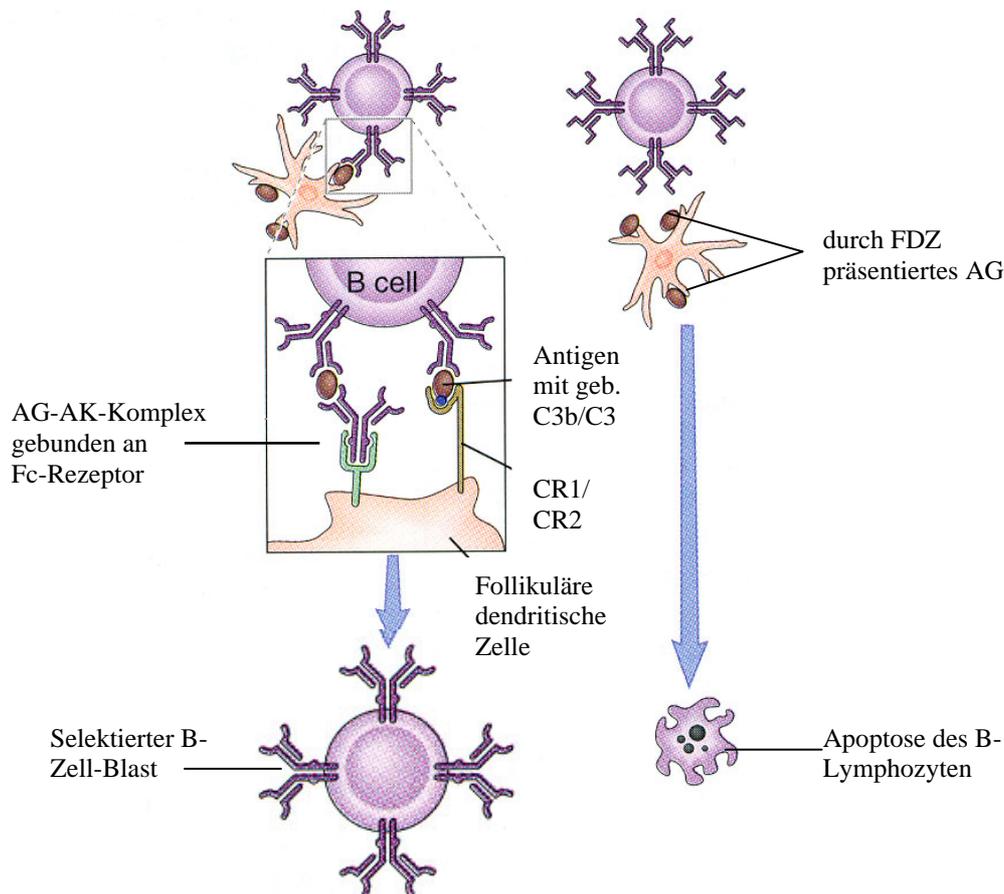
LDC kommen als unreife dendritische Zellen in den Epithelien der Haut (Langerhans-Zellen), im Gastrointestinaltrakt und im Respirationstrakt vor. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Aufnahme von Proteinantigenen und dessen Transport in die regionären Lymphknoten. Während ihrer Wanderung reifen die Zellen, indem sie vermehrt MHC-Antigene exprimieren. Damit Antigene T_H-Zellen effizient präsentiert werden, müssen MHC-Moleküle exprimiert sein (Abbas et al., 2000a). LDZ nehmen das Antigen nicht wie andere antigenpräsentierende Zellen durch Phagozytose auf. Es wird vermutet, dass sie das Antigen entweder direkt auf der Zelloberfläche aufbereiten oder nach Pinocytose in Assoziation mit MHC II präsentieren (Owen und Steward, 1995a, 1995b). Ausgereifte LDC befinden sich in den T-Zell-

abhängigen Bereichen des lymphatischen Gewebes, in denen sie als interdigitierende Zellen (IDZ) bezeichnet werden (Lydyard und Grossi, 1995).

Um die Funktion der FDZ besser verstehen zu können, wird im Folgenden kurz auf die zellulären Vorgänge bei der Follikelstimulation eingegangen.

Die Stimulierung der humoralen Immunantwort beginnt mit der Bindung eines Antigens an B-Lymphozyten in lymphatischen Geweben. Mit Hilfe von antigenspezifischen Immunglobulinrezeptoren (IgM, IgD) sind sie in der Lage, Antigen zu erkennen und nach Phagozytose und Opsonierung bei Anwesenheit von MHC-Molekülen T_H-Zellen zu präsentieren. Für die Interaktion mit T_H-Zellen wandern die aktivierten B-Lymphozyten in den Randbereich der Follikel (Sekundärfollikel), wo sie von Antigen-spezifischen T_H-Zellen erkannt und zur Proliferation angeregt werden (Abbas et al., 2000b). In den Keimzentren der Follikel setzt im Folgenden eine starke klonale Vermehrung der selektierten B-Zellen ein, die in diesem Stadium als Zentroblasten bezeichnet werden (Rajewsky, 1996). Während der Proliferation im Keimzentrum kommt es zu einer sehr hohen Zahl an Punktmutationen im Bereich der V (variabel)-Gene (somatische Hypermutation) der leichten und schweren Ketten der Immunglobuline. Die Mutationsrate liegt dabei um das 10^3 - 10^4 fache höher als bei anderen zellulären Genen, wodurch Abweichungen von der ursprünglichen IgG-Nukleotidsequenz von bis zu 5% entstehen (Abbas et al., 2000b). Follikuläre dendritische Zellen sind in dieser Phase der humoralen Immunantwort dafür verantwortlich, aus den zahlreichen B-Zell-Klonen die mit der optimalen Bindung (IgG) an das Antigen zu selektieren (Rajewsky, 1996). FDZ exprimieren auf ihren stachelförmigen Zytoplasmafortsätzen Rezeptoren für das Fc-Ende (Fc-Rezeptor) von Antikörpern und für die Produkte C3b und C3d (CR1/CR2-Rezeptor) der Komplementaktivierung. Über diese Rezeptoren sind die FDZ in der Lage, Antigen in Verbindung mit Antikörpern oder mit Komplementmolekülen zu binden („Antigen Trapping“) und zu präsentieren (Schriever et al., 1989; Lydyard und Grossi, 1995c). Kommt es zur Bindung zwischen den Rezeptoren der FDZ und einem komplementären B-Zell-Klon, so werden in dieser B-Zelle antiapoptotische Proteine induziert, die die Zelle vor dem programmierten Zelltod bewahren. B-Zellen mit erfolgloser zufälliger Mutation in Bezug auf die Erkennung des Antigens werden dagegen eliminiert (Lydyard und Grossi, 1995c; Abbas et al., 2000b). Das Ergebnis dieses Selektionsprozesses ist eine Population von B-Zellen, die Antikörper mit einer signifikant höheren Affinität zu dem Antigen produzieren, als derselbe B-Zell-Klon, der ursprünglich als Immunantwort entstanden ist.

Abbildung 2.4: Selektion von mutierten B-Lymphozyten (V-Gen) durch FDZ im Keimzentrum von Lymphfollikeln (nach Abbas et al., 2000b)



AG-AK:	Antigen-Antikörper
Fc:	Teil des Antikörpers, der kein Antigen binden kann
C3b/C3d:	Produkte der Komplementaktivierung
CR1/CR2:	Komplementrezeptor auf FDZ
FDZ:	follikuläre dendritische Zelle

2.13 Nachweis einer FeLV-Infektion

Zum Nachweis einer FeLV-Infektion sind verschiedene Methoden in der Literatur beschrieben, bei denen man zwischen dem Nachweis von Antikörpern gegen FeLV und dem eigentlichen Erregernachweis differenzieren muß. Der Nachweis von Antikörpern gegen FeLV läßt lediglich die Aussage zu, dass der Organismus sich zu einem unbestimmten Zeitpunkt durch die Bildung spezifischer Antikörper mit einer FeLV-Infektion

auseinandergesetzt hat. Aussagen über den Verlauf der Infektion (s. 2.11) und den aktuellen Infektionsstatus lassen sich somit allerdings nicht ableiten. Durch den Erregernachweis läßt sich auf eine aktuelle produktive Virusvermehrung schließen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Interpretation der unten erwähnten Methoden auf Grund unterschiedlicher Nachweisgrenzen differenziert vorgenommen werden muß. Tabelle 2.3 enthält eine Aufstellung der verschiedenen Methoden zum Nachweis von FeLV-Antikörpern sowie einer aktuell bestehenden FeLV-Infektion.

Tabelle 2.3 Nachweis von FeLV-Antikörpern und viralem Antigen

Antikörpernachweis		Erregernachweis	
Methode	Erstautor	Methode	Erstautor
Immundiffusion	Hardy et al., 1970	Elektronenmikroskopie	Jarrett et al., 1964a
Immunfluoreszenz	Essex et al., 1971b	Immundiffusion	Hardy et al., 1969
Komplementbindungsreaktion	Olsen und Yohn, 1972	Hämagglutinationstest	Fink et al., 1971
Chrom-51-release-assay	Grant et al., 1977	Hämagglutinationshemmtest	Fink et al., 1971
ELISA	Lutz et al., 1979	Komplementbindungsreaktion	Sarma, 1971b
Radioimmunassay	Lutz et al., 1983b	Gewebekultur	Francis et al., 1977
		Indirekte Immunfluoreszenz	Hardy et al., 1973b
		Indirekte Immunperoxidase	Rojko et al., 1978
		ELISA (p27)	Lutz et al., 1983a
		„one-step“-ELISA	Lutz und Jarrett, 1987
		Fluoreszenz-ELISA	Kushner et al., 1988
		PCR	Jackson et al., 1996

2.14 In situ-Hybridisierung

Mit der in situ-Hybridisierung (ISH) ist es möglich, DNA- oder RNA-Sequenzen in Geweben und Zellen mit Hilfe von markierten einzelsträngigen Nukleinsäuren nachzuweisen. Im Gegensatz zur Northern- oder Southern-Blot-Hybridisierung ist dies bei der ISH am fixierten Gewebe (in situ) möglich. Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindung der markierten

einzelsträngigen Nukleinsäure (der sogenannten „Sonde“) mit komplementären einzelsträngigen Sequenzen in den Zellen und Geweben (Wilkinson, 1992).

Analog zu immunhistologischen Methoden kann der Nachweis der Hybridisierung bei nicht radioaktiv markierten Sonden mittels spezifischer Antikörper vorgenommen werden (Höfler, 1990; Denijn et al., 1992). Bei nicht radioaktiv markierten Sonden ist die Detektion durch Biotin oder Digoxigenin (DIG) die gängigste Methode. Biotin (Vitamin H) wird meist in Form von Biotin-11-dUTP in Nukleinsäuren eingebaut. Auch andere biotinylierte Nucleotide wie Biotin-16-dUTP, Biotin-14-dATP und Biotin-11-dCTP sind kommerziell erhältlich (Brigati et al., 1983; Leitch et al., 1994).

Digoxigenin ist ein pflanzliches Steroid aus *Digitalis Purpurea* und *Digitalis lanata*. Es wird in Form von Digoxigenin-11-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP in DNA oder RNA eingebaut (Martinez-Montero et al., 1991; Fleming et al., 1992).

Zum Nachweis von Biotin-markierten Sonden kommen in Anlehnung an immunhistologische Verfahren entweder die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)- oder die Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Methode zum Einsatz. DIG-markierte Sonden werden i.a. mit Hilfe eines anti-Digoxigenin-Antikörpers nachgewiesen, der mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Als Substrat für die alkalische Phosphatase werden meist Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5Brom-4Chlor-3Indolyl-Phosphat (BCIP; X-Phosphat) verwendet, die in einer Redoxreaktion zu einem dunkelblauen unlöslichen Farbstoff umgesetzt werden (Fleming et al., 1992).

Beim Einsatz von nicht radioaktiv markierten Sonden ist eine Doppelmarkierung zur gleichzeitigen Detektion von Nukleinsäuren (in situ-Hybridisierung) und Proteinen (Immunhistologie) im fixierten Gewebe besonders gut möglich (Brahic et al., 1984; Woodrooffe et al., 1994).

Ein häufiges Einsatzgebiet der ISH ist der Nachweis der Genexpression, insbesondere von Viren, durch Identifizierung der mRNA (Polak und McGee, 1990). Durch die Verwendung von RNA-Sonden unterschiedlicher Polarität ist es möglich, bestimmte mRNA-Sequenzen (positive Polarität) in der Zelle zu identifizieren. Die Sonden mit der identischen Polarität zur mRNA binden im Gewebe nicht und können somit als Negativkontrollen verwendet werden (Wilkinson, 1990; Zurbriggen, 1993a).

Die Sensitivität der ISH ist von verschiedenen Faktoren abhängig und besitzt eine große Schwankungsbreite. Die Art der Sonde (Oglesbee et al., 1986; Giaid et al., 1989), die Markierungsweise, das Detektionssystem (Brahic und Haase, 1978; Wilkinson, 1990), die Fixierung des Gewebes oder der Einzelzellen sowie die Vorbehandlung und der

Frischezustand des verwendeten Materials (Ermine et al. 1988; Arai et al., 1989; Fleming et al., 1992) haben entscheidende Auswirkung auf die Sensitivität der ISH. Es existieren zahlreiche Arbeiten über die Nachweisgrenzen und die Optimierung der ISH. In Versuchen mit Biotin-markierten DNA-Sonden (200-400 Basen) konnten ca. 10-30 Kopien des humanen Papillomavirus (HPV) in Präparaten von Zervixschleimhaut nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen an Zellkulturen unter vergleichbaren Bedingungen lag die untere Nachweisgrenze von viralem Genom bei ca. 800 Kopien pro Zelle. Diese Differenzen wurden auf andere Permeabilität und Diffusionsbedingungen in Kulturzellen im Vergleich zu Gewebepräparaten zurückgeführt (Burns et al., 1987). Infektionsversuche mit Picornaviren bei Mäusen zeigten unter Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde (verschiedene Isotope) nach ISH eine untere Detektionsgrenze von wenigstens 10 RNA-Kopien pro Zelle. Bei einer Doppelmarkierung, bei der parallel zu dem Virusgenom virale Proteine (Immunhistologie) nachgewiesen wurden, erhöhte sich die untere Nachweisgrenze für Picornavirus-Genom auf 20 Kopien pro Zelle (Brahic et al., 1984). Von ISH an Chromosomenpräparaten ist bekannt, dass bei Verwendung von nicht radioaktiv markierten Sonden einzelne DNA-Stränge von Genen nachgewiesen werden können. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Länge dieser Sonden im zweistelligen Kilobasenbereich anzusiedeln ist (Nichols et al., 1987). Fleming und Mitarbeitern (1992) gelang es, unter optimierten Bedingungen 2-20 DNA-Transkripte des human α -1-antitrypsin Gens in Leber, Milz und Niere von transgenen Mäusen nachzuweisen. Dabei wurden DIG-gelabelte Sonden verwendet, die über ein „Alkalische-Phosphatase-System“ (Anti-DIG-AK; NDT/BCIP) sichtbar gemacht wurden. Bei Untersuchungen an HIV-infizierten Geweben war es nicht möglich, mittels ISH unter Verwendung radioaktiv markierter DNA-Sonden ins Zellgenom integriertes Retrovirus nachzuweisen. Die Länge der Zielsequenzen wurde in den entsprechenden Arbeiten auf 10-20 Kilobasen geschätzt (Höfler, 1987; Polak und McGee, 1990; Zietz et al., 1991). Die Abschätzung der Zahl bindender Sonden im Gewebe beruht bei diesen Untersuchungen auf der Auszählung einzelner punktförmiger Präzipitate, die jeweils als einzelne bindende Sonden interpretiert wurden (Brahic et al., 1984; Burns et al. 1987; Nichols et al., 1987; Fleming et al., 1992).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Zellkulturen

3.1.1.1 FeLV-infizierte Zellen

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Digoxigenin markierten RNA-Sonden (Ribosonden) standen Zellkulturen von FL74-UCD-1 (FL74), sowie feline Embryo-Zellen (FE-Zellen), infiziert mit dem Felinen Leukämie Virus (FeLV) der Subtypen FeLV-A, -B, -C zur Verfügung (Schwartz, 2001). Diese Zellen wurden außerdem als Positivkontrolle für die in situ-Hybridisierung (ISH) und Immunhistologie (IH) verwendet (s. unten).

Bei den FL74-Zellen handelt es sich um eine Suspensionskultur feline Lymphoblasten, die mit dem FeLV-Stamm KT-FeLV-UCD-1 persistent infiziert ist (Theilen et al., 1969).

Bei den FE-Zellen handelt es sich um eine embryonale Zelllinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Werner Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen), die im Rahmen der Dissertation von Dirk Schwartz (Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) als verschiedene permanent FeLV-infizierte Zelllinien etabliert wurden. Dafür wurden FE-Zellen jeweils mit FeLV-A (Glasgow-1 (Donahue et al., 1988)), FeLV-B (Gardner-Arnstein (Wunsch et al., 1983)) oder FeLV-C (C-Sarma (Riedel et al., 1986)) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. O. Jarrett, Department of Veterinary Pathology, University of Glasgow, UK) infiziert und weiter kultiviert.

Mit Hilfe der Zellpellets aus FL74-Zellen und FE+FeLV-A-, -B- und -C-Infektion wurden die Konzentrationen der Nachweis-Sonden gp70-A, gp70-B, gp70-C, gp70-ges., p27, p15E und U3 (s. Tabelle 3.1.10) in der in situ-Hybridisierung so eingestellt, dass ein optimale Intensität des zellassozierten ISH-Signals ohne unspezifisches Hintergrundsignal erreicht wurde. Für gp70-A, gp70-B, gp70-C und gp70-ges. wurden identische Sondenkonzentrationen in den Hybridisierungsmix eingesetzt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Insbesondere die verschiedenen Sonden für gp70 wurden getrennt an den Pellets von FE+FeLV-A-, -B-, -C-Zellen in jeweils dem gleichen Reaktionsansatz getestet.

Als Negativkontrollen wurden jeweils Folgeschnitte der Zellpellets mit den entsprechenden Kontroll-Sonden (s. Tabelle 3.1.10) sowie ein Schnitt ohne Sondenzusatz zum Hybridisierungsmix inkubiert.

Die Immunhistologie wurde gemäß den Angaben unter 3.1.4 mit einem Gemisch aus Antikörpern gegen die Proteine gp70 und p27 an Pellets von FE+FeLV-A, -B, und -C sowie Pellets von FL74-Zellen vorgenommen, um den Nachweis von Virus-Proteinen an den Kulturzellen zu überprüfen. Die FL74-Zellen wurden zusätzlich als Positivkontrolle für den Antigennachweis bei der ISH/IH-Doppelmarkierung verwendet (s. 3.1.5).

3.1.1.2 Kultivierung von FeLV infizierten FL74- und FE-Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen (IWAKI, Dunn Labortechnik GmbH; Asbach). Als Nährmedium für die Proliferationsphase wurde RPMI-Medium (RPMI 1640:90%, PAA-Laboratories GmbH, Cölbe), dem 9% fetales Kälberserum (FKS; PAA Laboratories) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S; PAA-Laboratories) zugesetzt wurden, verwendet. Als Kulturmedium für die Spülung von Monolayern (Spülmedium) diente RPMI 1640:99% mit 1% P/S (FKS-freies Medium).

Die Inkubation der Kulturen wurde im Brutschrank („Function Line“, Heraeus-Instruments GmbH, Habenu) bei 37°C in einem Luft/CO₂-(95% / 5%)-Gemisch vorgenommen.

Kultivierung von Suspensionskulturen (FL74)

Die FL74-Zellsuspension wurde nach jeweils drei Tagen Inkubation im Brutschrank in Zentrifugengläser überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 350 x g wurde der zellfreie Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden in 2 ml Nährmedium resuspendiert. Durch Aliquotieren und Überführen in weitere Kulturflaschen mit frischem Nährmedium (8 ml) wurden mehrere Suspensionskulturen hergestellt. Aus diesen Kulturen wurden nach wiederum drei Tagen Zellpellets hergestellt (s. 3.1.1.3, 3.1.1.4), die zur Etablierung der ISH und als Positivkontrolle für die ISH und die IH verwendet wurden.

Kultivierung von adhärennten Kulturen (FE+FeLV-A, -B und -C,)

Die adhärent wachsenden Zellen wurden zweimal im Abstand von drei Tagen nach Absaugen des zellfreien Überstandes und nach zweimaligem Waschen mit 2 ml FKS-freiem Medium mit 10-15 ml frischem Nährmedium überschichtet.

Nach Bildung eines geschlossenen Zellrasens auf dem Flaschenboden wurden die Zellen passagiert, aliquotiert und auf weitere Kulturflaschen verteilt.

Zur Ablösung der Zellen wurde zunächst das verbrauchte Nährmedium aus den Kulturflaschen entfernt und diese zweimal mit 2 ml FKS-freiem Medium gespült. Nach Zugabe von 5 ml Na-EDTA Trypsin (ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA) wurden die Kulturflaschen im Brutschrank (37°C, Luft/CO₂-(95% / 5%)-Gemisch) für 5-10 min bis zur vollständigen Ablösung der Zellen inkubiert.

Die Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung in frischem Nährmedium oder zur Herstellung von Zellpellets verwendet (s. 3.1.1.3, 3.1.1.4).

3.1.1.3 Herstellung von Zellpellets

Die Herstellung von Zellpellets erfolgte mit FeLV-infizierten FL74- und FE-Zellen (s. 3.1.1.1).

Die Zellsuspensionen aus den Kulturflaschen wurden in 14 ml Glaszentrifugenröhrchen überführt und die Flaschen mit 2 ml FKS-freiem Medium gespült.

Nach Zentrifugation für 5 min bei 350 x g wurde der zellfreie Überstand abgesaugt. Pellets aus FE-Zellen wurden in 1 ml Spülmedium resuspendiert und direkt in 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße überführt. Das FL74-Zellpellet wurde dagegen zuvor noch einmal in 10 ml Spülmedium resuspendiert und bei 350 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Überführung in die Mikrozentrifugengefäße wie bei den FE Zellen.

Nach Zentrifugation für 10 min bei 720 x g wurde bei allen Zellen erneut der Überstand abgesaugt und die Zellen wie oben beschrieben resuspendiert, zentrifugiert und das Spülmedium entfernt.

3.1.1.4 Formalinfixierung und Einbettung

Die Zellpellets wurden in 4 ml gepuffertem Formaldehyd (4% Paraformaldehyd; s. Anhang) resuspendiert, für 10 min bei 720 x g zentrifugiert und nach Absaugen des zellfreien Überstandes mit 4 ml gepuffertem Formaldehyd überschichtet. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei 4°C für 16-18h.

Anschließend wurde die Formalin-Lösung vorsichtig abgesaugt und die Pellets wurden in den Spitzen der Mikrozentrifugengefäße in Einbettkapseln (Tissue Tek III® Biopsy Cassette 4172; Miles Scientific, Naperville, USA) überführt. Die Dehydrierung und Einbettung in Paraffin erfolgte nach Standardmethoden in einem Einbettautomaten (VIP Tissue Tek®,

Vogel GmbH&Co). Die eingebetteten Pellets wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert.

3.1.2 FeLV-infizierte Katzen, Organe und Gewebe

Die in situ-Hybridisierung wurde an Milz, Leber, Mesenteriallymphknoten, Dünndarm und Knochenmark von 25 experimentell mit FeLV infizierten Katzen durchgeführt. Die Organe der Katzen stammten aus einem Infektionsversuch, der im Rahmen der Dissertation von Nadja S. Ruckstuhl am Departement für Innere Veterinärmedizin der Universität Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. H. Lutz durchgeführt wurde (Ruckstuhl, 2000). Die Organe wurden mit freundlicher Genehmigung für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Die Gewebe der infizierten Katzen wurden jeweils in einem Versuchsansatz pro Tier mit den Nachweis- und Kontroll-Sonden gp70-B + gp70-ges., p27, p15E und U3 durch ISH (s. 3.1.3.2) auf das Vorhandensein von viraler mRNA untersucht. Gp70-B und gp70-ges. wurden als Gemisch verwendet, um eine höhere Sensitivität des Signals zu erreichen. Auf eine Differenzierung zwischen gp70-A, gp70-B und gp70-C wurde verzichtet, weil sowohl an den Zellpellets (3.2.1) als auch an inkubierten Geweben der Versuchskatzen keine Unterschiede zwischen den Sonden gp70-A, gp70-B, gp70-C und gp70-ges. im Bezug auf die Verteilung und die Art positiv reagierender Zellen festzustellen waren.

Als Positivkontrollen wurden bei jedem Versuchsansatz FL74-Zellen für die oben aufgeführten Sondenkombinationen verwendet (s. oben). Außerdem wurde jeweils einmal das Gewebe ohne Sondenzugabe zum Hybridisierungsmix inkubiert.

Für die ISH/IH-Doppelmarkierung (s. 3.1.5) wurden an Hand der Ergebnisse der in situ-Hybridisierung 11 Katzen ausgewählt (Nr.: 157, 160, 162, 163, 164, 166, 167, 171, 175, 204, 232), bei denen in Lymphknoten und Milz zahlreich positive Zellen in den Follikeln vorhanden waren. Durch die Doppelmarkierung sollte insbesondere untersucht werden, ob und in welcher Menge follikuläre dendritische Zellen (FDZ) in Milz und Mesenteriallymphknoten beim viralen FeLV-RNA-Nachweis positiv reagieren, und inwiefern Antigen durch die Immunhistologie parallel nachgewiesen werden kann.

Dabei wurde neben den doppelt inkubierten Schnitten jeweils bei einem Gewebeschnitt nur die ISH (s. 3.1.3.2) mit dem Sondenmix aus gp70-B, gp70-ges. und p27 vorgenommen. Jeweils ein Schnitt wurde nur immunhistologisch (s. 3.1.4) mit dem Antikörpergemisch gp70 und p27 auf das Vorhandensein von Virus-Antigen untersucht. Die Negativ- und Positiv-Kontrollen wurden dabei analog den oben stehenden Angaben für die ISH und IH getrennt inkubiert.

Die folgenden Angaben über die Durchführung des Infektionsversuches sind der Dissertationsschrift von Ruckstuhl entnommen (Ruckstuhl, 2000), die diesen Versuch in Zürich durchführte und uns das Material zur Verfügung stellte.

Die Tiere wurden im Alter von 8 resp. 9 Wochen mit 300 000 FFU (focus forming units) FeLV Glasgow A durch intraperitoneale Injektion infiziert. Während der 16 Wochen dauernden Infektionsperiode wurde den Katzen in der 1. bis 10., 12., 14. und 16. Woche je einmal Blut entnommen. In der 16. Woche wurden die Katzen getötet und Organ- sowie Gewebe-Proben unmittelbar in gepuffertem 4% Paraformaldehyd für 10-12 h fixiert. Milz, Leber, Mesenteriallymphknoten, Dünndarm und Knochenmark wurden anschließend jeweils zusammen in einer Einbettkapsel routinemäßig in Paraffin eingebettet.

Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bis zur Verwendung bei 8°C.

Die Blutproben wurden an der Universität Zürich (Ruckstuhl, 2000) mittels ELISA auf Antikörper gegen FeLV-p27 und mittels quantitativer PCR (TaqMan®) auf Provirus in Blutzellen getestet. Außerdem wurden post mortem Leber, Milz, Niere, Knochenmark und verschiedene Lymphknoten mittels quantitativer PCR auf FeLV-Provirus untersucht.

Dabei war in allen untersuchten Organen und bei allen Katzen nach der Sektion Provirus nachweisbar.

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen sind den Tabellen im Anhang (8.1) zu entnehmen (Ruckstuhl, 2000).

3.1.3 RNA-in situ-Hybridisierung

3.1.3.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden diente zelluläre RNA (cRNA) aus den unter 3.1.1.1 beschriebenen FL74- und FE-Zellen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte analog den Angaben unter 3.1.1.2.

Zur RNA-Extraktion wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

Anschließend wurde die cRNA durch reverse Transkription (RT) in DNA umgeschrieben und verbleibende RNA durch RNase Behandlung entfernt.

Die DNA von FeLV-infizierten FL74-Zellen und FE-Zellen infiziert mit FeLV-A, -B und -C wurden im Rahmen der Dissertation von Dirk Schwartz wie oben beschrieben gewonnen und freundlicherweise für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

PCR zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente

Zur Amplifikation von Genomabschnitten von U3-LTR (long terminal repeats), p27 und p15E wurde DNA der FL 74-Zellen verwendet.

Im Bereich des Gens für gp70 wurden zwei verschiedene Abschnitte mit den Primerpaaren gp70/1 und gp70/2 detektiert (Tabelle 3.1.1). Der größere Abschnitt (gp70/1) stellt einen Bereich des Gens dar, in dem die Homologie der Basensequenz der Subtypen A, B und C des FeLV möglichst gering ist. Die Subtypen A und C sind im detektierten Bereich im Vergleich zu B um 36 Basenpaare kürzer. Zusätzlich unterscheidet sich die Sequenz von A/C im Vergleich zu B in 28 Basenpaaren. Daraus ergibt sich eine errechnete Homologie zwischen A/C und B von 79,8%. Die Homologie zwischen A und B beträgt im detektierten Bereich 89,2%.

In dem Genomabschnitt, der durch die Primerpaare gp70/2 detektiert wird, beträgt die Homologie zwischen den Subtypen A, B und C 92,1%. Mit der Wahl der unterschiedlichen Primer für das gp70-Gen sollte an FE-Zellen untersucht werden, ob in der ISH eine Unterscheidung der Subtypen FeLV-A, -B und -C möglich ist.

Gp70-A, -B und -C wurde jeweils aus FE-Zellen infiziert mit FeLV-A, -B oder -C mit dem Primerpaar gp70/1 (Tabelle 3.1.1) amplifiziert. Die Primer gp70/2 (Tabelle 3.1.1) wurden bei FeLV-A-infizierten FE-Zellen angewendet.

Zur besseren Übersicht werden im Folgenden die Amplifikate des Primerpaares gp70/1 als

gp70-A, gp70-B und gp70-C bezeichnet, die des Primerpaares gp70/2 als gp70-ges. (gp70 gesamt).

Primersysteme

Die Etablierung der Primersysteme sowie deren Einsatz zur Amplifizierung spezifischer Genomabschnitte von FeLV mittels PCR wurden im Rahmen der Dissertation von Dirk Schwarz (2001) vorgenommen.

Die Primersequenzen wurden freundlicherweise für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1.1: Primersysteme

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge (Basen)	Gen; Lokalisation im Genom (Länge des Amplifikats)
U3-LTR upper	CTT GAG GCC AAG AAC AGT TA	20	LTR; 5': 147-250 (104), 3': 8105-8208 (104)
U3-LTR lower	AGG TCG AAC TCT GGT CAA CT	20	
p27 upper	TAC GCC TTT ATC GCC AGT TG	20	gag; 1840-2181 (342)
p27 lower	ATC TTT CTT CCC TTT CCT CTG G	22	
gp70/1 upper	TAT ACC GTI CAG GAT AIG ACC	21	env; 6612-6952 (A, C: 305) (B: 341)
gp70/1 lower	CAA CAG TCI TTA GTT ITG TTG G	22	
gp70/2 upper	AGG GAT TGC AAT CTT AGG TA	20	env; 6950-7168 (219)
gp70/2 lower	TTA CAG GCC CAA TAG GTG	18	
p15E upper	ATT IAG AGA IAG GIT AAA ACA GC	23	env; 7642-7780 (139)
p15E lower	ATT AGG AGI AGG ATI AIT AAG	22	

LTR: long terminal repeats
gag: group specific antigen
env: envelope

Die zur Konstruktion des U3-LTR-Primersystems verwendete Gensequenz von FeLV-A/Glasgow-1 (Glas1) wurde der Veröffentlichung von Fulton et al. (1990) entnommen (NCBI Accession-Nr. M1824).

Grundlage der p27-, gp70- und p15E-Primersysteme sind die FeLV-Gensequenzen aus der Veröffentlichung von Donahue et al. (1988) (NCBI Accession-Nr. M18247).

PCR-Bedingungen

Die Komponenten wurden in der tabellarisch aufgelisteten Reihenfolge pipettiert (s. Tabelle 3.1.2). Zur Kühlung der Proben (1°C) während der einzelnen Pipettierschritte sowie zur Durchführung der Inkubationsschritte der PCR wurde der Multicycler PTC 200 DNA Engine (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) verwendet.

Tabelle 3.1.2: PCR-Ansatz

Komponente (Konzentration der Stammlösung)	im PCR-Ansatz eingesetztes Volumen	Endkonzentration in 50 µl Gesamtansatz	Hersteller [Bestell-Nummer]
GeneAmp® 10 x PCR-Puffer II	5,0 µl	Komponenten s. Anhang	Applied Biosystems (USA), in [N801-0161] enthalten
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 µl	1,5 mM	Applied Biosystems (USA), in [N801-0161] enthalten
dNTP-Stammlösung je (10 mM)	4,0 µl	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1:1:1:1); je 0,8 mM	Promega (Mannheim) [U1330]
Ampli-Taq® DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	1,25 U/50 µl	Applied Biosystems (USA)[N801-0161]
DEPC-Wasser (s. Anhang)	29,75 µl		s. Anhang
Primer-Mix, aus je (25 pm/µl) Upper- und Lower-Primer (s. Tabelle 3.1.1)	4,0 µl	je 2,0 pM	MWG-Biotech AG (Ebersberg)
cDNA-Probe (Probe aus der RT-Reaktion) (25 pm/µl)	4,0 µl	2,0 pM	

PCR-Ablauf:

- 1) 2 min bei 94°C
- 2) 40 Zyklen: 1 min bei 94°C
 1 min bei X°C (Annealing-Temperatur, s. Tabelle 3.1.3)
 1 min bei 72°C
- 3) 5 min bei 72°C
- 4) 4°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler; Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung

Tabelle 3.1.3: Annealing-Temperaturen der Primersysteme

Primersystem	Annealing-Temperatur (Herstellerangaben, MWG-Biotech-AK)	gewählte Annealing-Temperatur
U3-LTR	51,9 °C	54,8 °C
p27	54,8 °C	
gp70/1, gp70/2	47,9 °C	46,6 °C
p15E	46,6 °C	

Detektion der PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf ihre vorausberechnete Längen mittels horizontaler Elektrophorese (Elektrophoresekammer, Keutz-Laborgeräte GBR, Reiskirchen) im TBE (Tris-Borat-EDTA) -Puffer-Bad in Ethidiumbromid-imprägnierten Agarose/TBE-Puffer-Gelen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überprüft. Dazu wurden 15 µl PCR-Produkt und 3 µl Elektrophorese-Farbstoff (6 x Gel Loading Dye; AB Gene[®], Epsom, UK) in die Slots eines im TBE-Puffer-Bad (1 x TBE, s. Anhang) gelagerten Geles pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V und 500 mA (Stromquelle: Consort E425; Consort nv, Turnhout, Belgien) für 30-40 min je nach Länge des PCR-Produktes (Sambrook et al., 1989). Der Einsatz einer DNA-Fragment-Leiter (100 bp pro Teilstrich; Superladder low, AB Gene[®], Epsom) diente als Referenzwert für die Längenabschätzung der Amplifikate. Die Visualisierung erfolgte durch UV-Transillumination bei 312 nm (UV-Transilluminator TF-20M; Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich) mit fotografischer Dokumentation mittels Polaroid 667 Tageslichtfilm (Kamera: Polaroid MP4 Land Camera 44-01; Polaroid Corp., Cambridge, Massachusetts, USA).

Extraktion und Aufreinigung der DNA aus Agarosegel

Die Insert-DNA für die Klonierung von U3-LTR, gp70, p15E und p27 wurde durch Präparation aus einem Agarosegel (s. vorheriger Abschnitt) mittels des NucleoSpin[®] Extract 2 in 1-Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren) gewonnen.

Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers:

- 1) Ausschneiden des Gelstückes mit dem gewünschten DNA-Fragment mittels eines sauberen Skalpell; Wiegen des Gelstücks; Überführen in 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß

- 2) Zugabe von je 300 µl Puffer NT1 pro 100 mg Agarosegel; Inkubation für 5-10 min bei 50°C (bis zur vollständigen Auflösung sämtlicher Gelstücke); Mischen (Vortexen) für 2-3 min
- 3) Einsetzen einer Nucleo Spin Extract Column in ein 2 ml Sammelröhrchen und Beladen mit der Probe; Zentrifugieren für 1 min bei 8000 x g; Entleeren des Sammelröhrchens
- 4) Zugabe von 600 µl NT3; Zentrifugieren für 1 min bei 11000 x g; Entleeren des Sammelröhrchens
- 5) Zugabe von 200 µl Puffer NT3; Zentrifugieren für 2 min bei 11000 x g zur Entfernung von NT3; Überführen der Nucleo Spin Extract Column in ein sauberes 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß; Zugabe von 50 µl Elutionspuffer NE (im Verhältnis 1:1 mit DEPC-Wasser (s. Anhang) verdünnt); Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur; Zentrifugieren für 1 min bei höchster Geschwindigkeit (15800 x g)

Klonierung

Zur Herstellung der RNA-Sonden für gp70-ges. und p15E wurde lediglich die Ligation (TOPO[®] Vektor, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) vorgenommen. Anschließend wurden aus dem Plasmid mittels der Primerkombinationen M13 F (forward) und dem spezifischen revers-Primer, sowie M13 R (reverse) und dem forward-Primer jeweils der sense- und antisense-Strang getrennt abgelesen.

Für U3-LTR, p27, gp70-A, gp70-B und gp70-C wurde die im Folgenden beschriebene Klonierung vollständig durchgeführt.

Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] PCR[®] II-TOPO[®] Kit (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) verwendet (enthaltene Reagentien siehe Anhang).

Herstellung von LB (Luria-Bertani)-Medium und Platten

Tabelle 3.1.4: Zusammensetzung des LB-Mediums

Komponente	Konzentration	Hersteller [Bestell-Nummer]
Pepton von Casein	1%	Serva, Boehringer Ingelheim, Bioprodukt Partnership, Heidelberg [48600]
Hefeextrakt	0,5%	Serva [24540]
NaCl	1%	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt [1.06404.1000]

- Herstellung des LB-Mediums:

- 1) für 1 l Medium 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 800 ml Aqua dest. auflösen; pH-Wert mit 5% NaOH auf 7,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
- 2) Autoklavieren für 20 min bei 121°C; nach Abkühlen der Lösung auf 55°C Zugabe von 60 mg Ampicillin (Sigma) gelöst in 1,5 ml Aqua dest.; Lagerung bei +4°C

- Herstellung der LB-Agar-Platten

- 1) LB Medium herstellen (s.o.), Zugabe von 15 g/l Agar (DIFCO-Laboratories, Detroit, USA), Autoklavieren für 20 min bei 121°C, Lösung auf 55°C abkühlen lassen; Zugabe von 60 mg Ampicillin (s.o.); 10 mm dicke Platten (Durchmesser 10 cm) gießen und aushärten lassen; Umdrehen; Lagerung bei +4°C im Dunkeln

- Herstellung der X-Gal Stammlösung (40 mg/ml)

- 1) 40 mg X-Gal (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) in 1 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auflösen; vor Licht geschützt bei -20°C lagern

- Zugabe von X-Gal zu LB-Agar-Platten

- 1) LB-Agar-Platten auf 37°C erwärmen; 40 µl X-Gal Stammlösung (40 mg/ml) durch Aussparteln gleichmäßig auf der Platte verteilen und für 15 min bei RT trocknen; lichtgeschützt bis zur Verwendung bei 37°C lagern

- Vorbereitung für die Transformation

- 1) SOC-Medium aus dem Kit (s.o.) auf Raumtemperatur bringen
- 2) LB-Agar-Platten für 30 min bei 37°C erwärmen
- 3) Zugabe von X-Gal zu LB-Agar-Platten (s.o.) und Lagerung der Platten bei 37°C bis zum Gebrauch
- 4) Lagerung einer Portion One Shot[®] Chemically Competent E. coli-Zellen aus dem Kit (s.o.) für jede Transformation auf Eis bis zum Gebrauch

Ligation

Tabelle 3.1.5: Vorbereitung der Reaktionsansätze

Komponenten	Ansatz 1	Ansatz 2
frisches PCR-Produkt	0,5 µl	4,0 µl
NaCl-Lösung (1,2 M)	1,0 µl	1,0 µl
steriles Wasser	3,5 µl	-
TOPO [®] Vektor (Kit, s.o.)	1,0 µl	1,0 µl

- 1) Reaktionsansatz vorsichtig mixen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren; Probe auf Eis lagern

Transformation

- 1) 2 µl von der jeweiligen TOPO[®] Klonierungs-Reaktion in je ein Fläschchen One Shot[®] Chemically Competent E.coli geben und vorsichtig durch Umdrehen mischen; Inkubation für 30 min auf Eis
- 2) Inkubation der Bakterien für 30 sec bei 42°C im Wasserbad (Hitzeschock); sofortiges Überführen der Röhren auf Eis
- 3) Zugabe von 250 µl SOC Medium (Zusammensetzung s. Anhang) je Röhren; Inkubation bei 37°C für 1 h (horizontal liegend, geschüttelt bei 200 rpm (SM 25 Schüttler; Edmund Bühler Laborgerätebau, Glastechnik, Umwelttechnik, Tübingen))
- 4) Herstellung von Verdünnungsreihen: je Klonierungs-Reaktion folgende Mengen auf 4 vorgewärmte X-Gal-imprägnierte LB Platten ausspateln:

Tabelle 3.1.6: Verdünnungen je Platte

Komponenten	Platte 1	Platte 2	Platte 3	Platte 4
Transformationsprodukt	10 µl	25 µl	50 µl	Rest
SOC Medium	40 µl	25 µl	-	-

Inkubation für 15-18 h bei 37°C im Wärmeschrank (GFL, Burgwedel)

- 5) Aufnehmen von 5 weißen Einzelkolonien und Applikation in einzelne 14 ml-Glasröhrchen mit Gummistopfen mit flüssigem LB-Medium mit Ampicillin (s.o.); Kultivierung für 15-18 h bei 37°C im Schüttler

Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels des NUCLEOBOND[®] Kit PC 20 (Macherey-Nagel).

- 1) Zentrifugieren der Bakterienkulturen bei 3000 x g für 10 min; Resuspension des Zellpellets in 0,6 ml Puffer S1 (s. Anhang)
- 2) Zugabe von 0,6 ml Puffer S2 (s. Anhang); Mischen der Suspension durch sofortiges, 6-8 maliges Umdrehen der Röhrchen; Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (Zellaufspaltung)
- 3) Zugabe von 0,6 ml Puffer S3 (s. Anhang); Mischen der Suspension durch sofortiges, 6-8 maliges Umdrehen der Röhrchen bis zum Entstehen einer homogenen Suspension; Inkubation für 5 min auf Eis (Fällen der chromosomalen DNA)
- 4) Zentrifugieren für 15 min bei 12000 x g; vorsichtiges Abnehmen des klaren Überstands direkt vom weißen Präzipitat (Klären des Bakterienlysats)
- 5) Äquilibrierung der NUCLEOBOND[®]AX Cartridge (Patrone) mit 1 ml Puffer N2 (s. Anhang)
- 6) Pipettieren des Überstands aus 4) (Bakterienlysats) auf äquilibrierte NUCLEOBOND[®]AX Cartridge (Adsorption)
- 7) Waschen der NUCLEOBOND[®]AX Cartridge mit 3 x 1 ml Puffer N3 (s. Anhang)
- 8) Einsetzen der NUCLEOBOND[®]AX Cartridge in ein neues 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß und Pipettieren von 0,8 ml Puffer N5 (s. Anhang) auf die NUCLEOBOND[®]AX Cartridge, Auffangen des Eluats im 1,5 ml-Mikrozentrifugengefäß (Elution der Plasmid-DNA)
- 9) Präzipitieren der gereinigten Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,6 ml raumtemperiertem Isopropanol (2-Propanol; 8067, J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande); sofortiges Zentrifugieren für 30 min bei 15000 x g
- 10) Waschen der DNA mit 0,6 ml auf +4°C gekühltem 70% Ethanol; Zentrifugieren für 10 min bei 15000 x g; Trocknen für 5 min bei Raumtemperatur; Aufnahme des DNA-Pellets in 40 µl Aqua dest.; Mischen durch Ansnippen des Tubes mit dem Finger; Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur; kurzes Zentrifugieren; Bestimmung des

DNA-Gehaltes mit dem Photometer (UV-1202 UV-VIS Spectrophotometer; Shimadzu, Frankfurt)

Von den 5 weißen Einzelkolonien wurde jeweils die mit der höchsten DNA-Konzentration nach Präparation der Plasmid-DNA ausgewählt. Die Meßwerte sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 3.1.7: Meßwerte

Plasmid	Konzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A1 (260 nm)	A2 (280 nm)	A1/A2
U3-LTR	1,341	0,051	0,031	1,645
p27	1,423	0,068	0,039	1,763
gp70-A	1,149	0,029	0,018	1,647
gp70-B	2,047	0,05	0,029	1,778
gp70-C	1,033	0,027	0,017	1,667

A: Absorption

PCR zur Analyse der selektierten Klone

Die Bestätigung des Insert-Einbaus und die Überprüfung der Einbaurichtung in den Plasmidvektor wurde mittels PCR vorgenommen. Dabei wurden jeweils der upper- und lower-Primer von U3-LTR, p27, gp70-A, gp70-B und gp70-C (Tabelle 3.1.1) mit den Universalprimern M13(-20) Forward und M13 Reverse (TOPO TA Cloning[®] pCR[®] II-TOPO[®] Kit) kombiniert. Die Ergebnisse der PCR bei den verschiedenen Primer-Kombinationen sind in Tabelle 3.1.9 aufgelistet.

Die aufgereinigten Plasmide wurden in einer Verdünnung von $1/10^6$ in die PCR eingesetzt. Die Annealing-Temperaturen und der PCR-Ablauf entsprechen den oben genannten Angaben. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel überprüft.

Tabelle 3.1.8: PCR-Ansatz zum Austesten der Einbaurichtung

Komponente (Konzentration der Stammlösung)	im PCR- Ansatz eingesetztes Volumen	Endkonzentration in 50 μ l Gesamtansatz	Hersteller [Bestell-Nummer]
GeneAmp [®] 10 x PCR- Buffer II	5,0 μ l	Komponenten s. Anhang	Applied Biosystems (USA), in [N801- 0161] enthalten
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 μ l	1,5 mM	Applied Biosystems (USA), in [N801- 0161] enthalten
dNTP-Stammlösung je (10 mM)	4,0 μ l	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1:1:1:1); je 0,8 mM	Promega (Mannheim) [U1330]
Ampli-Taq [®] DNA- Polymerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l	1,25 U	Applied Biosystems (USA)[N801-0161]
DEPC-Wasser (s. Anhang)	29,75 μ l		s. Anhang
Primer, aus je (25 pm/ μ l) s. Tabelle 3.1.9	2+2 μ l	je 2,0 pM	MWG-Biotech AG (Ebersberg)
Plasmid-DNA verd. auf 25 pm/ μ l	4,0 μ l	2,0 pM	

Tabelle 3.1.9: Ergebnisse der Primerkombinationen

Plasmid	M13F/upper	M13F/lower	M13R/upper	M13R/lower
U3-LTR	-	+	+	-
p27	+	-	-	+
gp70-A	+	-	-	+
gp70-B	+	-	-	+
gp70-C	+	-	-	+

+ : deutliche Bande im Agarosegel

- : keine Bande im Agarosegel

PCR zur Amplifikation von p15E und gp70-ges. aus den Plasmidvektoren

Zur Amplifikation des sense-Stranges aus dem Plasmidvektor wurde jeweils die Primerkombinationen lower/M13 R, für den antisense-Strang die Kombination upper/M13F verwendet. Der PCR-Ansatz erfolgte gemäß den Angaben in Tabelle 3.1.8. Die verwendeten Annealing-Temperaturen sind Tabelle 3.1.3 zu entnehmen.

In die PCR wurden jeweils 4 μ l des Ligationsansatzes aus Tabelle 3.1.5 in einer Verdünnung von 1/10 in Aqua bidest. eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel überprüft.

Extraktion und Aufreinigung der PCR-Produkte

Die in Tabelle 3.1.9 mit „+“ gekennzeichneten Banden sowie die Amplifikate von p15E und gp70-ges. wurden aus den Agarosegelen ausgeschnitten und die DNA extrahiert.

Die Sequenz der extrahierten DNA wurde durch Sequenzierung bei der Firma SEQLAB (Göttingen) überprüft (Sequenzierungsergebnisse s. Anhang 8.4).

Die DNA wurde entweder direkt in die *in vitro*-Transkription und die Digoxigenierungs(DIG)-Reaktion eingesetzt oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

In vitro-Transkription und Digoxigenin-Markierung

Um DIG-gelabelte RNA-Sonden herzustellen, wurde die Transkription mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Im Plasmidvektor befinden sich flankierend zum Insert Bindungsstellen für die Universal-Primer SP6 und T7. Da die RNA-Polymerasen an diesen Bindungsstellen mit der Transskription beginnen, ist die DIG gelabelte RNA um 80 (SP6) beziehungsweise 68 (T7) Basen länger als die Insert-DNA. Der zur zellulären mRNA (positive Polarität) komplementäre Negativstrang wird im Weiteren als Nachweis-Sonde, der nicht komplementäre Strang (identische Polarität zur zellulären mRNA) als Kontroll-Sonde bezeichnet.

Daraus ergeben sich folgende Primer-Kombinationen, Sondenbezeichnungen und Sondenlängen:

Tabelle 3.1.10: ISH-Sonden

Sondenbezeichnung	Primer-kombination	RNA-Polymerase	Sondenlänge (DIG-RNA)
U3-LTR Nachweis-Sonde	upper/M13 R	SP6	184 Basen
U3-LTR Kontroll-Sonde	lower/M13 F	T7	172 Basen
p27 Nachweis-Sonde	upper/M13 F	T7	410 Basen
p27 Kontroll-Sonde	lower/M13 R	SP6	422 Basen
gp70-A Nachweis-Sonde	upper/M13 F	T7	373 Basen
gp70-A Kontroll-Sonde	lower/M13 R	SP6	385 Basen
gp70-B Nachweis-Sonde	upper/M13 F	T7	409 Basen
gp70-B Kontroll-Sonde	lower/M13 R	SP6	421 Basen
gp70-C Nachweis-Sonde	upper/M13 F	T7	373 Basen
gp70-C Kontroll-Sonde	lower/M13 R	SP6	385 Basen
gp70-ges. Nachweis-Sonde	upper/M13 F	T7	287 Basen
gp70-ges. Kontroll-Sonde	lower/M13 R	SP6	299 Basen
p15E Nachweis-Sonde	upper/M13 F	T7	207 Basen
p15E Kontroll-Sonde	lower/M13 R	SP6	219 Basen

Die Markierung erfolgte nach Angaben des Herstellers

- 1) Pipettieren von 0,1 µg Template-DNA in steriles, RNase-freies Reaktionsgefäß;
Auffüllen mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 13 µl
- 2) Zusammenpipettieren der folgenden Reagenzien

Tabelle 3.1.11: Zusammensetzung des RT-Ansatzes

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen
10 x NTP labeling mixture	je 10 mM ATP, CTP, GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11- UPT (pH 7,5 (20°C))	2 µl
10 x Transcription buffer	Komponenten s. Anhang	2 µl
RNase Inhibitor	20 U/µl	1 µl
RNA Polymerase SP6 oder T7	20 U/µl	2 µl

- 3) Mischen; Zentrifugieren für 10 Sekunden bei 5000 x g; Inkubation für 2 h bei 37°C
- 4) Zugabe von 2 µl DNase I [10 U/µl], RNase-frei, zur Entfernung der Template-DNA;
Inkubation für 15 min bei 37°C
- 5) Stop der Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0; s. Anhang)

Ethanol-Präzipitation

Zugabe zum RT-Produkt: 2,5 µl (4 M) LiCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zur Stabilisierung der Nukleinsäurestruktur und 75 µl gekühltem (-20°C) 100% Ethanol (Carl Roth GmbH & Co); gut mischen

- 1) Präzipitieren durch Lagerung bei -20°C für 15-18 h; Zentrifugieren bei 13000 x g für 15 min
- 2) Verwerfen des Überstandes; Waschen des Pellets mit 50 µl eiskaltem 70% Ethanol;
Zentrifugieren bei 13000 x g für 5 min
- 3) Verwerfen des Überstandes; Trocknen des Pellets und Auflösen in 100 µl DEPC-Wasser (s. Anhang) durch Inkubation für 30 min bei 37°C
- 4) Aliquotieren zu je 10 µl und bei -70°C einfrieren;

3.1.3.2 Durchführung der RNA-in situ-Hybridisierung (RNA-ISH)

Die RNA-in situ-Hybridisierung (RNA-ISH) erfolgte gemäß veröffentlichten Protokollen (Zurbriggen et al., 1993a; Gaedke et al., 1997; Nesseler et al., 1997). Zum Austesten der Sonden wurden persistent FeLV-infizierte FL74-Zellen (Theilen et al., 1969) sowie FeLV-A-, -B-, -C-infizierte FE-Zellen verwendet (s. 3.1.1.1). Von den Zellpellets sowie von allen in Paraffin eingebetteten Geweben wurden circa 5 µm dicke Schnitte hergestellt (Mikrotom HM 335E, Microm GmbH, Walldorf), auf Objektträger aufgezogen (SuperFrost® Plus, Menzelgläser, Braunschweig) und für 12 h bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte bis zur weiteren Verarbeitung für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert.

Pro Versuchsansatz wurden bis zu 16 Objektträger gleichzeitig inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass für einen Vergleich relevante Gewebe oder Sonden im gleichen Reaktionsansatz inkubiert wurden.

Als Positivkontrolle für den Ablauf der ISH wurden bei jeder Inkubation FL74-Zellen verwendet. Gewebeschnitte, die mit den jeweiligen Kontroll-Sonden (Tabelle 3.1.10) oder ohne jegliche Sonde im Hybridisierungs-Mix inkubiert wurden, dienten als Negativkontrollen. Die Inkubationen erfolgten in sterilisierten Glasstandküvetten, die nach jedem Schritt ausgeleert wurden. Desweiteren wurden autoklavierte Plastik-Einmalpipettenspitzen (RNase-frei, DNase-frei; Biozym, Hess. Oldendorf) sowie sterilisierte Glas-Messzylinder und Magnetrührer verwandt. Abgesehen von Puffer 3 (s. Anhang 8.3.3) und 1 x PBS-5mM MgCl₂ (s. Anhang 8.3.3), die frisch hergestellt wurden, sowie 4 %iges Paraformaldehyd (s. Anhang 8.3.3), wurden sämtliche Lösungen autoklaviert. Die Lösungen wurden vor ihrem Einsatz im Wasserbad auf die entsprechende Temperatur vorgewärmt. Wenn nicht anders angegeben, ist von 50-60 ml Volumen der jeweiligen Flüssigkeit auszugehen, da dadurch eine vollständige Bedeckung der Schnitte in der Standküvette gewährleistet war.

Erster Tag:**Entparaffinierung**

- 1) 3 x 5 min Roti-Histol[®] (Carl Roth GmbH & Co KG)
- 2) 5 min Isopropanol
- 3) 5 min 96% Ethanol
- 4) 5 min 70% Ethanol
- 5) 5 min DEPC-Wasser
- 6) 1 min DEPC-Wasser
- 7) 5 min 1 x PBS (s. Anhang 8.3.3)

Proteolyse und Nachfixierung

- 1) Inkubation in 0,2 N HCl (s. Anhang 8.3.3) für 20 min bei RT
- 2) 2 x 30 min Inkubation in 2 x SSC + 5 mM EDTA-Na₂ (s. Anhang 8.3.3) bei 50°C
- 3) Inkubation in Proteinase K-Lösung (frisch hergestellt, s. Tabelle 3.1.12) für 15 min bei 37°C

Tabelle 3.1.12: Proteinase-K-Lösung

Komponente	Konzentration	Menge
Tris-HCl (pH 8,0)	1 M (s. Anhang)	1 ml
CaCl ₂	0,1 M (s. Anhang)	1 ml
Proteinase K	Stocklösung: 15,6 mg/ml (s. Anhang)	1 µl
DEPC-Wasser (s. Anhang)		ad 60 ml

- 4) Inkubation in 0,2% Glycin gelöst in 1 x PBS (s. Anhang 8.3.3) für 5 min bei RT
- 5) Inkubation in 4% Paraformaldehyd (s. Anhang 8.3.3) für 4 min bei RT
- 6) 2 x 1 min Inkubation in 1 x PBS (s. Anhang 8.3.3) bei RT
- 7) Inkubation in 1 x PBS mit 5 mM MgCl₂ (s. Anhang 8.3.3) für 15 min bei RT

Acetylierung

- 1) Inkubation für 10 min bei RT in 0,25% Acetanhydrid mit 0,1 M Triethanolamin gelöst in DEPC-Wasser (pH 7,5; s. Anhang 8.3.3)
- 2) 2 x 1 min Inkubation in 1 x PBS (s. Anhang 8.3.3) bei RT

- 3) Inkubation in 1 x PBS für 15 min bei RT

Prähybridisierung

- 1) Vorwärmen des Prähybridisierungspuffers (PHB-Mix; s. Anhang 8.3.3) im Wasserbad auf 52°C
- 2) Zugabe von ssDNA und RNA (s. Tabelle 3.1.13) direkt vor der Inkubation

Tabelle 3.1.13: Zusätze zum PHB-Mix

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Menge	Besonderheiten
ssDNA	10 mg/ml (s. Anhang)	100 µg/ml	0,5 ml	5 min kochen, dann auf Eis kühlen
RNA	10 mg/ml (s. Anhang)	244 µg/ml	1,25 ml	

- 3) Inkubation für mind. 60 min bei 52°C

Hybridisierung

Den Hybridisierungs-Mix (HB-Mix; s. Tabelle 3.1.14) kurz vor Gebrauch frisch ansetzen

Tabelle 3.1.14: HB-Mix

Komponente	Stammlösung	Endkonz.	Menge	Besonderheiten
Hybridisierungspuffer-Aliquot (s. Anhang)			696 µl	
RNA	10 mg/ml (s. Anhang)	221 µg/ml	18 µl	
ssDNA	10 mg/ml (s. Anhang)	246 µg/ml	20 µl	5 min kochen, dann auf Eis
Dextransulfat	(s. Anhang 8.3.3)		80 µl	frisch ansetzen, lösen

Pro Gewebeschnitt wurden 50 µl HB-Mix und pro Zellpellet 25 µl HB-Mix verwendet. Entsprechend der Menge der in der jeweiligen Untersuchung inkubierten Gewebsschnitte wurden die RNA-Sonden zum HB-Mix getrennt hinzupipettiert. Die Menge der Sonde wurde an FeLV-infizierten FL74-Zellpellets sowie an Pellets von FE-Zellen infiziert mit FeLV-A, -B und -C ausgetestet (s. 3.1.2).

Tabelle 3.1.15: Menge zupipettierter Sonde

Sondenbezeichnung	Menge/50 µl HB-Mix
U3-LTR Nachweis-Sonde	2,0 µl
U3-LTR Kontroll-Sonde	2,0 µl
p27 Nachweis-Sonde	1,0 µl
p27 Kontroll-Sonde	1,0 µl
gp70-A Nachweis-Sonde	1,5 µl
gp70-A Kontroll-Sonde	1,5 µl
gp70-B Nachweis-Sonde	1,5 µl
gp70-B Kontroll-Sonde	1,5 µl
gp70-C Nachweis-Sonde	1,5 µl
gp70-C Kontroll-Sonde	1,5 µl
gp70-ges. Nachweis-Sonde	1,5 µl
gp70-ges. Kontroll-Sonde	1,5 µl
p15E Nachweis-Sonde	2,0 µl
p15E Kontroll-Sonde	2,0 µl

- 1) Objektträger nacheinander aus PHB-Mix herausholen; Trocknen des Objektträgers (Rückseite und um das Gewebe); vorsichtiges Auftragen von Hybridisierungs-Mix
- 2) zugeschnittenes Gelbond (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) mit hydrophober Seite langsam auf den Schnitt legen (Bildung von Luftblasen zwischen Gelbond und Objektträger vermeiden); Ränder um das Gelbond mit reichlich Fix-o-gum[®] (Marabuwerke GmbH & Co, Tamm) abdichten
- 3) Inkubation der Objektträger in feuchter Kammer für ca. 19 h bei 52°C

Zweiter Tag:

Posthybridisierungswaschung

- 1) vorsichtiges Abheben von Gelbond und Fix-o-gum[®] mit einer Pinzette und Abgießen der verbleibenden Lösung
- 2) Inkubation für 2 x 15 min bei 42°C in 6 x SSC mit 45% Formamid (frisch hergestellt; s. Anhang 8.3.3)
- 3) Inkubation für 2 x 5 min bei RT in 2 x SSC (s. Anhang 8.3.3)
- 4) Inkubation für 30 min bei 37°C in frisch hergestellter Lösung zur RNase-Behandlung (s. Anhang 8.3.3)
- 5) Inkubation für 2 x 5 min bei RT in 2 x SSC
- 6) Inkubation für 2 x 15 min bei 50°C in 0,2 x SSC (s. Anhang 8.3.3)

Färbung

- 1) Inkubation für 1 min bei RT in Puffer 1 (s. Anhang 8.3.3)
- 2) Inkubation für 30 min bei RT in RT-Blocking-Lösung (s. Anhang 8.3.3) (Äquibrierung)
- 3) Schnitte sorgfältig abtrocknen, mit DAKO-PEN (Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) ober- und unterhalb des Schnittes abdichten
- 4) Inkubation für 2 h bei RT in feuchter Kammer mit anti-DIG-Antikörper-AP-Lösung (ca. 200 µl je Schnitt; s. Anhang 8.3.3)
- 5) Inkubation für 2 x 15 min bei RT in Puffer 1 (in Standküvette)
- 6) Inkubation für 2 min bei RT in Puffer 3 (s. Anhang 8.3.3)
- 7) Inkubation im Dunkeln für 12-18 h bei RT in Substratlösung (s. Anhang 8.3.3)

Dritter Tag:**Abstoppreaktion**

- 1) Inkubation im Dunkeln für mindestens 10 min bis maximal 4 Stunden bei RT in Puffer 4 (s. Anhang 8.3.3)
- 2) Inkubation für mindestens 5 min bis maximal 1 Stunde bei Raumtemperatur in Aqua bidest.

Gegenfärbung

- 1) Gegenfärben für 8 sec bei Raumtemperatur in Papanicolaous Hämatoxylin (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; 1:20 in Aqua dest.)
- 2) Bläuen in Leitungswasser für 5 min
- 3) bis zum Eindecken in Aqua bidest. stellen; Eindecken per Hand mit Deckgläsern mit vorgewärmten Glycergel (Dako Diagnostika GmbH, Hamburg)

3.1.4 Immunhistologie (IH)

Für die immunhistologischen Untersuchungen (IH) wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte auf SuperFrost® Plus (Menzelgläser Braunschweig) Objektträger aufgezogen und anschließend für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Der Nachweis der FeLV-Antigene erfolgte durch die indirekte Peroxidase (IPO)-Technik (Bourne, 1983; Reinacher und Theilen, 1987). Dabei wurde ein Gemisch aus den Antikörpern gegen FeLV-gp70 und -p27 (siehe Tabelle 3.1.16) verwendet. Als Negativkontrolle wurde der Kontrollantikörper T1 (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-Bursa-Lymphozyten gerichtet; Hirschberger, 1987) verwendet, der an den Folgeschnitten inkubiert wurde.

Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Glasküvetten bei RT. Pro Küvette wurden 180 ml der entsprechenden Lösung verwendet, so dass die Schnitte vollständig bedeckt waren.

Tabelle 3.1.16 Verwendete Antikörper, Bezugsquellen und Vorbehandlung

Antikörper	Bezugsquelle	Methode
Maus α-gp70 (Klon C11D82i)	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, USA	1:1200 in TBS mit 20% SS IPO
Maus α-p27 (Klon PF12J-10A)	Custom Monoclonals Int.; Sacramento, USA	1:100 in TBS mit 20% SS IPO

SS: Schweineserum (Verdünnung in TBS)

IPO: indirekte Peroxidase-Technik

Erster Tag:

Entparaffinierung

- 1) 3 x 5 min Roti-Histol® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- 2) 2 x 3 min Isopropanol
- 3) 3 min 96 %iges Ethanol
- 4) 3 min 80 %iges Ethanol

Vorbehandlungen

Die Gewebe wurden zur Inaktivierung der endogenen Peroxidasen und zur Antigen-Demaskierung mit Methanol/H₂O₂ und Target Unmasking Fluid (TUF®; Kretech Diagnostics, Amsterdam) vorbehandelt.

- 1) Inkubation für 30 min in Methanol mit 0,5 % H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p.a.; 7210, E. Merck, Darmstadt)
- 2) Inkubation für 10 min in TBS (s. Anhang 8.3.4)
- 3) Inkubation für 15 min in vorgewärmtem TUF[®] (1:3 verdünnt in Aqua bidest.) bei 97°C
- 4) Schnitte für 15 min in TUF[®] bei RT abkühlen lassen
- 5) Waschen in TBS

Inkubation mit Primärantikörper

- 1) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates[™] (721100013; Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates[™] in die Halterung
- 2) Inkubation für 10 min mit unverdünntem Schweineserum
- 3) Übernacht-Inkubation mit Maus-Anti FeLV gp70 (1:1200 in TBS) und p27 (1:100 in TBS) oder des Kontrollantikörpers T1 in gleicher Verdünnung wie der Primärantikörper (p27; 1/100; Negativkontrollschnitt) bei 4°C

Zweiter Tag:

Inkubation mit Sekunderantikörper

- 1) Waschen 3 x 5 min in TBS
- 2) Inkubation für 30 min mit Kaninchen anti-Maus IgG-PO (Dako Diagnostika GmbH; Hamburg, Germany (P0161)), verdünnt 1/100 in TBS mit 20% Schweineserum
- 3) Waschen 3 x 5 min in TBS

Färbereaktion

- 1) Entnahme der Schnitte aus Coverplates[™] und überführen in Glasküvette
- 2) Inkubation für 10 min unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in frisch angesetztem und filtriertem 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01% H₂O₂ in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; s. Anhang 8.3.4)
- 3) Waschen 3 x 5 min in TBS
- 4) Gegenfärbung und Eindeckung (per Hand mit Glycergel) analog den Angaben unter 3.1.3.9

3.1.5 Doppelmarkierung RNA-ISH/IH

Für die Doppelmarkierung wurde zuerst die unter 3.1.3.2 beschriebene RNA-ISH mit den Sonden gp70-B, gp70-ges. und p27 als Gemisch durchgeführt. Nach der Abstoppreaktion wurden die Schnitte für 3 min in 80% Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation (IH) gemäß den Angaben unter 3.1.4 ohne Gegenfärbung. Die Schnitte wurden mit Glycergel (s.o.) eingedeckt.

Die Doppelmarkierung wurde für jeden Gewebeblock-Schnitt je einmal ohne und einmal mit einer Methylgrün-Gegenfärbung durchgeführt.

Methylgrün-Gegenfärbung

- 1) Färbung für 7 min in Methylgrün (Riedel-de Haen AG, 32746; s. Anhang)
- 2) Spülen für 1min in Aqua bidest.
- 3) Inkubation für 2 min in 70% Ethanol
- 4) anschließend bis zum Eindecken in Aqua bidest.

3.1.6 Auswertung

Die Auswertung der ISH, IH und Doppelmarkierung wurde am Durchlichtmikroskop (019548; Carl Zeiss, Germany) bei 25-, 100- und 400-facher Vergrößerung vorgenommen.

Die Beurteilung von Organstrukturen und Zelltypen erfolgte nach den üblichen histomorphologischen Kriterien (Liebich, 1993). Die Einteilung der positiven Signale bezieht sich auf die Anzahl positiv reagierender Zellen. Eine Aussage über die Farbintensität der Reaktion wurde nicht vorgenommen. Dabei bedeutet „-“, dass in der jeweiligen Lokalisation keine Zellen vorhanden sind, die im Vergleich zu den Negativkontrollen einen in 3.1.6.1 oder 3.1.6.2 beschriebenen Farbniederschlag aufweisen. Mit „+“ wurden Lokalisationen bewertet, in denen vereinzelte, mit „++“ solche, in denen zahlreiche der vorhandenen Zellen positiv reagierten.

Die Art der positiven Zellen richtet sich nach dem untersuchten Organ und der jeweiligen Lokalisation. Auf eine Zelldifferenzierung wird gegebenenfalls bei der Beschreibung der Ergebnisse genauer eingegangen (s. 3.2).

3.1.6.1 Auswertung der in situ-Hybridisierung

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, dunkelblaue bis schwarze, die Zellgrenzen nicht überschreitende Reaktionsprodukte gewertet, die in den Kontrollschnitten nicht nachweisbar waren. Die Farbreaktion stellte sich dabei als flächenhaftes bis diffuses Präzipitat dar, das meist im Zellkern, aber auch im Zytoplasma lokalisiert war. Auch bei einer schwachen Anfärbung der Zellen konnten keine einzelnen punktförmigen Präzipitate identifiziert werden. In vielen Fällen war durch die starke Anfärbung positiv reagierender Zellen keine Differenzierung zwischen kernassoziierter und zytoplasmatischer Reaktion möglich.

3.1.6.2 Auswertung der Immunhistologie

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune, die Zellgrenzen nicht überschreitende Reaktionsprodukte gewertet, die in den Kontrollschnitten nicht nachweisbar waren. Die Farbreaktion stellte sich dabei als feingranuläres oder flächenhaftes Präzipitat im Zytoplasma dar.

3.1.6.3 Auswertung der Doppelmarkierung RNA-ISH/IH

Bei den doppelt markierten Geweben (3.1.5) wurden gemäß der Auswertungen in 3.1.6.1 und 3.1.6.2 Zellen mit positivem Virus-RNA und solche mit FeLV-Protein-Nachweis neben doppelt markierten Zellen in verschiedenen Lokalisationen unterschieden. Doppelt markierte Zellen zeigten dabei in unterschiedlicher Intensität und Verteilung die beiden oben beschriebenen Präzipitate unterschiedlicher Färbung in einer Zelle.

In Lymphknoten und Milz wurden Zellen, die eine runde bis ovale Form sowie einen unterschiedlich großen, rundlichen, mehr oder weniger chromatindichten Zellkern aufwiesen als Lymphozyten angesprochen. Zellen, insbesondere in Follikelzentren, deren Zellgrenzen als Fortsätze eher sternförmig ausliefen, konkav gewölbt waren und sich unterschiedlich stark verzweigten, wurden als follikuläre dendritische Zellen (FDZ) angesprochen. Diese Zellen wiesen einen rundlichen, chromatinreichen Zellkern auf.

Die Einteilung der morphologischen und funktionellen Strukturen in den untersuchten Organen erfolgte in Anlehnung an Blue et al. (1981), Fossum et al. (1885), Pellas et al. (1990) sowie an die Lehrbücher von Roitt et al. (1995), Liebich (1993) und Abbas et al. (2000).

3.2 Ergebnisse

3.2.1 ISH

Die Ergebnisse der ISH nach Inkubation mit den Nachweis-Sonden sind für die untersuchten Organe bzw. Zellpellets getrennt aufgeführt (s. unten).

Auf den jeweiligen Folgeschnitten der Organproben waren nach Inkubation mit den Kontroll-Sonden keine zellassozierten Präzipitate entsprechend den Angaben unter 3.1.6.1 zu erzeugen. Die Reaktion der Proben, die ohne Sondenzusatz zum Hybridisierungsmix inkubiert wurden, unterschieden sich nicht von der Reaktion, die nach Inkubation mit den Negativsonden zu sehen war.

3.2.1.1 Zellpellets

Nach ISH der FeLV-infizierten FE- und FL74-Zellpellets mit den Nachweis-Sonden gp70-A, gp70-B, gp70-C, gp70-ges., p27, p15E und U3 zeigten nahezu alle Zellen eines Pellets ein deutliches, schwarz-blaues, flächenhaftes Präzipitat im Zellkern und im Zytoplasma. Auf den Folgeschnitten der oben genannten Zellpellets waren nach Inkubation mit den entsprechenden Kontroll-Sonden keine zellassozierten Präzipitate entsprechend den Angaben unter 3.1.6.1 zu erzeugen. Die Reaktion der Pellets, die ohne Sondenzusatz zum Hybridisierungsmix inkubiert wurden, unterschieden sich nicht von der Reaktion, die nach Inkubation mit den Kontroll-Sonden zu sehen war. Die Nachweis-Sonde gp70-ges. zeigte auf allen infizierten Zellpellets im Vergleich zu den Sonden gp70-A, -B und -C eine geringgradig schwächere Reaktionsintensität bei gleicher Anzahl positiver Zellen. Im Bezug auf die verschiedenen Zellpellets waren für gp70-ges. wie auch für die anderen Sonden zum Nachweis von gp70-RNA keine Unterschiede in der Signalstärke und der Verteilung nach getrennter Inkubation mit infizierten FE- + FeLV-A-, -B- und -C-Zellen zu erkennen. Die Nachweis-Sonden U3 und p15E erzeugten auf allen Pellets ein gleichartig positives Signal, das in der Intensität geringgradig schwächer ausgeprägt war, als das entsprechende Signal der gp70-ges. Sonde. Die verschiedenen Zellpellets zeigten ebenfalls nach Inkubation mit der positiven p27-Sonde ein Signal, deren Intensität ungefähr dem der gp70-A-, -B- oder -C-Sonde entsprach. Nach IH waren bei allen Zellpellets vergleichbare positive Reaktionen entsprechend den Angaben unter 3.1.6.2 zu beobachten.

3.2.1.2 Mesenteriallymphknoten

Die Mesenteriallymphknoten wurden nach funktionellen und morphologischen Gesichtspunkten wie folgt eingeteilt: Der Kortextbereich unterteilt sich durch die Lymphfollikel in den nodulären Kortext und den Parakortext. Der noduläre Kortext wird hauptsächlich aus Ansammlungen von B-Lymphozyten in Follikeln gebildet, die im aktivierten Lymphknoten Sekundärfollikel mit einem zellärmeren Keimzentrum und einem zellreichen Lymphozytensaum (Randbereich des Follikels) bilden. Der Parakortext grenzt direkt an den nodulären Kortext an und stellt die Verbindung zum zentral gelegenen Mark (Medulla) dar.

Im Parokortext befinden sich neben interdigitierenden (Antigen-präsentierenden) Zellen und Makrophagen hauptsächlich T-Lymphozyten. Im Markbereich des Lymphknotens finden sich T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und Makrophagen. Die radialen Trabekel, die von der Kapsel aus in das Parenchym einstrahlen, stützen zusammen mit den retikulären Fasern die verschiedenen zellulären Komponenten des Lymphknotens.

In den untersuchten Lymphknoten traten FeLV-positive ISH-Reaktionen in lymphozytären (s. Abbildung 6.5) und follikulären dendritischen Zellen (s. Abbildung 6.6) des nodulären Kortext sowie in mononukleären Zellen des Lymphknotenmarkes auf (Differenzierung s. Doppelmarkierung 3.2.3.1).

Bei 2 (Nr. 169 und 181) der 25 untersuchten Lymphknoten war in keiner Lokalisation ein ISH-Signal vorhanden. Die restlichen 23 Katzen zeigten in wenigstens einer Lokalisation des Lymphknotens mit mindestens einer Sonde ein positives Signal. Bei 6 Katzen (Katzen 161, 165, 174, 176, 216, 224) konnte nur mit den Sonden gp70 und p27 ein positive Reaktion erzeugt werden. Für alle vier Sonden war zu beobachten, dass in den Lymphknoten hauptsächlich in den Keimzentren der Follikel sowie in Parakortext und Medulla positiv reagierende Zellen vorkamen. In den Randbereichen der Follikel waren stets weniger Zellen positiv als im Zentrum (s. Abbildung 6.1). Bei einer Katze (224) waren nur im Bereich der Medulla positive Zellen vorhanden, Zellen in Follikeln und im Parakortext reagierten dabei für alle ISH-Sonden negativ.

In den Follikelzentren waren für die Sonden gp70 und p27 in 12 und 11 Lymphknoten zahlreich und in jeweils 10 Lymphknoten vereinzelt Zellen positiv. Für die Sonden p15E und U3 reagierten die Follikelzentren von nur ca. 50% der Katzen positiv. Es fanden sich für diese Sonden bis auf eine Ausnahme (p15E; Katze 171, zahlreiche Zellen positiv) nur vereinzelt positiv reagierende Zellen.

Im Randbereich der Follikel waren deutlich weniger Zellen für den viralen RNA-Nachweis positiv als in den Keimzentren (s. Abbildungen 6.1, 6.6). Fanden sich in den Follikeln zahlreiche positive Zellen (gp70, p27), waren in der Regel auch in den Randbereichen der Follikel positive Reaktionen zu sehen. Bei schwachem ISH-Signal in den Keimzentren (U3, p15E) waren die Randbereiche der Follikel meist negativ. Die markierten Zellen waren stets gleichmäßig in den Kompartimenten verteilt. In den meisten Fällen wurde die Abgrenzung zwischen lymphozytenreichem Randsaum und Zentrum im Follikel durch die unterschiedliche Anzahl positiv reagierender Zellen besonders deutlich (s. Abbildung 6.6). Dabei verhielten sich die verschiedenen Follikel eines Lymphknotens, unabhängig von deren Lokalisation, vergleichbar.

Der Parakortex wies für die Sonden gp70 und p27 meist zahlreiche (gp70: 8x; p27: 5x) oder vereinzelt (gp70: 13x; p27: 15x) positive Zellen auf. Keine positiven Zellen fanden sich für diese Sonden bei 4 (gp70) bzw. 5 (p27) Katzen. Nach Inkubation mit den Sonden p15E und U3 waren bei jeweils ca. 50% der Katzen vereinzelt positive Zellen im ansonsten negativen Parakortex nachzuweisen. Die positiv reagierenden Zellen waren in diesem Kompartiment gleichmäßig verteilt (s. Abbildung 6.1).

In der Medulla war mit der gp70- und der p27-Sonde bei nahezu allen Katzen mit ISH-positivem Lymphknoten virale RNA nachweisbar. Dabei waren 11x (gp70) bzw. 7x (p27) zahlreiche und 12x (gp70) bzw. 14x (p27) vereinzelt positive Zellen vorhanden. p15E und U3 waren nur vereinzelt in Zellen im Markbereich zu sehen. 11 Katzen zeigten für p15E und 10 Katzen für U3 ein positives Ergebnis. Auch im Lymphknotenmark zeigten die positiven Zellen eine gleichmäßige Verteilung (s. Abbildung 6.1).

Zusätzlich zu der Auswertung des in situ-Signales wurde in den Lymphknoten die Aktivierung der Lymphfollikel bewertet. Die Einteilung erfolgte in „wenig aktiviert“(*) und „stark aktiviert“ (**), je nachdem, wie deutlich ein zellreicher Randsaum von einem zellärmeren Zentrum in den Follikeln unterschieden werden konnte.

Die Mesenteriallymphknoten von allen untersuchten Katzen zeigten eine mehr oder weniger deutliche Aktivierung der Follikel. Dabei lag bei 12 Katzen eine starke Aktivierung vor, bei 13 Katzen waren die Lymphknotenfollikel mäßig aktiviert. Im Bezug auf den RNA-Nachweis konnten keine Zusammenhänge zu dem Aktivierungsgrad der untersuchten Lymphknoten festgestellt werden.

Die Ergebnisse der ISH und der Aktivierungsgrad der Follikel sind in Tabelle 3.2.1 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.2 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA-Nachweises in den untersuchten Lymphknoten.

Tabelle 3.2.1: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach ISH mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 in den verschiedenen Kompartimenten der Mesenteriallymphknoten und Darstellung des Aktivierungsgrades

Katz Nr.	AF	nodulärer Kortex								Parakortex				Medulla			
		Keimzentrum				Randbereich											
		gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3
157	**	++	++	+	+	+	+	-	-	++	++	+	+	++	++	+	+
158	*	++	++	+	+	+	+	-	-	++	++	+	+	++	++	+	+
159	**	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	++	-	-
160	*	++	+	+	+	+	-	-	-	++	+	-	-	++	+	-	+
161	*	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	++	+	-	-
162	**	++	++	+	-	+	+	-	-	++	+	-	-	++	+	+	-
163	**	++	++	+	+	+	+	+	-	++	+	+	+	++	+	+	+
164	*	++	++	+	+	+	+	-	-	++	+	+	+	++	++	+	+
165	**	+	+	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-	+	++	-	-
166	*	++	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
167	**	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
169	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	*	++	++	++	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
173	**	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
174	**	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
175	**	++	++	+	+	+	+	-	+	++	++	+	+	++	++	+	+
176	*	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
179	*	+	++	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
181	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	*	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
204	*	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	++	+	+	+
216	**	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
222	*	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
224	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-
232	*	+	+	-	-	+	+	-	-	++	++	+	+	++	++	+	+

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

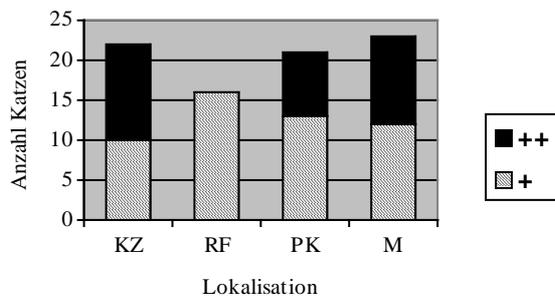
*: wenig aktiviert

** : stark aktiviert

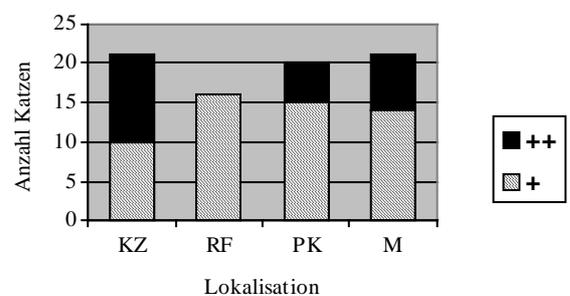
AF: Aktivierungsgrad der Follikel

Abbildungen 3.2.2: Graphische Darstellung der Verteilung positiver Zellen in den Kompartimenten des Mesenteriallymphknotens getrennt für die Sonden gp70, p27, p15E und U3

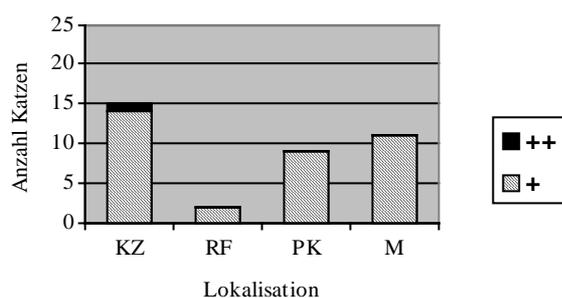
LK, Nachweis von gp70-RNA



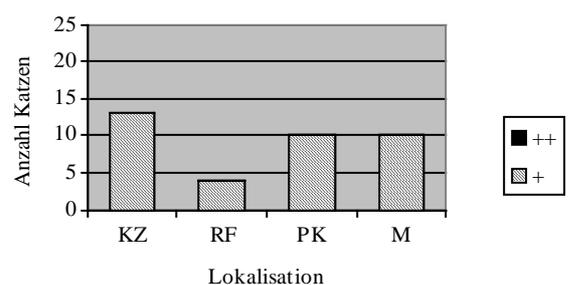
LK, Nachweis von p27-RNA



LK, Nachweis von p15E-RNA



LK, Nachweis von U3-RNA



KZ:	Keimzentrum	+:	vereinzelt positive Zellen
RF:	Randbereich der Follikel	++:	zahlreiche positive Zellen
PK:	Parakortex		
M:	Medulla		
LK:	Lymphknoten		

3.2.1.3 Milz

Die Milz wurde nach funktionellen und morphologischen Gesichtspunkten wie folgt eingeteilt: Zwischen dem trabekulären Maschenwerk befinden sich, eingebettet in die rote Pulpa, die lymphatischen Einrichtungen der Milz, die zusammengefasst als weiße Pulpa bezeichnet werden. Die Hauptmasse der lymphatischen Gewebe ist um eine Zentralarteriole

angeordnet und bildet die periarterioläre lymphatische Scheide (PALS). Die PALS besteht aus T- und B-Zell-Arealen, wobei sich die T-Zellen um die Zentralarteriole herum befinden. Die B-Zellen ordnen sich in Form von Follikeln an, die im stimulierten Zustand aus einem zellärmeren Keimzentrum und einem lymphozytenreichen Randsaum bestehen.

In der Milz traten positive ISH-Signale bei Lymphozyten und follikulären dendritischen Zellen im Bereich der Keimzentren auf. In den anderen Lokalisationen handelte es sich bei den positiv reagierenden Zellen um Lymphozyten, Lymphoblasten und vereinzelt Makrophagen.

Die Milzen von 6 Katzen (165, 169, 174, 181, 216, 224) zeigten nach ISH für keine Sonde ein positives Ergebnis. Dies entspricht einem Prozentsatz von 24% im Bezug auf die 25 untersuchten Tiere. Für die Sonden p15E und U3 reagierten zusätzlich 6 Tiere (158, 159, 161, 173, 179, 222) nach Inkubation mit den entsprechenden Nachweis-Sonden negativ. 2 Katzen zeigten kein positives Signal für U3 und eine Katze für p15E. Die Milz der Katze Nr. 176 war ausschließlich für den p27-RNA-Nachweis, die Katze Nr. 193 nur für den gp70-RNA-Nachweis positiv. Dabei konnten ausschließlich in den Randbereichen der Follikel ISH-positive Zellen gefunden werden.

In den Keimzentren waren im Vergleich zu den anderen Lokalisationen bei den meisten Katzen und in der größten Anzahl positiv reagierende Zellen vorhanden. Die im Vergleich zu den anderen Lokalisationen hohe Konzentration von Zellen mit positivem RNA-Nachweis ließ sich bis auf zwei Ausnahmen (Katzen 176 und 193, s. oben) für alle untersuchten ISH-Sonden nachvollziehen (s. Abbildung 6.8).

Im Randbereich der Follikel kamen bei positivem ISH-Signal in der Milz bis auf eine Ausnahme (Katze 232; gp70, ++) nur vereinzelt positive Zellen vor. Dabei zeigten für diese Lokalisation 14 Katzen für gp70, 13 für p27, 4 für p15E und 3 Katzen für U3 ein positives Signal (s. Abbildungen 6.8 und 6.9).

Für die PALS zeigte sich ein dem Randbereich der Follikel vergleichbares Verteilungsbild. Die Abgrenzung zwischen PALS und dem Randbereich der Follikel war nicht immer eindeutig zu treffen, weil besonders in wenig stimulierten Follikeln fließende Übergänge zwischen dem zellreichen Randbereich des Keimzentrums und den PALS vorhanden waren. Um die Arterien waren bis auf eine Ausnahme (Katze 232; gp70, ++) nur vereinzelt positiv reagierende Zellen zu finden. Für die Sonden gp70 und p27 war dies bei jeweils 12 Katzen, für p15E bei 3 Katzen und für U3 bei 5 Katzen zu beobachten.

Im Bereich der roten Pulpa waren für die Sonden p15E und U3 nur in einer Milz (Katze 232) vereinzelt positiv reagierende Zellen vorhanden. Bei dieser Katze konnten mit gp70 und p27

in zahlreiche Zellen virale RNA nachgewiesen werden. Ansonsten kamen gp70- und p27-positive Zellen bei jeweils 12 Katzen vor (s. Abbildung 6.8).

Die weiße Pulpa zeigte somit in den meisten Fällen eine relativ gleichmäßige Verteilung positiv reagierender Zellen unter Betonung der Keimzentren (s. Abbildung 6.8). Für die Sonden p15E und U3 fanden sich seltener positive Zellen in den PALS und der roten Pulpa im Vergleich zu gp70 und p27. Eine Ausnahme im Bezug auf die Verteilung der positiven Zellen in der Milz stellte die Katze 232 dar. In diesem Fall brachte die Inkubation mit gp70 für den Randbereich der Follikel, die PALS und die rote Pulpa zahlreiche positive Zellen hervor. Im Keimzentrum waren hingegen nur vereinzelt positive Reaktionen zu sehen. Nummer 232 war die einzige Katze, bei der in der roten Pulpa für p27 zahlreiche und für p15E und U3 überhaupt positive Zellen vorhanden waren.

Zusätzlich zu der Auswertung des in situ-Signales wurde in den Milzen die Aktivierung der Lymphfollikel bewertet. Die Einteilung erfolgte in „wenig aktiviert“(*) und „stark aktiviert“ (**), je nachdem wie deutlich ein zellreicher Randsaum von einem zellärmeren Zentrum in den Follikeln unterschieden werden konnte.

Die Milzen von allen untersuchten Katzen zeigten eine mehr oder weniger deutliche Aktivierung der Follikel. Dabei lag bei 10 Katzen eine starke Aktivierung vor, bei 15 Katzen waren die Lymphknotenfollikel mäßig aktiviert. Im Bezug auf den RNA-Nachweis konnten keine Zusammenhänge zum Aktivierungsgrad der untersuchten Milzen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der ISH und der Aktivierungsgrad der Follikel sind in Tabelle 3.2.3 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.4 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA-Nachweises im Milzgewebe.

Tabelle 3.2.3: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach ISH mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 in den verschiedenen Kompartimenten der Milz und Darstellung des Aktivierungsgrades der Follikel

Kat- ze Nr.	AF	weiße Pulpa												rote Pulpa			
		Keimzentrum				Randbereich des Follikels				PALS							
		gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3
157	*	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
158	*	++	++	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
159	*	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
160	*	++	++	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
161	*	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
162	*	++	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
163	*	++	++	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
164	**	++	++	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
165	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	**	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167	**	++	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
169	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	*	++	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
173	**	++	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
174	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
175	**	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
176	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
179	*	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
181	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	*	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
204	*	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	++	+	+	-
216	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222	*	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
232	*	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	++	++	+	+

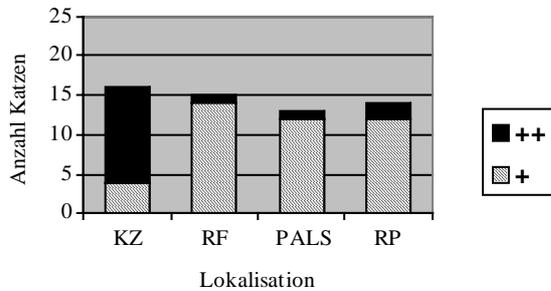
-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

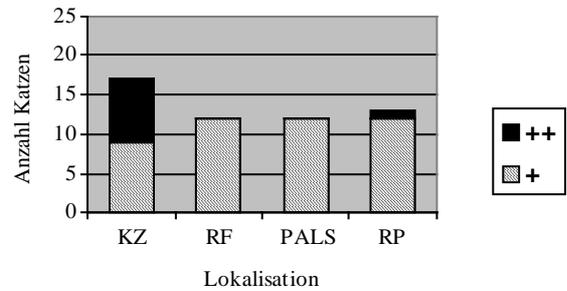
*: wenig aktiviert
 **: stark aktiviert
 AF: Aktivierungsgrad der Follikel

Abbildungen 3.2.4: Graphische Darstellung der Verteilung positiver Zellen in den Kompartimenten der Milz getrennt für die Sonden gp70, p27, p15E und U3

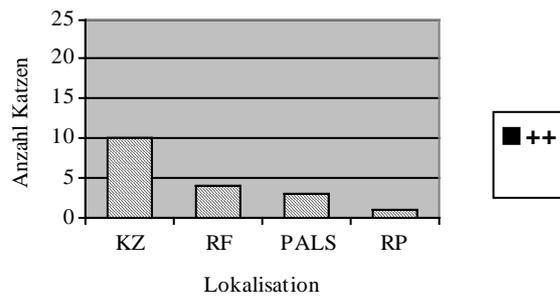
Milz, Nachweis von gp70-RNA



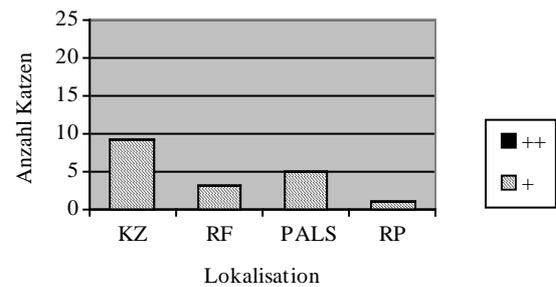
Milz, Nachweis von p27-RNA



Milz, Nachweis von p15E-RNA



Milz, Nachweis von U3-RNA



KZ: Keimzentrum
 RF: Randbereich des Follikels
 PALS: periarterioläre lymphatische Scheide
 RP: rote Pulpa

+: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

3.2.1.4 Dünndarm

Der Dünndarm wurde nach morphologischen Kriterien wie folgt eingeteilt: Die Darmschleimhaut gliedert sich in einen basalen Bereich, in dem sich die Krypten (Glandulae intestinales) befinden, und die Zotten, die als fingerförmige Fortsätze ins Lumen des Darmes ragen. Die Dünndarmzotten sind von einem einschichtigen Epithel überzogen, das sich im Bereich der Zottenbasis mit dem der benachbarten Zotten verbindet und somit eine geschlossene epitheliale Auskleidung des Darmlumens erzeugt. Die Krypten stellen Einstülpungen des Epithels in die Lamina propria mucosae dar. Die Lamina propria mucosae

besteht aus lockerem Bindegewebe, in das neben Gefäßen, Nervenfasern und glatten Muskelzellen auch Immunzellen eingelagert sind. Sie bildet das Grundgerüst (Stroma) der Zotten und Krypten.

Mit basalem Zottenstroma und basalem Zottenepithel ist im Weiteren das basale erste Drittel der Zotten angesprochen. Das apikale Zottenstroma und Zottenepithel schließt sich lumenwärts an und reicht bis zu den Zottenspitzen. Das Darmepithel setzt sich aus verschiedenen Zellen (Enterozyten, Becherzellen, endokrine Zellen) zusammen, die in den Auswertungen nicht differenziert wurden. Die Infiltrate im Bereich der Lamina propria fassen alle mononukleären Zellen zusammen, die in keinem geschlossenen Gewebeverband angeordnet sind.

Von 24 Katzen lagen Dünndarmabschnitte zur Untersuchung vor (von Katze 175 nicht). Bei 3 (169, 181, 224) der untersuchten Katzen waren weder in den Epithelzellen noch in der Lamina propria ISH-positive Zellen nachweisbar. Für alle untersuchten ISH-Sonden waren positive Zellen in den Krypten häufiger anzutreffen als in den Zotten (s. Abbildung 6.15). Unabhängig von den Sonden waren Zottenepithelzellen in der Regel nur dann positiv, wenn im Bereich des Kryptenepithels große Mengen viraler RNA nachgewiesen werden konnte. Positiv reagierende Zellen in der Lamina propria waren im Vergleich zu Epithelzellen gleichmäßiger in der Schleimhaut verteilt. Dennoch reagierten auch im Stroma mehr Zellen in basalen Bereichen positiv als in apikalen (s. Abbildung 6.15). Insbesondere im Bezug auf die Sonden gp70 und p27 konnten keine Unterschiede zwischen der Zahl an ISH-positiven Epithelzellen und ISH-positiven Infiltratzellen gefunden werden (s. Abbildungen 6.13 und 6.14). Ein hoher Gehalt an viraler RNA in den Epithelien korrelierte für alle ISH-Sonden weitgehend mit einer hohen Anzahl an ISH-positiven Infiltratzellen in der Lamina propria. Im Bereich der Krypten waren Epithelzellen bei 19 (gp70), 20 (p27), 12 (p15E) bzw. 17 (U3) Katzen nach ISH positiv. Nach Inkubation mit p15E und U3 zeigten deutlich weniger Zellen in diesem Bereich eine positive ISH-Reaktion.

Der abnehmende Gradient positiver Zellen von basalen zu apikalen Epithelschichten hatte zur Folge, dass in den Epithelzellen der Zottenspitzen nur für die Sonden gp70 (8 Tiere), p27 (4 Tiere) und p15E (1 Tier) virale RNA in wenigen Zellen nachgewiesen werden konnte. Wie oben beschrieben, war bei diesen Tieren stets eine starke Reaktion im Bereich des Kryptenepithels vorhanden. U3 konnte im Bereich der Zottenspitzen bei keiner der untersuchten Katzen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der ISH sind in den Tabelle 3.2.5 und 3.2.6 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.7 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA-Nachweises in Epithelzellen und infiltrierenden Zellen des Dünndarmes.

Tabelle 3.2.5: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach ISH mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 im Dünndarmepithel

Katze Nr.	Kryptenepithel				basales Zottenepithel				apikales Zottenepithel			
	gp70	p27	p15E	U3	gp70	p27	p15E	U3	gp70	p27	p15E	U3
157	++	++	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
158	++	++	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
159	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160	++	++	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
161	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
162	++	++	+	-	++	+	-	-	+	-	-	-
163	++	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
164	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	++	++	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
167	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	++	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	-
173	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
174	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
175	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
176	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
179	++	++	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
204	++	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
216	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
222	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
232	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen
 n.d.: nicht durchgeführt

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

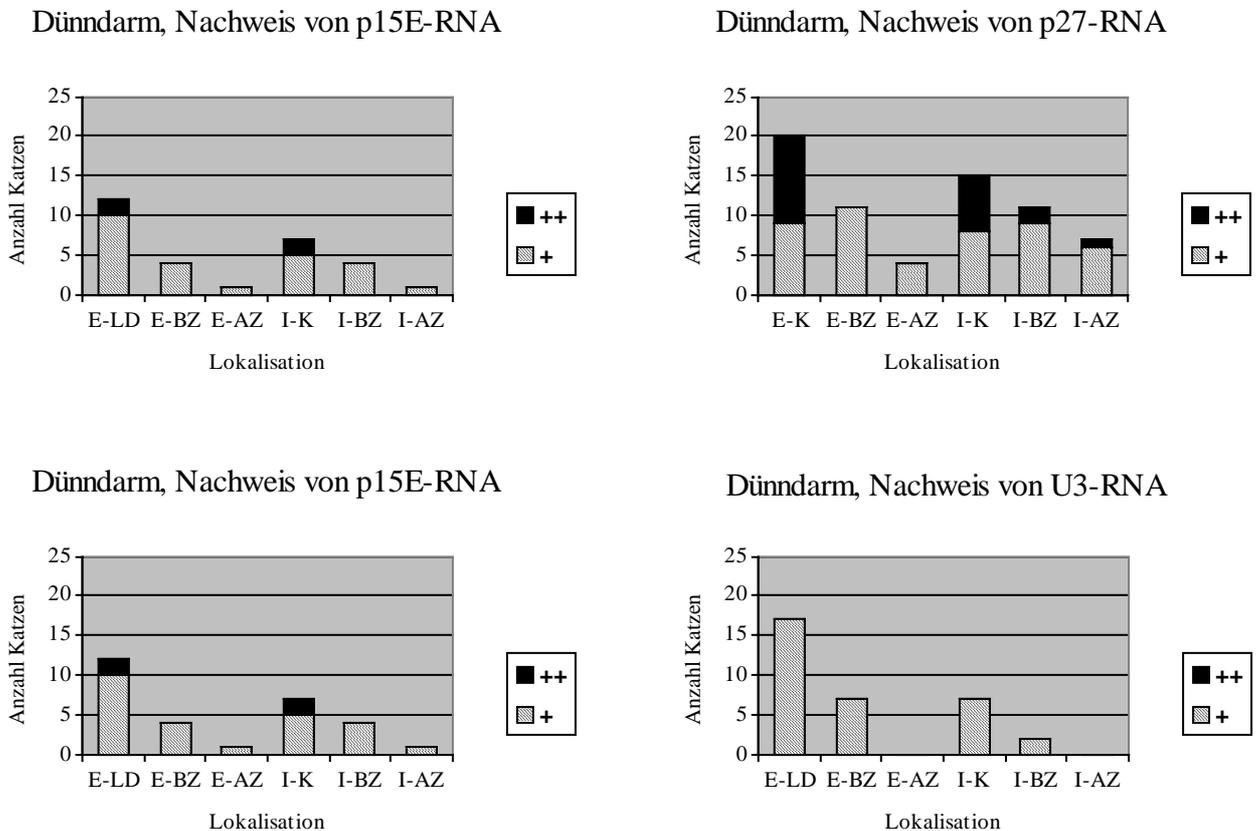
Tabelle 3.2.6: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach ISH mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 im Bezug auf infiltrierende Zellen der Lamina propria des Dünndarms

Katze Nr.	Kryptenbereich				basales Zottenstroma				apikales Zottenstroma			
	gp70	p27	p15E	U3	gp70	p27	p15E	U3	gp70	p27	p15E	U3
157	++	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
158	++	++	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160	++	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
161	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
162	++	++	+	-	++	++	+	-	++	++	-	-
163	++	++	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
164	++	++	++	+	++	+	+	+	++	+	-	-
165	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
167	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	++	++	++	+	++	+	+	-	++	+	+	-
173	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
175	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
179	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
204	++	++	-	-	++	++	-	-	++	+	-	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
232	++	++	+	-	++	+	-	-	++	-	-	-

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen
 n.d.: nicht durchgeführt

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

Abbildungen 3.2.7: Graphische Darstellung der Verteilung positiver Epithel- und Infiltratzellen im Dünndarm für die Sonden gp70, p27, p15E und U3



E-K: Epithel, Kryptenbereich
 E-BZ: Epithel, basale Zotten
 E-AZ: Epithel, apikale Zotten
 I-K: Infiltrate, Kryptenbereich
 I-BZ: Infiltrate, basales Zottenstroma
 I-AZ: Infiltrate, appikales Zottenstroma

+: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

3.2.1.5 Thymus

Der Thymus wurde nach morphologischen und funktionellen Kriterien wie folgt eingeteilt: Das Organ ist in verschiedene Läppchen unterteilt, die durch Bindegewebe voneinander getrennt sind. Innerhalb eines Läppchens sind die Lymphozyten in einer äußeren

Rindenschicht (Kortex) und einer inneren Markzone (Medulla) angeordnet. Die dicht gepackte Rinde enthält den Großteil der ruhenden T-Lymphozyten, während sich im Mark die aktivierten blastoiden Zellen befinden. Sowohl die Thymusrinde als auch das Thymusmark werden von epithelialen Retikulumzellen in zahlreiche Mikrokompartimente unterteilt. Die Retikulumzellen bilden im Rindenbereich die Blut-Thymus-Barriere um Blut- und Lymphgefäße. Als organspezifische Besonderheit bilden epitheliale Retikulumzellen in der Markzone konzentrisch geschichtete Einschlüsse (Hassall-Körperchen). Gelegentlich findet man in das Parenchym eingelagert rundliche Ansammlungen von mononukleären Zellen, bei denen es sich um kleine B-Zell-Follikel handelt.

Von den 25 untersuchten Katzen war bei 7 Tieren (Nr. 165, 169, 175, 176, 181, 216, 224) mit keiner Sonde ein positives ISH-Signal im Thymus zu erzeugen. Dies entspricht einem Prozentsatz von 28% im Bezug auf die untersuchten Gewebe. Waren im Thymus für eine Sonde nur vereinzelt positive Zellen vorhanden, verteilten sich diese in der Regel gleichmäßig über Rinde und Mark. Diese Verteilung war bei 8 (Nr. 158, 159, 162, 166, 171, 173, 193, 222) der positiven Katzen zu beobachten. Zahlreiche positive Zellen fanden sich ausschließlich im Kortex. Bei diesen Katzen waren in der Medulla häufig vereinzelt positive Zellen zu sehen (s. Abbildungen 6.23 und 6.24). Diese Verteilung positiver Zellen konnte nach Inkubation mit der Sonde gp70 bei 8 Katzen (Nr. 157, 160, 161, 163, 164, 179, 204, 232) und nach Inkubation mit p27 bei 3 Katzen (Nr. 157, 164, 179) beobachtet werden. Für die Sonden p15E und U3 waren nur sehr vereinzelt schwache Reaktionen in den Kompartimenten zu verzeichnen, wodurch ein deutliches Verteilungsmuster für diese Sonden nicht abgeleitet werden konnte. Mit der p15E-Sonde waren im Rindenbereich bei 4 Katzen und im Mark bei 3 Katzen vereinzelt positive Zellen nachweisbar. Für U3 waren bei jeweils 2 Katzen in den verschiedenen Kompartimenten vereinzelt positive Zellen vorhanden.

Positiv reagierende Lymphfollikel kamen bei den Katzen Nr. 157, 162 und 164 in jeweils einer Lokalisation vor (s. Abbildungen 6.24 und 6.25). Sie wurden nicht als positive Reaktion in die tabellarische (Tabelle 3.2.8) oder graphische (Abbildung 3.2.9) Auswertung einbezogen. Nach Inkubation mit den Sonden gp70 und p27 waren zahlreiche, nach Inkubation mit p15E und U3 vereinzelt Zellen in den B-Zell-Follikeln positiv.

Die Ergebnisse der ISH sind in der Tabelle 3.2.8 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.9 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA-Nachweises im Thymus.

Tabelle 3.2.8: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach ISH mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 in Kortex und Medulla des Thymus

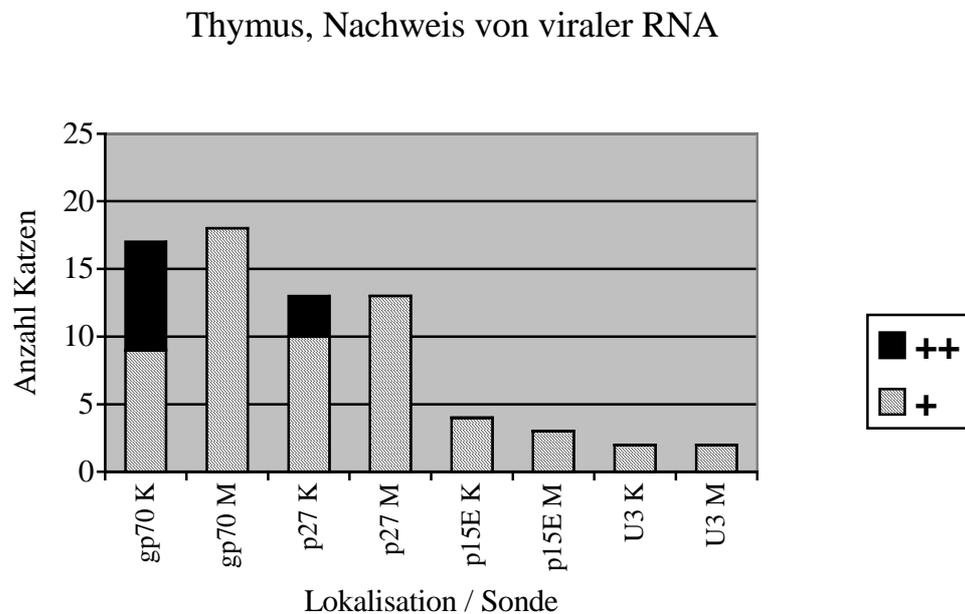
Katze Nr.	Kortex				Medulla			
	gp70	p27	p15	U3	gp70	p27	p15	U3
157	++	++	-	-	+	+	-	-
158	+	+	-	-	+	+	-	-
159	+	+	-	-	+	+	-	-
160	++	+	-	-	+	+	-	-
161	++	+	-	-	+	+	-	-
162	+	+	+	-	+	+	-	-
163	++	+	+	+	+	+	+	+
164	++	++	+	-	+	+	+	-
165	-	-	-	-	-	-	-	-
166	+	+	-	-	+	+	-	-
167	+	-	-	-	+	-	-	-
169	-	-	-	-	-	-	-	-
171	+	+	+	+	+	+	+	+
173	+	-	-	-	+	-	-	-
174	-	-	-	-	+	-	-	-
175	-	-	-	-	-	-	-	-
176	-	-	-	-	-	-	-	-
179	++	++	-	-	+	+	-	-
181	-	-	-	-	-	-	-	-
193	+	-	-	-	+	-	-	-
204	++	+	-	-	+	+	-	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-
222	+	-	-	-	+	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-
232	++	+	-	-	+	+	-	-

gp70-, p27-, p15E- und U3-positive Lymphfollikel : Katzen Nr. 157, 162, 164, 166

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

Abbildungen 3.2.9: Graphische Darstellung der Verteilung positiver Zellen in Kortex und Medulla des Thymus getrennt für die Sonden gp70, p27, p15E und U3



K: Kortex
M: Medulla
+: vereinzelt positive Zellen
++: zahlreiche positive Zellen

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

3.2.1.6 Knochenmark

Im Knochenmark werden physiologischerweise kontinuierlich Blutzellen aus Stamm- und Vorläuferzellen gebildet. Die mesenchymalen Retikulumzellen sind die gemeinsamen Vorläufer für alle Zelllinien und werden deshalb als pluripotente Stammzellen bezeichnet. Über Hämozytoblasten, die sich aus dem retikulären Gewebeverband lösen, differenzieren sich die verschiedenen Zelllinien bis zu Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Bei den eigenen Untersuchungen wurden zwischen einer frühen, mittleren und späten (reife Zellen) Entwicklungsphase unterschieden. In der frühen und mittleren Entwicklungsphase sind die verschiedenen Zelllinien lichtmikroskopisch kaum zu unterscheiden. Sie sind mit ca. 18-25 µm im Bezug auf die reifen Zellen (späte

Entwicklungsphase) relativ groß und haben im Verhältnis zum Zytoplasma einen großen Kern. Im Laufe der Entwicklung schrumpfen die Zellen mit Ausnahme der Megakaryozyten und die Kerne verändern sich in Form und Größe bis zu ihrem charakteristischen Aussehen. Durch die in der Regel starke Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas bei der ISH war eine Differenzierung der Vorläuferzellen und Zelllinien nach deren Kernmorphologie nur stark eingeschränkt möglich. Somit stellten sich die positiven Zellen in verschiedenen Größen mit mehr oder weniger aufgelockerter Struktur und rundlicher Gestalt dar. Mesenchymale Retikulumzellen konnten als spindelförmige Zellen mit ovalem Zellkern erkannt werden. Sie reagierten bei keinem Tier und mit keiner der Sonden positiv. Aus diesem Grund sind sie in der tabellarischen und graphischen Auswertung nicht berücksichtigt. Granulozyten, Plasmazellen und die späten Entwicklungsstadien von Zellen der erythrozytären Reihe (s. unten) wurden der Gruppe der „reifen Zellen“ zugeordnet. Stabkernige Granulozyten stellten sich bei schwachem ISH-Signal mit gelappten Kernen und Plasmazellen mit exzentrisch liegenden Kernen dar. Diese Zellen hatten eine Größe von ca. 16 μm . In manchen Fällen war die Kernmorphologie von Granulozyten und Plasmazellen aufgrund eines starken ISH-Signales nicht eindeutig zu differenzieren. Die kleinsten rundlichen Zellen im Knochenmark stellen reife Zellen der erythrozytären Reihe dar. Zu diesen zählen basophile, polychromatische und oxyphile Normoblasten, die einen Durchmesser von 8-12 μm aufweisen. Unter den reifen Zellen waren hauptsächlich Granulozyten und Zellen der erythrozytären Reihe positiv. Reife, kernlose Erythrozyten reagierten nach ISH stets negativ. Plasmazellen zeigten nur ganz vereinzelt ein positives Signal.

In einer zweiten Gruppe wurden Zellen zusammengefasst, die zwischen 15 und 20 μm groß waren und einen im Verhältnis zum Zytoplasma relativ großen Kern besaßen. Bei starkem ISH Signal war dabei keine Differenzierung zwischen Zytoplasma und Kern möglich. Diese Gruppe dürfte in der Regel Hämozytoblasten, Myelozyten, Plasmozyten, mittlere Lymphozyten und Promonozyten umfassen, die der frühen Entwicklungsphase der Zellreifung zugeordnet wurden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Granulozyten und Plasmazellen bei starkem ISH-Signal nicht von Zellen der frühen Entwicklungsphase zu unterscheiden waren und diesen deshalb möglicherweise manchmal mit zugeordnet wurden (s. Abbildungen 6.18, 6.20 und 6.21).

Die dritte Gruppe (mittlere Entwicklungsphase) bildeten Proerythroblasten, Promyelozyten, Immunoblasten, Monoblasten und Megakaryoblasten. Diese Zellen stellten sich mit einem großen soliden Zellkern dar und hatten eine Größe von 20-25 μm (s. Abbildungen 6.18, 6.20 und 6.21). Promegakaryozyten und Megakaryozyten nahmen eine Sonderstellung ein. Diese

Zellen waren eindeutig aufgrund ihrer Größe (50-100 µm) und ihrer Mehrkernigkeit zu differenzieren (s. Abbildung 6.18). Bei der Einzelinkubation mit den verschiedenen Sonden zeigten Megakaryozyten nur für gp70 und p27 ein sehr schwaches ISH-Signal. Knochenmark von Katzen mit solchen Megakaryozyten wurde deshalb auch in der ISH/IH-Doppelmarkierung (siehe 3.2.3.4) ausgewertet. Durch den Einsatz der gp70- und p27-Sonden als Gemisch konnte ein stärkeres Signal und damit eine bessere Auswertbarkeit dieser Zellen erreicht werden.

Von den 25 untersuchten Katzen lag bei 23 Katzen Knochenmark zur Inkubation vor. Bei 6 Katzen (Nr. 159, 169, 174, 181, 222, 224) waren mit keiner der Sonden ISH-positive Signale zu erzeugen. Bei Katzen mit positiver ISH-Reaktion im Knochenmark waren Zellen der frühen und mittleren Entwicklungsphase häufiger positiv als ganz ausgereifte Zellen. Diese Verteilung ließ sich nach Inkubation mit allen untersuchten Sonden nachvollziehen.

In der Regel war bei den „reifen“ Zellen, wenn überhaupt, nur dann ein positives ISH-Signal vorhanden, wenn in zahlreichen Zellen der frühen und mittleren Entwicklungsphase virale RNA nachgewiesen werden konnte. Daraus ergibt sich, dass für die Sonden U3 und p15E, mit einer Ausnahme (Katze Nr. 164, Sonde U3), keine positiven Reaktionen in der Gruppe der „reifen“ Zellen vorkamen. In der Regel konnten für alle untersuchten Sonden positive Zellen in den Gruppen der frühen und mittleren Entwicklungsphase parallel nachgewiesen werden. Dabei fanden sich keine Gesetzmässigkeiten im Bezug auf die Anzahl positiv reagierender Zellen. Mit den Sonden gp70 und p27 waren in den Zellen der frühen und mittleren Entwicklungsphase bei einer größeren Zahl von Katzen und in mehr Zellen virale RNA nachweisbar als nach Inkubation mit p15E oder U3. Auffällig war, dass mit den Sonden p15E und U3 nur dann positive Signale zu erzeugen waren, wenn nach Inkubation mit den Sonden gp70 und p27 zahlreiche Zellen positiv reagierten.

Im Knochenmark der Katze Nr. 160 war ein Lymphfollikel zu erkennen, der nach Inkubation mit allen ISH-Sonden positive Zellen aufwies (s. Abbildung 6.20). Diese Zellen wurden nicht als positive Reaktion in die tabellarische (Tabelle 3.2.10) oder graphische (Abbildung 3.2.11) Auswertung einbezogen. Nach Inkubation mit den Sonden gp70 und p27 waren zahlreiche, nach Inkubation mit p15E und U3 vereinzelt Zellen in dem B-Zell-Follikel positiv.

Die Ergebnisse der ISH sind in der Tabelle 3.2.10 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.11 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA-Nachweises im Knochenmark.

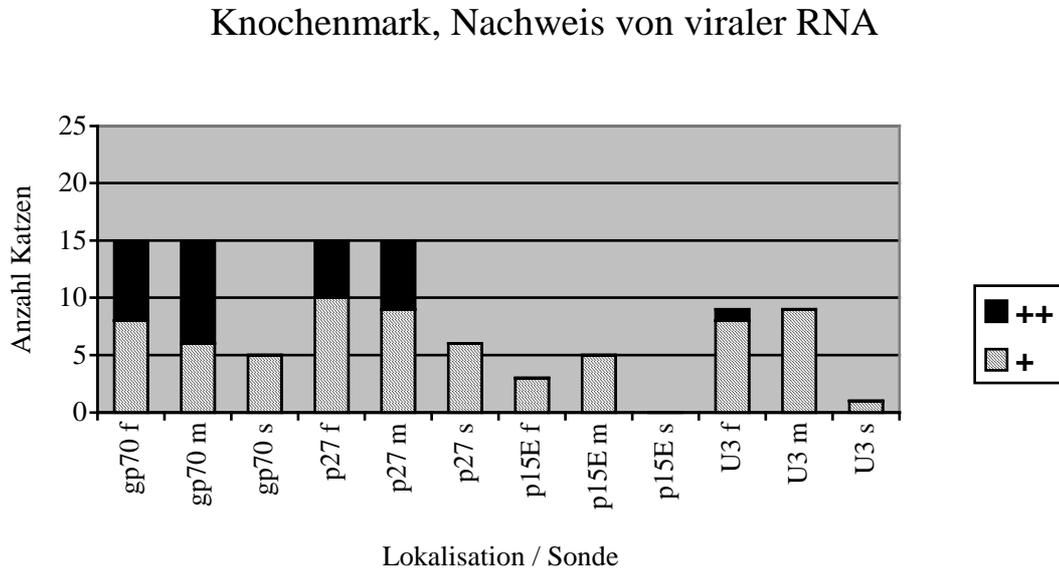
Tabelle 3.2.10: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach ISH mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 im Knochenmark

Katze Nr.	frühe Entwicklungsphase				mittlere Entwicklungsphase				späte Entwicklungsphase (reife Zellen)			
	gp70	p27	p15E	U3	gp70	p27	p15E	U3	gp70	p27	p15E	U3
157	+	+	-	-	++	+	-	+	-	+	-	-
158	++	++	-	-	++	+	-	+	-	-	-	-
159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160	+	+	-	+	++	+	-	+	+	+	-	-
161	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
162	+	++	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
163	++	++	-	+	++	++	-	+	-	-	-	-
164	++	++	+	++	++	++	+	+	+	+	-	+
165	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	++	++	+	+	++	++	+	+	-	-	-	-
167	++	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-	-
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
173	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
175	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
176	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
179	+	+	-	+	++	++	-	-	+	+	-	-
181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
204	++	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
216	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
232	++	+	-	+	++	++	+	+	-	-	-	-

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen
 n.d.: nicht durchgeführt

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

Abbildungen 3.2.11: Graphische Darstellung der Verteilung positiver Zellen im Knochenmark getrennt für die Sonden gp70, p27, p15E und U3



f: frühe Entwicklungsphase
 m: mittlere Entwicklungsphase
 s: späte Entwicklungsphase (reife Zellen)
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

gp70: Nachweis-Sonde für gp70-RNA
 p27: Nachweis-Sonde für p27-RNA
 p15E: Nachweis-Sonde für p15E-RNA
 U3: Nachweis-Sonde für U3-RNA

3.2.2 ISH/IH-Doppelmarkierung

Die Ergebnisse der Doppelmarkierung nach Inkubation mit den Nachweis-Sonden gp70 und p27 (ISH) und den Antikörpern gegen die viralen Proteine gp70 und p27 (IH) sind für die untersuchten Organe getrennt aufgeführt (s. unten).

Auf den jeweiligen Folgeschnitten der Organproben waren nach ISH mit dem Gemisch der Kontroll-Sonden gp70 und p27 keine zellassoziierten Präzipitate entsprechend den Angaben unter 3.1.6.1 zu erzeugen. Die Reaktion der Gewebe, die ohne Sondenzusatz zum Hybridisierungsmix inkubiert wurden, unterschieden sich nicht von der Reaktion, die nach Inkubation mit den Negativsonden zu sehen war.

Bei der immunhistologischen Untersuchung waren die Gewebe nach Inkubation mit dem Kontrollantikörper T1 stets negativ.

Die Anzahl ISH-positiver Zellen kann sich von den Angaben unter 3.2.2 (Auswertung ISH) unterscheiden, weil durch die Verwendung der Sonden gp70 und p27 als Gemisch eine höhere Sensitivität des ISH-Signals im Vergleich zu der getrennten Inkubation mit den entsprechenden Sonden erreicht wurde.

3.2.2.1 Mesenteriallymphknoten

Die Einteilung der unterschiedlichen Kompartimente des Lymphknotens entspricht der bei der Auswertung der ISH. Es wurden aber Parakortex und Medulla aufgrund geringer Unterschiede im Bezug auf die Anzahl und Verteilung positiv reagierende Zellen in eine Gruppe zusammengefasst.

In den Keimzentren ließen sich bei der Doppelmarkierung sowohl blastoide als auch folliculäre dendritische Zellen mit positiven Signalen stets parallel nachweisen (s. Abbildungen 6.3, 6.4). Sowohl markierte Virusproteine, als auch markierte virale RNA fand sich in FDZ im Bereich der sternförmigen Zytoplasmafortsätze, wodurch das charakteristische Aussehen der FDZ besonders deutlich wurde (s. Abbildungen 6.3 und 6.6). In blastoiden Zellen war nachweisbare virale RNA entweder nur in den Kernen, oder bei starkem ISH Signal diffus in den Zellen verteilt. Immunhistologische Präzipitate fanden sich stets nur im Zytoplasma von blastoiden Zellen (s. Abbildung 6.7).

Es war zu erkennen, dass in blastoiden Zellen hauptsächlich virale RNA nachgewiesen werden konnte, wohingegen FDZ meist nur für den Virus-Antigen-Nachweis positiv reagierten. Unter den positiv reagierenden Zellen bildeten FDZ häufig ein dicht gepacktes Netzwerk aus Zellen, das sich an einem Pol des Follikelzentrums befand. Blastoide Zellen waren bevorzugt an dem anderen Pol des Follikelzentrums zu erkennen. Unter den positiven Zellen kam es nur vereinzelt zur räumlichen Vermischung der beiden angesprochenen Zellarten (s. Abbildung 6.4). ISH-positive FDZ und blastoide Zellen mit positivem Antigennachweis kamen in geringer Menge und nicht bei allen untersuchten Katzen vor. Zusätzlich waren bei wenigen Katzen Zellen zu erkennen, die für den viralen RNA- und den Antigen-Nachweis gleichzeitig positiv reagierten. Es handelte sich bei diesen Zellen stets um FDZ, die nur in geringer Menge in den Follikelzentren zu sehen waren.

In den Randbereichen der Follikel kamen bei allen untersuchten Katzen positive blastoide Zellen vor. Außer bei der Katze Nr. 204 reagierten diese Zellen nur im viralen RNA-Nachweis positiv. Markierte Zellen kamen in den Randbereichen der Follikel in geringer

Menge vor und waren gleichmäßig in diesen verteilt (s. Abbildung 6.2). ISH- oder IH-positive FDZ konnten in keinem der untersuchten Lymphknoten in dieser Region identifiziert werden. Bei der Katze Nr. 204 fand sich im Vergleich zu den anderen Tieren eine größere Anzahl ISH-positiver Zellen im Randbereich der Follikel. Außerdem konnten vereinzelt blastoide Zellen mit positivem Antigen-Nachweis identifiziert werden. Auffällig war bei diesem Tier, dass nur wenige FDZ in den Keimzentren positive Reaktionen aufwiesen. Im Vergleich zu den anderen Katzen reagierten nach Immunhistologie mehr blastoide Zellen als FDZ positiv.

In Parakortex und Medulla kamen sowohl jeweils einfach als auch doppelt markierte Zellen vor. Dabei fanden sich nur immunhistologisch positive Zellen bei den meisten Katzen in geringerer Menge als ISH- oder ISH/IH-positive Zellen. Bei den doppelt und den jeweils einfach markierten Zellen handelte es sich hauptsächlich um Lymphozyten/Lymphoblasten und Makrophagen, die bei allen untersuchten Katzen in nahezu gleichen Anteilen zu finden waren. Lymphozyten/Lymphoblasten stellten sich dabei mit einem chromatinreichen, runden Zellkern und einem schmalen Zytoplasmasaum dar. Makrophagen waren im Vergleich zu lymphoiden Zellen größer und wiesen im Verhältnis zu den Kernen mehr Zytoplasma auf. Die Zellkerne von Makrophagen stellten sich rund und aufgelockert dar (s. Abbildungen 6.2 und 6.7). Es ist zu beachten, dass bei einem starken ISH-Signal Zellen morphologisch nur nach ihrer Größe zu differenzieren waren, weil in diesem Fall sowohl die Kerne als auch das Zytoplasma diffuse Präzipitate aufwiesen. Ansonsten waren markierte virale Proteine stets im Zytoplasma und virale RNA meist in den Zellkernen lokalisiert. Im Bezug auf doppelt oder einfach markierte Zellen war keine Zellspezifität abzuleiten.

Die Ergebnisse der ISH/IH-Doppelmarkierung sind in der Tabelle 3.2.12 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.13 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises in Lymphknoten.

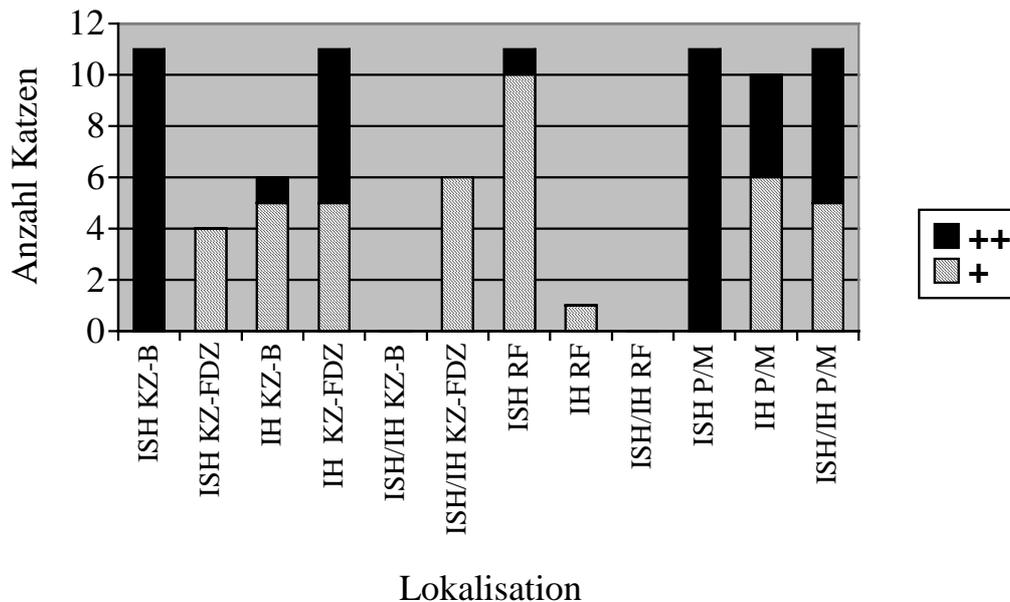
Tabelle 3.2.12: Vergleichende Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises im Lymphknoten nach IH/ISH-Doppelmarkierung

Katze Nr.	Keimzentrum			Randbereich des Follikels			Parakortex/Medulla		
	RNA- pos. (ISH)	Prot.- pos. (IH)	RNA und Prot.- pos. (ISH/ IH)	RNA- pos. (ISH)	Prot.- pos. (IH)	RNA und Prot.- pos. (ISH/ IH)	RNA- pos. (ISH)	Prot.- pos. (IH)	RNA und Prot.- pos. (ISH/ IH)
157	++	+, xx	x	+	-	-	++	+	++
160	++	x	-	+	-	-	++	+	++
162	++	xx	-	+	-	-	++	++	++
163	++	x	-	+	-	-	++	+	++
164	++, x	+, x	x	+	-	-	++	++	+
166	++	x	-	+	-	-	++	++	+
167	++, x	+, xx	x	+	-	-	++	+	+
171	++, x	+, xx	x	+	-	-	++	-	+
175	++, x	+, xx	x	+	-	-	++	+	++
204	++	++, x	-	++	+	-	++	+	+
232	++	xx	x	+	-	-	++	++	++

xx: zahlreiche positive FDZ
 ++: zahlreiche positive blastoide Zellen
 +: vereinzelt positive blastoide Zellen
 x: vereinzelt positive FDZ
 -: keine positiven Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
 IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
 ISH/IH: doppelt markierte Zellen
 FDZ: folliculäre dendritische Zellen

Abbildung 3.2.13: Graphische Darstellung der Verteilung einfach und doppelt markierter Zellen im Lymphknoten nach ISH/IH-Doppelmarkierung



KZ-B: Keimzentrum blastoide Zellen
 KZ-FDZ: Keimzentrum folliculäre dendritische Zellen
 RF: Randbereich des Follikels
 P/M: Parakortex/Medulla

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
 IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
 ISH/IH: doppelt markierte Zellen

+: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

3.2.2.2 Milz

Die Einteilung der unterschiedlichen Kompartimente der Milz entspricht der bei der Auswertung der ISH. Positive Reaktionen sowohl in der ISH als auch in der IH waren bei Zellen der Follikelperipherie und der PALS hinsichtlich der Reaktionsstärke und der Zahl positiver Zellen i.a. gleich. Deshalb wurden positive Zellen der Follikelperipherie und der

PALS zusammen in der Gruppe „Follikelrand“ ausgewertet. In den Follikelzentren der Milz konnten sowohl positive blastoide Zellen als auch positive follikuläre dendritische Zellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 6.9). FDZ kamen dabei ausschließlich in den Follikelzentren vor. Die Morphologie der Zellen und die Verteilung der ISH- oder IH-Präzipitate entsprechen den Angaben bei den Lymphknoten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den Lymphknoten fanden sich in den Follikelzentren der Milz nach Doppelinkubation hauptsächlich FDZ, die sowohl für den viralen Protein- als auch für den viralen RNA-Nachweis in den gleichen Zellen positiv reagierten (s. Abbildungen 6.10 und 6.11). Außer diesen Zellen waren in den Keimzentren aller untersuchten Katzen mehr oder weniger zahlreich nur ISH-positive blastoide Zellen zu erkennen. Anders als in den Follikelzentren der Lymphknoten waren FDZ und blastoide Zellen jeweils gleichmäßig in diesem Kompartiment verteilt (s. Abbildung 6.9). Bei einigen untersuchten Katzen kamen in geringer Menge zusätzlich zu den oben beschriebenen Zellen solche mit ausschließlichem viralem Protein-Nachweis vor. Bei diesen handelte es sich hauptsächlich um FDZ. Auch bei der Untersuchung der Milz nahm die Katze mit der Nr. 204 eine Sonderstellung ein. Bei dieser reagierten ausschließlich blastoide Zellen in den Follikelzentren nach Doppelinkubation positiv. Diese Zellen waren entweder ISH- oder IH-positiv, jedoch nie beides gleichzeitig. Auffällig war außerdem, dass bei dieser Katze, im Vergleich zu den anderen, zahlreiche Zellen in der roten Pulpa sowohl jeweils einfach als auch doppelt markiert waren.

Im Follikelrandbereich zeigten nur blastoide Zellen unterschiedlicher Größe ein positives Signal. Dabei waren bei allen Katzen vereinzelt ausschließlich ISH-positive Zellen nachzuweisen. Ausschließlich immunhistologisch positiv waren vereinzelt Zellen bei 4 Katzen. Nur bei einer Katze (Nr. 157) zeigten sich vereinzelt doppelt markierte Zellen im Follikelrandbereich (s. Abbildung 6.12). In diesem Kompartiment waren positiv reagierende Zellen gleichmäßig verteilt.

In der roten Pulpa von zwei der untersuchten Katzen konnten keine positiven Zellen nachgewiesen werden (Katzen Nr. 162 und 164). Im Vergleich zu den Follikeln waren in der roten Pulpa nur wenige positiv reagierende Zellen zu finden. Bei diesen Zellen handelte es sich hauptsächlich um lymphoide Zellen und Makrophagen. Entsprechend den Ausführungen bei den Lymphknoten wurden diese Zellen, wenn möglich, nach morphologischen Kriterien charakterisiert. Makrophagen und lymphoide Zellen machten jeweils ca. 50% der positiv reagierenden Zellen aus. In diesen Zellen war hauptsächlich virale RNA nachweisbar. Nur bei zwei Katzen fanden sich zusätzlich IH-positive oder doppelt markierte Zellen. Die Ergebnisse

der ISH/IH-Doppelmarkierung sind in der Tabelle 3.2.14 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.15 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises in der Milz.

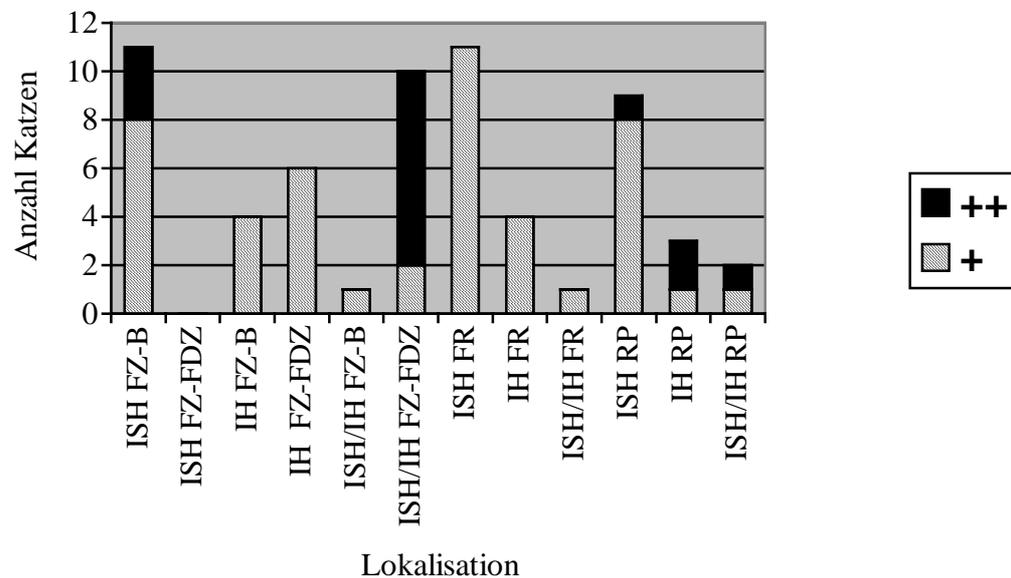
Tabelle 3.2.14: Vergleichende Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises in der Milz nach IH/ISH-Doppelmarkierung

Katze Nr	Follikelzentrum			Follikelrand			rote Pulpa		
	ISH	IH	ISH/IH	ISH	IH	ISH/IH	ISH	IH	ISH/IH
157	+	+, x	xx	+	+	+	+	++	+
160	++	x	xx	+	-	-	+	-	-
162	+	x	xx	+	-	-	-	-	-
163	+	+, x	+, xx	+	+	-	+	+	-
164	++	x	xx	+	-	-	-	-	-
166	+	-	x	+	-	-	+	-	-
167	+	x	xx	+	-	-	+	-	-
171	+	-	xx	+	+	-	+	-	-
175	+	+	x	+	+	-	+	-	-
204	++	+	-	+	-	-	++	++	++
232	+	-	xx	+	-	-	+	-	-

xx: zahlreiche positive FDZ
 ++: zahlreiche positive blastoide Zellen
 +: vereinzelt positive blastoide Zellen
 x: vereinzelt positive FDZ
 -: keine positiven Zellen
 FDZ: folliculäre dendritische Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
 IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
 ISH/IH: doppelt markierte Zellen

Abbildung 3.2.15: Graphische Darstellung der Verteilung einfach und doppelt markierter Zellen in der Milz nach ISH/IH-Doppelmarkierung



FZ-B: Follikelzentrum, blastoide Zellen
 FZ-FDZ: Follikelzentrum, follikuläre dendritische Zellen
 FR: Follikelrand
 RP: rote Pulpa

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
 IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
 ISH/IH: doppelt markierte Zellen

+: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

3.2.2.3 Dünndarm

Bei der Auswertung der Doppelmarkierung im Darm wurden im Bezug auf Epithelien eine Unterteilung in Krypten- und Zottenepithel vorgenommen. Die infiltrierenden Zellen der Lamina propria wiesen in allen Mukosabereichen einen etwa gleich großen Anteil jeweils einzeln oder doppelt markierter Zellen auf.

Positive Zellen fanden sich bei allen untersuchten Katzen sowohl in Epithelien als auch in infiltrierenden Zellen der Lamina propria (s. Abbildungen 6.15 und 6.16). Bei den positiven infiltrierenden Zellen handelte es sich zum größten Teil um lymphoide Zellen. Nur sehr

wenige Makrophagen reagierten nach der Doppelinkubation positiv. Die Zellen wurden, so weit möglich, anhand ihrer Morphologie differenziert (s.oben) (s. Abbildung 6.16). Das Verhältnis von positiven lymphoiden Zellen zu Makrophagen in der Lamina propria war unabhängig davon, ob die Zellen jeweils einfach oder doppelt markiert waren.

Virale RNA konnte mit zunehmendem Abstand zu den basalen Epithelien immer seltener in Epithelzellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war, weniger deutlich als für virale RNA, auch für den Virus-Protein-Nachweis nachvollziehbar (s. Abbildung 6.15). Im Bereich der Krypten fanden sich hauptsächlich doppelt markierte Epithelzellen (s. Abbildung 6.17). Jeweils einfach markierte Zellen kamen ohne ersichtliche Gesetzmäßigkeiten meist in geringer Menge bei fast allen Katzen vor. Im Bereich der Zottenepithelien zeigte sich der oben beschriebene Effekt (unterschiedliche Abnahme der ISH- und IH-Reaktion) darin, dass im Vergleich zu den Epithelzellen der Krypten in den Epithelzellen der Zotten weniger doppelt markierte Zellen zu finden waren. Nur immunhistologisch positive Zellen kamen in den Zottenepithelien vermehrt vor. Epithelzellen, in denen ausschließlich virale RNA nachweisbar war, konnten im Zottenbereich so gut wie nicht mehr gefunden werden (s. Abbildung 6.15).

Infiltrierende Zellen im Bereich der Lamina propria zeigten, außer bei zwei Katzen (Nr. 166 und 167), bei allen untersuchten Tieren in großer Menge positive Reaktionen. Doppelt markierte Zellen waren dabei etwas häufiger zu sehen als jeweils einfach markierte Zellen (s. Abbildung 6.16). Jeweils einfach oder doppelt markierte Zellen waren ohne ersichtliche Gesetzmäßigkeit auf die verschiedenen Schichten der Lamina propria verteilt.

Die Ergebnisse der ISH/IH-Doppelmarkierung sind in der Tabelle 3.2.16 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.17 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises im Dünndarm.

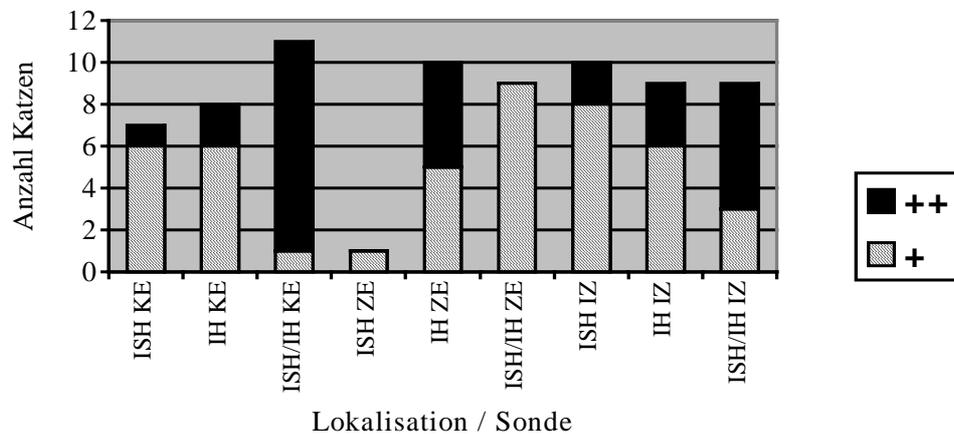
Tabelle.3.2.16: Vergleichende Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises im Dünndarm nach IH/ISH-Doppelmarkierung

Katze Nr.	Kryptenepithel			Zottenepithel			infiltrierende Zellen		
	ISH	IH	ISH/IH	ISH	IH	ISH/IH	ISH	IH	ISH/IH
157	+	+	++	-	++	+	++	++	++
160	-	-	++	-	++	+	+	+	+
162	-	+	++	+	++	+	+	+	++
163	+	+	++	-	+	+	+	+	++
164	-	++	++	-	++	+	-	++	++
166	+	-	++	-	+	+	+	-	-
167	+	-	++	-	+	-	+	-	-
171	+	+	++	-	+	+	+	+	+
175	++	+	++	-	+	+	++	+	++
204	+	+	++	-	-	+	+	+	++
232	-	++	+	-	++	-	+	++	+

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
 IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
 ISH/IH: doppelt markierte Zellen

Abbildung 3.2.17: Graphische Darstellung der Verteilung einfach und doppelt markierter Zellen im Dünndarm nach ISH/IH-Doppelmarkierung



KE: Kryptenepithel

ZE: Zottenepithel

IZ: infiltrierende Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal

IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal

ISH/IH: Doppelt markierte Zellen

+: vereinzelt positive Zellen

++: zahlreiche positive Zellen

3.2.2.4 Knochenmark

Bei der Doppelmarkierung wurden im Knochenmark insbesondere Megakaryozyten den blastoiden Zellen gegenübergestellt. Unter blastoiden Zellen sind alle unter 3.2.2.5 beschriebenen Zellarten zusammengefasst. Bei einer Katze (Nr. 175) lag kein Knochenmark zur Untersuchung vor. Den größten Anteil unter den positiven blastoiden Zellen machten solche aus, in denen ausschließlich virale RNA nachgewiesen werden konnte. Bei allen untersuchten Katzen kamen zusätzlich nur immunhistologisch positive Zellen vor (s. Abbildungen 6.18 und 6.20). 7 Katzen wiesen wenige doppelt markierte blastoide Zellen im Knochenmark auf. Zu beachten ist, dass bei einem starken ISH-Signal die immunhistologischen Präzipitate möglicherweise überlagert wurden und somit manche doppelt markierten Zellen nicht als solche zu erkennen waren.

Bei allen untersuchten Katzen konnte in Megakaryozyten hauptsächlich virales Antigen nachgewiesen werden. Meist war dies in zahlreichen Zellen möglich (s. Abbildungen 6.18

und 6.19). Bei zwei Katzen (Nr. 167 und 171) waren im Knochenmark zusätzlich sowohl ISH-positive als auch doppelt markierte Megakaryozyten in geringer Menge zu erkennen. Zwei weitere Katzen (Nr. 160 und 162) zeigten neben zahlreichen IH-positiven vereinzelt doppelt markierte Megakaryozyten. Virale nachweisbare RNA war in der Regel im Zellkern von positiven Zellen lokalisiert. Manche Megakaryozyten zeigten allerdings eine deutliche zytoplasmatische ISH-Reaktion ohne Beteiligung des Zellkernes. Nachweisbare virale Proteine waren stets im Zytoplasma von positiven Zellen zu sehen. Die Verteilung der beiden Signale in der Zelle wurde bei Megakaryozyten aufgrund ihrer Größe besonders deutlich (s. Abbildungen 6.21 und 6.22).

Die Ergebnisse der ISH/IH-Doppelmarkierung sind in der Tabelle 3.2.18 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.19 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises im Knochenmark

Tabelle 3.2.18: Vergleichende Darstellung des viralen mRNA- und viralen Protein-Nachweises im Knochenmark nach IH/ISH-Doppelmarkierung

Katze Nr.	blastoide Zellen			Megakaryozyten		
	ISH	IH	ISH/IH	ISH	IH	ISH/IH
157	++	+	-	-	+	-
160	++	+	-	-	++	+
162	+	++	+	-	++	+
163	++	+	+	-	++	-
164	++	+	+	-	++	-
166	++	+	-	-	+	-
167	++	++	+	+	++	+
171	++	+	-	+	+	+
175*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
204	++	+	+	-	+	-
232	+	++	+	-	++	+

-: keine positiven Zellen

+: vereinzelt positive Zellen

++: zahlreiche positive Zellen

n.d.: nicht durchgeführt

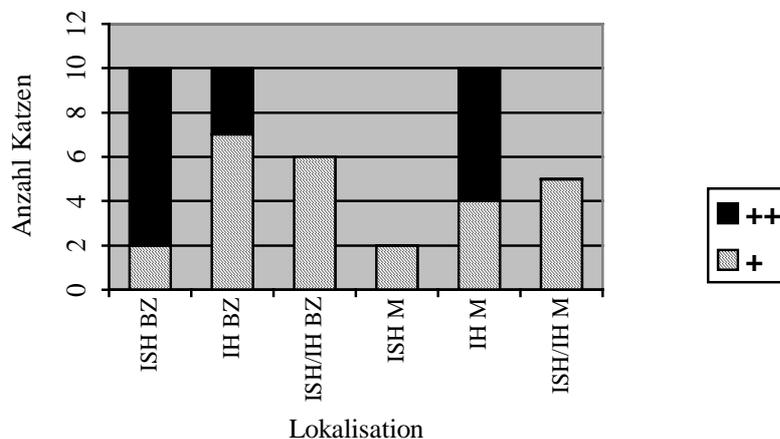
*: Knochenmark nicht in ausreichender Menge im Schnitt vorhanden

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal

IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal

ISH/IH: doppelt markierte Zellen

Abbildung 3.2.19: Graphische Darstellung der Verteilung einfach und doppelt markierter Zellen im Knochenmark nach ISH/IH-Doppelmarkierung



BZ: blastoide Zellen
M: Megakaryozyten
+: vereinzelt positive Zellen
++: zahlreiche positive Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
ISH/IH: doppelt markierte Zellen

3.2.2.5 Thymus

Nach ISH/IH-Doppelmarkierung zeigten sich neben einer unterschiedlich großen Zahl ISH-positiver Zellen nur ganz vereinzelt immunhistologisch positive Zellen. Die Zahl der Lymphozyten mit positivem viralem Antigennachweis war dabei nicht mit der Anzahl ISH-positiver Zellen korreliert. Bei 6 der 11 nach Doppelinkubation untersuchten Katzen konnten ganz vereinzelt zu in etwa gleichen Anteilen IH-positive oder doppelt markierte Zellen im Thymusmark identifiziert werden. Die restlichen Katzen zeigten keine immunhistologischen Reaktionen nach ISH/IH-Doppelmarkierung. Mit einer Ausnahme (Katze Nr. 232) lagen die Virusantigen-positiven Zellen mengenmäßig deutlich unter der Zahl von Lymphozyten, die nach ISH positiv reagierten. Bei der Katze Nr. 232 befanden sich antigen-positive Zellen vornehmlich im Thymusmark. Die Verteilung ISH-positiver Zellen zwischen Rinde und Mark entsprach den Untersuchungen nach ISH-Einzelinkubation.

Die Ergebnisse der ISH/IH-Doppelmarkierung sind in der Tabelle 3.2.19 detailliert dargestellt. In Abbildung 3.2.20 erfolgt eine vergleichende graphische Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises im Thymus.

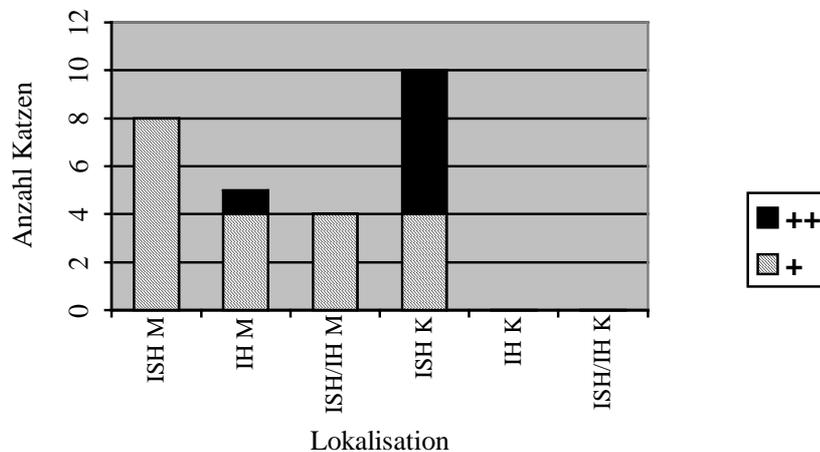
Tabelle 3.2.19: Vergleichende Darstellung des viralen RNA- und viralen Protein-Nachweises im Thymus nach IH/ISH-Doppelmarkierung

Katze Nr.	Medulla			Kortex		
	ISH	IH	ISH/IH	ISH	IH	ISH/IH
157	+	+	+	++	-	-
160	+	+	-	++	-	-
162	+	+	+	+	-	-
163	+	-	+	++	-	-
164	-	+	-	++	-	-
166	+	-	-	+	-	-
167	+	-	-	+	-	-
171	+	-	-	+	-	-
175	-	-	-	-	-	-
204	-	-	-	++	-	-
232	+	++	+	++	-	-

-: keine positiven Zellen
 +: vereinzelt positive Zellen
 ++: zahlreiche positive Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
 IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
 ISH/IH: doppelt markierte Zellen

Abbildung 3.2.20: Graphische Darstellung der Verteilung einfach und doppelt markierter Zellen im Thymus nach ISH/IH-Doppelmarkierung



K: Kortex
M: Medulla
+: vereinzelt positive Zellen
++: zahlreiche positive Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem ISH-Signal
IH: Zellen mit ausschließlichem IH-Signal
ISH/IH: doppelt markierte Zellen

Eine vergleichende Darstellung der in situ-Hybridisierung und gegebenenfalls der Doppelmarkierung aller untersuchten Organe sowie der Ergebnisse der serologischen (AG-Nachweis im Blut (Ruckstuhl, 2000)) und molekularbiologischen (Quantitative PCR (TaqMan)) Untersuchungen von Blut und Organen (Ruckstuhl, 2000) für jede Katze einzeln befinden sich im Anhang (s. 8.1) in tabellarischer Form.

Die beiden letzteren Untersuchungen wurden von Frau Ruckstuhl in Zürich durchgeführt.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, in welchen Zellen im lymphatischen Gewebe, im Knochenmark und im Darm der Katze produktive Virusvermehrung des FeLV stattfindet und welche Verteilungsmuster sich daraus für die einzelnen Organe ableiten lassen. Dabei waren insbesondere follikuläre dendritische Zellen (FDZ) in Milz und Lymphknoten als mögliche Orte der Virusantigenpräsentation ohne Virusvermehrung von besonderem Interesse. Immunhistologische Methoden zum Nachweis der FeLV-Hauptstrukturproteine gp70, p27 und p15E in Paraffinschnitten sind seit mehreren Jahren etabliert (Reinacher und Theilen, 1987, Teebken-Schuler, 1993). Die Methodik wurde für verschiedene Fragestellungen eingesetzt. Hierbei interessierte besonders die differentielle Expression der Virusproteine in einzelnen Geweben (Kovacevic et al., 1997; Kremendahl, 1998; Kipar et al., 2000a). Da über den Nachweis von FeLV-Antigen allerdings, insbesondere bei FDZ, nicht automatisch auf Virusvermehrung in positiv reagierenden Zellen geschlossen werden kann, wurde nunmehr mittels RNA-in situ-Hybridisierung untersucht, inwieweit eine Transkription des Virusgenoms in den verschiedenen Zellen und Geweben stattfindet.

4.1 Etablierung der Methode

Die in situ-Hybridisierung (ISH) wurde mit verschiedenen Digoxigenin-markierten Sonden an fixierten Gewebeschnitten (Mesenteriallymphknoten, Milz, Dünndarm, Thymus und Knochenmark) von 25 experimentell mit FeLV infizierten Katzen durchgeführt. Um die Transkription verschiedener Virusproteine untersuchen zu können, wurden Ribosonden unterschiedlicher Polarität verwendet. Der Nachweis von viraler DNA mittels markierter DNA-Sonden (DNA-DNA-ISH) wäre für die Fragestellung hinsichtlich der Virusvermehrung unbrauchbar, weil mit diesen wahrscheinlich endogene FeLV-Sequenzen, virale doppelsträngige DNA (dsDNA) nach der reversen Transkription und bereits ins Zellgenom integriertes Provirus nachgewiesen würden (s. 2.7). Gegenüber DNA-Sonden bieten RNA Sonden außerdem den Vorteil, dass die Sonden mit gleicher Polarität wie die virale mRNA (positive Polarität) als Negativkontrollen verwendet werden können (Wilkinson, 1990; Zurbriggen, 1993a). Die Sonden gegen Genomabschnitte der viralen Proteine gp70, p27 und p15E wurden gewählt, weil eine starke Expression dieser, als Hauptstrukturproteine des FeLV, zu erwarten war. Außerdem existieren über den immunhistologischen Nachweis dieser

Proteine vergleichbare Untersuchungen (Kästner, 1992; Teebken-Schuler, 1993, Kremendahl, 1998, Kipar et al., 2000a). Die Verwendung einer Sonde gegen U3-RNA steht vor dem Hintergrund, endogene FeLV-Sequenzen von exogenen Infektionen differenzieren zu können (s. unten). U3 wird bei produktiver Virusvermehrung stets gemeinsam mit den übrigen FeLV-Genen transkribiert (s. 4.2).

Die positiven Reaktionen, die mit den verschiedenen Sonden in Zellen und Geweben der untersuchten Katzen zu erzeugen waren, lassen nicht ohne weitere Überlegungen den Schluss auf produktive Virusvermehrung in diesen Zellen zu. Unter Berücksichtigung des Replikationszyklus von Retroviren (s. 2.7) und des Vorkommens endogener und ruhender exogener FeLV-Sequenzen in felines Zellen (Todaro et al., 1973; Okabe et al., 1976) müssen verschiedene Reaktionsmuster in Betracht gezogen werden, bei denen Zellen auch ohne produktive Virusvermehrung in der ISH positiv reagieren könnten.

Prinzipiell ist eine Hybridisierung von markierten RNA-Stängen an zelluläre oder virale dsDNA möglich. Dafür ist es erforderlich, die Ziel-DNA im zu untersuchenden Präparat zu denaturieren, was gewöhnlich durch Erhitzen der Gewebe auf über 90°C vor der Hybridisierung erreicht wird (Wilkinson, 1992; Leitch et al., 1994). DNA, die für virale Sequenzen kodiert, kommt in der FeLV-infizierten Zelle entweder in Form von nicht integrierter oder bereits ins Zellgenom integrierter dsDNA vor (Roe et al., 1997; Goff, 2001). Der Nachweis viraler dsDNA mittels der verwendeten Ribosonden ist allerdings unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen (s. 3.1.3.2) höchst unwahrscheinlich, weil zur Hybridisierung der zellulären DNA als Zielsequenz für die ISH eine erheblich höhere Schmelztemperatur benötigt würde (Leitch et al., 1994). Außerdem müssten an der hybridisierten viralen dsDNA die verwendeten Ribosonden beider Polaritäten binden und somit auch die Negativkontrollen (plus-Strang RNA-Sonde) positive Signale erzeugen. Sehr unwahrscheinlich wäre eine Bindung der Sonden an einzelsträngige DNA-Abschnitte, die während der reversen Transkription in der Zelle vorliegen (Baltimore, 1970; Temin, 1971; Stryer, 1991; Goff, 2001). Möglicherweise kommt es während der fortlaufenden reversen Transkription zu erheblichen sterischen Behinderungen im Bereich der Zielsequenzen, die nach eigener Ansicht eine Bindung der Sonden verhindern.

Bei der Infektion einer Zelle mit FeLV werden pro Virus zwei Kopien des viralen Genoms ins Zytoplasma der Zelle geschleust. Beide RNA-Stränge besitzen die Polarität von zellulärer mRNA und liegen jeweils einzelsträngig vor (Coffin, 1979; Horzinek, 1985). Dadurch wären sie, ebenso wie Transkripte von integrierten viralen Sequenzen, bei der Virusvermehrung nur mit den Nachweis-Sonden durch ISH zu detektieren. Eine Unterscheidung zwischen der

Infektion einer Zelle und produktiver Virusvermehrung wäre somit nicht möglich. In diesem Zusammenhang ist die Zeitspanne zwischen Viruseintritt in die Zelle und der Umschreibung der viralen RNA in dsDNA (reverse Transkription) von Bedeutung. Bei Temin und Baltimore (1972) finden sich Angaben, dass die reverse Transkription unmittelbar nach Viruseintritt in die infizierte Zelle beginnt. Über den genauen zeitlichen Ablauf existieren in der Literatur allerdings keine Angaben. Ebenso sind die auslösenden Signale für den Beginn der reversen Transkription bis heute noch nicht vollständig geklärt (Bohnlein et al., 1989; Das et al., 1999; s. auch 2.7). Unklar ist auch, wieviele Viruspartikel eine Zelle gleichzeitig infizieren können, das heisst, wieviele virale RNA-Genom-Einheiten prinzipiell gleichzeitig in einer Zelle vorliegen können. Um von einem positiven ISH-Signal in einer Zelle auf produktive Virusvermehrung schließen zu können, spielen auf der einen Seite die Sensitivität der ISH und auf der anderen Seite die Anzahl der viralen Transkripte in der Zelle bei produktiver Virusvermehrung eine entscheidende Rolle. Bisher gibt es keine Methode, mit der man eine Kopienzahl einer Nucleinsäuresequenz anhand der Stärke des ISH-Signales exakt berechnen kann. Schätzungen über die Menge von bindenden Sonden im Gewebe stützen sich auf Auszählungen einzelner Signale nach ISH mit radioaktiv markierten Sonden (Leitch et al., 1994). Die Angaben in der Literatur über die Sensitivität von enzymatisch markierten Sonden unterscheiden sich stark (Brahic, 1984; Burns et al., 1987; Höfler, 1987; Nichols et al., 1987; Polac und McGee, 1990; Wilkinson, 1990; Zietz et al., 1991; Fleming et al., 1992). Bei den eigenen Untersuchungen zeigten positiv reagierende Zellen meist ein deutliches Präzipitat, das zu einer flächenhaften oder diffusen Anfärbung der Zelle führte. Punktförmige granuläre Strukturen, die auf den Nachweis einzelner bindender Sonden hinweisen würden, wurden bei den Auswertungen nicht gesehen. Das ISH-Signal in schwach angefärbten Zellen war ebenfalls flächenhaft.

Leitch et al. (1994) sprechen bei einem Infektionsversuch von Lymphozyten mit Epstein-Barr-Virus von mehreren hundert viralen Kopien pro Zelle bei Vorliegen eines deutlich positiven ISH-Signals. Berücksichtigt man eventuell auftretende postmortale, lagerungs- und inkubationsbedingte Verluste der Zielsequenzen in den untersuchten Geweben, so ist der Nachweis von einzelnen intra vitam vorhandenen Transkripten des FeLV als unwahrscheinlich anzusehen (s. 2.13). Außerdem wären bei der Detektion einzelner bindender Sonden in einer Zelle punktförmige Präzipitate nach ISH zu erwarten. Es ist allerdings festzuhalten, dass einem positiven ISH-Signal keine bestimmte Anzahl an bindenden Sonden im Gewebe zugeordnet werden kann. Die Aussage, ob eine Zelle positiv oder negativ reagiert, ist demnach unter Berücksichtigung eines nicht genau zu definierenden Grenzwertes von in

der Zelle bindenden Sonden anzusehen. Das Fehlen eines sichtbaren Signales in einer Zelle schließt deshalb nicht aus, dass eventuell eine geringe Anzahl von Zielsequenzen in der Zelle vorliegen kann. Die Tatsache, dass bei den eigenen Untersuchungen nach ISH keine einzelnen granulären Signale sondern stets mehr oder weniger diffuse Reaktionen in positiv reagierenden Zellen gefunden wurden, läßt den Schluss zu, dass bei positiv reagierenden Zellen eine große Anzahl an Sonden in diesen gebunden hat. Diese Vorstellungen decken sich weitgehend mit Angaben über die Menge an synthetisierter retroviraler mRNA bei produktiver Virusvermehrung. Coffin (1979) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass bei der Vermehrung von Retroviren die viralen RNA-Sequenzen ca. 1% der kompletten zellulären RNA-Synthese ausmacht.

Bei der Transkription des retroviralen Genoms werden während der Replikation prinzipiell beide proviralen DNA-Stränge abgelesen. Allerdings wird dabei mehr RNA positiver Polarität, die als mRNA dienen kann, gebildet, als RNA Stränge negativer Polarität (Goff, 2001). Die in geringerer Anzahl synthetisierten RNA-Stränge müßten entsprechend ihrer Polarität mit den Kontroll-Sonden nachweisbar sein. Die Anzahl dieser bindenden Sonden scheint allerdings im Vergleich zu den Nachweis-Sonden unter der Detektionsgrenze der durchgeführten ISH zu liegen. Dies ergibt sich daraus, dass die Kontroll-Sonden bei den eigenen Untersuchungen stets negativ reagierten und sich keine Unterschiede zu der Inkubation ohne Sondenzusatz zum Hybridisierungsmix feststellen ließen (s. 3.2.2).

Aufgrund der ausgeführten Überlegungen kann unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei einem positiven ISH Signal in einer Zelle aller Wahrscheinlichkeit nach von produktiver Virusvermehrung ausgegangen werden.

4.2 Nachweis proviraler Transkripte

Kommt es in einer FeLV infizierten Zelle zur Virusvermehrung, werden Transkripte der proviralen DNA für zwei Funktionen benötigt. Ein Teil der RNA wird ins Zytoplasma geschleust und dient als Matritze zur Synthese der Strukturproteine des FeLV. Ein zweiter Teil wird als virales Genom beim Zusammenbau des Virus in dieses eingebaut. Dabei werden stets komplette Transkripte des Provirus gebildet. Die Transkription bricht erst im Bereich zelleigener Sequenzen ab (Bohnlein et al., 1989; Das et al., 1999; Goff, 2001). Dies deckt sich mit Angaben, dass env-Genprodukte erst posttranslational in die Strukturproteine gp70 und p15E gespalten werden (Bolognesi et al., 1978; Neil et al., 1980; Rojko et al., 1988). Demnach müssten bei produktiver Virusvermehrung in gleichen Anteilen mRNA der

einzelnen Strukturproteine in der Zelle vorliegen. U3-DNA müsste als beidseits flankierende Sequenz des proviralen Genoms sogar in größerer Menge transkribiert werden. Für den Nachweis der proviralen DNA-Transkripte mittels ISH wäre zu erwarten, dass in einer Zelle alle Anteile des Virusgenoms in gleicher Menge nachweisbar sind. Dies setzt allerdings voraus, dass zum Nachweis verschiedener Genomabschnitte vergleichbare Sonden verwendet werden. Die für eigene Untersuchungen hergestellten Sonden zum Nachweis von gp70-, p27-, p15E- und U3-RNA sind mit dem Farbstoff Digoxigenin markiert. Laut Angaben des Herstellers werden bei der Makierungsreaktion im Abstand von ca. 20 Basen markierte U-DIG-Moleküle in die Sonde eingebaut (DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Roche, Mannheim). Aus den unterschiedlichen Längen der Sonden ergibt sich somit eine unterschiedliche Anzahl an Bindungsstellen für den Anti-Digoxigenin-AK und letztlich eine unterschiedliche quantitative Umsetzung der Farbstoffe NBT/BCIP pro bindender Sonde im Gewebe. Daneben ist zu berücksichtigen, dass die Diffusionseigenschaften der Sonden ins fixierte Gewebe maßgeblich durch die Länge der Sonde bestimmt sind (Oglesbee et al., 1986; Giaid et al., 1989). Diese beiden Effekte dürften bei den unterschiedlichen verwendeten Sonden zu jeweils anderer Sensitivität der ISH geführt haben. Allerdings existieren neben diesen noch zahlreiche weitere nicht quantifizierbare Faktoren, die die Bindung einer Sonde in der Zelle beeinflussen. Leitch und Mitarbeiter (1994) beschreiben sogar Schwankungen der Bindungseigenschaften bei gleichartigen Zellen, die im Präparat unmittelbar nebeneinander liegen. Die Sonden gegen gp70- (409 Basen) und p27- (410 Basen) RNA waren in einer vergleichbaren Anzahl von Zellen nachweisbar. Vergleicht man die Signale nach Inkubation mit der U3- (184 Basen) und p15E- (207 Basen) Sonde, lässt sich ebenfalls eine nahezu gleiche Sensitivität der ISH feststellen. Diese liegt allerdings deutlich unter der nach ISH mit den Sonden gp70 oder p27. Indem die Sonden als Gemisch in der ISH verwendet wurden (gp70-ges. + gp70-B (ISH) oder gp70-ges. + gp70-B + p27 (ISH/IH-Doppelmarkierung)), konnte die Sensitivität der ISH gesteigert werden. Das Verteilungsmuster positiv reagierender Zellen in den einzelnen Organen war dabei für alle Sonden oder Sondenkombinationen vergleichbar.

4.3 Virusreplikation, Antigen- und/oder RNA-Nachweis

Bei den eigenen Untersuchungen konnten in verschiedenen Zellen und Geweben virale RNA und virale Proteine sowohl einzeln als auch gleichzeitig in derselben Zelle nachgewiesen werden. Bei bestimmten Zellarten (z.B. Megakaryozyten) bzw. Entwicklungsstadien von

Zellen (z.B. Enterozyten) konnten Gesetzmäßigkeiten bezüglich des Auftretens von ISH- und IH-Signalen ermittelt werden. Im Zustand produktiver Virusvermehrung ist zu erwarten, dass sowohl virale Proteine als auch virale RNA in so großer Menge synthetisiert werden, dass sie in der Zelle parallel nachweisbar sind.

Unmittelbar post mortem setzen im Organismus autolytische Prozesse ein, bei denen es nach Jackson und Wunner (1991) durch Ribonukleasen zum schnelleren Abbau von RNA als durch Proteasen von Proteinen in der Zelle kommt. Vermutlich spielt dieser Effekt bei den eigenen untersuchten Katzen eine untergeordnete Rolle, weil die Organe unmittelbar post mortem in Paraformaldehyd fixiert wurden, wodurch enzymatische Reaktionen gestoppt werden.

Betrachtet man den Replikationszyklus von Retroviren, ist vorstellbar, dass in einer frühen Phase der Virusvermehrung schon zahlreiche provirale Transkripte in der Zelle vorliegen, virale Strukturproteine aber noch nicht in größerer Menge synthetisiert wurden (Bourne, 1983; Zurbriggen et al., 1993b). Liegt die Antigenmenge unter der Detektionsgrenze der IH, würden virusvermehrende Zellen nur im RNA-Nachweis positiv reagieren. Auf der anderen Seite finden sich in der Literatur Angaben über eine Überproduktion von inneren Strukturproteinen in FeLV infizierten Zellen (Gardner et al., 1971; Hardy., 1982). Ein Teil der inneren Strukturproteine verbleibt dabei, ohne für den Virusaufbau genutzt zu werden, im Zytoplasma virusvermehrender Zellen (Hardy, 1982). Besonders eindrucksvoll läßt sich dies an Blutausstrichen FeLV-infizierter Katzen nachvollziehen, in denen reife Thrombozyten eindeutig als Virusantigen-positiv identifiziert werden können (Hardy et al., 1973b). Eine aktuelle Virusvermehrung ist bei Thrombozyten des strömenden Blutes aber auszuschließen. Vom FeLV ist der starke Tropismus zu mitotisch aktiven Zellen schon seit längerem bekannt (Temin, 1971; Blakeslees und Rojko, 1985; Miller et al., 1990; Roe et al., 1993). In den eigenen Untersuchungen konnte in verschiedenen Geweben eine deutliche Abnahme oder ein Verlust nachweisbarer viraler RNA mit der Differenzierung und Alterung von Zellen beobachtet werden (s. 3.2.2.3-3.2.2.5). Virale Proteine sind demgegenüber häufig auch in enddifferenzierten und alten Zellen zu detektieren (Hoover et al., 1977b; Rojko et al., 1978; Kästner, 1992; Teebken-Schuler, 1993). Bei Untersuchungen an Ratten konnte in Verbindung mit viralen Infektionen eine zelltypenabhängige Regulation der Virustranskription und -translation aufgrund des Differenzierungsgrades von Zellen festgestellt werden (Schneider-Schaulies et al. 1989, 1993). Obwohl derartige Mechanismen für FeLV in der Literatur nicht beschrieben sind, könnten sie dennoch ursächlich an den Differenzen zwischen der Expression viraler Antigenen und der Transkription der viralen DNA trotz produktiver Virusvermehrung beteiligt sein.

Der alleinige Nachweis von viralem Antigen in bestimmten Zellen, insbesondere in Thrombozyten, ist auch ohne Virusvermehrung in diesen zu erklären. Wie andere innere Strukturproteine kann p27 außer bei produktiver Virusvermehrung im Zytoplasma von FeLV-infizierten Zellen in größerer Menge nachgewiesen werden, ohne dass diese für den Aufbau von kompletten Viruspartikeln genutzt werden (Hardy et al., 1973b; Hardy, 1982).

Die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche ohne Aufnahme des Virus in die Zelle ist von verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen (Langerhans-Zellen, interdigitierende Zellen, folliculäre dendritische Zellen, B-Zellen) bekannt (Lydyard und Grossi, 1995b). Insbesondere bei interdigitierenden Zellen im lymphatischen Gewebe ist die Antigenretention ohne produktive Virusvermehrung anzunehmen. Teebken-Schuler (1993) konnte in ihren Untersuchungen bei zahlreichen Katzen virale Strukturproteine in interdigitierenden Zellen nachweisen. In diesen Zellen konnten bei keiner der 25 untersuchten Katzen bei eigenen Untersuchungen virale RNA detektiert werden. Virales Antigen war allerdings auch bei den eigens untersuchten Katzen in IDZ nach Doppelinkubation zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigten folliculäre dendritische Zellen neben positivem Antigen-Nachweis auch deutliche ISH-Signale, die auf Virusvermehrung in diesen Zellen schließen lassen (s. auch 3.2.3.1, 3.2.3.2).

Nach Aufnahme von Viruspartikeln, antigenen Determinanten oder Antigen-Antikörper-Komplexen durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Male und Roitt, 1995) ist es denkbar, dass virale Antigene in diesen Zellen isoliert nachweisbar sind.

Bei der Interpretation eigener Untersuchungen im Bezug auf doppelt oder jeweils einfach markierte Zellen ist zu berücksichtigen, dass bei einem starken ISH-Signal durch die diffuse Anfärbung der Zellen möglicherweise immunhistologische Präzipitate überdeckt wurden.

4.4 Verteilung viraler RNA und viraler Proteine in den Organen

In den untersuchten **Lymphknoten** stellen die Follikelzentren, der Parakortex und die Medulla die Hauptorte der Virusvermehrung dar. Das ist an einer großen Anzahl ISH-positiver Zellen zu erkennen. Trotz der unterschiedlichen Reaktionsintensität der einzelnen Sonden ist diese Verteilung für gp70-, p27-, p15E- und U3-RNA erkennbar.

In den *Follikelzentren* waren hauptsächlich mononukleäre Zellen nach ISH positiv. Die Tatsache, dass die Follikel B-Zell-Areale darstellen (Fossum et al., 1985; Pellas et al., 1990; Blue et al., 1981), sowie die Gestalt der ISH-positiven mononukleären Zellen, lassen darauf schließen, dass es sich bei diesen Zellen vornehmlich um B-Lymphozyten handelt. Ein

geringer Anteil wird möglicherweise von Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen gebildet. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Rojko und Mitarbeitern (1979, 1982) überein, die folliculäre B-Lymphozyten als die für die Virusreplikation wichtigste Zellart im Lymphknoten persistent FeLV-infizierter Katzen ansehen. Verwunderlich ist das Auftreten einiger blastoider runder Zellen in den Follikelzentren, in denen nur virales Antigen nachweisbar war. Bei diesen Zellen könnte es sich um B-Lymphozyten handeln, die virales Antigen ohne Infektion der Zelle präsentieren. Die Antigenpräsentation durch B-Zellen ohne Phagozytenfunktion ist in der Literatur beschrieben (Lydyard und Grossi, 1995). Außerdem ist es denkbar, dass es sich bei den nur immunhistologisch positiven Zellen um Makrophagen handelt, die Antigen phagozytiert haben. Makrophagen in den Follikelzentren waren bei den eigenen Untersuchungen morphologisch nur sehr eingeschränkt zu differenzieren. Das Fehlen als doppelt markiert erkennbarer B-Lymphozyten läßt sich durch das in der Regel starke ISH-Signal erklären, das sich sowohl auf die Zellkerne als auch auf das Zytoplasma erstreckte und auf eine starke Virusvermehrung in diesen Zellen hindeutet. Immunhistologische Präzipitate, die auch bei anderen Untersuchungen (Teebken-Schuler, 1993) in B-Lymphozyten feststellbar waren, wurden dadurch wahrscheinlich überdeckt. Bei dem Auftreten nur immunhistologisch positiver Zellen müssen unterschiedliche Infektionszeitpunkte oder Replikationszustände der Zelllinien aber auch jeder einzelnen Zelle berücksichtigt werden. Nach Beendigung der Virusreplikation in einer infizierten Zelle sind möglicherweise Reste von bereits synthetisiertem Antigen immunhistologisch nachweisbar. Eine produktive Virustranskription, die zu einem ISH-Signal führen würde, wäre allerdings zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich nicht mehr vorhanden. In infizierten Zellen, in denen eine persistente Infektionsform ohne vorherige Virusvermehrung vorliegt, wären weder ein ISH- noch ein IH-Signal zu erwarten. Entsprechend den Ergebnissen von Teebken-Schuler (1993) fanden sich in den Follikelzentren der Lymphknoten meist zahlreiche folliculäre dendritische Zellen (FDZ), die auf ihren sternförmigen Zytoplasmafortsätzen virales Antigen präsentierten. FDZ sind in der Lage, über Fc- und C3-Rezeptoren Antigen-Antikörperkomplexe zu binden, die extrazellulär und in gelöstem Zustand in Lymphfollikeln vorliegen. Durch die Antigenretention können folliculäre B-Lymphozyten über einen langen Zeitraum stimuliert werden (Nossal et al., 1968b; Hanna et al., 1970; Mandel et al., 1981; Witmer und Steinmann, 1994; Roitt et al., 1989). Zusätzlich zu den zahlreichen immunhistologisch positiven FDZ fanden sich bei 6 der 10 nach ISH/IH-Doppelmarkierung untersuchten Katzen wenige doppelt markierte FDZ in den Follikeln. Der Nachweis von viraler RNA läßt auf eine Infektion von FDZ mit anschließender Virusvermehrung schließen. Im Gegensatz zur Milz (s. unten) scheint die

Virusreplikation in FDZ im Lymphknoten entweder nur auf einem niedrigen Niveau stattzufinden oder nur einzelne Zellen zu betreffen. Teebken-Schuler (1993) konnte bei ihren Untersuchungen in FDZ signifikant größere Mengen an p27- als gp70-Antigen feststellen. Im Bezug auf den RNA-Nachweis von gp70 und p27 existieren bei den eigenen untersuchten Katzen allerdings keine Unterschiede. Möglicherweise stellen die produktive Virusvermehrung in FDZ und die selektive Antigenretention durch diese Zellen zwei unabhängige Abläufe dar, die zu Mengenunterschieden beim immunhistologischen Nachweis von gp70 und p27 führen. Eine Virusreplikation in FDZ zusammen mit einer Antigenretention durch FDZ würde das Auftreten zahlreicher IH-positiver und zusätzlich einiger doppelt markierter Zellen bei den eigenen untersuchten Katzen erklären. Erstaunlich ist, dass der Anteil von FDZ, in denen entsprechend den oben genannten Ausführungen Virusreplikation angenommen wird, bei den untersuchten Katzen mit positivem ISH-Signal in den Keimzentren nicht konstant war. Sogar innerhalb eines Lymphknotens konnten geringgradig unterschiedliche Verteilungsmuster positiv reagierender Zellen auftreten. In dem Lymphknoten einer Katze (Nr. 175) fanden sich einzelne Lymphfollikel, in denen vornehmlich FDZ nach ISH positiv reagierten (s. Abbildung 6.6). Andere Lymphfollikel desselben Lymphknotens zeigten allerdings die übliche Dominanz von ISH-positiven B-Lymphozyten in den Follikelzentren des Lymphknotens.

In den *Randbereichen der Follikel* der untersuchten Lymphknoten konnten virusvermehrende Zellen nicht bei allen Katzen und dann auch nur in geringer Menge nachgewiesen werden. Die meist komplett negativen Randbereiche der Follikel nach Inkubation mit der p15E- und der U3-Sonde weisen auf ein niedriges Replikationsniveau der positiven Zellen hin. Wahrscheinlich konnten nur mit den Sonden gp70 und p27 aufgrund deren höheren Sensitivität im Vergleich zu p15E und U3 sichtbare ISH-Reaktionen erzeugt werden. Nach ISH/IH-Doppelinkubation waren bis auf eine Ausnahme in den Randbereichen der Follikel keine viralen Antigene nachweisbar. Vermutlich liegt die vorhandene Antigenmenge bei den ISH-positiven Zellen unterhalb der Detektionsgrenze. Außerdem ist eine Überlagerung der Signale mit dem Verlust der Erkennbarkeit der immunhistologischen Reaktion auch in diesem Fall nicht auszuschließen. Offen bleibt die Frage, warum FeLV für Lymphozyten in dieser Lokalisation im Vergleich zu anderen Regionen des Lymphknotens einen geringen Tropismus aufweist. Erstaunlicherweise konnten in den Randbereichen der Follikel von Milz und Lymphknoten weder positiv noch negativ reagierende Zellen in der Gestalt von FDZ identifiziert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen am lymphatischen Gewebe nach einer HIV-Infektion. Im Gegensatz zu nicht infizierten Lymphknoten konnten

dabei mittels zellspezifischer Marker für FDZ (R4/23) das Verschwinden dieser Zellen demonstriert werden (Naim et al., 1983; Stein et al., 1991).

Der *Parakortex* und die *Medulla* der Lymphknoten stellen hauptsächlich T-Zellen enthaltende Bereiche dar (Fossum et al., 1985; Pellas et al., 1990; Blue et al., 1991). Außerdem befinden sich in diesen Lokalisationen zahlreiche interdigitierende Zellen (IDZ), die als antigenpräsentierende Zellen fungieren und bevorzugt in den zentralen Bereichen des Parakortex anzutreffen sind (Van Rooijen, 1987). Über zahlreiche Zytoplasmafortsätze stehen sie mit anderen IDC sowie T-Lymphozyten in Kontakt (Friess, 1976; Fossum et al., 1985). Neben diesen Zellen kommen in den extrafollikulären Bereichen des Lymphknotens zahlreiche Makrophagen vor (Fossum et al., 1985; Pellas et al., 1990; Blue et al., 1991).

Bei den eigenen Untersuchungen konnten bei fast allen Katzen zahlreiche virusvermehrende Zellen in Parakortex und Medulla gefunden werden. Es handelte sich bei den positiv reagierenden Zellen zum größten Teil um Lymphozyten. Wenige ISH-positive Zellen hatten die Morphologie von Makrophagen. Diese Verteilung ließ sich für alle ISH-Sonden nachvollziehen, wobei die geringere Sensitivität der p15E- und U3-Sonden an einer im Vergleich zu gp70 und p27 geringeren Anzahl positiver Zellen zu erkennen war. Diese Ergebnisse widersprechen anderen Untersuchungen, bei denen in feline T-Zellen keine FeLV-Replikation vermutet wurde (Rojko et al., 1979; Rojko und Olsen., 1984). Hoover und Mitarbeiter (1981) konnten in Makrophagen virämischer Katzen die Replikation von FeLV nachweisen. Bei in vitro Studien war es möglich, Makrophagen mit humanen Lentiviren zu infizieren, die das Virus im Anschluss vermehrten (Meltzer et al., 1990).

Erstaunlicherweise fanden sich im Parakortex und in der Medulla etwa gleiche Anteile jeweils einfach oder doppelt markierter Zellen. Die Phagozytose von Viruspartikeln, der zeitlich unterschiedliche Abbau von viralen Proteinen und Nukleinsäuren sowie unterschiedliche Nachweisgrenzen der ISH und der IH stellen mögliche Erklärungsansätze dar (s. 4.3).

Die Antigenpräsentation durch IDZ konnte in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden. Allerdings zeigten diese Zellen im Vergleich zu FDZ ein vergleichbar schwächeres immunhistologisches Signal (Rojko et al., 1978, Teebken-Schuler, 1993). In den eigenen Untersuchungen waren immunhistologische Präzipitate in IDZ nur andeutungsweise zu erkennen. Virale RNA konnte allerdings in IDZ bei keiner der untersuchten Katzen nachgewiesen werden. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Ergebnis ist eine Antigenpräsentation durch IDZ ohne Infektion und produktive Virusvermehrung. Dies wirft die Frage auf, warum FDZ und IDZ im Lymphknoten trotz ihrer vergleichbaren Funktion als antigenpräsentierende Zellen sich im Bezug auf die Virusvermehrung unterschiedlich

verhalten. Mögliche Ursachen könnten in der wahrscheinlich unterschiedlichen Abstammung begründet liegen, die für FDZ bis heute nicht als gesichert anzusehen ist (s. 2.13). IDZ gehen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks hervor und werden dem mononukleären Phagozytensystem zugeordnet (Lydyard und Grossi, 1995a). Denkbar ist auch, dass die unterschiedlichen Rezeptoren, mit denen FDZ und IDZ Antigen präsentieren (s. 2.13), für die Infektion und Vermehrung von FeLV eine Rolle spielen. Die Klärung dieser Fragen bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Auch in der **Milz** der untersuchten Katzen stellten Zellen in den Keimzentren den Hauptort der produktiven Virusvermehrung dar. Dies bestätigt die Ergebnisse verschiedener Arbeiten, in denen die germinativen Zentren der Milzfollikel aufgrund ihres starken Antigengehaltes als Hauptort der FeLV-Replikation angesehen wurden (Rojko et al., 1978, 1979; Reinacher, 1987a; Hayes et al., 1989; Kästner, 1992; Teebken-Schuler, 1993). In den Keimzentren befinden sich, wie auch in den Zentren der Follikel in den Lymphknoten, hauptsächlich B-Lymphozyten, die zwischen ein Netzwerk aus zahlreichen FDZ eingelagert sind. T-Lymphozyten sind vorwiegend im Bereich des PALS in unmittelbarer Umgebung der Zentralarterie, in der Marginalzone der Follikel und in der roten Pulpa anzutreffen. Vereinzelt können sie auch zwischen die Zellen der Follikelzentren eingestreut vorliegen (Wittmer und Steinmann, 1984; Eikelenboom et al., 1985; Fossum et al., 1985; Roitt et al., 1989; Blue et al., 1991).

Im Gegensatz zu den untersuchten Lymphknoten handelte es sich bei der überwiegenden Zahl ISH-positiver Zellen in den *Keimzentren* der Milz um FDZ. FDZ wurden in der ISH/IH-Doppelmarkierung blastoiden Zellen gegenübergestellt. Sie kamen zahlreich bei 8 und vereinzelt bei 2 der 11 nach Doppelmarkierung untersuchten Katzen in dieser Lokalisation vor. Die Virusvermehrung in FDZ war mit allen untersuchten ISH-Sonden nachweisbar, wobei sich die unterschiedliche Sensitivität der Sonden, wie bereits diskutiert, von der unterschiedlichen Anzahl positiv reagierender Zellen ableiten lässt. Bei der ISH/IH-Doppelmarkierung konnten in den meisten FDZ virales Antigen und virale RNA parallel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen von Kästner (1992), die bei zahlreichen FDZ in der Milz sowohl intrazytoplasmatisch als auch oberflächenassoziiert virales Antigen nachweisen konnte. Mononukleäre Zellen in den Keimzentren zeigten fast ausschließlich ISH-positive Reaktionen. Im Vergleich zu den untersuchten Lymphknoten kamen sie in den Keimzentren der Milz in geringerer Anzahl vor. Wie auch in den untersuchten Lymphknoten ist bei beiden Zellarten von einer Vermehrung

des FeLV auszugehen. Die Tatsache, dass in FDZ im Gegensatz zu mononukleären Zellen häufiger virales Antigen parallel zu viraler RNA nachgewiesen werden konnte, spricht für die These, dass Antigenpräsentation und Virusvermehrung in FDZ unabhängig und gleichzeitig ablaufen können (s. oben). Der positive Antigennachweis und die Art der positiv reagierenden Zellen in den Keimzentren der Milz steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Rojko und Mitarbeitern (1978, 1979) und Teebken-Schuler (1993). Im Gegensatz zu den untersuchten Lymphknoten ist festzuhalten, dass FDZ in der Milz signifikant häufiger Anzeichen einer produktiven Virusvermehrung aufwiesen. Anders als bei den untersuchten Lymphknoten waren die Reaktionen der Keimzentren in der Milz in der untersuchten Katzenpopulation im Hinblick auf die Verteilung von FDZ und B-Lymphozyten einheitlicher. Unterschiedlich reagierende Keimzentren konnten in den untersuchten Milzen, insbesondere bei der Katze Nr. 175, nur in sehr geringem Maße festgestellt werden. Für das Auftreten jeweils einfach markierter Zellen nach Doppelinkubation sei auf die Erklärungsansätze bei der Diskussion der Lymphknoten verwiesen.

Der *Randbereich des Follikels* stellt die Verbindungszone zwischen weißer und roter Pulpa dar, in der sich neben Makrophagen kleine Mengen an T- und B-Lymphozyten befinden. Ein Teil der Makrophagen (sogenannte marginale Metallophile) sind auf die Antigenpräsentation spezialisiert (Eikelenboom et al., 1985; Roitt et al., 1985).

Positive Zellen traten nach Auswertung der ISH für die unterschiedlichen Sonden in den Randbereichen der Follikel nur vereinzelt und auch nur bei 12 der 25 untersuchten Katzen auf. p15E- und U3-RNA waren dabei nur bei 4 bzw. 3 der untersuchten Katzen nachweisbar. Dies spricht für einen geringen Tropismus im Bezug auf die Vermehrung von FeLV für Zellen in dieser Lokalisation. In Abbildung 6.12 erkennt man sowohl Makrophagen als auch Lymphozyten, die positive ISH-Reaktionen aufweisen oder doppelt markiert sind. Über den Funktionszustand von Lymphozyten, in denen nur virale Proteine nachweisbar sind, sei auf die Erklärungsansätze bei der Diskussion der Lymphknoten verwiesen (unterschiedliche Infektionszeitpunkte und Replikationszustände). Im Bezug auf die oben erwähnten spezialisierten Makrophagen (marginale Metallophile) in den Randbereichen der Follikel ließ sich keine spezifische Reaktivität bei dem Nachweis von viralem Protein oder viraler RNA feststellen. Antigenpräsentation und Virusvermehrung scheinen demnach in diesen Zellen, wie auch für die FDZ vermutet, parallel abzulaufen.

Im Bereich der *PALS*, in dem sich überwiegend T-Lymphozyten ansiedeln, konnte ein mit den Randbereichen der Follikel vergleichbar niedriges Niveau an Virusreplikation festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von Teebken-Schuler (1993), bei

denen vereinzelt virales Protein in den Marginalzonen und den PALS nachweisbar war. Für eine Antigenretention oder nachweisbare Antigenpräsentation durch T-Lymphozyten gibt es demnach in der Milz keine Anhaltspunkte.

Ähnlich wie im Lymphknotenmark befinden sich in der *roten Pulpa* der Milz zahlreiche Makrophagen, deren Hauptaufgabe die Phagozytose verbrauchter Erythrozyten ist (Blue und Weiss, 1991). Außerdem siedeln sich in der roten Pulpa zahlreiche B-Lymphozyten und vereinzelt T-Lymphozyten an (Pellas und Weiss, 1990). Für alle drei Zellarten konnten in anderen Lokalisationen der Milz und auch im Lymphknotenmark eine Vermehrung des FeLV nachgewiesen werden. Auch hier ist, wie in anderen Organen, eine unterschiedliche Reaktivität der gleichen Zellarten abhängig von deren Lokalisation in den einzelnen Geweben feststellbar.

Der Virus- oder Antigennachweis in Megakaryozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Granulozyten in der Milz ist in der Literatur häufig beschrieben (Rickard et al., 1968; Hertz et al., 1970; Hoover et al., 1974; Hardy et al., 1973a; Rojko et al., 1978, 1979). In den eigenen Untersuchungen konnten diese Zellen auf Grund der häufig starken Blutfülle der Milz nicht eindeutig identifiziert werden.

Die *Schleimhaut* des **Margen-Darm-Traktes** stellt einen Hauptort für die Vermehrung von FeLV im Organismus dar. Durch den Tropismus zu epithelialen Geweben wird die horizontale Übertragung des FeLV ermöglicht (Jarrett et al., 1973c; Hardy et al., 1973a; Francis et al., 1977; Hoover et al., 1977a). Der Tropismus von FeLV für mitotisch aktive Zellen, die in den basalen Schichten des Darmes, wie auch in anderen epithelialen Geweben, vorkommen, wurde in zahlreichen Untersuchungen bestätigt (Jarrett et al., 1973c, Rojko et al., 1978, 1979; Reinacher und Theilen, 1987; Kästner, 1992; Kovacevic et al., 1997; Kremendahl, 1998; Kipar et al., 2000a). In den eigenen Untersuchungen an Dünndarmabschnitten konnte der Hauptort der FeLV Replikation im Kryptenepithel lokalisiert werden. Bei allen Katzen, bei denen das Darmepithel positive ISH-Reaktionen aufwies, war in nahezu allen Kryptenepithelzellen Virusvermehrung nachweisbar. Diese starke Vermehrung von FeLV im Darm deckt sich nicht mit Ergebnissen von Jarrett et al. (1973b), der in seinen Untersuchungen bei FeLV-infizierten Katzen elektronenmikroskopisch nur wenige Viruspartikel im Darm nachweisen konnte. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Aussagekraft der Elektronenmikroskopie nicht ohne weiteres mit der der ISH zu vergleichen ist. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sind lediglich komplette Viruspartikel beim Virusbudding oder frei im Darmlumen nachweisbar. Die Synthese des

Virus kann mit dieser Methode, wenn überhaupt, erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Virusreplikation erfasst werden.

Mit zunehmendem Abstand zu den proliferierenden Zellen an der Basalmembran differenzieren sich die Zellen der Darmschleimhaut, verlieren ihre Mitoseaktivität und nehmen sekretorische und resorptive Funktionen auf, bis sie als verbrauchte Zellen an den Spitzen der Zotten ins Darmlumen abgegeben werden (Liebich, 1993). Dieser physiologische Vorgang scheint Auswirkungen auf die Virusvermehrung zu haben. Eine kontinuierliche Abnahme der Menge an nachweisbarer viraler RNA mit der Alterung der Epithelzellen konnte für alle benutzten ISH-Sonden gezeigt werden. Dieser Effekt war auch im Bezug auf die Nachweisbarkeit von viralem Antigen zu erkennen. Dabei zeigte allerdings das ISH-Signal eine schnellere Abnahme als das IH-Signal. Ergebnisse anderer immunhistologischer Untersuchungen am Darm nach FeLV-Infektion bestätigen dieses Verteilungsmuster in Krypten- und Zottenepithel. Bei diesen Untersuchungen waren im Darm starke zellspezifische Unterschiede im Bezug auf den immunhistologischen Nachweis von gp70, p27 und p15E zu erkennen (Teebken-Schuler, 1993; Kremendahl, 1998). Auf viraler RNA-Ebene konnten solche Unterschiede bei eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Es zeigte sich lediglich erneut die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen ISH-Sonden an der jeweiligen Anzahl positiv reagierender Zellen.

Die zu beobachtende konstante Abnahme nachweisbarer viraler Proteine und viraler RNA während der Wanderung der Enterozyten zur Zottenspitze könnte damit zusammenhängen, dass zwar die Virusreplikation eingestellt wird, Strukturproteine und virale RNA aber noch in größerer Menge in den infizierten Zellen vorliegen. Durch den unterschiedlich schnellen Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren (Jackson und Wunner, 1991) könnten die Unterschiede zwischen ISH und IH-Reaktion im Bereich der Zottenepithelien erklärt werden. Mononukleäre Zellen in der *Lamina propria* reagierten nach ISH für alle untersuchten Sonden in vergleichbarem Maße positiv wie die Epithelzellen des Darmes. Vier der untersuchten Katzen zeigten trotz positiver Befunde in den Epithelzellen keine positiv reagierenden Zellen im Bereich der Lamina propria. Bei diesen Katzen waren allerdings nur schwache Reaktionen in den Epithelzellen zu sehen. Eventuell lag der virale RNA-Gehalt in den Infiltratzellen dieser Katzen unter der Nachweisgrenze der ISH.

Die ISH-positiven Zellen in der Lamina propria des Darms konnten anhand ihrer Morphologie als Lymphozyten charakterisiert werden. Makrophagen waren in der Lamina propria der untersuchten Katzen nur sehr vereinzelt vorhanden und fielen deshalb bei der Betrachtung ISH-positiver Zellen nicht ins Gewicht. Diese Ergebnisse entsprechen

Untersuchungen von Kremendahl (1998). Hier reagierten im Darm von Katzen ohne bakterielle Sekundärinfektionen überwiegend Lymphozyten für den viralen Proteinnachweis positiv.

Nach ISH/IH-Doppelmarkierung zeigten sich zusätzlich zu ISH-positiven Zellen solche mit alleinigem viralen Proteinnachweis. In manchen ISH-positiven Zellen konnten parallel virale Proteine nachgewiesen werden.

In der Literatur wird die Beteiligung des **Knochenmarkes** an einer FeLV-Infektion bei nahezu 100% der untersuchten Katzen beschrieben (Gardner et al., 1971; Jarrett et al., 1973b; Rojko et al., 1978; Reinacher und Theilen; 1987; Kästner, 1992). Bei dem Nachweis der Strukturproteine p27 und gp70 ergab sich dabei zelltypabhängig eine deutliche differenzielle Expression dieser viralen Antigene (Hoover et al., 1977b; Rojko et al., 1978; Teebken-Schuler, 1993). Bei den eigenen Fällen konnte bei ca. 75% der Katzen im Knochenmark ISH-positiv Zellen gefunden werden. Betrachtet man einzelne Zellen oder Zelllinien, werden erhebliche Unterschiede zwischen dem Nachweis von viralem Antigen und dem Nachweis produktiver Virusvermehrung mittel ISH deutlich. Megakaryozyten werden in der Literatur als die Zellen des Knochenmarks mit der deutlichsten Reaktion nach IPO beschrieben (Laird et al., 1968a, 1968b; Rickard et al., 1968, 1969). Auch in Thrombozyten ist häufig virales Antigen nachweisbar (Cockerell et al., 1976b; Pedersen et al., 1977; Rojko et al., 1978). Bei elektronenmikroskopischen Studien konnte in Megakaryozyten Virusbudding an Zellmembranen und Vesikelmembranen sowie intaktes Virus in Zytoplasmavesikeln nachgewiesen werden (Rickard et al., 1968; Hertz et al., 1970). Kästner (1992) vermutet aufgrund von teils diffus, teils granulär auftretenden immunhistologischen Präzipitaten in Megakaryozyten den Nachweis sowohl von freiem Virusprotein im Zytoplasma als auch von intaktem Virus in Zytoplasmavesikeln. Diese Ergebnisse und Vermutungen stehen teilweise in Diskrepanz zu eigenen Beobachtungen an Megakaryozyten im Knochenmark. Bei der ISH/IH-Doppelmarkierung fielen Megakaryozyten übereinstimmend mit Ergebnissen anderer Untersuchungen (s. oben) durch regelmäßigen und deutlichen viralen Proteinnachweis auf. Das Knochenmark enthielt bei allen 10 im Rahmen der Doppelmarkierung immunhistologisch untersuchten Katzen virale Antigene in meist zahlreichen Megakaryozyten. Erstaunlicherweise zeigten Megakaryozyten nach ISH nur bei 5 der 25 untersuchten Katzen positive Ergebnisse. Bei diesen Katzen waren dabei jeweils nicht mehr als 3 Megakaryozyten pro untersuchtem Knochenmark mit positiven ISH-Signal zu beobachten. Im Vergleich zu der Anzahl ISH-positiver Zellen anderer Zelllinien im Knochenmark kann man zu dem Zeitpunkt

der Euthanasie der Tiere nur von einem sehr niedrigen Niveau an Virusvermehrung in Megakaryozyten ausgehen. In den Untersuchungen von Käßner (1992) zeigten Megakaryozyten von FeLV-infizierten Katzen am häufigsten immunhistologische Präzipitate, wenn die Katzen noch keine Anzeichen FeLV-assoziiierter Erkrankungen oder FeLV-induzierter Tumoren aufwiesen. In älteren Untersuchungen konnten teilweise Megakaryozyten als die einzigen Virusantigen-positiven Zellen des Knochenmarks FeLV-infizierter asymptomatischer Katzen identifiziert werden (Hoover et al., 1974). Möglicherweise kommt es bereits sehr früh nach FeLV-Exposition zur Infektion von Megakaryozyten im Knochenmark und zur Virusvermehrung. Rojko und Mitarbeiter (1979) datieren die Infektion des Knochenmarks mit ausgiebiger Virusvermehrung auf den 7.-21. Tag p.I.. Es wäre denkbar, dass nach einer initialen Vermehrung von FeLV in mitotisch aktiven Vorstufen von Megakaryozyten die Transkription der proviralen DNA beendet wird. Über Megakaryozyten ist von in vitro-Studien bekannt, dass sie, wie auch andere Zellen des Knochenmarks, aus pluripotenten Stammzellen hervorgehen. Megakaryozytäre Vorläuferzellen verlieren allerdings früher als andere Zellen während der Entwicklung ihre eigene mitotische Aktivität und gehen in eine endomitotische Replikation mit der Abschnürung von Thrombozyten über (Kraz und Mertelsmann, 1990). Verbleibende virale RNA und translatierte virale Proteine könnten, ähnlich wie für die Epithelzellen des Darmes bereits diskutiert, in unterschiedlicher Geschwindigkeit in der infizierten Zelle abgebaut werden. Dadurch wären in reifen Megakaryozyten nur noch virale Proteine aber nur selten virale RNA nachweisbar. Wie in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte, dürften Thrombozyten in diesem Fall keine nachweisbare virale RNA enthalten. In Abbildung 6.21 ist eine kernassoziierte deutliche ISH-Reaktion in einem Megakaryozyten im Knochenmark zu erkennen. Im Zytoplasma sind deutlich virale Proteine und schemenhaft virale RNA nachweisbar. Im Gegensatz dazu sieht man in Abbildung 6.22 einen Megakaryozyten, dessen Zytoplasma nach ISH deutlich angefärbt ist. Immunhistologische Signale im Zytoplasma dürften überdeckt sein. Es wäre möglich, dass in diesen beiden Abbildungen zwei verschiedene zeitliche Zustände dargestellt sind. In Abbildung 6.21 wäre aufgrund der positiven Kernreaktion noch aktive Virusvermehrung mit Translation im Zytoplasma sichtbar. In dem Megakaryozyt in Abbildung 6.22 wäre demnach die Transkription proviraler DNA bereits abgeschlossen und nur noch zur Translation ausgeschleuste RNA im Zytoplasma nachweisbar.

Die Ergebnisse bei Megakaryozyten lassen sich in gewisser Weise auch bei den anderen Zellen des Knochenmarks nachvollziehen. Reife, ausdifferenzierte Zellen anderer Zelllinien

reagierten nach ISH nur sehr vereinzelt positiv. Lediglich bei 6 der untersuchten Katzen waren solche Zellen vereinzelt nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten virale Antigene bei anderen Untersuchungen mit zunehmender Differenzierung von neutrophilen Granulozyten vermehrt gefunden werden (Hoover et al., 1977b). In Zellen, die der mittleren und späten Vermehrungsphase zugeordnet wurden, fanden sich in großer Anzahl und bei zahlreichen Katzen ISH-positive Signale. Bei diesen Zellen kann zum Zeitpunkt der Untersuchung von produktiver Virusvermehrung ausgegangen werden. Zu beachten ist, dass auch frühe Vermehrungsphasen von Megakaryoblasten nicht eindeutig zu identifizieren waren und als relativ große, blastoide, ISH-positive Zellen wahrscheinlich denen der mittleren Vermehrungsphase mit zugeordnet wurden. Für die verschiedenen Sonden gp70, p27, p15E und U3 ließ sich bei Knochenmarkzellen eine vergleichbare Verteilung erkennen. Nach ISH/IH-Doppelmarkierung zeigten die meisten blastoiden Zellen, Megakaryozyten ausgenommen, Anzeichen produktiver Virusvermehrung. Nachweisbare virale Proteine waren wahrscheinlich häufig durch die ISH überlagert oder erzeugten doppelt markierte Zellen. Über den Funktionszustand nur IH-positiver Zellen sei auf die Ausführungen bei der Diskussion der anderen Organe verwiesen. Zusätzlich zu den üblichen Stammzellen im Knochenmark konnte bei einer Katze (Nr. 160) ein Lymphfollikel mit ISH-positiven Zellen nachgewiesen werden. Bei der Interpretation der verschiedenen Vermehrungs- und Reifungsstadien blastoider ISH-positiver Zellen ist zu berücksichtigen, dass eine genaue Differenzierung und Zuordnung der Zellen aufgrund der häufig starken Anfärbung nach ISH nicht möglich war. Erstaunlich ist, dass Retikulumzellen als mitotisch aktive Zellen im Knochenmark nach ISH in keinem Fall positiv reagierten. Die Ursachen dafür bleiben unklar.

Der Antigennachweis (Rojko und Olsen, 1984) und der Virusnachweis (Rickard et al., 1968) im **Thymusgewebe** FeLV infizierter Katzen ist in der Literatur beschrieben. In den eigenen Untersuchungen konnte im Thymus bei ca. 70% der Katzen Virusvermehrung mittels ISH nachgewiesen werden. Bei der Hälfte der positiven Katzen waren dabei mehr ISH-positive Lymphozyten in der Läppchenperipherie als im Mark zu erkennen. Dieses Ergebnis deckt sich mit Befunden an anderen untersuchten Organen insoweit, als dass sich im Rindenbereich des Thymus die mitotisch aktiven T-Lymphozyten befinden (Lydard und Grossi, 1995). Dem gegenüber war bei Katzen mit relativ wenig ISH-positiven Zellen im Thymus eine eher gleichmäßige Verteilung zwischen Rinde und Mark zu erkennen. Möglicherweise hängen die beiden unterschiedlichen Verteilungsmuster ISH-positiver Zellen im Thymusgewebe mit unterschiedlichen Aktivierungszuständen des Thymus zusammen. Erstaunlicherweise waren

nach ISH/IH-Doppelmarkierung nur sehr vereinzelt Lymphozyten zu erkennen, in denen virale Antigene nachweisbar waren (s. Abbildung 6.24). Die immunhistologisch positiven Lymphozyten fanden sich im Gegensatz zu den ISH-positiven Zellen vornehmlich im Thymusmark. Möglicherweise verlieren T-Lymphozyten während ihrer Wanderung von der Thymusrinde ins Mark ihre Eigenschaft, FeLV zu vermehren, wodurch im Markbereich in T-Lymphozyten nur noch Reste bereits synthetisierten Antigens immunhistologisch nachweisbar sind. Das Fehlen immunhistologischer Signale in FeLV-vermehrenden T-Lymphozyten in der Thymusrinde ist bei den eigenen Untersuchungen nicht hinreichend zu klären. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass zytoplasmatische immunhistologische Reaktionen auf Grund des hohen Kern/Zytoplasma-Verhältnisses von ruhenden Lymphozyten durch die meist starke ISH-Reaktion zumindest teilweise überdeckt worden sein können und als solche deshalb eventuell nicht zu erkennen waren.

Bei 4 der untersuchten Thymusgewebe konnten im Interstitium ISH-positive Lymphfollikel identifiziert werden. Lymphoide Zellen zeigten für alle untersuchten Sonden ein positives Signal, das dem von Lymphknotenfollikeln vergleichbar war. Aufgrund der Morphologie liessen sich neben lymphoiden Zellen sogar ISH-positive FDZ in diesen Follikeln finden (s. Abbildung 6.25). Es ist nicht geklärt, ob das Auftreten von Lymphfollikeln im Thymus oder im Knochenmark (Katze Nr. 160) mit einer FeLV-Infektion in Verbindung steht (Blue, 1988). Allerdings konnte eindeutig gezeigt werden, dass diese Follikel im Bezug auf die Vermehrung von FeLV in das Infektionsgeschehen involviert sind.

In zahlreichen Untersuchungen wird die differenzielle Expression verschiedener FeLV-Strukturproteine für unterschiedliche Gewebe, Lokalisationen und Zellarten beschrieben. Umfassende und detaillierte Untersuchungen finden sich in Arbeiten von Teebken-Schuler (1993) und Kremendahl (1998), auf die bei der Diskussion der eigenen untersuchten Organe teilweise eingegangen wurde. Es ist festzuhalten, dass die meist zellspezifische Expression der Strukturproteine gp70, p27 und p15E auf RNA-Ebene bei den eigenen Untersuchungen nicht nachvollziehbar war. Wie bereits angesprochen eignet sich allerdings die Art der angewandten Sonden nicht dazu, dieses Phänomen detailliert zu untersuchen. Die unterschiedliche nachweisbare Menge von Antigenen scheint allerdings, wie für FDZ bereits diskutiert, ursächlich nicht mit dem Ausmaß der Virusvermehrung im Zusammenhang zu stehen. In nahezu allen Zellarten, in denen virale Proteine in eigenen und anderen Untersuchungen nachweisbar waren, konnte auch eine produktive Virusvermehrung festgestellt werden.

4.5 Reaktionsmuster der untersuchten Katzen

Während der 14 Wochen dauernden Infektionsperiode zeigten die 25 untersuchten Katzen verschiedene immunologische Reaktionen auf die FeLV-Infektion, die im Folgenden anhand der Ergebnisse der serologischen und geweblichen Untersuchungen diskutiert werden.

Bei einer Katze (Nr. 169) waren während der kompletten Infektionsperiode weder FeLV-Antigen (ELISA) noch Provirus (TaqMan[®]) im Blut nachweisbar (Ergebnisse entnommen der Dissertation von Ruckstuhl 2000, Zürich). Erstaunlicherweise konnte nach der Sektion der Katze in den Organen mittels PCR FeLV-Sequenzen auf niedrigem Niveau nachgewiesen werden (Ruckstuhl, 2000). In der Arbeit von Ruckstuhl (2000) wurde ein Abschnitt des env-Gens zum Nachweis der so genannten „Provirusisolate“ verwendet. Die Ergebnisse wurden in der gleichen Arbeit als Infektion ohne Antigenämie und Virämie interpretiert. Es wurde vermutet, dass bei dieser Katze eine Immunität aufgrund vorwiegend zellulärer immunologischer Mechanismen induziert wurde. Bei den eigenen Untersuchungen konnten mittels ISH mit keiner der verwendeten Sonden und in keinem der untersuchten Gewebe ein positives Signal bei dieser Katze erzeugt werden. Von einer produktiven Virusvermehrung in den untersuchten Organen ist bei diesem Tier folglich nicht auszugehen. Auch immunhistologisch war bei dieser Katze kein virales Antigen nachweisbar. Diese Ergebnisse stehen in keinem Widerspruch zu denen von Ruckstuhl (2000), weil die Sensitivität der PCR deutlich über der der ISH liegen dürfte. Unklar bleibt allerdings die Frage, wie es theoretisch zur Infektion verschiedener Organe kommen kann, ohne dass eine Virämie bestanden haben soll. Nach eigener Ansicht ist nicht auszuschließen, dass möglicherweise in diesem Fall Kreuzreaktionen mit endogenen FeLV-Sequenzen zu positiven PCR-Ergebnissen auf niedrigem Niveau (s. oben) geführt haben könnten. Der Nachweis proviraler Sequenzen auf DNA-Ebene ist nur bei der Detektion des U3 im LTR für eine exogene Infektion beweisend.

Im Folgenden wird kurz auf die Interpretation von einzelnen Reaktionsmustern eingegangen, die bei Katzen ohne konstanten Virus- oder Antigennachweis im Blut nach ISH zu beobachten waren. Im Anhang unter 8.1 (Tabelle 8.4) findet sich eine Aufstellung der serologischen, molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der 25 untersuchten Katzen.

Drei der untersuchten Katzen (Nr. 159, 181 und 224) reagierten während der Infektionsperiode für den Provirus-Nachweis im Blut anfangs positiv. Gegen Ende der Versuchs waren mittel TaqMan[®] im Blut allerdings keine FeLV-Sequenzen mehr nachweisbar. Der Antigennachweis (ELISA) im Blut fiel bei diesen Tieren während des

kompletten Versuches negativ aus. Virale Sequenzen waren wie bei allen untersuchten Katzen, post mortem mittels TaqMan[®]-PCR in den Organen zu detektieren. Betrachtet man die Ergebnisse nach ISH, fällt auf, dass bei diesen Tieren teilweise Virusreplikation, wenn überhaupt, nur in Mesenteriallymphknoten, Knochenmark und Darmepithelzellen nachgewiesen werden konnte. Die Katze Nr. 181 reagierte in der ISH komplett negativ. Die meisten positiven Zellen fanden sich bei den Katzen Nr. 159 und 224 in den untersuchten Lymphknoten. Dabei war auffällig, dass sich entgegen der Verteilung bei anderen Katzen, die deutliche Anzeichen produktiver Virusvermehrung in allen Organen zeigten, die Follikelzentren nicht den Hauptort der nachweisbaren viralen RNA darstellten. Lymphoide Zellen in Parakortex und Medulla zeigten vornehmlich die positiven Reaktionen. Für die Katze Nr. 165 war nach ISH ebenfalls eine Betonung extrafollikulärer Bereiche im Lymphknoten zu beobachten. Auch diese Katze war für den viralen Antigennachweis im Blut immer negativ. Provirale Sequenzen waren im Blut allerdings bis Ende des Versuches nachweisbar.

Bei 4 der untersuchten Katzen (Nr. 161, 173, 174 und 216) waren virale Antigene im Blut nur während der Anfangsphase des Versuches nachweisbar. In unterschiedlichen Wochen p.i. wurde der AG-ELISA im Blut negativ. Provirus war bei diesen Tieren während der kompletten Infektionsperiode im Blut zu detektieren. In der ISH war bei der Katze Nr. 161 zu beobachten, dass in Kombination mit Virusantigennachweis bis zur 10. Woche alle Organe Anzeichen von Virusvermehrung zeigten und positive Zellen in gewohnter Weise in diesen verteilt waren (s. Ergebnisse). Bei Katzen, bei denen nachweisbares virales Antigen aus dem Blut früher eliminiert wurde, reagierten einzelne Organe, insbesondere die Milz, in der ISH negativ (Nr. 173, 174 und 216). Im Lymphknoten waren in einem Fall (Nr. 165), wie oben beschrieben, extrafollikuläre Bereiche stärker positiv als die Follikelzentren. In Knochenmark, Thymus und Dünndarmabschnitten reagierten Zellen in der ISH nur in sehr geringer Anzahl und nur für die Sonden mit hoher Sensitivität (gp70, p27) positiv.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf einer FeLV-Infektion, wird der Zustand einer möglichen Virämie mit Ausbreitung des Virus in alle Organe in der 2.-4. Woche p. i. erreicht (Rojko et al., 1979). Die eigenen Untersuchungen beziehen sich auf den Zustand nach einer 16-wöchigen Infektionsperiode (Ruckstuhl, 2000). Kommt es bei einer Katze zu einer persistenten Infektion, sollte Virusantigen permanent im Blut nachgewiesen werden können. (Hardy et al. 1973a; Jarrett et al., 1973c; Hardy et al., 1976; Hoover et al., 1977a; Reinacher und Theilen, 1987). Bei dem größten Teil der untersuchten Katzen dürfte dieser Infektionsverlauf vorgelegen haben. Virusantigen war im Blut spätestens ab der zweiten

Woche p. i. bis zum Versuchsende mittels ELISA nachweisbar (Ruckstuhl, 2000). Auch provirale Sequenzen konnten mittels PCR sowohl während der Infektionsperiode in Blutzellen, als auch nach der Sektion in den Organen nachgewiesen werden (Ruckstuhl, 2000). Virusvermehrung konnte zum Zeitpunkt der Sektion in allen untersuchten Organen mittels ISH auf unterschiedlich hohem Niveau festgestellt werden (s. 3.1.6).

Bildet sich bei einer Katze nach einer Virämie eine latente Infektion aus, wird die produktive Virusvermehrung eingestellt und die Virämie beendet. Die Ausbildung einer Viruslatenz wird maßgeblich durch die Immunitätslage des erkrankten Tieres beeinflusst (Essex et al., 1971a; Hardy et al., 1973b; Jarrett et al., 1973c). Wie oben beschrieben, sind bei Katzen, die eine Virämie beenden konnten, die Keimzentren lymphatischer Follikel von einer Virusvermehrung nicht so stark betroffen wie bei persistent infizierten Katzen. Möglicherweise waren die Tiere dadurch in der Lage, eine effektive humorale Immunität gegen FeLV auszubilden und die Virämie zu beenden. In der Literatur wird die Bildung virusneutralisierender Antikörper gegen antigene Determinanten des gp70 als wesentliche Voraussetzung zur Beendigung einer Virämie angesehen (Essex et al., 1971a; Hardy et al., 1973b; Jarrett et al., 1973c; Sarma und Lock, 1973; Schaller und Olsen, 1975; Hino et al., 1975, 1976; Fischinger et al., 1976; Hardy et al., 1976; Rojko et al., 1988). Virusvermehrung in lymphoiden Zellen extrafollikulärer Bereiche dürfte demnach auf die Immunantwort keine so starken negativen Auswirkungen haben, obwohl in diesen Lokalisationen trotzdem zahlreiche Zellen von der Virusvermehrung betroffen sein können. Die zur Beendigung einer Virämie erforderlichen immunologischen Leistungen scheinen nicht in dem Maß T-Zell-abhängig zu sein wie die Verhinderung FeLV-assoziiierter Erkrankungen. In der Literatur werden T-Zelldefekte als wesentliche Pathogenese für die Entstehung der FeLV-assoziierten Immunsuppression diskutiert (Hoover et al., 1973; Mathes und Olsen, 1981; Stiff und Olsen, 1982; Engelmann, 1984; Grand et al., 1984; Quackenbush et al., 1989; Hoover et al., 1989). Das Knochenmark, dessen Schädigung für zahlreiche FeLV-assoziierte Erkrankungen wie zum Beispiel die Anämie verantwortlich gemacht wird (Cotter, 1975; Hardy, 1980, 1981; Reinacher und Theilen, 1987; Reinacher, 1989), ist bei den eigenen untersuchten Tieren, die eine Virämie beenden konnten, von der Virusreplikation kaum betroffen. Auf eine mögliche Schädigung der Zellfunktion durch die Vermehrung von FeLV und die möglichen Konsequenzen wird unter 4.6 eingegangen.

4.6 Mögliche Auswirkungen der Virusreplikation auf das Immunsystem

In den eigenen Untersuchungen konnte in verschiedenen Zellen und Geweben Virusvermehrung des FeLV nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, inwieweit der Zustand der produktiven Virusvermehrung im Vergleich zur Expression von viralem Antigen Auswirkungen auf das Immunsystem der infizierten Katze hat.

Die Induktion zytopathischer Effekte in infizierten Zellen ist für feline Retroviren, wie auch für Retroviren anderer Spezies einschließlich des Menschen (HIV), seit längerem bekannt (Klatzmann et al., 1984; Haase, 1986; Pedersen et al., 1987). Die Mechanismen, durch die Retroviren zum Zelluntergang führen, sind bis heute nicht restlos aufgeklärt. Zellschädigende Effekte werden bei FeLV-exprimierenden Zellen in großem Maß durch antikörpervermittelte zytotoxische Effekte bewirkt. Die antigenen Eigenschaften der Virusbestandteile, die auf der Oberfläche FeLV-infizierter Zellen exprimiert werden, bestimmen maßgeblich die Virulenz eines Virusstammes (Sarma und Lock, 1973; Jarrett et al., 1973b, Rojko et al., 1988). Der Struktur des Hüllproteins gp70 werden dabei relevante antigenetische Unterschiede zugeschrieben (Hino et al., 1975, 1976; Fischinger et al., 1976; Riedel et al., 1986; Hoover et al., 1987). Insbesondere für die starke Immunsuppression, die durch die sogenannte FeLV-FAIDS-Variante ausgelöst wird, wird unter anderem eine veränderte Antigenität des Hüllproteins gp70 verantwortlich gemacht (Donahue et al., 1988; Overbough, 1988a; Mullins et al., 1989). Neben der antikörpervermittelten Zytotoxizität sind für FeLV andere Mechanismen der Zellschädigung bekannt. Unintegrierte provirale DNA, die bei der FeLV-FAIDS-Variante vermehrt in infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte, werden zytopathogene Effekte zugeschrieben (Mullins et al., 1986, 1989; Donahue et al., 1991). Die zytopathische Wirkung freier retroviraler DNA in der Zellen ist von in vivo und in vitro Studien auch für das HIV bekannt (Salmon et al., 1988; Pauza et al., 1990; Robinson, 1990). Weller und Mitarbeiter (1980) beschrieben die Akkumulation retroviraler DNA aufgrund permanenter Reinfektion als Grund für die zytopathogenen Effekte auf T-Lymphozyten. Darüber hinaus sind verschiedene weitere Mechanismen für FeLV denkbar die in Folge einer permanenten Reinfektion zum Zelluntergang führen können. Nach Donahue (1991) kommen dabei die Zerstörung der Zellmembran durch Viruseintritt oder Budding, die Veränderung des Wirtsgenoms durch die Integration des Provirus, zytotoxische Effekte durch die Akkumulation von Virusproteinen im Zytoplasma, die gestörte zelluläre Signaltransduktion infolge Virus-Rezeptor-Interaktion und die direkten zytotoxischen Effekte des gp70 in

Betracht. Nach in vitro Studien an HIV-infizierten CD4⁺-Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen der Integration und Replikation des Retrovirus und dem Absterben der Zellen vermutet. Als mögliche Ursachen für den Zelluntergang wurde bei diesen Untersuchungen eine Leckbildung der Zytoplasmamembran durch Virusbudding angenommen (Ho et al., 1987; Kim et al., 1987; Farnet und Haseltine, 1990).

Teebken-Schuler (1992) nimmt aufgrund ihrer Untersuchungen an, dass die FeLV-induzierte T-Zell-abhängige Immunsuppression durch die gp70-Präsenz auf interdigitierenden dendritischen Zellen maßgeblich ausgelöst wird. Außerdem konnte sie im Vergleich zu B-Zell-Arealen auf T-Lymphozyten eine stärkere Expression von gp70 darstellen. Eine Immunsuppression, die durch einen T-Zell-Defekt ausgelöst wird (Cockerell et al., 1976 b, 1977; Stiff und Olsen, 1982), ließe sich über einen antikörpervermittelten zytotoxischen Effekt gegen gp70 gut erklären. Im Bezug auf die Virusvermehrung konnte bei den eigenen Untersuchungen im lymphatischen Gewebe eine größere Affinität zu B-Lymphozyten festgestellt werden. In interdigitierenden dendritischen Zellen war Virusvermehrung in keinem Fall nachweisbar. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Ergebnisse muß berücksichtigt werden, dass bei den Untersuchungen von Teebken-Schuler (1993) und den eigenen Untersuchungen im Bezug auf den Virusstamm und den zeitlichen Verlauf der Infektion von unterschiedlichen Voraussetzungen auszugehen ist. Außerdem handelt es sich im Fall von Teebken-Schuler um natürlich infizierte Katzen wohingegen die eigenen Untersuchungen an Tieren nach experimenteller Infektion vorgenommen wurden. Interessante Vergleiche lassen sich zu Untersuchungen an Lymphknoten von HIV-infizierten Menschen ziehen. Stein und Mitarbeiter (1991) konnten durch ISH mit radioaktiv markierten Sonden retrovirale Sequenzen in T-Lymphozyten und FDZ in den Follikeln nachweisen. Wie in den eigenen Untersuchungen reagierten IDZ nach ISH negativ. In B-Lymphozyten konnten beim Menschen nicht in dem Maß wie in den eigenen Untersuchungen Virusvermehrung nachgewiesen werden. Vielmehr wurde B-Lymphozyten durch die Sezernierung von TNF α eine Stimulation von T-Helferzellen zugeschrieben. Nach Ansicht von Stein und Mitarbeitern (1991) könnte es durch die Stimulation von latent infizierten T-Helferzellen zur Reaktivierung des Retrovirus und zur Virusvermehrung kommen. FDZ würden ein Reservoir für das Retrovirus darstellen und dieses permanent auf neue T-Helferzellen übertragen. Ein solcher Kreislauf wäre nach eigenen Ansichten auch für feline Retroviren denkbar. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass das HIV-Virus einer anderen Gattung der Retroviren angehört als FeLV und wahrscheinlich auch speziesspezifische Unterschiede in der Immunreaktion auf eine Retrovirusinfektion bestehen. Bei den eigenen Untersuchungen ist zu

berücksichtigen, dass die Zuordnung ISH- oder IH-positiver Zellen zu bestimmten Zellarten oder Zelllinien hauptsächlich aus ihrer Lokalisation im Gewebe abgeleitet wurde. Morphologische Unterschiede der Zellen selbst konnten mit einigen Ausnahmen (z. B. FDZ, Megakaryozyten) aufgrund der Anfärbung nach ISH bei der Zuordnung positiver Zellen nur eingeschränkt berücksichtigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei den ISH-positiven lymphoiden Zellen in den Follikelzentren von Milz und Lymphknoten zum Teil um T-Lymphozyten und nicht, wie aufgrund der eigenen Untersuchungen angenommen, um B-Lymphozyten. Die Klärung dieser Frage bedarf weiterführender Untersuchungen.

Durch den Nachweis von transkribierter viraler RNA mittels ISH konnte in verschiedenen Zellen und Zelllinien produktive Virusvermehrung gezeigt werden. Dabei war insbesondere zu klären, ob dendritische Zellen im lymphatischen Gewebe, in denen virales Antigen durch IH nachweisbar ist, mit FeLV infiziert sein können und das Virus produktiv vermehren. In interdigitierenden Zellen im lymphatischen Gewebe konnte bei den eigenen Untersuchungen keine Virusvermehrung nachgewiesen werden, wohingegen diese Zelle virales Antigen präsentieren. Im Bezug auf follikuläre dendritische Zellen zeigte sich eine unterschiedliche Ausprägung der Virusvermehrung und Antigenpräsentation in Milz und Lymphknoten. In der Milz sind FDZ als virusvermehrend anzusehen. Virales Antigen und virale RNA waren meist parallel in diesen Zellen nachweisbar. In den untersuchten Lymphknoten hingegen steht die Antigenpräsentation bei den FDZ im Vordergrund. Dennoch vermehren diese Zellen in den Lymphatischen Follikeln der Lymphknoten FeLV, aber auf niedrigerem Niveau als in den Lymphfollikeln der Milz.

5 Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

1. Die Literaturübersicht befasst sich mit dem derzeitigen Kenntnisstand über die Replikation von Retroviren und der Interpretation, die sich durch den Nachweis exogene und endogene FeLV-Sequenzen in verschiedenen Geweben ergeben. Entsprechend der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Fragestellungen wird auf die Struktur des FeLV, die Pathogenese der Infektion, die Nachweismethoden für Virus und virales Antigen sowie auf die Funktion insbesondere dendritischer Zellen bei der Immunabwehr eingegangen.
2. In der vorliegenden Arbeit wurden Organe von 25 experimentell mit FeLV infizierten Katzen mittels RNA-ISH auf das Vorkommen von viralen RNA-Sequenzen der FeLV-Strukturproteine gp70, p27 und p15E sowie der exogenen FeLV-Sequenzen des U3 untersucht. Die Katzen wurden nach einer 16-wöchigen Infektionsperiode obduziert und Gewebeteile von Mesenteriallymphknoten, Milz, Thymus Knochenmark und Dünndarm zur weiteren Bearbeitung in Formalin fixiert. Außerdem wurden 11 der untersuchten Katzen mit starkem ISH-Signal ausgewählt und mit diesen eine ISH/Immunhistologie (IH)-Doppelmarkierung durchgeführt, um die Transkription und Translation der FeLV-Strukturproteine im Gewebe direkt vergleichen zu können.
3. In den Mesenteriallymphknoten stellen folliculäre lymphoide Zellen den Hauptort der produktiven Virusvermehrung dar. In folliculären dendritischen Zellen (FDZ) konnte virale RNA nicht in einer so großen Zahl von Zellen nachgewiesen werden wie virale Strukturproteine. Dies kann als Präsentation von Strukturproteinen durch FDZ interpretiert werden. Zellen in extrafolliculären Bereichen, ausgenommen interdigitierende dendritische Zellen (IDZ), vermehren FeLV auf hohem Niveau, haben also starke ISH- und IH-Signale.
4. Im Milzgewebe ist produktive Virusvermehrung (ISH+/IH+) regelmäßig und hauptsächlich in FDZ nachweisbar. Lymphozyten weisen im Vergleich zu FDZ einen geringeren viralen mRNA-Gehalt auf. Der FeLV-Antigen- und oder RNA-Nachweis laufen in den Zellen der Milz nahezu parallel ab.

5. Im Dünndarm stellen mitotisch aktive Epithelzellen den Hauptort produktiver Virusvermehrung dar. Mit zunehmender Differenzierung dieser Zellen kommt es zum Abbruch des Replikationszyklus und zum unterschiedlich schnellen Abbau von viraler RNA und viralen Proteinen.
6. In noch nicht ausdifferenzierten Zellen des Knochenmarks findet die Replikation des FeLV auf hohem Niveau statt. In reifen Zellen scheint die Replikation des FeLV ähnlich wie im Darmepithel in der Regel eingestellt zu werden, auch wenn virale Antigene, insbesondere in Megakaryozyten, weiterhin nachweisbar sind.
7. Im Thymus findet, wie auch die anderen untersuchten Organe, bei persistent infizierten Tieren regelmäßig eine Virusreplikation statt. Lymphozyten im Rindenbereich vermehren FeLV dabei in größerer Zahl als Zellen im Thymusmark.
8. Die Transkription von verschiedenen Abschnitten des proviralen FeLV-Genoms scheint in der virusreplizierenden Zelle parallel abzulaufen. Einen Hinweis für diese These stellen die vergleichbaren Verteilungsmuster ISH positiver Zellen in den untersuchten Organen nach Inkubation mit den Sonden gp70, p27, p15E und U3 dar.
9. Katzen, die eine wirksame Immunität mit Beendigung einer Virämie nach FeLV-Infektion entwickeln konnten, zeigten im Vergleich zu persistent infizierten Katzen ein anderes Verteilungsmuster der Virusvermehrung im lymphatischen System. FDZ und B-Lymphozyten, deren Funktionen als wesentlich für die Ausbildung einer humoralen Immunität anzusehen sind, waren bei transient infizierten Katzen im Vergleich zu persistent infizierten Tieren von der Virusvermehrung in geringerem Maß betroffen.

Summary

1. The literature review summarizes the current state of knowledge concerning the replication of retroviruses and the interpretation of results which are obtained for demonstration of exogenous and endogenous FeLV sequences in different tissues. With regards to the questions this study addresses, the structure of FeLV, the pathogenesis of FeLV infection, methods to demonstrate virus and viral antigen as well as the function especially of dendritic cells in immune response are discussed.
2. The present study examines tissues from 25 experimentally FeLV-infected cats by RNA-ISH for the presence of viral RNA sequences of the FeLV structural proteins gp70, p27 and p15E as well as exogenous FeLV sequences of U3. Cats were necropsied 16 weeks post infection and tissue samples from mesenteric lymph nodes, spleen, thymus, bone marrow and small intestine were fixed in formalin for further examination.
Furthermore, tissues from cats with a strong ISH signal were selected for ISH/immunohistology (IH) double staining in order to demonstrate transcription and translation of the FeLV structural proteins in tissues.
3. In mesenteric lymph nodes, follicular lymphatic cells represent the major site of productive viral replication. In follicular dendritic cells, viral RNA was demonstrated in a lower number of cells than viral structural proteins. Cells in extra follicular areas - except for interdigital dendritic cells - replicate FeLV at a high level which is recognizable by the presence of both, high ISH and high IH signals.
4. In splenic tissue, productive viral replication is regularly seen in and mainly restricted to follicular dendritic cells. Compared to follicular dendritic cells, lymphocytes exhibit a lower amount of viral RNA. FeLV antigen and RNA demonstration provide similar results.
5. In the small intestine, mitotically active epithelial cells represent the major site of productive viral replication. With increasing differentiation of these cells replication ceases and viral RNA and viral protein are degraded at different rates.

6. In bone marrow, precursor cells exhibit FeLV replication at a high level. Mature cells, similar to intestinal epithelial cells, seem to have stopped FeLV replication, though viral antigens can still be demonstrated, especially in megakaryocytes.
7. The thymus, like all other tissues examined, regularly exhibits viral replication in persistently infected animals. Cortical lymphocytes replicate FeLV to a higher degree than cells in the medulla.
8. The transcription of the different sequences of the proviral FeLV genome seems to occur in parallel in cells replicating the virus. The comparable distribution patterns of ISH-positive cells when demonstrating gp70, p27, p15E and U3 sequences support this hypothesis.
9. Cats which have developed an effective immunity and terminated the FeLV viraemia showed a different pattern of viral replication in lymphatic tissues. Follicular dendritic cells and B cells, which are mainly involved in the development of humoral immunity, only showed a low amount of viral replication in transiently infected cats compared to persistently infected cats.

6 Abbildungen

Abbildung 1: Lymphknoten, positive Lymphozyten zahlreich im Follikelzentrum (weißer Pfeil) und Parakortex, vereinzelt positive Zellen im Randbereich des Follikels (schwarzer Pfeil); ISH p27 mit Gegenfärbung (Papanicolaus Hämatoxylin), Katze Nr. 164, Objektivvergrößerung 20x, Nomarski-Interferenzkontrast

Abbildung 2: Lymphknoten, ISH- (blau) und IH- (braun) positive Zellen hauptsächlich in Follikelzentren, Parakortex und Medulla, unterschiedliche Verteilung zwischen nachweisbarem viralem AG (hauptsächlich Follikelzentren) und viraler RNA (auch viel Reaktion im Parakortex); Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 204, Objektivvergrößerung 10x

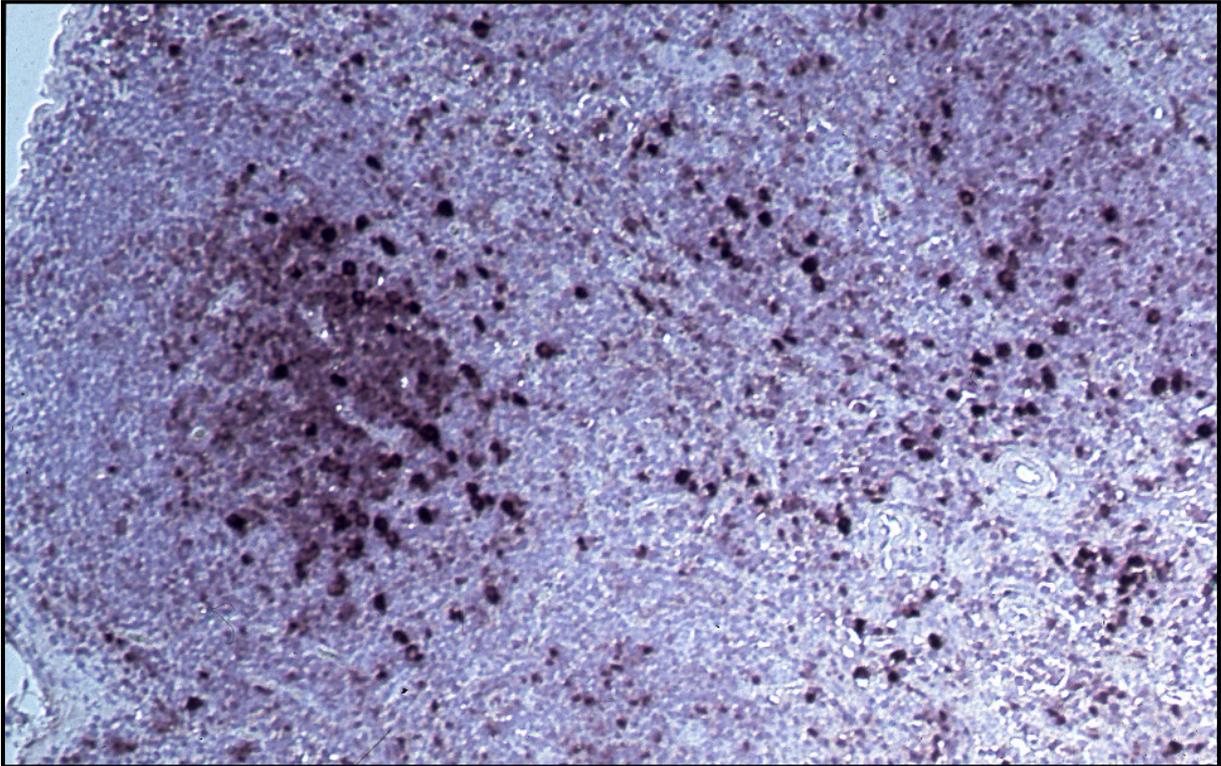


Abbildung 1

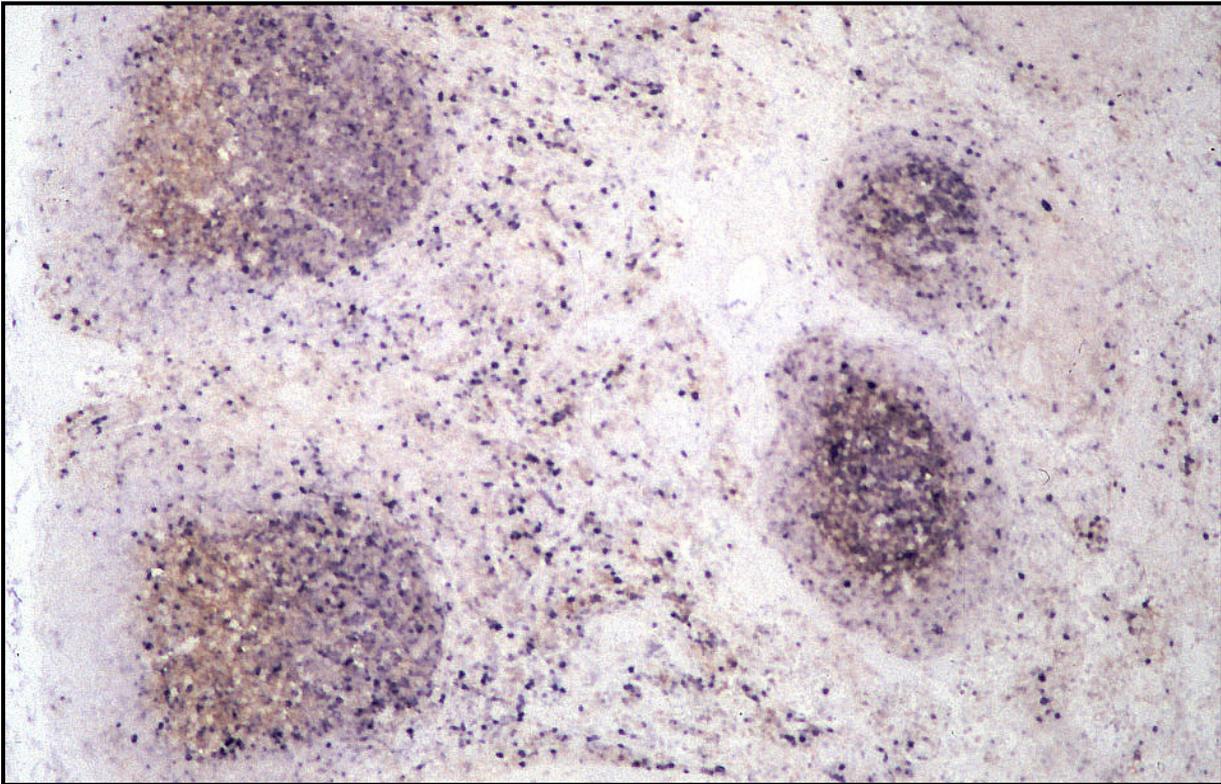


Abbildung 2

Abbildung 3: Lymphknoten, doppelt markierte FDZ (große Pfeile; blau und braun) und ISH-positive Lymphozyten (kleine Pfeile; blau) im Follikelzentrum gleichmäßig verteilt; Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 167, Objektivvergrößerung 20x

Abbildung 4: Lymphknoten, ISH-positive Lymphozyten (großer Pfeil; blau) neben IH-positiven FD-Zellen (kleiner Pfeil; braun) räumlich getrennt im Follikelzentrum; Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 157, Objektivvergrößerung 20x

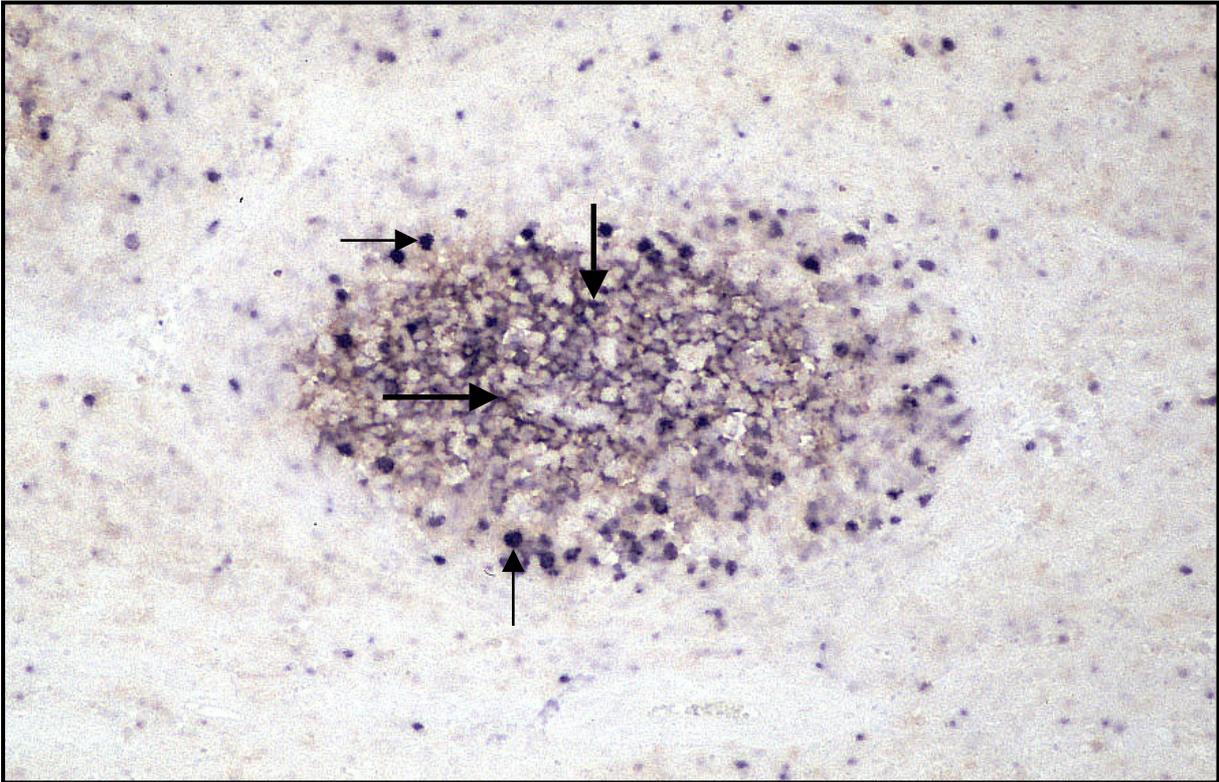


Abbildung 3

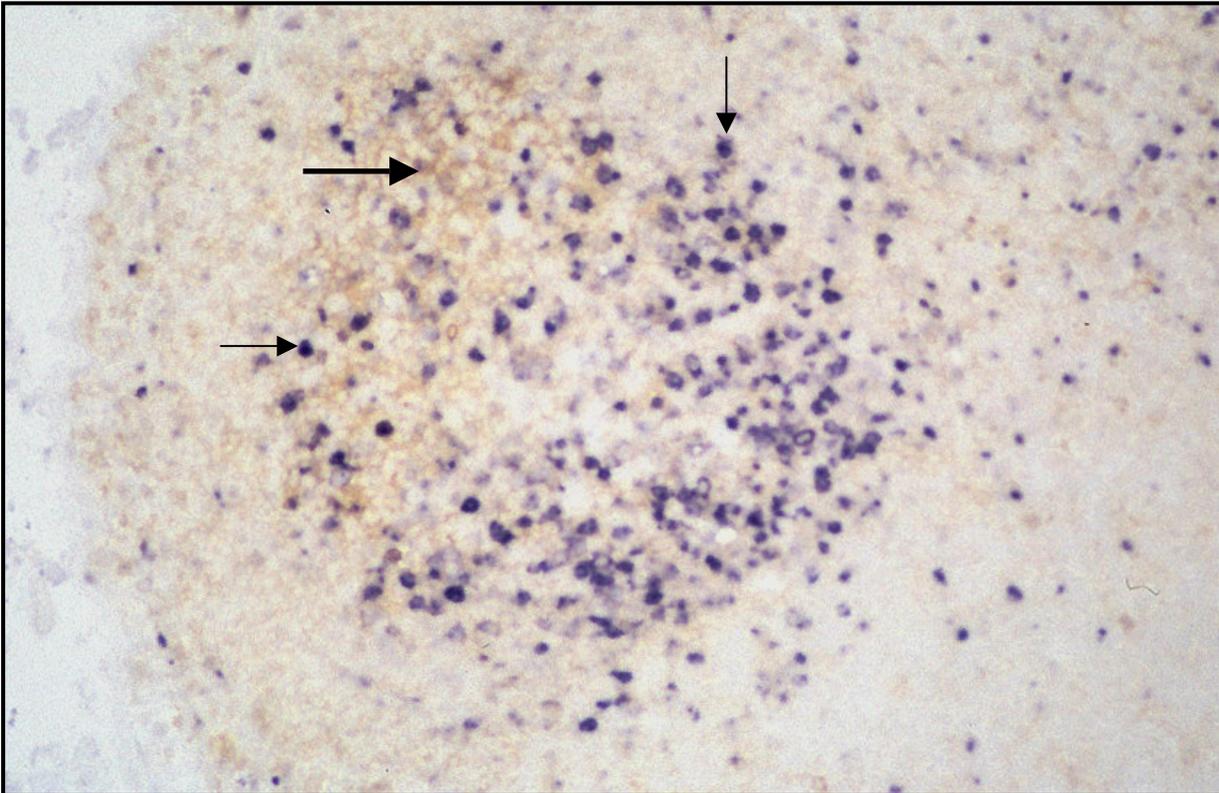


Abbildung 4

Abbildung 5: Lymphknoten, positive Lymphozyten (große Pfeile) und FD-Zellen (kleine Pfeile) im Follikelzentrum, im Randbereich des Follikels und im Parakortex vereinzelt positive Lymphozyten; ISH, gp70, Katze Nr. 164, Objektivvergrößerung 40x, Nomarski-Interferenzkontrast

Abbildung 6: Lymphknoten, Netzwerk aus zahlreichen positiven FD-Zellen im Follikelzentrum (große Pfeile), am Follikelrand ganz vereinzelt positive Lymphozyten (kleiner Pfeil); ISH, gp70 mit Gegenfärbung (Papanicolaus Hämatoxylin), Katze Nr. 175, Objektivvergrößerung 40x, Nomarski-Interferenzkontrast

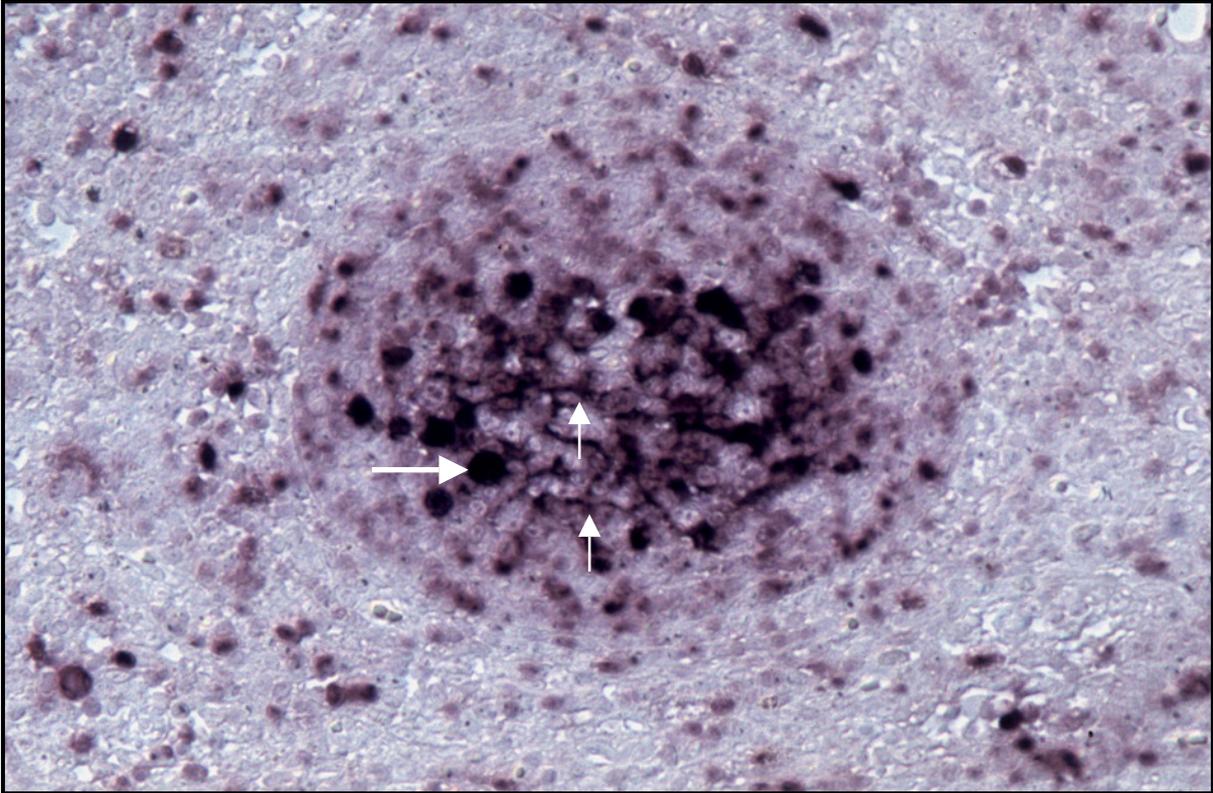


Abbildung 5

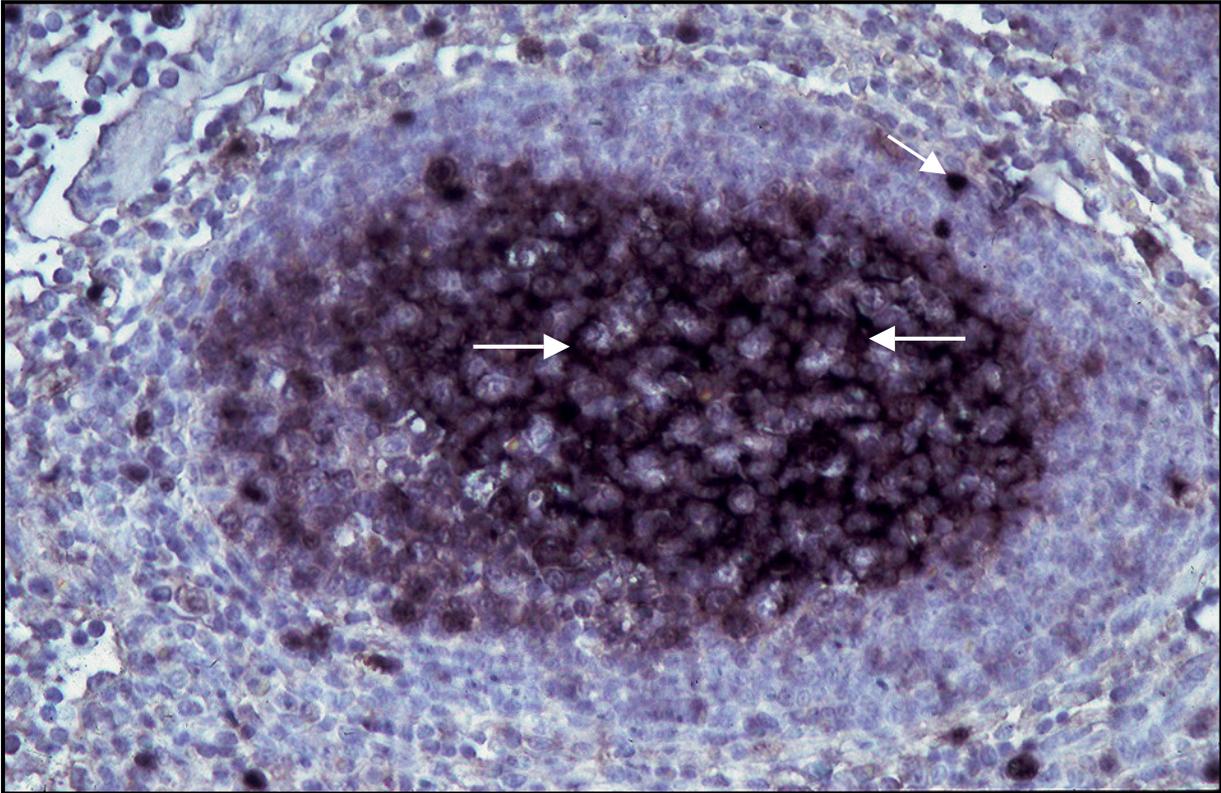


Abbildung 6

Abbildung 7: Lymphknoten, ISH- (blau), IH- (braun) sowie doppelt-markierte Makrophagen (große Pfeile) und Lymphozyten (kleine Pfeile) im Lymphknotenmark, RNA-Nachweis überwiegend im Kern, Antigennachweis im Zytoplasma, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 164, Objektivvergrößerung 100x

Abbildung 8: Milz, zahlreiche positive Lymphozyten und FD-Zellen im Follikelzentrum, in der PALS vereinzelt positive Lymphozyten (schwarzer Pfeil zeigt Zentralarterie der PALS); wenige ISH-positive Zellen in der roten Pulpa (weiße Pfeile); ISH, gp70 mit Gegenfärbung (Papanicolaus Hämatoxylin), Katze Nr. 164, Objektivvergrößerung 20x, Nomarski-Interferenzkontrast

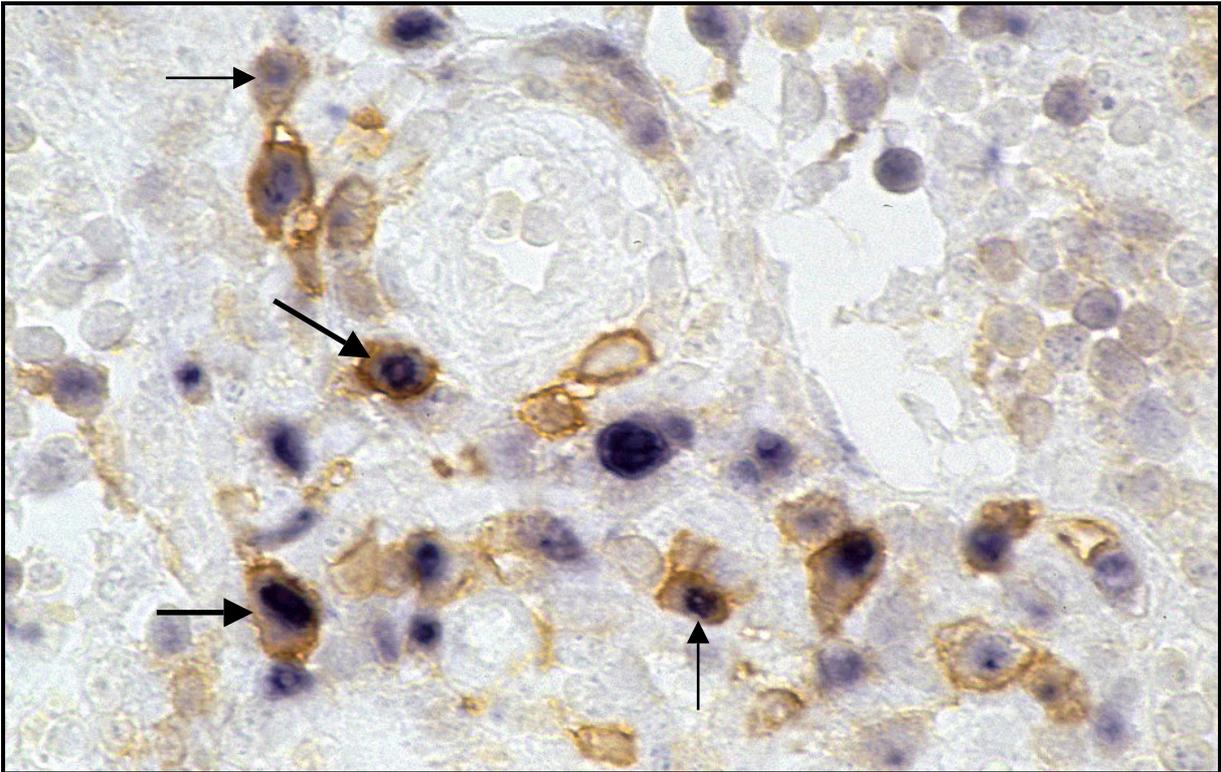


Abbildung 7

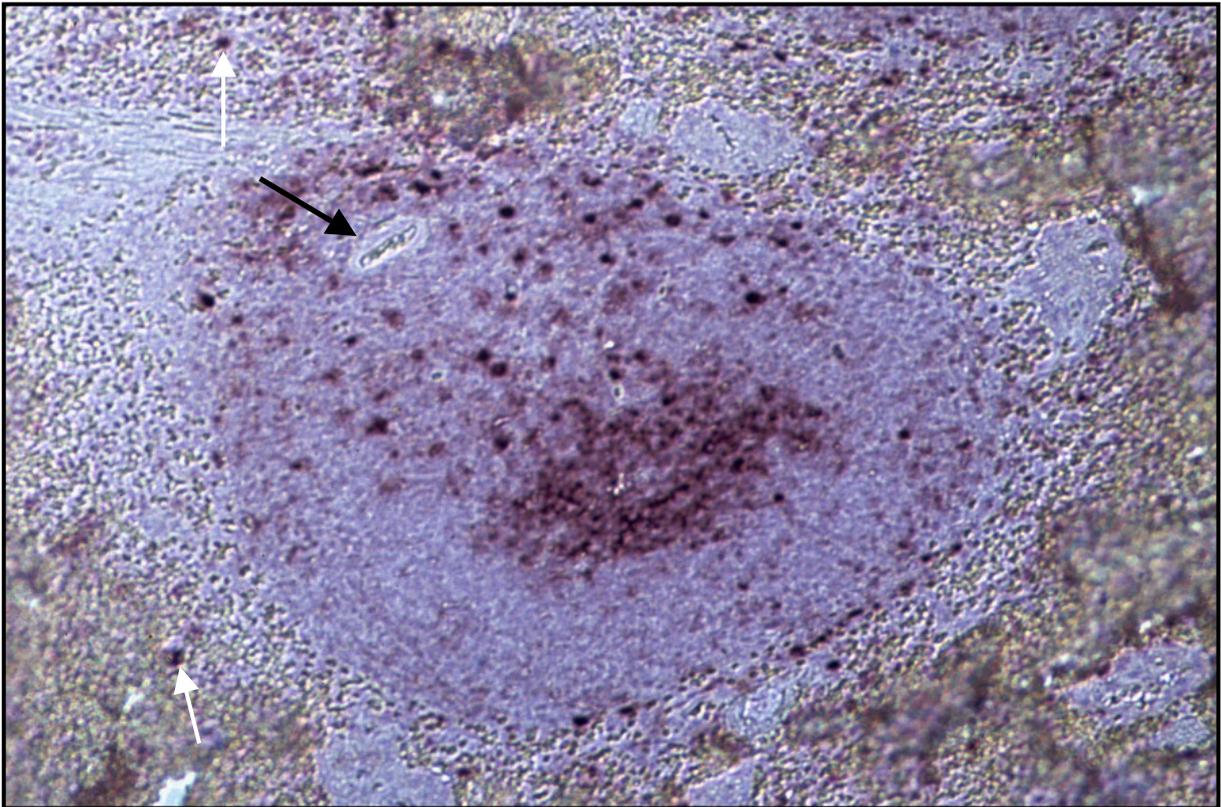


Abbildung 8

Abbildung 9: Milz, ISH-positive Lymphozyten zahlreich im Follikelzentrum und vereinzelt in der PALS (schwarze Pfeile; blau), zusätzlich teils einfach und teils doppelt markierte FDZ (weißer Pfeil) im Keimzentrum; Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 160, Objektivvergrößerung 20x

Abbildung 10: Milz, Netzwerk aus positiven FDZ im Keimzentrum, zahlreiche Zellen mit viralem RNA-Nachweis (blau), vereinzelt virale Proteine (braun) in den gleichen Zellen nachweisbar; Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 167, Objektivvergrößerung 40x

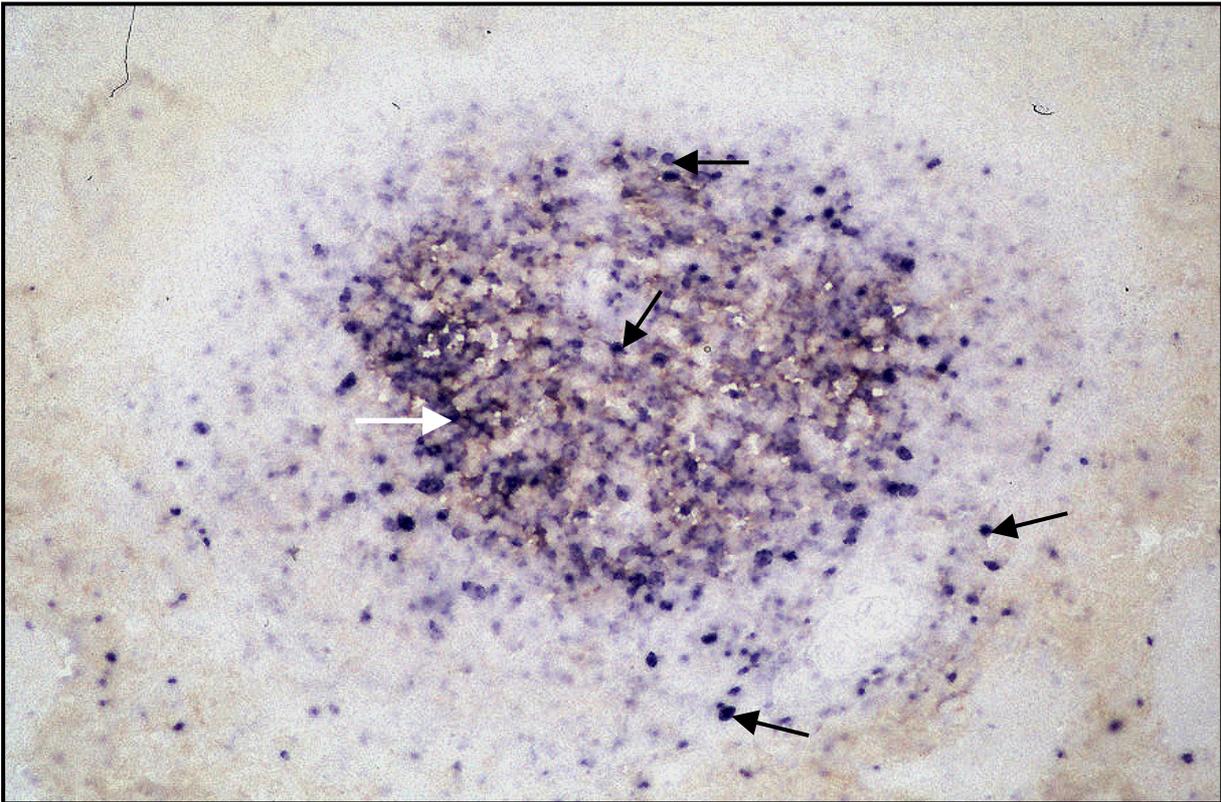


Abbildung 9

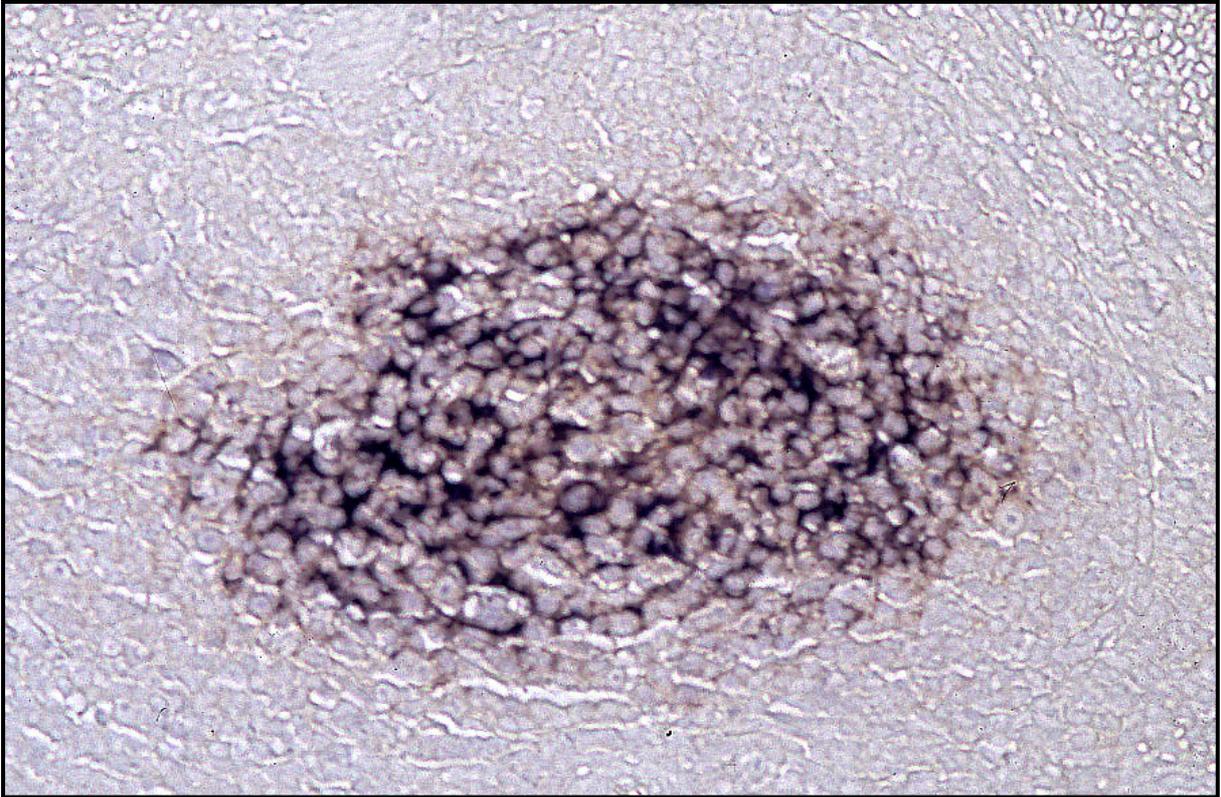


Abbildung 10

Abbildung 11: Lymphknoten, ISH-positive (weißer Pfeil, blau), und doppelt markierte (schwarzer Pfeil, blau und braun) FDZ im Keimzentrum, Antigen und virale mRNA hauptsächlich in Fortsätzen von dendritischen Zellen lokalisiert, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 222, Objektivvergrößerung 100x

Abbildung 12: Milz, ISH- (blau), IH- (braun) und doppelt-markierte Makrophagen (großer Pfeil) und Lymphozyten (kleine Pfeile) im Randbereich des Follikels; RNA-Nachweis überwiegend im Kern, Antigennachweis im Zytoplasma; Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 157, Objektivvergrößerung 100x

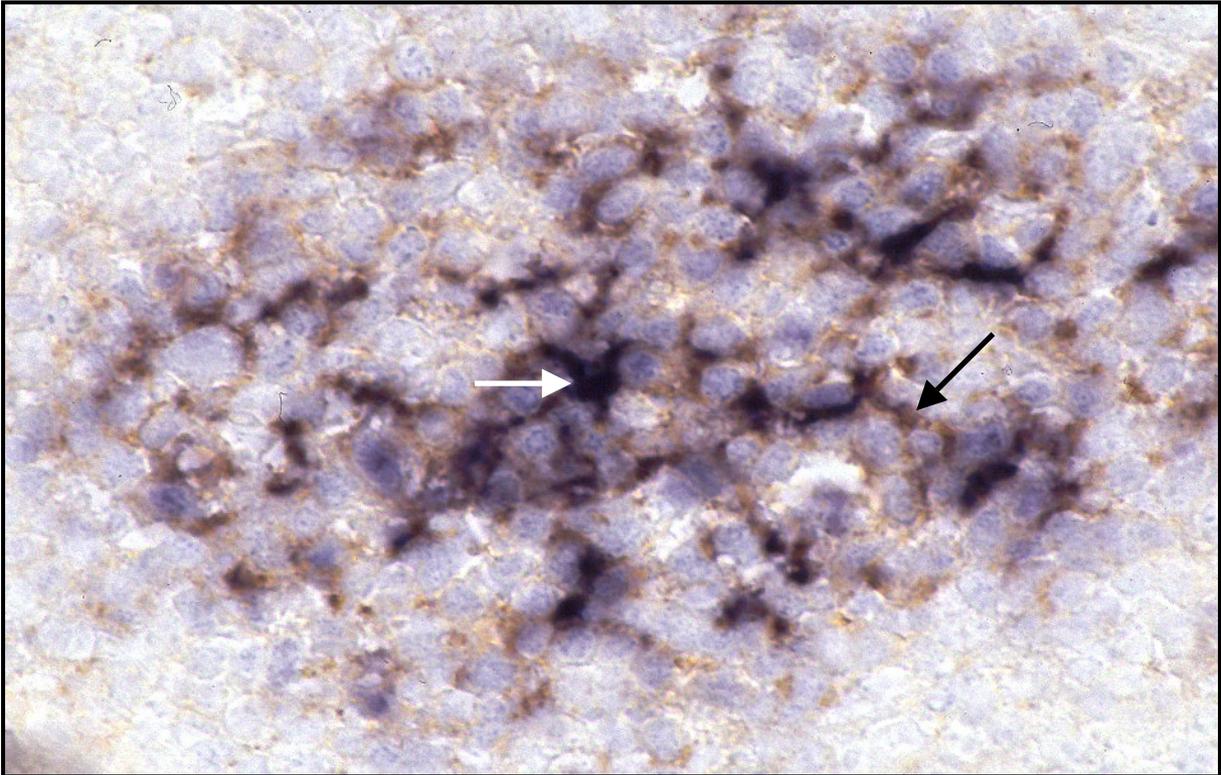


Abbildung 11

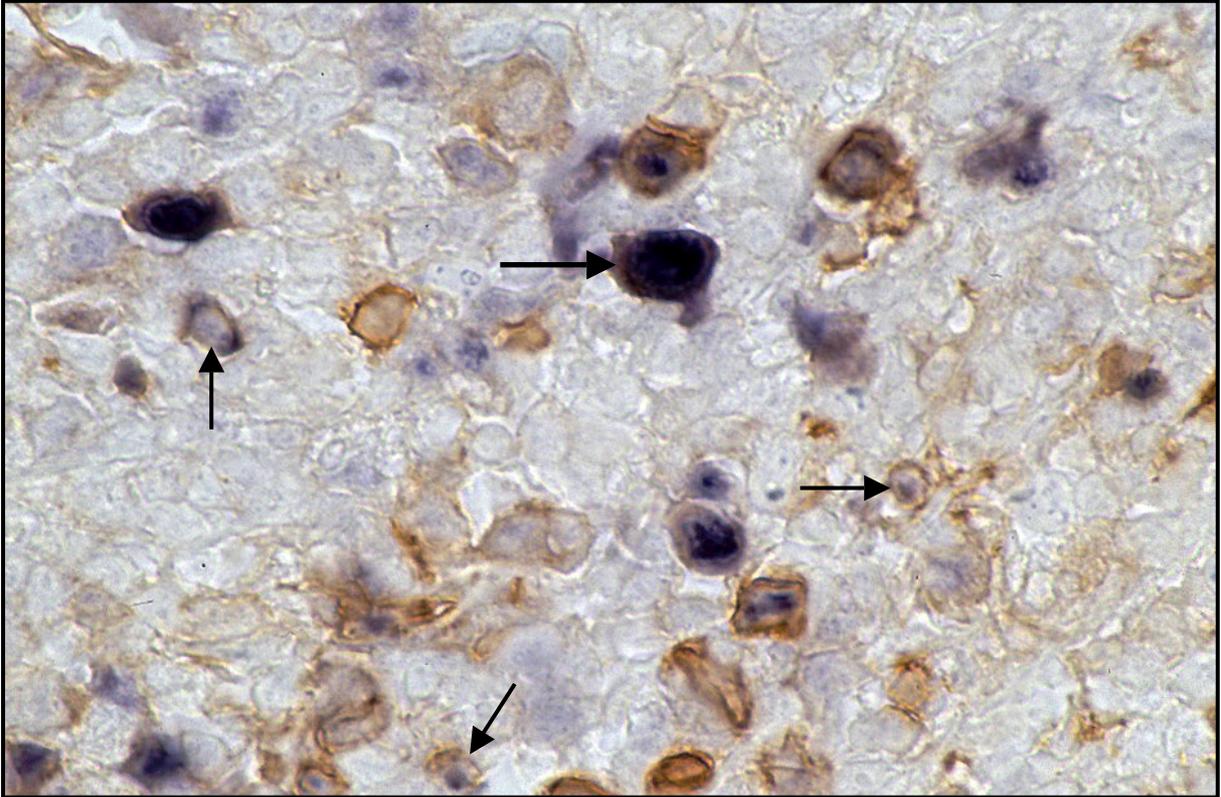


Abbildung 12

Abbildung 13: Dünndarm, positive Epithelzellen und infiltrierende Zellen im Bereich der Krypten und basalen Zottenanteile, ISH gp70 mit Gegenfärbung (Papanicolaus Hämatoxylin), Katze Nr. 163, Objektivvergrößerung 20x, Nomarski-Interferenzkontrast

Abbildung 14: Dünndarm, positiven Epithelzellen und infiltrierende Zellen im Bereich der Krypten und basalen Zottenanteilen, vergleichbares Verteilungsmuster zwischen positiven Infiltratzellen und positiven Epithelzellen für gp70- und p27-mRNA (s. auch Abbildung 13); ISH p27 mit Gegenfärbung (Papanicolau's Hämatoxylin), Katze Nr. 163, Objektivvergrößerung 20x, Nomarski-Interferenzkontrast

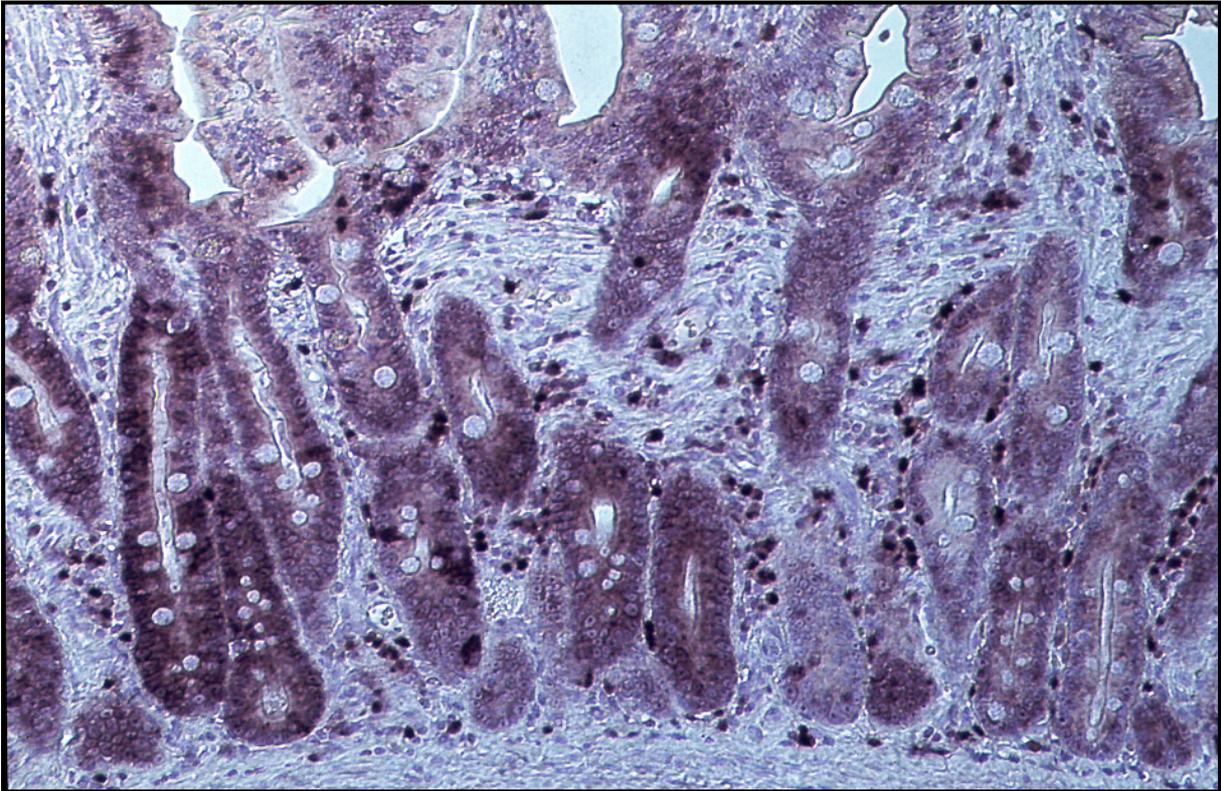


Abbildung 13

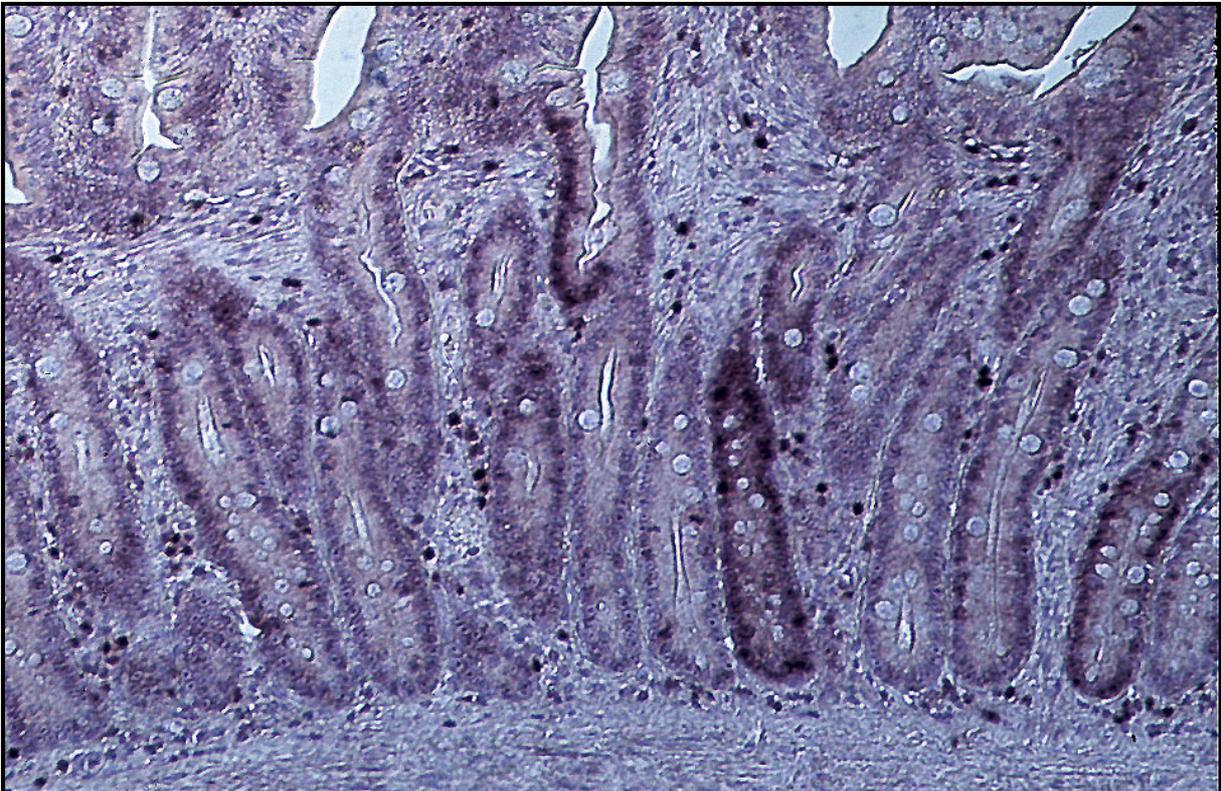


Abbildung 14

Abbildung 15: Dünndarm, virale RNA (blau) hauptsächlich in Epithelzellen der Krypten und in Infiltratzellen der Lamina propria nachweisbar, virale Proteine (braun) in Epithelzellen aller Epithelbereiche bis in die Zottenspitzen nachweisbar, Doppelmarkierung ISH/IH mit Gegenfärbung (Methylgrün), Katze Nr. 157, Objektivvergrößerung 10x

Abbildung 16: Dünndarm, doppelt markierte Epithelzellen im Bereich der Krypten, doppelt und einfach markierte infiltrierende Lymphozyten und Makrophagen in der Lamina propria, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 163, Objektivvergrößerung 20x



Abbildung 15

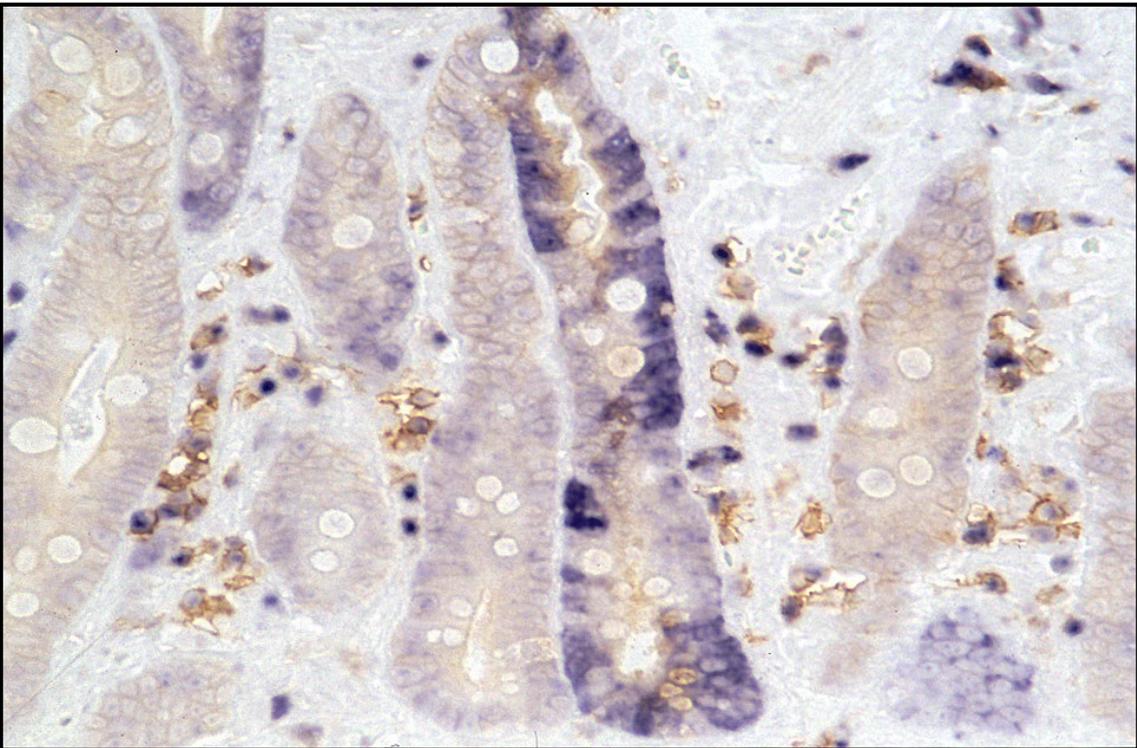


Abbildung 16

Abbildung 17: Dünndarm, virales Antigen (braun) hauptsächlich in Becherzellen lokalisiert, virale mRNA (blau) gleichmäßig in Zytoplasma und Zellkernen von Epithelzellen verteilt, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 167, Objektivvergrößerung 40x

Abbildung 18: Knochenmark, Megakaryozyten mit positivem Antigennachweis (braun) im Zytoplasma (große Pfeile), zahlreiche ISH-positive Zellen (blau) der frühen und mittleren Entwicklungsphase (kleine Pfeile), wenige doppelt markierte Zellen, Doppelmarkierung ISH/IH mit Gegenfärbung (Methylgrün), Katze Nr. 164, 20x

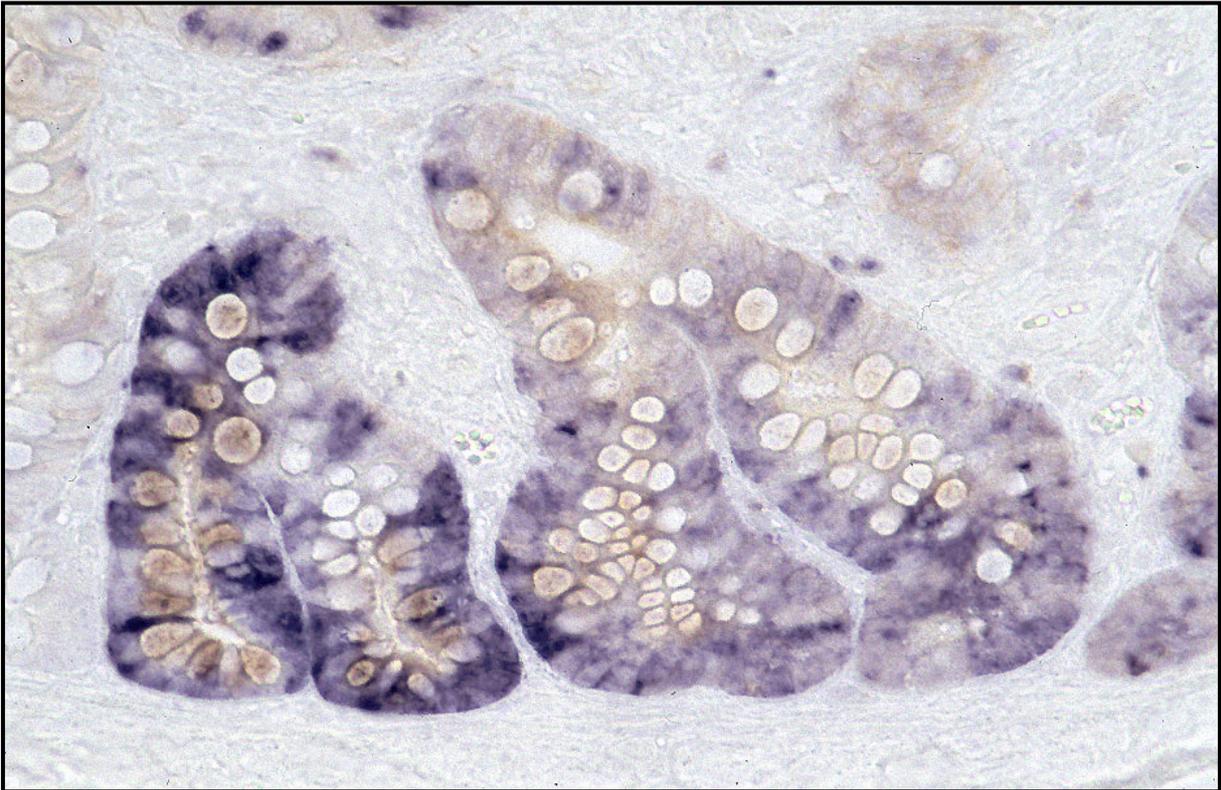


Abbildung 17

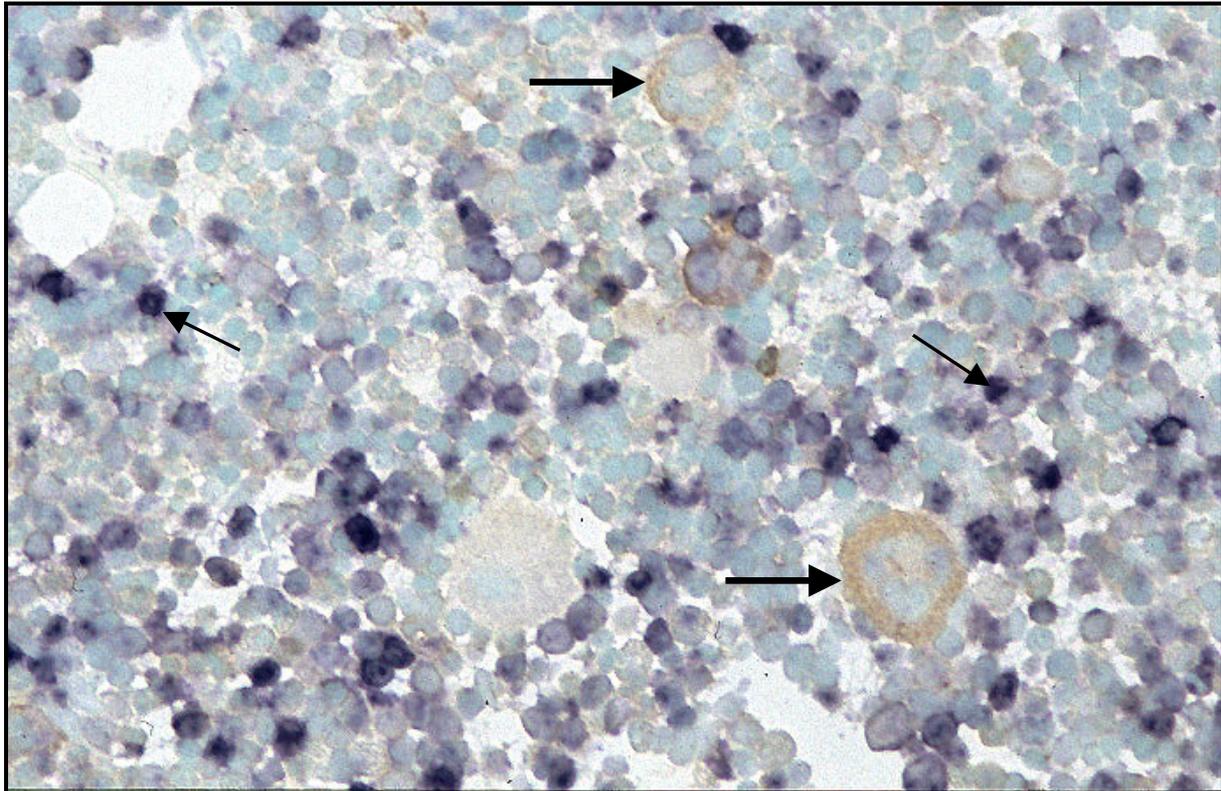


Abbildung 18

Abbildung 19: Knochenmark, Antigennachweis (braun) in Megakaryozyten (große Pfeile), vereinzelt doppelt markierte Zellen verschiedener Entwicklungsstadien bei schwachem viralen RNA-Nachweis (blau) im Zellkern (kleine Pfeile), Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 162, Objektivvergrößerung 40x

Abbildung 20: Knochenmark, großer Lymphfollikel mit zahlreichen ISH-positiven Zellen (große Pfeile; blau), kaum nachweisbares virales Antigen (braun) im Follikel, jeweils einfach und doppelt markierte Knochenmarkzellen in der Umgebung des Follikels (kleine Pfeile), Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 160, Objektivvergrößerung 40x

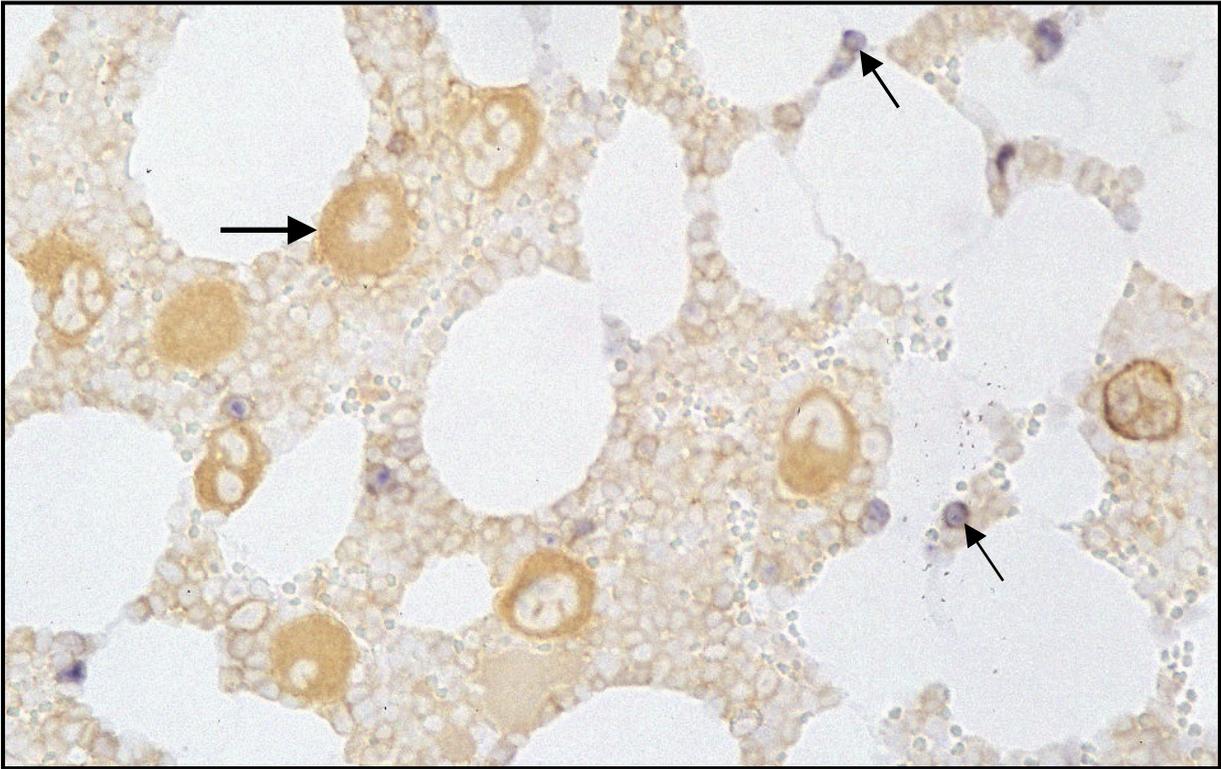


Abbildung 19

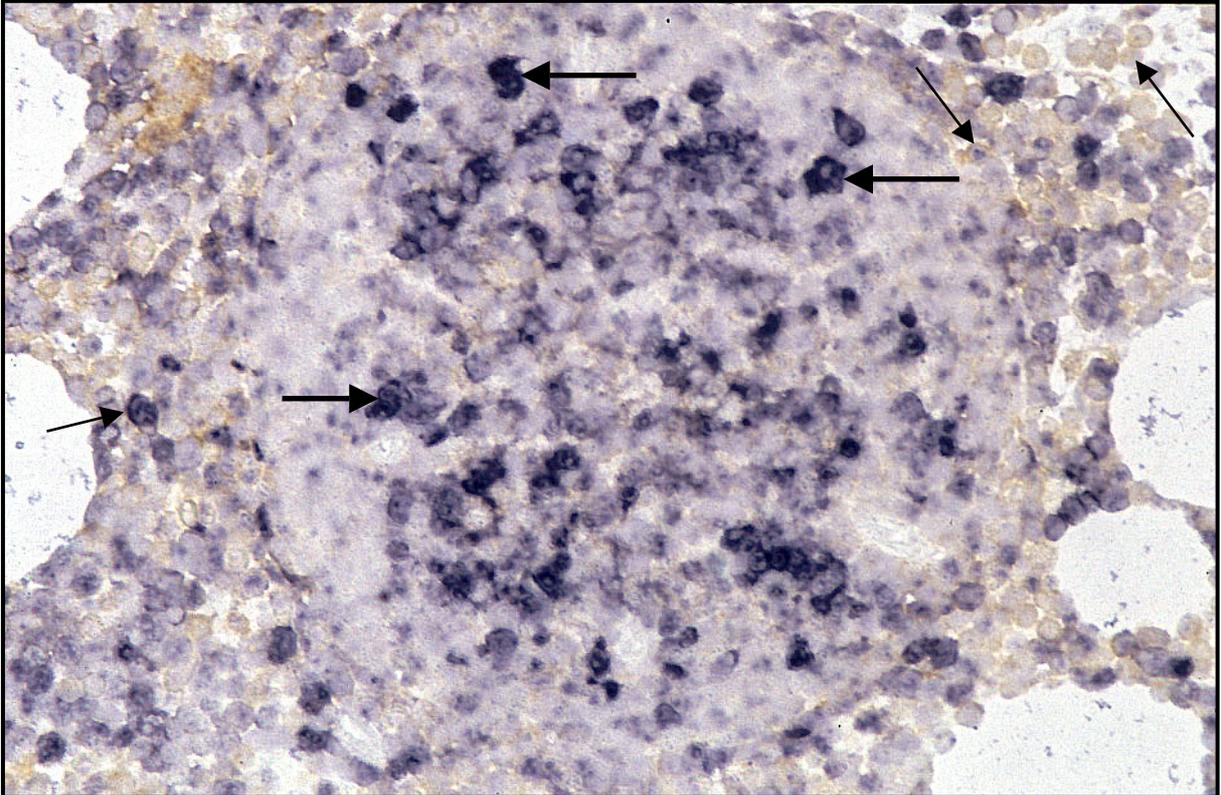


Abbildung 20

Abbildung 21: Knochenmark, doppelt markierter Megakaryozyt mit deutlichem Virusproteinnachweis (braun) im Zytoplasma und viralem RNA-Nachweis (blau) überwiegend im Kern, zahlreiche jeweils einfach und doppelt markierte unreife Knochenmarkzellen, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 160, Objektivvergrößerung 100 x

Abbildung 22: Knochenmark, Megakaryozyt mit viralem RNA-Nachweis (blau) vorwiegend im Zytoplasma, Immunreaktion eventuell überdeckt, zahlreiche ISH-positive unreife Zellen, vereinzelt IH-positive (braun) oder doppelt markierte Zellen, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 167, Objektivvergrößerung 100 x

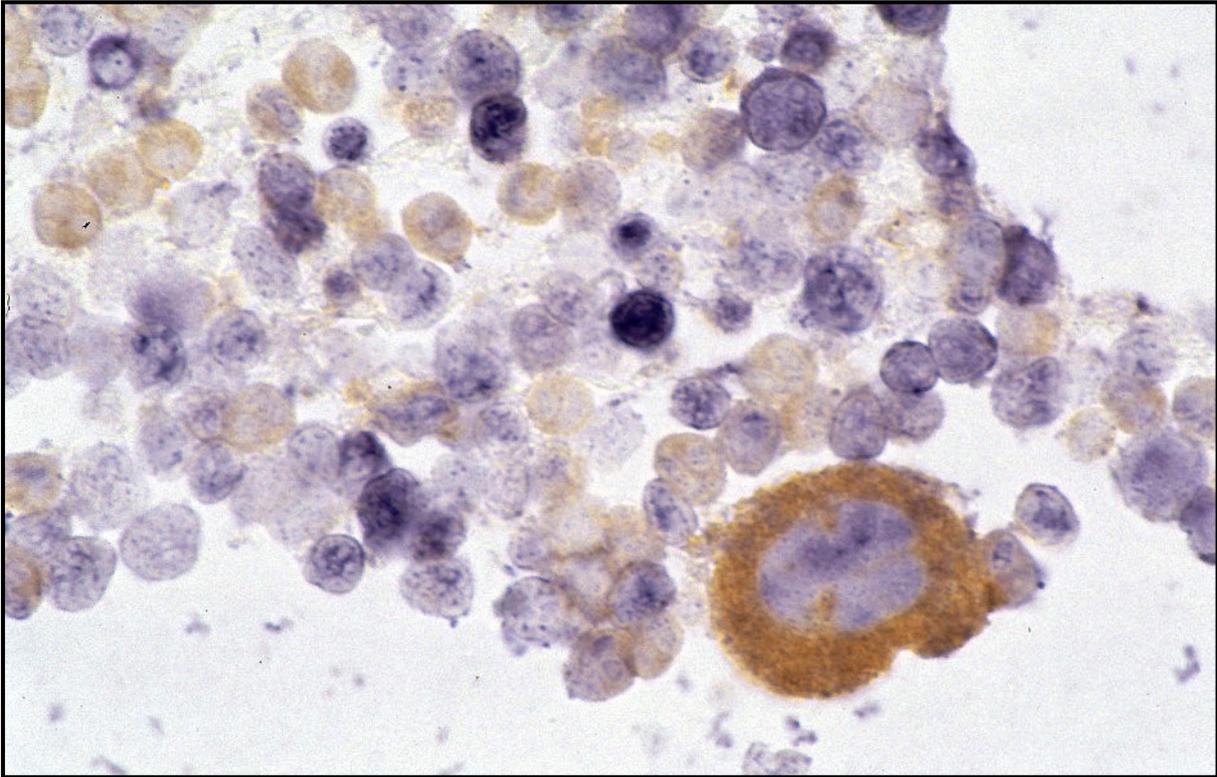


Abbildung 21

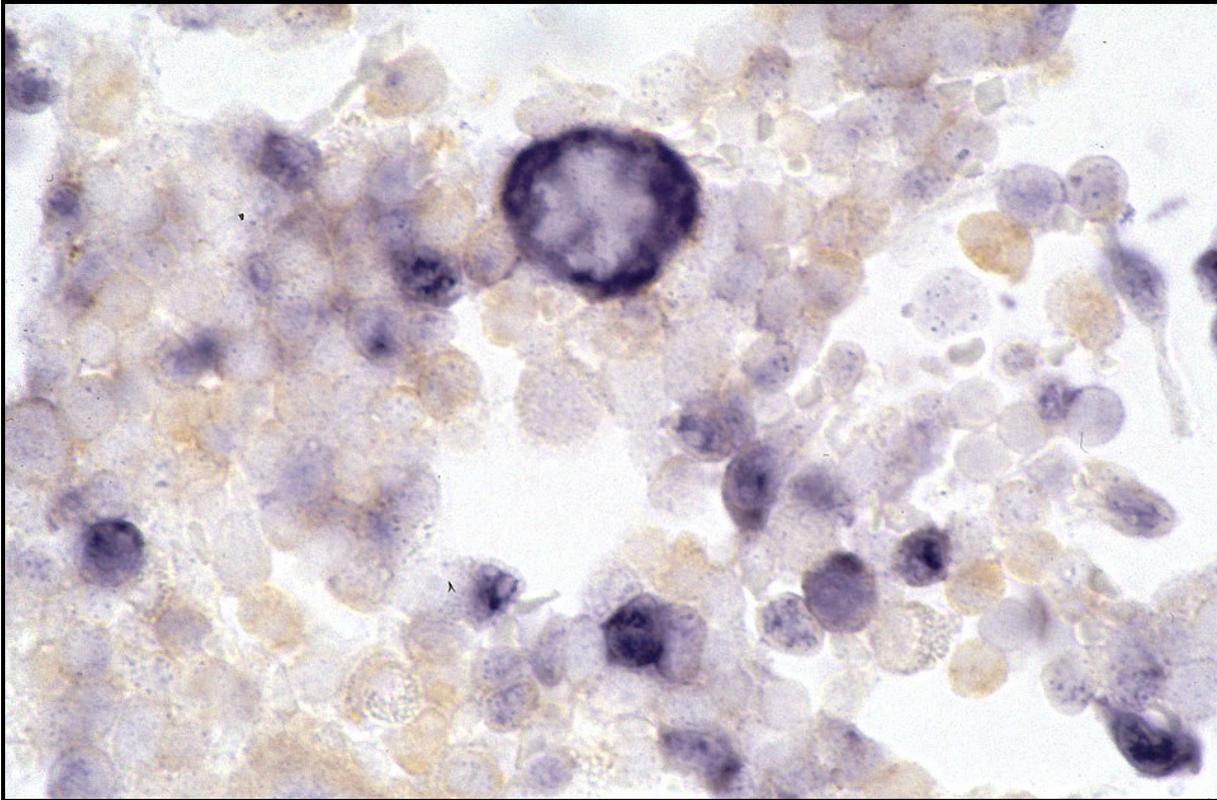


Abbildung 22

Abbildung 23: Thymus, zahlreiche positive Zellen im Kortex, vereinzelt positive Zellen in der Medulla, ISH, gp70 mit Gegenfärbung (Papanicolaus Hämatoxylin), Katze Nr. 164, Objektivvergrößerung 10x, Nomarski-Interferenzkontrast

Abbildung 24: Thymus, ISH-positive Zellen (blau) überwiegend im Kortexbereich, im interstitiellen Gewebe Lymphfollikel mit positiver Farbreaktion (Pfeil), undeutliche immunhistologische Reaktion (braun) im Thymusmark, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 157, Objektivvergrößerung 10x

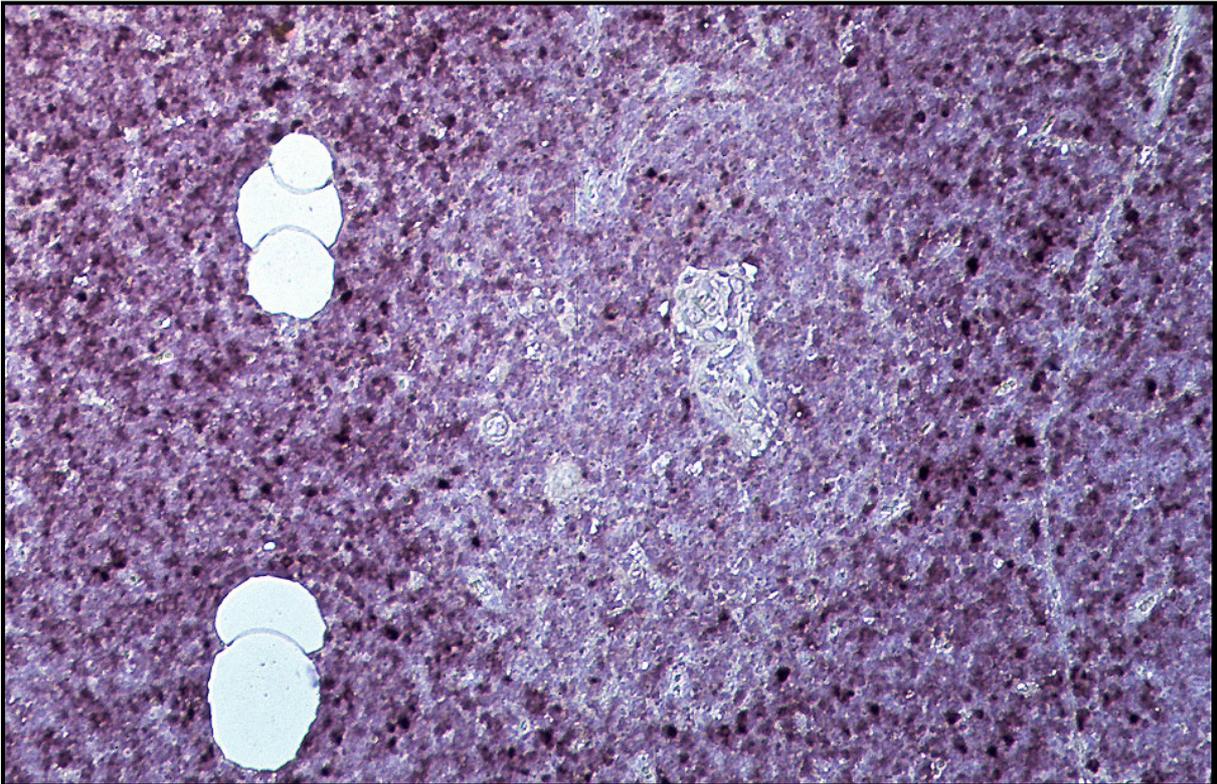


Abbildung 23

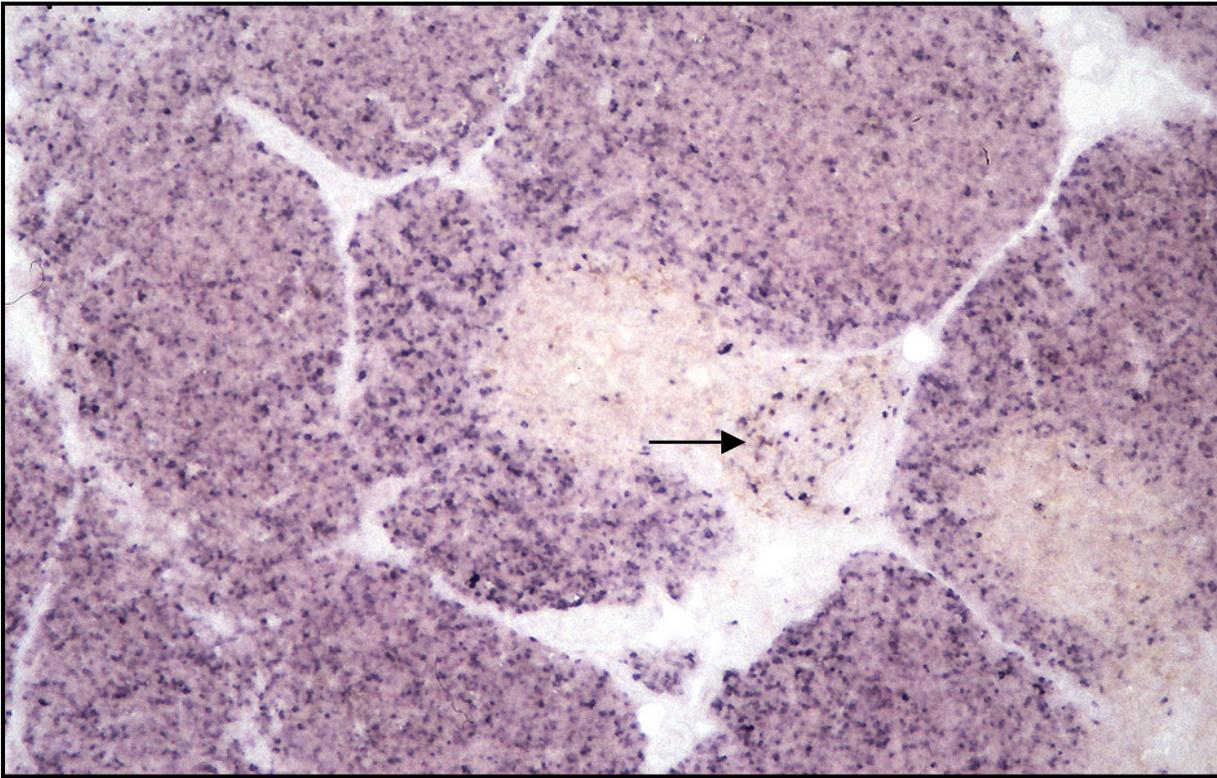


Abbildung 24

Abbildung 25: Thymus, zahlreiche ISH-positive Zellen (blau) im Lymphfollikel (Pfeil) und diffus im Thymusgewebe, undeutliche immunhistologische (braun) Reaktion, Doppelmarkierung ISH/IH, Katze Nr. 164, Objektivvergrößerung 20x

Abbildung 26: Milz, vergleichende Darstellung der Reaktion nach Inkubation mit den Sonden gp70 (A), p27 (B), p15E (C) und U3 (D) in der selben Lokalisation, unterschiedlich viele positive Zellen, ISH mit Gegenfärbung (Papanicolaus Hämatoxylin), Katze Nr. 232, Objektivvergrößerung 40x, Nomarski-Interferenzkontrast

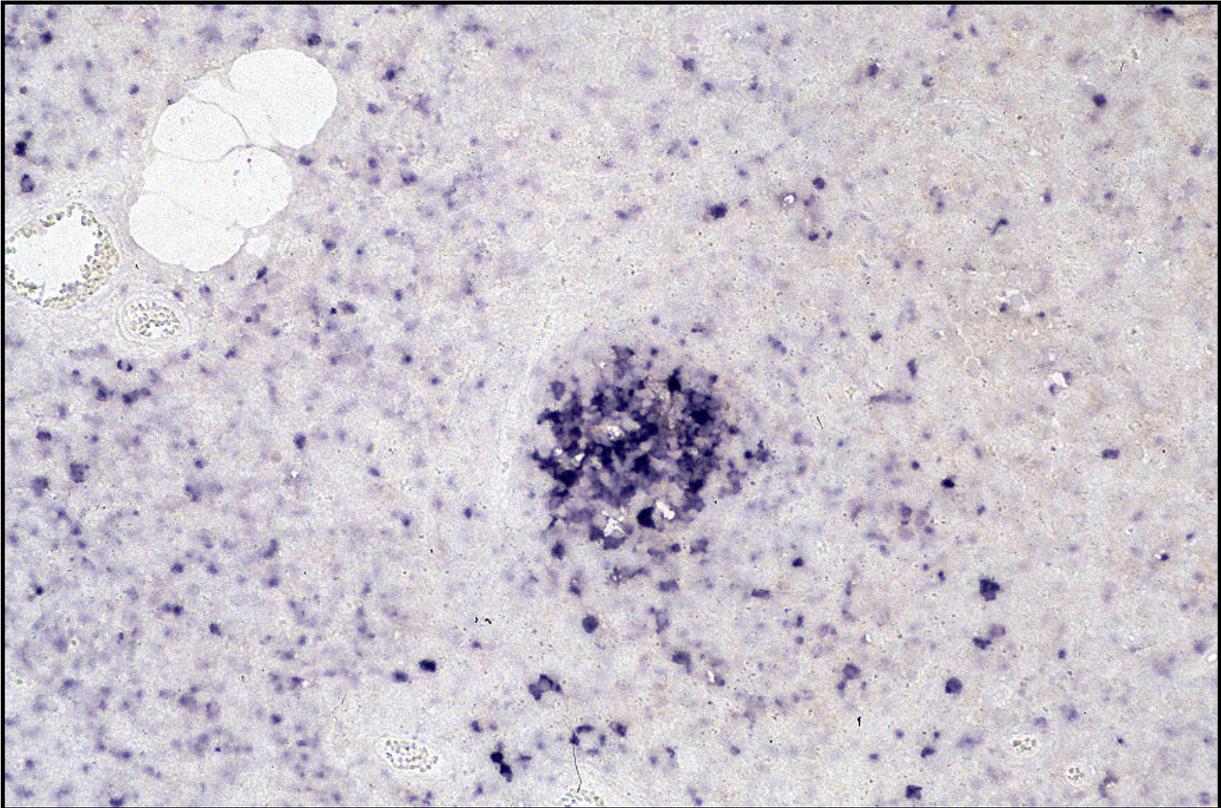
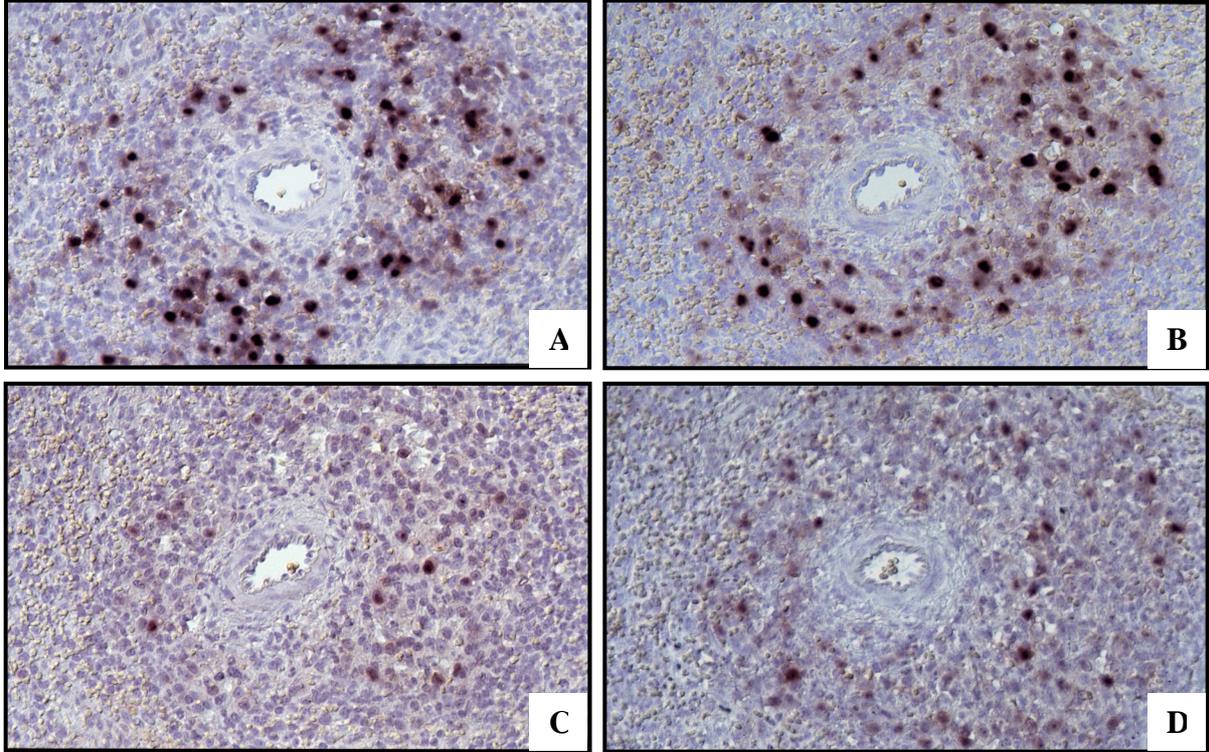


Abbildung 25



Abbildungen 26

7 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. (2000a): Cells and Tissues of the Immune System. In: Cellular and molecular immunology, 4th Edit., A. K. Abbas, A. H. Lichtman and J. S., Pober, Eds., W B. Saunders Company, Philadelphia, S. 17-41

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. (2000b): B Cell Activation and Antibody Production. In: Cellular and molecular immunology, 4th Edit., A. K. Abbas, A. H. Lichtman and J. S., Pober, Eds., W B. Saunders Company, Philadelphia, S. 182-207

Anderson, L. J.; Jarrett, W. F. H.; Jarrett, O.; Laird, H. M. (1971): Feline leukemia virus infection of kittens: Mortality associated with atrophy of the thymus and lymphoid depletion; J. Natl. Cancer Inst. **47**: 807-817

Arai, H.; Nagushi, T.; Sagi, N.; Moroji, T.; Iizuka, R. (1989): A study of non-isotopic in situ hybridisation histochemistry on post mortem changes in vasopressin mRNA in rat brain; Neurosci. Lett. **103**: 127-132

Baltimore, D. (1970): Viral RNA-dependent DNA polymerase; Nature **226**: 1209-1211

Blakeslee J. R.; Rojko, J. R. (1885): comparative pathobiology of viral diseases; CRC Press: Boca Raton 2-19

Blue, J.; Weiss, L. (1991): Vascular pathways in non sinusal red pulp; an electron microscope study of the cat spleen; Am. J. Anatomy **161**: 135-168

Bohnlein, S.; Hauber, J.; Cullen, B., R. (1989): Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat; J. Virol. **63**: 421-424

Bolognesi, D. P.; Montelaro, R. C.; Frank, H.; Schäfer, W. (1978): Assembly of type c oncornaviruses: a model; Science. **199**: 183-186

Bourne, J. A.: Handbook of immunoperoxidase staining methods. Immunochemistry Laboratory, DAKO Corporation, Santa Barbara, Kalifornien

Brahic, M.; Haase, A. T. (1978): Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridisation; Proc. Natl. Acad. Sci. **75**: 6125-6129

Brahic, M.; Haase, A. T. Cash, E. (1984): Simultaneous in situ detection of viral RNA and antigens; Proc. Natl. Acad. Sci. **81**: 5445-5448

- Brigati**, D. J.; Myerson, D.; Leary, J. J.; Spalholz, B.; Travis, S. Z.; Fong, C. K. Y.; Hasiung, G. D.; Ward, D. C. (1983): Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridisation probes; *Viol.* **126**: 21-50
- Burns**, J.; Graham, A. K.; Frank, C.; Fleming, K. A.; Evans, M. F. McGee, J. D. (1987): Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic in situ hybridisation; *J. Clin. Pathol.* **40**: 858-864
- Casey**, J. W.; Roach, A.; Mullins, J. I.; Burck, K. B. J.; Nicolson, M. O.; Gardner, M. B.; Davidson, N. (1981): The U3 position of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemia cats; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **78**: 7778-7782
- Charman**, H. P.; Kim, N.; Gilden, R. V.; Hardy, W. D.; Essex, M. (1976): Brief Communication: Humoral immune response of cats to feline leukemia virus: Comparison of the response to the major structural protein p30 and to a virus specific cell membrane antigen (FOCMA); *J. Natl. Cancer Inst.* **56**: 859-861
- Cockerell**, G. L.; Krakowka, S.; Hoover, E. A.; Olsen, R. G.; Yohn, D. S. (1976a): Characterisation of feline T- and B-lymphocytes and identification of an experimentally induced T-cell neoplasm in the cat; *J. Natl. Cancer Inst.* **57**: 907-913
- Cockerell**, G. L.; Hoover, A. A.; Krakowka, R. G.; Olsen, R. G.; Yohn, D. S. (1976b): Lymphocyte mitogen reactivity and enumeration of circulating B- and T-cells during feline leukemia virus infection in the cat; *J. Natl. Cancer Inst.* **57**: 1095-1099
- Cockerell**, G. L.; Hoover, E. A. (1977): Inhibition of normal lymphocyte mitogenic reactivity by serum from feline leukemia virus infected cats; *Cancer Res.* **37**: 3985-3989
- Coffin**, J. M. (1979): Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypotheses; *J. Gen. Virol.* **42**: 1-26
- Copelan**, E. A.; Rinehart, J. J.; Lewis, M.; Mathes, L.; Olsen, R.; Sagone, A. (1983): The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation in vitro; *J. Immunol.* **131**: 2017-20
- Cotter**, S. M.; Hardy, W. D. Jr.; Essex, M. (1975): Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat; *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **166**: 449-454
- Craven**, R. C.; Bennett, R., P.; Wills, J. W. (1991): Role of the avian retroviral protease in the activation of reverse transcriptase during virion assembly; *J. Virol.* **65**: 6205-6217

- Darnell, J.;** Lodish, H.; Baltimore, D. (1986): *Molecular Cell Biology*; New York, Scientific American Books: S. 1052
- Das, A. T.;** Klaver, B.; Berkhout, B. A. (1999): A hapten structure in the R region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is instrumental in polyadenylation site selection; *J. Virol.* **73**: 81-91
- Denijn, M.;** Schurman, H. J.; Jakobse, K. C.; Weger, R. A. (1992): In situ hybridisation: A valuable tool in diagnostic pathology; *Acta. Pathol. Microb. Immunol.* **100**: 669-681
- Dezzutti, C. S.;** Wright, K. A., Lewis, M. G.; Lafrado, L. J.; Olsen, R. G. (1989): FeLV-induced immunosuppression through alterations in signal transduction: Down regulation of protein kinase c; *Vet. Immunol. Immunopathol.* **21**: 55-67
- Donahue, P. R.;** Hoover, E. A.; Beltz, G. A.; Riedel, N.; Hirsch, V. M.; Overbaugh, J.; Mullins, J. I. (1988): Strong sequence conservation among horizontally transmissible minimally pathogenic feline leukemia virus; *J. Virol.* **62**: 722-731
- Donahue, P. R.;** Quackenbush, S. L.; Gallo, M. V.; de Noronha, C. M.; Overbaugh, J.; Hoover, E. A.; Mullins, J. I. (1991): Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS; *J. Virol.* **65**(8): 4461-4469
- Dougherty, E.;** Post, H. E.; und Rickard, C. G. (1969): Distribution of C-type viral particles in a spontaneous case of a lymphatic leukemia in a cat; *Can. Vet. J.* **10**: 281-293
- Dougherty, J. P. und Temin, J. M.** (1988): Determination of the rate of base pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication; *J. Virol.* **62**: 2817-2822
- Engelmann, R. W.;** Fulton, R. W.; Good, R. A.; Day, N. K. (1984): Suppression of gamma interferon production by inactivated feline leukemia virus; *Science* **227**:1368-1370
- Eikelenboom, P.;** Dijkstra, C. D.; Boorsma, D. M.; van Rooijen, N. (1985): Characterisation of lymphoid and nonlymphoid cells in the white pulp of the spleen using immunohistochemical techniques and enzyme-histochemistry; *Experientia* **41**: 209-214
- Ermine, A.;** Tordo, H.; Tsiang, H. (1988): Rapid diagnosis of rabies infection by means of a dot hybridisation assay; *Mol. Cell. Probes* **2**: 75-82
- Essex, M.;** Klein, G.; Snyder, S. P.; Harrold, J. B. (1971a): Correlation between humoral antibody and regression of tumours induced by feline sarcoma virus; *Nature* **233**: 175-176

- Essex, M.;** Klein, G.; Snyder, S. P.; Harrold, J. B. (1971b): Antibody to feline oncoronavirus-associated cell membrane antigen in neonatal cats; *Int. J. Cancer* **8**: 384-390
- Essex, M.;** Cotter, S. M.; Carpenter, J. L. (1973): Feline virus induced tumors and the immune response: Recent development; *Am. J. Vet. Res.* **34**: 809-812
- Essex, M.;** Cotter, S. M.; Carpenter, J. L.; Hardy, W. D.; Hess, P.; Jarrett, W.; Schaller, W.; Schaller, J. (1975a): Feline oncoronavirus-associated cell membrane antigen. II. Antibody titers in healthy cats from household and laboratory colony environments; *J. Natl. Cancer Inst.* **54**: 631-635
- Essex, M.;** Jakowski, R. M.; Hardy, W. D.; Cotter, S. M.; Hess, P.; Sliski, A. (1975b): Feline oncoronavirus-associated cell membran antigen. III. Antibody titers in cats from feline leukemia cluster households; *J. Natl. Cancer Inst.* **54**: 637-641
- Farnet, C. M.;** Haseltine, W. A. (1990). Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4164-4168
- Fenner, F.** (1976): The classification and nomenclature of viruses. Summary of the results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Madrid; *Intervirology* **6**:1-6
- Fink, M. A.;** Sibal, C. R.; Plata, E. J. (1971): Serologic detection of feline leukemia virus antigen or antibodies; *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **158**: 1070-1075
- Fischinger, P. J.;** Schäfer, W.; Bolognesi, D. P. (1976): Neutralization of homologous and heterologous oncornaviruses by antisera against the p15(E) and gp71 polypeptides of friend murine leukemia virus; *Virology* **71**: 169-84
- Fleming, K. A.;** Evans, M.; Ryley, K. C.; Franklin, D.; Lovell-Badge, R. H. Morey, A. L. (1992): Optimization of non-isotopic in situ hybridisation on formalin fixed, paraffin embedded material using digoxigenin labelled probes and transgenic tissues; *J. Pathol.* **167**: 9-17
- Fossum, S.,** Ford, W. L. (1985): The organisation of cell populations within lymph nodes: Their origin, life history and functional relationships; *Histopathology* **9**: 469-499
- Frazier, K.S.;** Paredes, A.; Dube, P.; Styer, E. (2000): Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation. *Vet. Pathol.* **37**: 328-335.

- Francis, D. P.; Essex, M.; Hardy, W. D. (1977):** Excretion of feline leukemia virus by naturally infected pet cats; *Nature* **269**: 252-254
- Francis, D. P.; Essex, M.; Gayzagian, D. (1979):** Feline leukemia virus: Survival under home and laboratory conditions; *J. Clin. Microbiol.* **9**: 154-156
- Freed, E. O. (1998):** HIV-1 gag proteins: Diverse functions in the virus life cycle; *Virology* **251**: 1-15
- Friess, A. (1976):** Interdigitating reticulum cells in the popliteal lymph node of the rat. An ultrastructural and cytochemical study; *Cell Tissue Res.* **179**: 43-60
- Fujiwara, T.; Mizuuchi, K. (1988):** Retroviral DNA integration: Structure of an integration intermediate; *Cell* **54**: 497-504
- Fulton, R.; Forrest, D.; McFarlane, R.; Onions, D. and Neil, J. C. (1987):** Retroviral transduction of T-Zell receptor beta-chain and myc genes; *Virology* **326**: 190-194
- 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; *J. Vet. Med.* **44**: 329-340.
- Gardner, M. B.; Rongey, R. W.; Yohnson, E. Y.; De Journett, R.; Huebner, R. J. (1971):** C-type tumor virus particles in salivary tissue of domestic cats; *J. Natl. Cancer Inst.* **47**: 343-347
- Gardner, M.B.; Baracid, M.; Rasheed, S.; Grant, C.; Aronson, S. (1980):** Humoral immunity in naturally FeLV-exposed and experimentaly FeSV-inoculated house cats; In: Hardy, W.D., Jr.; Essex, M.; McClelland, A.J. (Eds.); *Feline leukemia virus*, Elsevier/North Holland, s. 158-169
- Geerling, G.; Aoki, T.; Old, L. J. (1970):** Shared viral antigen of mammalian leukemia virus; *Nature* **226**: 265-266
- Giaid, A.; Hamid, Q.; Adams, C.; Springall, D. R.; Terenghi, G.; Polak, J. M. (1989):** Non-isotopic RNA probes; *Histochemistry* **93**: 191-196
- Goff, S. P. (2001):** Retroviridae: The retroviruses and their replication; In *Fields Virology*; Volume 2, 4th edition; Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds.); 1871-1939; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Grant, C. K.; Worley, M. B.; DeBoer, L. J. (1977):** Detection of complement dependent lytic antibodies in sera from feline leukemia infected cats by the chromium-51-release assay. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 157-160

- Grant, C. K.;** Essex, M.; Pedersen, N. C.; Hardy, W. D.; Stephenson, J. R.; Cotter, S. M.; Theilen, G. H. (1978): Lysis of feline lymphoma cells by complement dependent antibodies in feline leukemia virus contact cats. Correlation of lysis and antibodies to feline oncoronavirus associated cell membrane antigen; *J. Natl. Cancer. Inst.* **60**: 161-166
- Grant, C. K.;** Rickard, D. K.; Ramaika, C.; Madewell, B. R.; Essex, M. (1979): Complement and tumor antibody levels in cats and changes associated with natural feline leukemia virus infection and malignant disease; *Cancer Res.* **39**: 75-81
- Grant, C.K.;** Esser, M.; Gardner, M.B.; Hardy, W.D. (1980a): Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages; *Cancer Res.* **40**: 823-829
- Grant, C. K.;** Michalek, M. T. (1981): Feline leukemia-unique and cross-reacting antigens of individual virus-producing tumors identified by complement dependent antibodies; *Int. J. Cancer* **28**: 209-217
- Grant, C. K.;** Ernisse, B. J.; Pontefract, R. (1984): Comparison of feline leukemia virus-infected and normal cat T-cell lines in interleukin 2 conditioned medium; *Cancer Res.* **44**: 498-502
- Haase, A. T.** (1986): Pathogenesis of lentivirus infection; *Nature* **322**: 130-136
- Haley, P. J.;** Hoover, E. A.; Quackenbush, S. L.; Gasper, P. J.; Macy, D. W. (1985): Influence of antibody infusion on pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection; *J. Natl. Cancer Inst.* **74**: 821-827
- Hanna, M. G.;** Szakal, A. K.; Tyndall, R. L. (1970): Histoproliferative effect of feline leukemia virus on lymphatic tissue: Histological and ultrastructural studies of germinal centers and their relation to leukemogenesis; *Cancer Res.* **30**: 1748-1763
- Hardy, W. D., Jr.;** Geering, G.; Odd, L. J.; de Harven, E. (1969): Feline leukemia virus: Occurrence of viral antigen in the tissues of cats with lymphosarcoma and other diseases; *Science* **166**: 1019-1027
- Hardy, W. D.;** Geering, G.; Old, L. J.; de Harven, E.; Brodey, R. S.; McDonough, S. K. (1970): Serological studies of the feline leukemia virus; *Comp. Leuk. Res.* **36**: 343-354
- Hardy, W. D.** (1971): Immunodiffusion studies of feline leukemia and sarcoma; *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **158**; 1060-1069
- Hardy, W. D., Jr.;** Old, L. J.; Hess, P. W.; Essex, M.; Cotter, S. (1973a): Horizontal transmission of feline leukemia virus; *Nature* **244**: 266-269

- Hardy, W. D.;** Hirshaut, Y.; Hess, P. (1973b): Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence; *Bibl. Haematol.* **39**: 778-779
- Hardy, W. D.;** Hess, P. W.; MacEwen, E. G.; McClelland, M. C.; Hayes, A. A.; Zuckerman, E. E.; Essex, M.; Cotter, S. M.; Jarrett, O. (1976): Biology of feline leukemia virus in the natural environment; *Cancer Res.* **36**: 582-588
- Hardy, W. D.;** Zuckermann, E. E.; MacEwen, E. G.; Hayes, A. A.; Essex, M. (1977b): A feline leukemia virus- and sarcoma virus-induced tumor-specific antigen; *Nature* **270**: 249-251
- Hardy, W. D., Jr.;** McClelland, A. J.; Zuckerman, E. E.; Snyder, H. W.; McEwen, E. G.; Francis, D.; Essex, M. (1980): Development of virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV.; *Nature* **288**: 90-92
- Hardy, W. D., Jr.** (1981): Immunopathology induced by the feline leukemia virus, *Springer Seminars in Immunopathol.* **5**: 75-106
- Hardy, W. D., Jr.** (1982): Immunopathology induced by the feline leukemia virus; *Springer Sem. Immunopathol.* **5**: 75-106
- Hardy, W. D.;** Zuckermann, E. E. (1991): Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats; *J. Am. Vet. Med. Ass.* **188**: 1031-1034
- Hardy, W. D.** (1993): Feline oncoretroviruses. In: Levy, J. A., ed., *The retroviridae*. Plenum Press, New York: 109-168
- Hayes, K. A.;** Rojko, J. L.; Tarr, M. J.; Polas, P. J.; Olsen, R.G.; Mathes, R. G. (1989): Atypically localised viral expression in cat with feline leukemia; *Vet. Res.* **124**: 334-336
- Hebebrand, L. C.;** Mathes, L. E.; Olsen, R. G. (1977): Inhibition of concavalin. A stimulation of feline lymphocytes by inactivated feline leukemia virus; *Cancer Res.* **37**: 4532-4533
- Heberbrand, L. C.;** Olsen, R. G.; Mathes, L. E.; Nichols, W. S. (1979): Inhibition of human lymphocyte mitogen and antigen response by a 15.000-dalton protein from feline leukemia virus; *Cancer Res.* **39**: 443-447
- Henderson, L. E.;** Sowder, R.; Smythers, G.; Oroszlan, S. (1983): Terminal amino acid sequences and proteolytic cleavage sites of mouse mammary tumor virus env gene products; *J. Virol.* **48**: 314-9

- Herz, A.;** Theilen, G. H.; Schalm, O. W.; Munn, R. J. (1970): C-Type virus in bone marrow cells of cats with myeloproliferative disorders; *J. Natl. Cancer Inst.* **44**: 339-348
- Hino, S.;** Stephenson, J. R.; Aaronson, S. A. (1975): Antigenic determinations of the 70.000-molecular weight glycoprotein of wooly monkey type C RNA virus; *J. Immunol.* **115**: 922-927
- Hino, S.;** Stephenson, J. R.; Aaronson, S. A. (1976): Radioimmunoassay for the 70.000-molecular-weight glycoprotein of endogenous mouse type C viruses: Virus antigen expression in normal mouse tissue and sera; *J. Virol.* **18**: 933-941
- Hirschberger, J.** (1987): Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. *Vet. Med. Diss., Gießen.*
- Ho, D. D.;** Pomeranz, J. R.; Kaplasnaplan, C. J. (1987): Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus; *Engl. J. Med.* **317**: 278-286
- Höfler, H.** (1987): What`s new in "In situ Hybridisation"; *Path. Res. Pract.* **182**: 421-430
- Höfler, H.** (1990): Principles of in situ hybridisation. In: Polak, L.M.; McGee, J. D. (Eds.) *In situ Hybridisation - Principles and Practice.* Oxford University Press, London, Oxford: S. 15-30
- Hoover, E. A.;** McCullough, C. B.; Griesemer, R. A. (1972): Intranasal transmission of feline leukemia; *J. Natl. Cancer Inst.* **48**: 973-98
- Hoover, E. A.;** Oerryam, L. E.; Kociba, G. J. (1973): Early lesions in cats inoculated with feline leukemia virus; *Cancer Res.* **33**:145-152
- Hoover, E. A.;** Kociga, G. J.; Hardy, W. D.; Yohn, D. S. (1974): Erythroid hypoplasia in cats inoculated with feline leukemia virus; *J. Natl. Cancer Inst.* **53**: 1271-1276
- Hoover, E. A.;** Olsen, R. G.; Hardy, W. D.; Schaller, J. P.; Mathes, L. E. (1976): Feline leukemia virus infection: Age-related variation in response of cats to experimental infection; *J. Natl. Cancer Inst.* **57**: 365-369
- Hoover, E. A.;** Olsen, R. G.; Hardy, W. D., Jr.; Schaller, J. P. (1977a): Horizontal transmission of feline leukemia virus under experimental conditions; *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 443-444
- Hoover, E. A.;** Rojko, J. L.; Mathes, L. E.; Schaller, J. P. (1977b): Relationship between feline leukemia virus antigen expression in blood and bone marrow and viral infectivity in blood, bone marrow and saliva of cats.; *Cancer Res.* **37**: 3707-3710

- Hoover**, A. A.; Rojko, J. L.; Wilson, P. L.; Plsen, R. G. (1881): Determinants of susceptability and resistance of feline leukemia virus infection. I. Role of macrophages; *J. Natl. Cancer Inst.* **67**: 889-898
- Hoover**, E. A.; Mullins, J. I.; Quackenbush, S. L.; Gasper, P. W. (1987): Experimental transmission and pathogenesis of immunodeficiency syndrom in cats; *Blood* **70**: 1880-1892
- Hoover**, E. A.; Zeidner, N. S.; Perigo, N. A.; Quackenbush, S. L.; Strobel, J. D.; Hill, D. L.; Mullins, J. I. (1989): Feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrom in cats as a model for evaluation of antiretroviral therapy; *Intervirology* **30**:12-25
- Hoover**, E. A.; Mullins, J. I. (1991): Feline leukemia virus infection and diseases; *J. Am. Vet. Med. Ass.* **199**: 1287-1297
- Horzinek**, M. C. (1985): *Kompendium der allgemeinen Virologie*, 2. Auflage; Parey Verlag, Berlin, Hamburg
- Jackson**, A. C.; Wunner, W. H. (1991): Detection of rabies virus genomic RNA and mRNA in mouse and human brains by using in situ hybridisation; *J. Virol.* **65**: 2839-2844
- Jackson**, M. L.; Haines, D. M.; Taylor, S. M.; Misra, V. (1993): Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease; *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**: 25-30
- Jarrett**, W. F. H.; Martin, W. B.; Crighton, G. W.; Dalton, R. G.; Stewart, M. F. (1964a): A virus-like particle associated with leukaemia (lymphosarcoma); *Nature* **202**: 567-568
- Jarrett**, W. F. H.; Martin, W. B.; Chrighton, G. W.; Dalton, R. G.; Stewart, M. F. (1964b): Transmission experiments with leukemia (lymphosarcoma); *Nature* **202**: 566-567
- Jarrett**, W. F. H. (1971): Feline leukemia; *Int. Reviews Exp. Pathol.* **10**: 243-263
- Jarrett**, W.; Essex, M.; Mackey, L.; Jarrett, O.; Laird, H. (1972a): Brief communication: Antibodies in normal and leukemic cats to feline oncoronavirus-associated cell membran antigen; *J. Natl. Cancer. Inst.* **51**: 261-263
- Jarrett**, W.; Essex, M.; Mackey, L.; Jarrett, O.; Laird, H. (1973a): Brief Communication: Antibodies in normal and leukemic cats to feline oncornavirus-associated cell membrane Antigen; *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 261-263
- Jarrett**, O.; Laird, H. M.; Hay, D. (1973b): Determinants of the host range of feline leukemia virus; *J. Gen. Virol.* **20**: 169-175

- Jarrett, W.;** Jarrett, O.; Mackey, L.; Laird, H.; Hardy, W. D., Jr.; Essex, M. (1973c): Horizontal transmission of leukemia virus and leukemia in the cat. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 833-841
- Jarrett, O.;** Russell, P. H.; Steward, M. F. (1977): Protection of kittens from feline leukemia virus infection by maternally-derived antibodies; *Vet. Rec.* **101**: 304-305
- Jarrett, O.;** Hardy, W. D., Jr.; Golder, M. C.; Hay, D. (1978a): The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats; *Int. J. Cancer* **21**: 334-337
- Jarrett, O.;** Russell, P. H. (1978b): Differential growth and transmission in cats of feline leukaemia viruses of subgroups A and B; *Int. J. Cancer* **21**: 466-472
- Jarrett, O.** (1980): Feline Leukemia Virus Subgroups; In: Hardy, W. D. Jr.; Essex, M.; McClelland, A. J. (Eds.): *Feline Leukemia Virus*, Elsevier Holland: 473-479
- Jarrett, O.;** Golder, M. C.; Toth, S.; Onions, D. E.; Stewart, M. F. (1984): Interaction between feline leukaemia virus subgroups in the pathogenesis of erythroid hypoplasia; *Int. J. Cancer* **34**: 283-288
- Jarrett, R. F.** (1987): Pathogenesis of retroviral infection; *J. Pathol.* **153**: 199-200
- Jones, F. R.;** Yoshida, L. H.; Ladiges, W. C.; Kenny, M. A. (1980): Treatment of feline leukemia and reversal of FeLV by ex vivo removal of IgG: A preliminary report; *Cancer* **46**: 675-684
- Kästner, S.** (1992): Immunhistologische Untersuchung zur Antigenverteilung bei der spontanen Infektion mit dem Felinen Leukämievirus; *Vet. Med. Diss., Gießen*
- Kanz, L.;** Mertelsmann, R. (1990): Proliferation und Differenzierung in der Megakaryopoese; *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **74**: 28-35
- Kawakami, T. G.;** Theilen, G. H.; Dungworth, D. L.; Munn, R. J.; Beall, S.G. (1967): C-type viral particles in plasma of cats with feline leukemia; *Science* **158**: 1049-1050
- Kim, S.;** Bryn, R.; Groopman, J.; Baltimore, D. (1989): Temporal aspects of DNA and RNA Synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression; *J. Virol.* **63**: 3708-3713
- Klatzmann, D.;** Barre-Sinoussi, M. Nugeyre, M. T.; Dauguet, C.; Vilmer, E.; Griscelli, C. Brun-Vezinet, F.; Rozioux, C.; Gluckmann, J. C.; Chermann, J. C. und Montagnier, L. (1989): Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper induced T-lymphocytes; *Science* **225**: 59-62

- Khan, A. S.; Stephenson, J. R. (1977):** Feline leukemia virus: Biochemical and immunological characterisation of gag gene-coded structural proteins; *J. Virol.* **23**: 599-607
- Kipar, A.; Kremendahl, J.; von Bothmer, I.; Reinacher, M. (2000a):** Expression of viral proteins in feline leukemia virus-associated enteritis; *Vet. Pathol.* **37**: 317-322
- Kipar, A.; Kremendahl, J.; Jackson, M. L.; Reinacher, M. (2000b):** Examination of feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant form of enteritis in cats; *Vet. Pathol.* **38**: 359-371
- Köhler, K.; Kipar, A.; von Bothmer, I.; Menger, S.; Reinacher, M. (1998):** FeLV-positive mediastinale Lymphome der Katze: Vermehrte Expression von p15E als möglicher Auslöser für Apoptose; *Tierärztl. Wschr.* **100**: 400
- Köhler, K. (2003):** Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome zur differenziellen Expression von Virusproteinen bei FeLV positiven malignen Lymphomen der Katze; *Vet. Med. Diss., Gießen*
- Kovacevic, S.; Kipar, A.; Kremendahl, J.; Teebken-Schuler, D.; Grant, C. G.; Reinacher, M. (1997):** Immunohistochemical diagnosis of feline leukemia virus infection in formalin-fixed tissue; *Europ. J. Vet. Path.* **3**: 13-19
- Kraus, B. (1980):** Mehrkernige Riesenzellen in Granulomen; *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **64**: 103-125
- Kremendahl, J. (1998):** Untersuchungen zur Felinen Leukämievirus-assozierten Enteritis; *Vet. Med. Diss., Leipzig, 1998*
- Kushner, D. V.; Riggin, C. H.; Annunziato, M. E.; Marciani, D. J. (1988):** Fluorometric enzyme immunoassay for measurement of infectious feline leukemia virus and its neutralization; *J. Immunol. Meth.* **114**: 253-260
- Lafrado, L. J.; Olsen, R. G. (1986):** Demonstration of depressed polymorphonuclear leukocyte function in nonviremic FeLV-infected cats; *Cancer Invest.* **4**: 297-300
- Lafrado, L. J.; Lewis, M. G.; Mathes, L. E.; Olsen, R. G. (1987):** Suppression of in vitro neutrophil function by feline leukemia virus (FeLV) and purified FeLV-p15E; *J. Gen. Virol.* **68**: 507-13
- Lafrado, L. J.; Dezzutti, C. S.; Lewis, M. G.; Olsen, R. G. (1989):** Immunodeficiency in latent feline leukemia virus infection; *Vet. Immunol. Immunopathol.* **21**: 39-46

- Laird**, H. M.; Jarrett, O.; Crichton, G. W.; Jarrett, W. F. H. (1968a): An electron microscopy study of virus particles in spontaneous leukemia in the cat; *J. Natl. Cancer Inst.* **41**: 867-878
- Laird**, H. M.; Jarrett, O.; Crichton, G. W.; Jarrett, W. F. H.; Hay, D. (1968b): Replication of leukemogenic-type virus in cat inoculated with feline lymphosarkoma extracts; *J. Natl. Cancer Inst.* **41**: 879-893
- Laprevotte**, I.; Hampe, A.; Sherr, C. J.; Galibert, F. (1984): Nucleotide sequence of the gag gene and gag-pol of feline leukemia virus; *J. Virol.* **50**: 884-894
- Leider**, J. M. P.; Palese, P. und Smith, F. I. (1988): Determination of the mutation rate of a retrovirus; *J. Virol.* **62**: 3084-3091
- Leitch**, A. R.; Schwarzacker, T.; Jackson, D.; Leitch, I. J. (1994): In situ-Hybridisierung; in: Focus Reihe; Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford: 13-18
- Levin**, J. G.; Hu, S. C.; Rein, A.; Messer, L. I.; Gerwin, B. I. (1984): Murine leukemia virus mutant with a frameshift in the reverse transcriptase coding region: Implication for pol gene structure; *J. Virol.* **51**: 470-478
- Lewis**, M. G.; Duska, G. O.; Stiff, M. I.; Lafrado, L. J.; Olsen, R. G. (1986): Polymorphonuclear leucocyte dysfunction with feline leukaemia virus infection; *J. gen. Virol.* **67**: 2113-2118
- Lewis**, P. F.; Emermann, M. (1994): Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus; *J. Virol.* **68**: 510-516
- Liebert**, U. G.; Schneider-Schaulies, S., Baczko, K.; ter Meulen, V. (1990): Antibody-induced restriction of viral gene expression in measles encephalitis in rats; *J. Virol.* **64**: 706-713
- Liebich**, H. G. (1993): Verdauungsapparat, Dünndarm; in: Funktionelle Histologi 2. Auflage, S. 181-190; Schattauer, Stuttgart-New York
- Locke**, J. R.; Hill, D. E.; Walzer, Y. (1985): Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage; *J. Urol.* **133**: 1034
- Log**, T.; Chang, K. S., S. (1979): Enzyme immunoassay for feline oncornavirus associated cell membrane antigen (FOCMA) and detection of FOCMA in cell extracts by enzyme immunoassay inhibition test; *J. Immunol. Meth.* **26**: 291-303

- Luciw, P.;** Parke, D.; van Nest Dina, D.; Hendrix, K.; Gardner, M. B. (1986): Recombinant DNA approaches to feline leukemia virus immunization; In: J. W. Evans; A. Hollaender (Eds.): Genetic engineering of Animals, Plenum Press New York: 207-215
- Lutz, H.;** Higgins, J.; Pedersen, N. C.; Theilen, G. H. (1979): The demonstration of antibody specificity by a new technique; *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1216-1218
- Lutz, H.;** Pedersen, N.; Higgins, J.; Troy, F. A.; Theilen, G. H. (1980a): Long-term immune response to feline leukemia virus components in cats after natural infection; *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.* **7**: 653-664
- Lutz, H.;** Higgins, J.; Huebscher, U.; Troy, F., A.; Theilen, G., H. (1980b): Humoral immune reactivity to feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus; *Cancer Res.* **40**: 3642-3651
- Lutz, H.** (1983): Die Infektion mit felinem Leukämievirus: Immunologie und Serodiagnostik als Grundlage der Infektionsbekämpfung; *Schweiz Arch. Tierheilk.* **126**: 1-22
- Lutz, H.;** Pedersen, N. C.; Durbin, R.; Theilen, G. H. (1983a): Monoclonal antibodies to the epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in enzyme linked immunosorbent assay of p27; *J. Immunol. Meth.* **56**: 208-221
- Lutz, H.;** Pedersen, N. C.; Theilen, G. H. (1983b): Course of feline leukemia virus infection and its detection by enzyme linked immunosorbent assay and monoclonal antibodies; *Am. J. Vet. Res.* **44**: 2054-2059
- Lutz, H.;** Jarrett, O. (1987): Detection of feline leukemia virus infection in saliva; *J. Clin. Microbiol.* **25**: 827-831
- Lydyard, P.;** Grossi, C. (1995a): Zellen der Immunantwort, in: Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D.K. (Eds.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Immunology* (1993) London: 12-30
- Lydyard, P.;** Grossi, C. (1995b): Das lymphatische System, in Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D.K. (Eds.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Immunology* (1993) London: 31-40
- Lydyard, P.;** Grossi, C. (1995c): Die Entwicklung des Immunsystems, in Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D.K. (Eds.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Immunology* (1993) London: 143-158
- Mackey, L.;** Jarrett, W.; Jarrett, O.; Laird, H. (1975): Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats; *J. Natl. Cancer Inst.* **54**: 209-217

- Mandel, T. E.;** Phipps, R. P.; Abbot, A. P.; Tew, J. G. (1981): Long-term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immuniced mice; *Immunol.* **43**: 353-361
- Martinez-Montero, J. C.;** Herrington, C. S.; Stickland, J.; Sawyer, H.; Evans, M.; Flannery, D. M. J.; McGee, J. D. (1991): Model system of optimising mRNA non-isotopic in situ hybridisation: Riboprobes detection of lysozyme mRNA in archival gut biopsy specimens; *Clin. Pathol.* **44**: 825-839
- Mathes, L. E.;** Yohn, D. S.; Hoover, E. A.; Essex, M.; Schaller, J. P. Olsen, R. G. (1976): Feline oncoronavirus-associated cell membrane antigen. VI. cytotoxic antibodies in cats exposed to feline leukemia virus; *J. Nat. Cancer Inst.* **56**:1197-1200
- Mathes, L. E.;** Olsen, R. G. (1981): Immunobiology of the feline leukemia virus disease. In: *Feline Leukemia* (Eds.): CRC Press, Boca Raton: 77-88
- McDonough: S. K.;** Larsen, S., Brodey, R. S.; Stock, N. D.; Hardy, W. D. (1971): A transmissible feline fibrosarcoma of viral origin; *Cancer Res.* **31**: 953-954
- McDougal, J. S.;** Mawsle, A.; Cort, S. P.; Nicholson, J. K. A.; Cross, G. D.; Schneppler Campbell, J. A.; Hicks, D.; Sligh, J. (1985): Cell tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV I. Role of T-Cell activation and the expression of the T4-antigen; *J. Immunol.* **135**: 3151-3162
- Meltzer, M. S.;** Skillman, D. R.; Hoover, D. L.; Hanson, B. D.; Turpin, J. A.; Kalter, C. und Gendelman, H. E. (1990): HIV and the immune System: Macrophages and the human immunodeficiency virus; *Immunology today* **11**:217-223
- Miller, D. G.;** Adam, M. A.; Miller, A. D. (1990): Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection; *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4239-4242
- Mullins, J. I.;** Chen, C. S.; Hoover, E. A. (1986): Disease-specific and tissue-specific production of unintegrated feline leukemia virus variant DNA in feline AIDS; *Nature.* **319**: 333-335
- Mullins, J. I.;** Hoover E. A.; Overbaugh, J.; Quackenbush, S. L.; Donahue, P. R.; Poss, M. L. (1989): FeLV-FAIDS induced immunodeficiency syndrom in cats; *Vet. Immunol. Immunopathol.* **21**: 25-37

- Mullins**, J. I.; Hoover, E. A.; Quackenbush, S. L. (1991): Disease progression and viral genome variants in experimental feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome; *J. Acq. Immune Def. Syndr.* **4**: 547-557
- Naim**, M. J.; Gerdes, Z.; Abdulaziz, Z.; Stein, H.; Mason, D. Y. (1983): Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of human lymphoid tissue; *J. Clin. Path.* **36**: 167-175
- Neil**, J. C.; Onions, D. E.; Jarrett, O. (1980): Polypeptides of feline leukemia virus: identification of p15(E) and p12(E); *J. Gen. Virol.* **50**: 455-460
- Neil**, J. C.; Onions, D. E. (1985): Feline leukemia viruses: Molecular biology and pathogenesis; *Anticancer Res.* **5**: 49-63
- Nessler**, A.; Baumgärtner, W.; Gaedke, K.; Zurbriggen, A. (1997): Abundant expression of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body encephalitis of canine distemper; *J. Comp. Path.* **116**: 291-301.
- Nichols**, R. D.; Jonasson J. A.; McGee, J. D. (1987): High resolution gene mapping of the human α -globin locus; *J. Med. Genet.* **24**: 39-46
- Nossal**, G. J. V.; Abbot, A.; Mitchell, J.; Lummus, Z. (1968b): Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles; *J. Exp. Med.* **127**: 277-289
- Nurse**, P. (1975): Genetic control of cell size and cell division in yeast; *Nature* **256**: 547-551
- Nurse**, P. (1990): Universal control mechanism regulating onset of M-Phase; *Nature* **344**: 503-508
- Oglesbee**, M.; Jackwood, D.; Perrine, K.; Axthelm, M.; Krakowka, S.; Rice, J. (1986): In vitro detection of canine distemper virus nucleic acid with a virus specific cDNA probe by dot-blot and in situ hybridisation; *J. Virol. Methods* **14**: 195-211
- Okabe**, H.; Twiddy, E.; Gilden, R. V.; Masakazu, H.; Hoover, E. A.; Olsen, R. G. (1976): FeLV related sequences in DNA from a FeLV free cat colony; *Virology* **69**: 779-801
- Olsen**, R. G.; Yohn, D. S. (1972): Demonstration of antibody in cat sera to feline oncornavirus by complement fixation inhibition; *J. Natl. Cancer Inst.* **49**:345-403
- Olsen**, R. G.; Lewis, M. G.; Lafrado, L. J.; Mathes, L. E.; Haffer, K.; Sharpee, R. (1987): Feline leukemia virus: Current status of the feline induced immune depression and immunoprevention; *Cancer Metastasis Rev.* **6**: 243-60

- Onions, D.;** Jarrett, O.; Testa, N.; Fassoni, F.; Toth, S. (1982): Selective effect of feline leukemia virus on early erythroid precursors; *Nature* **296**: 156-158
- Owen, M.;** Steward, M. (1995a): Antigenerkennung, in Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D.K.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Eds.): *Immunology* (1993) London: 76-88
- Owen, M.;** Steward, M. (1995b): Das lymphatische System, in Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D.K.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Eds.): *Immunology* (1993) London: 34-40
- Orosz, C. G.;** Zinn, N. E.; Olsen, R. G.; Mathes, L. E. (1985): Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines; *J. Immunol.* **134**: 3396-403
- Oraslan, S.;** Huebner, R. J.; Gilden, R. V. (1971): Species-specific and interspecific antigenetic determinants associated with the structural protein of feline c-type virus; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 901-904
- Overbaugh, J.;** Riedel, N.; Hoover, E. A.; Mullins; J. I. (1988a): Transduction of endogenous envelope genes by feline leukemia virus in vitro; *Nature* **332**: 731-734
- Overbaugh, J.;** Donahue, P. R.; Quackenbush, S. L.; Hoover, E. A.; Mullins, J. L. (1988b): Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats; *Science* **19**: 906-910
- Pacitti, A. M.;** Jarrett, O.; Hay, D. (1986): Transmission of feline leukemia virus in the milk of a non viremic cat; *Vet. Res.* **118**: 381-384
- Pauza, C. D.;** Galindo, J. E.; Richmann, D. D. (1990): Reinfection results in accumulation of unintegrated viral DNA in cytopathic and persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of CEM cells; *J. Exp. Med.* **172**:1035-1042
- Pedersen, N. C.;** Theilen, M. H.; Keane, M. A.; Fairbanks, L.; Mason, T.; Orser, B.; Chen, C. H.; Allison, C. (1976): Studies of naturally transmitted feline leukemia virus infection; *Am. J. Vet. Res.* **38**: 1523-1531
- Pedersen, N. C.;** Theilen, G.; Keane, M. A.; Fairbanks, L.; Mason, T.; Orser, B. Chen, C. H.; Allison, C. (1977): Studys of naturally transmitted feline leukemia virus infection; *Am. J. Vet. Res.* **28**: 1523-1531
- Pedersen, N. C.;** Yohnson, L.; Theilen, G. H.: (1984): Biological behavior of tumors and associated retroviremia in cats inoculated with Sneider-Theilen fibrosarcoma virus and the phenomenon of tumor recurrence after primary regression; *Infect. Immun.* **43**: 631-636

- Pedersen, N. C.;** Ho, E. W.; Brown, M. L.; Yamamoto, J. K. (1987): Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic pet cats with a immunodeficiency like syndrome; *Science* **235**: 790-793
- Pellas, T. C.;** Weiss, L. (1990): Migration pathways of recirculating murine B-cells and CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes; *Am. J. Anatomy* **187**: 355-373
- Perryman, L. E.;** Hoover, E. A.; Yohn, D. S. (1972): Immunologic reactivity of the cat: Immunosuppression in experimental feline leukemia; *J. Natl. Cancer. Inst.* **49**: 1357-1362
- Pinter, A.;** Fleissner, E. (1979): Structural studies of retroviruses: Characterization for oligomeric complexes of murine and feline leukemia virus envelope and core components formed up in cross-linking; *J. Virol.* **30**: 157-165
- Polak, J. M.;** McGee, J. D. (1990): *In situ hybridisation - principles and practice*; Oxford University Press, London, Oxford
- Poss, M. L.;** Mullins, J. I.; Hoover, E. A. (1989): Posttranslational modifications distinguish the envelope glycoprotein of the immunodeficiency disease-inducing feline leukemia virus retrovirus; *J. Virol.* **63**: 189-195
- Pringle, C. R.** (1999): *Virus Taxonomy - 1999*; *Arch. Virol.* **144**: 421-429
- Quackenbush, S. L.;** Mullins, J. L.; Hoover, E. A. (1989): Colony forming T-lymphocyte deficit in the development of feline retrovirus induced immunodeficiency syndrome; *Blood* **73**: 509-516
- Quackenbush, S. L.;** Donahue, P. R.; Dean, D. A.; Myles, M. H.; Ackley, C. D.; Cooper, M. D.; Mullins, J. I.; Hoover, E. A. (1990): Lymphocyte subset alteration and viral determinants of immunodeficiency disease induction by FeLV-FAIDS; *J. Virol.* **64**: 5465-5474
- Rajewsky, K.** (1996): Clonal selection and learning in the antibody system; *Nature* **381**: 751-758
- Reinacher, M.;** Theilen, G. H. (1987): Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats; *Am. J. Vet. Res.* **48**: 939-45.
- Reinacher, M.** (1987a): Feline leukemia virus-associated enteritis - A condition with feature of feline panleukopenia; *Vet. Pathol.* **24**: 1-4
- Reinacher, M.** (1987b): Infection with feline leukemia virus detected upon post-mortem examination; *J. Small Anim. Pract.* **28**: 640-649

- Reinacher**, M. (1989): Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats; *Vet. Immunol. Immunopathol.* **21**: 85-95
- Rickard**, C. G.; Gillespie, J. H.; Lee, K. M.; Noronha, F.; Post, J.E.; Savage, E.L. (1968): Transmission and electron microscopy of lymphocytic leukemia in the cat; *Bibl. Haematol.* **31**: 282-284
- Rickard**, C. G.; Post, J. E.; Noronha, F.; Barr, L. M. (1969): A transmissible virus-induced lymphocytic leukemia of the cat; *J. Natl. Cancer Inst.* **42**: 987-1014
- Riedel**, C. G.; Hoover, E. A.; Gasper, P. W.; Nicolson, M. O.; Mullins, J. I. (1986): Molecular analysis and pathogenesis of the feline aplastic anemia retrovirus, feline leukemia virus C-Sarma; *J. Virol.* **60**: 242-250
- Riedel**, N.; Hoover, E. A.; Dornsive, R. E.; Mullins, J. I. (1988): Pathogenesis and host range determinants of the aplastic anemia retrovirus; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2758-2762
- Robinson** H. L.; Zinkus, D. A. (1990): Accumulation of human immunodeficiency virus type 1 DNA in T-cells: Result of multiple infection events; *J. Virol.* **64**: 4836-4841
- Roe**, T.; Reynolds, T. C.; Yu, G.; Brown, P. O. (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis; *EMBO J.* **12**: 2099-2108
- Roe**, T.; Chow, S. A.; Brown, P. O. (1997): 3'-end processing and kinetics of 5'-end joining during retroviral integration *in vivo*; *J. Virol.* **71**: 1334-1340
- Roitt**, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K. (1989): *Immunology*, Second edition, Gover Medicin Publishing, London, New York
- Rojko**, J. L.; Hoover, E. A.; Mathes, L. E.; House, W. R.; Schaller, J. P.; Olsen, R. G. (1978): Detection of feline leukemia virus in tissues of cats by a paraffin embedding immunofluorescence procedure; *J. Natl. Cancer Inst.* **61**: 1315-1321
- Rojko**, J. L.; Hoover, E. A.; Mathes, L. E.; Olsen, R. G.; Schaller, J. P. (1979): Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection; *J. Natl Cancer Inst.* **63**: 759-768
- Rojko**, J. L.; Hoover, E. A.; Quackenbush, S. L.; Olsen, R. G. (1982): Reactivation of latent feline leukemia virus infection; *Nature.* **298**: 385-388
- Rojko**, J. H.; Olsen, R. G. (1984): The Immunobiology of the feline leukaemia virus; *Vet. Immunol. Immunopathol.* **6**: 107-165
- Rojko**, J. L.; Essex, M.; Trainin, Z. (1988): Feline leukemia/sarcoma viruses and immunodeficiency; *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **32**: 57-96

- Rojko, J. L.;** Hardy, W. D., Jr. (1994): Feline leukemia virus and other retroviruses. In: Sherding, R. G. (Eds.): The cat: Diseases and clinical management, 2nd ed., Churchill Livingstone, New York: 263-432
- Ruckstuhl, N.** (2000): DNA-Vakzinierung gegen die FeLV-Infektion mit Interleukin-12 als Adjuvans; Vet. Med. Diss., Zürich
- Russell, P. H.;** Jarrett, O. (1978b): The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia viruses; Int. J. Cancer **21**: 768-778
- Salmon, P.;** Olivier, R. Riviere, Y. Brisson, E. Gluckmann, J. Kieny, M. P.; Montagnier, L.; Klatzmann, D. (1988): Loss of CD4 membrane expression and CD4 mRNA during acute human immunodeficiency virus replication; J. Exp. Med. **168**: 1953-1958
- Sarma, P. S.;** Log T. (1971a): Viral interference in feline leukemia-sarcoma complex; Virology 44: 252-258
- Sarma, P. S.;** Baskar, J. F.; Gilden, R. V.; Gardner, M.B.; Huebner, R.J. (1971b): In vitro isolation and characterization of the GA strain of feline sarcoma virus; Proc. Soc. Biol. Med. **137**: 1333-1336
- Sarma, P. S.;** Log, T. (1973): Subgroup classification of feline leukemia and sarcomaviruses by viral interference and neutralization test; Virology **54**: 160-169
- Sarli, G.;** Benazzi, C.; Preziosi, R.; Marcato, P. S. (1995): Assessment of proliferation activity by anti-PCNA monoclonal antibodies in formalin fixed, paraffin-embedded samples and correlation with mitotic index; Vet. Pathol. **32**: 93-96
- Sarli, G.;** Dellasalda, L.; Zaccaro, L.; Bendinelli, M.; Piedimonte, G.; Marcato, P. S. (1998): Apoptotic fraction in lymphoid tissue of FIV-infected spf cats; Vet. Immunol. Immunopathol. **64**: 33-44
- Sattentau, Q. L.;** Weiss, R. A. (1988): The HIV antigen, physiological ligand and HIV-receptor; Cell **52**: 631-633
- Schafer, W.;** Bolognesi, D., P. (1977a): Mammalian type C oncornaviruses: Relationship between viral structure and cell surface antigens and their possible significance in immunological defense mechanisms; Contemp. Top. Immunobiol. **6**: 127-167
- Schäfer, H. E.;** Fischer, R. (1977b): Aussagemöglichkeiten des zytochemischen Nachweises saurer Phosphatase an konventionellen Paraffinschnitten; Zbl. allg. Pathol. und pathol. Anat. **121**: 577

- Schaller, J. P.;** Olsen, R. G. (1975): Determination of subgroup-specific feline oncornavirus-neutralizing antibody; *Infect. Immun.* **12**: 1405-1410
- Schneider-Schaulies, S.;** Liebert, U. G.; Backo, K.; Cattaneo, R.; Billeter, M., ter Meulen, V. (1989): Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of lewis rats; *Virology* **171**: 525-534
- Schneider-Schaulies, S.;** Schneider-Schaulies, J.; Bayer, M.; Löffler, S.; ter Meulen, V. (1993): Spontaneous and differentiation-dependent regulation of measles virus gene expression in human glial cells; *J. Virol.* **67**: 3375-3383
- Schriever, F.;** Freedman, A. S.; Freeman, G.; Messner, E.; Lee, G.; Daley, J.; Nadler, L. M. (1989): Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype; *J. Exp. Med.* **169**: 2043-2058
- Schwartz, D.;** Kipar, A.; Köhler, K.; Jarrett, O.; Reinacher, M. (2001): Demonstration of provirus, transcription and translation of exogenous FeLV sequences by PCR and immunohistology; Proceedings, 19th ESVP Meeting, Thessaloniki-Greece 2001: 155
- Scolnik, E.;** Rands, E.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. (1970): RNA-dependent DNA polymerase activity in five RNA viruses: divalent cation requirements; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**: 1769-1796
- Sellheyer, K.;** Schwarting, R.; Stein, H. (1989): Isolation and antigenetic profile of follicular dendritic cells; *Clin. Exp. Immunol.* **78**: 431-436
- Sherr, C., J. et al.** (1978): Restriction endonuclease mapping of unintegrated proviral DNA of Snyder-Theilen feline sarcoma virus: Localisation of sarcoma-specific sequences; *J. Virol.* **32**: 860
- Snyder, H. W.;** Hardy, W. D.; Zuckermann, E. E.; Fleissner, E. (1978): Characterisation of a tumor specific antigen of the surface of feline lymphosarcoma cells; *Nature* **275**: 656-658
- Snyder, H. W.;** Singhal, M. C.; Zuckerman, E. E. ; Jones, F. R.; Hardy, W. D. (1983): The feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) is related to, but distinguishable from, FeLV-C gp70; *Virol.* **131**: 315-327
- Stein, H.;** Siegel, H.; Herbst, H.; Niedobitek, G.; Fost, H. D. (1991): Das lymphatische Gewebe und AIDS: Die Rolle der Lymphozyten und folliculären dendritischen Zellen (FDZ); *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **75**: 4-19

- Stephenson, J. R.;** Essex, M.; Hino, S.; Hardy, W. D.; Aaronson, S. A. (1977a): Feline oncornavirus-associated cell-membrane antigen (FOCMA): Distinction between FOCMA and the major virion glykoprotein; Proc. Natl. Acad. USA **74**: 1219-1223
- Stewart, L.;** Vogt, V. M. (1991): *Trans*-acting viral protease is necessary and sufficient for activation of avian leukosis virus reverse transcriptase; J. Virol. **65**: 6218-6231
- Stiff, M. I.;** Olsen, G. G. (1982): Loss of short-lived suppressive function of peripheral leucocytes in feline retrovirus-infected cats; J. Clin. Lab. Immunol. **7**: 133-138
- Stryer, L.** (1991): Lehrbuch der Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin: 857-879
- Teebken-Schuler, D.** (1993): Immunhistologischer Nachweis der viralen Strukturproteine p27 und gp70 des felinen Leukämievirus (FeLV) in Organen natürlich infizierter Katzen; Vet. Med. Diss., Gießen
- Teich, N.** (1982): Taxonomy of retroviruses.. In: Weiss, R.; Teich, N.; Varmus, H.; Coffin, J: RNA Tumor Viruses., Cold Spring Harbour Laboratory Press New York: S. 25
- Temin, H. M.;** Baltimore, D. (1972): RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses; Ver. Res. **17**: 129-185
- Theilen, G. H.;** Kawakami, T. G.; Rush, J. D.; Munn, R. J. (1969): Replication of cat leukemia virus in cell suspension culture; Nature **222**: 589-590
- Theilen, G. H.;** Madewell, B. R. (1987): Hematopoietic Neoplasms, Sarcomas and related conditions. In: G. H. Theilen; B. R. Madewell (Eds.), Lea & Febinger, Philadelphia: 354-381
- Todaro, G. J.;** Benveniste, R. E.; Lieber, M. M.; Livingston, D. M. (1973): Infectious type C viruses released by normal cat embryo cells; Virology **55**: 506-515
- Toth, S. R.;** Onions, D. E.; Jarrett, O. (1986): Histopathological and hematological findings in myeloid leukemia induced by a new feline leukemia virus isolate; Vet. Pathol. **23**: 462-470
- Varmus, H., E.;** Padgett, T.; Heasley, S. (1977): Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA; Cell **11**: 307-319
- Varmus, H.** (1988): Retroviruses; Science **240**: 1427-1435
- Velicer, L. F.;** Graves, D. C. (1974): Properties of feline leukemia virus. II. In vitro labelling of the polypeptides; J. Virol. **14**: 700

- Vedbrat, S. S.;** Evans-McCall, M.; Lutz, H.; Prensky, W. (1980): Monoclonal antibodies to FOCMA: Binding to FeLV-C infected cells; In: Hardy, W. D.; Essex, M.; McClelland, A. J. (Eds.), Elsevier, Hiederlande: 457-470
- Vedbrat, S. S.;** Rasheed, S.; Lutz, H.; Gonda, M. A. Ruscetti, S.; Gardner, M. B.; Rensky, W. (1983): Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: A viral and not a cellular coded transformation-specific antigen of cat lymphomas; *Virology* **124**: 445-461
- von Bothmer, I.;** Reinacher, M. (1999): Expression von Proteinen des Felinen Leukämievirus (FeLV) in verschiedenen Zellen und Geweben bei unterschiedlichen Krankheitsbildern nach spontaner Infektion; Abschlussbericht des DFG-Projektes Re 532/5-1 vom 01. Juni 1999
- van Rooijen, N.** (1987): The „in situ“ immune response in lymph nodes: A review; *Anat. Rec.* **218**: 359-364
- Weller, S. K.;** Joy, A. E. und Temin, H. M. (1980): Correlation between cell killing and massive second-round superinfection by members of some subgroups of avian leukosis virus; *J. Virol.* **33**: 494-506
- Wellman, M. L.;** Kociba, M. G.; Lewis, L. E.; Mathes, R. G.; Olsen, M. (1984): Inhibition of erythroid colony-forming cells by a M_r 15.000 protein of feline leukemia virus; *Cancer Res.* **44**: 1527-1529
- Wilkinson D.G.** (1990): mRNA in situ hybridisation and the study of development; In *Situ Hybridisation, Principles und Practice* (Hrsg. Polak, J. M., McGee, D.) Oxford University Press, New York: 113-124
- Wilkinson, D. G.** (1992): The theory and practice of in situ hybridisation. In: Wilkinson D. G. (Hrsg.) *In situ Hybridisation, A practical approach*; IRL Press, Oxford, New York, Tokyo: 1-15
- Willis, J. W.;** Craven, R. C. (1991): Form, function, and use of retroviral gag proteins; *AIDS* **5**: 639-654
- Witmer, M. D.;** Steinmann, R. M. (1984): The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells light-microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node and Peyer's patch, *Am. J. Anatomy* **170**: 465-481
- Wittmer, G.** (1993): Statistische Untersuchungen zur Infektion mit dem felinen Leukämievirus (FeLV) bei Sektionskatzen; *Vet. Med. Diss., Gießen*

Woodroffe, M. N.; Kuzner, M. L.; Ironside, J. W. (1994): In situ hybridisation. In Neuropathology; Neuropathol. Appl. Neurobiol **20**: 562-572

Wunsch, M.; Schulz, A. S.; Koch, W.; Friedrich, R.; Hunsmann, G. (1983): Sequence analysis of gardner-arnstein feline leukaemia virus envelope gene reveals common structural properties of mammalian retroviral envelope genes; EMBO J. **2**: 2239-2246

Zietz, C.; Speiser, B.; Hell, W.; Stürzl, M. Wolf, H.; Roth, W. K. (1991): Morphologischer HIV-Nachweis an formalinfixiertem Material - Techniken, Probleme, Ergebnisse; Verh. Dtsch. Ges .Path. **75**: 149-154

Zurbriggen, A.; Müller, C. Vandeveld, M. (1993a): In situ hybridisation 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

8 Anhang

8.1 Tabellen

Die folgenden Tabellen (8.1.1-8.1.25) enthalten eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse der in situ-Hybridisierung und gegebenenfalls der Doppelmarkierung aller untersuchten Organe sowie der Ergebnisse der serologischen (AG-Nachweis im Blut) und molekularbiologischen (Quantitative PCR (TaqMan) von Blut- und Organ-Proben) Untersuchungen. Die beiden letzteren Untersuchungen wurden von Fr. Ruckstuhl im Rahmen ihrer Dissertation in Zürich durchgeführt (Ruckstuhl, 2000).

Tabelle 8.1.1: Katze Nr.157

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)				
Lymphknoten												
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	KZ	FR	PK/M	
		+	gp70	++	++	++	gp70	+	++	++	++	
			p27	++	++	++	p27	+	++	++	++	
			p15E	+	+	+	p15E	-	+	+	+	
			U3	+	+	+	U3	-	+	+	+	
Milz												
			KZ	FR	PALS	RP	KZ	FR	FZ	FR	RP	
		+	gp70	++	+	+	gp70	+	+	+	+	
			p27	++	+	+	p27	+	+, x	+	++	
			p15E	+	-	-	p15E	-	xx	+	+	
			U3	+	+	+	U3	+	xx	+	+	
Dünndarm												
		+	E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ	
			gp70	++	+	++	+	+	+	+	++	
			p27	++	-	+	+	-	+	++	++	
			p15E	+	-	+	+	-	++	+	++	
			U3	+	-	+	-	-	++	+	++	
Knochenmark												
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten					
		+	gp70	+	++	+	ISH					
			p27	+	+	+	IH					
			p15E	-	-	-	ISH/IH					
			U3	-	+	-						
Thymus												
			Kortex	Medulla	Kortex	Medulla						
		+	gp70	++	+	ISH						
			p27	++	+	IH						
			p15E	-	-	ISH/IH						
			U3	-	-							

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.2: Katze Nr.158

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)				
Lymphknoten												
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK/M	FR	PK/M	
		+	gp70 ++	+	++	++	ISH				n.d.	
			p27 ++	+	++	++	IH					
			p15E +	-	+	+	ISH/IH					
			U3 +	-	+	+						
Milz												
			KZ	FR	PALS	RP	FZ	FR	RP	FR	RP	
		+	gp70 ++	+	+	+	ISH				n.d.	
			p27 ++	+	+	-	IH					
			p15E -	-	-	-	ISH/IH					
			U3 -	-	-	-						
Dünndarm												
		+	E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ	
			gp70 ++	+	+	++	+	+	ISH			
			p27 ++	+	-	++	+	+	IH		n.d.	
			p15E +	-	-	-	-	-	ISH/IH			
			U3 +	+	-	+	-	-				
Knochenmark												
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten					
		+	gp70 ++	++	-		ISH				n.d.	
			p27 ++	+	-		IH					
			p15E -	-	-		ISH/IH					
			U3 -	+	-							
Thymus												
			Kortex	Medulla							n.d.	
		+	gp70 +	+								
			p27 +	+								
			p15E -	-								
			U3 -	-								

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.3: Katze Nr.159

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)					
		Lymphknoten										
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK/M	FR	PK/M	
		+	gp70	+	+	+	+	+	+	+	+	
			p27	+	+	++					n.d.	
			p15E	+	-	-					ISH/IH	
			U3	+	+	-						
			Milz									
				KZ	FR	PALS	RP	FZ	FR	RP		
		+	gp70	-	-	-	+			ISH		
			p27	+	+	+	+			IH		
			p15E	-	-	-	-			ISH/IH		
			U3	-	-	-	-					
			Dünndarm									
				E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
		+	gp70	+	-	-	-	-	-		ISH	
			p27	+	-	-	-	-	-		IH	n.d.
			p15E	-	-	-	-	-	-		ISH/IH	
			U3	-	-	-	-	-	-			
			Knochenmark									
				Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten				
		+	gp70	-	-	-	-			ISH		
			p27	-	-	-	-			IH	n.d.	
			p15E	-	-	-	-			ISH/IH		
			U3	-	-	-	-					
			Thymus									
				Kortex	Medulla						n.d.	
		+	gp70	+	+	+						
			p27	+	+	+						
			p15E	-	-	-						
			U3	-	-	-						

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.4: Katze Nr.160

Blut		Organe									
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)		
		Lymphknoten									
			KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M	
	+	gp70	++	+	++	++		ISH	+	++	++
		p27	+	-	+	+		IH	x	-	+
		p15E	+	-	-	-		ISH/IH	-	-	++
		U3	+	-	-	+					
		Milz									
			KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR	RP	
	+	gp70	++	+	+	-		ISH	++	+	+
		p27	++	-	-	+		IH	x	-	-
		p15E	-	-	-	-		ISH/IH	xx	-	-
		U3	+	-	-	-					
	+	Dünndarm									
			E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
	+	gp70	++	+	+	++	+	+		-	-
		p27	++	+	-	+	+	-		-	++
		p15E	-	-	-	-	-	-		++	+
		U3	+	+	-	+	-	-			
		Knochenmark									
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten				
	+	gp70	+	++	+	++	+	ISH	++	-	-
		p27	+	+	+	+	+	IH	+	++	++
		p15E	-	-	-	-	-	ISH/IH	-	-	+
		U3	+	+	+	-	-				
		Thymus									
			Kortex	Medulla	Kortex	Medulla					
	+	gp70	++	+	+	+	+	ISH	+	++	++
		p27	+	+	+	+	+	IH	+	-	-
		p15E	-	-	-	-	-	ISH/IH	-	-	-
		U3	-	-	-	-	-				

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.5: Katze Nr.161

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)										Doppelmarkierung (ISH/IH)	
		Lymphknoten											
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	RP	FZ	FR	PK/M
+	gp70		+	-	+	++							ISH
	p27		+	+	+	+							IH
	p15E		-	-	-	-							ISH/IH
	U3		-	-	-	-							
Milz													
+	gp70		KZ	FR	PALS	RP					FZ	FR	RP
	p27		+	+	+	+							ISH
	p15E		+	+	+	+							IH
	U3		-	-	-	-							ISH/IH
Dünndarm													
-	gp70		E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ			E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
	p27		++	+	+	+	-	-					ISH
	p15E		++	+	+	+	-	-					IH
	U3		+	-	-	-	-	-					ISH/IH
Knochenmark													
+	gp70		Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten						
	p27		+	+	-			ISH					
	p15E		+	+	-			IH					
	U3		-	-	-			ISH/IH					
Thymus													
+	gp70		Kortex	Medulla									
	p27		++	+									n.d.
	p15E		+	+									
	U3		-	-	-								

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.6: Katze Nr.162

Blut		Organe									
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)				
Lymphknoten											
			KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M	
	+	gp70	++	+	++	++	ISH	++	+	++	++
		p27	++	+	+	+	IH	xx	-	++	++
		p15E	+	-	-	+	ISH/IH	-	-	++	++
		U3	-	-	-	-					
Milz											
		gp70	++	+	PALS	RP	ISH	FZ	FR	RP	
	+	p27	+	+	+	+	IH	x	-	-	-
		p15E	+	-	-	-	ISH/IH	xx	-	-	-
		U3	-	-	-	-					
Dünndarm											
	+	gp70	++	+	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ	
		p27	++	-	++	++	IH	-	+	+	+
	+	p15E	-	-	+	+	IH	+	++	++	+
		U3	+	-	-	-	ISH/IH	++	+	++	++
Knochenmark											
		gp70	+	+	Zellen mittlere EF	reife Zellen	ISH	blastoide Z.	Megakariozyten		
	+	p27	++	+	+	+	IH	+	-	-	-
		p15E	-	-	-	-	ISH/IH	+	++	++	++
		U3	-	-	-	-					
Thymus											
		gp70	+	+	Kortex	Medulla	ISH	Kortex	Medulla		
	+	p27	+	+	+	+	IH	+	+	+	+
		p15E	+	+	+	-	ISH/IH	+	+	-	-
		U3	-	-	-	-					

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.7: Katze Nr.163

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)										Doppelmarkierung (ISH/IH)	
Lymphknoten		KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	M	ISH	KZ	FR	PK/M
+	+	gp70	++	+	++	++	+	++	++	ISH	++	+	++
		p27	++	+	+	+	+	+	+	IH	x	-	+
		p15E	+	+	+	+	+	+	+	ISH/IH	-	-	++
		U3	+	-	+	+	-	+	+				
Milz		KZ	FR	PALS	RP	KZ	FR	PALS	RP	ISH	FZ	FR	RP
+	+	gp70	++	+	+	+	+	+	+	ISH	+	+	+
		p27	++	+	+	+	+	+	+	IH	+, x	+	+
		p15E	+	+	+	-	+	+	-	ISH/IH	+, xx	-	-
		U3	+	-	+	-	-	+	-				
Dünndarm		E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
+	+	gp70	++	+	-	++	+	+	+	ISH	+	-	+
		p27	+	+	-	++	+	-	+	IH	+	+	+
		p15E	-	-	-	-	-	-	-	ISH/IH	++	+	++
		U3	+	+	-	-	-	-	-				
Knochenmark		Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten							
+	+	gp70	++	++	-	ISH	++	-					
		p27	++	++	-	IH	++	++					
		p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-					
		U3	+	+	-								
Thymus		Kortex	Medulla	Kortex	Medulla								
+	+	gp70	++	+	+	ISH	+	++					
		p27	+	+	+	IH	-	-					
		p15E	+	+	+	ISH/IH	+	-					
		U3	+	+	+								

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.8: Katze Nr.164

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)				
Lymphknoten												
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	KZ	FR	PK/M	
		+	gp70	++	++	++	gp70	+	++	++	++	
			p27	++	+	++	p27	+	+	+	++	
			p15E	+	-	+	p15E	+	-	x	++	
			U3	+	-	+	U3	-	-	x	+	
Milz												
			KZ	FR	PALS	RP	KZ	FR	FZ	FR	RP	
		+	gp70	++	+	+	gp70	+	++	+	-	
			p27	++	+	+	p27	+	x	-	-	
			p15E	+	+	-	p15E	+	xx	-	-	
			U3	+	-	+	U3	-	xx	-	-	
Dünndarm												
		+	E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ	
			gp70	++	+	++	++	++	-	-	-	
			p27	++	+	++	+	+	++	++	++	
			p15E	+	-	++	+	-	++	+	++	
			U3	+	-	+	+	-	++	+	++	
Knochenmark												
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten					
		+	gp70	++	++	++	ISH					
			p27	++	++	+	IH					
			p15E	+	+	-	ISH/IH					
			U3	++	+	+	ISH/IH					
Thymus												
			Kortex	Medulla	Kortex	Medulla						
		+	gp70	++	++	+	ISH					
			p27	++	++	+	IH					
			p15E	+	+	+	ISH/IH					
			U3	-	-	-	ISH/IH					

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.9: Katze Nr.165

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)					
			Lymphknoten										
				KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M		
		+	gp70	+	-	+	+		ISH			n.d.	
			p27	+	+	++	++		IH				
			p15E	-	-	-	-		ISH/IH				
			U3	-	-	-	-						
			Milz										
				KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR	RP		
		+	gp70	-	-	-	-		ISH			n.d.	
			p27	-	-	-	-		IH				
			p15E	-	-	-	-		ISH/IH				
			U3	-	-	-	-						
		+	Dünndarm										
				E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ		E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
		+	gp70	-	-	-	-	-	-		ISH		n.d.
			p27	-	-	-	+	-	-		IH		
			p15E	-	-	-	-	-	-		ISH/IH		
			U3	-	-	-	-	-	-				
			Knochenmark										
				Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen		blastoide Z.		Megakariozyten			
		+	gp70	-	-	-	-		ISH			n.d.	
			p27	+	-	-	-		IH				
			p15E	-	-	-	-		ISH/IH				
			U3	-	-	-	-						
			Thymus										
				Kortex		Medulla						n.d.	
		+	gp70	-	-	-	-						
			p27	-	-	-	-						
			p15E	-	-	-	-						
			U3	-	-	-	-						

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.10: Katze Nr.166

Blut		Organe													
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)								Doppelmarkierung (ISH/IH)				
		Lymphknoten													
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	FR	PK/M		KZ	FR	PK/M
			gp70	++	-	+			+		+	ISH	++	+	++
			p27	+	-	+			+		-	IH	x	-	++
			p15E	+	-	+			+		-	ISH/IH	-	-	+
			U3	+	+	+			+		+		-	-	+
			Milz												
			gp70	++	+		RP			PALS		ISH	FZ	FR	RP
			p27	+	-	-	-			-		IH	+	+	+
			p15E	+	-	-	-			-		ISH/IH	x	-	-
			U3	+	-	-	-			-		ISH/IH	x	-	-
			Dünndarm												
			gp70	++	+		I-AZ			I-K		ISH	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
			p27	++	+	+	+			+		IH	++	-	++
			p15E	+	+	+	-			+		ISH/IH	+	+	-
			U3	+	-	-	-			+		ISH/IH	-	+	-
			Knochenmark												
			gp70	++			Zellen mittlere EF					ISH	blastoide Z.		Megakariozyten
			p27	++			++				-	IH	++		-
			p15E	+			+				-	ISH/IH	+		+
			U3	+			+				-	ISH/IH	-		-
			Thymus												
			gp70	+			Kortex					ISH	Kortex		Medulla
			p27	+			+				+	IH	+	+	+
			p15E	-			-				-	ISH/IH	-	-	-
			U3	-			-				-	ISH/IH	-	-	-

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.11: Katze Nr.167

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)							Doppelmarkierung (ISH/IH)		
		Lymphknoten											
				KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M		
				gp70	++	+	+	+	ISH	++	x	++	
				p27	++	+	+	+	IH	+	xx	+	
				p15E	+	-	-	-	ISH/IH	x	-	+	
				U3	+	-	-	-				+	
				Milz									
					KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR	RP	
				gp70	++	+	+	-	ISH	+	+	+	
				p27	+	-	-	-	IH	x	-	-	
				p15E	+	-	-	-	ISH/IH	xx	-	-	
				U3	-	-	-	-				-	
				Dünndarm									
					E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
				gp70	++	-	-	+	+	-	+	-	+
				p27	++	-	-	+	-	-	-	+	-
				p15E	++	-	-	+	-	-	++	-	-
				U3	+	-	-	-	-	-		-	-
				Knochenmark									
					Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen		blastoide Z.	Megakariozyten			
				gp70	++	++	-		ISH	++	+		
				p27	+	++	-		IH	++	++		
				p15E	+	+	-		ISH/IH	+	+		
				U3	+	+	-						
				Thymus									
					Kortex	Medulla		Kortex	Medulla				
				gp70	+	+		+	ISH	+	+		
				p27	-	-		-	IH	-	-		
				p15E	-	-		-	ISH/IH	-	-		
				U3	-	-		-		-	-		

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.12: Katze Nr. 169

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)					
		Lymphknoten											
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	RP	FZ	FR	PK/M
		+	gp70	-	-	-	ISH	-	-	-	ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	IH	-	-	-	IH		
			p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-	-	ISH/IH		
			U3	-	-	-		-	-	-			
			Milz										
		+	gp70	-	-	-	ISH	-	-	-	ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	IH	-	-	-	IH		
			p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-	-	ISH/IH		
			U3	-	-	-		-	-	-			
			Dünndarm										
		+	gp70	-	-	-	ISH	-	-	-	ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	IH	-	-	-	IH		
			p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-	-	ISH/IH		
			U3	-	-	-		-	-	-			
			Knochenmark										
		+	gp70	-	-	-	ISH	-	-	-	ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	IH	-	-	-	IH		
			p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-	-	ISH/IH		
			U3	-	-	-		-	-	-			
			Thymus										
		+	gp70	-	-	-	ISH	-	-	-	ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	IH	-	-	-	IH		
			p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-	-	ISH/IH		
			U3	-	-	-		-	-	-			
			Thymus										
		+	gp70	-	-	-	ISH	-	-	-	ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	IH	-	-	-	IH		
			p15E	-	-	-	ISH/IH	-	-	-	ISH/IH		
			U3	-	-	-		-	-	-			

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.13: Katze Nr.171

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)				Doppelmarkierung (ISH/IH)				
		Lymphknoten										
			KZ	FR	PK	M		KZ	FR			PK/M
	+	gp70	++	+	+	+		ISH		++	x	++
		p27	++	-	+	+		IH		+	xx	-
		p15E	++	+	+	+		ISH/IH		x	-	+
		U3	+	-	+	-						
		Milz										
			KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR			RP
	+	gp70	++	+	+	+		ISH		+	+	+
		p27	+	+	+	+		IH		-	+	-
		p15E	+	+	-	-		ISH/IH		xx	-	-
		U3	+	-	-	-						
	+	Dünndarm										
			E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ		E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
	+	gp70	++	+	+	++	++	++		+	-	+
		p27	++	+	+	++	+	+		+	+	+
		p15E	++	+	+	++	+	+		++	+	+
		U3	+	-	-	+	-	-				
		Knochenmark										
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen					blastoide Z.		Megakariozyten
	+	gp70	+	+	+					ISH	++	+
		p27	+	+	+					IH	+	+
		p15E	-	+	-					ISH/IH	-	+
		U3	-	+	-							
		Thymus										
			Kortex		Medulla					Kortex		Medulla
	+	gp70	+		+					ISH	+	+
		p27	+		+					IH	-	-
		p15E	+		+					ISH/IH	-	-
		U3	+		+							

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.14: Katze Nr.173

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)										
Lymphknoten		KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK/M	Doppelmarkierung (ISH/IH)			
-	+	gp70	++	+	+	+	+	+	ISH	n.d.		
		p27	++	+	+	+	+	+	IH			
		p15E	+	-	+	-	-	-	ISH/IH			
		U3	+	+	-	+	-	+				
Milz												
-	+	gp70	++	+	+	+	+	+	ISH	n.d.		
		p27	+	+	+	+	+	+	IH			
		p15E	-	-	-	-	-	-	ISH/IH			
		U3	-	-	-	-	-	-				
Dünndarm												
-	+	gp70	++	-	+	+	+	+	ISH	n.d.		
		p27	+	-	+	-	-	-	IH			
		p15E	+	-	-	-	-	-	ISH/IH			
		U3	+	-	-	-	-	-				
Knochenmark												
-	+	gp70	++	+	+	+	+	+	ISH	n.d.		
		p27	+	-	+	-	-	-	IH			
		p15E	+	-	-	-	-	-	ISH/IH			
		U3	+	-	-	-	-	-				
Thymus												
-	+	gp70	n.d.					reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten		
		p27								n.d.		
		p15E										
		U3										
Thymus												
-	+	gp70	n.d.					Medulla	n.d.			
		p27						+				
		p15E						-				
		U3						-				

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.15: Katze Nr.174

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)				
		Lymphknoten											
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK/M	FR	FR	PK/M	
+		gp70	+	+	+	+							
		p27	-	-	+	+						n.d.	
		p15E	-	-	-	-							
		U3	-	-	-	-							
		Milz											
+		gp70	-	-	PALS	RP	KZ	FR					
		p27	-	-	-	-						n.d.	
		p15E	-	-	-	-							
		U3	-	-	-	-							
		Dünndarm											
+	(pos. in 3.-7. W)	gp70	-	-	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ	E-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
		p27	+	-	-	-							n.d.
		p15E	-	-	-	-							
		U3	-	-	-	-							
		Knochenmark											
+		gp70	Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten						
		p27	-	-	-								n.d.
		p15E	-	-	-								
		U3	-	-	-								
		Thymus											
+		gp70	Kortex	Medulla									n.d.
		p27	-	+									
		p15E	-	-									
		U3	-	-									

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.16: Katze Nr.157

Blut		Organe										Doppelmarkierung (ISH/IH)		
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)											
			Lymphknoten											
				KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M			
			+	++	+	++	++		++	+	++	ISH	+	
				++	+	++	++		++	+	++	IH	-	
				+	-	+	+		+	-	+	ISH/IH	-	
				+	+	+	+		+	+	+		+	
			Milz											
				KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR	RP			
			+	++	+	+	+		+	+	+	ISH	+	
				++	+	+	+		+	+	+	IH	+	
				+	-	-	-		x	-	-	ISH/IH	-	
				+	+	+	-							
			Dünndarm											
				E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ		
			+				n.d.			++	-	++	+	
										+	+	+	+	
										++	+	++	+	
			Knochenmark											
				Zellen frühe EF		Zellen mittlere EF		reife Zellen		blastoide Z.		Megakariozyten		
			+	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		
										ISH				
										IH				
										ISH/IH				
			Thymus											
				Kortex		Medulla		Kortex		Medulla				
			+	-		-		-		-		-		
				-		-		-		-		-		
				-		-		-		-		-		
				-		-		-		-		-		

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.17: Katze Nr.176

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)				Doppelmarkierung (ISH/IH)					
		Lymphknoten										
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	FR	PK/M	
		+	gp70	+	-	+	+	-	+		ISH	
			p27	+	+	+		+			IH	
			p15E	-	-	-		-			ISH/IH	
			U3	-	-	-		-				
			Milz									
		+	gp70	-	-	-	RP	-		FZ	FR	RP
			p27	-	-	-		-				n.d.
			p15E	-	-	-		-			ISH/IH	
			U3	-	-	-		-				
		+	Dünndarm									
			gp70	+	-	-	I-AZ	-		E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
			p27	+	-	-		-				n.d.
			p15E	+	-	-		-			ISH/IH	
			U3	+	-	-		-				
			Knochenmark									
		+	Zellen frühe EF	+	Zellen mittlere EF	+	reife Zellen	blastoide Z.				Megakariozyten
			gp70	+	+	-	-				ISH	
			p27	+	+	-	-				IH	
			p15E	-	-	-	-				ISH/IH	
			U3	-	-	-	-					n.d.
			Thymus									
		+	Kortex		Medulla							n.d.
			gp70	-	-	-						
			p27	-	-	-						
			p15E	-	-	-						
			U3	-	-	-						

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.18: Katze Nr.179

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)										Doppelmarkierung (ISH/IH)
Lymphknoten		KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK/M
		gp70	-	-	+	+	-	-	+	+	+	ISH
		p27	++	+	+	+	+	+	+	+	+	IH
		p15E	+	-	-	-	-	-	+	+	+	ISH/IH
		U3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Milz										
		gp70	+	FR	PALS	RP	FR	PALS	RP	FZ	FR	RP
		p27	+	-	-	+	-	-	+	+	+	ISH
		p15E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IH
		U3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ISH/IH
		Dünndarm										
		gp70	++	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	I-AZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
		p27	++	+	+	+	+	+	+	+	+	ISH
		p15E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IH
		U3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ISH/IH
		Knochenmark										
		gp70	+	Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten				
		p27	+	+	++	+	+	+	+	+	+	ISH
		p15E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IH
		U3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ISH/IH
		Thymus										
		gp70	++	Kortex	Medulla							n.d.
		p27	++	+	+							
		p15E	-	-	-							
		U3	-	-	-							

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.19: Katze Nr.181

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)				Doppelmarkierung (ISH/IH)					
		Lymphknoten											
				KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M		
+		gp70	-	-	-	-	-	ISH				n.d.	
		p27	-	-	-	-	-	IH					
		p15E	-	-	-	-	-	ISH/IH					
		U3	-	-	-	-	-						
		Milz											
+		gp70	-	-	-	-	-	ISH				n.d.	
		p27	-	-	-	-	-	IH					
		p15E	-	-	-	-	-	ISH/IH					
		U3	-	-	-	-	-						
		Dünndarm											
+	(pos. in 1.-7. W)	gp70	-	-	-	-	-	ISH				n.d.	
		p27	-	-	-	-	-	IH					
		p15E	-	-	-	-	-	ISH/IH					
		U3	-	-	-	-	-						
		Knochenmark											
+		gp70	-	-	-	-	-	ISH				n.d.	
		p27	-	-	-	-	-	IH					
		p15E	-	-	-	-	-	ISH/IH					
		U3	-	-	-	-	-						
		Thymus											
+		Zellen frühe EF		Zellen mittlere EF		reife Zellen		blastoide Z.		Megakariozyten			
		Thymus											
+		Kortex		Medulla								n.d.	

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.20: Katze Nr.193

Blut		Organe												
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)							Doppelmarkierung (ISH/IH)			
				KZ	FR	PK	M	KZ	FR	KZ	FR	PK/M		
		Lymphknoten												
		+	gp70	+	-	+	+					ISH	n.d.	
			p27	+	+	-	-					IH		
			p15E	-	-	-	-					ISH/IH		
			U3	+	-	-	-							
		Milz												
		+	gp70	+	+	-	-					ISH	n.d.	
			p27	-	-	-	-					IH		
			p15E	-	-	-	-					ISH/IH		
			U3	-	-	-	-							
		+	Dünndarm											
			gp70	+	+	-	-						ISH	n.d.
			p27	+	-	-	-						IH	
			p15E	-	-	-	-						ISH/IH	
		U3	+	-	-	-								
		+	Knochenmark											
			gp70	+	+	-	-						ISH	n.d.
			p27	+	-	-	-						IH	
			p15E	-	-	-	-						ISH/IH	
		U3	+	-	-	-								
		+	Thymus											
			gp70	+	+	-	-						ISH	n.d.
			p27	-	-	-	-						IH	
			p15E	-	-	-	-						ISH/IH	
		U3	+	-	-	-								
		+	Kortex		Medulla								n.d.	
			gp70	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			p27	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			p15E	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		U3	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.21: Katze Nr.204

Blut		Organe									
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)					Doppelmarkierung (ISH/IH)				
Lymphknoten		KZ	FR	PK	M	KZ	FR	KZ	FR	PK/M	
+	+	gp70	++	+	++	++	+	++	++	++	++
		p27	++	+	+	+	+	++	x	+	+
		p15E	+	-	-	+	-	-	-	-	+
		U3	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Milz											
+	+	gp70	++	+	++	++	+	++	++	++	++
		p27	++	+	+	+	+	+	+	-	++
		p15E	+	-	-	+	-	-	-	-	++
		U3	+	-	-	-	-	-	-	-	++
Dünndarm											
+	+	gp70	++	+	++	++	+	++	++	++	++
		p27	+	+	++	+	+	++	+	+	+
		p15E	+	-	-	-	-	-	+	+	++
		U3	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Knochenmark											
+	+	Zellen frühe EF	++	+	+	+	+	+	+	+	+
		Zellen mittlere EF	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Zellen reife Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		blastoide Z.	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Thymus											
+	+	Kortex	++	+	+	+	+	+	+	+	+
		Medulla	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Kortex	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Medulla	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.22: Katze Nr.216

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)										Doppelmarkierung (ISH/IH)	
		Lymphknoten											
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	RP	FZ	FR	PK/M
+		gp70	+	+	+	+							ISH
		p27	+	+	+	+							IH
		p15E	-	-	-	-							ISH/IH
		U3	-	-	-	-							
		Milz											
+		gp70	-	-	-	-							ISH
		p27	-	-	-	-							IH
		p15E	-	-	-	-							ISH/IH
		U3	-	-	-	-							
		Dünndarm											
-	+	gp70	+	-	-	-							ISH
		p27	+	-	-	-							IH
		p15E	-	-	-	-							ISH/IH
		U3	+	-	-	-							
		Knochenmark											
+		gp70	-	-	-	-							ISH
		p27	-	-	-	-							IH
		p15E	-	-	-	-							ISH/IH
		U3	+	-	-	-							
		Thymus											
+		Zellen frühe EF		Zellen mittlere EF		reife Zellen		blastoide Z.		Megakariozyten			
		-		+		-		-		-		n.d.	
		-		+		-		-		-		-	
		-		-		-		-		-		-	
		Thymus											
+		Kortex		Medulla								n.d.	
		-		-		-		-		-		-	
		-		-		-		-		-		-	
		-		-		-		-		-		-	

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.23: Katze Nr.222

Blut		Organe											
ELISA	TaqMan	TaqMan		in situ-Hybridisierung (ISH)				Doppelmarkierung (ISH/IH)					
		Lymphknoten											
			KZ	FR	PK	M	KZ	FR	PK	RP	FZ	FR	PK/M
		+	gp70	+	-	+	gp70	-	+	+	ISH		n.d.
			p27	+	-	+	p27	-	-	-	IH		
			p15E	+	-	+	p15E	-	-	+	ISH/IH		
			U3	-	-	-	U3	-	-	-			
			Milz										
		+	gp70	+	-	-	gp70	-	-	RP	FZ	FR	RP
			p27	++	-	-	p27	-	-	-	ISH		n.d.
			p15E	-	-	-	p15E	-	-	-	IH		
			U3	-	-	-	U3	-	-	-	ISH/IH		
+	+		Dünndarm										
		+	gp70	+	-	-	gp70	-	+	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
			p27	+	-	-	p27	-	+	-	ISH		n.d.
			p15E	-	-	-	p15E	-	-	-	IH		
			U3	+	-	-	U3	-	-	-	ISH/IH		
			Knochenmark										
		+	gp70	-	-	-	gp70	-	-	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten	
			p27	-	-	-	p27	-	-	-	ISH		n.d.
			p15E	-	-	-	p15E	-	-	-	IH		
			U3	-	-	-	U3	-	-	-	ISH/IH		
			Thymus										
		+	gp70	+	-	-	gp70	-	-	Medulla			n.d.
			p27	-	-	-	p27	-	-	+			
			p15E	-	-	-	p15E	-	-	-			
			U3	-	-	-	U3	-	-	-			

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.24: Katze Nr.224

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)										
		Doppelmarkierung (ISH/IH)										
		Lymphknoten										
			KZ	FR	PK	M		KZ	FR			
		+	-	-	-	++		ISH				n.d.
			-	-	-	+		IH				
			-	-	-	-		ISH/IH				
			-	-	-	-						
		Milz										
			KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR			
		+	-	-	-	-		ISH				n.d.
			-	-	-	-		IH				
			-	-	-	-		ISH/IH				
			-	-	-	-						
		Dünndarm										
			E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ		E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ
		+	-	-	-	-	-	-		ISH		
			-	-	-	-	-	-		IH		n.d.
			-	-	-	-	-	-		ISH/IH		
			-	-	-	-	-	-				
		Knochenmark										
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen		blastoide Z.	Megakariozyten				
		+	-	-	-			ISH				n.d.
			-	-	-			IH				
			-	-	-			ISH/IH				
			-	-	-							
		Thymus										
			Kortex	Medulla								
		+	-	-								n.d.
			-	-								
			-	-								
			-	-								

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25.

Tabelle 8.1.25: Katze Nr.232

Blut		Organe										
ELISA	TaqMan	TaqMan	in situ-Hybridisierung (ISH)							Doppelmarkierung (ISH/IH)		
Lymphknoten												
			KZ	FR	PK	M		KZ	FR	PK/M		
	+		gp70	+	++	++	++	ISH	+	++	++	
			p27	+	++	++	++	IH	+	xx	++	
			p15E	-	-	+	+	ISH/IH	-	x	++	
			U3	-	-	+	+		-	-	++	
Milz												
			KZ	FR	PALS	RP		FZ	FR	RP		
	+		gp70	+	++	++	++	ISH	+	+	+	
			p27	+	+	++	++	IH	-	-	-	
			p15E	+	+	+	+	ISH/IH	xx	-	-	
			U3	+	+	+	+		-	-	-	
Dünndarm												
	+		E-K	E-BZ	E-AZ	I-K	I-BZ	I-AZ	E-K	E-BZ+AZ	I-BZ+AZ	
			gp70	+	+	++	++	++	-	-	+	
			p27	+	-	++	+	-	++	++	++	
			p15E	+	-	+	-	-	+	-	+	
			U3	+	-	-	-	-	-	-	-	
Knochenmark												
			Zellen frühe EF	Zellen mittlere EF	reife Zellen	blastoide Z.	Megakariozyten					
	+		gp70	++	++	-	+	ISH	+	-	-	
			p27	+	++	-	+	IH	++	++	++	
			p15E	-	+	-	+	ISH/IH	+	+	+	
			U3	+	+	-	-		-	-	-	
Thymus												
			Kortex	Medulla	Kortex	Medulla						
	+		gp70	++	+	+	+	ISH	+	++	++	
			p27	+	+	+	+	IH	++	++	-	
			p15E	-	-	-	-	ISH/IH	+	+	-	
			U3	-	-	-	-		-	-	-	

Legende: Siehe S. 191-192 am Ende der Tabellen 8.1.1.-8.1.25Legende für die Tabellen 8.1.1-8.1.25:

Die Ergebnisse der ersten drei Spalten sind der Dissertationsschrift von Nadja S. Ruckstuhl, 2000, Universität Zürich entnommen. Die Bewertung als positiv oder negativ bezieht sich auf die letzte Blutentnahme vor der Euthanasie. In Klammern sind gegebenenfalls Zeiträume angegeben, in denen die Blutuntersuchung positiv ausfiel.

ELISA (p27): Nachweis von FeLV-Antigen (p27) mittels ELISA im Blut

Prov. TaqMan: Nachweis von FeLV-Provirus mittels TaqMan im Blut oder in Geweben.

gp70: Sonde zum Nachweis von gp70-RNA

p27: Sonde zum Nachweis von p27-RNA

p15E: Sonde zum Nachweis von p15E-RNA

U3: Sonde zum Nachweis von U3-RNA

Auswertung der in situ-Hybridisierung

-: keine positiven Zellen

+: vereinzelt positive Zellen

++: zahlreiche positive Zellen

Auswertung Doppelmarkierung:

+: vereinzelt positive blastoide Zellen

++: zahlreiche positive blastoide Zellen

x: vereinzelt positive FD

xx: zahlreiche positive FDZ

-: keine positiven Zellen

FDZ: folliculäre dendritische Zellen

ISH: Zellen mit ausschließlichem Nachweis viraler RNA

IH: Zellen mit ausschließlichem Nachweis viraler Proteine

ISH/IH: Doppelt markierte Zellen

KZ: Keimzentrum

PK: Parakortex

M: Medulla

PALS: periarteriöle lymphatische Scheide

RP: rote Pulpa

FZ: Follikelzentrum

FR:	Follikelrand
E-K:	Epithelzellen im Bereich der Krypten
E-BZ:	Epithelzellen der basalen Zottenepithels
E-AZ:	Epithelzellen des apikalen Zottenepithels
I-K:	infiltrierende Zellen in der Lamina propria im Kryptenbereich
I-BZ:	infiltrierende Zellen in der Lamina propria im basalen Zottenbereich
I-AZ:	infiltrierende Zellen in der Lamina propria im apikalen Zottenbereich
EF:	Entwicklungsphase
Z:	Zellen
n.d.:	nicht durchgeführt

Tabelle 8.2:

Antigennachweis im Blut mittels FeLV p27 AG-ELISA vom Tag der Infektion bis zur Euthanasie (16.Woche) 1x wöchentlich.

(nach Ruckstuhl, 2000)

Nr.	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W12	W14	W16
157	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
158	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
161	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
162	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
163	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
164	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
167	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
173	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
174	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
175	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
176	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
179	-	-	-	+	+	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	+
181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
204	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
216	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
232	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: negatives Ergebnis
 +: positives Ergebnis
 n.d.: nicht durchgeführt,
 W: Woche nach Infektion

Tabelle 8.3

Virusgenomnachweis im Blut mittels FeLV-TaqMan[®]-PCR vom Tag der Infektion bis zur Euthanasie (16. Woche) 1x wöchentlich.

(nach Ruckstuhl, 2000)

Nr.	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W12	W14	W16
157	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
158	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
159	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
160	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
161	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
162	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
163	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
164	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
165	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
166	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
167	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
173	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
174	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
175	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
176	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
179	-	+	+	+	+	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	+
181	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
193	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
204	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
216	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
222	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
224	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
232	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

: negatives Ergebnis
 + : positives Ergebnis
 n.d.: nicht durchgeführt,
 W : Woche nach Infektion

Tabelle 8.4:

ELISA/ Taq Man/ ISH/ IH vergleichend

(Ergebnisse von ELISA und TaqMan[®] nach Ruckstuhl, 2000)

Nr.	ELISA	TaqMan	In situ-Hybridisierung					Immunhistologie				
	Blut	Blut	Milz	LK	Darm	Thy	KM	Milz	LK	Darm	Thy	KM
157	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
158	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
159	-	B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
160	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
161	B	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
162	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
163	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
164	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
165	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
166	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
167	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
173	B	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
174	B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
175	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
176	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
179	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
181	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
204	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
216	B	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
222	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
224	-	B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
232	-	B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

ELISA: Nachweis von p27 Antigen im Blut

TaqMan: Nachweis von FeLV-DNA-Sequenzen im Blut

B: anfänglich positiv dann Virämie beendet (s. Tabellen 8.1.1-8.1.25)

+: positives Ergebnis/Signal

-: kein positives Ergebnis/Signal

LK : Lymphknoten

Thy: Thymus

KM: Knochenmark

8.2 Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte

ABgene[®] House, Epsom, UK (Vertrieb: Advanced Biotechnologies Ltd., Hamburg)

Superladder low (100 µg/µl in Tris-EDTA-Puffer), SLL-100

6 x Type II DNA electrophoresis loading buffer (6 x Gel Loading Dye) (AB-0594)

Zusammensetzung:

15 % *Ficoll 400*

0,06 % Bromphenolblau

0,06 % Xylol-Cyanol FF

30 mM EDTA

Applied Biosystems/ Perkin Elmer Deutschland GmbH, Weiterstadt

GeneAmp[®] MgCl₂ Solution 25 mM (in N8080167 enthalten)

GeneAmp[®] 10 x PCR Buffer II (in N8080167 enthalten)

Zusammensetzung:

100 mM Tris-HCl (pH 8,3)

500 mM KCl

Lagerung bei -20°C

SIX PAQ ATAQ + BUFFER II: AmpliTaq[®] DNA Polymerase (N8080167)

Zusammensetzung:

5 U/µl *AmpliTaq[®] DNA Polymerase*

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

100 mM KCl

0,1 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

1 mM DTT

50 % Glycerol

0,5 % Tween 20[®]

0,5 % Nonidet P40[®]

Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

Plastik-Einmalpipetten Safe Seal Tips, RNase-frei, DNase-frei:

20 µl (780027)

200 µl (780202)

1000 µl (781002)

1,5 ml-Mikrozentrifugengefäße, RNase-frei, DNase-frei (710318)

2,0 ml- Mikrozentrifugengefäße, RNase-frei, DNase-frei (710328)

Gelbond (863734)

Multicycler PTC 200

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Agarose *Rotigarose*[®] (Agarose NEEO; Ultraqualität) (2267.4)

Ampicillin (Natrium-Salz) > 99 % (K029.1)

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid (X-Gal; in Pulverform) ≥ 99 % (2315.2)

Dimethylsulfoxid *Rotipuran*[®] ≥ 99,5% p.a. (9065.3)

Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat (Na₂HPO₄ x 2 H₂O) ≥ 99,5 % p.a. (4984.2)

Eosin (7089.1)

Essigsäure ≥ 99,8 % p.a. (3738.1)

Ethanol *Rotipuran*[®] (RNase-/DNase-frei) ≥ 99,8 % p.a. (9065.3)

Ethanol 100 % vergällt (K928.1)

Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml) (2218.1)

Glycerol *Rotipuran*[®] (wasserfrei) ≥ 99,5 % p.a. (3783.1)

Isopropanol (2-Propanol/ Isopropylalkohol) ≥ 99 % (9866.49)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) ≥ 99,5 % p.a. (3904.2)

Methylalkohol (Methanol) ≥ 99 % (8388.1)

Natriumchlorid (NaCl) krist. ≥ 99,5 % p.a. (3957.1)

Natriumhydroxid (Plätzchen) ≥ 99 % p.a. (6771.1)

N,N-Dimethylformamid-Lösung > 99,9 % p.a. (6251.1)

Xylol-Ersatz *Roti-Histol*[®] (6640.1)

Färbekasten (H549.1)

Glaskasten (H554.1)

Färbegestell (H552.1)

Drahtbügel (H553.1)

Chemipharm GmbH, Sulzbach

Formaldehyd-Lösung 36 % DAB 7 (4210756255)

Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

DAKO-PEN (S2002)

Glycergel (C056330)

DIFCO-Laboratories, Detroit, USA

Bacto-Agar (0140-01)

Fluka Feinchemikalien, jetzt: Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze

Ampicillin (10047)

Dextransulfat (31395)

Diethylpyrokarbonat (DEPC) (32490)

Imidazol (36750)

Paraformaldehyd (76240)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (93352)

Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GfL), Burgwedel

Wärmeschrank (7601)

Wasserbad (1013)

ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, USA

Natrium-EDTA-Trypsin-Lösung (16-891-49)

Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

pCR®2.1-TOPO® Vektor-Kit

TOPO TA Cloning® pCR®II-Topo® Kit

Kreatech Diagnostics, Amsterdam, NL (Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg)

Target Unmasking Fluid® 3 x (TUF®) (SP-0000-TUF3)

Life Sciences Int. GmbH, Frankfurt/M.

Coverplates™

Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren

NucleoSpin® Extract 2 in 1-Kit

Nucleobond® Kit PC 20 (740571.100)

Marabuwerke GmbH & Co, Tamm

Fix-o-gum® (290117000)

Menzel Gläser, Braunschweig

SuperFrost®/Plus-Objektträger (041300)

Merck Eurolab GmbH, DarmstadtCaCl₂ (102382)

Dimethylformamid (1.03053.1000)

Formamid, 100%, nicht deionisiert (109684.1000)

HCl, 1N (109970)

KCl (4938)

MgCl₂ x 6 H₂O (105833)

NaCl krist. (1064000.5000)

Papanicolaou 1b-Lösung, (9254)

Saures Hämatoxylin nach Ehrlich (K22638002)

Triethanolamin (1083790250)

Wasserstoffperoxid Perhydrol® (H₂O₂) 30 % (1.07210.0250)**PAA-Laboratories, Cölbe**

Fetales Kälberserum (FKS) (A 15-042)

Trypsin (L11-004)

Penicillin/Streptomycin (P/S) (P 11-010)

RPMI 1640 1x (E 15-840)

Qiagen, Heidelberg

EDTA EasySol; 0,5 M EDTA-Na₂ (pH 8,0) (EDTA05M1)

Formamid, 100%, deionisiert (FORMD003)

10 x PBS (PBS10X02)

20 x SSC (standard saline citrate) (SSC20X01)

Triton X-100 (TRX10001)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

anti-digoxigenin-AP Fab fragments, 150 U (1093274)

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)

Proteinase K (1413783)

RNase A (1119915)

RNase T1 (109207)

Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande

Tissue Tek® O.C.T Compound (4583)

Serva, Boehringer Ingelheim, Bioproduct Partnership, Heidelberg

EDTA-Na₂ (11280.01)

Casein-Pepton (Peptone from Casein) (48600)

Hefe-Extrakt (Yeast extract Servabacter) (24540)

Natrium-EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0) (11280)

Sigma-Aldrich, Steinheim

3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid DAB > 99 % p.a.) (D-5637)

β(2)-di-Mercaptoethanol > 98 %, p.a. (M3148)

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat) (B6777)

5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-Galactopyranosid (X-Gal) (B4252)

N,N-Dimethylformamid (D-4254)

DNA Sodium Salt Type XIV from Hering Testes (D6898)

Levamisol (L9756)

LiCl [8 M] (7026)

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (N6639)

Piperazin-N,N' bis[2-ethansulfat-Saeure] (PIPES) (P3768)

RNA Type III from *S. cerevisiae* (R7125)
steriles neutrales Schafserum (S2263)
Tris-EDTA Buffer 100 x (100 x TE) (T2985)

Vogel GmbH & Co., Gießen

Paraffin (in Granulatform; Schmelzpunkt: 56 - 58°C)

8.3 Lösungen und Puffer

8.3.1 Zellkultur

Fetales Kälberserum (FKS)

Steriles FKS vor Verwendung für mindestens 30 Minuten auf 56°C erwärmen (Inaktivierung von Komplement); längerfristige Lagerung bei -20°C

Kultivierungsmedium (Nährmedium)

445 ml RPMI 1640
50 ml FKS
5 ml Penecillin/Streptomycin
Lagerung bei 4°C

FKS-freies Medium (Spülmedium)

495 ml RPMI 1640
5 ml Penecillin/Streptomycin
Lagerung bei 4°C

Behälter zur Kultivierung von Zellen

Zell-/Gewebe-Kulturflaschen aus Polystyrol mit abgewinkelttem Halsstück; Verschlusskappe mit gasdurchlässigem Bakterien-/Viren-Filtereinsatz (*vent cap*) [3123-025 (25 cm²), 3103-075 (75 cm²); IWAKI/Braxel Scitech Div. Asahi Techno Glass, Japan; Vertrieb: Dunn-Labortechnik GmbH, Asbach]

Gepufferte Formalinlösung (4 %)

1. 2 g Paraformaldehyd mit 40 ml PBS (pH 7,2 - 7,4) auf 60°C unter Rühren erwärmen

2. 0,1 M NaOH dazugeben, bis das Paraformaldehyd vollständig in Lösung gegangen ist (maximal 10 ml dazugeben)
3. Lösung mit PBS auf 50 ml auffüllen
4. Die Lösung mit 0,1 M NaOH beziehungsweise 0,1 N HCl auf einen pH von 7,2 einstellen

Mikrozentrifugengefäß-Schneidezange

[®]*Micro Tube Cutter*; zum Absetzen der Konus-Spitze von Mikrozentrifugengefäßen
[Z 21708-5; Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, USA]

Einbettkapsel und Filterpapier

Zur Lagerung des Zellpellets während der Fixierung und Einbettung; *Tissue Tek III[®]*, *Biopsy Cassette 4172*; *Tissue Tek II[®]*-Filterpapier [SA-4694; Miles Scientific, Naperville, USA; Vertrieb: Vogel GmbH & Co., Gießen]

8.3.2 Herstellung der Sonden

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Verdünnungen mit Aqua. bidest vorgenommen

Messung der Nukleinsäure-Konzentration, PCR

DEPC-Wasser

- 1) Zugabe von 1 ml DEPC-Lösung (Diethylpyrokarbonat; 32490; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) zu 1000 ml Aqua bidest.; unter langsamem Rühren 15-18 h bei Raumtemperatur inkubieren (bis DEPC-Phase zu kleinsten Tröpfchen verwirbelt ist)
- 2) Autoklavieren bei 121°C für 20 min (DEPC-Wasser muß geruchsneutral sein!)

dNTPs

Gebrauchslösung (dNTP-Mix): je 1:10 in DEPC-Wasser verdünnen und anschließend alle dNTPs zu gleichen Teilen mischen. Lagerung bei -20°C; Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs): dATP/dCTP/dGTP/dTTP (je 100 mM; pH 7,5), U1330 [Promega GmbH, Mannheim]

Primer

MWG-Biotech AG, Ebersberg

1. Lösung der Lyophilisate nach Herstelleranweisung
2. Gebrauchslösung: Ein Aliquot der Primer-Stammlösung auf 25 pmol/μl (1:4 in DEPC-Wasser) verdünnen

Messung der Nukleinsäure-Konzentration

Genequant II; Messung der RNA-/DNA-Konzentration der RNA-/DNA-Extrakte, Messung der Primer-Konzentration (DNA-Oligonukleotide) [Pharmacia Biotech/ LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK]

Meßküvette

Hellma[®] Quarzglas Suprasil Typ 105.202.008-QS; Probenvolumen: 100 μl, Schichtdicke der zu messenden Lösung: 10 mm [Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim]

Thermocycler

MultiCycler PTC 200 mit Reaktionsblock (*Alpha Unit*) *48/48 Dual Block* für 0,2 ml-Reaktionsgefäße (Gesamtkapazität: 96 x 0,2 ml-Reaktionsgefäße); Thermocycler nach dem Peltier-Prinzip (thermoelektrische Erwärmung/Kühlung) [MJ Research Inc., Waltham, USA; Vertrieb: Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf]

Heizblock

Thermostat 3401; zum raschen Auftauen der Reagentien [Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg]

Vortexer

IKA[®]-Works MS1 Minishaker [Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen]

Zentrifuge

Tischzentrifuge Roth[®] MicroCentrifuge Model SD [T464.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe]

Reaktionsgefäße

Aus Polystyrol; mit flachem Deckel; Volumen: 0,2 ml; RNase-/DNase-frei; autoklavierbar [711082; Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf]

Gelelektrophoretische Detektion der PCR-Produkte

Tris-Borat-EDTA -Puffer (TBE)

Stammlösung (10 x):

108 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan [Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH] (93352)

55 g Borsäure [Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH] Borsäure > 99,5 % p.a. (15663)

40 ml Na-EDTA [ICN Biomedicals Inc., Casta Mesa, USA]

Aqua bidest. ad 1000 ml

Stammlösung kochen (15 min, 100°C)

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 in Aqua bidest. verdünnen

Lagerung bei Raumtemperatur

Ethidiumbromid-imprägniertes Agarose-TBE-Puffer-Gel

Protokoll für zwei Agarose-Gele (Dicke: 5 mm, je 20 Slots):

1. 1,82 g Agarose mit 91 ml TBE-Puffer 1 x im Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle kurz aufkochen lassen, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Auf 60°C abkühlen lassen.
2. 1,8 µl Ethidiumbromidlösung (Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml), 2218.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) dazu geben und gut mischen.
3. Die noch flüssige Agarose in die Plexiglasform ausgießen und beide Kämme (für 20 Slots) im Spannrahmen befestigen. Gel vor Gebrauch mindestens 1 h lang fest werden lassen

Lagerung der fertigen Gele bei 4°C für max.1 Woche (luftdicht in Plastikfolie verpackt)

DNA-Fragment-Leiter

Stammlösung: *Superladder low*; 10 DNA-Fragmentlängen (100 bis 1000 bp) in einem Abstand von jeweils 100 bp

Gebrauchslösung (Menge ausreichend für einen Slot):

3 µl *Superladder low*

3 µl *6 x Gel Loading Dye* (s. 8.2)

7 µl Aqua bidest.

Lagerung: 4°C bei regelmäßigem Gebrauch, ansonsten bei -20°C

Pro Agarosegel mit 20 Slots werden jeweils 2 Slots für linker- und rechterseits die Proben flankierende Leitern benutzt

Gel-Elektrophorese-Kammer

Aus Plexiglas; zur waagrechten Elektrophorese; Befüllung mit ca. 300 ml 1 x TBE

[Von-KEUTZ-Laborgeräte GBR, Reiskirchen]

Gieß-Einsätze, Steck-Kämme

Einsätze aus Plexiglas, Kämmе aus Plastik; geeignet zum Gießen von zwei zusammenhängenden Agarose-Gelen mit jeweil 20 Slots und einer Dicke von 5 mm

[Von-KEUTZ-Laborgeräte GBR, Reiskirchen]

Stromquelle für die Elektrophorese-Kammer

Consort E425 Microcomputer Electrophoresis power Supply; Standard-Einstellung: 500 mA/120V [CONSORT nv, Turnhout, B]

UV-Transilluminator

TF-20 M; 6 UV-Leuchtröhren (je 15 W); Wellenlänge: 312 nm [Vilbert Lourmat, Marne La Vallee, F]

Kamera

Polaroid MP4 Land Camera 44-01; mit Stativ und Filmkassette für Polaroid-Filme (Sofortentwicklung) [Polaroid Corp., Cambridge, USA]

Film-Material

Polaroid Typ 667 DP (3¼ x 4¼ “), ISO 3000/36° [Polaroid (U.K.) Ltd., St. Albans, UK; Vertrieb: Besier OHG; Wiesbaden (110378)]

Klonierung**Luria-Bertani (LB-)Medium (pH 7,0)**

Casein-Pepton 1% (s.8.2)

Hefe-Extrakt 0,5 % (s.8.2)

NaCl: 1 % (s.8.2)

1 N HCl beziehungsweise 1 M NaOH zur pH-Wert-Einstellung auf pH 7,0

Ampicillin (s. 8.2)

Lagerung bei 4°C

Zusatz von 80 µg/ml zum LB-Medium nach Abkühlung auf 55°C

Agarose

Zugabe von 15 g/l zum LB-Medium für die Herstellung von LB-Agar-Platten

X-Gal

Lagerung bei –20°C und vor Licht geschützt; Stammlösung: 40 mg/ml

Extraktionskit für PCR-Produkte

NucleoSpin[®] Extract 2 in 1; zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionsansätzen und Agarosegel-Banden

[740 590.250; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren]

Beinhaltet:

NucleoSpin tubes (DNA-Filtrationseinheit)

2 ml-Mikrozentrifugengefäße (Sammelgefäß für das Filtrat)

Buffer NT1 (Lyse der Agarose)

Buffer NT3 (Aufreinigung)

Buffer NE (Elution der DNA aus den *NucleoSpin tubes*)

Klonierungskit

TOPO TA Cloning[®] *pCR*[®]*II-TOPO*[®]; zur Klonierung von PCR-Produkten in Plasmid-DNA und Transformation von *E. coli* [K4600-01; Invitrogen BV, Groningen, NL]

Beinhaltet:

TOPO TA Cloning[®] *reagents* (Box 1; Lagerung bei -20°C):

pCR[®]*II-TOPO*[®]-Plasmid-DNA (10 ng/ml) in 50 % Glycerol

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

1 mM DTT

0,1 mM *Triton X-100*

100 µg/ml BSA

Phenolrot

10 x PCR Puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3)

500 mM KCl

25 mM MgCl₂

0,01 % Gelatine

Salz-Lösung: 1,2 M NaCl

0,06 M MgCl₂

dNTP Mix: je 12,5 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP

M13 Forward (-20) Primer (0,1 µg/µl in TE-puffer)

M13 Reverse Primer (0,1 µg/µl in TE-puffer)

Control Template (0,1 µg/µl in TE-puffer)

Control PCR Primers (0,1 µg/µl in TE-puffer)

Steriles Wasser

One Shot[®] *Reagents* (Box 2; Lagerung bei -80°C):

SOC-Medium: 2 % Trypton

0,5 % Hefe-Extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

TOP 10-Zellen (Chemokompetente/*Elektrocomp*TM *E. coli*)

pUC18-Kontroll DNA (10 ng/µl)

Plasmid-DNA-Extraktionskit

NUCLEOBOND[®] PC 20-AX-Kit; zur Isolation und Aufreinigung der klonierten/transformierten Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen [740571-100; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren]

Beinhaltet:

Buffer S1 (Lyse der Zellen)

Buffer S2 (Lyse der Zellen)

Buffer S3 (DNA-Fällung)

Buffer N2 (Äquilibration der *NUCLEOBOND[®] AX Cartridge*)

Buffer N3 (DNA-Aufreinigung)

Buffer N5 (DNA-Elution)

Schüttler

SM 25 Schüttler; zur Transformierung und Kultivierung der *One Shot[®] TOP10-E. coli* [Edmund Bühler Laborgerätebau, Glastechnik, Umwelttechnik, Tübingen]

Photometer

UV-1202 UV-VIS Spectrophotometer; zur Messung der Plasmid-DNA-Konzentration [Shimadzu Europe Ltd./Shimadzu Deutschland GmbH]

Agar-Platten-Schalen

Rotilabo[®]; Durchmesser: 90 mm, Höhe: 14 mm [222.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe]

RT-Reaktion und Digoxigenierung

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7); zur *in vitro* Transkription und Digoxigenin-Markierung [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany]

Beinhaltet:

NTP labeling mixture (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5 (20°C))

Transkriptionspuffer (10x conc.)

DNase I, RNase-free (10 U/μl)

RNase inhibitor (20 U/μl)

SP6 RNA polymerase (20 U/μl)

T7 RNA polymerase (20 U/μl)

8.3.3 In situ-Hybridisierung

DEPC-Wasser (s. 8.3.2)

1 x PBS (pH 7,4)

100 ml 10 x PBS (steril; PBS10X02; Qbiogene, Heidelberg)

900 ml Aqua bidest

Einstellen des pH mit 0,1 M NaOH

2 x SSC + 5 mM EDTA-Na₂

50 ml 20 x SSC (SSC20X01, standard saline citrate; Qbiogene, Heidelberg)

5 ml 0,5 M EDTA-Na₂ (EDTA Easy Sol, EDTA05M1; Qbiogene, Heidelberg)

ad 500 ml Aqua bidest.

1 M Tris-HCl (pH 8,0)

12,11g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (93352; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

100 ml Aqua bidest. Einstellen des pH mit konzentrierter Salzsäure

0,25% Acetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 7,5)

Komponente	Menge	Besonderheiten	Hersteller [Bestell-Nummer]
Triethanolamin	894 mg		Merck Eurolab GmbH [1083790250]
DEPC-Wasser	ad 60 ml	pH mit 1 M HCl auf 7,5 einstellen	s. 8.3.2
Acetanhydrid	150 µl		Fluka Chemie AG [45830]

50 x Denhardts

100 ml Denhardt´s Solution (DENH1003; Qbiogene, Heidelberg)

100 ml Aqua bidest.

Prähybridisierungs-Mix (PHB-Mix)

Komponente	Menge	Hersteller [Bestell-Nummer]
20 x SSC	450 ml	Qbiogene [SSC20X01]
100% Formamid, deionisiert	675 ml	Qbiogene [FORMD003]
50 x Denhardts	150 ml	s. 8.3.2
DEPC-Wasser	210 ml	s. 8.3.2

Gesamtmenge: 1485 ml (30 Aliquots à 49,5 ml); Lagerung bei -20°C

Puffer 4 (pH 8,0)

Komponente	Menge	Endkonz.	Hersteller [Bestell-Nummer]
Tris-HCl	1,21 g	10 mM	Fluka [93352]
EDTA- Na_2	0,37 g	1 mM	Serva [11280.01]
Aqua bidest.	ad 1000 ml		

Einstellung des pH mit 2 N HCl

ssDNA (Stammlösung: 10 mg/ml)

250 mg Deoxyribonucleic acid (DNA) Sodium Salt Type XIV from Herring Testes (D 6898 Sigma-Aldrich Chemie AG, Steinheim)

25 ml Puffer 4 (pH 8,0; s. vorige Tabelle)

RNA-Stammlösung (10 mg/ml)

10 mg RNS (R 7250; Sigma-Aldrich Chemie AG, Steinheim)

1 ml DEPC-Wasser (s. o.)

0,5 M PIPES (Piperazin-N,N'-bis[2-ethanesulfonsäure])

1,7315 g PIPES (P3768; Sigma-Aldrich Chemie AG, Steinheim)

10 ml Aqua bidest.

Steril herstellen!

20 x Hybridisierungssalze

Komponente	Menge	Endkonz.	Hersteller [Bestell-Nummer]
EDTA, pH 8,0; 0,5 M	10 ml	0,1 M	Qbiogene [EDTA05M1]
PIPES, pH 7,0; 0,5 M	10 ml	0,1 M	s. 8.3.2
NaCl; 5,0 M	30 ml	3,0 M	s. 8.3.2

Hybridisierungspuffer

Komponente	Menge	Hersteller [Bestell-Nummer]
100 % Formamid, deionisiert	16 ml	Qbiogene [FORMD003]
20 x Hybridisierungssalze (s. vorige Tabelle)	8 ml	s. 8.3.2
50 x Denhardts	3,2 ml	s. 8.3.2
Heparin (Liquemin [®] N, 25000 Heparin-Natrium)	320 µl	Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz [57740]
10% Triton X-100 (10 ml Triton X-100, 90 ml Aqua bidest.)	320 µl	Qbiogene [TRX10001]

Gesamtmenge: 27,84 ml (40 Aliquots à 696 µl); Lagerung bei – 20°C

Dextransulfat

250 mg Dextransulfat (31395; Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

400 µl DEPC-Wasser (s. 8.3.2)

Im Mikrozentrifugengefäß ansetzen, gut mischen und in warmem Wasser lösen. Nicht benutzten Rest verwerfen

6 x SSC mit 45% Formamid (für 120 ml)

Komponente	Menge	Hersteller [Bestell-Nummer]
20 x SSC	36 ml	Qbiogene [SSC20X01] (standard saline citrate)
100% Formamid (nicht-deionisiert)	54 ml	Merck Eurolab GmbH [109684.1000]
Aqua bidest	30 ml	

im Wasserbad vorinkubieren (d. h. auf 42°C erwärmen)

Lösung zur RNase-Behandlung (für 60 ml)

Komponente	Menge bzw. Konzentration	Hersteller [Bestell-Nummer]
NaCl	10 ml (3 M)	s. 8.3.2
Tris (pH 8,0)	600 µl (1 M)	s. 8.3.2
EDTA (pH 8,0)	120 µl (0,5 M)	Qbiogene [EDTA05M1]
Aqua bidest.	49 ml	
RNase A	30 µl (15 µg)	Roche Diagnostics [1119915]
RNase T1	10 µl (5000 U)	Roche Diagnostics [109207]

im Wasserbad vorinkubieren (d. h. auf 37°C erwärmen)

Puffer 1 (pH 7,5)

Komponente	Menge	Endkonz.	Hersteller [Bestell-Nummer]
Tris-HCl	12,11 g	100 mM	Fluka [93352]
NaCl	8,77 g	150 mM	Merck Eurolab GmbH[1.06400.5000]
Aqua bidest.	ad 1000 ml		

Einstellung des pH mit konzentrierter HCl

RT-Blocking-Lösung (für 60 ml)

Komponente	Menge	Hersteller [Bestell-Nummer]
steriles neutrales Schafserum	1,2 ml	Sigma [S 2263]
10% Triton-X 100 [®] (10 ml Triton X-100 + 90 ml Aqua bidest.)	1,8 ml	Qbiogene [TRX10001]
Puffer 1 (s. vorige Tabelle)	ad 60 ml	s. vorige Tabelle

Anti-DIG-Antikörper-Lösung

Komponente	Menge	Besonderheiten/ Hersteller [Bestell-Nummer]
Anti-digoxigenin-AP-Fab fragments, 150 U	15 µl	Roche [1093274]
steriles neutrales Schafserum	31 µl	Sigma [S 2263]
10% Triton-X 100 [®] (10 ml Triton X-100, 90 ml Aqua bidest.)	94 µl	Qbiogene [TRX10001]
Puffer 1	3 ml	auf 37°C vorwärmen

Puffer 3 (pH 9,5)

Komponente	Menge	Endkonzentration	Hersteller [Bestell-Nummer]
Tris-HCl	2,422 g	100 mM	Fluka [93352]
NaCl	1,168 g	100 mM	Merck Eurolab GmbH [1.06400.5000]
MgCl ₂ x6 H ₂ O	2,034 g	50 mM	Merck Eurolab GmbH[105833]
Aqua bidest.	ad 200 ml		

Einstellung des pH mit 1 M HCl vor der Zugabe von MgCl₂

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Stammlösung (Endkonzentration: 75 mg/ml)

1 g NBT (N 6639; Sigma-Aldrich Chemie AG, Steinheim)

13,3 ml 70% Dimethylformamid (s.o.)

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat, BCIP)-Stammlösung (Endkonzentration 50 mg/ml)

500 mg X-Phosphat (B6777; Sigma-Aldrich Chemie AG, Steinheim)

10 ml 100% Dimethylformamid (1.03053.1000, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)

Substratlösung

Komponente	Menge	Hersteller [Bestell-Nummer]
NBT (75 mg/ml)	150 µl	Sigma-Aldrich [N 6639]
X-Phosphat	120 µl	Sigma-Aldrich [B6777]
Levamisol	30 mg	Sigma-Aldrich [L9756]
Puffer 3	ad 60 ml	s.o.

8.3.4 Immunhistologie

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10 x):

60,57 g Tris

610 ml Aqua dest.

390 ml HCl 1N

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8 % (in Aqua dest.)

Einstellung des pH auf 7,6 mit 1N HCl

TUF[®]

Target Unmasking Fluid[®]; zur Demaskierung der mittels Antikörper zu detektierenden Antigenstrukturen im Schnitt

Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)

6,81 g Imidazol

ad 1000 ml Aqua dest.

Zugeben von 500 ml 0,1 M HCl (Lösung ca. 1 Woche haltbar)

DAB-Lösung

100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer), filtrieren

Unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30% H₂O₂ zugeben

Papanicolaous Hämatoxilin

Papanicolaous Lösung und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

8.4 Sequenzierungsergebnisse

gp70 A Sequenzierung (T7)

TGGGCCCTCTAAATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTCA
ACAGTCGTTAGTTGTGTTGGGGTCGGTGGCATTAAAGCTAGGTATGTCCCTTGTACTAAATTTAT
 gp70-A lower
 TAACCTATCTCCGGTCCCAATCCGTTTGGGACCCATGGTGGTGGGGGCAACAGACCTTGGGGCGCT
 TTCATTGTTTTGGGGCCTCTGGGTCCCCACTTTGGACCCTGTTTGANATTGTCGGGANGGGGGCCCC
 CCNCCNNNCNNCCNCTGNCCNNCCNNCNCCTCTNCNCCCCCCCCCTNCNCCANN
 CNNCNTNCATNCCGNGCGGTNATATCCNGTNCGGTTNNNCCCTNCCGCGCCNCCCGCCTNCNANT
 gp70-A upper
 TCCTNNTTCTTCTNCNCCNNTCCCTCTCACNNCCNACATCCTNACNTNCNCTATAGNCTNACC
 Sp 6 Promoter
TAANTTNGANCCGCNNTACTANGGTNNTAGCNNNTTGCNGCCTNCCCCNCGTCCNCCNCCNCCN
 M13 Reverse
 TCGC

gp70 A Sequenzierung (Sp6)

AGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTC
 GCCCTTTATACCGTGCAGGATAGGACCCTATCGCTTTATTCACGGTGTCCCGGCAGGTATCAACC
 gp70 upper
 ATTACGCCGCTCAGGCAATGGGACCAAACCTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCATCCCGACAA
 TCTCAAACAGGGTCCAAAGTGGCGACCCAGAGGCCCAAACGAATGAAAGCGCCCAAGGTCTGTT
 GCCCCACCACCATGGGTCCCAAACgGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAATTTATTACAAGGG
 ACATACCTANCCTTAAATGCCACCGACCCAACACAACTAAAGACTGTTGAAGGGCGAATTCTNCA
 gp70 lower
 GATATCCATNACACTGGCGCCNCTCGAGNATGNATCTAGAGNGCCAAATCCGCCCTNNAGTNAG
 T7 Promoter
TCGTANTNCAANTCACCNNCCGNCGTNNNACATNGTNGTGACTGNNANAANCTGGGAAAACC
 T7 Promoter M13 (-20) Forward M13 (-40) Forward
 TTGNNNGNNCCCANCTTNNNTCNCNNTNCCNCATTTCCNNTTNNCCNCCNNGNNNNNCTTNNC

gp70 B Sequenzierung (T7)

GGGCCCTCTA_gAGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCCGCCCTT**CAAC**
AGTCGTTAGTTGTGTTGGGGTCCGGTGGCATTAAAGGCTAGGTATGTCCCTTGACTAAATTTATTA
 gp70 lower
 ACCTATCTCCGGTCCCAATCCGTTTGGGACTTGCAGGGGTaCTTAGAGGGGCAATGG
 AGGCATTAACAAGAGTTATACCTGGGGTGCCTCCGTTGCCTTGGGAATGGTGAGGCTTACTCCNGA
 NCCTACTCGACANNNGNCTGCCTGGNGGGGTTTGCCCTGCNACCACCTCNCTTTNCTTCNCTCCNCN
 GCCNCNNGGNNNCTNCNCNNNCNCCTTCNTCNCNCNGCNCNCNCNNTCN**GGTCATATNCTGTA**
 gp70 upper
NGGNNNANANNGCGAATTCTNCAANACANTCNTCCNCCCGCNCNCNNTNCCNTCNNTCNATCAC
 ANCCCCCTGCCGCCGNTNCCCN**CNNNAGTATCNCCTANNT**AGCNTNGCGTAANCNT**GGTCNNAN**
 Sp6 Promoter
CTNTTTCNTGNCNTTNTNTNANCCCNTGNNNCCNCNTNNCACCNCTGANTCANCTCN
 M13 Reverse

gp70 B Sequenzierung (Sp6)

GCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCaCTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCCG
 CCCTTT**TATACCGTGCAGGATAGGACC**CTATAGCCCTGTTCTCGGTATCCCGGCAAGTAATGACCA
 gp70 upper
 TTACGCCGCCTCAGGCCATGGGACCAAATCTAGTCCTGCCTGATCAAAAACCCCATCCAGGCAAT
 CTCAAATAGAGTCCCGAGTAACACCTCACCTCCCAAGGCAACGGAGGCACCCAGGTATAACTC
 TTGTTAATGCCTCCATTGCCCCCTAAGTACCCCTGTCACCCCGCAAGTCCCAAACGGATTGGGAC
 CGGAGATAGGTTAATAAATTTAGTACAAGGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACC**CCAACA**
CAACTAACGACTGTTGAAGGGGCGAATTCTGCA_gATAT_cCATCACACTGGCGGGCGNTCGAACNT
 gp70 lower
 TCNTTTAAAGGGCCCAATTCG**CCCTATAGNGAGTNGNATTA**CAATTCA**CTGGGCGTTCGNTTTA**
 T7 Promoter M13 (-20) Forward
NAACNTCGTGACTGGGACAANTGGCTTCCCCNACTTNAATCCCNTTGANNACATTCCCCNTTTCCC
 M13 (-40) Forward
 AATTNGCGNNAANTCNAAAAANGGCCNCCCATCNCCTTTNNAACNAANTNNNNNANNCCTNT
 AATTNGNNNANTAGGNCCCCCCTTTNTNNNNNNCTTTTNTANCNCNNNNGGNGGGGNGGNNTCCN
 CCCC

gp70 C Sequenzierung (T7)

TTGGGCCCTCTA_{gat}GCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTCA
ACAGTCGTTAGTTGTGTTGGGGTCGGTGGCATTAAAGGCTAGGTATGTCCCTTGCCTAAATTTA
 gp70 lower
 TTAATCTATCTCCGGTCCCTATCCGTTTGGGACCCATGGTAGCGGAGGCGACAGACCTTGGGGTGC
 TGCTAGTTATTTGGGGCCTCTGGGTTGTCACCTTGGACTTTGTTTGGAGATTGTCGGGATGGGGGTTT
 TTGATCAGGTAAGACTAAGTTGGTCCCATCGCCTGAGGCGGCGTAATGGTCATTACTTGCCGGGA
 TACCGA_gAACAGGGCTATAGGGTCCCTATCCTGCACGGTATAAAGGGCGAATTCCA_gCACACTGGC
 gp70 upper
 GGGCGTTACTAGTGGATCCGA_gCTCGGTACCAAGCTTGATGCATANCTGAGTATTCTATAGTGTC
 Sp6 Promoter
ACCTAAATNNCNTGGCNGNATCATNGTNATAGCNGNTTCCCNNTTGTGTGAAAAATNNTNTNCCC
 M 23 Reverse
 NTCACNATTNCNNCACAACATAACNANCCCGGNANNCATNAAANNGGNNAANCCTGGGGNNNCCTN
 ATNANNGANCNNTTCCCATTNANTTNNNTNNTNCCNCCCTNCCCCCCTTNC

gp70 C Sequenzierung (Sp6)

AGCTTGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCG
 CCCTTTATACCGTGCAGGATAGGACCCTATAGCCCTGTTCTCGGTATCCCGGCAAGTAATGACCA
 gp70 upper
 TTACGCCGCCTCAGGCGATGGGACCCAACCTTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCATCCCGACAAT
 CTCAAACAAAGTCCAAGGTGACAACCCAGAGGCCCAAATAACTAGCAGCACCCCAAGGTCTGTC
 GCCTCCGCTACCATGGGTCCCAAACGGATAGGGACCGGAGATAGATTAATAAATTTAGTGCAAGG
 GACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACACAACTAACGACTGTTGAAGGGCGAATTCTG
 gp70 lower
 CAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTA_gAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGA
 T7 Promoter
GTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC
 T7 Promoter M13 (-20) Forward M13 (-40) Forward
 CAACTTAATTGC_cCTTGCAG_cACAT_cCCCCTTTCGCCAACTGGCGTAATAACGAAAAAGGCCCNACC
 GATCGCCTTTCCAACAANTTGCGCACCTTAATGGGGAATGGACNCNCCCTTTTNNCGGGGCATTTA
 ACNCGGNGGGGGGNNGGGTNNNCNCNNNNNNNNCNCNNNNNTTTNNNNNNNCCTNNNNCCCNNN
 CTTTNNNTTNTTNCNTTCNTTTTNNCNCNNNNNNCNGNTTTTCCNNNAANNTTNAAN

gp70-ges. Sequenzierung (T7)

GCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTTTACAGGCCCAATAGGTGC
 gp70-ges. lower
 CGTTGGGGGGCGGGCTAGATAGTGCCCCTGTATGTCCCTATTGTGTCTTATTGCACAAAGCCGGTGG
 GTTCTAGGAACAGTCCCTATGCACAATTCCATGCCCTGANACTTCAGATATAGTTAGTTTGTGTTGC
 NNAGTAGATAGGCAGGATGGGGNCCGGTTTGTATGGTTGCTGTAGTTACCTAAGANTGCAATCCC
 gp70-ges. upper
TAAGGGCGAATTCGATATCGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTC
 Sp6 Promoter
GCTAAATAGCTAGGCGTAATCATGGTCANAGNTGTGTCCNGGCTNTATGCAATANNAGCGCATT
 Sp6 Promoter M13 Reverse
 NAGCCCGNTTATGCTTANNNGNTC

gp70-ges. Sequenzierung (Sp6)

CTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAGGGATTGCANTCTTAGGT
 gp70-ges. upper
AACTACAGCAACCAAACAAACCCCCCCCCATCCTGCCTATCTACTCCGCAACACAACTAACTATA
 TCTGAAGTATCAGGGCAAGGAATGTGCATAGGGGCTGTTCTAAAACCCACCAGGCTTTGTGCAAT
 AAGACACAACAGGGACATACAGGGGCGCACATTCTAGCCGCCCCAACGGCACCTATTNGGCCT
 gp70-ges. lower
GTAAAAGGGCGNATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTT
 GGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCGACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGNCTGG
 T7 Promoter M13 (-20) Forward M13 (-40) Forward
GAAAACGTCCCAAATGGTACCTAGGGGTCATGTTCTNNGSTNNGGTCNAAACANN TGGTN

p27 Sequenzierung (T7)

ANNAGAAAAACCCCAATTATTTATTTNCCCNCCGGTTCCCTCCTAAAGCANGCTTCGATCNG
 CNCGNTNNTGTNATGGATATCCTGCNCCANTTCGCCCTTCCAGAGGAANGGAAGAANGATGGTC
 p27 lower
 TCCCTTTTGTGTATATCTTTTCTGCCTCTTTNAGCANATCAGATAGGGTGAACCCCTGTNGGCCTTC
 TAACCTTGGNNCTTANTTCTTATGTCCAGGNCTAGACTGGTANATAAAGGACAGGATNNCACTAA
 CACGCCTGCCNNGGTCTTTANGGTCATAGGGAGTATAACATTCTGTAANCCTCTTTAATCTCTCTA
 AAAATGCTGCNTGGCCGTTTCTTCTTTCCCTTGCACAACTNGCTTTACCCTAGTGCCNAAANCTANA
 TGGGGCGTTCNTGCNCCCCCGCNCAGACCCCTAAATAGNNANNCAACTGGNGATAAAGGN
 p27 upper
GTAAAGGGCGACTTNCAGCACACNNGGCGGCCGTTATTATTGGANCCGAGCTCGGGACCAAGCTTG
 ATGCATAGCTTGAGNNTTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATNCTCATAGCTGTT
 Sp6 Promoter M13 Reverse
TCCNGNNATCAANGCCNCAAANGGGNCAAAN

p27 Sequenzierung (sp6)

CCTTTAGTAACGGCCGCCNNGTGCTGGAATTCGCCCTTTTACGCCTTTATCGCCAGTTGCTATTAN
 p27 upper
 CGGNTCTCCGCGGGGCTGCAAGACCCCCACTAATTCGGCACAGGTAAAGCAAGTTGTGCAAGGG
 GNNGAGGAAACGCCATCATCATTCTAGAGAGATNAAAACAGGCTTACAGAATGTATACTCCCTAT
 GACCCTGAAGACCCGGGGCAGGCTGCTAGTGTTATCCTGTCCTTTATTTACCACNCTAGGCCAGAC
 ATAAGNANTAAGTTACAAAGGCTNGAAGGCCTACAAGGGTTCACCTATCTGATCTGCTGAAAGA
 GGCNGAAAAGATATACAACAAAAGGGAGACCATCTTTCTTCCCTTTNCTCTTGAAGGGCGAATT
 p27 lower
 CTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCNCGAGCATGCNTCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATA
GTGAGTCGTANTACAACTCACTGGCCGNCGTTCTACAACGCCGNGACTGGGAAAACCCCTGGCC
 T7 Promoter M13 (-20) Forward M13 (-20) Forward
 GTTACCCAACCTAATCGTTTTGCANACATCCCCCTTTGCCATCTGGCGTANTANCGAAAAANGCC
 CCCTACCCGA

p15E Sequenzierung (T7)

TTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTCCTTAGTGA
 p15E lower
TCCTACTCCTAATGGCCCATGATGGAGGATATTAAGGTAGTGAACCAGGGGGACTTGTGAAACCA
 p15E lower
 CCCTCAAACCATCCCTGCTGGGAGTCAAATAGTTGTTGTCGCGGTCNTAATCCTACTCCTAATAA
 p15E upper
 GGGCGAATTCGATATCGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTCACCT
 Sp6 Promoter
AAATAGCTAGGCGTAATCATGGTCATAGNTGTTCCNGTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC
 M13 Reverse
 CCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCCTA

p15E Sequenzierung (sp6)

GCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCATATCGAATTCGCCCTTATTGAGAGAGAGAGTAAA
 p15E upper
ACAGCGACAACAACCTATTTGACTCCCACAGGGATGGTTTGAAGGTGGTTCAACAAGTCCCCCTGGT
 CACTACCTTAATATCCTCCATCATGGGCCATTAGGAGNAGGATATCCAGTAAGGAAAGGGCGAATT
 p15E lower
 CCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGGTCTCCCTATAGTG
 T7 Promoter
AGTCGTATTACAATCGACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACGAGCTCTGCTT
 T7 Promoter M13 (-20) Forward M13 (-40) Forward
 ATATAGACCTCCCACCGTACACGCTACCGCCATTTGCGTCAATGGGGCGGGTTTGTTA

8.5 Abkürzungen

A,a	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Ag	Antigen
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APZ	antigen präsentierende Zellen
Aqua dest./bidest.	Aqua destillata/bidestillata
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
DAB	3.3'Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Env	retrovirales Gen, welches für alle Proteine der Virushülle kodiert
FAIDS	feline aquired immunodeficiency syndrom
FDZ	follikuläre dendritische Zellen
FeLV	Felines Leukämievirus
FKS	Fetales Kälberserum
FOCMA	feline oncoronavirus-associated cell membrane antigen
gag	retrovirales Gen, welches für gruppenspezifische Antigene kodiert
gp70	Glykoproteine (Hüllprotein) von FeLV, 70 000 Dalton
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HB-Mix	Hybridisierungsmix
ID	Immundiffusion
IDZ	interdigitierende Zellen

IF	indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPO	indirekte Immunperoxidase
ISH	in situ-Hybridisierung
IH	Immunhistologie
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LTR	Long Terminal Repeats
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MuLV	Murines Leukämievirus
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n.d.	nicht durchgeführt
obB	ohne besonderen Befund
p10	Coreprotein des FeLV, 10 000 Dalton
p12	Protein des FeLV, 12 000 Dalton
p15E	Hüllprotein des FeLV, 15 000 Dalton
p27	Coreprotein des FeLV, 27 000 Dalton
PALS	periarteriöläre Lymphozytenscheide
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHB-Mix	Prähybridisierungs-Mix
p.i.	post infection
PIPES	Piperazin-N,N'bis[2-ethansulfonsäure]
pol	retrovirales Gen, welches für die reverse Transkriptase (Polymerase) kodiert
Prov.	Provirus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SBH	Southern Blot-Hybridisation
SPF	specific pathogen free
SS	Schweineserum

SSC	standard saline citrate
ssDNA	single strang DNA
TBS	Tris buffered saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TUF	target unmasking fluid
VI	Virusisolierung
X-Phosphat	s. 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, von denen ich bei der Anfertigung dieser Arbeit Unterstützung erhalten habe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die freundliche Aufnahme im Institut für Veterinär-Pathologie, die Überlassung des Themas und seine stets gewährte sachdienliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. A. Kipar danke ich ganz herzlich für die Betreuung und Hilfestellung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Werner Hecht möchte ich mich besonders für die Hilfestellungen und die jeder Zeit anzutreffende Diskussionsbereitschaft bei der Lösung molekularbiologischer Problemen bedanken, ohne die ein Abschluß dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Heike May danke ich die Einführung in die Technik der in situ-Hybridisierung und die freundschaftliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dirk Schwartz danke ich für die Einführung in das Arbeiten mit Zellkulturen und PCR sowie für die Überlassung von FeLV-infizierten Zellen und Primersystemen aus seinen eigenen Arbeiten.

Bei Herrn Dr. Dr. Udo Hetzel möchte ich mich ganz herzlich für die geduldige Einführung in die Arbeit mit dem Photomikroskop und so manches hilfreiches Gespräch bedanken.

Bei allen, die an der Durchführung des FeLV-Infektionsversuches in Zürich und der Sektion der Tiere beteiligt waren, möchte ich mich für die Überlassung der Organproben bedanken.

Bei Tatjan Euler möchte ich mich ganz herzlich für ihre liebevolle Unterstützung und Freundschaft bedanken, die so manche FeLV-bedingte Stimmungsschwankungen beseitigen konnten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, ohne deren Interesse, Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, Kollegen und Freunden aus dem Institut für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre kameradschaftliches Verhalten bedanken, durch die der Aufenthalt am Institut für mich zu einer schönen und lehrreichen Zeit wurde.